

- ²³ D. D. DZIEWIATKOWSKI AND H. B. LEWIS, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 49.
²⁴ E. H. MOSBACH AND C. G. KING, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 491.
²⁵ F. EISENBERG AND S. GURIN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 317.
²⁶ J. F. DOUGLAS AND C. G. KING, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 865.
²⁷ S. ROSEMAN, F. E. MOSES, J. LUDOWEIG AND A. DORFMAN, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 213.
²⁸ S. ROSEMAN, J. LUDOWEIG, F. E. MOSES AND A. DORFMAN, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 665.
²⁹ Y. J. TOPPER AND M. M. LIPTON, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 135.
³⁰ F. EISENBERG, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 501.
³¹ G. C. BUTLER AND M. A. PACKHAM, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 551.
³² F. EISENBERG, J. B. FIELD AND D. STETTEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 297.
³³ K. J. ISSELBACHER AND J. AXELROD, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1070.
³⁴ W. H. FISHMAN, *Advances in Enzymol.*, 16 (1955) 361.
³⁵ G. A. LEVY, *Science*, 116 (1952) 285.
³⁶ W. H. FISHMAN AND S. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 435.
³⁷ H.-G. SIE AND W. H. FISHMAN, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 453.

Received July 27th, 1957

INFLUENCE DES CHLORURES ALCALINS SUR L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA LACTOGLOBULINE NATURE ET DÉNATURÉE PAR LA CHALEUR

JEANNINE YON

*Laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences, Institut de
Biologie physicochimique, Paris (France)*

Divers travaux ont permis de déterminer la nature des forces impliquées dans l'association d'un enzyme avec son substrat^{1, 2, 3}. Les substrats utilisés avaient une structure chimique relativement simple. Plus récemment, STEINER⁴, étudiant au moyen de la lumière diffusée l'association de la trypsine avec une autre protéine, l'inhibiteur du soja, en fonction du pH et de la force ionique, arrive à la conclusion que la formation du complexe implique la participation d'un groupe carboxyle. Une étude analogue a été appliquée par cet auteur au problème de la dimérisation de l' α -chymotrypsine⁵.

Lorsque les forces d'attraction coulombiennes interviennent d'une manière appréciable dans l'association enzyme-substrat, on peut s'attendre à ce qu'une modification de la force ionique du milieu entraîne des variations dans l'affinité de l'enzyme pour son substrat; au contraire si les liaisons ioniques sont négligeables ou s'il y a compensation entre les attractions et les répulsions électrostatiques, on ne notera aucune variation sensible de l'affinité. Dans le présent travail, nous avons donc étudié quantitativement l'effet de l'augmentation de la concentration saline (principalement KCl et NaCl) sur l'hydrolyse des formes natives et dénaturées (*s* et *f* de BRIGGS ET HULL⁶) de la β -lactoglobuline. L'étude cinétique et thermodynamique permet de localiser l'effet des sels qui peut s'exercer soit au stade de la formation réversible du complexe intermédiaire, soit sur le processus de décomposition irréversible de ce complexe.

I. MATÉRIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1. Préparation des solutions

L'influence de la force ionique sur la protéolyse de la lactoglobuline et de ses formes dénaturées par la chaleur a été étudiée dans différentes conditions: en milieu tamponné et en solution saline non tamponnée.

(a) *Lactoglobuline native*. Le mode de préparation de cette protéine a été décrit antérieurement^{7,8}. Elle est utilisée en solution dans un tampon phosphate $M/15$, pH 7.10 (phosphate disodique 0.046 M; phosphate monopotassique 0.02 M) contenant NaCl à la concentration désirée par l'expérience. On réalise ainsi les mêmes conditions que pour les études faites au moyen de la lumière diffusée⁹. Le pH de chacune des solutions est soigneusement vérifié, le tampon de référence ayant été préalablement étalonné à l'électrode à hydrogène.

Pour l'étude de la réaction en milieu non tamponné, les solutions de lactoglobuline sont préparées extemporanément par dissolution des cristaux dans la solution saline. La solubilité de la lactoglobuline est assez faible, ce qui limite l'étude de la réaction à une zone de concentrations supérieures à 0.01 M NaCl (dans ce milieu la concentration de protéine ne dépasse pas 2 mg/ml). La conductivité des solutions salines étudiées (μ variant entre 0.01 et 1.7) n'est pratiquement pas modifiée par la présence de protéine.

(b) *Lactoglobuline dénaturée par la chaleur*. Les deux formes de lactoglobuline dénaturées par la chaleur ont été étudiées: ce sont les formes *s* (slow) et *f* (fast) de BRIGGS ET HULL⁸ qui ont été différencieres par les auteurs selon leur mobilité électrophorétique. Elles diffèrent par le mode de préparation: pour la forme *f* la dénaturation est plus poussée que pour la forme *s* et s'effectue en présence d'oxygène^{8,10}. Le degré de polymérisation de la molécule *f* est plus élevé (le poids moléculaire est 870.000 contre 167.000 pour la forme dénaturée *s* et 35.000 pour la native). L'homogénéité des fractions dénaturées a été vérifiée par électrophorèse (TISELIUS) à pH 6.9 $\mu = 0.1^*$. La protéine dénaturée est ajustée à la concentration saline désirée en dialysant jusqu'à l'équilibre contre une solution saline donnée.

(c) *Trypsine*. Nous utilisons la trypsine Worthington en solution dans HCl $M/1000$ et libérée par dialyse du sulfate de magnésium présent dans l'échantillon commercial.

La concentration des différentes solutions protéiques est mesurée par l'absorption à 280 m μ (en prenant comme coefficient d'extinction pour la lactoglobuline $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}} = 0.96^{11}$, pour la trypsine $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}} = 1.58^{12}$.

2. Mesure de la protéolyse.

Trois méthodes ont été utilisées pour la mesure de la protéolyse:

la méthode spectrophotométrique qui consiste à mesurer la densité optique du surnageant après précipitation par l'acide trichloracétique, selon le procédé déjà décrit dans une publication antérieure⁸.

la méthode titrimétrique de LINDESTRÖM-LANG, qui permet de titrer la totalité des groupes carboxyles libérés par l'hydrolyse de la protéine; le titrage s'effectue en milieu acétonique^{8,13}.

le titrage des groupes α -aminés par la méthode potentiométrique continue à pH constant, lorsque la réaction s'effectue en milieu non tamponné.

La validité de ces techniques a été discutée dans un travail où nous comparons les deux méthodes de titrage appliquées à l'hydrolyse de la lactoglobuline native et dénaturée par la chaleur¹⁴. A pH 7, on compte environ 25 liaisons peptidiques rompues par molécule en fin de réaction (à pH 8, 35 liaisons sont coupées en fin de protéolyse^{10,15}); on retrouve ce même nombre pour les deux formes dénaturées si l'on adopte le même poids moléculaire que pour la protéine native (P.M. = 35.000).

L'électrophorèse sur papier ne révèle pas de différence entre les produits d'hydrolyse de la protéine native et dénaturée par la chaleur¹⁴.

II. FORMATION DU COMPLEXE ENZYME-SUBSTRAT

Des travaux antérieurs ont montré qu'un cation monovalent, l'ion ammonium¹⁶ inhibe la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine, sans modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat, alors que l'action inhibitrice du calcium et du magnésium se manifeste à la fois par un effet sur la constante de dissociation et sur la vitesse maximum de la réaction^{8,16}. L'action inhibitrice de NaCl (et de KCl) exige des con-

* Cette vérification a été faite par Mr. S. DE MENDE, du Centre d'Electrophorèse du C.N.R.S., que nous remercions bien vivement.

centrations salines plus fortes. Dans tous les cas étudiés, l'augmentation de la concentration saline entraîne une diminution de la vitesse initiale d'hydrolyse de la lactoglobuline, qu'elle soit à l'état natif ou qu'elle soit dénaturée par la chaleur. Cette action est parfaitement réversible dans tous les cas étudiés. Nous avons cherché à préciser le mécanisme de l'inhibition.

Les concentrations respectives de l'enzyme, du substrat et de l'inhibiteur (NaCl , KCl , Na_2SO_4) sont telles que la vitesse de la réaction v , peut s'exprimer par la relation¹⁷:

$$v = -K'_m v/s + V'_m,$$

K'_m et V'_m représentent respectivement la constante de Michaelis et la vitesse maximum apparentes en présence d'un inhibiteur de l'enzyme ou du substrat^{8,18}), s al concentration de substrat. Cette représentation qui implique la linéarité de v en fonction de v/s permet d'obtenir directement les valeurs de V'_m et de K'_m . Par l'étude des variations de ces constantes en fonction de la concentration de l'inhibiteur, on peut déterminer le type de l'inhibition^{8,17,18}.

1. Etude avec la lactoglobuline native

L'étude cinétique a été faite en milieu tamponné, pH 7.10 et 35° en présence de NaCl et KCl à différentes concentrations variant entre 0.1 M et 1 M , en suivant la réaction par la méthode trichloracétique. Les concentrations de substrat varient entre 4.7 et 29 mg/ml. Les mêmes expériences ont été faites en milieu non tamponné; dans ces conditions, l'hydrolyse est suivie par la méthode potentiométrique à pH constant et les concentrations de substrat varient entre 1.2 et 11.7 mg/ml. Pour chaque concentration saline, on vérifie que la loi de variation de la vitesse en fonction de la concentration de l'enzyme est encore linéaire.

Sur la Fig. 1, nous avons réuni les résultats obtenus par les deux méthodes. A chaque concentration de NaCl (ou KCl) correspond une droite selon la représentation

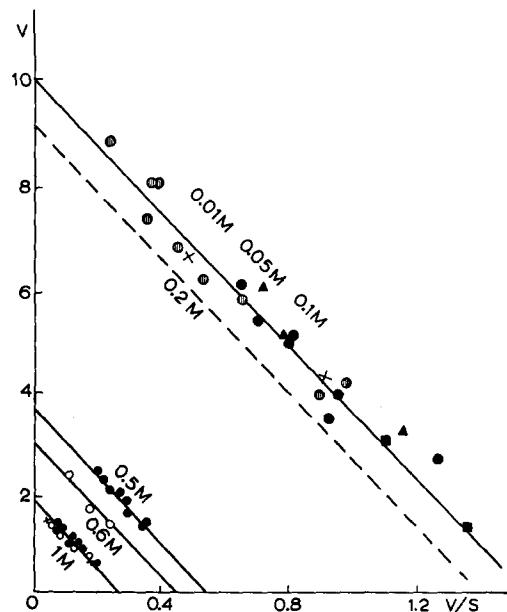


Fig. 1. Influence de NaCl (et KCl) sur l'hydrolyse de la lactoglobuline native par la trypsine. Représentation graphique d'EADIE. Les résultats obtenus par la méthode potentiométrique (●; ▲; ■) et par précipitation trichloracétique (○; ◉) sont groupés sur la même figure. $\times \text{ClK}$; $\blacktriangle \text{ClNa}$ 0.05 M ; $\blacksquare \text{ClNa}$ 0.01 M . Tous les résultats sont calculés pour une concentration d'enzyme de 1 mg/ml, et v exprimé en liaisons peptidiques détruites $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \cdot 10^7$. La droite en pointillés a été tracée à partir de résultats antérieurs¹⁶.

d'EADIE. Le parallélisme des droites indique que K'_m reste constant, quelle que soit la concentration saline du milieu. Or pour la plupart des protéases K_m est assimilable à l'inverse de la constante d'association de l'enzyme pour son substrat, et ceci est valable pour le système lactoglobuline-trypsine¹⁰. Par conséquent, on peut admettre que l'affinité de l'enzyme pour son substrat n'est pas sensible aux variations de la force ionique. Seule diminue la vitesse maximum de protéolyse; cette diminution n'est appréciable qu'à partir de concentrations salines supérieures à 0.1 M et aux fortes concentrations salines la vitesse tend asymptotiquement vers une valeur non nulle.

La loi de décroissance de la vitesse en fonction de la concentration saline du milieu est la même, que la réaction ait lieu en tampon phosphate ou en milieu non tamponné (Fig. 2). Lorsque la concentration saline passe de ClNa (ou CIK) 0.1 M à 1 M, on diminue environ cinq fois la vitesse d'hydrolyse. La représentation semi-logarithmique (Fig. 3) permet de déterminer une "constante d'interaction" qui correspond à la valeur de la concentration saline pour laquelle l'inhibition atteint 50% de sa valeur maximum. On trouve $pK_i = 0.5$, d'où $K_i = 0.36 M$.

A 44.4° nous avons vérifié que les chlorures alcalins exercent une action analogue sur la cinétique de la réaction: aucune modification de la constante de Michaelis, mais diminution de la vitesse maximum (Fig. 4). Toutefois à cette température la diminution de V_m est moins importante qu'à 35°.

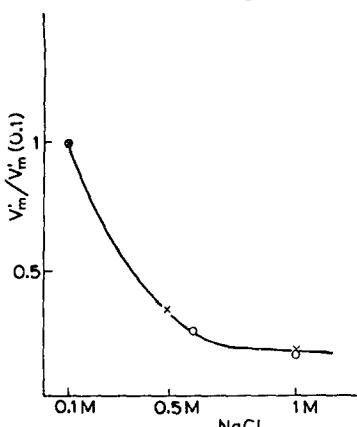


Fig. 2. Variations de la vitesse maximum d'hydrolyse en fonction de la concentration saline. V'_m : vitesse maximum pour une concentration quelconque de NaCl; $V'_m(0.1)$: vitesse obtenue en milieu NaCl 0.1 M. En abscisses: concentration molaire de NaCl. × expériences faites en tampon phosphate, O expériences faites en milieu non tamponné.

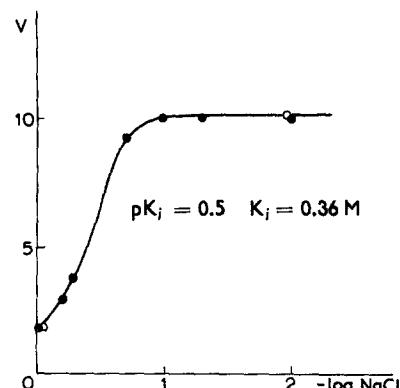


Fig. 3. Détermination de la constante d'interaction lactoglobuline - NaCl.

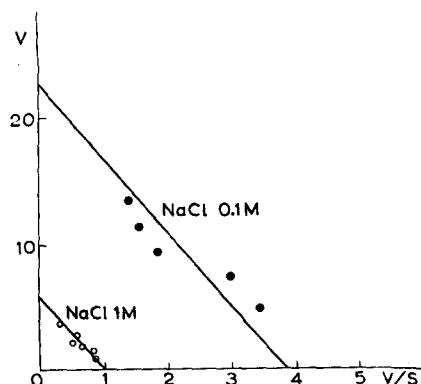


Fig. 4. Influence de NaCl sur l'affinité lactoglobuline-trypsin à 44.4°. Représentation d'EADIE.

L'équilibre d'association n'est donc pas modifié en fonction de la concentration saline du milieu, quelle que soit la température à laquelle s'effectue la réaction ($K'_m = K_m = 6 \text{ mg/ml} = 1.7 \cdot 10^{-4} M$). Il s'ensuit que les constantes thermodynamiques correspondant à la formation du complexe enzyme-substrat restent identiques dans les différents milieux étudiés. Nous avons déjà déterminé antérieurement ces valeurs⁸: $\Delta F = -5300 \pm 50 \text{ cal}$; $\Delta H \approx 0$; $\Delta S = 17 \text{ u.e.}$

2. Etude avec la lactoglobuline dénaturée

(a) *Lactoglobuline dénaturée s.* La même étude cinétique a été faite à 35° et pH 7.0 avec un autre substrat: la lactoglobuline dénaturée *s*, en différents milieux salins non tamponnés. La méthode potentiométrique a été utilisée préférentiellement, après comparaison avec la méthode de LINDERSTRÖM-LANG¹⁴. Par suite du mode de dénaturation la concentration du substrat ne peut dépasser 5 mg/ml, ce qui limite évidemment la zone d'étude. Comme l'indique la Fig. 5, on aboutit à des résultats totalement différents des précédents. Toutes les droites obtenues par la représentation d'EADIE, correspondant aux différentes concentrations salines convergent en un même point de l'axe des ordonnées: à la précision expérimentale près, la vitesse maximum demeure identique, quel que soit le milieu. Par contre, la constante de Michaelis est une fonction croissante de la concentration saline. Voici d'après la Fig. 5 quelques constantes de Michaelis déterminées avec précision:

NaCl	K_m (mg/ml)
0.05 M - 0.1 M	3.1
0.5 M	4.4
1 M	9.0

L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue donc en fonction de la force ionique du milieu.

(b) *Lactoglobuline dénaturée f.* Les résultats expérimentaux groupés sur la Fig. 6 montrent une analogie dans l'action de la force ionique sur les deux substrats dénaturés. L'augmentation de la constante de Michaelis en fonction de la concentration saline est plus importante lorsque le substrat est la forme *f*.

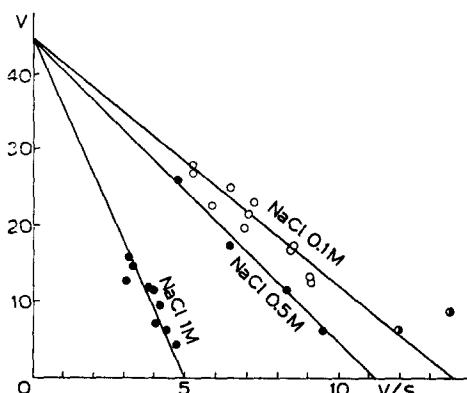


Fig. 5. Influence de NaCl sur l'hydrolyse trypsique de la lactoglobuline dénaturée *s*. Méthode potentiométrique. Représentation d'EADIE. La convergence des droites montre que V_m n'est pas modifié par l'augmentation de NaCl. K_m augmente avec la concentration saline.

Bibliographie p. 121.

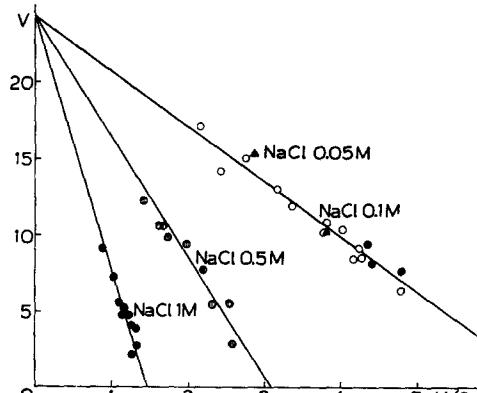


Fig. 6. Influence de NaCl sur l'hydrolyse trypsique de la lactoglobuline dénaturée *f*. Représentation d'EADIE.

NaCl	K_m (mg/ml)
0.05 M - 0.1 M	3.3
0.5 M	8.5
1 M	16.5

Mais quelle que soit la forme du substrat dénaturé, la vitesse maximum d'hydrolyse n'est pas modifiée par la concentration saline du milieu.

Nous avons été conduits à comparer les constantes de sédimentation dans les milieux de concentrations salines extrêmes (0.1 M et 1 M), la possibilité d'une polymérisation ou dépolymérisation sous l'effet de la concentration saline pouvant agir secondairement pour modifier l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat. Compte tenu de la viscosité du milieu, la valeur de s_{20} ne subit aucune modification sensible lorsqu'on passe de NaCl 0.1 M à NaCl 1 M. Pour les formes native, dénaturées *s* et *f*, on obtient respectivement $s_{20} = 2.7 \pm 0.2$; 4.7 ± 0.2 ; 13.5 ± 0.3 .

3. Nature de l'inhibition

De la convergence des droites d'EADIE (Fig. 5 et 6), on serait tenté de conclure à une inhibition du type compétitif s'exerçant au niveau du substrat^{17,8}. Toutefois, cette représentation n'est pas suffisante pour conclure. En effet avec ce type d'inhibition, l'inverse de la vitesse pour une concentration déterminée de substrat *s*, devient fonction linéaire de (1), la concentration de l'inhibiteur¹⁹:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K'_m}{V_m s} \left[1 + \frac{(1)}{K_i} \right]$$

K_i est la constante d'inhibition. Or, dans le cas présent, la linéarité de la vitesse d'hydrolyse de la lactoglobuline *s* et *f* en fonction de la concentration saline n'est pas vérifiée. L'augmentation de K'_m avec la concentration en sels, ne correspond donc pas à un mécanisme de ce genre. Par contre, on obtient un accord satisfaisant si l'on attribue à l'effet Debye la variation de K'_m en fonction de la force ionique μ du milieu réactionnel.

La relation de Debye et Hückel qui exprime la correction à apporter pour l'effet de sels peut s'écrire:

$$\log_{10} K'_m = \log_{10} K'_m o + B z_a z_b \sqrt{\mu},$$

avec $B = 0.513$ à 35° ; $K'_m o$ est la constante de Michaelis extrapolée à dilution infinie, z_a et z_b la valence respective des groupes chargés de l'enzyme et du substrat intervenant dans l'association.

Des expériences ont été faites pour un grand nombre de concentrations salines variant entre 0.05 M et 1.7 M avec différents sels (NaCl, KCl, Na_2SO_4). La linéarité de $\log K'_m$ en fonction de $\sqrt{\mu}$ est vérifiée à la fois pour la lactoglobuline dénaturée *s* et pour la forme *f* (Fig. 7). Les deux droites obtenues ont des pentes différentes. Elles concourent en un point de l'axe des ordonnées, ce qui signifie que à force ionique nulle, on obtient la même constante de Michaelis pour les substrats *s* et *f*, si l'on exprime cette constante en mg/ml (soit $K_m o = 1.7$ mg/ml), et si on l'exprime en moles, à condition de considérer comme unité cinétique de substrat un monomère qui aurait même poids moléculaire que la protéine native (soit $K_m o = 4.9 \cdot 10^{-5}$ M). Cette manière de faire a été discutée par ailleurs¹⁰. Les constantes de Michaelis extrapolées à l'origine des abscisses étant identiques pour les deux substrats *s* et *f*, il s'ensuit

une égalité des valeurs de l'énergie libre de formation des complexes à force ionique nulle. Les calculs sont faits en prenant pour les deux formes dénaturées, le poids moléculaire de la lactoglobuline native considérée comme monomère. A 35°, on a donc:

$$\Delta F_{10} = -6.050 \pm 50 \text{ cal}; \Delta H_{10} \approx 0; \Delta S_{10} = 20 \text{ u.e.}$$

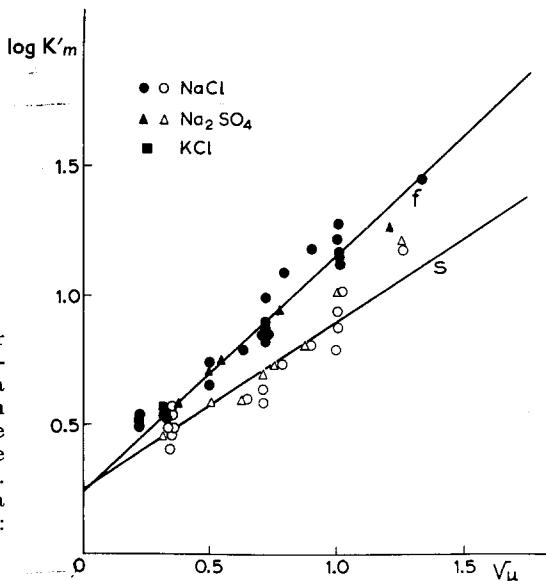


Fig. 7. Action de la force ionique sur l'affinité de l'enzyme pour ses deux substrats dénaturés *s* et *f*. — en abscisses: la racine carrée de la force ionique μ . — en ordonnées: $\log K'm$, les constantes de Michaelis sont exprimées en mg/ml de substrat pour les deux formes dénaturées. La pente des droites est calculée par la méthode des moindres carrés (pente *s*: 0.57 ± 0.08 ; pente *f*: 0.93 ± 0.08).

III. ACTIVATION DES COMPLEXES INTERMÉDIAIRES

La théorie des vitesses absolues donne une relation simple entre la constante spécifique de vitesse de décomposition du complexe k_s , et les constantes thermodynamiques correspondant à l'activation de ce complexe:

$$k_s = \frac{kT}{h} e^{-\Delta H^\ddagger / RT} e^{\Delta S^\ddagger / R};$$

ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , sont respectivement l'enthalpie et l'entropie d'activation. ΔH^\ddagger s'obtient à partir de l'énergie d'activation expérimentale d'après les variations de k_s en fonction de l'inverse de la température absolue.

Si K_m reste constant quelle que soit la température, il est indifférent d'étudier les variations de la vitesse initiale d'hydrolyse v plutôt que les variations de k_s en fonction de $1/T^{20}$. Les déterminations de v à plusieurs températures ont toujours été faites pour des concentrations de substrat variant assez largement de part et d'autre de K_m . L'expérience illustrée par la Fig. 4 précise d'autre part que même en NaCl 1 M, il n'y a pas de modification de K_m pour la lactoglobuline native.

Nous avons déterminé les valeurs de ΔH^\ddagger , ΔF^\ddagger , ΔS^\ddagger correspondant à l'activation des complexes intermédiaires que forme la trypsin avec la lactoglobuline native et ses formes dénaturées par la chaleur.

1. Lactoglobuline native

La Fig. 8 illustre l'effet de la concentration saline sur l'énergie d'activation expérimentale. La croissance progressive des valeurs de ΔH^\ddagger avec la concentration saline est partiellement compensée par l'augmentation de ΔS^\ddagger , la valeur de ΔF^\ddagger varie assez peu (voir Tableau I). Le ralentissement de la vitesse d'hydrolyse en présence de NaCl (ou de KCl) s'accompagne d'une augmentation de l'énergie d'activation d'autant plus grande que la concentration saline du milieu est plus forte. A mesure qu'augmente la force ionique, s'élève la barrière de potentiel que doit franchir le complexe pour passer à l'état activé. En outre, les droites d'Arrhenius obtenues dans les différents milieux salins (Fig. 8) convergent en un point qui correspond à une température d'environ 60°.

TABLEAU I

CONSTANTES THERMODYNAMIQUES CORRESPONDANT À L'ACTIVATION DES COMPLEXES INTERMÉDIAIRES À pH 7.00 ET À 35° C.

Les valeurs sont calculées en adoptant pour la trypsine un poids moléculaire de 24.000. On admet également que 20 liaisons peptidiques sont coupées par monomère de lactoglobuline native et dénaturée.

Lactoglobuline	NaCl ou KCl concentration molaire	V_m	k_s	k_s	ΔF^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
		Liaisons pept. $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ pour 1 mg ml^{-1} de trypsine $\cdot 10^2$	Liaisons pept. $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ pour 1 mg d'azote $\cdot 10^6$	sec^{-1}	cal/mole	cal/mole	u.e.*
Native	0.01	33	2.0	0.068	19.600	18.500	-4
	0.05	33	2.0	0.068	19.600	18.500	-4
	0.1	33	2.0	0.068	19.600	18.500	-4
	0.5	12.5	0.76	0.026	20.250	26.000	+19
	1.0	6.3	0.38	0.013	20.700	31.500	+35
Dénaturée s	0.05	130	8.0	0.260	18.600	11.700	-22
	0.1	130	8.0	0.260	18.600	11.700	-22
	0.5	130	8.0	0.260	18.600	11.700	-22
	1.0	130	8.0	0.260	18.600	11.700	-22
Dénaturée f	0.05	35	2.05	0.072	19.600	11.700	-26
	0.1	35	2.05	0.072	19.600	11.700	-26
	0.5	35	2.05	0.072	19.600	11.700	-26
	1.0	35	2.05	0.072	19.600	11.700	-26

* unités d'entropie.

2. Lactoglobuline dénaturée par la chaleur: formes s et f

Nous avons vu que la constante de Michaelis varie avec la force ionique. Extrapolée à force ionique nulle, elle a même valeur pour les deux substrats *f* et *s*, si l'on considère le monomère. Par contre, la constante de décomposition irréversible du complexe n'est pas sensible à la concentration saline du milieu (Fig. 5 et 6), mais diffère pour les substrats *s* et *f* avec les valeurs respectives : $8 \cdot 10^{-5}$ et $2 \cdot 10^{-5}$ liaisons peptidiques $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ par mg ml^{-1} d'azote de l'enzyme. L'énergie d'activation expérimentale a été trouvée identique pour les deux substrats de même qu'à pH 8¹⁰ et de plus elle ne varie pas avec la force ionique du milieu ($E = 12.300$ cal) (Fig. 9).

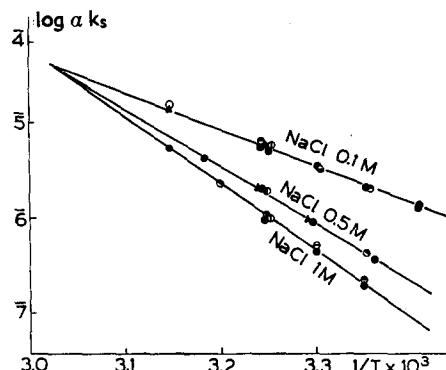


Fig. 8. Hydrolyse de la lactoglobuline native par la trypsine: énergie d'activation expérimentale en présence de $NaCl$ et KCl ($0.1 M$; $0.5 M$; $1 M$). αk_s est la constante spécifique de vitesse mesurée par la méthode potentiométrique¹⁴.

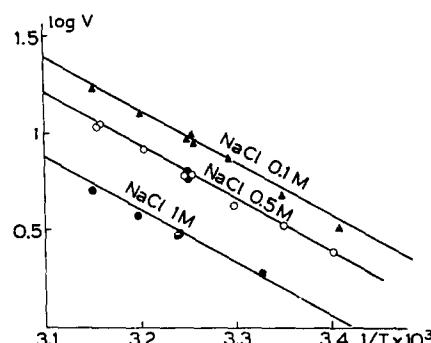


Fig. 9. Hydrolyse de la lactoglobuline dénaturée f : énergie d'activation expérimentale en présence de $NaCl$ (concentration de substrat: $s_0 = 2.05 \text{ mg/ml}$).

IV. DISCUSSION

L'augmentation de la concentration saline entraîne donc des conséquences très différentes sur l'hydrolyse de la lactoglobuline selon que la protéine est à l'état "natif" ou dénaturé par la chaleur. Avec la lactoglobuline native, quelle que soit la force ionique du milieu, l'affinité de l'enzyme pour son substrat reste inchangée; seule diminue la vitesse de décomposition du complexe intermédiaire. Avec le substrat dénaturé, au contraire, on note une diminution de l'affinité en fonction de la concentration saline d'autant plus importante que le substrat est "plus dénaturé"; la vitesse maximum n'est pas modifiée. Cette inhibition n'est pas imputable à une action spécifique du cation ou de l'anion mais résulte de l'effet de la force ionique du milieu sur la formation du complexe intermédiaire. L'importance relative des attractions coulombiennes par rapport aux attractions de van der Waals est très différente selon l'état du substrat. Aucun effet électrostatique n'a été mis en évidence dans l'association trypsine-lactoglobuline native, ce qui suggère que les forces de van der Waals interviennent principalement. Par contre, dans la formation des complexes entre la trypsine et les formes dénaturées de la lactoglobuline, on note une attraction électrostatique dont l'énergie maximum correspond à 750 calories. Il semble que l'attraction électrostatique qui intervient ici soit imputable à une ou plusieurs charges locales progressivement démasquées au cours de la dénaturation du substrat. L'effet de sels est plus important pour la forme f que pour la forme s , comme le révèle la différence des pentes des droites (Fig. 7). Cherchons à préciser. L'application de la relation de Debye nous donne une valeur de $z_a z_b$ de 1.2 pour la forme s et 1.9 pour la forme f à pH 7.00, et d'après LABEYRIE ET NASLIN²¹, 4 pour la sérumalbumine à pH 8.4. Il serait évidemment un peu hâtif de présenter une interprétation quantitative de ces valeurs; elles montrent toutefois qu'il s'agit vraisemblablement d'un effet de charges locales et non de charges globales (dans ce dernier cas la valeur de $z_a z_b$ serait supérieure à 100).

D'après les travaux de KUNITZ²² et les études plus récentes de MCLAREN²³, il existe sur la molécule de trypsine au moins trois charges capables de lier l'enzyme à l'inhibiteur du soja. Or l'inhibiteur du soja est un inhibiteur compétitif et doit

théoriquement occuper le même site de fixation qu'une protéine quelconque servant de substrat à la trypsine. La trypsine possèderait donc au moins trois charges libres sur le site de fixation, mais elles ne semblent intervenir que partiellement dans la liaison de l'enzyme avec la lactoglobuline dénaturée et pratiquement pas dans la formation du complexe trypsine - lactoglobuline native.

Ce travail souligne aussi une action inhibitrice des chlorures alcalins sur le processus d'activation des complexes intermédiaires. Lorsque la molécule de lactoglobuline est à l'état natif, la vitesse de décomposition du complexe intermédiaire se trouve notablement ralenti par la présence de sels; ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de l'énergie d'activation expérimentale. Au contraire lorsque le substrat est dénaturé, la vitesse maximum de protéolyse et les constantes thermodynamiques correspondant au processus d'activation du complexe restent les mêmes, quelle que soit la concentration saline du milieu. Cette différence liée à la modification du substrat fait naturellement penser à une action des sels au niveau des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène...). Il semble donc raisonnable d'admettre que la nouvelle répartition des charges entraînée par la présence de NaCl a pour effet de renforcer quelques-unes des liaisons faibles qui maintiennent la configuration native de la protéine, et lui confèrent une structure plus rigide. Que le processus de dénaturation (si l'on entend par là la rupture de quelques liaisons faibles) se produise pendant l'activation du complexe, comme le suggère LABEYRIE¹⁰, ou qu'il constitue un stade initial de la protéolyse selon l'hypothèse de LINDERSTRÖM-LANG²⁴, notre interprétation reste valable.

La protection des liaisons faibles par les chlorures alcalins permet aussi d'expliquer le ralentissement de la vitesse d'autolyse de la trypsine; le sel protégerait l'enzyme contre sa dénaturation²⁵. En accord avec notre interprétation, on doit citer les travaux de SADRON²⁶ et DOTY²⁷ qui montrent que NaCl retarde la dénaturation par la chaleur de l'acide désoxyribonucléique. GORINI ET AUDRAIN²⁸, GORINI, FÉLIX ET FROMAGEOT^{29,30}, attribuent aux cations bivalents, particulièrement Ca⁺⁺ et Mn⁺⁺ une action protectrice analogue contre la dénaturation des protéines par la chaleur.

Je tiens à remercier M. le Professeur RENÉ WURMSER pour l'intérêt qu'il n'a cessé de témoigner à ce travail.

Mes remerciements vont également à Mlle S. GUINAND: les problèmes qu'elle m'a posés, liés à l'étude du complexe intermédiaire au moyen de la lumière diffusée sont à l'origine de cette étude.

RÉSUMÉ

A pH 7.0, l'hydrolyse trypsique des formes natives et dénaturées de la lactoglobuline est inhibée par les chlorures alcalins aux concentrations supérieures à 0.1 M. Selon l'état du substrat, l'inhibition s'exerce soit au niveau de l'association réversible de l'enzyme avec son substrat, soit au niveau du processus d'activation.

L'étude cinétique de la réaction en fonction de la force ionique du milieu fournit des indications sur la nature des liaisons mises en jeu dans le maintien de la configuration du complexe intermédiaire. Avec la lactoglobuline native, n'interviennent pratiquement que des forces d'attraction de Van der Waals à faible distance; avec l'une et l'autre des formes dénaturées, la trypsine s'associe au moyen de liaisons de Van der Waals et de liaisons électrostatiques. L'attraction coulombienne résulte vraisemblablement du démasquage d'une ou de plusieurs charges locales au cours de la dénaturation de la lactoglobuline.

Ce travail souligne également une action des chlorures alcalins sur le processus d'activation du complexe intermédiaire lorsque la lactoglobuline est à l'état natif. Elle est interprétée comme un renforcement des liaisons faibles, qui maintiennent la configuration native de la protéine.

SUMMARY

At pH 7, tryptic hydrolysis of native and denatured lactoglobulin is inhibited by sodium and potassium chloride if their concentration is higher than 0.1 M. According to the state of the substrate, inhibition takes place on the level either of the reversible association of the enzyme with the substrate or on the level of the process of activation.

The study of the kinetics of the reaction as a function of the ionic strength of the medium gives some information about the nature of bonds which maintain the configuration of the intermediary complex. With the native lactoglobulin, practically only van der Waals' forces of attraction, effective over short distances, are involved; trypsin is linked with the different forms of the denatured protein, by van der Waals' adsorption forces and by electrostatic bonds. The coulombic attraction probably results from one or several local charges which are unveiled during the denaturation of the lactoglobulin.

The action of sodium and potassium chloride on the process of activation of the intermediary complex in the case of the native lactoglobulin is also stressed; this action is considered as a strengthening of weak bonds which maintain the native configuration of the protein.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. NACHMANSOHN ET I. W. WILSON, *Advances in Enzymol.*, 12 (1951) 259.
- 2 F. BERGMANN, *Discussions Faraday Soc.*, 20 (1955) 126.
- 3 D. H. ADAMS ET V. P. WHITTAKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 543.
- 4 R. F. STEINER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49 (1954) 71.
- 5 R. F. STEINER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 455.
- 6 D. R. BRIGGS ET R. HULL, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 2007.
- 7 A. G. OGSTON ET R. CECIL, *Biochem. J.*, 44 (1949) 33.
- 8 J. YON, *J. chim. phys.*, 52 (1955) 413.
- 9 S. GUINAND, résultats non encore publiés.
- 10 F. LABEYRIE, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 72.
- 11 B. D. POLIS, H. W. SCHMUCKLER, J. H. CUSTER ET T. L. MCMEEKIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4965.
- 12 P. JOLIOT, communication personnelle.
- 13 K. LINDESTRÖM-LANG, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 17 (1927) No. 4.
- 14 J. YON, *Bull. soc. chim. biol.*, 39 (1957) 1163.
- 15 L. MILLER, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, sér. chim.*, 23 (1938) 45.
- 16 J. YON, *J. chim. phys.*, 52 (1955) 452.
- 17 G. S. EADIE, *Science*, 116 (1952) 688.
- 18 J. S. FRIEDENWALD ET G. W. MAENGWYN-DAVIES, in *Symposium on the Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, Baltimore (1954).
- 19 M. DIXON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 170.
- 20 K. D. GIBSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 221.
- 21 F. LABEYRIE ET L. NASLIN, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- 22 M. KUNITZ, in *Crystalline Enzymes*, Columbia Univ. Press, New York (1948).
- 23 A. D. McLAREN, *Compt. rend. lab. Carlsberg, sér. chim.*, 28 (1952) 175.
- 24 K. LINDESTRÖM-LANG, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 14 (1949) 117.
- 25 J. YON, résultats non encore publiés.
- 26 C. SADRON, *3e Congr. intern. biochim.*, Bruxelles (1955).
- 27 P. DOTY, *3e Congr. intern. biochim.*, Bruxelles (1955).
- 28 L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 184.
- 29 L. GORINI ET F. FÉLIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 128.
- 30 L. GORINI, F. FÉLIX ET CL. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 283.

Reçu la 22 juillet 1957