

BBA 65564

PURIFICATION ET PROPRIETES D'UN INHIBITEUR DE LA DESOXYRIBONUCLEASE PANCREATIQUE, EXTRAIT DU SERUM DE RAT

GÉRARD BERGER ET PIERRE MAY

Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse, Villejuif (France)

(Reçu le 26 septembre, 1966)

SUMMARY

Purification and properties of deoxyribonuclease I inhibitor from rat serum

By means of chromatography on DEAE-cellulose and filtration on Sephadex G-200, we obtained deoxyribonuclease I (EC 3.1.4.5) inhibitor preparations from rat serum. The specific activity of these preparations is approx. 200 times that of the original material and their purity had been checked by analytical ultracentrifugation, utilizing the ultraviolet absorption system, and by electrophoresis in starch gel.

This inhibitor exhibits the general properties of proteins. Its sedimentation coefficient at the concentration of 0.1% is $s_{20,w} = 4.6$ S. Its mobility of migration during starch-gel electrophoresis is comparable to that of an α_2 -globulin.

It acts by fixation on the enzyme stoichiometrically, and apparently molecule for molecule. The constant of dissociation of the complex formed is very low ($1.38 \cdot 10^{-10}$ M). The strong affinity of the two compounds can cause a pseudo-irreversible behavior of the inhibitor at certain concentrations. The inhibition is non-competitive after incubation of the enzyme and the inhibitor. The system is in 'mutual depletion' and the results of the kinetic study agree well with the equation of STRAUSS AND GOLDSTEIN established for such a system.

The inhibitor is without action on deoxyribonuclease II (EC 3.1.4.6) and on DNA polymerase (EC 2.7.7.7).

Many of its properties indicate its close similarity to calf spleen inhibitor II extracted by LINDBERG.

INTRODUCTION

Des inhibiteurs de nature protéique de la désoxyribonucléase I ont été trouvés dans des cellules et des liquides biologiques de types variés¹⁻⁷.

Récemment, LINDBERG⁸ a isolé et cristallisé deux de ces inhibiteurs, présents dans la rate de veau.

Pour notre part, nous avons extrait et étudié un inhibiteur sérique de la désoxyribonucléase I chez le rat. La méthode de purification, l'étude des propriétés

physicochimiques et du mécanisme d'action de cet inhibiteur font l'objet du présent article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le sang du rat est recueilli par ponction aortique, le sérum est séparé, centrifugé puis dialysé contre le tampon de départ utilisé pour la chromatographie.

L'estimation des protéines a été effectuée par lecture de l'absorption optique à $280 \text{ m}\mu$, en adoptant comme coefficient d'extinction: $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 11.4$, valeur trouvée pour la désoxyribonucléase I à pH neutre dans le tampon phosphate 0.05 M.

Les mesures d'activité inhibitrice ont été effectuées selon trois méthodes: méthode viscosimétrique déjà décrite⁹, méthode spectrophotométrique de KUNITZ¹⁰ modifiée par LINDBERG⁷ et méthode titrimétrique à pH constant dérivée de celle de THOMAS¹¹.

Les conditions expérimentales employées pour cette dernière méthode sont les suivantes: concentrations en DNA: 1.5 mg/ml, en désoxyribonucléase pancréatique: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en sulfate de magnésium: 0.005 M, en chlorure de sodium: 0.025 M. Le pH est fixé à 7.5 et la vitesse de réaction est mesurée par la quantité de soude délivrée par unité de temps dans le vase de réaction, pour que le pH reste constant, la température étant réglée à 25°. L'appareil utilisé ici est un pH mètre Radiometer TTT 1 C équipé d'une autoburette ABU 1a et d'un enregistreur SBR 2 C.

L'inhibiteur agissant par fixation stoechiométrique sur l'enzyme, comme nous le verrons plus loin, les quantités d'inhibiteur ont été exprimées en quantités équivalentes de désoxyribonucléase inhibée. L'activité spécifique des échantillons est définie comme le nombre de μg de désoxyribonucléase inhibée par μg de protéines.

On utilise: une désoxyribonucléase cristallisée de pancréas de boeuf (Sigma) (désoxyribonucléate oligonucléotido hydrolase, EC 3.1.4.5); un DNA hautement polymérisé de thymus de veau (laboratoires Choay), préparé par une modification de la méthode de KIRBY¹². Son profil de fusion dans 0.15 M NaCl + 0.015 M citrate trisodique donne: $T_m = 87.2^\circ$; hyperchromicité = 44%. Sauf indications contraires, le DNA est utilisé à l'état natif. Dans certaines expériences particulières, on a été amené à dénaturer le DNA en chauffant 10 min à 100° la solution 1.5 mg/ml de DNA, sulfate de magnésium 0.005 M, chlorure de sodium 0.025 M. Après traitement thermique, on a refroidi rapidement cette solution dans un bain d'eau glacée et on a continué l'application de la méthode titrimétrique selon les indications précédentes.

Les électrophorèses en gel d'amidon ont été effectuées selon la méthode de POULIK¹³. Afin de comparer les vitesses de migration, on a fait migrer le front du tampon borate d'une longueur égale (10 cm après la fente) dans toutes les expériences.

Les ultracentrifugations analytiques ont été réalisées au Centre d'Ultracentrifugation du C.N.R.S., dirigé par Madame S. WURMSER et les analyses d'acides aminés, dans le laboratoire de Monsieur R. VENDRELY selon la méthode de SPACKMAN, STEIN ET MOORE²².

On a concentré les solutions de protéines par dialyse contre du polyéthylène glycol 15 000 (Carl Roth).

La recherche de quelques composés glucidiques présents dans les glycoprotéines

du sérum a été effectuée : celle des hexoses, par la méthode à l'orcinol, celle des hexosamines à l'aide du réactif d'Ehrlich et celle des méthyl-pentoses par la cystéine¹⁴.

PURIFICATION DE L'INHIBITEUR SÉRIQUE DE RAT

Chromatographie sur DEAE-cellulose

Cette opération a déjà été décrite¹⁵. Les modifications apportées depuis sont relatives aux quantités: 500 ml de sérum sont introduits sur une colonne de 75 g de DEAE-cellulose. Après lavage des protéines non adsorbées, l'inhibiteur de désoxyribonucléase I fixé sur la colonne est élué avec un tampon de pH décroissant et de force ionique croissante (Fig. 1).

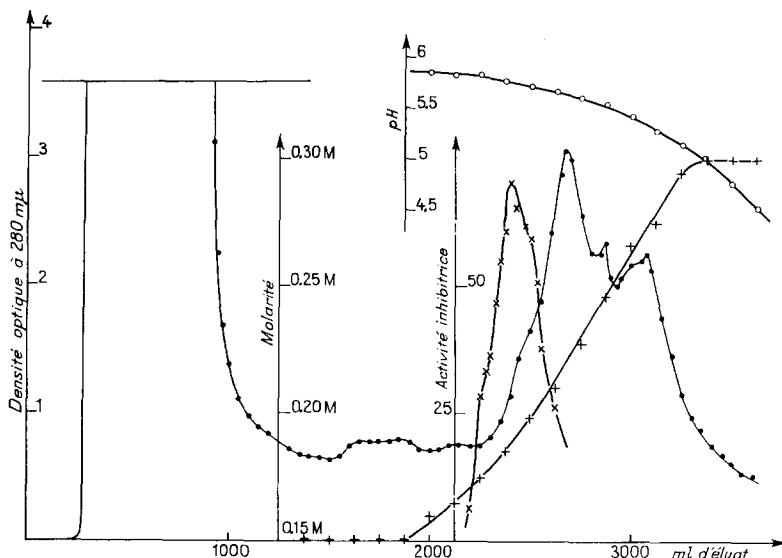


Fig. 1. Chromatographie sur DEAE-cellulose de sérum de rat. L'activité inhibitrice est exprimée en μg de désoxyribonucléase inhibée par ml d'élutat, les mesures étant effectuées selon la méthode viscosimétrique. —·—·—, densité optique à $280 \text{ m}\mu$; +---+, molarité; x—x—x, activité inhibitrice; ○—○, pH.

Le rendement en protéines est quantitatif, l'activité inhibitrice est retrouvée avec un rendement supérieur à 90% et l'activité spécifique est multipliée par 60 environ.

Filtration sur gel de Sephadex G-200

Les fractions obtenues, concentrées à l'aide de polyéthylène glycol et dialysées, sont ensuite passées 3 fois de suite sur une colonne de Sephadex G-200 (réf. 5). L'activité inhibitrice est ainsi séparée d'une fraction importante de protéines (Fig. 2) contenant vraisemblablement de la céroloplasmine, reconnaissable à sa couleur bleutée. Le rendement en activité inhibitrice de la filtration est toujours quantitatif. Pour la suite des opérations, on garde uniquement les fractions d'activité spécifique maximale. On recommence ainsi la filtration deux fois de suite et l'on obtient finale-

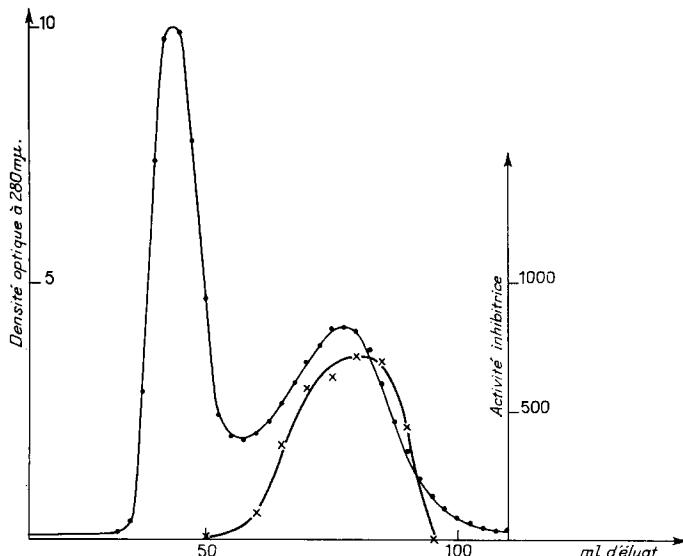


Fig. 2. 1ère filtration moléculaire sur gel de Sephadex G-200. L'activité inhibitrice est exprimée en μg de désoxyribonucléase inhibée par ml d'élutat, les mesures étant effectuées selon la méthode viscosimétrique. —·—·—, densité optique à 280 m μ ; x—x, activité inhibitrice.

ment des fractions dont l'activité spécifique est multipliée de 180-240 fois, selon l'activité du sérum de départ. Le fait d'avoir éliminé, après chaque filtration, les fractions de moindre activité spécifique réduit en fin de compte le rendement effectif en inhibiteur purifié à la valeur de 20% environ.

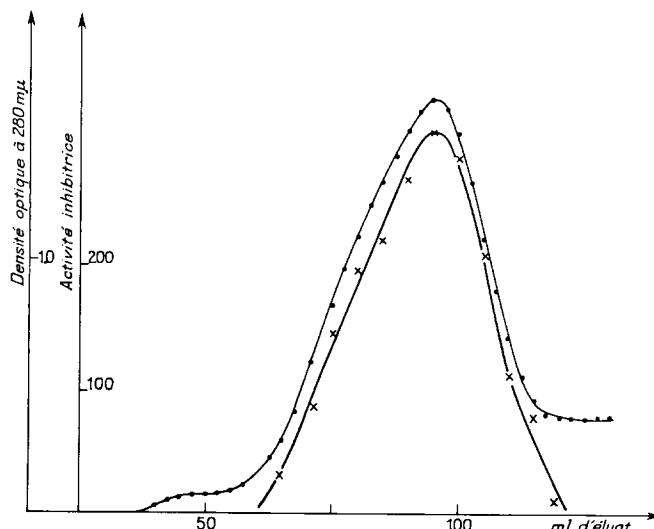


Fig. 3. 3ème filtration moléculaire sur gel de Sephadex G-200. L'activité inhibitrice est exprimée en μg de désoxyribonucléase inhibée par ml d'élutat, les mesures étant effectuées selon la méthode viscosimétrique. —·—·—, densité optique à 280 m μ ; x—x, activité inhibitrice.

Critères de pureté

1er critère: Lors de la 3ème filtration sur gel de Sephadex, l'activité inhibitrice est sensiblement proportionnelle à la concentration en protéines (Fig. 3).

L'activité spécifique est respectivement de 0.21, 0.37, 0.47 µg de désoxyribonucléase inhibée/µg de protéines selon qu'elle est déterminée par les méthodes viscosimétrique, spectrophotométrique ou titrimétrique à pH constant. Nous tenterons d'expliquer plus loin ces différences. Les valeurs obtenues ici sont du même ordre de grandeur que celles données par LINDBERG⁸ pour l'inhibiteur II cristallisé, extrait de la rate de veau.

2ème critère: Les préparations présentent à l'analyse par électrophorèse en gel d'amidon une bande très largement prédominante (bande No. 1, Fig. 4). Cette bande

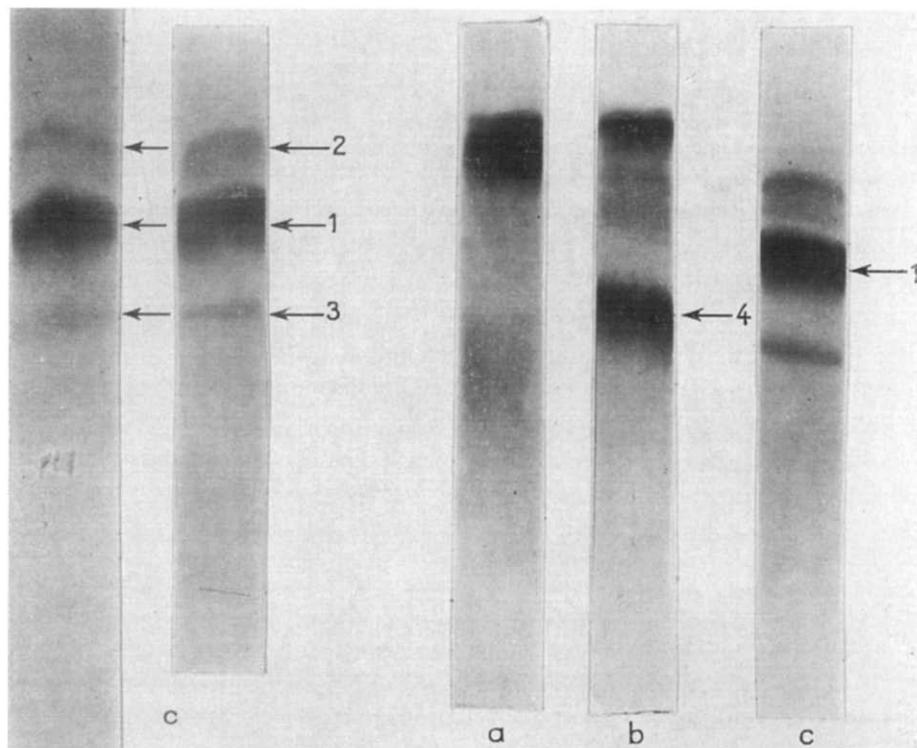


Fig. 4. Electrophorèses en gel d'amidon d'inhibiteur de désoxyribonucléase I. a. Électrophorèse de 1 mg de désoxyribonucléase I. b. Électrophorèse du mélange de 1 mg de désoxyribonucléase I et de 1 mg d'inhibiteur. c. Électrophorèse de 1 mg d'inhibiteur de désoxyribonucléase I (représentée pour 3 préparations différentes).

correspond à l'inhibiteur: en effet, lorsqu'on effectue l'électrophorèse en présence de désoxyribonucléase, la bande No. 1 disparaît, et elle est remplacée par une autre bande (No. 4), de vitesse de migration inférieure; ceci est en faveur de la formation d'un complexe entre le constituant de la bande No. 1 et la désoxyribonucléase. Les bandes No. 2 et 3, de faible intensité, sont probablement des impuretés ou des produits de décomposition de l'inhibiteur.

3ème critère: L'ultracentrifugation analytique effectuée à l'aide d'un dispositif de mesure de l'absorption optique à $280 \text{ m}\mu$ ne décèle qu'un constituant. Par la méthode schlieren, cependant, on note en plus du pic de l'inhibiteur, un pic dû à la présence de polyéthylène glycol, utilisé pour les concentrations des échantillons. Cette substance n'absorbe pas la lumière à $280 \text{ m}\mu$ mais ses solutions ont un indice de réfraction élevé. La présence de polyéthylène glycol dans nos préparations n'influe pas sur les mesures d'absorption optique à $280 \text{ m}\mu$ ni sur les mesures d'inhibition.

PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

L'inhibiteur de désoxyribonucléase I extrait du sérum de rat, comme la plupart des inhibiteurs de cet enzyme déjà décrits, présente les propriétés générales des protéines.

Il est sensible à l'action de la trypsine, non dialysable, sensible à la chaleur, à la dilution, et son maximum de stabilité se situe aux alentours de pH 7. Il est considérablement stabilisé en solution par l'addition de 1% de mercaptoéthanol (*cf. réf. 7*). On peut le congeler et le lyophiliser mais on perd alors jusqu'à 30% de son activité spécifique.

Sa vitesse de migration en électrophorèse en gel d'amidon est comparable à celle d'une α_2 -D globuline, décrite dans le sérum de rat par BOFFA ET FINE¹⁶.

Son coefficient de sédimentation est de 4.6 S à 20°, par rapport à l'eau, et à la concentration de 0.1%.

Nous avons tenté d'évaluer son poids moléculaire (et celui de la désoxyribonucléase I) par la méthode de filtration sur gel de Sephadex G 200, en utilisant les formules de LEACH¹⁷ et les courbes de ANDREWS¹⁸, reliant les volumes d'élution aux poids moléculaires. Les valeurs respectives de 27 000 et 30 000 ont été trouvées par ces deux méthodes pour la désoxyribonucléase I, et celles de 55 000 et 56 500 ont été attribuées à son inhibiteur.

Ces valeurs sont en bon accord avec celles trouvées par LINDBERG⁸, par la méthode d'Archibald, tant pour la désoxyribonucléase I, que pour l'inhibiteur II cristallisé.

D'autre part, 1 μg de notre préparation inhibant complètement 0.47 μg de désoxyribonucléase pancréatique (mesure effectuée par la méthode trimétrique), le complexe enzyme-inhibiteur est vraisemblablement formé d'une molécule de chacun des constituants.

On a obtenu la composition suivante en acides aminés, exprimée en pourcentage du poids de protéines de l'échantillon, mesuré comme plus haut: Asp 9.9; Thr 6.7; Ser 7.0; Glu 12.4; Gly 3.3; Ala 4.7; Val 8.3; Met 3.3; Ile 4.9; Leu 10.6; Tyr 5.5; Phe 6.3; Lys 7.0; His 1.8; Arg 5.2.

Ces résultats apellent les remarques suivantes:

(a) Le tryptophane n'a pas été dosé, la méthode d'analyse employée ne le permettant pas.

(b) La méthode d'hydrolyse utilisée est susceptible de détruire une fraction importante (jusqu'à la moitié) de la cystéine éventuellement présente dans la protéine, ce qui rend impossible une détermination quantitative de cet acide aminé.

Nous signalerons cependant que nous n'avons décelé aucun pic de cystéine sur le chromatogramme.

(c) Nous avons noté la présence de 6% de proline environ. Toutefois cette détermination est approximative car le pic de l'acide glutamique interfère avec celui de la proline.

Enfin, les quantités de composés glucidiques (hexoses, hexosamines, méthylpentoses) présents dans nos préparations, sont faibles et échappent à une détermination précise. L'inhibiteur de désoxyribonucléase I du sérum de rat n'est donc pas une glycoprotéine.

PROPRIÉTÉS ENZYMOLOGIQUES

Fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme de manière non compétitive avec le substrat, dans un système en déplétion mutuelle

(i) Nous avons montré, dans une précédente note⁵ que l'inhibiteur sérique de rat agit par fixation sur la désoxyribonucléase I.

(ii) D'autre part, après incubation avec la désoxyribonucléase, l'inhibiteur se comporte d'une manière non compétitive vis-à-vis du substrat. La Fig. 5 montre en effet que l'inhibition n'est pas diminuée par l'augmentation de la concentration en substrat, dans les limites de concentrations utilisables.

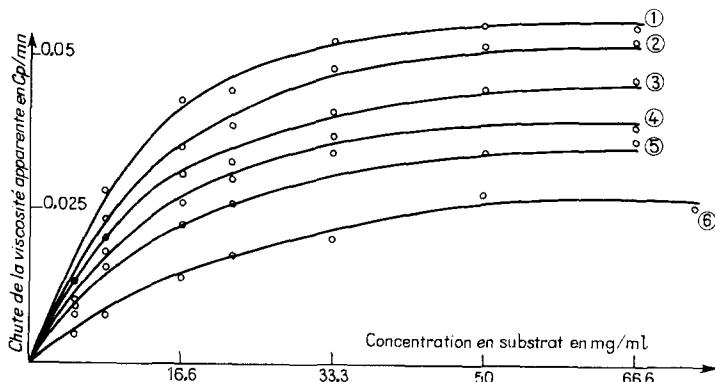


Fig. 5. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction pour diverses concentrations en inhibiteur. Méthode de mesure viscosimétrique. Concentration en désoxyribonucléase $5.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$. Courbe 1, sans inhibiteur. Courbes 2-6, respectivement 1.66, 3.33, 5, 6.66, $16.6 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/\text{ml}$ d'une préparation partiellement purifiée d'inhibiteur.

(iii) De très faibles concentrations d'inhibiteur purifié suffisent pour obtenir une inhibition notable. C'est ainsi que pour notre préparation la plus pure, l'inhibition est pratiquement totale lorsque les concentrations molaires en inhibiteur et en enzyme sont égales (en effectuant les mesures par la méthode titrimétrique et en adoptant pour poids moléculaires de l'inhibiteur et de la désoxyribonucléase I les valeurs respectives de 55 000 et de 30 000 mesurées ci-dessus). Dans l'étude de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme, nous ne pouvons donc admettre la simplification habituelle : concentration en inhibiteur libre = concentration en inhibiteur total.

Dans ces conditions, le système est dit en déplétion mutuelle.

Vérification de l'équation de STRAUSS ET GOLDSTEIN

STRAUSS ET GOLDSTEIN¹⁹ ont établi l'équation suivante, relative aux cas d'inhibition non compétitive dans un système en déplétion mutuelle:

$$\frac{[I_t]}{K_i} = \frac{i}{1-i} + \frac{i[E_t]}{K_i}$$

$[I_t]$ et $[E_t]$ désignent respectivement ici les concentrations totales en inhibiteur et en enzyme.

i est l'inhibition, définie par le rapport $(v_0 - v)/v_0$ où v_0 et v sont les vitesses de réaction respectivement sans inhibiteur et en présence de celui-ci.

K_i représente la constante de dissociation du complexe qu'on admet constitué d'une molécule d'enzyme et d'une molécule d'inhibiteur.

Pour contrôler dans quelle mesure cette équation est vérifiée pour le système de la désoxyribonucléase I et de son inhibiteur, nous avons tracé, pour une série de concentrations données en inhibiteur, les courbes représentant la vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme.

(i) Lorsque la concentration en enzyme est grande par rapport à celle de l'inhibiteur et lorsque la constante K_i est suffisamment faible, l'équation générale se ramène à (réf. 20):

$$v = k([E_t] - [I_t])$$

On peut voir sur les Figs. 6 et 7 que la vitesse de réaction est linéaire dans la région où $[E_t] \gg [I_t]$. Les portions de droites obtenues pour différentes valeurs de

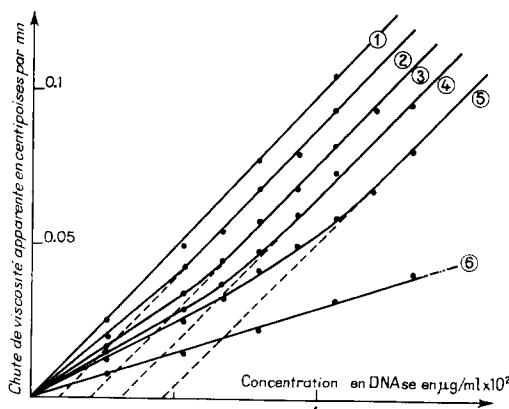


Fig. 6. Vitesse de réaction en fonction de la concentration en désoxyribonucléase (DNAse). Méthode de mesure viscosimétrique. Courbe 1, sans inhibiteur. Courbes 2-6, respectivement 1.66, 3.33, 5, 6.66, $16.6 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/\text{ml}$, d'une préparation partiellement purifiée d'inhibiteur.

$[I_t]$ sont parallèles entre elles et parallèles à la droite $v = k[E_t]$. Leur intersection avec l'axe des abscisses permet de déterminer la concentration équivalente de désoxyribonucléase inhibée dans chacun des cas.

Cette équivalence est rigoureusement proportionnelle à la concentration en inhibiteur lorsque les mesures sont effectuées par la méthode titrimétrique (Fig. 8).

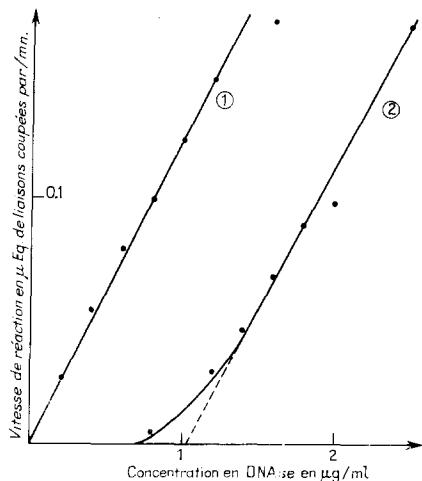


Fig. 7. Vitesse de réaction en fonction de la concentration en désoxyribonucléase (DNase). Méthode de mesure titrimétrique. Courbe 1, désoxyribonucléase seule. Courbe 2, désoxyribonucléase + 3 µg/ml de préparation d'inhibiteur partiellement purifié.

Par contre, on observe un léger écart à la proportionnalité, lorsque les concentrations en inhibiteur augmentent, dans le cas de la méthode viscosimétrique (Fig. 9). De plus, pour un même échantillon d'inhibiteur, les trois méthodes de mesure donnent des valeurs différentes d'activité spécifique. Ces différences pourraient s'expliquer par une dissociation réversible de l'inhibiteur en sous-unités inactives vis-à-vis de la désoxyribonucléase, dissociation qui serait d'autant plus importante que la concentration en inhibiteur serait plus faible. En effet, l'équivalence en désoxyribonucléase d'un échantillon augmente en même temps que les concentrations en inhibiteur utilisées, lorsqu'on passe de la méthode viscosimétrique à la méthode spectro-

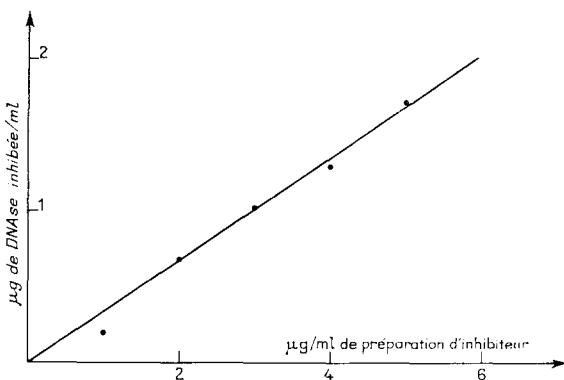


Fig. 8. Equivalence stœchiométrique entre la désoxyribonucléase I (DNase) et son inhibiteur. Méthode de mesure titrimétrique à pH constant. On a utilisé une préparation partiellement purifiée d'inhibiteur.

photométrique puis à celle de titrimétrie. Cependant les zones de concentrations facilement utilisables dans les trois méthodes ne se recoupent pas, et l'on ne peut faire une étude complète en fonction de la concentration, qui pourrait vérifier l'hypothèse avancée.

Les courbes de dosage de l'inhibiteur montrent la décroissance linéaire de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en inhibiteur⁹ et illustrent aussi la précédente formule.

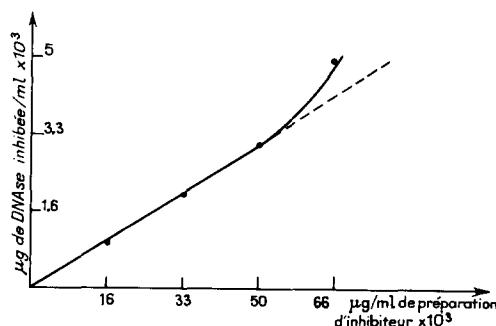


Fig. 9. Comme Fig. 8, mais par la méthode de mesure viscosimétrique et pour une autre préparation d'inhibiteur.

(ii) Lorsque la concentration en inhibiteur est grande par rapport à celle de l'enzyme, et dans le cas de la méthode titrimétrique, l'inhibition est pratiquement totale et aucune étude ne peut être faite. Par contre, avec la méthode viscosimétrique, les concentrations en enzyme et en inhibiteur sont 150 fois plus faibles environ, le complexe formé entre ces deux constituants est partiellement dissocié et une activité enzymatique résiduelle est encore mesurable.

L'équation générale se simplifie et devient²⁰:

$$v = \frac{k[E_t]}{1 + \frac{[I_t]}{K_i}}$$

La vitesse de réaction est alors proportionnelle à la concentration en enzyme, pour une concentration donnée en inhibiteur. C'est bien ce que l'on observe sur la partie des courbes de la Fig. 6 au voisinage de l'origine, partie d'autant plus importante que la concentration en inhibiteur est plus grande.

D'autre part, la formule précédente peut s'écrire aussi:

$$\frac{v_0}{v} - 1 = \frac{[I_t]}{K_i}$$

La grandeur $v_0/v - 1$ doit être, dans ce cas, proportionnelle à la concentration en inhibiteur utilisée et indépendante de la concentration en enzyme. La Fig. 10 illustre ce résultat.

Au total, nos données expérimentales sont en bon accord avec l'équation de STRAUSS ET GOLDSTEIN relative à un inhibiteur non compétitif avec le substrat, dans un système en déplétion mutuelle.

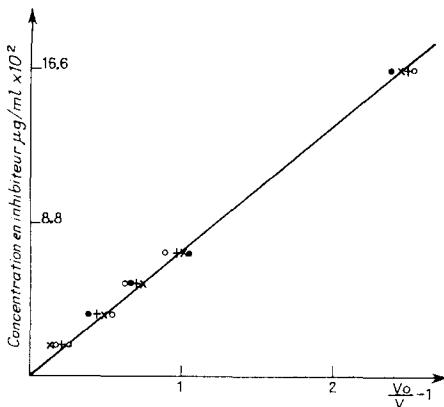


Fig. 10. Proportionnalité entre la concentration en inhibiteur et la grandeur $v_0/v - 1$. Méthode de mesure viscosimétrique. Concentrations en désoxyribonucléase: ●, $2.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$; ✕, $5.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$; +, $6.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$; ○, $8.0 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$.

Calcul de la constante de dissociation K_i du complexe inhibiteur-enzyme

Pour calculer la constante de dissociation K_i du complexe inhibiteur-enzyme, nous avons utilisé les résultats expérimentaux de la Fig. 6, obtenus par la méthode viscosimétrique. Nous avons déterminé la quantité de désoxyribonucléase inhibée par μg de notre échantillon d'inhibiteur. Admettant que l'union enzyme-inhibiteur se fait molécule à molécule et prenant comme poids moléculaire de la désoxyribonucléase la valeur de 30 000, nous en avons déduit pour chacune des courbes de la Fig. 6, la concentration moléculaire de l'inhibiteur $[I_t]$. La partie des courbes au voisinage de l'origine nous a permis de calculer la grandeur $[I_t]/K_i = v_0/v - 1$. Le rapport de ces deux grandeurs nous a donné K_i . Les résultats ainsi obtenus sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I

DÉTERMINATIONS DE K_i

Courbes No.	$[I_t] \cdot 10^{10}$ (M)	$v_0/v - 1$	$K_i \cdot 10^{10}$ (M)
2	0.34	0.26	1.32
3	0.69	0.48	1.44
4	1.03	0.73	1.41
5	1.38	1	1.38
6	3.44	2.5	1.38

Nous obtenons ainsi pour K_i la valeur moyenne de $1.38 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ avec une dispersion faible. Cette valeur permet de considérer que l'affinité entre l'enzyme et l'inhibiteur est très grande.

Remarques

(i) Il est à noter cependant que la détermination de la valeur de K_i dépend de la valeur choisie pour le poids moléculaire de la désoxyribonucléase I. Nous avons

pris pour ce calcul la valeur moyenne entre nos deux déterminations (filtration sur gel de Sephadex G-200) et celle de LINDBERG⁸ (méthode d'Archibald). Si nous avions adopté la valeur d'environ 60 000 trouvée précédemment pour le poids moléculaire de la désoxyribonucléase I (réf. 10) nous aurions obtenu une valeur de K_i deux fois plus faible, à peu près.

La pureté de la désoxyribonucléase utilisée est essentielle pour le calcul de sa concentration. Nous avons employé une désoxyribonucléase pancréatique cristallisée dont l'activité spécifique est sensiblement constante dans toute la largeur du pic où elle passe, lors d'une chromatographie sur DEAE-cellulose ou d'une filtration sur gel de Sephadex G-200.

La pureté de la préparation d'inhibiteur, par contre, est moins essentielle, puisqu'on détermine la concentration véritable en inhibiteur par l'équivalence en désoxyribonucléase inhibée.

Enfin, la constante d'inhibition calculée ici s'applique au système inhibiteur sérique de rat-désoxyribonucléase pancréatique de bœuf, que nous avons choisi pour des raisons de commodité. En effet les essais de purification de l'inhibiteur sérique de bœuf ont toujours été infructueux. Celui-ci est très labile et il est détruit lors des chromatographies. Il est possible que la valeur de K_i soit différente lorsqu'on utilise l'inhibiteur de bœuf. Cependant on peut penser que dans ce cas elle est encore plus faible et que les résultats n'en sont pas modifiés qualitativement.

(ii) On a pu voir sur la Fig. 7, que lorsque les mesures de vitesse sont effectuées par la méthode titrimétrique à pH constant, l'inhibition est pratiquement complète tant que la concentration en enzyme reste inférieure à une valeur déterminée par la stoechiométrie de l'union enzyme-inhibiteur. Il est facile de montrer que ce comportement pseudo-irréversible de l'inhibiteur est dû au domaine des concentrations employées dans cette méthode.

En effet, en appliquant la formule générale de STRAUSS ET GOLDSTEIN, pour $[E_t] = [I_t]$ = environ $3 \cdot 10^{-8}$ M et avec la valeur de K_i précédemment trouvée, on peut voir que l'inhibition $i = 0.94$, c'est-à-dire qu'elle est pratiquement totale. Le même calcul, appliqué pour les concentrations employées dans la méthode viscosimétrique ($[E_t] = [I_t]$ = environ $2 \cdot 10^{-10}$ M) donne pour i une valeur de 0.45. Dans ce dernier cas, il existe une activité enzymatique résiduelle et donc une vitesse de réaction non négligeable.

(iii) Nous avons vu que l'inhibition n'est pratiquement pas modifiée par une augmentation de la concentration en substrat. Ce caractère non compétitif à l'égard du substrat, lorsque l'inhibiteur a préalablement été incubé avec l'enzyme, ne permet pas cependant d'affirmer l'indépendance, sur l'enzyme, du site d'action sur le substrat et du site de fixation de l'inhibiteur. En effet, la très forte affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur pourrait empêcher le déplacement ultérieur de ce dernier par le substrat.

Spécificité d'action de l'inhibiteur vis-à-vis de l'enzyme

L'inhibiteur de désoxyribonucléase I du sérum de rat n'a pas d'action sur la désoxyribonucléase II (EC 3.1.4.6, désoxyribonucléase de rate de veau). On observe seulement un léger retard dans le démarrage de la réaction de cet enzyme.

Il n'a pas non plus d'action directe sur la DNA polymérase (EC 2.7.7.7) comme l'a montré DE RECONDO²¹.

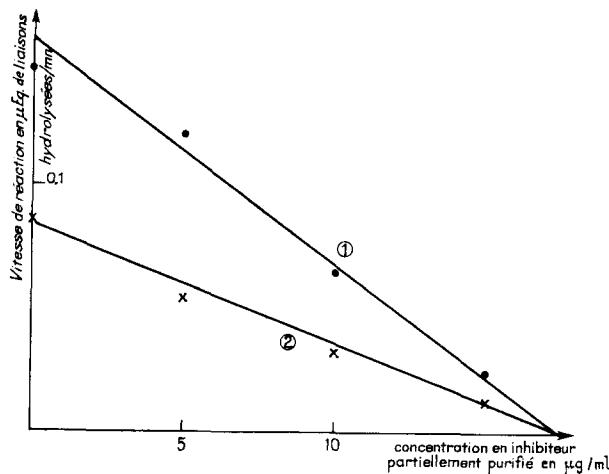


Fig. 11. Dosage d'inhibiteur de désoxyribonucléase I par la méthode titrimétrique à pH constant. Concentration en désoxyribonucléase, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Conditions expérimentales détaillées dans le texte (cf. MATÉRIEL ET MÉTHODES). Courbe 1, —·—·—, DNA natif. Courbe 2, ×—×, DNA dénaturé thermiquement.

Signalons enfin que l'état du substrat n'a pas d'influence sur le dosage de l'inhibiteur. L'activité spécifique d'un échantillon d'inhibiteur mesurée par la méthode titrimétrique est identique lorsqu'on utilise du DNA natif ou du DNA dénaturé par la chaleur (Fig. 11). Ce résultat s'accorde avec le fait que l'inhibiteur agit par fixation sur l'enzyme et non sur le substrat.

RESUMÉ

Par chromatographie sur DEAE-cellulose et filtration sur Sephadex G-200, on a obtenu, à partir de sérum de rat, des préparation d'inhibiteur de désoxyribonucléase I (EC 3.1.4.5), dont l'activité spécifique est environ 200 fois celle du matériel de départ. La pureté de ces préparations a été contrôlée par ultracentrifugation analytique en utilisant le système d'absorption ultraviolet et par électrophorèse en gel d'amidon.

L'inhibiteur sérique préparé ici présente les propriétés générales des protéines. Son coefficient de sédimentation à la concentration de 0.1% est égal à $s_{20,w} = 4.6 \text{ S}$. Sa vitesse de migration à l'électrophorèse en gel d'amidon est comparable à celle d'une α_2 -globuline.

Il agit par fixation sur l'enzyme, d'une manière stoechiométrique, et vraisemblablement molécule pour molécule. La constante de dissociation du complexe formé est très faible ($1.38 \cdot 10^{-10} \text{ M}$). La forte affinité des deux composés peut même entraîner un comportement pseudo-irréversible de l'inhibiteur dans certaines des conditions de concentration étudiées. L'inhibition est du type non compétitif avec le substrat, après incubation de l'enzyme et de l'inhibiteur. Le système est en 'déplétion mutuelle' et les résultats de l'étude cinétique sont en bon accord avec l'équation de STRAUSS ET GOLDSTEIN établie pour un tel système.

Il est sans action sur la désoxyribonucléase II et sur la DNA polymérase.

Beaucoup de ses propriétés nous conduisent à le rapprocher de l'inhibiteur II extrait de la rate de veau par LINDBERG.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement Mademoiselle LE BRETON pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour les suggestions dont elle nous a fait bénéficier. Nous remercions également Madame A. M. DE RECONDO, pour les fructueuses discussions auxquelles elle a bien voulu participer, ainsi que Mademoiselle J. BORDÉ pour l'excellente collaboration technique qu'elle nous a apportée.

Cet article recouvre en partie le travail d'une thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Physiques soutenue par G. BERGER devant la Faculté des Sciences de Paris, le 10 Mai 1966 (No. d'enregistrement au Centre National de la Recherche Scientifique: A.O. 1240).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. J. COOPER, M. L. TRAUTMAN ET M. LASKOWSKI, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 73 (1950) 219.
- 2 H. H. HENSTELL ET R. L. FREDMAN, *Cancer Res.*, 12 (1952) 341.
- 3 N. B. KURNICK, L. J. SCHWARTZ, S. PARISER ET S. L. LEE, *J. Clin. Invest.*, 32 (1953) 193.
- 4 B. FESTY ET C. PAOLETTI, *Compt. Rend.*, 257 (1963) 3682.
- 5 G. BERGER ET P. MAY, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 1915.
- 6 B. R. ZALITE ET J. S. ROTH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 107 (1964) 16.
- 7 U. LINDBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 237.
- 8 U. LINDBERG, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1246.
- 9 G. BERGER ET P. MAY, *Compt. Rend.*, 258 (1964) 738.
- 10 M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950) 349.
- 11 C. THOMAS, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1861.
- 12 K. S. KIRBY, *Biochem. J.*, 66 (1957) 495.
- 13 M. D. POULIK, *Nature*, 180 (1957) 1477.
- 14 R. J. WINTZLER, *Methods Biochem. Anal.*, 2 (1955) 279.
- 15 G. BERGER ET P. MAY, *Compt. Rend.*, 258 (1964) 1093.
- 16 G. A. BOFFA ET J. M. FINE, *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, 7 (1962) 813.
- 17 A. LEACH ET P. O'SHEA, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 245.
- 18 P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 96 (1965) 595.
- 19 O. STRAUSS ET A. GOLDSTEIN, *J. Gen. Physiol.*, 26 (1943) 559.
- 20 J. LEYDEN WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. I, Academic Press, New York and London, 1963, p. 66.
- 21 A. M. DE RECONDO, *Biochim. Biophys. Acta*, 114 (1966) 338.
- 22 D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.

Biochim. Biophys. Acta, 139 (1967) 148-161