

lables par les réactifs amidon-iode-azide avec 0,01 μ mole de peptides au départ. Par contre, la révélation habituelle des taches par l'acide sulfurique concentré exige des quantités plus appréciables de matière.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau.

L'application de cette méthode à des peptides plus longs, ainsi que l'utilisation de phénylisothiocyanate marqué au ^{35}S pour augmenter la sensibilité de cette méthode, sont à l'étude et feront l'objet d'une prochaine publication.

Les auteurs remercient sincèrement la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide financière accordée pour ce travail.

SUMMARY

The microchromatography of phenylthiohydantoins on thin layers of silica (solvent: heptane, pyridine, ethyl acetate 5:3:2 vol.; revelation by starch-iodine-azide) is described. This method is 10 to 20 times more sensitive than that of classic paper chromatography. Good results are obtained in the EDMAN degradation of 0,01 μ mole of di- or tri-peptides.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève

230. Interaction de films de protéine et de poly-amino-acides avec la trypsine à travers de minces écrans

par A. Rothen

(16 VIII 60)

Nous avons publié ici même, il y a quelques années, le résultat d'expériences sur l'interaction de films de protéine avec des anticorps et des enzymes¹). Ces études ont été depuis lors considérablement étendues et cet article résume l'état actuel de la question.

Nous nous bornerons aux interactions de la trypsine et d'un substrat approprié, à l'état de couches monomoléculaires.

Rappelons brièvement les *conditions expérimentales*. Des couches monomoléculaires de protéine formées à la surface d'une cuve de LANGMUIR, sont transférées sur une plaque de verre métallisée (Rh ou Cr) par immersions (\downarrow) et émergences (\uparrow) successives. L'épaisseur d'une monocouche est d'environ 6 à 8 Å. Les épaisseurs sont déterminées optiquement par un appareil appelé ellipsomètre²) qui permet d'apprécier une fraction d'Å. Ces couches de protéine sont capables d'adsorber spécifiquement des anticorps homologues. En quelques minutes une couche de 30 à 40 Å peut être adsorbée. Dans le cas, exceptionnel, de couches d'albumine de sérum de bœuf, l'épaisseur de la couche d'anticorps adsorbés est plus ou moins proportionnelle au nombre de couches d'albumine présentes (maximum d'épaisseur de la couche d'anticorps environ 300 Å).

Ces couches de protéine transférées sur plaque sont extrêmement sensibles à l'action de solutions diluées d'enzymes protéolytiques. En quelques secondes, elles

¹) A. ROTHEN, Helv. 33, 834 (1950).

²) A. ROTHEN, J. physic. Chemistry 63, 1929 (1960).

perdent entièrement leur propriété de réagir spécifiquement avec des anticorps homologues; elles ont été «inactivées». Nous appellerons donc ici inactivation toute action enzymatique qui rend des couches de protéine incapables d'adsorber spécifiquement des anticorps. Des films de protéine transférés sur plaque puis protégés par un écran de plastique (formvar par exemple) peuvent être inactivés si on place une goutte de solution de trypsine sur l'écran (conc. 0,1%, tampon véronal 0,05 M, pH 7,7). L'épaisseur minimum de l'écran pour empêcher toute action tryptique dépend du nombre de couches et de leur mode de déposition. Un écran de 50 Å de formvar est suffisant pour protéger une seule double couche ($\uparrow\downarrow$) d'albumine de sérum de bœuf, alors que 1000 Å sont nécessaires s'il y a 6 couches sous-jacentes déposées par éersion (\uparrow)₆. Tels sont brièvement les faits présentés dans l'article cité plus haut.

Le mécanisme de cette action à travers un écran est la question fondamentale posée par ces expériences. On avait considéré naguère comme une possibilité le mécanisme suivant: sous l'influence d'une interaction à travers l'écran, les couches de protéine se détacheraient et seraient inactivées par l'enzyme lorsque par suite de leur diffusion elles émergeraient à la surface externe de l'écran. Les nouvelles données expérimentales montrent qu'il n'en est rien. En effet, si l'on utilise comme substrat des couches d'ovalbumine, l'inactivation totale des couches à travers un écran peut être obtenue sans perte d'épaisseur due à une désorption des couches du substrat. Après dissolution de l'écran on observe la même épaisseur qu'avant la déposition de l'écran et le traitement enzymatique. Il faut un écran de 300 Å de formvar pour protéger 10 doubles couches ($(\uparrow\downarrow)_{10}$) d'ovalbumine contre toute action tryptique. Les expériences décrites précédemment, jointes à ces nouvelles données, indiquent définitivement que s'il y a transport matériel à travers l'écran, c'est l'enzyme qui doit avoir diffusé. Nous démontrerons plus loin comment on peut déceler la trypsine qui, sous l'influence d'une interaction à grande distance, a forcé la barrière offerte par l'écran.

L'ancrage des films de protéine et son influence dans l'interaction à grande distance

En général les couches de protéine ne sont pas transférées directement sur les plaques-support. Les plaques sont recouvertes d'abord d'un certain nombre de couches de sels de Ba d'acides gras supérieurs, stéarique ou acides contenant 20, 23 ou 24 atomes de carbone. (Les sels de Ba de ces acides gras seront dorénavant désignés par le terme de sel et le nom de leur acide, pour abrégier autant que possible le texte.) Ces couches formées à l'état monomoléculaire avec une orientation bien caractéristique à la surface d'une cuve de LANGMUIR, sont transférées sous forte pression (18 dynes/cm) sur les plaques. Elles forment une excellente base ou ancrage pour la déposition de films de protéine. En outre, si elles sont traitées par une solution d'acétate d'uranyle, l'ancrage des couches est renforcé. Ce traitement sera dénoté par le terme «conditionner.» Si les plaques ont été conditionnées, un très grand nombre de couches d'albumine de sérum de bœuf peuvent être transférées et empilées les unes sur les autres. Par contre, si les plaques n'ont pas été conditionnées, deux doubles couches ($(\uparrow\downarrow)_2$) seulement de cette protéine peuvent être transférées. La 3^e couche n'a pas une adhérence suffisante pour être maintenue sur la plaque lors des transferts par immersion-éersion.

L'expérience suivante est très caractéristique: Des couches d'albumine sont déposées en marches d'escalier sur une plaque recouverte de trois couches de sel de l'acide à 23 atomes de carbone. Le bas de la plaque est recouvert de 9, le milieu de 6 et le haut de 3 doubles couches d'albumine. Un écran de formvar de 600 Å d'épaisseur uniforme recouvre la plaque. Après un

traitement de 3 min par une solution de trypsine, l'écran est dissous, et la plaque, recouverte d'une solution d'anticorps homologues de sérum de lapin. On observe alors, comme le montrent les résultats quantitatifs du tableau I, que les 3 couches d'albumine n'ont pas subi l'action trypsique alors que les 6 et surtout les 9 couches ont été complètement inactivées. Lorsque le traitement enzymatique est fait sans écran protecteur, par une solution très diluée de trypsine, on constate d'autre part qu'un grand nombre de couches est moins rapidement inactivé qu'un plus petit nombre, ce qui pouvait être prévu.

Le résultat important est que l'inactivation par la trypsine, considérée en fonction du nombre de couches sous-jacentes d'albumine, varie d'une façon opposée, resp. en l'absence et en présence d'un écran. Pour protéger un système donné de couches, il faut un écran d'autant plus épais que le nombre de couches est plus grand. Il faut donc en conclure que l'interaction à travers l'écran, qui est suffisamment forte pour forcer le passage de l'enzyme, doit augmenter avec le nombre de couches. Cette interaction devient apparente en présence d'un écran, et se différencie nettement d'une force de diffusion libre.

Tableau I. *Influence du nombre de couches de protéine sur l'inactivation en présence ou en l'absence d'écran*

Nombre de doubles couches d'albumine de bœuf	3	6	9
Épaisseur de la couche d'anticorps en Å (sans action trypsique) . .	127	222	318
Épaisseur de la couche d'anticorps en Å (trypsine 3', écran 600 Å) .	127	60	40
Épaisseur de la couche d'anticorps en Å (trypsine diluée, point d'écran)	70	112	161

Le très curieux phénomène suivant a été observé concernant l'intensité de l'interaction à grande distance, considérée en fonction du nombre de couches de sel gras servant d'ancrage aux couches de protéine.

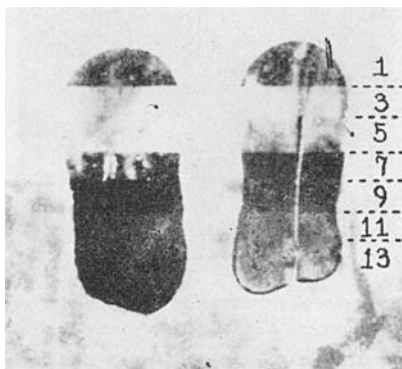


Fig. 1. *Plaque recouverte de 3 doubles couches de sérum de bœuf déposées sur un ancrage en marches d'escalier de stéarate de Ba*

Le nombre de couches de l'ancrage est indiqué à droite. Les plaques furent chauffées 5' à 75° avant la déposition de l'écran de formvar de 70 Å d'épaisseur. Deux gouttes de trypsine furent déposées durant 1' à gauche et 3' à droite. Après lavage les plaques furent photographiées; le contour des gouttes est apparent. Contraste obtenu par la photographie d'une figure de condensation²⁾. Les films déposés sur 3 et sur 5 couches ne sont pas inactivés et apparaissent en blanc.

Une plaque est recouverte par des couches de sel en C_{23} , déposées en marches d'escalier, chaque échelon correspondant à des différences successives d'épaisseur d'une double couche

(62 Å), l'escalier allant de 17 couches (bas de la plaque) à une. Quatre doubles couches d'albumine sont déposées uniformément sur cet ancrage en escalier. La plaque est chauffée 5 min à 75° (on peut aussi chauffer avant la déposition des couches d'albumine, mais il est préférable de le faire après). Un écran de 150 Å de formvar protège les couches pendant un traitement trypsique de 5'. Après dissolution de l'écran et adsorption d'anticorps, on observe que l'inactivation des couches de protéine varie d'une façon périodique avec le nombre de couches de l'ancrage, ainsi que le montrent les résultats du tableau II (voir aussi fig. 1). Les films de protéine déposés sur trois couches, n'ont subi aucune action enzymatique, ils sont capables d'absorber une couche épaisse d'anticorps. Il en est de même des films situés sur 13 ou 15 couches qui sont peu inactivés alors que ceux transférés sur 7 ou 17 couches sont très inactivés. Lorsque l'on traite une plaque semblable, mais qui n'a pas d'écran protecteur, par une solution d'enzyme plus diluée (0,002%) pour diminuer la vitesse de réaction, l'inactivation des films est sensiblement la même quel que soit le nombre de couches de sel servant de base, à l'exception des films déposés sur une couche, qui ne sont plus inactivés (fig. 2).

Tableau II. *Influence du nombre de couches de l'ancrage sur l'inactivation en présence d'un écran*

Nombre de couches du sel en C_{23} de l'ancrage (31 Å par couche)	1	3	7	11	15	17
Epaisseur de la couche d'anticorps adsorbés après inactivation à travers 150 Å de formvar	79	128	61	110	135	29

Il découle des observations qui précèdent que cette différence dans l'inactivation en fonction des couches sous-jacentes de sel gras ne résulte pas d'une différence dans la sensibilité des films envers la trypsine mais d'une différence dans la vitesse de diffusion de l'enzyme à travers l'écran, ce qui va être démontré directement dans le paragraphe suivant.

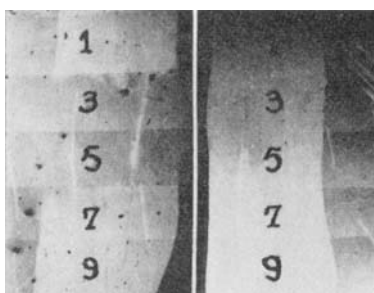


Fig. 2. *Illustration de la différence dans l'inactivation de couches de protéine déposées sur un ancrage en marches d'escalier de stéarate de Ba*

A gauche, inactivation à travers un écran, échelons 3 et 5 non inactivés. A droite, inactivation plus ou moins uniforme en l'absence d'écran. Photographie obtenue avec l'ellipsomètre, après dissolution de l'écran et adsorption d'anticorps. Les parties peu inactivées apparaissent foncées.

Démonstration du fait que l'enzyme peut traverser un écran et preuve de ce que la vitesse de transport est fonction du nombre des films de protéine ainsi que du nombre des couches de sel gras dont est constitué l'écran

Lorsque l'on applique une bande de ruban collant du type «Scotch tape» sur une plaque recouverte de couches de sel gras et de protéine, et qu'on détache ensuite la bande de la plaque, toutes les couches qui recouvraient cette dernière sont transférées sur le ruban collant à l'exception de la première couche déposée, dont l'adhésion sur la plaque est très grande. Ceci se dé-

montre aisément avec l'ellipsomètre. Si une plaque recouverte d'un ancrage «conditionné» sur lequel ont été transférées 3 ou 4 doubles couches d'albumine est traitée quelques secondes par une solution de trypsine, des molécules de trypsine sont adsorbées sur la plaque. Après lavage on observe une augmentation d'épaisseur si le traitement a été suffisamment court, sinon, une diminution, par suite de l'hydrolyse et de la formation de fragments de molécule de protéine qui sont désorbés. La bande collante est alors placée sur une autre plaque appelée «réceptrice», recouverte uniformément de films d'albumine ancrés sur couches de sel gras. Il est préférable de chauffer cette plaque à 75° pendant 5', ce qui accroît l'adhérence des films de protéine. Un film liquide de tampon (pH 7,7) d'environ 0,1 mm d'épaisseur sépare le ruban collant de la plaque. Après 6' la plaque lavée est traitée par une solution d'anticorps homologues et l'on constate que les films d'albumine sur lesquels a été déposé le ruban sont complètement inactivés; il n'y a pas d'adsorption d'anticorps. Une expérience de contrôle montre qu'un ruban qui n'a pas de trypsine inactive pas les couches. Il est important que le traitement enzymatique ne soit pas de trop longue durée, car les couches d'albumine seraient alors complètement hydrolysées et la trypsine s'adsorberait directement sur les couches conditionnées de sel. L'expérience a montré qu'une couche monomoléculaire de trypsine de 16 Å d'épaisseur, adsorbée directement sur des couches conditionnées de sel gras, a une si grande adhésion qu'elle ne peut être détachée. Il en résulte qu'elle reste attachée sur le ruban qui est de ce fait enzymatiquement inactif. Une couche de trypsine adsorbée directement sur des couches non conditionnées d'acide gras, peut, par contre, être détachée et l'on peut après transfert obtenir un ruban capable d'exercer une action tryptique.

Si un écran de formvar protège les films d'albumine pendant l'action enzymatique, on observe invariablement que le ruban utilisé pour détacher les couches après la dissolution de l'écran, peut inactiver une plaque réceptrice, si l'écran était suffisamment mince pour qu'il y ait eu inactivation des couches de la première plaque. Si cette plaque n'a pas été inactivée le ruban utilisé pour en détacher les couches après le traitement enzymatique ne peut transmettre aucune action tryptique. Par exemple un ruban porteur de trypsine peut être obtenu d'une plaque recouverte de 9 doubles couches d'albumine protégées par un écran de formvar de 500 Å d'épaisseur, alors que si la plaque n'avait que 3 doubles couches protégées par 470 Å de formvar, le ruban serait inactif. Nous avons mentionné plus haut (fig. 1 et 2, tabl. II) le rôle très important joué par le nombre de couches de l'ancrage, dans l'inactivation à travers un écran. Supposons que l'on traite par la trypsine, en présence d'un écran, une plaque recouverte de films de protéine (chauffés à 70°) déposés sur un ancrage en marches d'escalier de couches de sel gras, chaque marche correspondant à des différences d'une double couche. Si cette plaque était traitée directement par des anticorps, on observerait que les films de protéine déposés sur 3 couches de sel ne seraient pas inactivés alors que ceux déposés sur 1 ou 7 couches le seraient. Mais si l'on transfère les couches sur un ruban, on constate que l'on peut décalquer sur la plaque réceptrice du ruban le schéma de l'inactivation. S'il y avait 3 marches dans l'ancrage de la première plaque, correspondant à 1, 3, et 5 couches de sel gras, on observe 3 zones d'inactivation de la plaque réceptrice correspondant aux trois marches. Les lignes de démarcation entre chaque zone sont presque aussi nettes que les lignes de séparation des marches de la première plaque. Dans une expérience typique, les épaisseurs des couches d'anticorps correspondant aux 3 zones, furent 41 Å, 103 Å, et 160 Å (correspondant aux marches avec une, trois et cinq doubles couches d'acide gras). Ceci démontre directement que la variation de l'inactivation des films de protéine en fonction des couches de l'ancrage provient bien d'une différence dans la vitesse de transport de l'enzyme.

On pourrait peut-être penser que ces différences résultent de la formation d'une combinaison chimique entre couches de l'ancrage et protéine. Nous pensons plutôt que l'origine de ces phénomènes est de nature physique, ainsi que le suggèrent les observations suivantes.

Plaçons, dans des expériences analogues à celles qui viennent d'être décrites, un écran de formvar de 50 à 120 Å d'épaisseur, directement sur la plaque métallisée, sous l'escalier de sel gras. Nous appellerons cet écran, l'écran de fond, pour le différencier de l'écran protecteur placé sur les couches. On observe que le minimum dans l'inactivation a été déplacé, et que ce sont les films déposés sur 5 couches de sel gras qui sont les plus résistants et non plus ceux déposés sur trois. Mais si l'écran de fond est plus épais que 140 Å, ce sont, comme en l'absence d'écran de fond,

les films déposés sur 3 couches qui sont les plus résistants. La transition a lieu dans une limite étroite d'épaisseur, d'environ 10 Å autour de 130 Å de l'écran de fond (tabl. III et fig. 3).

Tableau III. *Influence d'un écran de fond en formvar sur l'inactivation*

Plaque	Epaisseur de l'écran de fond en Å	Epaisseur de l'écran protecteur de formvar en Å	Epaisseur de la couche d'anticorps quand l'ancrage consiste en				
			1	3	5	7	9
			couches de stéarate de Ba				
1	70	85	32	60	144	30	14
	sans écran	85	55	102	83	2	5
2	127	115	78	137	92	41	11
	sans écran	115	53	118	86	65	24

Si l'on incorpore à l'écran de fond des colorants azoïques en les dissolvant dans le $C_2H_4Cl_2$ (conc. 0,1 à 0,4%) servant de solvant pour le formvar, l'épaisseur optique est d'environ 20% plus grande que s'il n'y avait pas de colorants. Quand ce sont l'écarlate BFS ou le jaune CFS qui sont présents dans l'écran, la grande différence dans l'inactivation des échelons correspondant à 3 ou 5 couches de sel gras a fortement diminué. Mais si le colorant soudan noir (à deux groupes azoïques par molécule) est introduit dans l'écran, ce sont toujours les films de protéine déposés sur 5 couches de sel gras qui deviennent plus inactivés que ceux déposés sur 3 couches, même avec

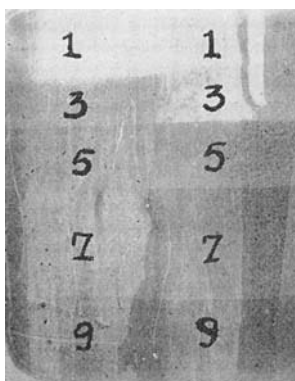


Fig. 3. *Plaque illustrant l'influence d'un écran de fond de formvar de 50 Å d'épaisseur sur l'inactivation à travers un écran*

A droite, inactivation en présence d'un écran de fond, échelon 3 inactivé. A gauche, inactivation sans écran de fond, échelon 3 protégé. Ecran protecteur de 90 Å d'épaisseur. Photographie prise avec l'ellipsomètre, après dissolution de l'écran et adsorption d'anticorps.

les écrans les plus minces. Les résultats sont pareils à ceux obtenus avec un écran épais de formvar. Des résultats qualitativement semblables sont obtenus avec des écrans de fond de parlodion; la différence dans l'inactivation des marches diminue fortement, mais sans qu'on n'ait jamais pu observer que les films déposés sur 5 couches soient moins inactivés que ceux déposés sur 3.

Influence de la nature des couches d'ancrage et des plaques-support sur l'inactivation à grande distance

La nature de l'acide gras dont le sel sert d'ancrage a un effet considérable sur la vitesse de transport de l'enzyme à travers l'écran. Plus la chaîne de l'acide est longue, plus la vitesse est grande. Sans écran, la vitesse d'inactivation est indépendante de l'acide du sel. Pour le sel d'un acide donné, l'épaisseur de l'écran nécessaire pour la protection des films de protéine est plus faible si les couches sont formées par les sels de calcium que par ceux de baryum (le strontium est intermédiaire). Cette différence dans l'inactivation disparaît en l'absence d'écran.

Lorsque l'ancrage est constitué par des couches d'octadécylamine (formées dans les mêmes conditions que les couches de sel, mais à partir d'une solution benzénique de l'amine), on observe, comme dans le cas des sels, qu'après chauffage à 70°, la trypsine traverse moins rapidement l'écran si les couches de protéine sont déposées sur trois plutôt que sur une ou cinq couches d'amine.

Les couches de sel gras sont généralement formées à la surface d'une solution tampon pH 7,5 à 7,7. Il y a une perte d'épaisseur optique d'environ 10 Å pour 5 couches chauffées 5' à 75°, ce qui provient de l'évaporation de l'acide gras libre. Lorsque la déposition des couches est faite à pH 8,5, il n'y a pas de perte par chauffage, et l'on observe que les grandes différences dans l'inactivation des films en fonction du nombre de couches sous-jacentes ont fortement diminué. Il semble que la présence de discontinuités dans l'ancrage soit une des conditions nécessaires pour la périodicité dans l'inactivation. On ne peut admettre que ce soit l'acide libre qui, en s'évaporant, modifierait les films de protéine, puisque le chauffage peut s'effectuer avant la déposition de ces derniers. La présence de traces de sels de zinc (conc. 10^{-5} M) dans la solution de la cuve utilisée pour la déposition des couches de sel gras empêche l'apparition de la périodicité. C'est pourquoi il est recommandable d'utiliser des cuves en plastique et non en laiton.

La nature des plaques joue aussi un rôle.

Nous avons utilisé des plaques en acier inoxydable, en verre recouvert d'une très mince couche de Rh, Cr, TiO ou TiO₂, et en acier «carbide» (acier à haute teneur en carbone qui permet d'obtenir des surfaces suffisamment planes pour que deux blocs puissent adhérer très fortement l'un à l'autre en contact optique). L'écran nécessaire pour empêcher l'action enzymatique est beaucoup plus mince si l'on utilise des plaques «carbide» ou des plaques de verre recouvertes de TiO ou TiO₂, plutôt que des plaques de verre métallisé. Autre différence: avec des plaques recouvertes de TiO ou TiO₂, les films de protéine déposés sur une couche de sel gras, sont aussi peu sensibles à l'action enzymatique que ceux déposés sur trois couches, que les plaques soient chauffées à 75° ou non. Finalement, avec des plaques-support en «carbide», il n'a jamais été possible d'observer, après chauffage à 75°, la périodicité décrite plus haut dans l'inactivation des couches d'albumine en fonction du nombre de couches de l'ancrage.

Nature du substrat

Dans toutes les expériences décrites jusqu'ici, on a utilisé comme substrat des couches de protéine, soit d'ovalbumine soit d'albumine de sérum de bœuf. Il était indiqué d'utiliser d'autres grandes molécules comme substrat. Nous avons étudié l'influence des poly-amino-acides suivants, quant à leur pouvoir d'accélérer la diffusion de la trypsine à travers de minces écrans: poly-L-lysine, acide poly-L-aspartique, poly-L-proline et poly-L-sarcosine. Contrairement aux protéines, aucun de ces

polymères ne peut s'étaler facilement en couche mince à l'interphase air-eau dans un intervalle de pH de 4 à 9, quel que soit leur poids moléculaire. Il faut en conclure que la structure secondaire de ces poly-amino-acides synthétiques est toute différente de celle des protéines. Les polymères dissous à des concentrations de 0,1% dans des tampons d'hydrogénocarbonate de sodium (0,05 M; pH 8,6), furent adsorbés directement sur des plaques recouvertes d'un ancrage de sel gras. L'épaisseur de la couche adsorbée est d'environ 10 à 15 Å et indépendante du nombre de couches de l'ancrage. L'adsorption a donc lieu en surface, sans pénétration dans les couches sous-jacentes. La trypsine peut être adsorbée directement sur les couches de n'importe lequel de ces polymères, et après transfert sur ruban collant, les rubans sont tous capables d'inactiver des plaques réceptrices recouvertes d'albumine de sérum de bœuf.

La trypsine ne peut pas traverser un écran très mince (40 à 50 Å) de formvar protégeant ces poly-amino-acides, à l'exception de la poly-L-lysine. Dans ce dernier cas un écran de plus de 200 Å d'épaisseur est nécessaire pour qu'après le traitement enzymatique, le ruban sur lequel les couches sont transférées soit incapable d'inactiver une plaque réceptrice. Trois échantillons de poly-L-lysine de différents degrés de polymérisation furent étudiés (poids moléculaires 4000, 7000 et 300 000). On n'observa pas de différence significative dans l'épaisseur de l'écran, nécessaire pour empêcher la pénétration de la trypsine avec ces trois échantillons. Il était théoriquement important de savoir si la substitution de la poly-D-lysine à la poly-L-lysine modifierait l'interaction à travers l'écran. Mais nous avons trouvé que si l'on adsorbait de la trypsine sur une couche de poly-D-lysine, il était impossible d'obtenir une action tryptique de la bande de ruban sur laquelle les couches avaient été transférées. Il fallait en conclure que l'énergie d'adsorption de la trypsine sur la poly-D-lysine était suffisamment grande pour empêcher une désorption ultérieure de l'enzyme, sous l'influence de la solution tampon. On pouvait alors supposer que la poly-D-lysine inhiberait peut-être l'action enzymatique d'une solution de trypsine. L'expérience montra qu'il en est bien ainsi.

Une solution contenant 0,2 mg de poly-D-lysine et 0,03 mg de trypsine par ml de tampon au véronal n'exerce aucune action tryptique. Par contre le mélange poly-L-lysine-trypsine (aux mêmes concentrations) est tout aussi actif qu'une solution de trypsine. Pour ces expériences on a déposé des gouttes de ces diverses solutions sur une même plaque couverte de couches d'albumine. Après lavage et adsorption d'anticorps, on observe que la surface soumise au mélange poly-D-lysine-trypsine peut adsorber 130 Å d'anticorps, tandis que les surfaces traitées par la trypsine ou le mélange poly-L-lysine-trypsine ne peuvent adsorber que 50 Å d'anticorps environ. (Il n'y a pas eu inactivation totale, vu la grande dilution de la trypsine (0,003%)). L'addition soit de D-lysine soit de L-lysine à une solution de trypsine ne modifie pas son activité enzymatique.

On peut facilement démontrer que la trypsine hydrolyse une couche de poly-L-lysine adsorbée sur plaque mais n'attaque pas une couche de poly-D-lysine. La démonstration est basée sur le fait qu'une couche soit de poly-L-lysine soit de poly-D-lysine est capable d'absorber d'une solution de n'importe quel sérum de lapin (dilution 1/10 dans un tampon de véronal 0,05 M) une couche de protéine d'environ 180 Å d'épaisseur. Si l'on traite par la trypsine la couche de poly-L-lysine, elle perd sa propriété d'absorber des protéines, par contre une couche de poly-D-lysine peut adsorber autant de protéine après qu'avant le traitement par l'enzyme.

L'impossibilité d'obtenir une bande active de ruban, lorsque la trypsine arrive en contact avec une couche de poly-D-lysine, exclut toute méthode de détermination

de trypsine basée sur son activité enzymatique pour les expériences où la poly-D-lysine constitue le substrat. Pour cette raison, de la trypsine radioactive fut préparée par incorporation de tritium suivant la méthode de WILZBACH³⁾.

Expérience avec de la trypsine radioactive (à tritium)

L'échantillon cristallin de trypsine avait une activité de 1,3 millicurie par mg, ce qui correspond à une moyenne d'environ un atome de tritium par molécule de trypsine. Une bande de ruban collant (13 mm × 4 mm), après transfert d'une couche de trypsine adsorbée directement sur quelques couches de sel gras, donna 1400 c/min dans un compteur à courant gazeux. Cela montrait que l'échantillon était suffisamment radioactif pour qu'on pût utiliser le dosage de sa radioactivité comme méthode analytique. Quand un très mince écran de formvar (de 50 Å d'épaisseur) protégeait les couches de sel gras pendant l'action enzymatique, le nombre de c/min obtenu après dissolution de l'écran et transfert sur ruban tomba à 80 c/min ou moins. Ces expériences confirment entièrement la conclusion atteinte précédemment et basée sur une autre méthode analytique, qu'un mince écran de formvar est imperméable à la trypsine quand il repose sur une plaque recouverte de couches de sel gras. D'autres essais montrèrent qu'il en est de même quand l'écran est placé directement sur la plaque. Lorsqu'une couche de poly-L-lysine

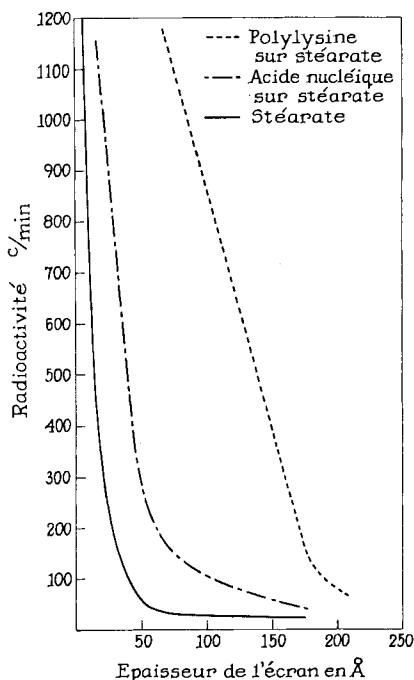


Fig. 4. Efficacité d'un écran de formvar pour protéger des couches de polylysine, d'acide nucléique et de stéarate de baryum contre la trypsine, déterminée par des mesures de radioactivité

ou de poly-D-lysine est ancrée sur les couches de sel gras, après adsorption directe de trypsine radioactive, la radioactivité du ruban est sensiblement la même que s'il n'y a pas de poly-amino-acide, soit environ 1400 c/min comme nous l'avons vu. En présence d'un écran, les résultats sont très différents. Il faut une épaisseur de formvar de plus de 200 Å pour que le ruban donne moins de 100 c/min. Autre fait important, on n'observe pas de différence significative entre l'influence de la poly-D-lysine et de la poly-L-lysine. La configuration spatiale du polymère ne joue pas de

³⁾ K. WILZBACH, J. Amer. chem. Soc. 79, 1013 (1957).

rôle dans l'interaction à grande distance. Lorsque le substrat consiste en une couche adsorbée de n'importe quel autre des poly-amino-acides mentionnés ci-dessus, un écran de 100 Å ou plus mince est suffisant pour faire tomber la radioactivité du ruban à moins de 100 c/min.

Ces résultats sont en parfait accord avec les conclusions basées sur l'activité enzymatique des rubans. La figure 4 illustre cette grande différence dans la facilité avec laquelle la trypsine peut traverser un écran de formvar, suivant la nature des couches sous-jacentes. L'acide nucléique comme la polylysine furent adsorbés sur des couches de sel gras. On pourrait penser que la propriété d'accélérer la diffusion de la trypsine à travers un écran, exhibée seulement par la polylysine, résulte de la basicité du polymère. Cette simple explication n'est pas suffisante. Il faut se rappeler que la trypsine ne traverse pas un mince écran situé sur des couches non conditionnées, soit de sels gras supérieurs soit d'amines supérieures (p. ex. stéarate ou octadécylamine). Ceci est vrai dans l'intervalle de pH de 2,6 à 8,6, c'est-à-dire de part et d'autre du point isoélectrique de la trypsine. En outre la trypsine peut être adsorbée directement sur n'importe quel substrat, qu'il soit acide (acide nucléique, acide polyaspartique, etc.) ou basique (histone, protamine).

La méthode de préparation de la trypsine radioactive ne fournit pas de preuve de la formation de ce corps par simple échange, sans réaction secondaire. L'activité enzymatique de la trypsine radioactive était égale à celle de l'échantillon non irradié. Cependant, l'activité enzymatique diminuait avec le temps; un échantillon cristallin gardé à 4° perdit toute son activité enzymatique en quatre mois, et une portion importante devint insoluble. Il semble probable néanmoins que le tritium était incorporé dans la molécule de trypsine active enzymatiquement, puisque les conclusions furent les mêmes quelle qu'eût été la méthode analytique. Si le tritium avait été fixé sur un petit fragment moléculaire détaché, ce fragment n'aurait pas été adsorbé sur une plaque. Des molécules de la grandeur d'un tripeptide p. ex., n'ont pas une adhésion suffisante pour rester adsorbées sur une couche de sel gras. En outre, un film de trypsine tritiée, formé à la surface d'une cuve de LANGMUIR et transféré sur plaque, est très radioactif. Autrement dit le tritium n'entre pas en solution dans le liquide de la cuve mais fait partie intégrante du film. Une double couche transférée donne le même nombre de coups par minute qu'une couche adsorbée directement.

Effets d'orientation produits par un écran

Une couche de poly-L-lysine est adsorbée directement sur une plaque recouverte de quelques couches, conditionnées ou pas, de sel gras. Après traitement enzymatique et transfert sur ruban collant on observe que ce ruban libère moins de trypsine que si le traitement enzymatique avait été fait en présence d'un écran d'une centaine de Å d'épaisseur.

Ces observations paradoxales peuvent peut-être s'expliquer par les considérations suivantes. Le réseau d'un écran de formvar doit avoir des mailles très serrées, puisqu'un écran de 50 Å offre une barrière imperméable à la trypsine quand elle n'est que sous l'influence des forces de diffusion libre. Néanmoins l'enzyme peut traverser l'écran si l'interaction enzyme-substrat est suffisamment grande. Il s'en suit que la traversée de l'écran par les molécules de trypsine est un passage forcé. Ces molécules doivent être orientées et déformées, et les pores virtuels de l'écran doivent être considérés d'un point de vue dynamique plutôt que statique; lorsque les molécules entrent en contact avec le substrat, elles ont donc une orientation bien définie, et

une faible partie de la surface moléculaire totale doit être en contact immédiat avec le substrat. Par contre, en l'absence d'un écran, les molécules peuvent être adsorbées sans les restrictions que cet écran impose. Les molécules s'adsorbent fort probablement de façon à couvrir la plus grande surface possible du substrat. Par exemple, il est bien connu que des acides gras à longue chaîne sont adsorbés sur une plaque, d'une solution organique, avec leurs chaînes orientées parallèlement à la surface de la plaque; il y a surface maximum de contact. Mais si les molécules ont été orientées dans une phase condensée, comme elles le sont lorsqu'elles sont déposées à l'interphase eau-air, elles restent orientées en bloc durant leur transfert sur plaque, avec leur grand axe perpendiculaire au plan de la plaque. Il est donc fort compréhensible que la libération des molécules de trypsine du ruban doive être une fonction de l'orientation de leur attachement. L'énergie de désorption doit augmenter avec la surface d'attachement.

Portée de l'interaction

Une interaction entre trypsine et substrat approprié peut être décelée à travers 2000 Å de formvar. La distance maximum observable est atteinte lorsque la force de l'interaction égale la résistance offerte par l'écran. On peut donc se demander jusqu'à quelle distance cette interaction peut être observée; par exemple, à quelle distance la force de l'interaction est de l'ordre de grandeur de la force de la diffusion libre. Pour élucider ce point, des expériences furent faites avec un écran comprenant deux parties: une partie inférieure consistant en couches de sels gras qui n'offrent, même en présence d'un grand nombre de couches, qu'une très faible protection contre l'action tryptique⁴⁾, et une partie supérieure faite de formvar dont l'efficacité était connue par les essais décrits plus haut. La partie inférieure de l'écran, quoique perméable à la trypsine, servait ainsi à maintenir le formvar à une distance déterminée et constante du substrat de protéine (48 Å par double couche de stéarate).

Les essais furent faits comme nous l'avons décrit précédemment. Après dissolution du formvar, les couches, y compris l'écran inférieur de stéarate, furent transférées sur ruban qui fut placé sur une plaque réceptrice. Il est frappant d'observer le grand nombre de couches de stéarate qu'on peut introduire entre un substrat consistant en 3 doubles couches d'albumine et un écran de formvar de 150 Å environ d'épaisseur, sans empêcher la pénétration de la trypsine placée sur le formvar. Un ruban enzymatiquement actif peut être obtenu lorsque 3 doubles couches d'albumine, protégées par un écran mixte de 30 doubles couches ($(\downarrow\uparrow)_{30}$) de stéarate et de 120 Å de formvar, sont traitées par la trypsine. Par contre, on obtient un ruban inactif quand il n'y a pas de couches d'albumine, sous un écran de 30 doubles couches de stéarate et de 80 Å de formvar. On remarque aussi que 5 à 10 doubles couches de stéarate sont plus efficaces que 30 doubles couches. Il est possible qu'une pile de peu de couches de stéarate soit plus stable qu'une pile beaucoup plus épaisse qui, sous l'influence de l'interaction, se fracturerait plus aisément. Du fait de la méthode de détection de la trypsine, on ne peut pas, dans ces dernières expériences, déterminer où se trouve la trypsine qui a forcé l'écran de formvar. Elle peut être située soit à l'interphase stéarate-formvar, soit à l'interphase sous-jacente stéarate-substrat; dans les deux cas le ruban sera enzymatiquement actif.

Quel que soit le mécanisme du phénomène, il est apparent que l'interaction s'étend à une grande distance, beaucoup plus grande que ne permettraient de la prévoir les expériences faites avec un écran homogène de formvar. On pourrait peut-être penser que les couches de stéarate, du fait de leur structure cristalline, sont plus capables que le formvar de transmettre à l'enzyme «l'information» donnée

⁴⁾ A. ROTHEN, J. Amer. chem. Soc. 70, 2732 (1948).

par le substrat. Autrement dit, pour une distance donnée, l'interaction serait plus grande si le volume séparant l'enzyme du substrat était occupé par des couches de sel gras plutôt que par du formvar.

Influence du pH de la solution de trypsine sur la capacité de l'enzyme de forcer un écran

La trypsine dissoute dans un tampon d'acétate de sodium pH 5,8, peut être adsorbée sur des couches de protéine déposées sur un ancrage conditionné, mais après transfert sur ruban, le ruban est inactif. Si l'ancrage n'est pas conditionné, le ruban est actif. Aussi dans ce cas, le substrat consistait-il en deux doubles couches d'albumine déposées sur un ancrage de sel gras non conditionné.

Un écran de formvar de 160 Å d'épaisseur n'empêche pas le transport de la trypsine. Une série d'expériences pour étudier l'influence du pH de la solution d'enzyme fut faite à l'aide d'une couche de poly-L-lysine adsorbée sur un ancrage non conditionné. Trois milieux furent utilisés pour dissoudre la trypsine: 1) un tampon de phtalate (phtalate acide de potassium 0,025 M avec assez de HCl pour ajuster le pH à 2,7); 2) un tampon d'acétate (0,025 M et 0,1 M pH 5,8); 3) un tampon d'hydrogénocarbonate de sodium (0,05 M, pH 8,5).

Des rubans actifs purent être obtenus lorsque l'écran protecteur avait 125 Å d'épaisseur ou moins, avec n'importe laquelle de ces trois solutions dont les pH sont situés de part et d'autre du point isoélectrique de la trypsine. Autrement dit, une explication du passage de l'enzyme à travers l'écran, basée uniquement sur des effets électrostatiques, semble insuffisante. Avec des écrans plus épais, seule la solution la plus alcaline permet le passage de l'enzyme. On n'observa pas de différence appréciable dans l'activité des rubans lorsque l'enzyme était dissous soit dans l'eau, soit dans une solution contenant 1,2% de NaCl, soit dans un tampon au véronal (en présence d'un écran de formvar de 200 Å d'épaisseur ou moins). On peut en conclure que soit le pH soit la force ionique jouent un rôle secondaire dans le mécanisme du transfert de l'enzyme.

Discussion et conclusion

Les nombreuses expériences décrites dans ce mémoire confirment l'hypothèse d'une interaction à grande distance entre enzyme et substrat approprié, lorsque des molécules de trypsine se trouvent placées sur un écran qui les sépare du substrat. Sous l'influence de cette interaction, les molécules d'enzyme sont forcées à travers l'écran et nous appellerons ce phénomène, une diffusion forcée. Quelle est la nature de cette interaction? L'influence très considérable qu'exercent sur cette diffusion forcée non seulement la couche sur laquelle le substrat est ancré, mais toutes les couches sous-jacentes, jusqu'à 200 ou 300 Å de distance du substrat, ainsi que la nature de la plaque-support, doivent être de première considération pour trouver une solution plausible du problème.

D'un point de vue très général, il semble qu'il y ait un choix à faire entre deux types de mécanisme (a et b).

a) Le premier type comprendrait toute théorie basée sur un phénomène de distribution ou d'orientation du substrat résultant d'une action de proche en proche

des couches sous-jacentes. Cette action se manifesterait par une distribution différente de charges (si l'on voulait ne considérer que des actions de COULOMB), ou de dipôles réels ou temporaires (forces de VAN DER WAALS, LONDON), ou d'oscillateurs étendus (modèle de LONDON). Un certain ordre des couches du substrat joue un rôle dans l'extension de l'interaction. Chaque fois que les couches de protéine sont déposées d'une façon hétérogène, avec formation d'imperfections macroscopiques par suite d'une faute de technique, cette hétérogénéité se reflète dans l'inactivation des couches à travers un écran. Nous avons vu que la trypsine traverse aisément un écran de formvar de 130 Å d'épaisseur placé sur trois doubles couches de protéine. Par contre elle ne traverse pas l'écran si les couches ont été préalablement chauffées à 130°. En l'absence d'écran les couches, chauffées ou non, sont également sensibles à la trypsine. Il semble que l'on doive considérer le chauffage comme un principe désorganisateur de l'ordre des couches.

On rencontre cependant de grandes difficultés à interpréter, avec une théorie de ce type, la périodicité observée dans l'inactivation en fonction du nombre de couches sous-jacentes de l'ancrage, ainsi que l'influence d'un écran de fond, influence qui dépend d'une façon si critique de son épaisseur.

b) L'idée vient tout naturellement à l'esprit qu'à cette périodicité dans l'interaction doit correspondre une périodicité fondamentale dans la cause même de l'interaction. Le physicien russe LIFSHITZ a développé récemment une théorie⁵⁾ qui explique quantitativement les résultats expérimentaux de DERJAGUIN & ABRIKOSSOVA⁵⁾. Ces derniers ont mesuré directement, d'une façon élégante, la force d'attraction moléculaire qui opère entre deux solides séparés dans le vide par des distances de l'ordre de 1000 à 2000 Å. LIFSHITZ part de l'idée que les forces d'attraction moléculaire sont dues aux fluctuations du champ électromagnétique entourant un corps solide, même au zéro absolu. Ces fluctuations résultent de la présence d'énergie dans tout solide au zéro absolu («zero point energy»). On peut se représenter cette énergie comme une émission et absorption de photons virtuels. Par l'introduction de photons virtuels pour expliquer cette interaction à grande distance, LIFSHITZ introduit, *ipso facto*, la notion de périodicité, soit de fréquence ou de longueur d'onde. En effet, les bandes d'absorption des corps qui agissent les uns sur les autres jouent un rôle essentiel dans sa théorie. Un point important à noter dans la théorie de LIFSHITZ est qu'il traite le problème d'un point de vue macroscopique, comme dû à un phénomène de coopération, où les constantes qui apparaissent dans les expressions algébriques sont des constantes caractérisant un domaine macroscopique (constante diélectrique, coefficient d'absorption). Nous avons toujours pensé que nos observations résultaient d'un phénomène de coopération. Toute théorie, telle que celle de LIFSHITZ, qui introduit une notion d'onde pour expliquer l'interaction, ferait partie du deuxième type des mécanismes très généraux mentionné plus haut. On peut donc légitimement se demander si une théorie ondulatoire ne pourrait pas servir de base pour expliquer nos observations sur la périodicité de l'inactivation en fonction du nombre de couches sous-jacentes formant l'ancrage. On pourrait imaginer l'existence d'un système d'ondes stationnaires virtuelles, avec réflexion sur la plaque support, correspondant

⁵⁾ B. V. DERJAGUIN, I. I. ABRIKOSSOVA & E. M. LIFSHITZ, *Quart. Review* 10, 295 (1956).

aux photons virtuels de LIFSHITZ. Dans ce cas, les phénomènes observés devraient varier avec les coefficients d'absorption de l'ancrage. Cela permettrait de concevoir pourquoi la présence de certains colorants dans l'écran de fond et le remplacement du formvar par le parlodion jouent un rôle dans l'inactivation. Sans aucun doute, ces considérations peu affinées ne permettent pas d'expliquer, même qualitativement, l'ensemble de nos observations, mais c'est à partir d'idées de cette nature qu'il nous paraît peut-être possible de résoudre le problème. Il y a un facteur dont il faut tenir compte dans n'importe laquelle des théories ondulatoires que l'on peut envisager, à savoir l'effet de retardement de l'onde dû aux distances séparant plaque, substrat et enzyme. Ces distances ne sont pas négligeables et le temps de transmission devient de l'ordre de grandeur de la période de l'onde. Autrement dit, la question de phase est de grande importance. Cet effet a été énoncé par VERWEY & OVERBEEK⁶⁾ puis développé d'une façon entièrement différente par CASIMIR & POLDER⁷⁾, et LIFSHITZ l'a introduit dans sa théorie. Il va sans dire que ces mécanismes d'actions à grande distance, qui font probablement partie du chapitre de l'électrodynamisme des quanta, doivent jouer un très grand rôle dans la biochimie cellulaire, qui est essentiellement une chimie d'interphases. Ceci augmente considérablement l'intérêt du problème, qui est biochimique aussi bien que physique.

SUMMARY

The experiments described indicate that trypsin molecules in solution are able to diffuse through a thin screen of formvar at a rate which is a function of the nature of the material located under the screen. Trypsin molecules will not diffuse through a blanket of formvar as thin as 50 Å deposited on multilayers of long chain fatty acids or amines. However if a few layers of protein coat the fatty acid layers, a much thicker screen of formvar is necessary to prevent the passage of the enzyme. A screen as thick as 2000 Å, depending upon the number and orientation of the underjacent protein layers, may be necessary to prevent this 'forced diffusion' from taking place. Of all the synthetic polyaminoacids tested as substitutes for the protein layers, only the poly-L- and poly-D-lysine are able to force the enzyme through a blanket.

This long range interaction between substrate and enzyme does not appear to result exclusively from Coulombic forces. The periodicity observed in the rate of the forced diffusion of the enzyme as a function of the number of layers in the anchorage may indicate that there is a fundamental periodicity in the cause of the interaction. It is suggested that the zero point energy which according to LIFSHITZ plays a fundamental rôle in the interaction between solids separated by a gap, may also play a rôle in the molecular forces responsible for the phenomena which have been described.

The ROCKEFELLER Institute, New York, N. Y.

⁶⁾ E. J. W. VERWEY & J. T. G. OVERBEEK, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier 1948, p. 104.

⁷⁾ H. B. G. CASIMIR & D. POLDER, *Physic. Review* **73**, 360 (1948).
