

Action de l'actinomycétine sur le fibrinogène et la fibrine,

Note de JEAN-MARIE GHUYSEN, présentée par MAURICE WELSCH.

Nous avons montré avec G. Léger (1*) que les multiples activités bactériolytiques et protéolytiques de l'actinomycétine (2*) sont attribuables à des enzymes distincts, beaucoup plus étroitement spécifiques que la trypsine. Le plasma citraté, puis coagulé par recalcification, est digéré lorsqu'il est mis en incubation avec l'actinomycétine concentrée. Etant donné les analogies qui ont été soulignées entre la fibrine et l'épidermine (3*), nous nous sommes demandé si l'action fibrinolytique de l'actinomycétine, déjà signalée par Frédéricq (4*), pouvait être attribuée à l'un des enzymes qui attaquent les diverses fractions de cette substance (1*) ou si, au contraire, il s'agissait d'un ferment nouveau distinct.

Matériel et méthodes. — 1. ACTINOMYCÉTINE. — Nous avons utilisé quatre fractions d'actinomycétine, F, C, N et A, à des degrés divers de concentration et de purification, dont la préparation et certaines caractéristiques ont été rapportées ici même (1*). F = actinomycétine brute ; C = actinomycétine concentrée ; N = fraction de C retenue sur sable ; A = fraction de C retenue par le sable et récupérée par élution.

2. FIBRINOGENE. — Il est préparé à partir de sang de bœuf conformément à la technique de Astrup et Darling (5*) modifiée par Astrup et Müllertz (6*). Nous utilisons une solution à 0,1 p. 100 dans un tampon véronal de pH 7,8 et de force ionique 0,05.

3. FIBRINE. — Nous avons préparé la fibrine soit sous forme de coagulum non organisé, en traitant le fibrinogène purifié par la thrombine et en laissant s'opérer la coagulation en masse, soit sous forme fibreuse, rétractée, par battage de plasma de bœuf recalcifié, ou de la solution de fibrinogène purifié additionnée de thrombine. Les fibres sont recueillies par filtration, lavées à l'eau, séchées à 40° entre deux feuilles de papier filtre, et enfin broyées, de telle sorte que l'on puisse en faire une suspension aqueuse relativement stable.

4. RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOGENOLYTIQUE. — A 4,5 ml de la solution de fibrinogène, on ajoute 0,5 ml de préparation enzymatique étudiée, les deux réactifs étant au préalable portés à 37°. Le mélange est maintenu à 37° et des fractions de 1 ml en sont prélevées après des temps d'incubation variés. Ces échantillons sont introduits dans de petits tubes à essai (diamètre 8 mm) contenant 2

(1*) J. M. Ghuisen et G. Léger, *C. R. Soc. Biol.*, 1954, t. 148, p. 1691.

(2*) M. Welsch, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, t. 126, p. 244 ; *Rev. belge Pathol. Méd. expériment.*, 1947, t. 18, suppl. 2.

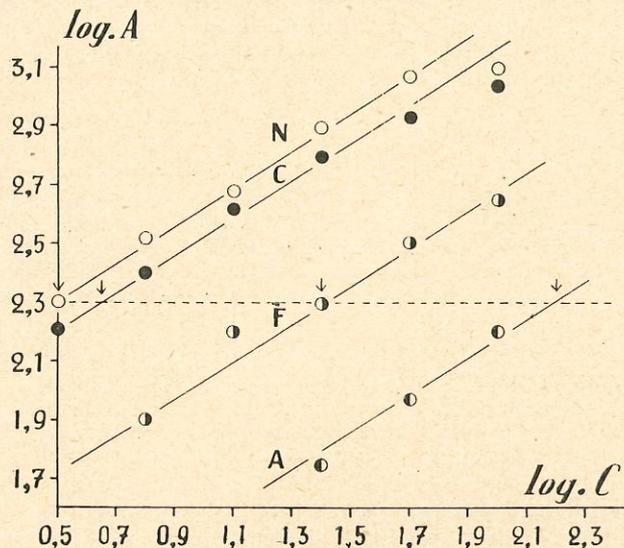
(3*) K. M. Rudall, *Advances in Protein Chemistry*, 1952, t. 7, p. 253.

(4*) P. Frédéricq, *Arch. intern. Physiol.*, 1952, t. 52, p. 73 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, t. 140, p. 1165.

(5*) T. Astrup et S. Darlin, *Acta Physiol. Scand.*, 1942, t. 4, p. 45.

(6*) T. Astrup et S. Müllertz, *Arch. Biochem.*, 1952, t. 40, p. 346.

unités de thrombine dans 0,2 ml de soluté physiologique. Après 15 minutes de repos à la température du laboratoire, les échantillons sont coagulés, pour autant que le fibrinogène n'ait pas été détruit par l'actinomycétine. Au contraire, le contenu du tube reste liquide et clair, ou reste liquide mais devient trouble, lorsque le fibrinogène était totalement ou partiellement détruit. Nous définissons la concentration standard (1) comme étant la concentration qui, en 5 minutes, permet encore une coagulation parfaite sous l'influence de la thrombine.



Influence de la concentration enzymatique sur l'étendue de la fibrinolyse.
 En abscisses : log. concentration de la préparation enzymatique (exprimée en p. cent de celle de la solution-mère ; concentration des solutions-mères en γ /ml : F = 9200 ; C = 1000 ; N = 1000 ; A = 525).
 En ordonnées : log. de la mesure de l'aire digérée.

5. RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE. — a) *Fibrine non organisée*. Elle peut être effectuée soit en mesurant le temps nécessaire pour assurer la dissolution d'un coagulum frais de fibrine, soit en mesurant l'étendue de la digestion d'un film fraîchement préparé de fibrine par une quantité fixe de la préparation examinée (7*). La deuxième méthode étant plus sensible et plus précise (6), nous lui avons donné la préférence.

On ajoute 20 unités de thrombine à 9 ml de la solution de fibrinogène et l'on introduit immédiatement le mélange dans une boîte de Petri (diamètre : 90 mm). Après coagulation du film, on dépose à sa surface une quantité déterminée (0,03 ml) de la solution enzymatique étudiée, soit au moyen d'une pipette calibrée, soit au moyen des

(7*) M. Permin, *Acta physiol. scand.*, 1950, t. 20, p. 388.

« fisch spine beads » recommandés par Humphrey et Lightbown (8*). Après incubation à 37° pendant 20 heures, on peut observer une zone de digestion plus ou moins circulaire dont on mesure l'étendue par le produit des longueurs en mm de deux axes perpendiculaires entre eux. L'épreuve est faite en triple sur une même boîte et l'on prend la moyenne des trois résultats obtenus. Cette valeur (A), mesure de l'activité fibrinolytique, est liée à la concentration de l'enzyme (C) par une relation de la forme $A = k.c^n$. Pour les quatre préparations enzymatiques étudiées, la valeur de la constante n était identique, ainsi que le montre la figure. Nous pouvons donc définir arbitrairement une concentration standard pour l'activité fibrinolytique : c'est la concentration minimale qui, dans les conditions expérimentales choisies, permet d'obtenir une valeur de log A égale à 2,3.

Substrat	A				B		
	Concentration standard en γ /ml pour les fractions				Activité relative (en pour cent de celle de la fraction N) des fractions		
	F	C	N	A	A	C	F
Fibrinogène.....	76,70	1,25	0,83	26,25	1,10	67	3,2
Fibrine (coagulum frais).....	2530	44,6	31,6	661	1,25	71	4,8
Caséine.....	431	5,6	4,5	79	1,0	80	5,7
Fibrine battue :							
de fibrinogène purifié	460	25,6	50	131	11	195	38
de plasma brut.....	368	18,8	34,2	75	9,3	182	46
Kératine.....	1840	60	135	289	7,3	225	47

b) *Fibrine rétractée*. La digestion à 37° de la suspension de fibrine en tampon phosphaté, M/30, de pH 8, est mesurée par la méthode néphélométrique. La cinétique est d'ordre un pour les quatre préparations étudiées, dans certaines limites. Tenant compte de celles-ci, la concentration standard est définie comme étant la concentration minimale qui, en 10 minutes, assure une réduction de trouble de 50 p. 100.

Résultats expérimentaux. — 1) Les concentrations standard pour chacun des substrats étudiés et pour chacune des préparations examinées sont consignées dans la partie A du tableau. On y joint, à titre comparatif, les valeurs correspondantes pour les activités caséinolytique et kératinolytique. On peut voir que le processus de concentration de l'actinomycétine assure une notable purification des agents actifs. L'adsorption sur sable ne permet toutefois pas de sépa-

(8*) J. H. Humphrey et L. W. Lightbown, *J. gener. Microbiol.*, 1952, t. 7, p. 129.

rer complètement les divers principes actifs en cause, et, pour certains d'entre eux, cette opération aboutit même à une certaine perte, soit par défaut d'éluion, soit par véritable inactivation.

2) Dans la partie B du tableau, nous avons exprimé les activités relatives des préparations F, C et A, en fonction de celles de la préparation N ($100 \times$ concentration standard de N/concentration standard de la préparation considérée).

3) On constate que les activités relatives des diverses fractions à l'égard de la fibrine rétractée sont du même ordre de grandeur que pour la kératine. On peut en conclure que l'enzyme kératinolytique est vraisemblablement responsable de la digestion de la fibrine rétractée.

4) Par contre, les activités relatives de ces diverses fractions à l'égard de la fibrine non organisée et du fibrinogène sont du même ordre de grandeur que pour la caséine. On peut en conclure que l'enzyme caséinolytique est responsable de la digestion de la fibrine non organisée et de celle du fibrinogène.

5) La digestion par l'actinomycétine d'un coagulum frais, obtenu à partir de sang complet ou de plasma, exige un temps plus prolongé et une concentration plus élevée que celle d'un coagulum fraîchement préparé à partir de fibrinogène purifié. Cette différence est attribuable au fait que l'enzyme caséinolytique, responsable de la lyse du caillot, possède une affinité pour d'autres protéines présentes dans le sang ou le plasma.

6) Grâce à ses principes caséinolytique et kératinolytique, dissolvant respectivement la fibrine native et la fibrine rétractée, l'actinomycétine de *Streptomyces albus* G pourrait avoir des applications pratiques analogues à celles de la streptokinase, dont l'activité, indirecte, résulte de sa capacité d'activer le plasminogène en plasmine (9*).

Conclusions. 1) Le principe caséinolytique de l'actinomycétine de *Streptomyces albus* G est capable de digérer rapidement la fibrine non organisée (coagulum frais), préparée à partir de fibrinogène purifié.

2) Son activité est moins intense vis-à-vis de caillots obtenus à partir de sang complet ou de plasma, par suite de l'affinité d'autres protéines pour l'enzyme.

3) Le principe kératinolytique qui l'accompagne est capable de digérer la fibrine rétractée, obtenue par battage (*).

(Laboratoire de Microbiologie générale et médicale de l'Université de Liège et du C.R.P.A. ; Laboratoires de Recherches de la Société Labaz, Bruxelles).

(9*) L. R. Christensen, *J. gener. Physiol.*, 1945, t. 28, p. 363.

(*) Nos remerciements à l'I.R.S.I.A. qui a subsidié ces recherches.