

LES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES DE *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*INFLUENCE DE LA COMPLEXONE III* ET DU CALCIUM SUR
LA STABILITÉ DE DEUX DE CES ENZYMES

par

R. MONIER, G. LITWACK**, M. SOMLO ET B. LABOUESSE

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

Clostridium histolyticum se signale par l'abondance et l'activité des enzymes protéolytiques qu'il libère dans ses milieux de culture. Parmi ces enzymes, ont été identifiés, dans diverses conditions, une collagénase, une protéase activée par la cystéine et capable d'hydrolyser la liaison amide ou ester de dérivés de la L-arginine ou de la L-lysine, une protéase inhibée par la cystéine et deux peptidases, agissant respectivement sur le L-leucyl-glycocolle et sur le L-leucyl-glycyl-glycocolle¹⁻⁵.

Dans le présent travail, nous montrons notamment qu'à côté de la collagénase et des deux protéases indiquées ci-dessus, il existe une troisième protéase. En outre, nous étudions quelques propriétés de ces enzymes protéolytiques et plus particulièrement l'action de la complexone III et du calcium sur leur stabilité.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Conditions de production des enzymes

Une souche de *Cl. histolyticum*, provenant des collections de l'Institut Pasteur, Paris, est cultivée sur le milieu suivant: peptone de viande*** 60 g; Na₂HPO₄, 12H₂O 22.4 g; KH₂PO₄ 1.92 g; FeSO₄, 7H₂O 0.600 g; MgSO₄, 7H₂O 0.049 g; MnCl₂, 4H₂O 0.0019 g pour 1 litre. Le pH de ce milieu est ajusté avant stérilisation à 7.4 avec NaOH. Les cultures sont effectuées en anaérobiose. Le milieu est ensemencé à partir de cultures en voie de croissance sur le même milieu, moins de 40 heures après la stérilisation. Le rendement en enzymes protéolytiques est sensiblement plus élevé à 26° qu'à 37°. A la fin de la phase logarithmique de croissance, les milieux sont rapidement centrifugés à —2°. Le surnageant (pH 6.9–7.10) est dialysé contre deux fois 100 volumes de tampon borate, pH 7.4 renfermant CaCl₂ 10⁻³ M, pendant au moins 40 heures à 4°. Dans les préparations brutes ainsi obtenues, à 0° en présence de toluène, les différentes activités protéolytiques se conservent au moins deux mois; l'activité collagénasique par contre subit une diminution déjà sensible après deux semaines environ.

2. Dosage des activités protéolytique et collagénasique

L'activité protéolytique est déterminée soit par la méthode d'ANSON⁶, en utilisant comme substrat la caséine, soit par la méthode de coagulation d'un "lait" synthétique, selon la technique de GORINI ET LANZAVECCHIA⁷. Les protéolyses et les coagulations sont effectuées dans un thermostat à 35°. Dans le premier cas, les activités enzymatiques sont exprimées en millimicromolécules de

* Sel de sodium de l'acide éthylène diamine tétraacétique; A.G. vorm. B. Siegfried, Zofingen (Suisse).

** Fellow of the National Foundation for Infantile Paralysis. Adresse Actuelle: Department of Biochemistry, College of Agriculture, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

*** UCLAF, Romainville, Seine.

tyrosine/min. Dans le second cas, elles sont traduites soit à l'aide de l'expression $1/T \cdot 10^3$, dans laquelle T désigne le temps de coagulation en secondes et qui est en première approximation directement proportionnelle à l'activité, soit à l'aide d'unités arbitrairement définies (à pH 6.4 et à pH 8.4, on convient qu'une solution d'enzyme qui coagule le lait en 1,000 secondes dans les conditions expérimentales employées⁷, renferme 0.1 unités par ml; à pH 7.4, en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$, 0.1 unités par ml correspondent à un temps de coagulation de 500 secondes). Remarquons qu'à pH 6.4 et pH 8.4 la proportionnalité entre $1/T$ et la concentration en enzyme est observée jusqu'à des dilutions importantes (T au moins égal à 4,000 secondes), tandis qu'à pH 7.4, en présence de cystéine, cette proportionnalité n'est réelle que dans un domaine de dilution plus restreint, le dosage n'étant significatif que pour $T \leq 500$ secondes.

L'activité collagénasique est dosée sur du collagène préparé à partir de fragments de tendons de queues de rat par la technique d'EINBINDER ET SCHUBERT⁸, en suspension dans du tampon borate, pH 7.4, CaCl_2 $10^{-3} M$, en déterminant la quantité d'azote total passant en solution. Le dosage de l'azote est effectué par la méthode de LUBCHINSKY ET ZALTA⁹. 1 unité d'activité collagénasique correspond à la mise en solution de 160 micromolécules d'azote par heure à partir de 20 mg de collagène en suspension dans un volume total de 2 ml.

3. Détection des activités sur différents substrats synthétiques

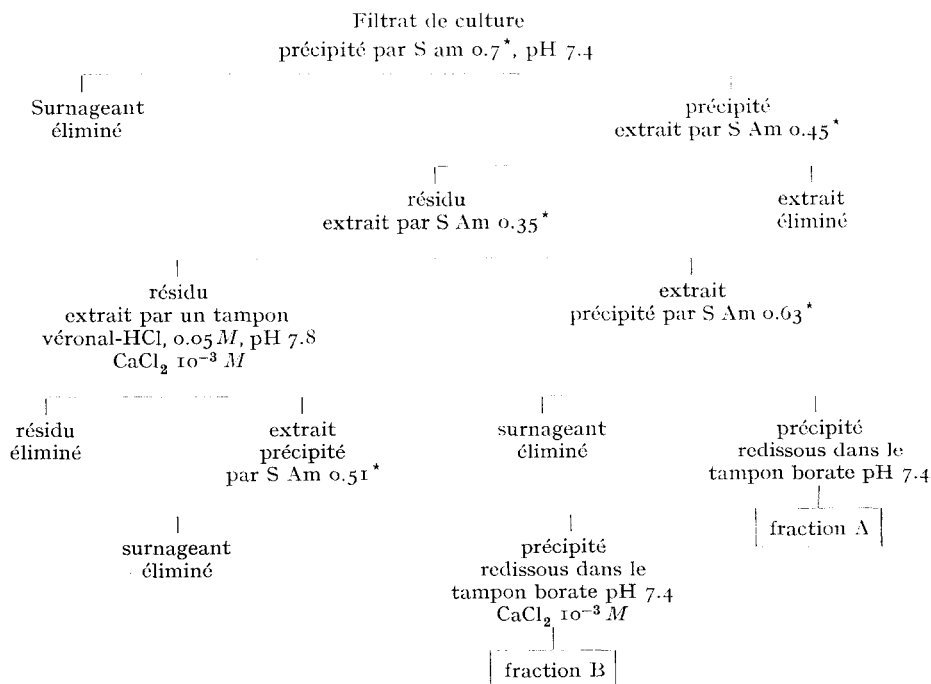
L'activité des peptidases a été recherchée sur le L-leucyl-glycocolle et le L-leucyl-glycyl-glycocolle, en solutions $10^{-2} M$ dans le tampon borate, pH 7.4. Dans le cas du premier peptide, on ajoute CoCl_2 $10^{-3} M$ ⁵. L'hydrolyse éventuelle des substrats est suivie à l'aide de la chromatographie semi-quantitative sur papier (solvant: *n*-butanol/acide formique/eau; 75/15/10).

L'activité sur benzoyl-L-arginine amide est déterminée en tampon borate, pH 7.4 (concentration en substrat: $5 \cdot 10^{-3} M$) en dosant l'ammoniaque libérée au réactif de Nessler après microdiffusion en cellule de CONWAY¹⁰.

4. Purification partielle des enzymes

Il est possible de fractionner grossièrement et de purifier partiellement les enzymes protéolytiques, selon le schéma indiqué, à l'aide de sulfate d'ammonium.

Schéma de purification partielle des enzymes



* S Am 0.7 = Sulfate d'ammonium à 70% de saturation, S Am 0.45 = Sulfate d'ammonium à 45% de saturation, etc.

Les précipitations, les extractions et les centrifugations sont conduites à une température comprise entre -3 et -5° . On obtient finalement deux fractions A et B qui renferment l'essentiel des activités protéolytiques des filtrats de culture initiaux partiellement séparées les unes des autres (voir Tableau VIII).

RÉSULTATS

1. Action de concentrations croissantes de cystéine sur l'activité coagulante et l'activité protéolytique et sur l'hydrolyse de la benzoyl-L-arginine amide dans une préparation brute.

Les courbes de la Fig. 1 traduisent, en pour cent des activités initialement trouvées dans une préparation brute à pH 7.4, la variation de l'activité coagulante et de l'activité protéolytique en fonction de la concentration en L-cystéine. La L-cystéine, en solution dans le tampon borate à pH 7.4, est ajoutée à l'enzyme 1 minute avant le début des déterminations. Les concentrations indiquées sont les concentrations présentes dans le milieu réactionnel pendant les protéolyses ou les coagulations.

L'activité coagulante et l'activité protéolytique passent chacune par un minimum pour une concentration en cystéine égale à $2.5 \cdot 10^{-3} M$. Les préparations brutes contiennent donc au moins deux groupes d'enzymes, les uns inhibés et les autres activés par la cystéine, ainsi que l'avaient déjà montré VAN HEYNINGEN¹¹ et TYTELL ET HEWSON³. Il importe de souligner le parallélisme étroit entre les variations de l'activité coagulante et celles de l'activité protéolytique. Ce parallélisme suggère que les différents enzymes, actifs dans la protéolyse, le sont également dans la coagulation et que les deux méthodes de dosage permettent la détection des mêmes enzymes.

L'eau oxygénée et l'iodacétamide, qui inhibent l'activité mesurée après addition de cystéine, sont, dans les mêmes conditions expérimentales, dépourvues d'action sur l'activité observée en l'absence de cystéine.

TABLEAU I

ACTION DE L'EAU OXYGÉNÉE ET DE L'IODACÉTAMIDE SUR LES ACTIVITÉS COAGULANTES D'UNE PRÉPARATION BRUTE

	pH 6.4 (unités/ml)	pH 8.4 (unités/ml)	pH 7.4 en présence de Cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$ (unités/ml)
Témoin	0.51	0.39	0.21
H ₂ O ₂ 0.1 % *	0.50	0.40	0.0
Témoin	0.74	0.52	0.25
Iodacétamide $10^{-3} M$ *	0.80	0.53	0.10

* H₂O₂ et iodacétamide sont ajoutés aux échantillons d'enzyme une minute avant dosage.

Bibliographie p. 82.

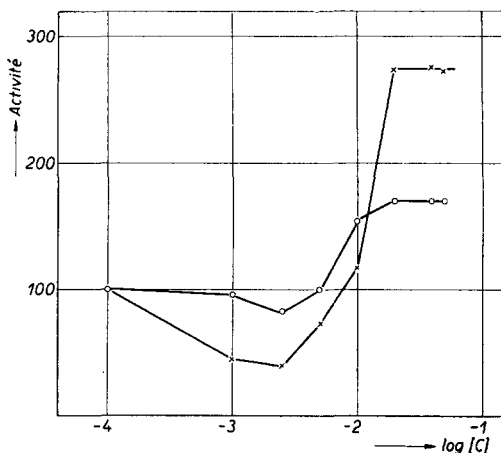


Fig. 1. Action de concentrations croissantes de L-cystéine sur les activités coagulante et protéolytique d'une préparation brute à pH 7.4. En abscisses, $\log (C)$ = logarithme de la concentration moléculaire en L-cystéine. En ordonnées, activité = activité en pour cent de l'activité en l'absence de L-cystéine. ○—○ = activité coagulante; ×—× = activité protéolytique.

En outre, l'activité sur la benzoyl-L-arginine amide, très marquée en présence de cystéine, est très faible en son absence. Par conséquent, dans les conditions employées ici, le ou les enzymes activables par la cystéine, sont pratiquement inactifs en son absence et les activités mesurées en l'absence de cystéine sont presque exclusivement dues aux enzymes non activés par la cystéine.

TABLEAU II
ACTIVITÉ SUR BENZOYL-L-ARGININE AMIDE D'UNE PRÉPARATION BRUTE

Concentration en cystéine (M)	Durée de l'hydrolyse (min)	Substrat hydrolysé (%)
0	240	5
$2 \cdot 10^{-2}$	20	100

2. pH optimum des activités coagulante et protéolytique.

En l'absence de cystéine, l'activité coagulante des préparations brutes, ainsi que celle des préparations purifiées B, présente deux pH optimum vers pH 6.3 et vers pH 8.3 (Fig. 2 et 3). Ceci suggère que *Cl. histolyticum* libre, dans nos conditions de culture, au moins deux enzymes coagulant le lait et non activés par la cystéine. Il n'est pas possible, cependant, de distinguer deux optimums sur la courbe qui traduit l'action du pH sur l'activité protéolytique sur caséine de la préparation brute.

En présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2}$ M, l'activité protéolytique et l'activité coagulante, dans les préparations brutes, présentent chacune un seul optimum, au voisinage de pH 7.4.

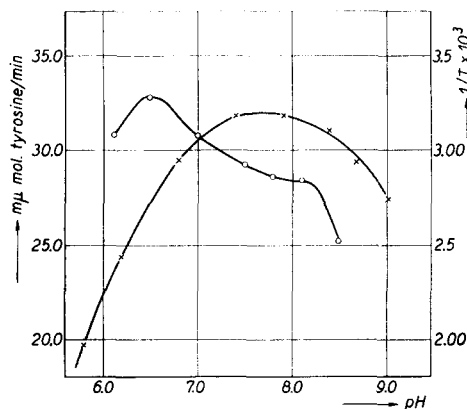


Fig. 2. Variation des activités coagulante et protéolytique (tampon véronal-acétate) d'une préparation brute en fonction du pH. \circ — \circ = activité coagulante; \times — \times = activité protéolytique.

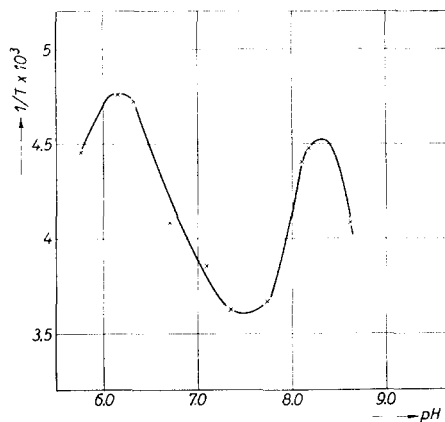


Fig. 3. Variation de l'activité coagulante de la fraction B en fonction du pH.

3. Action de la complexone III sur la stabilité à la chaleur des activités coagulante et protéolytique

Une préparation enzymatique brute en solution dans le tampon borate (pH 7.4) en présence de $\text{CaCl}_2 10^{-3}$ M, est préchauffée 10 minutes à 35° puis additionnée d'une

solution, dans le même tampon, de complexone III à une concentration convenable et incubée à 35°. Les activités coagulantes sur des "laits" à pH 6.4 (activité 6.4) et à pH 8.4 (activité 8.4) en l'absence de cystéine, et sur un lait à pH 7.4, en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$ (activité 7.4) sont mesurées par la technique habituelle après des temps déterminés et comparées aux activités d'une préparation témoin, renfermant les mêmes concentrations initiales d'enzymes, incubée au même pH en l'absence de versène. Les résultats obtenus avec de la complexone III à la concentration $10^{-2} M$ sont représentés par les courbes de la Fig. 4. Ces courbes ont été obtenues en portant en abscisse les temps d'incubation et en ordonnées les valeurs de l'expression $\log C_0/C$, dans laquelle C_0 désigne l'activité coagulante initiale et C , l'activité au temps t , calculées à l'aide des unités arbitrairement définies dans la partie expérimentale. On constate que :

(1) les trois activités 6.4, 8.4 et 7.4 varient très peu, dans les conditions employées, en l'absence de complexone.

(2) l'activité 7.4 est très peu affectée par la présence de complexone $10^{-2} M$.

(3) les activités 6.4 et 8.4 sont au contraire fortement sensibilisées à la dénaturation thermique par la complexone et cela de façon très inégale, l'activité 6.4 étant la plus atteinte.

(4) les courbes qui traduisent les variations des activités 6.4 et 8.4 en présence de complexone ne sont pas des droites.

Le fait que les vitesses d'inactivation des activités 6.4 et 8.4 sont nettement différentes en présence de complexone confirme l'existence, dans nos préparations brutes, de deux enzymes non activés par la cystéine déjà suggérée par la forme des courbes d'activité en fonction du pH. En outre la très faible variation de l'activité 7.4 en présence de complexone, comparée à la baisse très marquée des activités 6.4 et 8.4, démontre que, dans ces mélanges, l'enzyme activé par la cystéine est, au moins en première approximation, seul responsable de l'activité mesurée à pH 7.4 en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$.

Dans le Tableau III sont réunis les résultats d'un essai d'inactivation par la chaleur en présence de complexone d'une préparation brute, essai dans lequel les activités protéolytiques et coagulantes, à pH 6.4 et à pH 8.4, ont été déterminées simultanément. Dans cet essai, on a choisi une concentration en complexone suffisamment faible ($2 \cdot 10^{-3} M$) pour que son action inactivante puisse être supprimée, pendant le temps que durent les protéolyses, par l'addition aux solutions de caséine employées, de la concentration en CaCl_2 ($5 \cdot 10^{-3} M$) maximum compatible avec la stabilité de ces solutions. Dans ces conditions les protéolyses réalisées restent d'ordre zéro.

On voit que, à chaque pH, l'activité protéolytique et l'activité coagulante diminuent exactement dans les mêmes proportions. Par conséquent, les deux enzymes responsables des activités coagulantes 6.4 et 8.4 sont tous les deux capables de protéolyser la caséine.

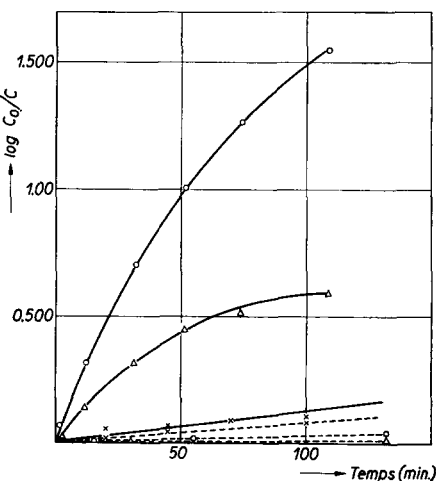


Fig. 4. Action de la complexone III $10^{-2} M$ sur la stabilité, à pH 7.4 et 35° des différentes activités coagulantes dans une préparation brute (—○— = activité 6.4; —△— = activité 8.4; —×— = activité 7.4. Courbes en pointillés = témoins sans complexone. Courbes en traits pleins = en présence de complexone $10^{-2} M$).

TABLEAU III

ACTION DE LA COMPLEXONE III $2 \cdot 10^{-3} M$ SUR LES ACTIVITÉS COAGULANTES ET PROTÉOLYTIQUES D'UNE PRÉPARATION BRUTE V = vitesse initiale de protéolyse, en millimicromolécules de tyrosine par minute.

Durée de l'incubation en présence de complexone III (min)	Activités							
	pH 6.4				pH 8.4			
	Coagulation		Protéolyse		Coagulation		Protéolyse	
	unités/ml	%	V	%	unités/ml	%	V	%
0	0.33	100	19.5	100	0.26	100	20.5	100
200	0.16	48	9.0	46	0.18	70	15.4	75

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié la sensibilisation par la complexone à la dénaturation thermique des activités coagulantes 6.4 et 8.4 dans une préparation purifiée B. Les enzymes de la fraction B ont été dissous dans le tampon borate à pH 7.4 en présence de $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-3} M$, la dilution étant calculée de façon à obtenir des activités coagulantes comparables à celles que l'on trouve dans les préparations brutes. La concentration en complexone a été réduite à $10^{-3} M$, une concentration plus élevée donnant ces conditions une vitesse d'inactivation trop grande pour être aisément mesurable. Les résultats obtenus sont représentés dans la Fig. 5.

On voit que :

(1) la stabilité à la chaleur en l'absence de complexone des activités 6.4 et 8.4 est beaucoup moindre dans les préparations purifiées que dans les préparations brutes, ce qui n'est pas pour surprendre.

(2) les courbes obtenues sont des droites et les réactions de dénaturation des deux activités dans ces conditions sont donc du premier ordre, ce qui permet de calculer des constantes de vitesse. Ces constantes sont respectivement égales, pour les activités 6.4 et 8.4, à $9.2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et $6.9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

L'existence de deux enzymes différents dans les préparations purifiées B se trouve donc confirmée.

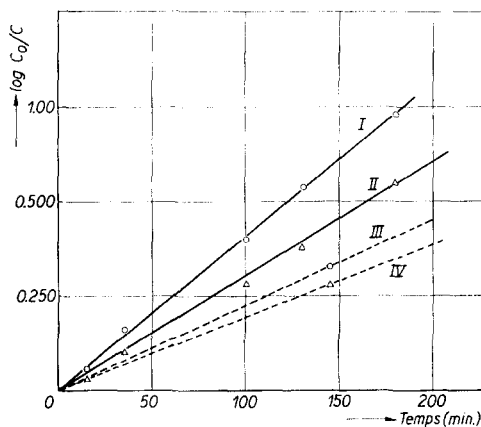


Fig. 5. Action de la complexone III $10^{-3} M$ sur la stabilité, à pH 7.4 et 35° , des activités coagulantes 6.4 et 8.4 dans une préparation purifiée (—○— = activité 6.4; —△— = activité 8.4; courbes en pointillés = préparation témoin; courbes en traits pleins = en présence de versene $10^{-3} M$). La constante k indiquée pour chaque droite est déterminée d'après la formule: $k = 2.303/t \times \log C_0/C$. I. $k = 9.2 \cdot 10^{-3}$; II. $k = 6.9 \cdot 10^{-3}$; III. $k = 5.1 \cdot 10^{-3}$; IV. $k = 4.6 \cdot 10^{-3}$.

4. Rôle du calcium dans la protection des activités coagulantes 6.4 et 8.4.

Le Tableau IV donne les activités coagulantes à pH 6.4 et à pH 8.4 dans des préparations dialysées à 4° contre des solutions de tampon borate pH 7.4, additionnées ou non de $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-3} M$ (l'accroissement de la concentration en ions Cl^- provoquée par l'addition de CaCl_2 est négligeable du fait de la concentration en NaCl présente dans le

tampon initial). La première partie du tableau se rapporte à des fractions aliquotes d'un filtrat de culture frais, dialysées à 4° pendant 40 heures contre deux fois 100 volumes de solutions de borate. La deuxième partie de rapporte à des fractions aliquotes d'une préparation purifiée B, renfermant CaCl_2 10^{-2} M, dialysées dans des conditions analogues. Dans les deux cas, les activités récupérées sont plus élevées après dialyse contre la solution tampon renfermant du calcium. Il semble donc que les ions calcium accroissent la stabilité des activités 6.4 et 8.4 pendant les dialyses à 4°. Le phénomène mis en évidence ne peut être interprété comme un phénomène d'activation, puisque toutes les déterminations d'activité coagulante sont effectuées à l'aide de "laits" renfermant une concentration en ions Ca^{+2} supérieure à celle présente dans les différents échantillons d'enzymes.

TABLEAU IV
PROTECTION PAR LE CALCIUM DES ACTIVITÉS COAGULANTES À pH 6.4 ET
À pH 8.4 PENDANT LES DIALYSES
1. Filtrat de culture brut

Concentration en CaCl_2 (M)	Activité coagulante	
	pH 6.4 (unités/ml)	pH 8.4 (unités/ml)
0	0.28	0.16
10^{-3}	0.35	0.21

2. Préparation purifiée				
Concentration en CaCl_2 (M)	pH 6.4		pH 8.4	
	unités/ml	pour cent de l'activité avant dialyse	unités/ml	pour cent de l'activité avant dialyse
0	0.24	35	0.22	43
10^{-3}	0.44	64	0.40	78

Dans le Tableau V sont indiquées les activités à 6.4 et 8.4 de fractions aliquotes d'un filtrat de culture frais, chaque fraction ayant été dialysée contre des solutions de borate, pH 7.4, renfermant, à la concentration 10^{-3} , les sels indiqués dans la première colonne du tableau. Les activités sont exprimées en pour cent des activités d'une préparation témoin, dialysée contre du borate non additionné de sels. On voit que le magnésium et le baryum peuvent, dans une certaine mesure, remplacer le calcium dans la protection de l'activité 6.4. Au contraire, la protection par le calcium de l'activité 8.4, paraît beaucoup plus spécifique. La substitution du manganèse au calcium entraîne une perte d'activité surtout dans le cas de l'activité 8.4.

Dans une deuxième série d'expériences, des fractions aliquotes d'une préparation brute, dialysées pendant 40 heures à 4° contre du tampon borate non additionné de calcium, ont été incubées à 35° en présence de quantités variables de CaCl_2 et leurs activités 6.4, 8.4 et 7.4 mesurées après des temps déterminés. Les résultats obtenus pour l'activité 6.4 sont représentés par les courbes de la Fig. 6; on voit que ces courbes ne sont pas des droites. Au contraire, les courbes se rapportant à l'activité 8.4 peuvent être assimilées à des droites et les constantes de vitesse correspondantes sont indiquées dans le Tableau VI.

Bibliographie p. 82.

TABLEAU V
RÉCUPÉRATION DES ACTIVITÉS COAGULANTES À pH 6.4 ET À pH 8.4
APRÈS DIALYSE EN PRÉSENCE DE QUELQUES CATIONS

Sel ajouté au tampon	Activité coagulante*	
	pH 6.4	pH 8.4
CaCl ₂	125	131
MgCl ₂	120	101
BaCl ₂	112	101
MnCl ₂	98	75

* en pour cent de l'activité mesurée dans un témoin dialysé contre un tampon non additionné de sel.

TABLEAU VI

DÉNATURATION THERMIQUE À 35° DES
ACTIVITÉS COAGULANTES À pH 6.4 ET À pH 8.4
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CaCl₂

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{C_0}{C}$$

Concentration en CaCl ₂ (M)	$k \times 10^{-3} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	
	pH 6.4	pH 8.4
1. Préparation brute		
0	—	1.4
10 ⁻⁴	—	1.2
10 ⁻³	—	0.7
2. Préparation purifiée		
0	3.8	4.1
10 ⁻³	2.5	2.7
10 ⁻²	2.6	2.7

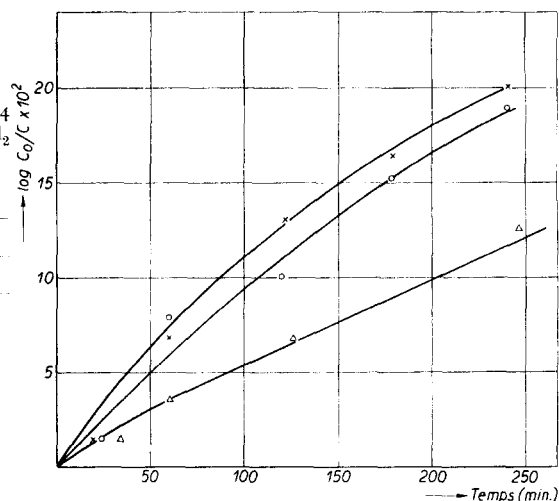


Fig. 6. Action du CaCl₂ sur la stabilité, à pH 7.4 et 35°, de l'activité 6.4 dans une préparation brute. (—×—: CaCl₂ = 0; —○—: CaCl₂ = 10⁻⁴ M; —△—: CaCl₂ = 10⁻³ M).

La stabilité de l'activité mesurée à pH 7.4 en présence de cystéine dans les préparations brutes n'est pratiquement pas influencée par la concentration en calcium.

Dans un essai semblable, réalisé à l'aide d'une préparation purifiée B dissoute dans un tampon borate sans calcium, les courbes obtenues sont toutes assimilables à des droites. Les constantes de vitesse de dénaturation calculées sont indiquées dans le Tableau VI. On voit que la stabilité à 35° des activités 6.4 et 8.4 est accrue par la présence de calcium dans des proportions semblables dans les préparations brutes et dans les préparations purifiées. Une concentration en CaCl₂ égale à 10⁻³ M est suffisante pour obtenir l'effet protecteur maximum.

5. Action de quelques métaux sur les activités 6.4 et 8.4

A des fractions aliquotes d'une préparation brute renfermant CaCl₂ 10⁻³ M, on ajoute, en solution dans du borate pH 7.4, les sels suivants, à la concentration 10⁻³ M: CdSO₄; NiCl₂; CoCl₂; MnCl₂; Zn(CH₃COO)₂; FeSO₄, (NH₄)₂SO₄. Après une heure à 0°, on détermine les activités 6.4 et 8.4 et on les compare aux activités d'une préparation

témoin. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau VII. Tous les métaux utilisés exercent une action inhibitrice plus ou moins marquée: les plus fortes inhibitions sont obtenues en présence de Cd^{+2} et de Ni^{+2} . L'activité 8.4 est, en règle générale, plus sensible que l'activité 6.4.

TABLEAU VII
ACTION DE QUELQUES MÉTAUX SUR LES ACTIVITÉS COAGULANTES À pH 6.4 ET À pH 8.4

Métal	Activité coagulante*	
	pH 6.4	pH 8.4
Cd	39.3	18.1
Ni	58.2	61.5
Co	98.5	93.5
Mn	94.0	95.0
Zn	95.0	73.5
Fe	94.0	89.0

* en pour cent de l'activité mesurée dans un témoin.

6. *Activité collagénasique et répartition des différentes activités coagulantes entre les fractions A et B.*

Les préparations enzymatiques brutes présentent une activité collagénasique nette: 20 mg de collagène natif, en suspension dans 1 ml de tampon borate, pH 7.4 sont entièrement dissous à 35°, une heure après addition d'1 ml de la préparation brute.

En étudiant la répartition des différentes activités entre les fractions partiellement purifiées A et B (Tableau VIII) on constate que:

(1) la fraction A présente une très forte activité coagulante à pH 7.4, en présence de cystéine, tandis que les activités 6.4 et 8.4 y sont très faibles.

(2) la fraction B est caractérisée par une situation inverse.

(3) l'activité collagénasique se répartit à peu près également entre les fractions A et B et indépendamment des autres activités.

TABLEAU VIII
RÉPARTITION DES ACTIVITÉS AU COURS D'UNE PURIFICATION PARTIELLE

	Activités coagulantes						Activité collagénasique	
	pH 6.4		pH 8.4		pH 7.4 en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-3}$ M			
	unités	%	unités	%	unités	%	unités	%
Filtrat initial	165	100	81	100	300	100	250	100
Fraction A	3.8	2.5	2.8	3.5	171	57	78	31
Fraction B	160	97	100	124	7	2.3	50	20

7. *Activité sur différents substrats*

Nous avons, en premier, lieu cherché à déceler dans nos préparations la présence des peptidases signalées par DE BELLIS et collaborateurs⁵. Ni les préparations brutes, ni les fractions purifiées ne présentent d'activité appréciable sur le peptide L-leucylglycocolle en présence de CoCl_2 10^{-3} M ou sur le peptide L-leucylglycylglycocolle.

Bibliographie p. 82.

TABLEAU IX

QUELQUES PROPRIÉTÉS DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES ENOCYLLAIRES DE *Cl. histolyticum*

	Activation par la cystéine	Protection par le calcium	Activité protéolytique sur caséine (Méthode d'ASSON)	Activité coagulante (Méthode de GORINI)	pH optimum de l'activité coagulante	Activité sur collagène	Activité sur benzoyl-L-arginine amide
Protéase I	inhibée	+	+	+	6.3	o	nulle ou très faible
Protéase II	inhibée	+	+	+	8.3	o	nulle ou très faible
Protéase III	activée	o	+	+	7.4	o	
Collagénase	inhibée	?	o	o			o

+ = protection ou activité nette; o = aucune protection ou aucune activité; ? = non déterminé.

Les préparations brutes sont également dépourvues d'activité, en l'absence de cystéine, sur la carbobenzoxy-glycyl-L-proline ou la carbobenzoxy-glycyl-L-proline amide. Au cours de leur action sur diverses protéines (gélatine, lysozyme, insuline) elles ne libèrent pas, d'autre part, de peptides terminés du côté aminé par des résidus proline ou hydroxyproline, qui seraient aisément décelables, après chromatographie sur papier, par la réaction colorée à l'isatine¹².

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer suggère l'existence dans les filtrats de culture de la souche de *Cl. histolyticum* étudiée de quatre enzymes protéolytiques, dont les propriétés essentielles sont résumées dans le Tableau IX et qui sont les suivants:

(1) Deux enzymes inactivés par la cystéine (protéase I et protéase II du Tableau IX), que l'on peut distinguer par les pH optimums de leurs activités coagulantes, respectivement situés vers pH 6.3 et vers pH 8.3, et par leurs vitesses d'inactivation à 35° en présence de complexone III. L'un de ces deux enzymes semble être identique à la protéase inactivée par la cystéine déjà décrite par DE BELLIS et coll.⁵. Nos résultats montrent que ces enzymes sont actifs à la fois dans la coagulation du "lait" et dans la protéolyse de la caséine. Ils sont protégés, contre l'inactivation au cours des dialyses à 4° et contre l'inactivation par la chaleur à 35°, par le calcium. Ce résultat est à rapprocher des observations de GORINI¹³ sur la stabilisation par ce métal de plusieurs protéases bactériennes. Dans les préparations brutes, ces enzymes sont en outre protégés par d'autres constituants du milieu. L'ordre des réactions d'inactivation, généralement différent de 1 dans les préparations brutes, mais dans tous les cas égal à 1 dans les préparations purifiées, permet de supposer que ces constituants protecteurs sont des protéines, elles-mêmes sujettes à une dénaturation thermique, et que la purification élimine en tout ou en partie. Il n'est pas possible de décider, sur la base des résultats décrits, si l'accélération par la complexone III des dénaturations thermiques est seulement liée au fait que ce corps complexe énergiquement le calcium et les autres métaux divalents, ou si elle est due, en partie au moins, à une action directe sur les enzymes.

(2) L'enzyme activé par la cystéine (protéase III du Tableau IX) déjà décrit par plusieurs auteurs^{3,4,5}. Cet enzyme est capable d'hydrolyser la caséine, la benzoyl-L-arginine amide et de coaguler le "lait". Le pH optimum trouvé ici pour son activité

coagulante est à peu près le même que celui indiqué par OGLE ET TYTELL⁴ pour l'activité sur benzoyl-L-arginine amide. Sa stabilité à 35° n'est affectée ni par la présence de complexone III, ni par la présence de calcium.

(3) La collagénase. La répartition des différentes activités au cours des fractionnements montre que l'activité collagénasique ne peut être attribuée à aucun des trois enzymes précédents. Il semble en outre que la collagénase n'intervienne pas dans la coagulation du "lait". Cette observation est à rapprocher de celles de BIDWELL ET VAN HEYNINGEN¹⁴ et de DE BELLIS ET COLLABORATEURS⁵, qui ont montré que la collagénase est dépourvue d'action protéolytique, mesurable par les techniques classiques, sur toute une série de protéines. KOCHOTALY ET KREJCI¹⁵, ayant observé au cours de l'action des enzymes exocellulaires de *Cl. histolyticum* sur diverses protéines, une libération de groupes carboxyliques supérieure à celle des groupes aminés, ont formulé l'hypothèse que l'un au moins des enzymes présents dans leurs préparations rompraient avec une certaine spécificité des liaisons peptide auxquelles des résidus proline participent par leurs groupes iminés. Etant donné, d'une part, la fréquence des résidus proline et hydroxyproline dans le collagène et dans la gélatine, et d'autre part, la spécificité que la collagénase présente pour ces protéines, on pouvait se demander si cette spécificité n'était pas liée à une sensibilité particulière à l'action de la collagénase des liaisons proline. Nos résultats permettent d'exclure cette hypothèse puisque des préparations brutes, qui présentent une activité collagénasique marquée, sont sans action sur ces liaisons, aussi bien dans des protéines que dans des substrats synthétiques.

Les conclusions exposées ne sont pas entièrement en accord avec celles de DE BELLIS, MANDL, McLENNAN ET HOWES⁵. En effet, ces auteurs ont trouvé, outre la collagénase et l'enzyme activé par la cystéine, une seule protéase, alors que nous en trouvons deux. D'autre part, ces auteurs signalent l'existence de deux peptidases que nous ne retrouvons pas dans nos préparations. Ces différences sont probablement dues soit à la nature de la souche de *Cl. histolyticum* employée, soit aux conditions de culture. Il n'est pas impossible que la présence de peptidases, considérées généralement comme endocellulaires, dans les filtrats de culture étudiés par DE BELLIS ET COLLABORATEURS soit le résultat d'un début d'autolyse, que nos propres conditions expérimentales excluent.

Nous sommes heureux de remercier ici le Docteur PRÉVOT, qui nous a fourni la souche de *Cl. histolyticum* utilisée, et Mr. BRICAS, qui a mis à notre disposition les différents substrats synthétiques étudiés.

RÉSUMÉ

Les enzymes protéolytiques exocellulaires de *Clostridium histolyticum* ont été étudiés, en utilisant en particulier la technique de coagulation d'un "lait" synthétique de GORINI. Les filtrats de culture de la souche utilisée renferment, outre la collagénase et les deux protéases déjà décrites par d'autres auteurs, une seconde protéase inhibée par la cystéine. Les deux protéases inhibées par la cystéine se distinguent par les pH optimum de leurs activités coagulantes et par leurs vitesses de dénaturation à 35° en présence de complexone III. Ces deux protéases sont protégées par le calcium contre la dénaturation thermique et contre la dénaturation pendant les dialyses à 4°. Quelques aspects du mode d'action de la collagénase sont discutés.

SUMMARY

Extracellular proteolytic enzymes of *Clostridium histolyticum* were studied, particularly by means of the synthetic "milk" curdling method of GORINI. Culture filtrates of the strain used contain, *Bibliographie p. 82.*

besides the collagenase and the two proteases previously described by other investigators, a second cysteine-inhibited protease. The two cysteine-inhibited proteases can be distinguished by their pH-activity curves ("milk" curdling) and by their denaturation rates at 35° C in presence of complexon III. These two proteases are protected by calcium against thermal denaturation and denaturation during dialysis at 4° C. Some aspects of collagenase activity are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die exozellulären proteolytischen Enzyme von *Clostridium histolyticum* wurden untersucht: die Autoren bedienten sich bei diesem Studium besonders der von GORINI eingeführten Technik der Gerinnung von künstlicher "Milch". Ausser der Kollagenase und der beiden, durch andere Autoren bereits beschriebenen Proteasen, enthalten Nährlösungsfiltrate des benützten Stammes eine zweite, durch Cystein gehemmte Protease. Die beiden, durch Cystein gehemmten Proteasen unterscheiden sich durch die optimalen pH-Werte ihrer Gerinnungsaktivität, sowie durch ihre, bei 35° C und in Gegenwart von Komplexon III, festgestellte Denaturierungskinetik. Kalziumionen schützen beide Proteasen gegen Denaturierung durch Hitze und gegen Denaturierung während bei 4° C durchgeführten Dialysen. Es werden einige Betrachtungen über die Aktivität der Kollagenase angestellt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. H. T. ROBB-SMITH, *Nature and Structure of Collagen, Discussion by Colloid. and Biophys. Comm. Faraday Soc., King's Coll. London*, Mar. (1953) 6-13.
- ² J. C. MACLENNAN, *Trans. New York Acad. Sci.*, ser. II, vol. 16 (1953) 14.
- ³ A. A. TYTELL ET K. HEWSON, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 74 (1940) 555.
- ⁴ J. D. OGLE ET A. A. TYTELL, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 42 (1953) 327.
- ⁵ R. DE BELLIS, I. MANDL, J. D. MACLENNAN ET E. L. HOWES, *Nature*, 174 (1954) 1191.
- ⁶ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
- ⁷ L. GORINI ET G. LANZAVECCHIA, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 407.
- ⁸ J. EINBINDER ET M. SCHUBERT, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 335.
- ⁹ B. LUBOCHINSKY ET J. P. ZALTA, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1363.
- ¹⁰ E. J. CONWAY ET A. BYRNE, *Biochem. J.*, 34 (1933) 419.
- ¹¹ W. E. VAN HEYNINGEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1540.
- ¹² W. GRASSMAN ET K. VON ARNIM, *Ann.*, 519 (1938) 192.
- ¹³ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- ¹⁴ E. BIDWELL ET W. E. VAN HEYNINGEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 140.
- ¹⁵ W. KOCHOLATY ET L. E. KREJCI, *Archiv. Biochem.*, 18 (1948) 1.

Reçu le 10 mars 1955