

**Quelques propriétés de l'hyaluronidase extraite et purifiée
à partir de l'espèce Engraulis encrasicolus ponticus
de la mer Noire**

Natalia ROSOIU

Institut Roumain de Recherches Marines, Constantza (Roumanie)

SUMMARY :

The hyaluronidase obtained from viscera and gonads of Engraulis encrasicolus ponticus by extraction in buffer $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ at pH 4.3 and precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 75% saturation, dialysis, aseptic filtration and lyophilisation, has an enzymatic activity of at least 300 IU/mg at pH 4.7 to 5.0 and 37°C and of 62 IU/mg at pH 6.45 and 37°C respectively. The enzyme has a maximum activity in the pH domain ranging between 3.6 and 5.6 and optimum pH at 4.2 to 4.4, 4.8 to 5.2 and 5.6. The optimum temperatures occur at 40° and 60°C and the enzyme shows a high degree of thermostability. The most efficient activator of this hyaluronidase is NaCl. It produces a highest activation at a concentration of 0.3M by an optimum pH action of 4.4 and an optimum temperature of 60°C.

L'hyaluronidase a été extraite et purifiée des viscères, y compris les gonades, du petit poisson Engraulis encrasicolus ponticus au cours de la période de maturation des gonades, quand l'activité hyaluronidase atteint un maximum (ROSOIU et coll., 1985a), par un procédé qui consiste dans l'extraction de l'enzyme en tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ à un pH de 4.3 (qui permet l'extraction sélective de l'enzyme, étant le milieu optimal d'extraction de l'hyaluronidase), puis précipitation avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à une saturation de 75%, dialyse en courant continu d'eau distillée, filtration aseptique et lyophilisation. On obtient une hyaluronidase pure avec une activité enzymatique d'au moins 300 UI/mg à un pH de 4.7-5.0 et à 37°C, et respectivement 62 UI/mg à un pH de 6.4 et à 37°C.

Le domaine des concentrations enzymatiques où la vitesse de réaction varie proportionnellement s'étend seulement jusqu'à 0.008 mg d'hyaluronidase dans le milieu de réaction, suivi ensuite d'une inhibition due probablement aux produits de réaction.

L'hyaluronidase extraite et purifiée des viscères, y compris les gonades, d'Engraulis encrasicolus ponticus manifeste une activité enzymatique dans l'intervalle de pH 3.6-8.0. Le maximum d'activité est enregistré dans l'intervalle de pH compris entre 3.6 et 5.6, avec le pH optimal d'action 4.2-4.4; 4.8-5.2, 2 et 5.6 (ROSOIU et coll., 1987).

Par rapport aux données obtenues dans le cas des extraits non purifiés (ROSOIU et VOINESCU, 1985 b, 1986), on constate l'activité maximale dans le même intervalle de pH, ainsi que des valeurs optimales d'action du pH très proches, bien que les courbes de vitesse de réaction selon le pH soient un peu différentes entre elles.

Tant l'hyaluronidase purifiée que celle non purifiée, manifestent une activité maximale à 40°C et à 60°C, fait dû probablement à certains phénomènes d'activation qui ont lieu à des températures plus élevées. Les deux préparations enzymatiques manifestent un haut degré de thermostabilité.

La vitesse de réaction augmente selon une fonction hyperbolique jusqu'à seulement 62.5 µg de hyaluronate de sodium dans le milieu de réaction. A des concentrations plus élevées du substrat, on observe un phénomène d'inhibition accentuée, dû probablement à l'inhibition par les produits de réaction. Un phénomène similaire a été constaté aussi pour l'hyaluronidase non purifiée.

Par rapport à l'hyaluronidase non purifiée, la vitesse de réaction est directement proportionnelle au temps de réaction, l'ordre de réaction n'étant pas modifié.

Le plus efficace activateur de l'hyaluronidase extraite et purifiée de l'Engraulis encrasicolus ponticus est le NaCl, qui produit une activation maximale à la concentration de 0.3M dans le milieu de réaction, avec un pH optimal d'action de 4.4 et une température optimale d'action de 60°C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- ROSOIU N., SERBAN M., VOINESCU I., 1985 a - Cercetari marine (Recherches marines), 18, 245.
ROSOIU N., SERBAN M., VOINESCU I., POPESCU M., 1987 - Rev.roum.Biochim., 24, 1, 61.
ROSOIU N., VOINESCU I., 1985 b - Cercetari marine (Recherches marines), 18, 235.
ROSOIU N., VOINESCU I., 1986 - Rapp.Comm.int.Mer Médit., 30, 2.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 31, 2 (1988).

**Propriétés chimiques et pharmacologiques
d'un inhibiteur naturel de la pepsine
extrait du Gastéropode Rapana thomasiana Grosse**

Natalia ROSOIU*, A. CARSTEANU** et M. ZODIANU**

* Institut Roumain de Recherches Marines, Constantza (Roumanie)
** Institut de Recherches Chimico-Pharmaceutiques, Bucarest (Roumanie)

SUMMARY :

The paper presents some data on chemical composition and some pharmacological properties of the natural inhibitor of pepsin that was extracted and purified from the marine gastropod Rapana thomasiana Grosse. The natural inhibitor of pepsin shows an intense inhibitory effect on this enzyme and, in addition, displays very important pharmacological properties.

Les données publiées antérieurement sur l'inhibiteur naturel de la pepsine, isolé et purifié de Rapana thomasiana Grosse, prouvent sa nature peptidique. Il a les propriétés suivantes :

- 1) il manifeste une intense activité d'inhibition vis à vis de la pepsine,
- 2) il exerce une inhibition de type non-compétitif,
- 3) il entre instantanément en réaction avec l'enzyme,
- 4) l'activité d'inhibition de la pepsine n'est pas dépendante du degré de pureté du produit, etc (ROSOIU et al., 1982; ROSOIU, 1985).

Dans ce travail nous présentons de nouvelles données concernant les caractéristiques chimiques et certaines propriétés pharmacologiques de l'inhibiteur naturel de la pepsine extrait et purifié du gastéropode marin Rapana thomasiana Grosse.

L'isolation et la purification de l'inhibiteur naturel de la pepsine ont été effectuées suivant un procédé original, le produit bioactif étant obtenu, conformément à la technologie, sous forme de :

- 1) - poudre amorphe de couleur jaune à brun-rougeâtre (P),
- 2) - solution opalescente jaune, ayant une odeur caractéristique et un résidu actif de 0.54 g% (S).

Dans les deux formes, les produits manifestent une intense action inhibitrice vis à vis de la pepsine : 200 µg d'inhibiteur inhibent en proportion de 80-100% 400 µg de pepsine étalon, le rapport enzyme/inhibiteur (E/I) étant 2/1.

A côté des peptides, qui constituent le principe bioactif, les produits contiennent des acides aminés libres, glucides (hexoses, pentoses, méthylpentoses) et des micro-éléments (Na, K, Ca, Mg, Cu, Zn et Fe).

Le produit sous forme de solution (S) présente une action hypnotique en fonction de la teneur en substance active, et manifeste un effet d'augmentation de l'action d'inhibition des barbituriques, ce qui suppose une activité tranquillisante-neuroleptique. Ces actions se manifestent fortement aux doses élevées et moins aux faibles doses (1/10 de DL_{50}).

L'administration p.o. du produit sous forme de poudre (P) en doses relativement faibles, de 56 mg/kg, empêche l'apparition des lésions ulcéreuses dans les deux cas d'ulcères (par la ligature du pylore et réserpinique). En même temps, dans l'ulcère par la ligature du pylore on constate la diminution du volume du liquide gastrique et de l'activité du liquide de l'estomac.

Les actions pharmacologiques, spécifiques sous l'aspect de l'intensité et des paramètres modifiés, s'expliquent par la composition chimique différente, selon la technologie utilisée en vue de l'obtention de l'inhibiteur naturel de la pepsine, sous forme de poudre (P) et de solution (S), respectivement. (ROSOIU et al., 1985).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- ROSOIU N., SERBAN M., PANAIT M., 1982 - Cercetari marine (Recherches marines), 15, 235.
ROSOIU N., 1985 - Rapp.Comm.int.Mer Médit., 29, 6, 21.
ROSOIU N., CARSTEANU A., ZODIANU M., PANAIT M., 1985 - Cercetari marine (Recherches marines), 18, 221.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 31, 2 (1988).