

LES GROUPES ACTIFS DE LA RIBONUCLÉASE

II. OXYDO-RÉDUCTION

par

L. LEDOUX*

Laboratoire de Morphologie animale, Université de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Différents auteurs ont montré que certains inhibiteurs des groupes SH inactivent la ribonucléase dans des conditions telles que l'on peut conclure à une action spécifique sur les groupes thiols.

Rappelons à ce sujet les travaux de ZITTLE²⁰ (inactivation par les ions Cu^{+2} , l'iodo-acétate et l'acétate phénylmercurique) et les nôtres (inhibition par le parachloromercuribenzoate de sodium^{15, 17}, la chloropicrine¹⁸ et activation par les réducteurs¹⁶).

A ces résultats semblent s'opposer ceux de HOLMES *et al.*¹² (inactivation par les radicaux hydroxyles et action nulle de l'eau oxygénée), ceux de ROTH^{22, 23} (activation apparente par le parachloromercuribenzoate de sodium) et ceux de TABORDA *et al.*²⁷ (inactivation par les réducteurs).

Nous avons déjà discuté¹⁶ les résultats de ROTH et montré qu'ils étaient parfaitement compatibles avec les nôtres. Le problème soulevé par l'impossibilité apparente de l'enzyme à réagir avec l'eau oxygénée nous a poussé à étudier systématiquement les variations de l'activité enzymatique sous l'influence de divers réactifs d'oxydo-réduction.

Nous avons étudié successivement l'action:

- | | |
|---|--|
| 1. du cyanure | 5. de l'eau oxygénée |
| 2. du sulfite | 6. de l'oxygène de l'air |
| 3. du glutathion réduit ou oxydé | 7. de systèmes à potentiel rédox imposé. |
| 4. de l'acide <i>o</i> -iodosobenzoïque | |

Nous avons pu en tirer un schéma de structure qui rend compte des phénomènes observés et nous l'avons vérifié par des dosages ampérométriques.

MATÉRIEL

1. *Ribonucléase (RNase)*: Nous avons utilisé la ribonucléase cristallisée, dépourvue de sels, fournie par la General Biochemicals inc. Des essais ont été effectués, à titre de contrôle, sur un échantillon d'enzyme fourni par la Worthington Biochemical Sales Co. Des résultats comparables ont été obtenus dans les deux cas.

* Aspirant du Fonds national de la Recherche scientifique belge.

2. *Acide ribonucléique* (ARN): ARN Schwarz purifié et dialysé, mis en tampon acétique 0.2 *M* de pH 5.
3. *Glutathion réduit et oxydé*: Produits Schwarz.
4. *Les réactifs minéraux* sont tous des produits pour analyse (Merck ou UCB).

MÉTHODES

*Méthode spectrophotométrique de KUNITZ*¹⁴. Elle consiste à suivre les variations de la densité optique à 300 mμ d'une solution de ARN à 10/100 en tampon acétique 0.2 *M* de pH 5 sous l'action de la ribonucléase.

On mesure les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle DU thermostaté à 25° C, par rapport à une solution de référence contenant les mêmes constituants que la solution étudiée, exception faite de la ribonucléase.

Méthode ampérométrique^{1, 3, 13, 21}. On forme une pile constituée d'une électrode d'iodure mercurique et d'une électrode de platine vibrante plongeant dans la solution contenant les thiols à doser. On y ajoute des ions argent par fractions d'un μl.

Lorsque les ions sont consommés entièrement par les SH le courant passe dans le circuit et son intensité est proportionnelle à la concentration en ions Ag⁺ libres qui transportent le courant.

RÉSULTATS

Action du cyanure (Fig. 1, a)

Nous avons étudié les variations de l'activité enzymatique d'une solution de ribonucléase à 5 γ/ml sous l'action du cyanure de potassium. Les concentrations en cyanure se répartissaient entre 10⁻⁶ *M*/l et 10⁻¹ *M*/l. La réaction s'effectuait en tampon acétique 0.2 *M* (pH 5). Les résultats ne sont significatifs que jusqu'aux concentrations de cyanure voisines de 10⁻¹ *M*/l vu le pK élevé de cette substance.

Notons que pour une solution molaire en CNK, il y a inhibition apparente de l'enzyme (influence de la variation de pH, dénaturation?).

La courbe *a* de la Fig. 1 qui exprime les variations du logarithme de l'activité enzymatique en fonction des logarithmes des concentrations d'activateur, rend compte des résultats obtenus.

L'action du cyanure sera discutée plus loin de façon approfondie.

Action du sulfite (Fig. 1, b)

L'effet observé est, globalement, le même mais l'activation est cependant plus faible (65 % au lieu de 100 %). Nous avons étudié la variation de l'activité enzymatique en présence de concentrations croissantes d'activateur (de 10⁻⁵ *M*/l à 10⁻¹ *M*/l). Remarquons dès à présent que la RNase oxydée (voir plus loin) est réactivée par le sulfite jusqu'à ce que la moitié de l'activité initiale soit restaurée.

Nous verrons plus loin l'interprétation de ces phénomènes.

Action du glutathion (Fig. 1, c)

Le même effet se retrouve encore, mais l'activation maxima s'obtient déjà à des concentrations relativement faibles en activateur.

Une remarque générale s'impose ici: tous les réducteurs utilisés activent la ribo-

Bibliographie p. 134.

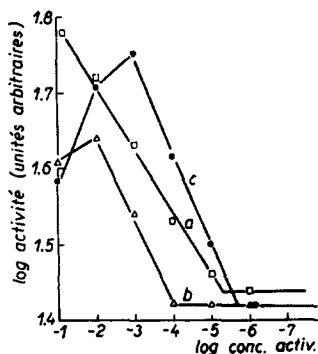


Fig. 1. Action des réducteurs sur l'activité de la ribonucléase

- a. cyanure
- b. sulfite
- c. glutathion

nucléase, mais on peut se demander si cette action n'est pas due à la complexion d'ions métalliques inactivant l'enzyme et à la libération ultérieure des groupes actifs de celui-ci.

Nous avons, par conséquent, tenté de complexer par du versène* les ions métalliques présents; l'activité enzymatique n'a jamais été modifiée, même à des concentrations en versène de l'ordre de 10^{-1} M/l.

L'action du cyanure, du glutathion et du sulfite dépend donc bien des propriétés oxydo-réductrices de ces substances.

Action de l'acide iodosobenzoïque

Cet oxydant doux, spécifique des fonctions SH, nous a fourni les résultats consignés dans les Figs. 2 et 3.

On sait^{8,9,26} qu'aux pH supérieurs ou égaux à 7, aucun groupe autre que les SH n'est oxydé par l'iodosobenzoate, même aux très fortes concentrations. Le fait que l'inhibition est beaucoup plus rapide à des pH supérieurs à 7 peut provenir de la nature des SH de la ribonucléase: supposons, en effet, que ces SH forment des liaisons avec des groupes voisins ($S^-NH_3^+$ par exemple). Les réactifs employés devront, dans cette éventualité, briser d'abord ces liens; la réaction globale dépendra de la valeur relative des vitesses des réactions partielles.

On comprend que si l'on augmente le pH du milieu, les liens $S^-NH_3^+$ (ou tous autres liens du même type) deviendront

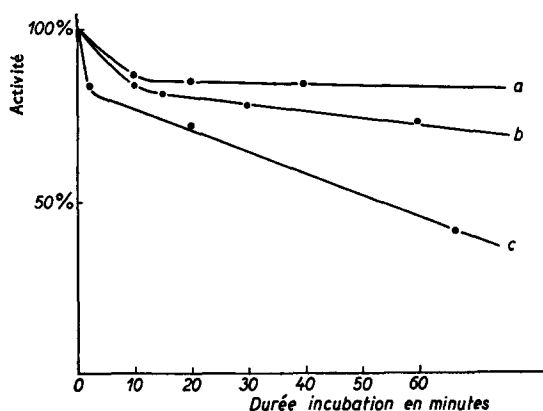


Fig. 2. Action de l'acide iodosobenzoïque à pH 7 (RNase: 5 γ /ml)

a. 10^{-4} M; b. 10^{-3} M; c. 10^{-2} M.

de plus en plus faibles et que l'oxydation pourra s'accomplir plus aisément.

Nous reviendrons d'ailleurs ultérieurement sur cette interprétation.

Action de l'eau oxygénée

Contrairement aux résultats obtenus par HOLMES *et al.*¹² (qui signalent cependant avoir observé parfois une inhibition non reproductible), notre échantillon de ribonucléase s'est montré oxydable par l'eau oxygénée.

Il faut cependant admettre qu'à pH 7 les concentrations de perhydrol requises sont fort élevées, lorsque la réaction n'est pas catalysée.

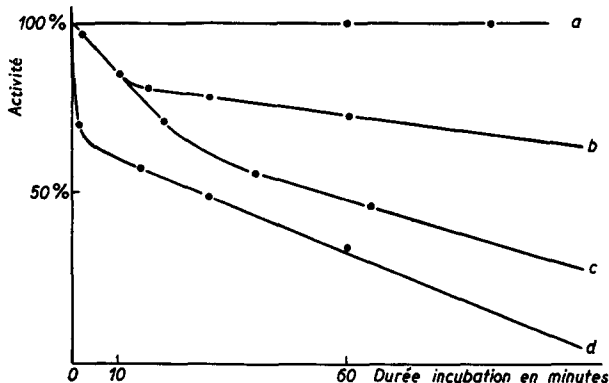


Fig. 3. Action de l'acide iodosobenzoïque 10^{-3} M à différents pH (RNase: 5 γ /ml)

a. pH 5; b. pH 7; c. pH 8.5; d. pH 10.

Le Fig. 4 rend compte de nos résultats (RNase: 4.7 γ /ml).

* Acide éthylène-diamine-tétraacétique.

On voit que pour une concentration 0.9 M en H_2O_2 (pH 7), l'inhibition est lente mais complète en 6 heures environ.

Nous avons déterminé l'activité d'une solution de RNase en présence de perhydrol 0.3 M , 0.6 M et 0.9 M après 6 heures d'incubation et en l'absence de catalyseur. On voit que dans ces conditions et à pH 7, il faut nécessairement de fortes concentrations en perhydrol pour qu'il y ait inactivation.

Nous avons essayé de réactiver l'enzyme par du cyanure 10^{-2} M et nous avons pu ainsi mettre en évidence les phénomènes indiqués en 1, 2 et 3 sur le figure: lorsque l'on ajoute du cyanure à une solution contenant H_2O_2 et de la ribonucléase, l'inhibition de l'enzyme s'accélère fortement: 30-45 minutes suffisent pour obtenir une inactivation qui nécessiterait 5 heures d'incubation sans cyanure.

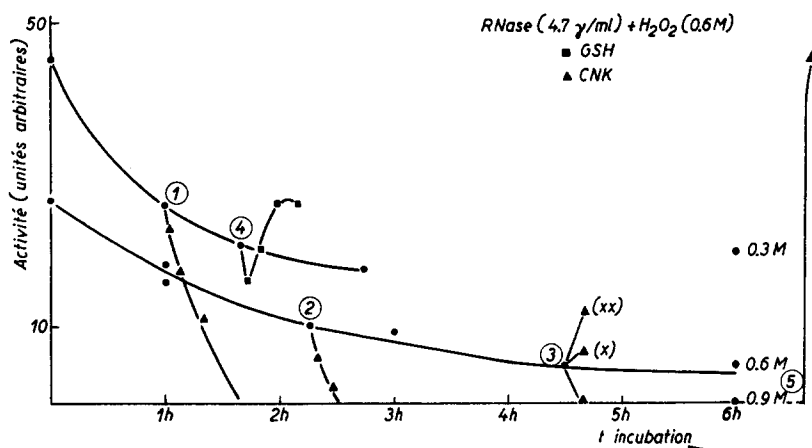


Fig. 4. Action du perhydrol 0.6 M sur la RNase ($4.7\text{ }\gamma/\text{ml}$) à pH 7
 1 et 2. adjonction de cyanure
 3. adjonction de catalase
 (x): idem, après action d'une goutte d'une solution de catalase
 (xx): idem, après action de 2 gouttes d'une solution de catalase
 4. adjonction de glutathion réduit
 5. réactivation par le cyanure après destruction complète de l'eau oxygénée

Lorsque l'on détruit l'eau oxygénée (en 3) par une (x) ou deux (xx) gouttes d'une solution de catalase avant d'ajouter le réducteur, l'effet catalytique disparaît et l'activation de l'enzyme se produit. Lorsque l'adjonction de cyanure est effectuée après décomposition complète de l'eau oxygénée (5) l'enzyme retrouve son activité initiale. L'oxydation est donc parfaitement réversible. Puisque le glutathion n'a pas les propriétés complexantes du cyanure, on pouvait espérer qu'il n'aurait pas la même action catalytique: aussi avons nous ajouté du glutathion réduit (10^{-3} M) à la solution enzymatique (4). Dans ces conditions, il y a activation de l'enzyme.

Afin de déterminer si des groupements autres que les groupes SH n'étaient pas responsables de l'inactivation de l'enzyme, nous avons suivi les spectres ultra-violet de solutions de ribonucléase en présence de diverses proportions d'eau oxygénée. Les mêmes essais ont été effectués avec du glutathion et du cyanure. Le spectre de l'enzyme n'a jamais subi de modification appréciable, alors que l'activité enzymatique était profondément affectée. La tyrosine, responsable du spectre d'absorption, n'intervient donc pas directement dans les processus d'activation et d'inactivation ci-dessus.

Oxydation par l'air

Un volume de solution enzymatique (dans de l'eau distillée) est placé pendant une nuit à la glacière, en flacon bouché; le liquide est ajusté au ras du col.

Un volume égal de la même solution est conservé dans les mêmes conditions en flacon bouche d'ouate; il est agité mécaniquement.

On prépare les témoins identiques que l'on place dans les mêmes conditions: le solvant est cette fois de l'eau bidistillée fraîche.

Après une nuit en chambre froide, la première solution accuse une perte d'activité d'environ 10%, alors que la seconde est complètement inactivée. Les témoins n'ont subi aucune variation d'un jour à l'autre.

Sous l'action du cyanure $10^{-2} M$, il y a réactivation totale de la seconde solution; les autres solutions sont activées de la façon prévue.

Systèmes à potentiel d'oxydo-réduction imposé

Puisque l'activité de la ribonucléase peut être mesurée aisément à de très grandes dilutions (dans la méthode que nous employons, la concentration la plus fréquente est de 6 γ /ml, soit $4 \cdot 10^{-7}$ moles/litre), nous pouvons envisager de la mesurer dans des milieux à potentiel imposé.

Si, par exemple, nous choisissons les concentrations en glutathion oxydé et réduit et les pH qui conviennent, nous pourrions obtenir une série de milieux dont le potentiel d'oxydo-réduction ne variera pas si l'on ajoute de faibles concentrations d'enzyme. Au contraire, ce potentiel imposera à l'enzyme un état d'oxydo-réduction correspondant à celui du milieu.

Si, par conséquent, l'activité enzymatique dépend de l'état d'oxydo-réduction de l'enzyme, elle variera en fonction du potentiel du milieu.

Toutefois, la possibilité qu'il existe des complexes entre le système rédox tampon et l'enzyme devra être considérée dans chaque cas.

La plus grande difficulté de la méthode réside dans la détermination du potentiel d'oxydo-réduction imposé. On peut soit le calculer, soit le mesurer.

Il est possible de le calculer chaque fois que le système rédox tampon a un potentiel rédox normal bien déterminé et que les variations $E = f(\text{pH})$ sont connues.

Il est difficile de le mesurer à l'aide des méthodes électrométriques: elles ne permettent pas de déterminer le potentiel d'un mélange de glutathion oxydé et réduit²⁸ parce que le composé oxydé est inactif vis-à-vis de l'électrode de platine.

Les expériences faites avec les indicateurs de potentiel d'oxydo-réduction ne sont pas concluantes non plus, d'après WURMSER²⁸, car il n'est pas possible par cette méthode de mettre en évidence un équilibre vrai entre la forme oxydée et la forme réduite. Les indicateurs permettent cependant de déterminer le potentiel d'oxydo-réduction apparent à quelques pourcents près.

Nous avons alors essayé de résoudre le problème en employant des substances dont le potentiel d'oxydo-réduction est bien connu et dont les variations de potentiel en fonction du pH sont bien déterminées.

De plus, nous avons chaque fois mesuré le potentiel à l'aide d'indicateurs colorés et nous avons rejeté les solutions pour lesquelles ces valeurs ne concordaient pas (parmi un grand nombre d'essais, trois seulement ont dû être ainsi rejetées). Nous avons déterminé les activités enzymatiques en présence de:

1. cyanure de potassium
2. sulfite de sodium
3. glutathion réduit/glutathion oxydé

Les potentiels d'oxydo-réduction ont été calculés à l'aide des formules suivantes

1. CNK^4 : $E = 0.27 - 0.03 \log (\text{CN}^-)$

Valable de pH 9 à pH 13, soit pour des concentrations situées entre $5 \cdot 10^{-5} M$ et M/l

2. SO_3Na_2^5 : $E = 0.33 - 0.03 \log (\text{SO}_3^{2-})$

Valable de pH 7 à 13, soit pour des concentrations situées entre $10^{-6} M$ et M/l

3. GSH/GSSG^{24} : $E = 0.45 + 0.03 \log \frac{(\text{GSSG})}{(\text{GSH})^2} - 0.06 \text{ pH}$

La littérature abonde en valeurs discordantes^{6, 20, 19}. Nous avons choisi la valeur la plus récente; elle concorde d'ailleurs parfaitement avec nos propres mesures effectuées avec des indicateurs colorés.

Indicateurs employés^{7, 19}:

- 2-6 dichlorophénol-indophénol.
- Bleu de méthylène.
- Empois d'amidon iodé.
- Tétrасulfonate d'indigo.
- Thionine.

En partant de solutions de ribonucléase plus ou moins oxydée (par H_2O_2 par exemple), il est possible de fixer l'état d'oxydo-réduction de l'enzyme selon le potentiel du milieu.

Les valeurs de l'activité enzymatique en fonction du potentiel d'oxydo-réduction sont données dans la Fig. 5.

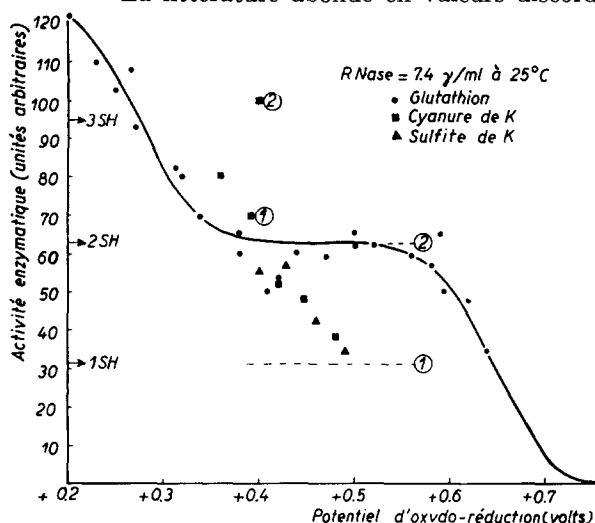


Fig. 5. Variations de l'activité d'une solution de ribonucléase (7.4 γ /ml) en fonction du potentiel d'oxydo-réduction du milieu et courbe d'oxydo-réduction théorique (voir discussion)

DISCUSSION

Action des oxydants

L'eau oxygénée, l'acide iodosobenzoïque et l'oxygène de l'air ont tous trois une action inhibitrice marquée sur la ribonucléase.

L'eau oxygénée n'agit efficacement, à pH 7, que lorsque la réaction est catalysée: rappelons à ce propos le cas analogue de l'uréase¹⁰, dont les SH ne sont aucunement oxydés si la solution est dépourvue de toute trace métallique.

Lorsque HOLMES *et al.* ont observé¹² une inhibition faible et non reproductible de la ribonucléase sous l'action du perhydrol, il est probable que les solutions utilisées étaient, en général, parfaitement exemptes de catalyseurs d'oxydo-réduction. Les impuretés qui s'y trouvaient de temps à autre permettaient l'oxydation et l'inhibition occasionnelle de l'enzyme. Il se peut d'ailleurs que l'échantillon de RNase dont nous nous sommes servi contienne quelques traces métalliques permettant à la réaction de

s'effectuer même dans l'eau bidistillée; la préparation de HOLMES *et al.* en était apparemment exempte.

Quoi qu'il en soit, la présence de catalyseurs semble bien être la condition *sine qua non* de l'oxydation de l'enzyme par le perhydrol à pH 7. Quant à l'intervention des radicaux libres postulée par HOLMES *et al.*, elle est fondée sur les constatations suivantes:

Fe^{+3} seul est sans effet

H_2O_2 seule est sans effet

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{radicaux OH}\cdot$ inactivent l'enzyme.

Il nous semble qu'il n'y a pas — a priori — de raison valable pour exclure l'action de radicaux hydroxyles (capables d'ailleurs d'oxyder des SH), mais il n'y a pas non plus de raison de l'admettre nécessairement, puisque d'autres substances sont capables de catalyser également l'oxydation et que celle-ci peut être réalisée par l'oxygène de l'air dans des conditions favorables. L'eau distillée, qui nous a permis d'oxyder l'enzyme, contenait surtout des ions cuivre; ceux-ci ont été décelés par spectroscopie. ZITTLE²⁹ a déjà montré que le cuivre inhibe la ribonucléase; mais puisque, dans nos expériences, le cuivre n'inhibe que si l'oxygène de l'air intervient, on peut en déduire que cet ion agit non pas en se fixant sur l'enzyme, mais en catalysant son oxydation par l'air.

On sait qu'il en est de même pour la cystéine, le glutathion, l'uréase et — de façon générale — pour tous les thiols.

La nécessité de l'intervention d'un catalyseur peut très bien s'expliquer si l'on imagine que les SH de la RNase ne sont pas libres dans les conditions habituelles: leur inertie proviendrait surtout de la nécessité de rompre une liaison pour reformer l'autre. Nous reviendrons plus loin sur ce point qui nous paraît devoir expliquer le comportement de la RNase tant au point de vue des oxydo-réductions qu'à celui du pH.

Remarquons auparavant que l'acide iodosobenzoïque réagit d'autant mieux que le pH est plus élevé, alors qu'il est déjà fort actif à pH 7 dans la plupart des cas^{9,8} (il oxyde quantitativement la cystéine en une minute); les rares cas où ce réactif ne s'est pas avéré spécifique¹¹ ont été signalés en milieu acide, mais jamais à un pH supérieur à 7, même aux fortes concentrations. De plus, les mesures spectroscopiques que nous avons faites excluent la tyrosine de la liste des acides aminés constitutifs de la RNase susceptibles d'être touchés par les conditions d'oxydo-réduction. Il ne reste comme possibilité que la sérine et la thréonine, alcools primaires et secondaires dont l'oxydation *réversible* est fort douteuse dans des conditions aussi douces.

Il semble donc que l'oxydation de la ribonucléase porte bien sur des groupes SH libres ou libérables relativement facilement.

Action des réducteurs

Le Fig. 5 montre que si l'on exprime les activités enzymatiques en fonction du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, on obtient une courbe présentant un palier et deux parties ascendantes.

Cette courbe présente un aspect semblable à celui des courbes de titration d'oxydo-réduction obtenues pour des systèmes contenant deux couples d'oxydo réduction distincts.

Si l'on calcule une courbe selon la formule:

$$E = E_o + \frac{0.06}{n} \log \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})}$$

avec $(\text{Ox}) + (\text{Red}) = C^{\text{te}}$

et des valeurs différentes du rapport: $\frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})}$

en obtient en effet une courbe en S.

On peut vérifier que la courbe expérimentale que nous avons obtenue correspond à une double courbe en S: prenons, comme paliers de la première, les valeurs activité nulle et activité = 63 μ . On obtient alors une courbe (indiquée sur le graphique) autour de laquelle viennent se ranger tous les points expérimentaux à condition de prendre $n = 1$ (un seul électron). De même, on peut superposer une seconde courbe en S (paliers = 63 et 126 μ) aux points situés entre 0.2 V et 0.4 V.

Cela nous a permis de déterminer les potentiels de demi-réduction, les énergies libres et les constantes d'équilibre correspondantes:

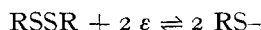
$$\begin{array}{lll} E_1^{\circ'} = 0.27 \text{ V} \pm 0.01 \text{ V} & K_1^{\circ'*} = 1.4 \cdot 10^9 & G_1^{\circ'*} = -12,400 \text{ cal.} \\ E_2^{\circ'} = 0.64 \text{ V} \pm 0.01 \text{ V} & K_2^{\circ'} = 2.5 \cdot 10^{21} & G_2^{\circ'} = -29,400 \text{ cal.}^{**} \end{array}$$

Tout semble donc se passer comme si la réduction de la ribonucléase se taisait en deux étapes distinctes.

On pourrait penser que la réaction ne met en jeu qu'un électron puisque la courbe expérimentale épouse la courbe théorique construite selon la formule:

$$E = E^o + \frac{0.06}{n} \log \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} \quad n = 1$$

Si cependant l'équilibre d'oxydo-réduction de l'enzyme était de la forme:

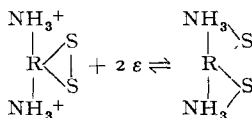


On aurait:

$$E = E^o + \frac{0.06}{2} \log \frac{(\text{RSSR})}{(\text{RS}^-)^2} \quad E = E^o + 0.06 \log \frac{(\text{RSSR})^{1/2}}{(\text{RS}^-)}$$

Si l'activité enzymatique dépend de la concentration de la forme RS^- , on doit s'attendre à ce que la courbe exprimant l'activité en fonction du potentiel d'oxydo-réduction n'implique apparemment que le transfert d'un seul électron.

En tenant compte de ce qui a été dit plus haut, nous voyons que la réaction doit être du type:



En effet, le pH du milieu d'incubation n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique:

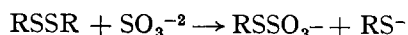
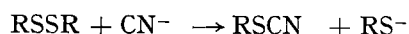
* Calculés à l'aide des équations: $G^{\circ'} = -E^{\circ'} nF$ $E^{\circ'} = \frac{RT}{nF} \ln K^{\circ'}$

** *Remarque*

Ce calcul suppose un équilibre parfaitement réversible. Ce n'est, en réalité, pas là le cas, puisque 15 minutes d'incubation suffisent pour amener une solution de ribonucléase à un état de réduction imposé alors qu'il faut beaucoup plus longtemps pour oxyder l'enzyme. De plus, le calcul assimile les activités aux concentrations, ce qui ne peut être fait qu'en solution très diluée.

on peut obtenir la même activation en faisant varier la concentration en réducteur et le pH du milieu (le potentiel d'oxydo-réduction du glutathion dépend de ces deux variables) à condition que l'on obtienne ainsi le même potentiel-tampon.

En ce qui concerne la réduction de l'enzyme par le cyanure ou le sulfite, le problème est compliqué par le pouvoir complexant de ces réducteurs. On connaît, en effet, les réactions suivantes^{25, 26}:

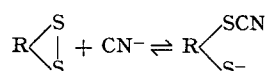


Dès lors, le potentiel imposé n'a plus que la valeur d'une indication à moins d'admettre que la réduction se fasse en deux étapes:

rupture par réaction électronique
complexion subséquente diminuant l'activité enzymatique,
dont la première serait déterminante.

Si l'on observe une proportionnalité apparente entre le potentiel imposé et l'activité enzymatique, cela provient du fait suivant:

Imaginons l'équilibre:



dont la constante d'équilibre est:

$$\frac{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{SCN} \\ | \\ \text{S}^- \end{array} \right)}{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array} \right) \cdot (\text{CN}^-)} = K \quad (1)$$

Le potentiel d'oxydo-réduction du cyanure vaut:

$$E = 0.27 - 0.03 \log (\text{CN}^-)$$

(1) nous donne:

$$\log K = \log \frac{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{SCN} \\ | \\ \text{S}^- \end{array} \right)}{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array} \right)} - \log (\text{CN}^-), \quad \text{d'où} \quad \log K = \log \frac{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{SCN} \\ | \\ \text{S}^- \end{array} \right)}{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array} \right)} + \frac{E - 0.27}{0.03}$$

$$E = (0.03 \log K + 0.27) + 0.03 \log \frac{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array} \right)}{\left(\text{R} \begin{array}{c} \text{SCN} \\ | \\ \text{S}^- \end{array} \right)}$$

Dans ce cas encore, l'activité enzymatique sera une fonction exponentielle du potentiel imposé. La valeur de K règlera la position du potentiel de demi-réduction; de cette valeur dépendra la coïncidence des courbes obtenues en $f(E)$ pour le glutathion, le cyanure et le sulfite.

Seule la courbe obtenue pour le glutathion peut donc être considérée comme exprimant des phénomènes relativement simples.

Bibliographie p. 134.

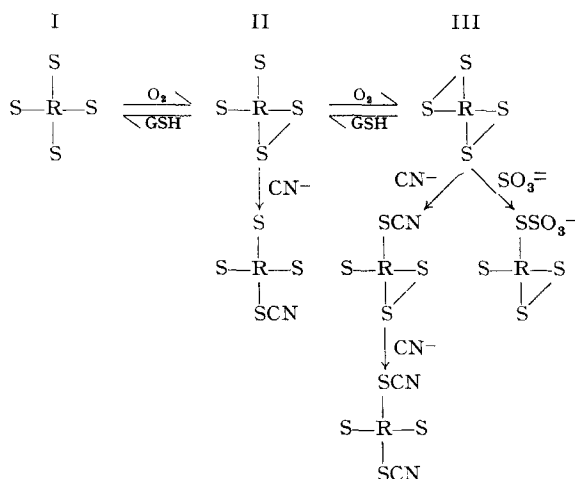
Considérons maintenant plus attentivement le cas du cyanure :

Les points 0.39 V et 0.40 V (CN^-) sont obtenus en faisant agir une même quantité de cyanure sur des solutions de RNase d'activité initiale différente : le point supérieur (2) est obtenu à partir de RNase d'activité initiale = 63 μ (. . . 2) ; le point inférieur (1) correspond à une solution de départ d'activité plus faible (. . . 1) mais de même concentration molaire.

L'état initial de la RNase a donc une importance primordiale. Lorsque la même expérience est effectuée avec du glutathion, on obtient toujours la même valeur quel que soit l'état de départ, pour autant que la *concentration* en enzyme soit la même.

Pour une concentration donnée en RNase, le glutathion porte donc l'activité enzymatique à une valeur indépendante de l'état d'oxydation initial tandis que l'action du cyanure dépend à la fois de la concentration en RNase *et* de l'activité initiale.

L'ensemble des résultats ci-dessus nous conduit à proposer le schéma de structure suivant pour les groupes actifs de la ribonucléase :

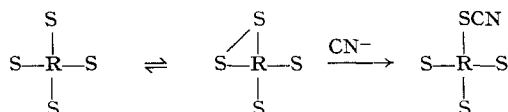


La ribonucléase contiendrait à son état d'activité maximum 4 SH libres ou libérables aisément (I). Le potentiel rédox de l'équilibre d'une des deux paires de SH est tel qu'après les manipulations effectuées au cours de la préparation de l'enzyme, cette paire peut s'oxyder, donnant la forme II. Cette forme est stable dans les conditions habituelles de conservation. En présence de catalyseurs et en solution neutre ou basique, la forme III apparaît. Il est évident que toute solution de RNase sera dès lors un mélange de ces différentes formes. On peut a priori supposer que toute solution à l'équilibre contiendra deux de ces formes et deux seulement, puisque l'équilibre est possible de l'une à l'autre.

Ces hypothèses permettent de calculer les activations théoriques dans chaque cas ; c'est ce calcul qui servira de contrôle au schéma.

Considérons tout d'abord le cas du cyanure :

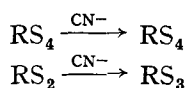
1er couple :



Posons y = facteur multiplicatif de l'activité enzymatique. Si l'activité est proportionnelle au nombre de S libres, on a :

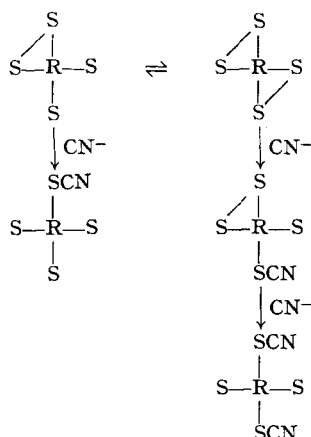
$$y \left(\frac{100-x}{100} \cdot 4 + \frac{x}{100} \cdot 2 \right) = \frac{100-x}{100} \cdot 4 + \frac{x}{100} \cdot 3$$

si x = pourcentage de la forme à 2 S et puisque



De cette égalité nous tirons : $y = \frac{400-x}{400-2x}$

Il nous est par conséquent facile de tracer une abaque donnant y en fonction de x et, à partir de là, l'activation due au cyanure : $(y-1)\%$ (Fig. 6, courbe I, II).
2e couple :



En employant les mêmes symboles, nous avons ici :

$$y \left(\frac{x}{100} \cdot 2 + \frac{100-x}{100} \cdot 0 \right) = \frac{x}{100} \cdot 3 + \frac{100-x}{100} \cdot 2$$

D'où :

$$y = \frac{x+200}{2x}$$

(Fig. 6, courbe II \rightleftharpoons III).

L'abaque ainsi dressée indiquera, dans chaque cas, l'activation *maximum* que l'état de la solution de départ permet d'obtenir.

Pour déterminer le pourcentage (x) de la forme II, nous avons procédé comme suit : nous avons prélevé un échantillon d'une solution enzymatique de concentration donnée et nous l'avons porté à un potentiel donné à l'aide de glutathion. Selon l'activité obtenue, l'activité de départ et la concentration, il est facile de déterminer quelles formes contient la solution de départ et en quels pourcentages.

Le tableau ci-dessous donne les valeurs obtenues expérimentalement dans chaque cas et les valeurs calculées correspondantes :

Bibliographie p. 134.

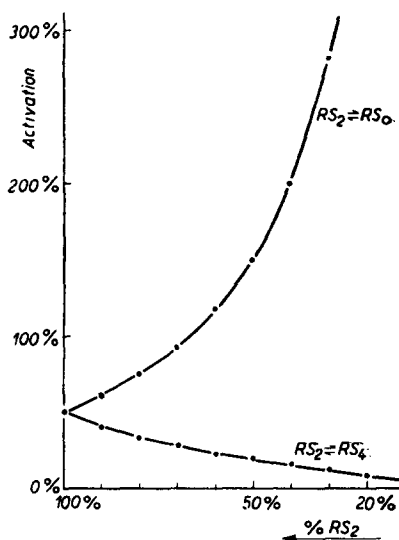


Fig. 6. Activation provoquée par le cyanure en fonction de l'état d'oxydo-réduction de la ribonucléase.

<i>x</i>	<i>Couple</i>	% Activation	
		Calculé	Observé
0	2-0	∞	∞
		activité = 70 <i>u</i>	activité = 72 <i>u</i>
58,5	2-0	115	107
82	2-0	75	80
100	2-0	50	50
	2-4		
60	2-4	23	27
50	2-4	20	20

L'accord entre les nombres trouvés et les valeurs théoriques est donc excellent.

Il est possible de réaliser une abaque dans le cas du sulfite aussi. La comparaison des valeurs expérimentales et de celles obtenues par le calcul est donnée dans le tableau ci-dessous :

<i>x</i>	<i>Couple</i>	% Activation	
		Calculé	Observé
0	2-0	∞	∞
		activité = 34 <i>u</i>	activité = 40 <i>u</i>
47	2-0	58	66
100	2-0	0	3
	2-4		

L'accord est à nouveau très bon et le schéma semble donc se confirmer. Toutefois, ce schéma paraît se heurter à une objection : c'est que l'analyse quantitative des acides aminés de la RNase⁹ n'indique que 0.7 cystéine pour 8 cystine/2 dans chaque molécule de protéine.

Nous avons, pour cette raison, dosé les SH de la molécule native de RNase par la méthode de BENESH ET BENESH¹; cette technique, utilisant un appareillage particulièrement sensible, permet de doser le γ de SH à 3% près et le dixième de γ à 6% près (ce pourcentage correspond à une erreur égale à deux fois l'écart-type).

Nos dosages ampérométriques ont montré qu'il existe en réalité dans la ribonucléase native :

$$2.1 \pm 0.1 \text{ SH par molécule}$$

après oxydation par H₂O₂ dans des conditions où l'enzyme est totalement inactivé, on trouve :

$$0.1 \pm 0.1 \text{ SH par molécule}$$

On voit que le schéma proposé trouve une confirmation directe dans les résultats de ces dosages.

Puisqu'il nous était impossible de doser les SH en présence d'un excès de cyanure, de sulfite ou de glutathion, nous avons mesuré les SH libres dans des hydrolysats de ribonucléase.

L'hydrolyse s'effectuait sous azote, en tube scellé. On évaporait l'HCl en excès et l'on dosait de la manière usuelle.

Nous nous sommes rapidement aperçu de ce que la méthode ne fournissait pas de

résultats reproductibles dans ces conditions: après chaque évaporation d'HCl il faut, en effet, ajouter un nouveau volume d'H₂O et recommencer l'opération à 5 reprises à cause de l'évaporation de l'azéotrope HCl-H₂O. En améliorant de plus en plus la technique de l'évaporation, nous avons été amené à monter un dispositif permettant de conduire l'ensemble des opérations à l'abri de l'air et à température déterminée.

Dans ces conditions seulement les résultats deviennent reproductibles; ils sont d'ailleurs beaucoup plus élevés. Le tableau ci-dessous reproduit les valeurs obtenues:

<i>Nombre d'essais</i>	<i>Mode d'évaporation</i>	<i>(Résultat nombre de SH par molec)</i>
2	à l'air	1.30 ± 0.40
3	partiellement sous vide	1.75 ± 0.15
3	sous vide	3.28 ± 0.15

Une solution témoin de cystéine accuse, après hydrolyse et évaporation sous vide, une perte de groupes SH égale à 15% environ, due vraisemblablement aux conditions de dosage (milieu ammoniacal, durée du dosage).

On peut supposer, dès lors, qu'une perte du même ordre de grandeur se produit aussi dans le cas de la RNase; s'il en est bien ainsi, il y aurait en fait l'équivalent de 4 SH par molécule (perte = 18%), ce qui correspond bien à la valeur requise par le schéma que nous avons proposé.

Remarquons enfin que des raisons stériques pourraient expliquer le manque de stabilité relatif des liaisons disulfures résultant de l'oxydation: en effet, lorsqu'une solution de cystine est hydrolysée dans les mêmes conditions, il n'y a pas apparition de SH.

On voit donc que le schéma que nous avons proposé à la suite de l'étude des propriétés enzymatiques de la ribonucléase semble correspondre également aux propriétés chimiques de la protéine.

Nous remercions vivement Monsieur M. C. DURAND de l'échantillon de ribonucléase qu'il nous a aimablement offert.

RÉSUMÉ

1. Le glutathion réduit, le cyanure et le sulfite activent la ribonucléase. Cette activation est due exclusivement aux propriétés oxydo-réductrices de ces substances.

2. Le glutathion oxydé et l'acide iodosobenzoïque inhibent au contraire l'enzyme. Cette inhibition est réversible sous l'action des réducteurs et sa vitesse dépend des conditions de pH.

3. L'oxygène de l'air et l'eau oxygénée inhibent aussi l'enzyme. La réaction est catalysée par des ions métalliques (Cu²⁺ . . .) et par le cyanure. Les solutions ainsi traitées sont réactivables par les réducteurs (cyanure y compris) après destruction des agents d'oxydation.

4. L'emploi de solutions-tampons rédox montre que l'activité de la ribonucléase est une fonction simple du potentiel d'oxydo-réduction.

5. Un schéma de structure de la protéine est proposé sur la base de ses propriétés enzymatiques. Il implique la présence de deux couples de thiols oxydables dont les potentiels normaux sont évalués à 0.27 V et 0.64 V. Ces thiols sont responsables, en partie tout au moins, de l'activité enzymatique de la protéine.

6. Ce schéma de structure s'est vu confirmé par voie chimique.

SUMMARY

1. Reduced glutathione, cyanide and sulphite activate ribonuclease. This activation is due to the oxido-reduction properties of these substances.

2. Oxidized glutathione and iodosobenzoic acid inhibit the enzyme. This inhibition is reversible under the action of reducing agents and its rate depends on the pH conditions.

Bibliographie p. 134.

3. Atmospheric oxygen and hydrogen peroxide also inhibit the enzyme. The reaction is catalysed by metallic ions (Cu^{+2} etc.) and by cyanide. The solutions thus treated are reactivated by the reducing agents (cyanide included) after destruction of the oxidizing agents.

4. The use of redox buffer solutions shows that the activity of ribonuclease is a simple function of oxido-reduction potentials.

5. A structural scheme of the protein is proposed on the basis of its enzymic properties. It implies the presence of two pairs of oxidizable thiol groups of which the normal potentials are evaluated as 0.27 V and 0.64 V. These thiol groups are responsible, or at least partly, for the enzymic activity of the protein.

6. This structural scheme has been confirmed chemically.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Reduziertes Glutathion, Cyanid und Sulfit aktivieren Ribonuclease. Diese Aktivierung ist ausschliesslich den Oxydations-Reduktionseigenschaften dieser Substanzen zuzuschreiben.

2. Dagegen wirken oxydiertes Glutathion und Jodosobenzoessäure auf das Enzym hemmend. Die Hemmung ist bei der Einwirkung von Reduktionsmitteln reversibel und seine Geschwindigkeit hängt von den Bedingungen des pH's ab.

3. Luftsauerstoff und Wasserstoffsuperoxyd wirken auch hemmend auf das Enzym. Die Reaktion wird von Metallionen (Cu^{+2} . . .) und Cyanid katalysiert. Nach der Zerstörung des Oxydationsmittels sind die so behandelten Lösungen durch Reduktionsmittel (Cyanid mit inbegriffen) reaktivierbar.

4. Die Verwendung von Redox-Pufferlösungen zeigt, dass die Aktivität der Ribonuclease eine einfache Funktion des Oxydations-Reduktionspotentials ist.

5. Es wird auf Grund seiner enzymatischen Eigenschaften ein Strukturschema des Proteins vorgeschlagen. Es berücksichtigt die Gegenwart von 2 Paaren oxydierbarer Thiole, deren Normalpotentiale zu 0.27 V und 0.64 V bestimmt wurden. Diese Thiole sind, wenigstens teilweise, für die enzymatische Aktivität des Proteins verantwortlich.

6. Dieses Strukturschema hat sich auf chemischen Wege bestätigen lassen.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. BENESH ET R. E. BENESH, *Arch. Biochem.*, 19, 1 (1948) 35.
- 2 E. BRAND, dans J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline enzymes*, Colombia University Press, 1948.
- 3 R. CECIL, *Biochem. J.*, 47 (1950) 572.
- 4 G. CHARLOT, *Théorie et méthode nouvelle d'analyse qualitative*, Masson, 1949.
- 5 G. CHARLOT, *Théorie et méthode nouvelle d'analyse qualitative*, Masson, 1949.
- 6 M. DIXON ET J. H. QUASTEL, *J. Chem. Soc.*, (1923) 2943.
- 7 S. GLASSTONE, *Introduction to Electrochemistry*, Van Nostrand, 1949.
- 8 L. HELLERMAN, F. P. CHINARD ET V. R. DEITZ, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 443.
- 9 L. HELLERMAN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 7 (1939) 165.
- 10 L. HELLERMAN, E. PERKINS ET R. CLARK, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 19 (1933) 855.
- 11 L. HELLERMAN, F. P. CHINARD ET P. A. RAMSDELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 2551.
- 12 B. HOLMES, E. COLLINSON ET F. S. DANTON, *Nature*, 165 (1950) 266.
- 13 M. KOLTHOFF ET W. E. HARRIS, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 161.
- 14 M. KUNITZ, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 569.
- 15 L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 190.
- 16 L. LEDOUX, *Arch. intern. physiol.*, 61 (1953) 264.
- 17 L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 517.
- 18 L. LEDOUX, *Arch. intern. physiol.*, 61 (1953) 428.
- 19 L. MICHAELIS, *Oxydations Reductions Potentiale*, (1933) 100, 102.
- 20 L. MICHAELIS ET L. B. FLEXNER, *J. Biol. Chem.*, 79 (1928) 689.
- 21 S. ROSENBERG, J. C. PERRONE ET P. L. KIRK, *Anal. Chem.*, 22 (1950) 1186.
- 22 J. S. ROTH, *Nature*, 171 (1953) 127.
- 23 J. S. ROTH, *The Biol. Bull.*, 103 (1952) 228.
- 24 L. R. RYKLAN ET C. L. A. SCHMIDT, *Univ. Calif. Publ. Physiol.*, 8 (1944) 257.
- 25 A. SCHÖBERL, *Chem. Ber.*, 84 (1951) 571.
- 26 R. STRICKS ET M. KOLTHOFF, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4646.
- 27 A. R. TABORDA, L. C. TABORDA, J. N. WILLIAMS ET C. A. ELEVEJHEM, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 222.
- 28 R. WURMSER, *Energetique des réactions en solution*, Cours de Sorbonne, (1948) 57.
- 29 C. A. ZITTLE, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 111.

Reçu le 23 juin 1953