

BBA 67824

ETUDE DU COMPLEXE PLASMINE- α_2 -MACROGLOBULINE DE PORC

YVETTE JACQUOT-ARMAND et SYLVANIE GUINAND

Laboratoire de Biologie Physicochimique, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay (France)

(Reçu le 10 Octobre, 1976)

Summary

Study of the complex between porcine plasmin and α_2 -macroglobulin

Porcine plasmin (EC 3.4.21.7) is obtained from plasminogen activated by human urokinase. This enzyme can bind, in an equimolecular ratio, to an α_2 -macroglobulin isolated from porcine serum.

The number of active sites of plasmin has been determined through a burst titration of nitroaniline during the presteady-state hydrolysis of an amide substrate (*N*- α -carbobenzoxy-L-arginine-*p*-nitroanilide). The kinetic constants relative to a very sensitive ester substrate (*N*- α -carbobenzoxy-L-lysine nitrophenylester) hydrolysis have been measured.

The binding of plasmin to α_2 -macroglobulin results in a complete inhibition of proteolytic activity, a reduction of active sites number and a decrease of esterolytic activity towards this substrate. In the complex, the residual activity (about 60%) is protected from protein inhibitors.

Absorbance difference spectra show that 1 mol of α_2 -macroglobulin binds 1 mol of plasmin and 2 mol of trypsin. When plasmin is first bound to α_2 -macroglobulin, only 1 mol of trypsin can gain access to the second site without removing the plasmin, showing that a steric hindrance is implicated in the inhibition performed by α_2 -macroglobulin binding.

Introduction

Différents enzymes ont la propriété de se complexer avec une protéine du sérum, l' α_2 -macroglobuline, en perdant ainsi leur activité protéolytique. Cette protéine a souvent été, pour cette raison, considérée comme un inhibiteur. En fait, en se fixant sur l'enzyme, elle protège le centre actif contre l'agression d'inhibiteurs circulants et peut alors constituer une réserve d'enzyme qui serait

Abbreviations: Z-Arg-nitroanilide, *N*- α -carbobenzoxy-L-arginine-*p*-nitroanilide; Z-Lys-OPhNO₂, *N*- α -carbobenzoxy-L-lysine nitrophénylester; Bz-Arg-OEt, benzoyl-arginine ethyl ester; Tos-Arg-OMe, tosyl-arginine methylester; NPGB, nitrophényl *p* guanidobenzoate.

libéré dans certaines conditions, assurant la régulation nécessaire à l'équilibre physiologique [1]. On voit donc l'intérêt de l'étude des interactions de cette macroglobuline et des enzymes qu'elle peut fixer (*in vitro* et *in vivo*).

Ganrot [2] a été l'un des premiers à rechercher les conditions de formation de complexe entre l' α_2 -macroglobuline humaine et la trypsine bovine. Nous-mêmes avons publié une étude analogue concernant la formation du complexe trypsine- α_2 -macroglobuline, les deux protéines provenant de la même origine, le porc [3], et avons confirmé qu'il existe sur l' α_2 -macroglobuline deux sites de fixation pour la trypsine.

Par la suite, ces recherches ont été étendues à la plasmine humaine [4] qui semble, comme la plasmine bovine [5], former un complexe mol à mol avec l' α_2 -macroglobuline.

La plasmine est un enzyme à sérine auquel son action très spécifique sur la fibrine confère un rôle physiologique essentiel dans le maintien de la balance homéostatique entre la formation du caillot et sa dissolution. Pour certains auteurs [6], il y aurait compétition entre la thrombine nécessaire à la coagulation du sang et la plasmine produisant la fibrinolyse. *In vivo*, c'est dans le sang que se forme la plasmine par activation du plasminogène suivant un mécanisme enzymatique encore mal connu, faisant vraisemblablement intervenir les plaquettes [7].

L'objet de cet article est d'étudier les réactions entre la plasmine de porc et l' α_2 -macroglobuline de même espèce. Pour suivre le mécanisme de formation du complexe, il est nécessaire de pouvoir mesurer quantitativement l'activité de l'enzyme libre. Mais, alors qu'il existe pour la trypsine diverses méthodes permettant de déterminer les constantes catalytiques (k_{cat}) à l'égard de substrats synthétiques, l'activité de la plasmine est généralement exprimée en unités arbitraires en prenant la caséine comme substrat.

Cependant pour obtenir l'activité de la plasmine en valeurs absolues, on peut faire appel à la technique dite du "jet" de nitrophénol [8] qui permet de titrer le nombre de sites actifs; cette méthode a été appliquée à plusieurs enzymes à sérine tels que trypsine, thrombine et plasmine [9].

D'autre part, nous avons, comme dans le cas de la trypsine, étudié l'activité de l'enzyme libre et complexé à l' α_2 -macroglobuline en utilisant des substrats synthétiques. Or il a été observé [10] que, pour certains d'entre eux (benzoyl-arginine ethylester (Bz-Arg-OEt) et tosyl-arginine methylester (Tos-Arg-OMe)), la plasmine avait un pouvoir catalytique beaucoup plus faible que la trypsine. Nous avons alors recherché de meilleurs substrats, porteurs de préférence d'un groupe chromophore, afin de pouvoir mesurer plus aisément l'activité de l'enzyme et suivre les changements possibles des constantes cinétiques de la plasmine lorsqu'elle se trouve complexée avec l' α_2 -macroglobuline.

Matériel et Méthodes

La plasminogène est isolé du plasma de porc préalablement défibriné par du chlorure de calcium à 4%. On effectue ensuite une chromatographie d'affinité sur une colonne de Sépharose-lysine en suivant la technique décrite par Deutsch et Mertz [11] pour préparer le plasminogène humain. L'élution se fait par passage d'acide ϵ -aminocaproïque, 0.2 M, qu'on élimine par une dialyse sous vide

qui concentre en même temps la solution. Le plasminogène est ensuite conservé à l'état congelé en milieu tampon phosphate, 0.1 M, pH 7.

La pureté du plasminogène a été testée d'une part par ultracentrifugation analytique (Spinco Beckman, modèle E), d'autre part par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en absence [12] et en présence d'agents dissociants [13].

La concentration protéique du plasminogène est déterminée par l'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction a été établi à partir de mesures d'incrément d'indice ($\Delta n/\Delta c = 0.185$, c étant exprimé en g/ml). Sa valeur $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 17.5$ est très voisine de celle admise pour le plasminogène humain [14].

La plasmine est obtenue en activant le plasminogène de porc par l'urokinase humaine (Leo Pharmaceutical Products) dans les conditions décrites par Walther et col. [15]: pour 1.5 mg de plasminogène en solution à pH 9, on utilise 100 unités Ploug d'urokinase et le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min. On a vérifié qu'au bout de ce temps l'activité est maximale.

La plasmine, hautement instable à la température du laboratoire, perd son activité après quelques heures. Pour éviter cette inactivation, certains auteurs conservent la plasmine d'une manière empirique dans le glycérol. Des mécanismes ont été récemment proposés pour expliquer l'effet du diéthylène glycol dans le cas particulier de l'hydrolyse du Bz-Arg-OET par la plasmine [16].

Nous avons nous-mêmes observé que ce diol, à la concentration de 25–30%, empêchait la formation de polymères inactifs. Les solutions de plasmine ont donc été conservées en tampon phosphate, pH 7, en présence de diéthylène glycol.

L'activité protéolytique de la plasmine a été déterminée en utilisant des substrats chromophores:

(a) l'azocaséine (Sigma) en solution à 5% dans NaHCO_3 , 0.1 M. Le mélange (vol. à vol. d'azocaséine et de plasmine) est porté au bain-marie à 37°C pendant 30 min et la réaction est stoppée par 5 vols. d'acide trichloracétique à 5%. Le précipité est éliminé par centrifugation (ou filtration) et le surnageant est dilué deux fois dans NaOH, 0.5 M; on mesure alors l'absorbance à 430 nm à l'aide du spectrophotomètre Cary 15.

(b) le "Remazol Brilliant Blue hide" (Calbiochem B grade) utilisé selon la technique décrite par Rinderknecht et col. [17]. La réaction de l'enzyme sur ce substrat fait apparaître une coloration bleue de la solution: on peut ainsi titrer l'enzyme réagissant par la mesure de l'absorbance à 595 nm.

Pour étudier l'activité hydrolytique de la plasmine, deux substrats synthétiques, chromophores également, ont été choisis en raison des hautes valeurs de constantes catalytiques obtenues avec la trypsine: un amide, le *N*- α -carbobenzoxo-L-arginine-*p*-nitroanilide (Z-Arg-nitroanilide) qui avait fait l'objet d'une étude personnelle [18], un ester, le *N*- α -carbobenzoxo-L-lysine nitrophénylester (Z-Lys-OPhNO₂) étudiés dans une large gamme de pH [19]. Le produit commercial utilisé est le *p*-nitrophényl ester (Calbiochem.), les deux autres formes ortho et méta ont été synthétisées au laboratoire par M. Hill.

L' α_2 -macroglobuline est isolée du sérum ou du plasma de porc préalablement délipidé. La fraction qui précipite par le sulfate d'ammonium pour des concentrations comprises entre 1.8 et 2.22 M est dépourvue de γ -globuline; le précipité est redissous dans l'eau et la solution soumise à plusieurs ultracentrifugations préparatives à 40 000 tours/min pendant 5 h, à travers un milieu salin de

forte densité. L' α_2 -macroglobuline, recueillie sous forme de pellicules gélatineuses dans le fond des tubes de centrifugation, s'est révélée homogène, tant en électrophorèse qu'en ultracentrifugation analytique ($s_{20,w}^0 = 19$ S). La concentration protéique est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm en utilisant pour le coefficient d'extinction la valeur $E_{cm}^{1\%} = 10.2$ préalablement déterminée [20]. Le rendement en α_2 -macroglobuline calculé par rapport à sa teneur dans la fraction protéique de départ est d'environ 60%.

Pour déterminer les conditions de formation du complexe plasmine- α_2 -macroglobuline, on a utilisé la même technique que pour le complexe trypsine- α_2 -macroglobuline [3]. A une solution contenant une certaine concentration de plasmine, on ajoute des quantités croissantes d' α_2 -macroglobuline. Chaque mélange est incubé 3 min à la température ambiante. On suit la cinétique d'hydrolyse à l'égard du Z-Lys-OPhNO₂ par enregistrement spectrophotométrique du nitrophénol libéré. La réaction est alors "stoppée" par addition de l'inhibiteur du soja (inhibiteur de la trypsine, mais aussi de la plasmine) qui agit sur l'enzyme resté libre dans le milieu. Lorsque toute la plasmine est complexée, la cinétique n'est plus modifiée par addition de cet inhibiteur, celui-ci n'ayant pas accès au centre actif de l'enzyme complexé. On détermine ainsi le nombre de mol d' α_2 -macroglobuline nécessaires à la saturation d'une mol de plasmine. Alors que, dans le cas de la trypsine, ce nombre était de 1 : 2, dans le cas de la plasmine, la formation de complexe met en jeu une mol d' α_2 -macroglobuline pour une mol de plasmine.

Résultats

Plasminogène plasmine

L'ultracentrifugation analytique d'une solution de plasminogène de porc montre la présence d'un composant principal dont le coefficient de sédimentation $s = 5.6$ est très voisin de celui mentionné pour le plasminogène humain. Il est ici accompagné d'un composant plus lourd: $s = 18.5$ présent à très faible concentration (environ 5% des protéines totales) qui paraît provenir d'une polymérisation partielle du plasminogène au cours de la préparation. Ce contaminant peut être éliminé par passage de la solution sur une colonne de Sephadex G-200 ou de gel d'agarose, mais sa présence à si faible concentration ne gêne pas nos mesures d'activité enzymatique.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a mis en évidence la présence de cinq bandes anodiques. Ces multiples formes, de mobilité différente, ont été signalées pour le plasminogène humain [21], chacun des "isozymogènes" étant susceptible de se transformer en plasmine.

Après activation du plasminogène par l'urokinase, on constate la présence de deux bandes seulement, mais la mobilité est égale à celle des bandes les plus rapides observées pour le plasminogène (Fig. 1a) ce qui laisse supposer qu'il existe déjà dans le zymogène une faible proportion de plasmine formée par autoactivation.

En milieu dissociant (dodécyle sulfate de sodium et mercaptoethanol) l'électrophorèse montre, pour le plasminogène, la présence d'une bande principale P_1 accompagnée de deux faibles bandes plus mobiles, P_1 et P_2 ; pour la plasmine, on observe les mêmes bandes mais les intensités relatives sont modifiées, P_1

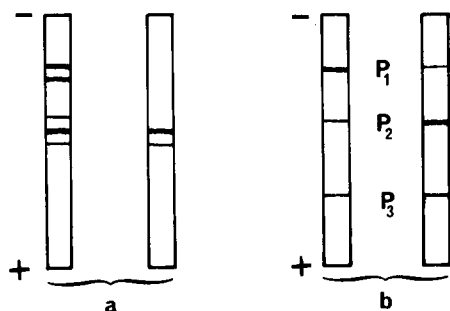


Fig. 1. Schéma des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 5%; durée de migration 45 min. a, à pH 9.1, selon Davis [11]; b, à pH 7.2, en dodécyle sulfate de sodium, selon Weber et Osborn [13] plasminogène natif, à gauche; plasminogène activé, à droite.

devenant très faible au profit de P₂ et P₃ (Fig. 1b) On sait que lors de l'activation du plasminogène, il y a élimination d'un peptide et coupure de la chaîne polypeptidique. En milieu dissociant et réducteur, les deux chaînes ainsi formées se séparent, les bandes dont l'intensité a augmenté correspondent donc aux chaînes lourde et légère de la molécule de plasmine [22,23]. La pré-existence de ces bandes dans le zymogène confirme l'hypothèse de la présence dans le plasminogène de plasmine formée par autoactivation.

La transformation du plasminogène en plasmine a pu être suivie par spectrophotométrie de différence dans l'ultraviolet. L'apparition de la plasmine est caractérisée par deux extremums négatifs situés à 292 et 286 nm (Fig. 2); ils correspondent à un déplacement du spectre vers les courtes longueurs d'onde ("blue shift") traduisant un démasquage de tryptophane.

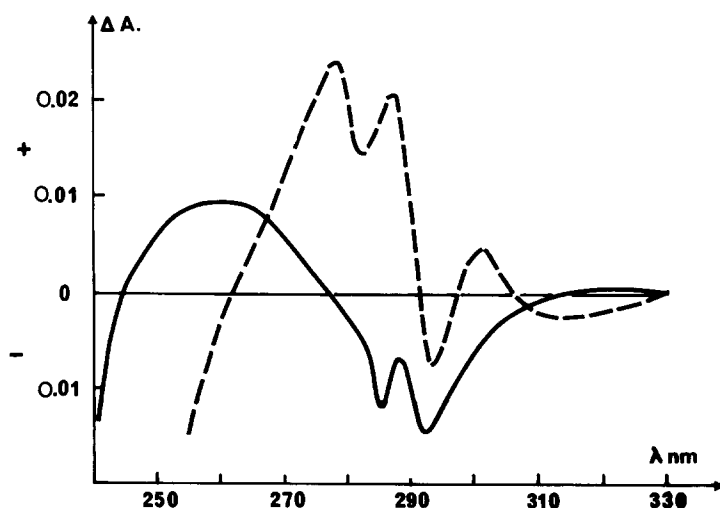


Fig. 2. Spectres de différence d'absorption enregistrés à 27°C (spectrophotomètre Cary 15, échelle 0.1). —, plasmine versus plasminogène (ce travail); - - - - -, trypsine versus trypsinogène (Benmouyal et Trowbridge [24]).

Il est intéressant de noter que lors de la transformation du trypsinogène en trypsine [24], les résidus aromatiques mis en jeu subissent, au contraire, un déplacement de leur bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde ("red shift"). En outre, dans le spectre de différence plasmine/plasminogène, on n'observe pas, comme dans le cas de la trypsine, de pic à 300 nm [25] attribuable à un tryptophane de comportement anormal.

Activité de la plasmine libre ou liée à l' α_2 -macroglobuline

(a) *Activité protéolytique.* Les mesures d'activité à l'égard de l'azocaséine ont été faites pour des concentrations de plasmines comprises entre 50 et 100 μg . L'addition d' α_2 -macroglobuline inhibe progressivement la protéolyse; lorsqu'une mol d' α_2 -macroglobuline est fixée sur une mol de plasmine, l'inhibition atteint 95%.

Avec un substrat moins spécifique comme le Remazol, l'inactivation du complexe est moins importante (80% environ).

(b) *Activité amidasique.* En suivant à 25°C la cinétique d'hydrolyse à l'état stationnaire du substrat Z-Arg-nitroanilide, on trouve une constante de désacylation de très faible valeur ($k_{\text{cat}} \approx 0.05 \text{ s}^{-1}$). Avec ce même substrat, la constante catalytique de la trypsine était 100 fois plus élevée [18]. Plusieurs auteurs [26, 27] ont constaté que les amides se comportaient comme de mauvais substrats pour la plasmine humaine.

Cette observation faisait apparaître l'intérêt d'étudier, à l'état préstationnaire, la cinétique de l'hydrolyse de ces amides par la plasmine porcine. Cette étude a été faite en suivant la technique de Chase et Shaw, en remplaçant l'ester NPGb par l'amide Z-Arg-nitroanilide. Pour nous limiter à l'étape préstationnaire, nous avons réduit la concentration du substrat à $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ pour des concentrations de plasmine comprises entre $2.5 \cdot 10^{-6}$ et $3.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ dans une solution tampon Tris \cdot HCl à pH 8.3. Nous avons constaté l'émission d'un "jet" de nitroaniline. La mesure de l'absorbance à $\lambda = 410 \text{ nm}$ permet de calculer la teneur en sites actifs de l'enzyme, en prenant comme valeur du coefficient d'extinction de la nitroaniline, $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Le nombre de sites actifs a été ainsi déterminé pour chaque échantillon de plasmine. Le taux variait entre 50 et 70% selon les préparations d'enzyme mais les valeurs des constantes cinétiques seront toujours rapportées à 100% de sites actifs.

Lorsqu'on remplace la plasmine par le complexe plasmine- α_2 -macroglobuline, l'amplitude du jet de nitroaniline est réduite d'environ 30%. On observe, après le "jet", une cinétique d'hydrolyse lente (post-burst) qui n'apparaît pas avec la plasmine libre. Ce phénomène secondaire pourrait s'expliquer soit par une catalyse des groupements aminés de la molécule d' α_2 -macroglobuline par la plasmine, soit par un freinage stérique dû à l' α_2 -macroglobuline qui retarderait la réaction à cette étape. La rupture de pente qu'on observe ensuite dans l'enregistrement serait en faveur de cette dernière hypothèse.

(c) *Activité estérasique.* Le Z-Lys-OPhNO₂ s'est révélé un substrat très sensible pour la plasmine. Mais cet ester présente l'inconvénient de s'autolyser rapidement à pH alcalin et il faut en tenir compte pour déterminer la vitesse d'hydrolyse due à l'enzyme. Pour diminuer cette autolyse on a été amené à abaisser le pH expérimental jusqu'à 6.4. Par ailleurs, il nous a paru intéressant

TABLEAU I

POINT ISOBESTE ET COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLAIRE DU SUBSTRAT Z-Lys-OPhNO₂ SOUS LES TROIS FORMES NITROPHENYLESTER

$\Delta\epsilon = \epsilon(\text{nitrophenol}) - \epsilon(\text{nitrophenylester})$.

| | Point isobeste $\lambda(\text{nm})$ | $\Delta\epsilon$ |
|-------|--|------------------|
| Para | 347.5 | 5050 |
| Ortho | 371.5 | 1635 |
| Meta | 358 | 1023 |

de comparer les trois formes de cet ester dans lesquelles le groupe nitrophénol est situé en position para, ortho ou meta. Pour ces substrats le spectre d'absorption entre la forme protonée et déprotonée du nitrophénol a été enregistré et le point isobeste a été déterminé ainsi que le coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde (Tableau I).

Pour une même préparation de plasmine de porc, les mesures cinétiques de l'hydrolyse des trois formes de ce substrat ester ont donné les résultats portés dans le Tableau II. On voit que les valeurs des constantes catalytiques (k_{cat}) déterminées à 27°C sont voisines, aux erreurs d'expérience près, pour les trois substrats examinés, ce qui est normal puisque l'hydrolyse à l'état stationnaire libère le même composé: l'ion carbobenzoxylysine dans les trois cas. L'affinité apparente est peu différente pour les formes para et ortho, mais elle est nettement plus faible dans le cas du meta nitrophénol. D'autre part, le degré de spécificité qui ressort de la valeur du rapport k_{cat}/K_m , est meilleur pour les formes para ou ortho. Mais l'autolyse dans le cas de l'orthonitrophénylester est 2.5 fois moins importante que pour la paranitrophénylester; il y a donc intérêt à choisir le substrat sous la forme ortho.

L'activité estérasique de la plasmine a été comparée lorsque l'enzyme se trouve sous forme native et lorsqu'il est complexé avec l' α_2 -macroglobuline. Les mesures de cinétique ont été faites à trois températures (25, 32 et 37°C) et les résultats sont portés dans le Tableau III. L'examen de ce tableau montre que la fixation d' α_2 -macroglobuline sur la plasmine inhibe assez fortement l'activité hydrolytique de l'enzyme à l'égard du Z-Lys-OPhNO₂.

Dans le cas de la trypsine liée à l' α_2 -macroglobuline, nous avons constaté

TABLEAU II

CONSTANTES D'HYDROLYSE DU Z-LYS-OP NO₂ PAR LA PLASMINE DE PORC À 27°C, pH 6.4

| Nitrophényl ester | k_{cat} (s ⁻¹) | K_m (10 ⁵ M) | k_{cat}/K_m (10 ⁵ M ⁻¹ · s ⁻¹) |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|---|
| Para | 10.6 | 4.9 | 2.1 |
| Ortho | 13.1 | 6.1 | 2.15 |
| Meta | 14.1 | 224 | 0.107 |

TABLEAU III

CONSTANTES D'HYDROLYSE DU Z-LYS-OP NO₂ PAR LA PLASMINE LIBRE OU COMPLEXÉE, pH 6.4

| | k_{cat} (s ⁻¹) | | | K_m (10 ⁵ M) | | | k_{cat}/K_m (10 ⁵ M ⁻¹ · s ⁻¹) | | |
|--|-------------------------------------|------|------|---------------------------|------|------|---|------|------|
| | 25°C | 32°C | 37°C | 25°C | 32°C | 37°C | 25°C | 32°C | 37°C |
| Plasmine | 9.6 | 15.8 | 19 | 5.6 | 5.2 | 4.1 | 1.7 | 3 | 4.6 |
| Plasmine- α_2 - macroglobuline | 6.3 | 7.5 | 8.3 | 9.2 | 6.1 | 5.2 | 0.68 | 1.2 | 1.6 |

également une diminution du même ordre de la vitesse d'hydrolyse de ce substrat. Pour les ester Bz-Arg-OEt et Tos-Arg-OMe, cette inhibition ne dépasse pas 25% [1,28], probablement parce que ces substrats sont moins encombrants que le Z-Lys-OPhNO₂. On voit, en outre, que la constante apparente d'affinité, $1/K_m$ diminue lorsque l' α_2 -macroglobuline est fixée sur la molécule de plasmine.

La valeur des constantes cinétiques varie nettement avec l'augmentation de la température. L'activité spécifique est meilleure à 37°C, à la fois pour la plasmine libre et pour le complexe plasmine- α_2 -macroglobuline.

Spectres de différence du complexe plasmine- α_2 -macroglobuline

La formation du complexe trypsine- α_2 -macroglobuline avait été mise en évidence par spectrophotométrie de différence [29]. Un changement de conformation local, vraisemblablement attribuable à la trypsine, lorsqu'elle fixe l' α_2 -macroglobuline, se manifeste par l'apparition d'extremums d'amplitude positive, caractéristiques des chromophores tyrosine et tryptophane.

Si l'on utilise cette même technique pour suivre la fixation de l' α_2 -macroglobuline sur la plasmine, on n'observe qu'une faible modification du spectre d'absorption. On sait cependant, par des mesures cinétiques, que le complexe

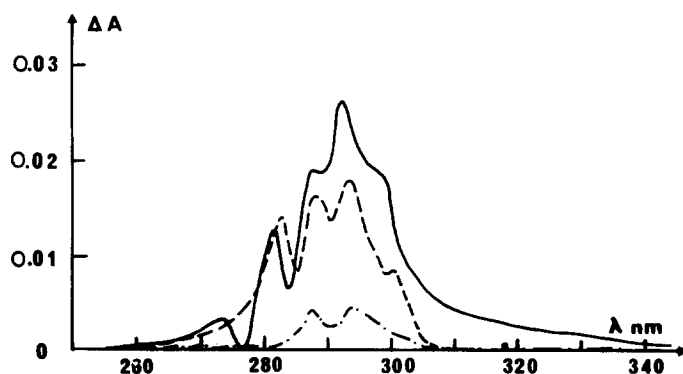


Fig. 3. Spectres de différence d'absorption enregistrés à 27°C (spectrophotomètre Cary 15, échelle 0.1). — · — · —, plasmine- α_2 -macroglobuline versus plasmine; - - - - -, plasmine- α_2 -macroglobuline — trypsine versus plasmine plus trypsine; —, trypsine- α_2 -macroglobuline versus trypsine.

s'est bien formé puisque l'activité hydrolytique de la plasmine n'est pas modifiée par la présence de l'inhibiteur protéique du soja.

En outre, si, après avoir enregistré le spectre de différence du complexe plasmine- α_2 -macroglobuline, qui n'est pas très apparent par rapport à la ligne de base, on ajoute de la trypsine (à la fois dans la cuve de mesure et dans la cuve de référence), on note l'apparition d'extremums d'amplitude positive caractéristiques de la formation du complexe trypsine- α_2 -macroglobuline, mais avec des valeurs d'absorbance plus faibles que celles que nous avons précédemment obtenues (Fig. 3).

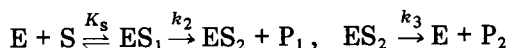
Il est donc encore possible de fixer de la trypsine sur le complexe plasmine- α_2 -macroglobuline. On montre que cette fixation ultérieure de trypsine ne déplace pas l'enzyme déjà présent, même si l'on ajoute un excès de trypsine qui reste libre dans ce cas.

Discussion

Bien que la plasmine et la trypsine soient considérées comme présentant de grandes similitudes dans leurs propriétés catalytiques et qu'elles puissent hydrolyser les mêmes substrats, il existe entre elles des différences de structure moléculaire qui pourraient expliquer les divergences de comportement que nous avons mises en évidence. La plasmine est, en effet, formée de deux chaînes maintenues par des liaisons S-S: la chaîne lourde aurait un poids moléculaire de 55 000 et la chaîne légère, d'un poids moléculaire voisin de celui de la trypsine (26 000), porterait la sérine et l'histidine du centre actif de l'enzyme [15].

En outre les charges sont différentes: le point isoélectrique de la plasmine est d'environ 5 et celui de la trypsine est de 10.

Dans la réaction de catalyse, le même mécanisme a été proposé pour la trypsine et la plasmine [30].



Mais, alors que pour l'hydrolyse des amides par la trypsine, l'étape d'acylation est limitante ($k_2 \ll k_3$), dans le cas de la plasmine la brusque libération de nitroaniline constatée est en faveur d'une désacylation limitante. Ces observations sont en parfait accord avec les résultats de Christensen et Müllertz [27], qui, lors de l'hydrolyse de l'amide Bz-Arg-nitroanilide par la plasmine humaine, trouvent, en étudiant les étapes préstationnaire et stationnaire de la réaction, des valeurs de constantes $k_2 = 16 \text{ s}^{-1}$ et $k_3 = 0.09 \text{ s}^{-1}$.

Lors de notre étude de l'hydrolyse à l'état stationnaire, le Z-Lys-OPhNO₂ s'est montré meilleur substrat pour la plasmine que les esters Bz-Arg-OEt et Tos-Arg-OMe. On confirme ainsi que la plasmine agit préférentiellement sur les groupements lysine alors que l'action de la trypsine est la même sur les groupements arginine ou lysine [31,32].

Mais ce substrat présente l'inconvénient de s'autolyser rapidement. En opérant à pH 6.4 et en substituant dans la molécule de cet ester le groupe nitré en position para par un groupe nitré en position ortho, on réduit notablement la vitesse de cette autolyse.

La fixation de l' α_2 -macroglobuline sur la plasmine a des effets qui diffèrent

selon la nature du substrat: à l'égard des protéines (caséine, fibrine . . .) il y a inhibition quasi totale de l'hydrolyse, à l'égard des substrats synthétiques de petits poids moléculaires, l'inhibition de l'hydrolyse est faible. Cependant cette inhibition dépend de l'encombrement du substrat synthétique, elle atteint 30—40% pour Z-Lys-OPhNO₂: tout se passe comme si l'accès au site actif de la plasmine était rendu difficile par le voisinage de l' α_2 -macroglobuline. La même observation a été faite pour le complexe trypsine- α_2 -macroglobuline en utilisant un substrat d'encombrement analogue: le *N*- α -carbobenzoxy-glycyl-glycyl-L-arginine 2-naphthylamide [33]. Les auteurs ont alors noté une inhibition de la vitesse d'hydrolyse de 50%.

Une étude précédente [29] avait montré qu'il fallait 2 mol de trypsine pour saturer une mol d' α_2 -macroglobuline; dans le cas de la plasmine le complexe se fait mol à mol. Ce résultat a été mis en évidence à la fois par étude cinétique et par spectroscopie de différence.

Cette dernière méthode a confirmé l'existence de deux sites de fixation sur l' α_2 -macroglobuline; la plasmine de par son encombrement n'a accès qu'à un seul de ces sites, alors qu'une molécule de trypsine, plus petite, peut encore se fixer pour former un complexe ternaire.

Le fait que la trypsine ne déplace pas la plasmine du complexe permet d'admettre que les constantes d'association sont du même ordre de grandeur pour les deux enzymes. On sait que pour la trypsine cette constante est très élevée [3], ce qui laisse supposer que le complexe est pratiquement irréversible. Cependant des chercheurs [5] assurent qu'à 37°C, la plasmine liée à l' α_2 -macroglobuline arrive, en fonction du temps, à digérer le caillot de fibrine. Pour d'autres auteurs [34], au contraire, la formation du complexe exigerait une coupure de liaison peptidique de l' α_2 -macroglobuline par l'enzyme qui se trouverait piégé irréversiblement. Le rôle physiologique de cette macroglobuline serait alors de fixer les protéases en excès dans certains cas pathologiques pour les éliminer du plasma.

Résumé

La plasmine de porc, comme un certain nombre d'enzymes à sérine, a la capacité de se lier à l' α_2 -macroglobuline. La formation d'un complexe stable met en jeu 1 mol de plasmine pour 1 mol d' α_2 -macroglobuline.

Une étude préalable de la plasmine a permis de mettre au point une technique de mesure de l'activité en utilisant comme substrat le *N*- α -carbobenzoxy-L-arginine-*p*-nitroanilide (Z-Arg-nitroanilide); la réaction de désacylation étant limitante, on titre les sites actifs de la plasmine par le "jet" de nitroaniline produit. La mesure des constantes cinétiques d'hydrolyse du *N*- α -carbobenzoxy-L-lysine nitrophénylester (Z-Lys-OPhNO₂) a montré que cet ester est un substrat très sensible à l'action de la plasmine, particulièrement lorsqu'il est sous forme nitrée en ortho.

Lorsque la plasmine est liée à l' α_2 -macroglobuline, on observe par rapport à l'enzyme libre: (a) une disparition quasi totale de l'activité protéolytique (azocaséine), (b) une réduction du taux des sites actifs mesuré à l'état préstationnaire (Z-Arg-nitroanilide), (c) une diminution d'environ 40% des constantes cinétiques mesurées à l'état stationnaire (Z-Lys-OPhNO₂). L'activité hydroly-

tique résiduelle est à l'abri de l'effet d'un inhibiteur protéique (inhibiteur du soja).

On montre, par spectroscopie de différence, que lorsqu'une molécule de plasmine est fixée sur l' α_2 -macroglobuline, une molécule de trypsine peut encore se fixer, sans déplacer la plasmine.

Reconnaissance

Ce travail a bénéficié de l'aide du C.N.R.S. (E.R.A. No. 480). Il a été poursuivi dans le service du Professeur J. Tonnelat que nous tenons à remercier pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude.

Bibliographie

- 1 James, K., Taylor, F.B. et Findenberg, H.H. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 133, 374—376
- 2 Ganrot, P.O. (1966) *Acta Chem. Scand.* 20, 2299—2324
- 3 Jacquot-Armand, Y. (1967) *Comp. Rend. Acad. Sci.* 264 2236—2239
- 4 Ganrot, P.O. (1967) *Acta Chem. Scand.* 21, 602—608
- 5 Sugihara, H., Nagasawa, S. et Suzuki, T. (1971) *J. Biochem. Tokyo* 70, 649—658
- 6 Higgs, R.J. et Rosenberg, R.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4335—4338
- 7 Taylor, F.B. et Müller-Eberhard, H.J. (1967) *Nature* 216, 1023—1025
- 8 Chase, J. et Shaw, E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 508—514
- 9 Chase, J. et Shaw, E. (1969) *Biochemistry* 8, 2212—2224
- 10 Iwanagna, S., Wallen, P., Gröndal, J., Henschen, A. et Blömbäck, B. (1969) *Eur. J. Biochem.* 8, 189—199
- 11 Deutsch, D.G. et Mertz, E.T. (1970) *Science* 170, 1095—1096
- 12 Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404—427
- 13 Weber, K. et Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406—4412
- 14 Mc Clintock, D.K. et Bell, P.H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 694—701
- 15 Walther, P.J., Steinman, H.M., Hill, R.L. et Mc Kee, P.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1173—1181
- 16 Grimard, M. (1975) *FEBS Lett.* 54, 334—338
- 17 Rinderknecht, H., Silverman, P., Geokas, M.C. et Haverbach, B.J. (1970) *Clin. Chim. Acta* 28, 293—300
- 18 Jacquot-Armand, Y. et Hill, M. (1970) *FEBS Lett.* 11, 249—253
- 19 Bender, M.L., Kezdy, J. et Feder, J. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 4953—4955
- 20 Jacquot-Armand, Y. et Guinand, S. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 133, 289—300
- 21 Summaria, L., Arzadon, L., Bernabe, P. et Robbins, K.C. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4691—4701
- 22 Sodetz, J.M., Brockway, W.J. et Castellino, F.J. (1972) *Biochemistry* 11, 4451—4458
- 23 Wallen, P. et Wiman, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 257, 122—134
- 24 Benmouyal, P. et Trowbridge, C.G. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 67—76
- 25 Guinand, S., Hui Bon Hoa, G. et Pantaloni, C. (1974) *Biochimie* 56, 863—871
- 26 Troll, W., Sherry, S. et Wachman, J. (1954) *J. Biol. Chem.* 208, 85—93
- 27 Christensen, U. et Müllertz, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 187—198
- 28 Iwamoto, M. et Abiko, Y. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 185, 402—410
- 29 Krebs, G. et Jacquot-Armand, Y. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 929—936
- 30 Sodetz, J.M. et Castellino, F.J. (1972) *Biochemistry* 11, 3167—3171
- 31 Weinstein, M.J. et Doolittle, R.F. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 577—589
- 32 Silverstein, R.M. (1975) *Anal. Biochem.* 65, 500—506
- 33 Rinderknecht, H., Fleming, R.M. et Geokas, M.C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 377, 158—165
- 34 Barrett, A.J. et Starkey, P.M. (1973) *Biochem. J.* 133, 709—724