

BBA 65674

INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ACTIVITE DE LA TRYPSINE  
ET DE LA TRYPSINE ACETYLEEJ. J. BÉCHET, J. CHEVALLIER, J. LABOUESSE, B. ARNOULD,  
S. ALDIN-CICARELLI ET J. YON*Laboratoire d'Enzymologie Chimique, Institut de Biochimie et Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire, Faculté des Sciences, Orsay (France)*

(Reçu le 1 août, 1967)

## SUMMARY

*Influence of ionic strength on the activity of trypsin and acetyltrypsin*

The action of ionic strength on the esterasic activity of trypsin (EC 3.4.4.4) has been investigated with specific substrates.

A substantial effect of ionic strength on the ionisation  $pK$  of the histidine located at the active center is observed. The shift of this  $pK$  is explained by a repulsive interaction between the charged imidazole group and two positive charges. Some comparative experiments carried out with acetyltrypsin led to the identification of these charges as the  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  of two lysine residues.

## INTRODUCTION

L'influence de la concentration saline du milieu sur une réaction enzymatique a été analysée théoriquement par WEBB<sup>1</sup>. Elle peut résulter de mécanismes très divers dépendant de la nature de l'électrolyte, de celle de l'enzyme et de celle du substrat.

Plusieurs études expérimentales effectuées avec la trypsin (EC 3.4.4.4) illustrent bien la variété des effets produits par l'addition de sels au milieu réactionnel<sup>2-6</sup>.

Une étude détaillée peut, dans certains cas, apporter quelques informations sur l'environnement des entités catalytiques du centre actif et permettre de préciser les effets d'un changement de cet environnement sur l'activité de l'enzyme.

Nous avons étudiée l'activité esterasique de la trypsin en fonction de la concentration saline et du pH du milieu. L'effet de la force ionique varie avec le pH dans la zone d'ionisation de l'histidine du centre actif impliqué dans la catalyse. Ce phénomène a été analysé pour l'hydrolyse trypsique de 2 esters spécifiques: l'ester éthylique du *N*- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine (BAEE) et l'ester méthyle à du *N*- $\alpha$ -*p*-toluène sulfonyl-

Abréviations: BAEE, ester éthylique du *N*- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine; TAME, ester méthyle à du *N*- $\alpha$ -*p*-toluène sulfonyl-L-arginine; TLCK, chlorométhyl cétone de la *N*- $\alpha$ -*p*-toluène sulfonyl-L-lysine.

L-arginine (TAME). Une étude analogue a été faite avec la trypsine acétylée et les mêmes substrats. La comparaison des résultats conduit à préciser la nature des groupements environnant l'imidazole du centre actif et interagissant avec lui.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les réactions d'hydrolyse sont suivies par la méthode potentiométrique à pH constant<sup>7</sup>. Les mesures sont effectuées avec un pH-mètre Vibron 33 B (Electronic Instruments Ltd.). Le récipient à hydrolyse placé dans un bain à température constante, contient 10 ml d'une solution non tamponnée de substrat dont la concentration est choisie suivant les valeurs des constantes de Michaelis apparentes.

La concentration de NaCl varie entre 0.001 M et 3.6 M. Pour les faibles forces ioniques inférieures à 0.001 aucun sel de sodium n'est ajouté: la force ionique est déterminée par la concentration du substrat. L'étude est faite à 25° et pour différentes valeurs de pH comprises entre 4.5 et 8.5.

Les mesures de vitesse d'inactivation de la trypsine par le chlorométhyl cétone de la *N*-*α*-*p*-toluène sulfonyl-L-lysine (TLCK) sont effectuées comme suit: le milieu d'incubation contient de la trypsine à une concentration donnée ( $10^{-5}$  M), du TLCK en excès de 10 à 50 fois et du NaCl en concentration variable suivant les expériences: le milieu n'est pas tamponné, mais le pH est maintenu constant par addition de petites quantités de NaOH. A des temps donnés, une partie aliquote du mélange d'incubation est prélevée et l'activité résiduelle de la trypsine est testée sur une solution de BAEE  $10^{-3}$  M.

La trypsine (EC 3.4.4.4) est un produit "Worthington". On la dialyse exhaustivement contre HCl 0.01 M avant utilisation pour éliminer le  $MgSO_4$  qui constitue 50% en poids de la préparation commerciale. Pour quelques mesures, l'enzyme a été préalablement purifié par précipitation au NaCl 1 M de la fraction inactive<sup>8</sup>, et dialysé à nouveau contre HCl 0.01 M.

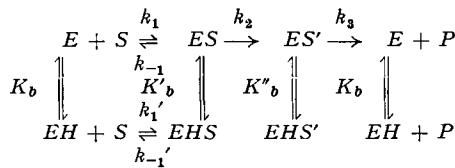
La trypsine est acétylée par l'anhydride acétique à 0° (pH = 6.7), en présence de  $CaCl_2$  0.01 M. Après précipitation par le  $(NH_4)_2SO_4$ , on dialyse contre un tampon phosphate de pH 7. Pour l'analyse chimique des groupements aminés de cette protéine on utilise le 2,4-dinitrofluorobenzène. Les résultats montrent que tous les groupes  $\epsilon$ -aminés de l'enzyme sont acétylés, mais que le résidu  $\alpha$ -aminé de l'isoleucine N terminale reste libre. Les tyrosines non masquées qui ont été acétylées sont désacétylées par traitement à l'hydroxylamine 0.5 M à 25° pendant 1 h. Après chromatographie sur DEAE-cellulose et élution avec un gradient de force ionique, on obtient une fraction d'activité spécifique du même ordre de grandeur que celle de la trypsine de départ<sup>8</sup>.

Les substrats BAEE, TAME sont des produits "Mann Research Laboratory".

Le TLCK a été préparé par Madame L. Jarosková de l'Académie des Sciences Tchécoslovaque (Prague).

#### Partie théorique

Dans la zone de pH où le groupe responsable de l'activité enzymatique s'ionise, le schéma réactionnel peut être écrit de la manière suivante:



$E$  représente l'enzyme,  $S$  le substrat,  $ES$  le complexe enzyme-substrat,  $ES'$  l'acyl-enzyme.  $EH$ ,  $EHS$ ,  $EHS'$  correspondent aux formes ioniques inactives de l'enzyme. La vitesse de la réaction enzymatique, pour une force ionique donnée, s'exprime par la relation générale<sup>9</sup>:

$$v = \frac{V(\text{pH}) [S]}{K_m(\text{pH}) + [S]} \quad (1)$$

dans laquelle  $V$  (pH) correspond à l'expression complexe:

$$V(\text{pH}) = \frac{k_2 k_3 [E_t]}{k_2 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K''_b} \right) + k_3 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K'_b} \right)}$$

et  $K_m$  (pH) à:

$$K_m(\text{pH}) = \frac{\left[ k_{-1} \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K_b} \right) + k_2 \right] k_3}{k_1 \left[ k_2 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K''_b} \right) + k_3 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K'_b} \right) \right]}$$

La plupart des mesures effectuées dans cette étude sont faites dans le cas limite où la concentration du substrat  $[S]$  est très supérieure à  $K_m$ . La vitesse  $v$  de la réaction est alors égale à :

$$v = V(\text{pH}) = \frac{k_2 k_3 [E_t]}{k_2 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K''_b} \right) + k_3 \left( 1 + \frac{[\text{H}]}{K'_b} \right)} \quad (2)$$

et la constante d'ionisation expérimentale moyenne correspond à :

$$\bar{K}_b = \frac{k_2 + k_3}{\frac{k_2}{K''_b} + \frac{k_3}{K'_b}} \quad (3)$$

Dans le cas de l'hydrolyse trypsique d'esters spécifiques, l'expression de  $v$  se simplifie, car la constante  $k_2$  est très supérieure à  $k_3$  (bibl. 10), et devient égale à  $k_3 [E_t] / (1 + [\text{H}] / K''_b)$ . La constante d'ionisation déterminée expérimentalement n'est autre que  $K''_b$ .

Les résultats expérimentaux donnant les valeurs de  $v$ , à différentes forces ioniques, seront discutés à partir des expressions 1 et 2.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### (1) Résultats obtenus avec la trypsine native

(a) Influence de la force ionique sur l'hydrolyse du BAEE et du TAME par la trypsine, en fonction du pH.

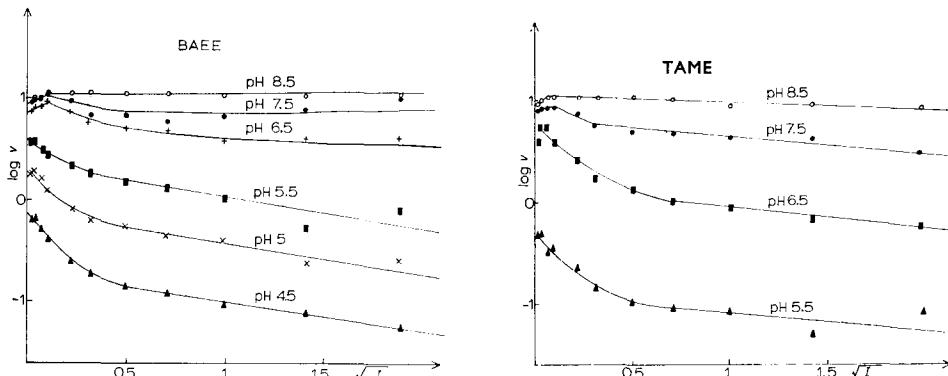


Fig. 1. Hydrolyse trypsique du BAEE à différentes forces ioniques et différents pH. Représentation de  $\log v$  en fonction de  $\sqrt{I}$ ;  $v$  est exprimée en unités arbitraires:  $\mu\text{l NaOH } 0.1 \text{ M ajoutés par min dans } 10 \text{ ml de solution et rapportés à la même concentration d'enzyme: } 4 \mu\text{g/ml}$ . Conditions expérimentales: concentration du BAEE  $10^{-4} \text{ M}$  pour les faibles forces ioniques et  $10^{-3} \text{ M}$  pour les forces ioniques plus élevées. Concentration en NaCl variable entre  $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  et  $3.6 \text{ M}$ ; temp.,  $25^\circ$ , pH variable entre 4.5 et 8.5.

Fig. 2. Hydrolyse trypsique du TAME à différentes forces ioniques et différents pH. Représentation de  $\log v$  en fonction de  $\sqrt{I}$ ;  $v$  est exprimée en unités arbitraires:  $\mu\text{l NaOH } 0.1 \text{ M ajoutés par min dans } 10 \text{ ml de solution et rapportés à la même concentration d'enzyme: } 0.57 \mu\text{g/ml}$ . Concentration en TAME:  $10^{-4} \text{ M}$  pour les faibles forces ioniques et  $10^{-3} \text{ M}$  pour les forces ioniques plus élevées. Concentration de NaCl variable entre  $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  et  $3.6 \text{ M}$ ; temp.,  $25^\circ$ .

L'influence de la concentration saline du milieu a été étudiée sur l'hydrolyse d'esters spécifiques BAEE et TAME pour des concentrations de substrats (1 mM ou 10 mM) très supérieures à  $K_m$ . Les valeurs des vitesses d'hydrolyse obtenues à différents pH sont portées graphiquement en fonction de  $\sqrt{I}$  sur les Figs. 1 et 2.

Au pH optimum d'action de l'enzyme (pH = 8.5) on observe une légère augmentation de la vitesse de la réaction de l'ordre de 20% entre  $I = 0.0005$  ( $\sqrt{I} = 0.02$ ) et  $I = 0.01$  ( $\sqrt{I} = 0.1$ ), suivie d'un plateau où  $v$  ne varie plus avec la force ionique du milieu.

Lorsque le pH diminue, le premier effet d'activation devient moins apparent, et l'on constate une diminution progressive de la vitesse de la réaction à mesure que la force ionique croît; dans l'hydrolyse du BAEE à pH 4.5 le rapport des vitesses pour des forces ioniques de 0.001 et 3.6 est d'environ 10. Ces variations de vitesse reflètent des modifications de la constante cinétique  $V$  (pH). En effet la valeur de  $K_m$  (pH) est de l'ordre de  $10 \mu\text{M}$  (bibl. 10) pour une force ionique de 0.1. La relation 1 montre qu'elle devrait augmenter d'un facteur minimum de  $10^3$  pour rendre compte de la diminution de vitesse observée. Or les cinétiques sont toujours d'ordre zéro.

Un argument direct nous est donné par le résultat de mesures effectuées à pH 7.0 dans le cas de l'hydrolyse trypsique du BAEE à 2 concentrations extrêmes en sel (Fig. 3). Les variations de  $v$  en fonction de  $v/[S]$  suivant la représentation d'Eadie sont parallèles pour les 2 forces ioniques considérées.

L'effet observé s'exerce donc uniquement sur  $V$  (pH). Ce résultat est à rapprocher de ceux d'INAGAMI<sup>11</sup> qui n'observe aucun effet de la force ionique sur l'association de la trypsine avec certains inhibiteurs compétitifs (benzylamine, tryptamine...).

L'expression de la vitesse qui rend compte des résultats est donc donnée par la

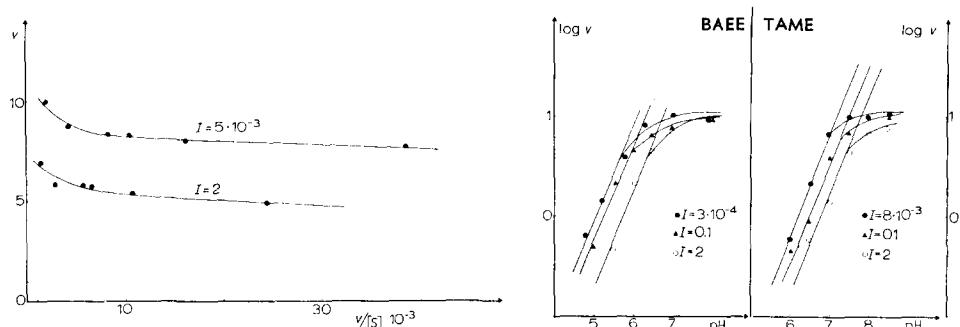


Fig. 3. Hydrolyse trypsique du BAEE à 2 concentrations extrêmes en sel et à différentes concentrations en substrat. Représentation d'Eadie  $v$  en fonction de  $v/[S]$ . Conditions d'expériences: pH 7, temp., 25°, concentration en  $S$  variable entre  $10^{-4}$  M et  $5 \cdot 10^{-3}$  M;  $v$  est exprimée en unités arbitraires.  $I = 5 \cdot 10^{-3}$  et 2.

Fig. 4. Hydrolyse trypsique du BAEE et du TAME à différents pH et à différentes forces ioniques. Représentation de  $\log v$  en fonction du pH à 3 forces ioniques distinctes. Concentration en substrat:  $10^{-3}$  M; temp., 25°;  $v$  est exprimé en unités arbitraires.

relation 2 qui se simplifie encore dans le cas des 2 substrats étudiés pour lesquels  $k_3$  est très inférieur à  $k_2$  (bibl. 10); la valeur de  $v$  est alors:  $v = k_3 [E_t] / (1 + [H]/K''_b)$ .

De l'analyse de ces résultats, il ressort qu'au pH optimum le paramètre  $V$  n'est pas affecté par une variation de la force ionique sauf aux très faibles concentrations salines où une légère activation est visible\*. On peut donc admettre que la constante cinétique  $k_3$  est indépendante de la force ionique du milieu pour les 2 esters étudiés. Comme seul  $V$  (pH) varie dans nos conditions d'expérience, il faut en conclure que c'est la constante d'ionisation de l'histidine du centre actif,  $K''_b$ , qui dépend de la force ionique du milieu.

Ce résultat apparaît clairement lorsqu'on porte  $\log v$  en fonction du pH à différentes forces ioniques (Fig. 4). Si l'on admet que dans la zone de pH considéré, la vitesse de la réaction est directement liée à l'état d'ionisation d'un groupe de l'enzyme, les différentes valeurs de  $pK''_b$  peuvent être calculées à partir de l'expression:

$$pK''_b = \text{pH} - \log \frac{v}{v_{\text{opt}} - v}$$

où  $v$  est la valeur de la vitesse observée à une force ionique et à un pH donnés, et  $v_{\text{opt}}$  la valeur de cette vitesse à la même force ionique, mais au pH optimum. Les valeurs des  $pK$  moyens pour les 2 systèmes sont données dans la Fig. 5 en fonction de  $\sqrt{I}$ .

L'effet n'est pas spécifique de la nature du sel employé, comme on l'a vérifié dans le cas de l'hydrolyse trypsique du TAME en présence de divers sels: KCl, NaCl, NaI,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  à 2 pH différents 8.5 et 6.0 (Fig. 6). Aux fortes concentrations salines, l'influence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  serait toutefois légèrement plus grande que celle du NaCl.

#### (b) Influence de la force ionique sur l'inactivation de la trypsine par le TLCK.

Comme le montrent les études cinétiques d'activité de la trypsine, le  $pK$  d'ionisation de l'entité catalytique réactive (imidazole de l'histidine 46 (bibl. 12) est sensible

\* Ici s'impose une remarque. La légère activation observée au pH optimum semble disparaître lorsque l'enzyme a été préalablement purifié par traitement par NaCl 1 M (voir Fig. 6).

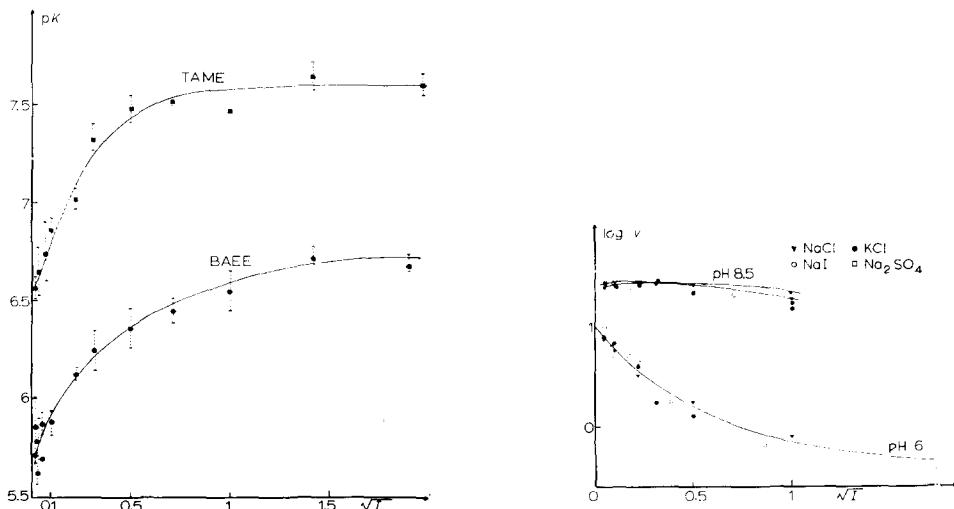


Fig. 5. Variation du  $pK$  d'ionisation du groupement actif de l'enzyme en fonction de la racine carrée de la force ionique pour l'hydrolyse trypsique de 2 esters: BAEE, TAME.

Fig. 6. Hydrolyse du TAME par la trypsine en présence de différents sels: représentation de  $\log v$  en fonction de  $\sqrt{I}$ , à pH 8.5 et pH 6. temp.,  $25^\circ$ ,  $v$  est exprimé en unités arbitraires: dans cette expérience, la fraction inactive de la trypsine a été éliminée par précipitation en  $\text{NaCl}$  1 M.

à la force ionique du milieu. Il est donc probable que le titrage d'une des formes ionisée ou non ionisée de ce groupe en fonction du pH dépende de la concentration saline du milieu.

Les titrages potentiométriques ou spectrophotométriques<sup>13</sup> risquant d'être in-

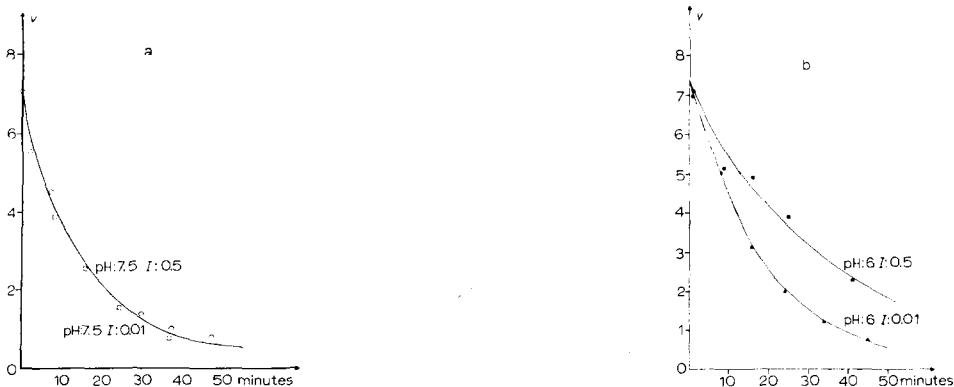


Fig. 7. (a) Inactivation de la trypsine par le TLCK en fonction de la force ionique du milieu d'incubation. Représentation de la vitesse d'hydrolyse du BAEE par la trypsine inactivée, en fonction du temps d'incubation de l'enzyme, en présence de TLCK. Conditions d'inactivation: pH 7.5,  $[E] = 10^{-6}$  M,  $[\text{TLCK}] = 10^{-4}$  M,  $I = 0.5$  et  $0.01$ ,  $v$  est exprimée en unités arbitraires. (b) Inactivation de la trypsine par le TLCK en fonction de la force ionique du milieu d'incubation. Représentation de la vitesse d'hydrolyse du BAEE par la trypsine inactivée, en fonction du temps d'incubation de l'enzyme, en présence de TLCK. Conditions d'inactivation: pH 6.0,  $[E] = 10^{-6}$  M,  $[\text{TLCK}] = 5 \cdot 10^{-4}$  M,  $I = 0.5$  et  $0.01$ ,  $v$  est exprimée en unités arbitraires.

suffisamment précis, nous avons utilisé une méthode chimique<sup>14,15</sup>. La réactivité du TLCK, inhibiteur spécifique et stoéchiométrique de la trypsine<sup>14,15</sup> est fonction du pH entre 6 et 8, et vraisemblablement de l'ionisation de l'histidine réactive qui subit l'alkylation. Si cet état d'ionisation de l'histidine est sensible à la force ionique comme on peut le présumer d'après les résultats de l'étude cinétique, l'effet du TLCK à un pH donné sera plus ou moins important suivant la concentration saline du milieu.

Les résultats expérimentaux montrent effectivement qu'à pH 7.5 la vitesse d'inactivation de la trypsine par le TLCK est indépendante de la force ionique (Fig. 7a) alors qu'à pH 6.0 elle diminue dans un rapport 2 lorsque la force ionique passe de 0.01 à 0.5 (Fig. 7b).

(2) *Résultats obtenus avec la trypsine acétylée: Influence de la force ionique sur l'hydrolyse du BAEE et du TAME*

On a tout d'abord vérifié que les propriétés catalytiques de la trypsine acétylée sont identiques à celles de la trypsine native dans les conditions de pH optimum d'activité de l'enzyme. Le Tableau I donne les valeurs des paramètres cinétiques  $K_m$  et  $k_3$  pour l'hydrolyse du BAEE et du TAME par la trypsine native et la trypsine acétylée à pH 8.5 et 25°. On obtient les mêmes valeurs pour l'enzyme natif et pour l'enzyme

TABLEAU I

COMPARAISON DES CONSTANTES CINÉTIQUES DÉTERMINÉES POUR LA TRYPSINE NATURE ET LA TRYPSINE ACÉTYLÉE

$k_3$  est déterminée à 25° (NaCl 0.1 M).  $K_m$  est la valeur de la constante de Michaelis apparente pour 0.1 mM  $\ll [S] \ll 20$  mM dans le cas du BAEE et 0.31 mM  $\ll [S] \ll 10$  mM pour le TAME.

	BAEE		TAME	
	$K_m$ ( $M \times 10^5$ )	$k_3$ ( $sec^{-1}$ )	$K_m$ ( $M \times 10^4$ )	$k_3$ ( $sec^{-1}$ )
Trypsine native	2	20	1.2	75
Trypsine acétylée	3	21	1.4	78

chimiquement modifié. L'effet d'activation par le substrat préalablement analysé par BÉCHET ET YON<sup>16</sup> avec la trypsine native semble se produire d'une manière identique avec l'enzyme acétylée, dans nos conditions d'expérience. Une étude détaillée de l'influence des modifications chimiques de l'enzyme sur l'effet d'activation par le substrat est actuellement en cours\*.

Une étude analogue à la précédente a été effectuée avec la trypsine acétylée. L'influence de la force ionique sur la vitesse d'hydrolyse du BAEE a été étudiée en fonction du pH. Dans le cas de la trypsine acétylée, les expériences sont limitées aux valeurs de pH supérieures à 6 par suite de l'insolubilité de l'enzyme aux pH acides. La Fig. 8 représente les variations de  $\log v$  en fonction du pH pour 3 valeurs différentes de la force ionique (1-0.1-0.01).

Les résultats obtenus imposent 2 remarques. (a) A un pH donné, la vitesse de la réaction reste identique quelle que soit la force ionique du milieu: avec la trypsine acétylée, on n'observe plus de variations du  $pK$  apparent de l'imidazole lorsque la

\* J. LABOUESSE ET J. CHEVALLIER, résultats non encore publiés.

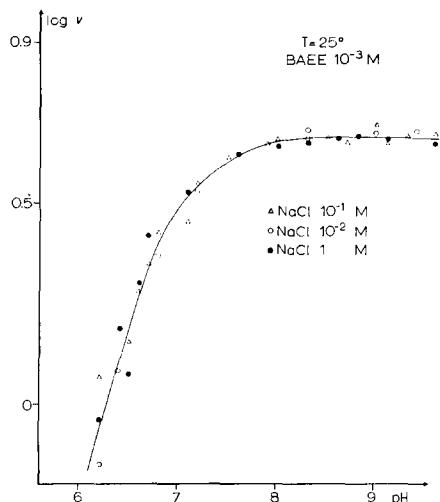


Fig. 8. Effet de la force ionique sur l'hydrolyse du BAEE par la trypsine acétylée à différentes concentrations de NaCl, temp., 25°, [BAEE] =  $10^{-3}$  M;  $[E] = 2.5 \cdot 10^{-8}$  M (en admettant 24 000 comme poids moléculaire pour la trypsine acétylée et  $1/\epsilon = 0.63$ ).

Fig. 9. Variation du  $pK$  d'ionisation de l'histidine du centre actif en fonction de la force ionique pour l'hydrolyse du BAEE par la trypsine native (TN) (1) et la trypsine acétylée (TAC) (2).

concentration saline varie. Puisque le substrat est ici le BAEE, pour lequel l'étape de désacylation est limitante ( $k_2 \gg k_3$ ), on peut dire que  $pK''_b$  reste insensible aux variations de la force ionique du milieu. (b) La valeur de  $pK''_b$  est de  $7.0 \pm 0.1$  à 25° alors qu'elle est de  $5.5 \pm 0.1$  à la même température et à force ionique nulle pour l'hydrolyse du même substrat par la trypsine native.

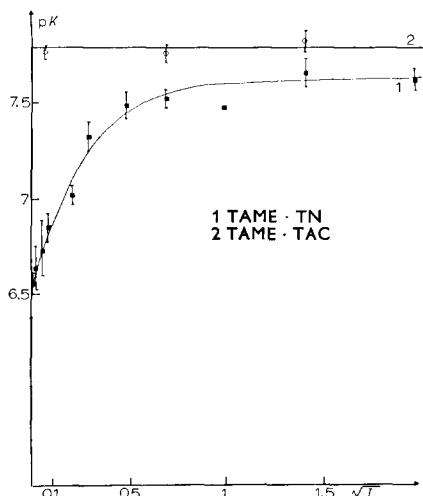


Fig. 10. Effet de la force ionique sur le  $pK$  d'ionisation de l'histidine du centre actif dans les complexes TAME-trypsine acétylée (TAC) (courbe 2) et TAME-trypsine native (TN) (courbe 1). Conditions expérimentales dans l'étude avec la trypsine acétylée: temp., 25°; [TAME] =  $10^{-3}$  M,  $[E] = 1.5 \cdot 10^{-8}$  M.

La comparaison des résultats obtenus avec la trypsine native et la trypsine acétylée pour l'hydrolyse du BAEE est illustrée par la Fig. 9.

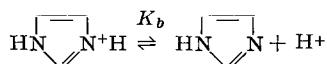
Des expériences analogues ont été effectuées avec le TAME. Les 2 remarques précédentes sont valables pour l'hydrolyse de cet ester spécifique. Le  $pK$  apparent d'ionisation de l'imidazole réactif reste identique quelle que soit la force ionique du milieu, mais sa valeur est nettement supérieure à celle que l'on obtient pour l'enzyme natif. A force ionique nulle, le  $pK''_b$  est de  $7.7 \pm 0.1$  pour la trypsine acétylée alors qu'il est de  $6.5 \pm 0.1$  pour la trypsine native (Fig. 10).

Les résultats obtenus avec la trypsine acétylée et la trypsine native diffèrent donc totalement. Un effet important de la force ionique est observé lors de l'hydrolyse du TAME et du BAEE par la trypsine native. L'hydrolyse de ces mêmes esters par l'enzyme acétylé, dans les mêmes conditions reste insensible aux variations de la force ionique du milieu.

#### DISCUSSION

L'activité estérasique de la trypsine native est modifiée par l'addition de sel. L'effet de celui-ci ne s'exerce pas sur la constante de vitesse de l'étape limitante de la réaction,  $k_3$ ; le complexe de transition ne semble donc pas présenter de caractère ionique comme le soulignent BENDER ET KEZDY<sup>17</sup> dans le cas de la chymotrypsine (EC 3.4.4.5). L'action de la force ionique porte sur le  $pK$  d'ionisation de l'entité catalytique réactive (groupement histidine); celui-ci se trouve fortement déplacé d'environ 1.1 unité pH lorsqu'on passe d'un milieu de faible force ionique ( $I = 0.0001$ ) à un milieu de force ionique élevée ( $I = 2$ ).

Les raisons d'un tel phénomène n'apparaissent pas immédiatement. Normalement l'ionisation du groupement imidazole qui ne fait pas apparaître de charges nouvelles:



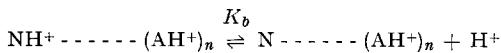
est pratiquement insensible à la force ionique du milieu. Les  $pK$  d'ionisation de l'imidazole libre en solution, déterminés par titrage potentiométrique sont respectivement égaux à  $6.98 \pm 0.05$  en absence de sel et à  $7.03 \pm 0.05$  en présence de  $\text{NaCl}$  2 M.

Un effet de la charge globale positive de la protéine dont le point isoionique est de 10.8 (bibl. 18), variable avec le pH et la force ionique, sur l'ionisation de l'histidine<sup>19</sup> ne peut, non plus, rendre compte du phénomène observé dans la zone de pH de l'étude expérimentale. En effet la valeur de  $pK''_b$  calculée pour une force ionique donnée ne varie pas avec le pH d'étude et par conséquent avec la charge de la protéine. Les variations de  $\log v$  en fonction du pH, à différentes forces ioniques (Fig. 4) sont nettement décalées les unes par rapport aux autres et ont toutes une pente de 1 aux pH acides. Cet argument supplémentaire élimine un éventuel effet de la charge globale de l'enzyme sur l'ionisation de l'histidine 46.

L'analogie entre nos résultats et ceux de GOLDSTEIN, LEVIN ET KATCHALSKI<sup>20</sup> dans le cas de dérivés insolubles de la trypsine obtenus par le couplage de l'enzyme avec des copolymères d'anhydride maléique et d'éthylène, permet de penser que l'histidine du centre actif se trouve dans un environnement ionique local tel que son  $pK$  est sensible à des variations de cet environnement. Si, par exemple, une ou plusieurs

charges positives de l'enzyme natif interagissent avec l'histidine chargée positivement, le  $pK$  de celle-ci sera déplacé vers les pH acides et cet effet diminuera à mesure que la concentration en sel du milieu augmentera.

Puisque les résultats expérimentaux excluent un effet de charge globale de la molécule sur l'ionisation de l'imidazole réactif, on peut en première approximation ne considérer que le groupe d'atomes interagissant au centre actif de l'enzyme. Et l'on peut schématiser l'équilibre :



où  $(\text{AH}^+)_n$  représente dans l'enzyme un ensemble de charges positives à proximité du centre actif; la constante  $K_b$  dépendra de la force ionique du milieu du fait des variations des coefficients d'activité des différents constituants de l'équilibre avec la concentration saline. La constante de dissociation  $K_b$  peut s'écrire<sup>21</sup> :

$$K_b = K_{b0} \frac{\gamma [\text{N} \cdots \cdots \cdots (\text{AH}^+)_n]}{\gamma [\text{NH}^+ \cdots \cdots \cdots (\text{AH}^+)_n]}$$

dans laquelle les coefficients d'activité sont respectivement donnés par les expressions dérivées de la formule de Debye et Hückel :

$$\log \gamma [\text{N} \cdots \cdots \cdots (\text{AH}^+)_n] = \frac{-0.5(z-1)^2 VI}{1 + 0.327 r VI} + bI$$

$$\log \gamma [\text{NH}^+ \cdots \cdots \cdots (\text{AH}^+)_n] = \frac{-0.5 z^2 VI}{1 + 0.327 r VI} + b'I$$

$z$  étant égal à l'ensemble des charges réagissantes, c'est à dire à  $n + 1$ ;  $r$  représente le rayon effectif moyen du groupe catalytique titré;  $b$  et  $b'$  sont des constantes négligeables aux forces ioniques inférieures à 0.1. De ces relations, on peut déduire :

$$pK_b = pK_{b0} + \frac{0.5(2z-1) VI}{1 + 0.327 r VI} + b''I \quad (5)$$

avec  $b'' = b' - b$ .

La pente de la courbe représentant les valeurs de  $pK_b$  en fonction de  $\sqrt{I}$  pour les faibles valeurs de  $I$  doit être égale à 0.5 ( $2z-1$ ); elle permet donc de déterminer  $z$  et par conséquent  $n$ . D'après la Fig. 5, on peut évaluer à approx. 2.5 la pente des courbes obtenues avec le BAEE et le TAME;  $z$  est alors égal à 3, et  $n$  à 2.

La présence de 2 charges positives à proximité de l'histidine réactive exerce donc un effet sur l'ionisation de cette dernière en facilitant le départ du proton et par là l'activité catalytique. Cette interaction répulsive a été mise en évidence au niveau de l'acylenzyme et uniquement dans le cas de la trypsin native. Dans la trypsin acétylée dont tous les groupements  $\epsilon$ -aminés de lysine ont été acétylés, le  $pK$  de l'histidine réactive est insensible à la force ionique du milieu (Figs. 9 et 10). Ceci permet de préciser davantage la nature des interactions locales intervenant au niveau du site actif de l'enzyme et d'attribuer à 2 groupements  $\epsilon$ -aminés de lysine les 2 charges positives situées dans la structure tertiaire de l'enzyme à proximité du groupe catalytique et interagissant avec lui.

Le groupement  $\alpha$ -aminé de l'isoleucine en position N terminale auquel on pourrait, par analogie avec la chymotrypsine<sup>23</sup> attribuer un rôle conformationnel, reste

libre dans la trypsine acétylée<sup>8</sup>. Il n'interagirait donc pas avec l'histidine réactive, ce qui permet de supposer qu'il reste suffisamment éloigné du centre actif de l'enzyme.

L'effet observé peut être rapproché du résultat de ZAREMBOVITCH sur les variations de la constante d'ionisation de l'imidazole dans la molécule d'histamine en fonction de la force ionique du milieu<sup>22</sup>. La présence de la charge positive du groupe aminé crée vraisemblablement une répulsion qui facilite la dissociation de l'imidazole; le  $pK$  de ce dernier extrapolé à force ionique nulle est de 5.86. L'effet répulsif décroît lorsqu'augmente la force ionique du milieu; ainsi le  $pK$  de l'imidazole est d'environ 6.6 à force ionique 1.

Si pour un même substrat, on compare à force ionique nulle la valeur de  $pK''_b$  de l'imidazole réactif pour la trypsine acétylée et pour la trypsine native, on peut admettre que la différence résulte uniquement de l'interaction répulsive due à la présence des charges de 2 lysines dans la trypsine native, et n'existant pas dans la trypsine acétylée. Ceci permet une évaluation de l'énergie de répulsion électrostatique ( $\Delta G_e$ ) entre les charges dans la trypsine native, au moyen de la relation:

$$\Delta G_e = 2.3 RT (pK''_b \text{ trypsine acétylée} - pK''_b \text{ trypsine native}) \quad (6)$$

$pK''_b$  trypsine acétylée et  $pK''_b$  trypsine native représentent respectivement les  $pK$  de l'imidazole réactif dans la trypsine acétylée et dans la trypsine native à force ionique nulle.

$\Delta G_e$  diffère légèrement suivant la nature du substrat, elle varie avec l'acyl-enzyme. Pour la tosylarginine trypsine,  $\Delta G_e$  est de  $1600 \pm 100$  calories et pour la benzoyl arginine trypsine, de  $2000 \pm 100$  calories. Ceci permet une évaluation très approximative de la distance entre les groupes en interaction au moyen de la relation classique<sup>1</sup>:

$$\Delta G_e = \frac{305z_1z_2}{d(6d - 7)} \quad (7)$$

dans laquelle  $z_1$  représente la charge de l'imidazole,  $z_2$  les charges des 2 lysines,  $d$  la distance approximative entre les charges;  $6d - 7$  résulte d'une évaluation approximative de la constante diélectrique locale valable pour des distances comprises entre 3 Å et 10 Å. Les distances ainsi calculées sont de l'ordre de 9 Å pour le TAME et 8 Å pour le BAEE. Ces résultats donnent une idée de la distance moyenne entre l'imidazole du centre actif et les 2 groupements lysine qui entrent en interaction avec lui dans les acylenzymes.

## CONCLUSION

L'étude de l'action de la force ionique sur l'hydrolyse du BAEE et du TAME par la trypsine (EC 3.4.4.4) et par la trypsine acétylée permet d'apporter quelques précisions sur le microenvironnement de l'un des groupes catalytiques de l'enzyme: l'histidine<sup>46</sup>. Alors que l'on n'observe aucun effet de la force ionique sur l'activité de la trypsine acétylée, on a pu montrer que les variations obtenues avec l'enzyme natif ne portent ni sur  $K_m$  ni sur la constante de désacylation  $k_3$  qui est limitante pour les substrats étudiés, mais résultent de modifications dans l'état d'ionisation de l'histidine réactive. La présence de 2 charges positives appartenant à des groupements ε-aminés de lysine situés dans les acylenzymes à proximité de l'histidine favorisent la

dissociation de cette dernière, ce qui a pour effet de promouvoir l'activité catalytique. Il reste à préciser si une interaction répulsive locale analogue existe déjà dans l'enzyme libre; mais ceci nécessite une étude plus complexe avec les amides correspondantes.

Les résultats précédents ne semblent pas spécifiques de la trypsine car, avec d'autres estérases comme la chymotrypsine (EC 3.4.4.5) l'effet de la force ionique, quoiqu'un peu plus complexe, n'est pas très différent\*<sup>\*\*</sup>.

Des effets de force ionique à certains égards comparables ont été décrits avec d'autres enzymes hydrolytiques et en particulier avec la thrombine (EC 3.4.4.13) (bibl. 24) et avec la ribonucléase (EC 2.7.7.16) (bibl. 25).

Dans le cas de l'activité estérasique de la thrombine, les auteurs suggèrent que l'effet de la force ionique, au pH optimum d'activité, s'exerce sur la constante d'acylation et pas sur la constante de désacylation. Un déplacement du pH optimum d'activité de la ribonucléase a été observé au cours de l'hydrolyse de quelques substrats: la cytidine 2',3'-phosphate cyclique et la cytidylyl uridine. Par ailleurs, pour ce même enzyme, SAROFF a démontré l'existence d'amas de charges localisées en certains endroits de la protéine et l'un d'eux impliquerait en particulier les histidines réactives<sup>26,27</sup>.

#### RÉSUMÉ

L'influence de la force ionique sur l'activité estérasique de la trypsine a été étudiée avec des substrats spécifiques.

Un effet important de la force ionique sur le  $pK$  d'ionisation du groupement histidine du centre actif est mis en évidence. Les variations de ce  $pK$  avec la concentration saline du milieu résulte vraisemblablement d'une interaction, répulsive entre le groupe imidazole chargé, et 2 charges positives de l'enzyme. Quelques expériences comparatives avec la trypsine acétylée conduisent à identifier ces charges comme celles des groupes  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  de 2 résidus lysine.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement Madame L. JAROSKOVÀ, qui a préparé le TLCK, et le Dr. J. RUDINGER de l'Académie des Sciences Tchécoslovaque (Prague), qui nous l'a gracieusement offert.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide du C.N.R.S. (Equipe de Recherches et R.C.P. No. 23).

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. L. WEBB, *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1963, p. 815.
- 2 J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 111.
- 3 J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 75.
- 4 J. YON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1263.
- 5 M. MC DONALD ET M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1946) 155.

\* J. J. BÉCHET ET S. ALDIN-CICARELLI, résultats non publiés.

\*\* Dans le cas de l'hydrolyse par la chymotrypsine d'un substrat spécifique tel que l'ATEE, on observe un effet sur  $K_m$  qui provient soit d'une variation de  $K_s$  ou de  $k_2$ , et un effet sur  $pK''_b$ .  $V$  (donc  $k_3$ ) ne varie pas en fonction de la force ionique.

- 6 M. CASTENADA AGULLO, M. L. DEL CASTILLO, J. R. WHITAKER ET A. L. TAPPEL, *J. Gen. Physiol.*, 44 (1961) 1103.
- 7 G. W. SCHWERT, H. NEURATH, S. KAUFMAN ET J. E. SNOKE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 221.
- 8 J. LABOUESSE ET M. GERVAIS, *European J. Biochem.*, 2 (1967) 215.
- 9 R. A. ALBERTY ET V. BLOOMFIELD, *J. Biol. Chem.*, 8 (1963) 2804.
- 10 J. J. BÉCHET, M. C. GARDIENNET, ET J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 101.
- 11 T. INAGAMI, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 787.
- 12 O. MIKES, V. HOLEYSOVSKY, V. TOMASEK ET F. ŠORM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24 (1966) 346.
- 13 J. W. DONAVAN, *Biochemistry*, 4 (1965) 823.
- 14 M. MARES-GUIA ET E. SHAW, *Federation Proc.*, 22 (1963) 528.
- 15 B. TOMASEK, E. F. SEVERIN ET F. ŠORM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20 (1965) 545.
- 16 J. J. BÉCHET ET J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 117.
- 17 M. L. BENDER ET F. J. KEZDY, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 3704.
- 18 M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33 (1951) 320.
- 19 F. F. KEZDY, G. E. CLEMENT ET M. L. BENDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 3690.
- 20 L. GOLDSTEIN, Y. LEVIN ET E. KATCHALSKI, *Biochemistry*, 3 (1964) 1913.
- 21 J. T. EDSELL ET J. WYMAN, *Biophysical Chemistry*, Academic Press, New York, 1958.
- 22 J. ZAREMBOVITCH, *J. Chim. Phys.*, 63 (1966) 420.
- 23 B. LABOUESSE, H. L. OPPENHEIMER ET P. G. HESS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14 (1964) 318.
- 24 E. F. CURRAGH ET D. T. ELMORE, *Biochem. J.*, 93 (1964) 163.
- 25 M. IRIE, *J. Biochem. Tokyo*, 57 (1965) 355.
- 26 G. I. LOEB ET H. A. SAROFF, *Biochemistry*, 3 (1965) 1819.
- 27 H. A. SAROFF, *J. Theoret. Biol.*, 9 (1965) 229.

*Biochim. Biophys. Acta*, 151 (1968) 165-177