

ACTION DES ULTRASONS SUR UNE OXYDASE

par

P. GRABAR, I. VOÏNOVITCH* ET R. O. PRUDHOMME

Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

Les ultrasons (U.S.) provoquent la désintégration des cellules, et, tout particulièrement, des microorganismes. Cette propriété peut être utilisée et l'a été pour l'obtention d'extraits microbiens riches en antigènes ou en enzymes. Mais cette désintégration, due aux effets mécaniques de la cavitation, est accompagnée d'une activité chimique des U.S.

Dans des publications antérieures, deux d'entre nous ont mis en évidence les modifications importantes que subissent les protéines, ainsi que des composés plus simples^{1, 2}, et ont proposé une explication du mécanisme de l'action oxydante des U.S.^{3, 4, 5}. Ce mécanisme serait le suivant: les charges électriques qui prennent naissance sur les parois des bulles de gaz engendrées par la cavitation, provoquent des effluves (accompagnées de luminescence). Il s'ensuit une forte ionisation de l'eau et la formation de radicaux libres (comme dans le cas des rayons X) de grande activité chimique. Ainsi les noyaux aromatiques sont attaqués, les composés éthyléniques sont saturés, diverses oxydations ont lieu, etc. D'une manière générale, l'activité mécanique (p. ex., destruction des microbes) des U.S. est plus rapide que ces effets chimiques.

On pouvait s'attendre à ce que des enzymes soient inactivés par les U.S. C'est ce que nous avons essayé de contrôler en nous adressant à un enzyme assez labile, une polyphénoloxydase du champignon *Agaricus campestris*.

Nos recherches nous ayant montré, d'autre part, que les actions chimiques des ultrasons sont supprimées en absence de cavitation et aussi presque toujours lorsqu'on opère en présence d'hydrogène dans la phase gazeuse, nous avons également essayé de nous rendre compte si, dans ce cas, on observe cet effet protecteur.

Nous croyons que ces expériences présentent un certain intérêt parce qu'elles montrent que l'on doit tenir compte d'un éventuel effet destructeur des ultrasons, lorsqu'on s'adresse à eux pour obtenir un extrait contenant des enzymes.

TECHNIQUES

1. *Préparation des solutions enzymatiques.* Nous avons suivi ici la méthode de KEILIN ET MANN⁶, en partant de 5 kg de champignons frais (*Agaricus campestris*). Nous avons été amenés toutefois à employer des quantités d'acétate de plomb et de gel de phosphate tricalcique légèrement différentes de celles utilisées par ces auteurs, et nous avons arrêté nos essais de purification avant la précipitation par l'acétone car, à ce stade, nous observions des altérations de l'enzyme. Nous avons jugé que le matériel obtenu, qui possédait

* Laboratoire de l'Ecole technique de la Conserve, Paris.

une activité enzymatique 200 fois supérieure à celle du jus initial, était suffisamment purifié pour pouvoir servir dans les expériences envisagées.

2. *Mesure de l'activité oxydasique.* Nous avons utilisé une méthode colorimétrique, basée sur l'oxydation du pyrogallol en purpurogalline, similaire à la méthode introduite par WILLSTÄTTER⁷.

On ajoute à une solution de 1 g de pyrogallol bisublimé dans 250 ml d'eau distillée (exempte de cuivre) une quantité de solution enzymatique calculée de manière à obtenir entre 2 et 5 mg de purpurogalline. On agite à l'air dans une ampoule à décantation durant 5 min à 20°; l'oxydation est alors arrêtée par 5 ml d'une sol. d'acide sulfurique à 20%. On extrait alors par de l'éther chimiquement pur la purpurogalline formée. On complète à 100 ml avec ce solvant et on prélève la quantité nécessaire pour la mesure colorimétrique en ayant soin de filtrer le liquide sur un petit entonnoir à longue tige garni d'un filtre sans cendres (DURIEUX), afin de retenir l'eau contenue dans l'éther et de clarifier éventuellement la solution. Les mesures colorimétriques ont été faites avec un électrophotomètre à cellules au Sélénium montées en opposition et les déviations lues au tambour de l'appareil ont été comparées avec une courbe étalon de purpurogalline, obtenue par oxydation du pyrogallol avec du bichromate de potassium.

L'activité a été exprimée en PN (Purpurogallin Number), qui représente la quantité en mg de purpurogalline formée à partir du pyrogallol en 5 min, à 20°, par mg du poids sec de la préparation enzymatique.

Dans nos expériences nous avons utilisé des dilutions (activité comprise entre 3 et 8 PN) de solutions purifiées ayant des activités d'environ 35 P.N.

3. *Ultrasons.* Nous utilisons dans toutes nos études un appareillage à quartz piezoélectrique construit par la maison S.C.A.M.⁸, qui diffère des autres installations par le fait que le faisceau ultrasonore se dégage directement dans l'eau, ce qui présente certains avantages dans l'étude de produits biologiques. Sa puissance ultrasonore est de 76 watts. La fréquence utilisée dans cette étude a été de 960 Kc/sec.

Les solutions d'oxydase (généralement 30 ml) ont été placées dans une cloche en verre, décrite précédemment¹, dont le fond est constitué par une fine membrane en nitrocellulose, imperméable à l'eau, mais transparente pour les ultrasons. Afin d'éviter l'échauffement du liquide, la cloche a été maintenue pendant l'ultrasonation dans un bain d'eau glacée.

La phase gazeuse au-dessus de la solution étudiée a été, soit de l'air, soit de l'hydrogène. Ce dernier, débarassé

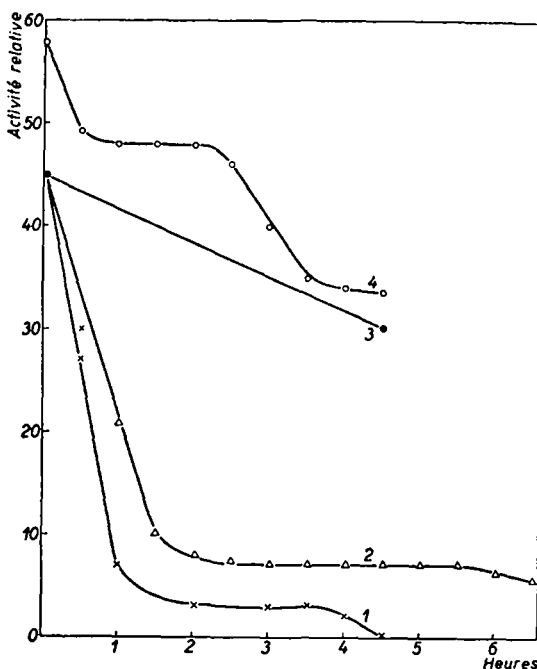


Fig. 1. Activités relatives (les nombres correspondent à des divisions du photomètre) des solutions enzymatiques en fonction du temps d'action: des ultrasons dans l'air (courbe 1); des ultrasons dans l'hydrogène (courbe 2); des ultrasons sans cavitation (3) et de l'agitation avec barbotage d'air (4).

par un barbotage dans une solution de pyrogallol potassique des traces d'oxygène qu'il contient, a été introduit dans la cloche après un dégazage du liquide dans le vide; cette opération a été répétée trois fois pour éliminer l'air aussi complètement que possible.

Des prélèvements du liquide soumis aux ultrasons ont été faits à des temps connus, afin de suivre l'inactivation en fonction du temps. Lorsqu'on travaillait en présence d'hydrogène, on procédait au dégazage et au remplacement de l'air par de l'hydrogène après chaque prélèvement.

Dans l'expérience témoin, où l'on soumettait la solution de l'enzyme à l'action de l'onde ultrasonore sans cavitation, on a utilisé un dispositif spécial, décrit dans un travail antérieur¹; le liquide préalablement dégazé s'y trouve inclus sans phase gazeuse entre deux membranes dans un récipient cylindrique.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Deux séries d'expériences ont été effectuées en utilisant des solutions d'oxydase ayant des activités différentes. Les résultats ont été similaires. Dans chaque série on soumettait les solutions à l'action des ultrasons, d'une part, en présence d'air et, d'autre part, en présence d'hydrogène, après élimination aussi complète que possible de l'air. Les essais témoins ont été faits, d'une part, en faisant agir les U.S. sur une solution d'oxydase placée dans un récipient cylindrique entièrement rempli de liquide et dégazé, ce qui avait pour but d'éviter l'effet de la cavitation, et d'autre part, en soumettant des solutions d'oxydase soit à une agitation mécanique en présence d'air, soit à un barbotage intense d'air et à une agitation simultanée.

Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la Fig. 1.

DISCUSSION

Les solutions enzymatiques employées ne sont pas stables, elles se conservent mal et dans tous nos essais on notait une baisse de l'activité. Mais, si dans les essais témoins (agitation ou action des U.S. sans cavitation) l'inactivation était relativement lente, elle se produisait extrêmement vite sous l'action des U.S. en présence d'air. Ce résultat ne nous étonne pas, puisque de nombreux exemples nous ont montré les effets oxydants des ultrasons et que nous connaissons la sensibilité de l'enzyme employé à des actions oxydantes. Nous soulignerons toutefois la rapidité de l'inactivation. Ce qui est plus étonnant, c'est que l'hydrogène n'ait pas protégé l'enzyme contre les effets des ultrasons; il a cependant ralenti très sensiblement l'inactivation. Or, dans nos expériences antérieures, nous avons généralement constaté que la présence d'hydrogène dans la phase gazeuse empêchait les effets oxydants de se manifester. Jusqu'à présent, nous n'avons observé que deux cas où cette règle ne s'était pas vérifiée: a) l'hydrate manganique brun, c'est-à-dire s'oxyde en hydrate manganique, même en présence d'hydrogène, bien que beaucoup plus lentement qu'en présence d'air, et b) l'hémagglutinine de *Hemophilus pertussis* est inactivée même en présence d'hydrogène, tandis que la toxine scarlatineuse est protégée dans ces conditions (l'agglutinogène persiste même en présence d'air)².

Si nous croyons avoir proposé une explication plausible du mécanisme des actions oxydantes des U.S.⁴, l'effet de l'hydrogène n'a pas encore été bien expliqué. Il n'est pas impossible qu'il y ait des niveaux différents pour différents accepteurs des produits

oxydants qui se forment dans l'eau sous l'effet des U.S., l'hydrate manganeux étant un accepteur plus puissant que l'hydrogène et ce dernier, à son tour, étant plus actif que le noyau benzénique, etc. Si cette hypothèse est exacte, l'oxydase que nous avons étudiée et l'hémagglutinine de *H. pertussis* auraient une sensibilité voisine de celle de l'hydrate manganeux et on est tenté de se demander si ce n'est pas le composé métallique de l'oxydase qui en est la cause.

Notons que, sous l'effet des U.S., les solutions d'oxydase brunissent et que des essais de réactivation à l'aide du sulfate de cuivre et de la gélatine de l'enzyme¹⁰, inactivé par les U.S., n'ont pas donné de résultat.

Une autre explication de l'absence de protection par l'hydrogène serait que, dans ce cas, il s'agirait, non pas de l'effet chimique des U.S., mais de l'action mécanique de la cavitation (comme la désintégration des microbes et, probablement, la dégradation des hauts polymères), qui n'est pas influencée par l'hydrogène. Dans l'état actuel de nos connaissances nous ne pouvons pas décider lequel des deux mécanismes connus est en cause ici, mais il nous paraît peu probable qu'il s'agisse d'une action mécanique, étant données les dimensions relativement petites de la molécule d'oxydase.

Avant de conclure, nous voudrions insister sur le fait que nos observations peuvent éventuellement dépendre de notre appareillage, de sa puissance et de la fréquence employée. D'autre part, l'enzyme étudié est particulièrement labile. Il n'est donc pas impossible, et des publications d'autres auteurs le prouvent, d'obtenir à l'aide des U.S. des extraits de cellules contenant des enzymes actifs. Mais ce que nous voulions souligner, c'est que sous l'effet des U.S., certains enzymes peuvent être irréversiblement inactivés et que, par conséquent, si un extrait ne contient pas un enzyme que l'on cherche, cela ne veut pas dire nécessairement qu'il n'existait pas dans la cellule.

RÉSUMÉ

Les ultrasons (fréquence 960 Kc/sec; intensité 76 watts) inactivent très rapidement des solutions aqueuses de polyphénoloxydase de *Agricus campestris* purifiée, en présence d'air. Contrairement à ce qui se passe dans de nombreux autres cas, l'hydrogène ne protège pas, mais ralentit seulement cette inactivation, qui est probablement due à l'activité chimique des U.S. Cet exemple montre que l'extraction d'enzymes de cellules à l'aide des U.S. peut être accompagnée éventuellement de leur complète inactivation.

SUMMARY

Ultrasonic waves (frequency 960 Kc/sec; intensity 76 Watts) very rapidly inactivate in air aqueous solutions of the purified polyphenoloxidase of *Agaricus campestris*. In this case, on contrast to many others, hydrogen does not prevent but only slows down this inactivation probably due to the chemical activity of the ultrasonic waves. This example shows that extraction of enzymes from cells by ultrasonic waves may possibly be accompanied by complete inactivation of the enzymes.

ZUSAMMENFASSUNG

Ultraschallwellen (Frequenz 960 Kc/Sek; Intensität 76 Watt) inaktivieren an der Luft sehr schnell wässrige Lösungen gereinigter Polyphenoloxydase aus *Agaricus campestris*. Zum Unterschied von vielen anderen Fällen, schützt in diesem Falle Wasserstoff nicht gegen die Inaktivierung, sondern verlangsamt sie nur; diese Inaktivierung scheint durch die chemische Wirkung der Ultraschallwellen bedingt zu werden. Dieses Beispiel lehrt, dass die Extraktion von Enzymen aus Zellen mit Hilfe von Ultraschallwellen gegebenenfalls von einer vollständigen Inaktivierung der Enzyme begleitet sein kann.

Bibliographie p. 416.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. O. PRUDHOMME ET P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 122.
- ² P. GRABAR ET R. O. PRUDHOMME, *J. chim. phys.*, 49 (1947) 145.
- ³ P. GRABAR ET R. O. PRUDHOMME, *Compt. rend. acad. sci.*, 226 (1948) 1821.
- ⁴ R. O. PRUDHOMME ET P. GRABAR, *J. chim. phys.*, (sous presse).
- ⁵ R. O. PRUDHOMME, *J. chim. phys.*, (sous presse).
- ⁶ D. KEILIN ET T. MANN, *Proc. Roy. Soc.*, B 125 (1938) 187.
- ⁷ R. WILLSTÄTTER ET H. HEISS, *Liebigs Ann. Chem.*, 433 (1923) 17.
- ⁸ A. DOGNON ET C. FLORISSON, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 97.
- ⁹ TOURNIER, *Thèse de Doctorat en médecine*, Paris 1948.
- ¹⁰ H. NELSON ET C. R. DAWSON, *Advances in Enzymol.*, 4 (1946) 99.

Reçu le 3 janvier 1949