

INFLUENCE DU ZINC SUR LA STABILITÉ DE LA PLASMINE

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Paris (France)

La plasmine utilisée ici a été préparée à partir du plasminogène contenu dans la fraction III-3 du plasma humain fractionné suivant COHN ET EDSELL¹. Nous avons activé le plasminogène en plasmine en traitant cette fraction avec de la streptokinase (Lederle) (0.1% par rapport au poids de la fraction III-3) à 0° pendant 15 heures en milieu tampon borate 5·10⁻² M, à pH 7.9. La mesure du pouvoir protéolytique se fait à 35° en solution tampon borate à pH 8.2 sur la sérumalbumine dénaturée² ou sur la caséine Hammarsten; la concentration de la fraction III-3 est de 0.167 mg/ml, celle du substrat est de 2%. Le degré d'hydrolyse est déterminé par spectrophotométrie ($\lambda = 280 \text{ m}\mu$) après élimination de la protéine précipitable par l'acide trichloracétique³. Dans ces conditions, et dans les limites où la fraction de substrat hydrolysé n'excède pas le dixième de la quantité de substrat employé, la réaction de protéolyse reste d'ordre zéro. Il est donc possible de déterminer la concentration (C) de la plasmine active contenue dans un échantillon donné.

La fraction III-3 que nous avons utilisée n'est pas totalement soluble dans nos conditions d'expériences, et présente une activité protéolytique spontanée avant le traitement par la streptokinase. Après centrifugation (2000-3000 t.m.) la partie insoluble mise en suspension dans le tampon renferme 20% de l'activité spontanée totale. L'action de la streptokinase fait augmenter de 3.5 fois l'activité spontanée de la partie soluble, aussi bien que celle de la partie insoluble.

Etudiant l'action exercée par quelques ions métalliques sur la plasmine, nous avons constaté que le zinc (ZnCl₂) augmente fortement la stabilité de la plasmine, alors que d'autres métaux (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺) tendent à la diminuer (Tableau I). Pour une concentration en Zn⁺⁺ 2·10⁻⁴ M, la constante d'inactivation est déjà 100 fois plus petite que dans le cas du tampon seul; cette concentration est encore pratiquement sans effet sur l'activité de l'enzyme (Tableau II). D'après ce tableau, on voit qu'en présence de concentrations de Zn⁺⁺ relativement élevées, l'activité de la plasmine diminue (inactivation de la plasmine par Zn⁺⁺).

TABLEAU I

INFLUENCE DE DIFFÉRENTS CATIONS SUR LA STABILITÉ DE LA PLASMINE À 35°

Stabilité en solution à 1 mg/ml dans tampon borate pH 7.9.

Expériences poursuivies jusqu'à un pourcentage d'inactivation de 50 environ.

Activité protéolytique mesurée sur la sérumalbumine dénaturée et sur la caséine.

$$K = \frac{2.3}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C}$$

Métal	Concentration moléculaire	$K \cdot 10^4$
Ca ⁺⁺	10 ⁻⁴	10
	10 ⁻²	14
Mg ⁺⁺	10 ⁻⁴	11
	10 ⁻²	16
Mn ⁺⁺	10 ⁻⁴	9.4
	10 ⁻²	15
Co ⁺⁺	10 ⁻⁴	11
	10 ⁻⁵	11
Zn ^{++*}	2·10 ⁻⁵	8.4
	10 ⁻⁴	2
	2·10 ⁻⁴	0.08
Tampon seul		8

* La concentration de Zn⁺⁺ pendant la protéolyse ne dépasse jamais 10⁻⁴ M.

Nous avons constaté aussi que la présence de Zn⁺⁺ augmente la fraction de plasmine insoluble aux dépens de la partie soluble sans toucher sensiblement à l'activité de l'ensemble, comme on peut le constater si on centrifuge après addition de Zn⁺⁺ (Tableau III) (précipitation de la plasmine par Zn⁺⁺).

TABLEAU II
INFLUENCE DE Zn^{++} SUR L'ACTIVITÉ DE LA PLASMINE

Plasmine, fraction III-3 totale (soluble et insoluble).
Activité protéolytique mesurée sur la caséine.

<i>Concentration de Zn^{++} pendant la protéolyse</i>	<i>Activité</i>
0	100
$10^{-6} M$	100
$10^{-5} M$	100
$10^{-4} M$	100
$1.7 \cdot 10^{-4} M$	100
$2 \cdot 10^{-4} M$	95
$0.7 \cdot 10^{-3} M$	76
$1.7 \cdot 10^{-3} M$	48

TABLEAU III
PRÉCIPITATION DE LA PLASMINE PAR Zn^{++}

Plasmine: fraction III-3 totale (soluble et insoluble).
Activité protéolytique mesurée sur la caséine.

<i>Concentration de Zn^{++} avant la centrifugation*</i>	<i>Activité</i>		
	<i>Sans centrifugation</i>	<i>Après centrifugation</i>	
	<i>Surnageant</i>	<i>Culot</i>	
0	100	78	18
$10^{-6} M$	100	78	18
$10^{-5} M$	98	78	18
$10^{-4} M$	100	52	35
$2 \cdot 10^{-4} M$	97	21	62
$10^{-3} M$	100	0	81

* L'expérience a été faite de façon telle qu'au moment de la protéolyse, la concentration de Zn^{++} se trouve convenablement diluée (inférieure à $1.7 \cdot 10^{-4} M$) pour demeurer sans effet sur l'activité enzymatique.

Les deux phénomènes d'inactivation et de précipitation provoqués par le Zn^{++} ne dépendent pas l'un de l'autre. L'inactivation est complètement réversible, tandis que la précipitation ne l'est pas. Si on diminue par une dilution convenable la concentration de Zn^{++} , ou si on ajoute une quantité stoechiométrique d'acide éthylénediaminetétracétique (Complexone), on retrouve toute l'activité, mais elle est partagée entre une partie soluble et une partie qui demeure insoluble. En ce qui concerne les rapports entre protection et précipitation, nous avons observé que les résultats obtenus en présence de Zn^{++} (Tableau I) sont les mêmes, qu'on suive l'inactivation de la plasmine totale (soluble + insoluble), ou celle de la fraction soluble restée dans le surnageant après séparation par centrifugation de la partie précipitée par Zn^{++} .

L'étude détaillée et la signification des faits précédents, feront l'objet d'un prochain mémoire, dans ce même journal.

Nous remercions Dr J. T. EDSALL (Harvard University, Boston), Mr. G. MOCQUOT (Institut des Recherches Agronomiques, Paris) et les Etablissements Lederle auxquels nous devons une partie des substances utilisées ici.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. L. ONCLEY, M. MELIN, D. A. RICHERT, J. W. CAMERON ET P. M. GROSS Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 541.
- ² L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- ³ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.

Reçu le 4 août 1952