

BBA 12260

SUR LA DÉTERMINATION DES SITES ACTIFS DE CERTAINES ENZYMES

V. RÉACTION DU SEL DE ROUSSIN AVEC DES CHÉLATES

A. DOBRY-DUCLAUX

(avec la collaboration technique de Mlle N. DAUMAS)

Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France)

(Reçu le 25 janvier, 1963)

SUMMARY

The determination of the active sites of certain enzymes

V. Reaction of Roussin salt with chelates

Roussin salt ($K[Fe_4S_3(NO)_7]$) reacts with chelates without destroying them, at pH values corresponding to the active range of most enzymes. Inhibition of this activity, which this complex provokes in all the enzymes studied till now, cannot be attributed to the displacement of the metal by the Roussin salt.

The basic nitrogen groups react with Roussin salt in the free state, as well as in the chelate form. In both cases, the reaction products are poorly soluble. This poor solubility indicates that if these groups are found in the active centre of an enzyme, the Roussin salt would block this centre, irrespective of the state in which these groups were found.

INTRODUCTION

Dans le deuxième mémoire de cette série¹, j'ai montré que l'action inhibitrice du sel de Roussin ou nitrososulfure de fer* sur une série d'enzymes, pouvait s'expliquer par sa fixation sur plusieurs groupes basiques du centre actif, groupes très rapprochés les uns des autres.

Parmi les divers modes d'inhibition, attribuables à cette fixation (et variables d'un enzyme à l'autre), tels que: changement de la structure secondaire ou tertiaire, compétition pour la fixation avec un des substrats etc., on peut aussi envisager, dans certains cas, la possibilité d'une destruction du centre actif. En effet, si le centre est constitué par un chélate, dont les ligants sont des groupes basiques, liés à un métal indispensable à l'activité enzymatique, le NSFK* peut entrer en

Abréviations: Im, imidazole; En, éthylènediamine.

* J'ai utilisé dans les mémoires précédents l'abréviation NSF pour désigner le sel de Roussin $K[Fe_4S_3(NO)_7]$. Pour éviter toute confusion, j'emploierai dorénavant le symbole NSF^- pour le radical complexe et le symbole NSFK pour désigner la molécule non dissociée (sel de potassium).

compétition avec ce métal, le chasser même du centre actif, pour former lui-même des combinaisons peu dissociées avec les ligants correspondants. Quoique les constantes de dissociation des chélates soient souvent très petites, on ne peut pas écarter cette possibilité à priori, car la distance entre les ligants dans un chélate est très petite et l'affinité pour le NSFK est de ce fait très grande.

Parmi les enzymes que j'ai essayés jusqu'à présent, ce mode d'action pourrait être envisagé* pour: (a) l'alcool² et la glutamate³ deshydrogénases qui contiennent le zinc fortement lié et qui est indispensable à leur activité, et (b) l'hexokinase⁴, la carboxylase⁵ et l'isocitrate deshydrogénase⁶ chez lesquelles, au contraire, le métal divalent Mg^{2+} est si faiblement lié qu'il est nécessaire d'en ajouter au mélange réactionnel.

Le but de ce travail est d'étudier l'action du NSFK sur les chélates. Comme métal nous avons choisi le zinc; plusieurs essais ont été faits avec des chélates de cobalt, sans que les résultats aient été différents. Comme donneurs avec des ligands basiques, nous avons employé l'imidazole, l'éthylènediamine et la polyvinylamine. A titre de comparaison, l'action du NSFK a été également étudiée sur un complexe basique de zinc, $Zn(NH_3)_4(OH)_2$.

Cette étude a été facilitée d'une part, et compliquée d'autre part, par le fait que tous les chélates essayés donnent avec le NSFK un précipité insoluble. Cette propriété facilite l'isolement des produits de réaction, mais laisse des doutes sur leur nature. En effet, les donneurs employés seuls réagissent aussi avec le NSFK, en formant des précipités insolubles. Il s'agissait donc de savoir si le précipité formé est un sel de NSF^- et d'amine ou d'imidazole, ou bien un composé formé par le chélate correspondant et le NSFK. Autrement dit, il s'agissait de savoir si le NSFK provoque une destruction du chélate, en réagissant avec les ligands et en chassant le métal, ou s'il réagit avec le chélate comme tel, sans provoquer sa destruction.

Dans la dernière alternative, deux modes de réaction sont possibles: ou le NSFK réagit avec le chélate par double décomposition, selon le schéma



ou il forme des sels doubles, par association d'une molécule de chélate avec un nombre défini de molécules de NSFK.

Les analyses des précipités obtenus ont confirmé la seconde alternative et le premier mode de réaction. L'expérience décrite ci-dessous, avec un complexe ammoniacal de zinc, montre directement que de tels composés triples, formés par le zinc, les donneurs et le NSF^- sont possibles.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Précipitation des chélates par le NSFK

Pour voir si le chélate est précipité sans décomposition par le NSFK, il aurait fallu opérer dans des conditions telles que seul le chélate soit présent en solution, sans excès de donneurs libres. Il serait nécessaire, en outre que, dans ces conditions le chélate soit soluble et que le pH de la solution corresponde à la zone d'activité des enzymes employées auparavant. Théoriquement, plus le pH est élevé, moins il

* Puisqu'on ne connaît pas le mode de liaison métal-enzyme, on ne peut pas écarter à priori la possibilité d'une chélation.

y a des ligants libres en solution. Le pH le plus proche, en moyenne, des essais enzymatiques se placerait vers 7.5. Mais nous n'avons pas pu effectuer nos expériences à ce pH, car le chélate de zinc et d'imidazole précipite à des pH > 6.8, tandis que celui d'éthylènediamine se décompose à des pH > 7.0, en libérant l'hydroxyde de zinc qui précipite. Nous étions donc obligés de nous limiter aux pH les plus grands, compatibles avec la stabilité des chélates.

Dans ces conditions, tous les ligants des donneurs ne sont pas engagés dans les chélates. Par addition du NSFK, l'équilibre entre le chélate et le donneur est forcément déplacé. Le sens de ce déplacement dépend de la substance avec laquelle le NSFK se combine de préférence. S'il se combine d'abord avec le chélate, il se forme spontanément de nouvelles molécules de chélate; inversement, la combinaison préférentielle avec les molécules de donneur conduit à une décomposition progressive du chélate. On peut immédiatement reconnaître la substance avec laquelle réagit le NSFK par le sens de la variation du pH au moment de la précipitation. En effet, dans le premier cas, il doit diminuer par formation forcée de nouvelles molécules de chélate; dans le second cas, par contre, il doit augmenter.

Au moment de la précipitation, nous avons toujours observé d'abord un palier constant du pH, suivi d'une chute notable. Aux pH voisins de la neutralité, l'affinité du NSFK pour les chélates est donc supérieure à l'affinité pour les donneurs libres (éthylènediamine, imidazole).

Si l'on ne prend pas de précaution de maintenir le pH constant au cours de la précipitation par le NSFK, on obtient des produits mal définis.

Préparation des chélates

Tous les chélates sont préparés par addition de soude, jusqu'au pH désiré, aux solutions de donneurs et de sulfate de zinc dans la proportion de 4 ligants pour 1 atome de zinc. Ces solutions, de concentration $4 \cdot 10^{-2}$ M en chélate, sont directement employées pour les essais.

Lors de la chélatation de la polyvinylamine par le zinc, il pourrait se produire éventuellement un empêchement stérique; et il en résulterait une non-saturation des quatre valences de coordination de zinc par les ligants. Si l'on n'ajoute à la solution de polyvinylamine que la quantité calculée de sulfate de zinc, en comptant 4 restes de ligants pour 1 atome de zinc, il pourrait rester en solution des groupes NH₂ libres. Pour éviter la présence éventuelle des ligants libres, nous avons ajouté dès le début un excès de sulfate de zinc et nous avons éliminé ensuite le zinc non chélaté. Exemple: à une solution de chlorhydrate de polyvinylamine à 2 mg par ml, additionnée de sulfate de zinc 0.10 M, en proportion de 2 groupes NH₂ pour 1 atome de zinc, on ajoute de la soude jusqu'à pH 8.5. On la dialyse trois fois contre dix fois son volume d'eau. L'excès de zinc précipite comme hydroxyde de zinc et est éliminé par centrifugation. Le pH final de la solution est environ 7.0.

Purification des précipités

La recristallisation des précipités obtenus par action du NSFK sur les chélates est impossible; vue leur très faible solubilité, il est nécessaire d'employer un très grand volume d'eau bouillante et ils se décomposent. Le précipité obtenu avec le

complexe ammoniacal de zinc est beaucoup plus soluble dans l'eau, mais la réaction fortement alcaline de la solution provoque à chaud la décomposition du NSF^- . Aucun de ces précipités ne cristallise à partir des solvants organiques. Ils laissent, par évaporation, une laque noire. Nous les avons purifiés par dissolution dans la méthyléthylcétone. L'impureté entraînée lors de la précipitation pourrait être soit l'hydroxyde, soit le sulfate de zinc. Les deux substances n'étant pas solubles dans ce solvant, nous n'avons employé pour les analyses que la partie soluble. Il ne reste d'ailleurs que très peu de résidu insoluble après ce traitement (sauf avec le précipité provenant du complexe ammoniacal de zinc).

Analyses

Fe et Zn: Après une destruction par l'acide sulfurique et une calcination, on sépare le fer et le zinc par l'ammoniaque; le précipité d'hydroxyde de fer, centrifugé, est redissous et précipité de nouveau. Cette opération est répétée 3 fois. On dose le zinc dans les surnageants réunis par titrage avec le complexon III (EDTA) à pH 10, en présence de noir ériochrome T comme indicateur⁷, et le fer par le même réactif sur le précipité redissous et amené à pH 2.5, en présence de Tirone comme indicateur⁸.

NH₃, (En), (Im): Par dosage d'azote d'après Kjeldahl. L'azote du groupe NO du NSF ne se réduit pas et échappe au dosage.

K: d'Après la méthode de WITTIG ET RAFF¹¹, par précipitation sous forme de tétraborate de potassium, après une destruction par l'acide sulfurique et une calcination soit des précipités, soit du liquide évaporé après la précipitation par le NSFK.

SO₄²⁻: Dosage par titrage conductimétrique dans le liquide surnageant après la précipitation de la presque totalité du chélate. On arrête la précipitation dès que la solution surnageante commence à se colorer, pour éviter la présence gênante d'un excès de NSFK.

Le potassium et le SO₄²⁻ se retrouvent intégralement dans la solution après la précipitation des chélates par le NSFK.

[Zn (En)₂] [Fe₄S₃(NO)₇]₂

	Zn	Fe	N
Trouvé (%)	{ 4.75	34.8	4.14
Calculé (%)	5.25	35.8	4.50

[Zn(Im)₄] [Fe₄S₃(NO)₇]₂

	Zn	Fe	N
Trouvé (%)	{ 4.85	29.4	8.27
Calculé (%)	4.80	29.6	8.17

[Zn(NH₃)₄] [Fe₄S₃(NO)₇]₂

	Zn	Fe	N
Trouvé (%)	{ 5.35	36.7	4.39
Calculé (%)	5.40	37.0	4.45

* Le NSFK qui a servi à cette précipitation contenait apparemment d'autres complexes de la série des sels de Roussin, de sorte qu'il ne contenait que 36.8% de Fe au lieu de 39.4%.

RÉSULTATS

Réaction du NSFK avec le complexe ammoniacal de zinc

Le NSFK ne donne aucun précipité ni avec l'ammoniaque diluée, ni avec un sel de zinc. Mais si l'on forme au préalable un complexe ammoniacal de zinc, en mélangeant une solution de sulfate de zinc avec un léger excès d'ammoniaque, il se forme, par addition d'une solution de NSFK un précipité microcristallin, de composition: $[Zn(NH_3)_4][Fe_4S_3(NO)_7]_2$. Il est décomposé en partie par les solvants organiques (alcool, méthyléthylcétones) en laissant comme résidu insoluble un composé de zinc, le nitrososulfure de fer passant en solution organique.

Réaction du NSFK avec le chélate de zinc et d'éthylènediamine

Le chélate précipité à pH 7.0 par addition du NSFK, est cristallin et il est soluble sans décomposition dans l'alcool ou la méthyléthylcétones. Il a pour formule: $[Zn(En)_4][Fe_4S_3(NO)_7]_2$.

Contrairement au composé obtenu avec le chlorhydrate d'éthylènediamine seule, où chaque groupe NH_3^+ est salifié par le radical NSF^- , le précipité obtenu avec le chélate correspondant ne contient qu'un radical NSF^- par deux groupes aminés.

Réaction du NSFK avec le chélate de zinc et d'imidazole

Le chélate formé en solution, contenant l'imidazole et le sulfate de zinc en proportion 4 molécule d'imidazole pour 1 atome de zinc, est précipité à pH 6.8 par le NSFK; le précipité cristallin, soluble sans décomposition dans l'alcool ou la méthyléthylcétones, a pour formule $[Zn(Im)_4][Fe_4S_3(NO)_7]_2$.

Si la solution contient moins d'imidazole par rapport au zinc que dans le cas précédent (par exemple 2 Im: 1 Zn), le chélate formé ne contient que 2 molécules de donneur pour 1 atome de zinc¹¹. Il précipite aux pH > 6.5. Si l'on ajoute de NSFK à cette solution à pH 6.5, la composition du précipité formé avec NSF^- correspond néanmoins à la formule précédente. L'excès de zinc se retrouve dans la solution surnageante. Le NSFK déplace donc l'équilibre en faveur de la formation d'un chélate, dans lequel toutes les valences de coordination sont saturées par les donneurs.

Réaction du NSFK avec le chélate de zinc et de polyvinylamine

Le chélate de la polyvinylamine précipite dès qu'un faible pourcentage de ses groupes (environ 15%) sont combinés au NSF^- ; mais le précipité continue à absorber le NSFK de la solution jusqu'à ce que presque la totalité de ses groupes fonctionnels soient combinés avec le complexe (comme le fait la polyvinylamine elle même en présence de NSFK). Le précipité amorphe étant insoluble dans l'eau et décomposable par les solvants organiques, nous avons établi sa formule d'après la composition du liquide surnageant. La différence entre la quantité mise et retrouvée dans ce liquide nous donne le rapport entre le nombre de groupes chélatés et le nombre de NSF^- fixés. Il n'y a pas de libération de zinc pendant la précipitation. Ceci nous permet de supposer que le NSFK se fixe sur le chélate de la polyvinylamine, sans chasser le

zinc, comme sur les autres chélates. Il se fixe au maximum une molécule de NSFK pour deux groupes aminés. Par contre, avec le chlorhydrate de polyvinylamine seule, chaque groupe aminé est salifié par le radical NSF^- . Le chélate de la polyvinylamine forme donc avec le NSFK un sel dans les mêmes proportions que le chélate d'éthylènediamine.

Les chélates de zinc et des donneurs non azotés, tels que l'aldéhyde salicylique, ne forment aucune combinaison insoluble avec le NSFK.

De même, le chélate de cobalt et d'histidine ne se combine pas avec le NSFK. Le groupe négatif carboxyle, situé au voisinage immédiat des ligants azotés, repousse apparemment le groupe négatif NSF^- , ou occupe dès le début l'emplacement où devrait se placer le NSF^- .

RÉSUMÉ

Nous constatons que (a) le NSFK est capable de s'additionner aux chélates, sans provoquer leur destruction, à des pH correspondants à la zone d'activité de la plupart des enzymes. L'inhibition de cette activité, que provoque ce complexe chez tous les enzymes essayés jusqu'à présent, ne peut être attribuée à la destruction du centre actif par suite du déplacement du métal par le NSFK; (b) les fonctions azotées basiques réagissent avec le NSFK aussi bien à l'état libre qu'à l'état chélaté. Dans les deux cas, les produits de la réaction sont peu solubles. Cette insolubilité nous laisse prévoir que si ces fonctions se trouvent dans le centre actif d'une enzyme, le NSFK provoque un blocage de ce centre, indépendamment de l'état dans lequel s'y trouvent ces fonctions.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. DOBRY-DUCLAUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 44.
- ² K. WALLENFELS, H. SUND, A. FAESSLER ET W. BURCHARD, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 31.
- ³ B. VALLEE, S. J. ADELSTEIN ET J. A. OLSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5196.
- ⁴ S. J. ADELSTEIN ET B. VALLEE, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 589.
- ⁵ L. BERGER, M. W. SLEIN, S. P. COLOWICK ET C. F. CORI, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1946) 379.
- ⁶ M. DIXON ET E. C. WEBB, *The Enzymes*, Longmans, Green and Co, Ltd., London, 5-me Ed., p. 195.
- ⁷ E. ADLER, H. v. EULER, G. GÜNTHER ET M. PLASS, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1028.
- ⁸ G. SCHWARZENBACH ET W. BIEDERMANN, *Chimia Aarau*, 2 (1948) 56.
- ⁹ G. SCHWARZENBACH ET A. WILLI, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 528.
- ¹⁰ P. RAFF ET W. BROTHZ, *Z. Anal. Chem.*, 133 (1951) 241.
- ¹¹ G. WITTIG ET P. RAFF, *Ann.*, 573 (1951) 195.
- ¹² J. T. EDSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3054.