

PN 10059

Étude cinétique comparée de l'hydrolyse des lactoglobulines A et B*

La protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine a été étudiée antérieurement sur une protéine issue d'un mélange de laits^{1,2}. On sait actuellement qu'il existe dans le lait de vache, deux lactoglobulines génétiquement différentes³. Ces protéines n'ont pas la même charge globale⁴, en particulier dans la zone de pH correspondant à l'activité de la trypsine. D'autre part, leur composition en aminoacides diffère légèrement⁵. Il fallait donc reprendre l'étude de la protéolyse trypsique de chacune de ces deux protéines.

Les lactoglobulines sont préparées au laboratoire par la méthode de PALMER⁶, modifiée⁷. Les types A et B sont identifiés par électrophorèse sur papier et par ultracentrifugation analytique. La trypsine (EC 3.4.4.4) (produit Worthington, qui contient environ 50% de MgSO_4) est dissoute dans HCl 0.01 N et dialysée contre cette solution jusqu'à élimination totale de MgSO_4 .

La cinétique d'hydrolyse des lactoglobulines par la trypsine a été suivie essentiellement par la méthode potentiométrique à pH constant⁸, qui permet une bonne détermination des vitesses initiales. Dans des conditions identiques (c'est-à-dire en solution dans le chlorure de sodium 0.1 M à pH 7.00 et 35°), à des concentrations d'enzyme et de substrat égales, la vitesse initiale d'attaque trypsique de la lactoglobuline B est 3.5 fois plus faible que celle de la lactoglobuline A. Cependant lorsque nous prolongeons l'hydrolyse, le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques rompues dans les lactoglobulines A et B, diminue avec le temps de protéolyse. De 3.5 en début de réaction, il passe à 1.1 au bout de 3 h d'hydrolyse. Nous observons également, qu'un même pourcentage de produits (10% pour les deux substrats) précipitables par l'acide trichloracétique à 5%, en solution aqueuse à 30% d'alcool, subsiste dans le milieu réactionnel après une trentaine d'heures de protéolyse. Ceci semble en accord avec le fait que les deux lactoglobulines A et B contiennent le même nombre de résidus lysine et arginine.

Indépendamment de cette étude, des différences dans les vitesses d'attaque des lactoglobulines A et B ont été mises en évidence dans un autre laboratoire⁹, au moyen de techniques différentes.

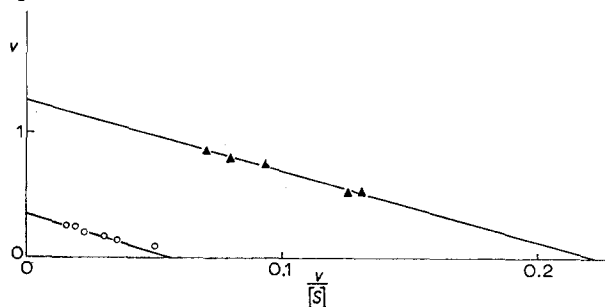


Fig. 1. Hydrolyse trypsique des lactoglobulines A et B. Représentation de Eadie. La vitesse initiale v est exprimée en liaisons peptidiques détruites $\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \times 10^7$. La concentration d'enzyme est $e = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Temp. = 35°; NaCl , 0.1 M pH = 7. ▲, lactoglobuline A; ○, lactoglobuline B.

* Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication au Congrès International de Biophysique de Stockholm (Aout 1961).

Nous avons déterminé les constantes cinétiques de ces réactions: constante de Michaelis K_m et constante spécifique de décomposition du complexe enzyme-substrat k_s à partir de la représentation de Eadie (Fig. 1): les résultats sont groupés dans le Tableau I:

TABLEAU I

Substrat	K_m (mg/ml)	k_s (sec ⁻¹)
Lactoglobuline A	5.7 ± 1	0.07
Lactoglobuline B	6 ± 1	0.02

L'étude cinétique de ces réactions montre tout d'abord que la constante de Michaelis K_m est la même pour les lactoglobulines A et B. Les différences dans les vitesses initiales d'attaque enzymatique résultent donc de variations dans les constantes spécifiques de décomposition de ces complexes.

L'affinité de la trypsine est donc la même pour les deux lactoglobulines malgré leur différence de charge ($\Delta z = 2$ au-dessus de pH 6)⁴. Par conséquent, la charge électrique globale du substrat n'intervient pas dans son association avec l'enzyme. Ceci est en accord avec les résultats antérieurs¹⁰, qui montrent que l'association trypsine-lactoglobuline n'est pas de nature électrostatique. D'autre part, la portion de la molécule portant les deux groupements carboxyliques supplémentaires (acides aspartiques) dans la lactoglobuline A n'intervient pas dans la formation du complexe intermédiaire.

Les différences de structure (charge électrique ou constitution chimique) entre les deux lactoglobulines semblent intervenir seulement au stade de la décomposition du complexe intermédiaire. Des analyses chimiques^{5,11}, révèlent qu'il existe dans la lactoglobuline A deux acides aspartiques et deux valines de plus, deux glycines et deux alanines de moins que dans la lactoglobuline B. A partir d'hydrolysats chymotrypsiques des lactoglobulines A et B, ont été isolés¹² deux peptides A et B dans lesquels un acide aspartique est remplacé par une glycine. Dans ces peptides, il y a 4 liaisons hydrolysables par la trypsine. Comme cela est observé pour l'hydrolyse de certains peptides¹³ la présence d'un groupement carboxylique chargé négativement (acide aspartique) au voisinage d'une liaison peptidique doit faciliter la rupture de celle-ci. Ceci laisse supposer que cette liaison est l'une des premières à rompre dans les lactoglobulines A et B.

D'autre part la charge globale de la protéine peut intervenir dans la décomposition du complexe. L'étude cinétique de la réaction en fonction du pH permet d'apporter quelques précisions sur ce point. Les valeurs de K_m à différents pH sont identiques pour les deux lactoglobulines, elles correspondent aux erreurs d'expérience près à celles qui avaient été déterminées avec le mélange des deux protéines^{1,2}. C'est-à-dire dans des conditions extrêmes, K_m passe de 6 mg/ml à pH 7.0 à 3 mg/ml à pH 8.5. Les modifications de K_m en fonction du pH feront l'objet d'une étude ultérieure.

Par contre, la variation de k_s en fonction du pH est différente pour les deux lactoglobulines A et B. On obtient deux courbes en S décalées l'une par rapport à

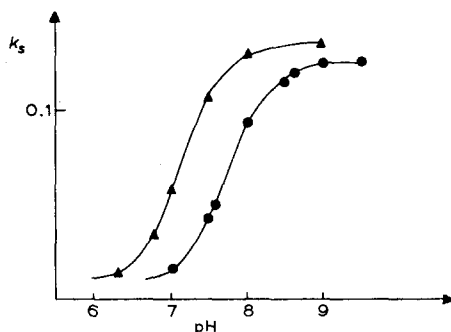


Fig. 2. Variation de la constante spécifique de vitesse de décomposition du complexe, $k_s(\text{sec}^{-1})$ en fonction du pH. Temp. = 35°; NaCl, 0.1 M. ▲, lactoglobuline A; ●, lactoglobuline B.

l'autre par une translation suivant l'axe des pH (Fig. 2). L'activité optimale de la trypsine vis-à-vis de la lactoglobuline A, atteinte à pH 8.0 est légèrement supérieure à l'activité maximale de la trypsine envers la lactoglobuline B, atteinte à pH 9.0 seulement. On a montré¹⁰, que l'activation du complexe trypsine-lactoglobuline s'accompagne de la perte d'un proton. La charge globale de la lactoglobuline A ou l'influence de l'acide aspartique doit favoriser le départ de ce proton.

L'analyse cinétique que nous avons faite, nous a permis de préciser que la trypsine a même affinité pour les deux lactoglobulines A et B. Les différences de vitesse d'hydrolyse résultent de variations dans les constantes spécifiques de décomposition des complexes intermédiaires: ces variations sont imputées à une différence dans la structure primaire au voisinage vraisemblablement de l'une des premières liaisons hydrolysables et à l'influence des différences de charges qui résultent de telles structures.

Laboratoire de Biologie Physico Chimique,
Faculté des Sciences de Paris,
Paris (France)

M. MONNOT

- ¹ J. YON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 1163.
- ² F. LABEYRIE, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 72.
- ³ R. ASCHAFFENBURG ET J. DREWRY, *Nature*, 176 (1955) 218.
- ⁴ C. TANFORD, L. C. BUNVILLE ET Y. NOZAKI, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2874.
- ⁵ W. GORDON, J. BASCH ET E. B. KALAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 (1960) 672.
- ⁶ A. H. PALMER, *J. Biol. Chem.*, 104 (1934) 359.
- ⁷ A. G. OGSTON ET D. CECIL, *Biochem. J.*, 44 (1949) 33.
- ⁸ S. G. WALEY ET J. WATSON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 328.
- ⁹ G. PRÉAUX, J. ARCHAMBEAU, A. DELANCHE ET R. LONTIE, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 70(5) (1962) 752.
- ¹⁰ J. YON ET G. AUBEL-SADRON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 209.
- ¹¹ K. A. PIEZ, E. W. DAVIE, J. E. FOLK ET J. A. GLADNER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2912.
- ¹² E. B. KALAN, W. G. GORDON, J. J. BASCH ET R. TOWNEND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 96 (1962) 376.
- ¹³ H. NEURATH ET G. W. SCHWERT, *Chem. Rev.*, 46 (1) (1950) 70.

Received May 15th, 1963