

INHIBITION DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE
DE LA SÉRUM ALBUMINE PAR LES SELS DE SODIUM:
RÔLE DE L'ANION

FRANÇOISE LABEYRIE ET LYLIANE NASLIN

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

L'influence des sels sur les réactions enzymatiques a été souvent signalée; les cas étudiés se rattachent généralement à une action spécifique de l'anion ou du cation fixé sur l'enzyme ou sur le substrat. Cependant, si l'attraction entre un enzyme et son substrat est due, au moins partiellement, à des forces électrostatiques, on doit pouvoir observer une inhibition non spécifique par les sels, correspondant à la modification de la constante d'association enzyme-substrat, sous l'influence de la force ionique par effet Debye-Hückel.

Pour tenter de mettre en évidence un tel effet de force ionique, nous avons entrepris l'étude de l'influence de sels dans le domaine des faibles concentrations salines sur la protéolyse de la sérumalbumine humaine par la trypsine; nous avons choisi des sels de sodium dont les anions ont différente valence au pH expérimental (8.4): chlorure, acétate, bromure, thiocyanate et méthylorange monovalents; sulfate, phosphate et oxalate divalents; citrate trivalent et pyrophosphate à moitié sous la forme trivalente et à moitié sous la forme tétravalente.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La réaction est suivie sur une solution préparée de la façon suivante: x ml de la solution stock de sérumalbumine, a ml de la solution saline, $8-x-a$ ml d'eau bidistillée. Les quantités a et x sont calculées pour avoir les concentrations finales voulues en protéine et en sel. Le bêcher contenant cette solution est placé dans un bain thermostaté à 20°C ($\pm 0.05^\circ$); le pH est amené à la valeur voulue par addition de soude 0.1 N; la concentration d'ions Na⁺ ainsi introduits est de l'ordre de $4 \cdot 10^{-4}$ N par mg/ml de protéine.

On ajoute la quantité voulue de trypsine sous un faible volume (0.150 ml). On titre alors en fonction du temps, le nombre de groupes NH₂ apparus par hydrolyse des liaisons peptidiques, en mesurant la quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH constant¹; le détail de la technique expérimentale a été précisé antérieurement². Le rapport du nombre de groupes titrés au nombre de liaisons peptidiques détruites, soit [NH₂]/[LP] est égal à [NH₂]/[NH₂ + NH₃⁺] et varie en fonction du pH, aux environs de pK_{NH₃}; il devient égal à 1 quand le pH est supérieur d'environ 2 unités au pK_{NH₃}. Nous avons vérifié qu'au dessus de pH 8.3, la vitesse mesurée est indépendante du pH, quelle que soit la concentration de chlorure de sodium (0.1 et 0.01 N), nous sommes donc bien placés dans les conditions où nous titrons le nombre exact de liaisons peptidiques détruites.

Sérumalbumine humaine

L'échantillon lyophilisé a été préparé au Centre National de Transfusion Sanguine; il correspond à la fraction V de COHN et contient les sels du plasma recueilli sur solution anticoagulante. La protéine est dissoute dans l'eau bidistillée sur verre, à la concentration de 50 mg/ml, puis dialysée en tube de cellophane à 4°C, avec agitation, contre de l'eau bidistillée fréquemment renouvelée jusqu'au moment où la résistivité à l'équilibre du liquide extérieur est voisine de 80,000 ohms/cm,

à 20°C (équivalente à celle d'une solution de $10^{-5} N$ NaCl). Au cours de cette dialyse, la solution devient trouble, on la centrifuge 15 min à 12,000 r.p.m.; la pureté de la sérumalbumine, telle qu'on peut la mesurer par électrophorèse selon Tiselius, est voisine de 90 %. La solution ainsi préparée constitue la solution stock, elle est conservée à 3°C et utilisée pendant une période d'environ 8 jours; les expériences faites dans ces conditions sont bien reproductibles. La concentration est déterminée à partir des densités optiques à 280 m μ , mesurées au spectrophotomètre Beckman, en prenant $E_{1\text{mg/ml}}^{1\text{cm}} = 0.53^3$.

Trypsine

On a utilisé un échantillon Worthington (contenant environ 50 % de sulfate de magnésium), dissous et dialysé contre HCl $10^{-4} N$, cette solution est filtrée et conservée à 3°C; sa concentration, voisine de 10 mg/ml, est mesurée exactement à partir des densités optiques à 280 m μ avec $E_{1\text{mg/ml}}^{1\text{cm}} = 1.59^4$.

Solutions salines

Tous les sels utilisés sont des produits purs pour analyses; les solutions sont préparées par pesées exactes. La concentration des solutions de bromure et de thiocyanate, hygroscopiques, a été vérifiée par mesure de l'indice de réfraction en lumière blanche, en prenant pour d_n/d_c les valeurs déterminées pour la raie jaune du sodium soit 1.37 et $1.30 \cdot 10^{-4}$ respectivement⁵.

Mesure des pH

Ils sont mesurés avec un pH-mètre à haute sensibilité et grande stabilité. Les tampons de référence ont été étalonnés à l'électrode d'hydrogène.

RÉSULTATS

Le chlorure de sodium se comporte comme un inhibiteur de l'hydrolyse de la sérumalbumine par la trypsine (Fig. 1); son action est nette aux concentrations supérieures à $10^{-2} M$. On peut remarquer sur la Fig. 1 que dans ces conditions expérimentales, il est facile de déterminer avec précision les vitesses initiales de réaction aux concentrations salines relativement élevées, parce que la réaction évolue linéairement dans le temps. Il en est autrement aux faibles concentrations salines: quelques liaisons peptidiques sont probablement coupées très rapidement pendant la phase initiale de la réaction: il n'est donc pas possible de faire l'étude quantitative précise de l'inhibition aux faibles concentrations de NaCl.

L'énergie d'activation de la protéolyse, mesurée entre 20 et 40°C, n'est pas modifiée sensiblement lorsqu'on fait varier la concentration en chlorure de sodium de 0.1 à 0.01 N; on a trouvé, dans les deux cas, une valeur voisine de 20.000 cal/mole.

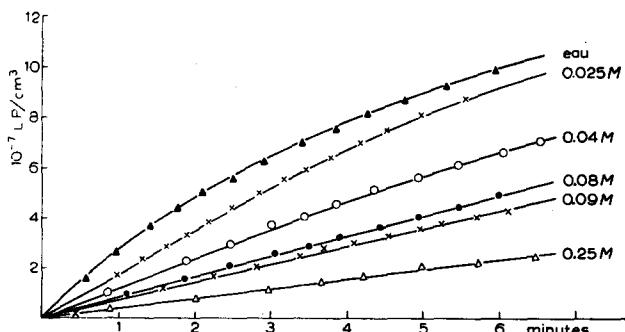


Fig. 1. Cinétique d'hydrolyse de la sérumalbumine humaine par la trypsine pour différentes concentrations de chlorure de sodium. Sérumalbumine humaine 3.7 mg/ml, Trypsine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $t = 20^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8.4$.

A la lactoglobuline native en milieu NaCl 0.1 N, et à la lactoglobuline dénaturée par la chaleur correspondent des ΔE égaux respectivement à 19,000 et 14,000 cal/mole⁶.

Tous les sels que nous avons étudiés produisent également une inhibition. L'ensemble des résultats est mis en évidence sur la Fig. 2 à l'aide d'une représentation semilogarithmique: il est frappant de constater que les sels dont l'anion a la même valence, ont le plus souvent une action similaire: il en est ainsi pour le chlorure, le bromure et l'acétate d'une part, le sulfate, le phosphate et l'oxalate d'autre part. Par contre le thiocyanate et surtout le méthylorange ont une action très supérieure à celle des autres sels monovalents.

On peut calculer d'après ces résultats les rapports entre les pouvoirs inhibiteurs des différents sels et celui du chlorure de sodium, soit I_r ; le logarithme de ce rapport est donné par la valeur de la translation parallèle à l'axe des abscisses, nécessaire pour amener les courbes correspondantes en coïncidence avec la courbe "NaCl"; les valeurs de I_r sont données dans le Tableau I en même temps que les concentrations d'ion Na et les forces ioniques relatives. Ce tableau montre nettement que le facteur principal n'est pas la concentration d'ions Na⁺; le pouvoir inhibiteur paraît lié à la force ionique puisque à part le thiocyanate et le méthylorange, les sels dont l'anion a la même

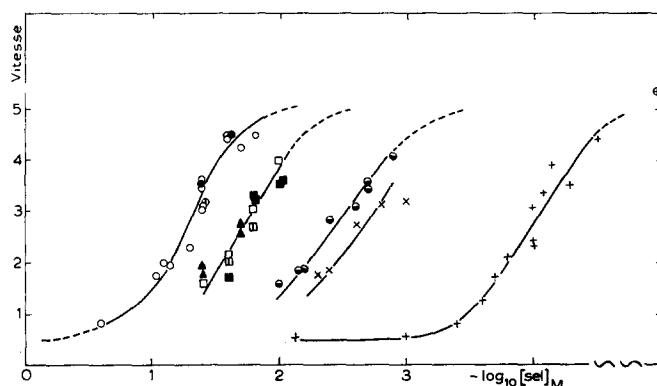


Fig. 2. Variation de la vitesse de réaction avec la concentration saline pour une série de sels de sodium. Conditions expérimentales: voir Fig. 1. ○ Cl⁻; ● Br⁻; ○ CH₃CO₂⁻; ▲ SCN⁻; □ SO₄²⁻; ▨ C₂O₄²⁻; ■ PO₄H²⁻; ⊖ Citrate³⁻; ✕ [½ P₂O₇H³⁻ + ½ P₂O₇⁴⁻]; + méthylorange; ⊕ eau pure.

TABLEAU I
POUVOIR INHIBITEUR RELATIF I_r DES SELS ÉTUDIÉS À pH 8.4

| Sel | I_r | Concentration en Na ⁺ d'une solution molaire | |
|---------------|-------|--|---|
| | | 1 | 1 |
| Acétate | | | |
| Bromure | | | |
| Chlorure | | | |
| Thiocyanate | 2.4 | 1 | 1 |
| Méthylorange | 560 | 1 | 1 |
| Sulfate | | | |
| Phosphate | 2.8 | 2 | 3 |
| Oxalate | | | |
| Citrate | 14 | 3 | 6 |
| Pyrophosphate | 20 | 3.5 | 8 |

valence, produisent le même effet. Cependant le citrate et le pyrophosphate ont un pouvoir inhibiteur environ deux fois plus grand que celui correspondant à la seule force ionique de leur solution.

L'action inhibitrice du pyrophosphate sur l'hydrolyse trypsique du blanc d'oeuf a déjà été signalée par SCHALE⁷.

DISCUSSION

Pour expliquer ces résultats, il y a lieu d'envisager, comme on l'a vu dans l'introduction, deux effets possibles:

(1) un effet de force ionique tel que l'a observé J. YON⁸ dans ce même laboratoire; elle a montré que le chlorure et le sulfate de sodium inhibent l'hydrolyse trypsique de la lactoglobuline dénaturée par la chaleur en modifiant la constante apparente de Michaelis. Cette modification, de la forme $\log K_m = a + \beta \sqrt{\mu}$ (μ étant la force ionique des solutions salines variant de 0.05 à 1.2), suggère que la force ionique agit sur la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat par un effet de type Debye-Hückel.

(2) Un effet spécifique dû à la fixation des ions soit sur l'enzyme, soit—and cette hypothèse est la plus probable—sur la sérumalbumine elle-même. En ce qui concerne la première possibilité, on connaît actuellement peu de choses; il semble que le méthylorange ne se fixe pas sur la trypsine à pH 8 puisque le spectre du méthylorange n'est pas modifié par l'addition de trypsine⁹.

En ce qui concerne la fixation sur la sérumalbumine au contraire, on sait, d'après les travaux de SCATCHARD et coll.¹⁰, de KLOTZ ET URQUHART¹¹, de CARR¹², que l'affinité des anions pour la sérumalbumine est notable et varie dans le sens suivant aux pH compris entre 6 et 9:

Phosphate < citrate < chlorure < thiocyanate ≪ méthylorange (le phosphate est à ce pH moitié divalent moitié monovalent, le citrate est en grande partie divalent). Les ions Na⁺ ne se fixent pas sur la sérumalbumine à ce pH¹³.

A la fixation des anions sur la sérumalbumine peut donc correspondre un blocage du substrat selon un mode d'action comparable avec celui des ions Ca⁺⁺ et NH₄⁺ protégeant la lactoglobuline et la sérumalbumine contre l'attaque par la trypsine^{14, 15}.

On peut interpréter les résultats de nos expériences de la façon suivante:

(a) L'action du thiocyanate et surtout du méthylorange qui inhibent la réaction à des concentrations respectivement 2.4 et 560 fois plus faibles que les autres sels monovalents, et qui ont une affinité notable pour la sérumalbumine (les constantes intrinsèques de dissociation sont de l'ordre de $K_d = 10^{-3}$ et 10^{-5} respectivement)^{10, 16}, est une action spécifique de ces anions. Il est probable que cette action est due à la fixation de ces anions sur l'albumine, la protéine ainsi combinée n'étant plus sensible à la trypsine.

(b) L'inhibition par les ions monovalents Cl⁻, Br⁻, CH₃CO₂⁻ et par les ions divalents PO₄H⁻⁻, SO₄⁻⁻ et C₂O₄⁻⁻, par le citrate et le pyrophosphate, est due vraisemblablement en grande partie à un effet de force ionique; ainsi s'explique (1) le manque de parallélisme entre le pouvoir inhibiteur et l'affinité de fixation sur la sérumalbumine, (2) la relation entre le pouvoir inhibiteur et la force ionique.

(c) On a vu que le pouvoir inhibiteur du citrate et du pyrophosphate est plus grand que celui correspondant à la seule force ionique des solutions; la différence est

due probablement à une fixation de ces anions sur l'enzyme ou la sérumalbumine.

(d) Enfin puisque les anions du groupe (a) se fixent sur la sérumalbumine aux mêmes emplacements que le méthylorange¹¹, quoiqu'avec une affinité beaucoup plus faible (pour le NaCl $K_d = 2.2 \cdot 10^{-2}$), il est possible qu'une petite partie de l'inhibition observée par les sels du groupe (a) soit liée à une fixation de ces anions.

L'hypothèse d'une action spécifique des anions sur la trypsine elle-même reste valable, quoique peu probable.

Nous tenons à remercier Mr. le Professeur RENÉ WURMSER des suggestions et critiques qu'il a apportées à ce travail, ainsi que Mr. le Docteur LEWIN qui a mis à notre disposition la sérumalbumine humaine utilisée dans ces expériences.

RÉSUMÉ

Tous les sels de sodium étudiés, ajoutés à une solution de sérumalbumine humaine dialysée, se comportent comme inhibiteurs de la protéolyse trypsique de ce substrat. La concentration de sel qui donne 50 % d'inhibition est $6 \cdot 10^{-2} M$ pour NaCl et varie avec la nature et la valence de l'anion dans l'ordre suivant: $\text{Cl}^- \sim \text{Br}^- \sim \text{CH}_3\text{CO}_2^- > \text{SCN}^- > \text{SO}_4^{2-} \sim \text{HPO}_4^{2-} \sim \text{C}_2\text{O}_4^{2-} > \text{citrate}^{-3} > \text{P}_2\text{O}_7^{(-3 \text{ et } -4)} > \text{méthylorange}^-$.

Les parts correspondant à l'effet de force ionique et à la fixation des anions sur la sérumalbumine sont discutées pour les différents inhibiteurs.

SUMMARY

All sodium salts, when added to a dialysed solution of serumalbumin, behave as inhibitors of tryptic proteolysis of this substrate. The concentration of salt giving 50 % inhibition is $6 \cdot 10^{-2} M$ for NaCl and varies with the nature and valency of the anion in the following order: $\text{Cl}^- \sim \text{Br}^- \sim \text{CH}_3\text{CO}_2^- > \text{SCN}^- > \text{SO}_4^{2-} \sim \text{HPO}_4^{2-} \sim \text{C}_2\text{O}_4^{2-} > \text{citrate}^{-3} > \text{P}_2\text{O}_7^{(-3, -4)} > \text{methylorange}^-$.

The parts corresponding to the effect of ionic strength and to the fixation of the anions on the serumalbumin are discussed for the different inhibitors.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. G. WALEY ET J. WATSON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 328.
- ² F. LABEYRIE, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1956) 1271.
- ³ E. J. COHN, W. L. HUGHES ET J. H. WEARE, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 1753.
- ⁴ P. JOLIOT, communication personnelle.
- ⁵ A. HEYDWEILLER, *Ann. Physik*, 41 (1913) 505.
- ⁶ F. LABEYRIE, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 72.
- ⁷ O. SCHALES, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 79 (1952) 75.
- ⁸ J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 111.
- ⁹ P. MAY, communication personnelle.
- ¹⁰ G. SCATCHARD, I. H. SCHEINBERG ET S. H. ARMSTRONG, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 535.
- ¹¹ I. M. KLOTZ ET J. M. URQUHART, *J. Phys. & Colloid. Chem.*, 53 (1949) 100.
- ¹² C. W. CARR, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40 (1952) 286.
- ¹³ C. W. CARR, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 476.
- ¹⁴ L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 180.
- ¹⁵ J. YON, *J. chim. phys.*, 52 (1955) 413.
- ¹⁶ I. M. KLOTZ, R. K. BURKHARD ET J. M. URQUHART, *J. Phys. Chem.*, 56 (1952) 77.

Reçu le 21 octobre 1957