

Caractéristiques biochimiques et spectrales de l'Hyaluronidase extraite et purifiée de l'espèce *Engraulis encrassicolus ponticus* du Littoral Roumain de la Mer Noire

Natalia ROSOIU et Mircea CRASMARU

Institut Roumain de Recherches Marines, Constanta (Roumanie)

SUMMARY

The hyaluronidase extracted and purified from the *Engraulis encrassicolus ponticus* viscera and gonads is a homogenous enzyme preparation. Its degree of purity is similar to that of the Merck hyaluronidase. The spectral characteristics and the electrophoretic pattern in agarose gels, in veronal buffer pH 8.9, of the two enzymes are similar, suggesting that there is a structural resemblance between the fish and the bovine testis hyaluronidase. At a nearly neutral pH, that is identical to that of the body fluids, the purified fish hyaluronidase exhibits a high enzyme activity "in vitro" of at least 50 USP/mg and at the same time a high specific activity "in vivo" for the depolymerization of the conjunctive tissue similar to the imported injectable drug "Hyason".

Dans nos travaux antérieurs nous avons présenté des données concernant l'extraction et la purification de l'hyaluronidase des poissons *Engraulis encrassicolus ponticus*, *Odontogadus merlangus eulinus* et *Sprattus sprattus sprattus* (ROSOIU et al., 1985 a), la cinétique enzymatique en absence et en présence d'un activateur (ROSOIU et al., 1985 b, 1986 a, b, 1987), ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de l'hyaluronidase extraite et purifiée de l'espèce *Engraulis encrassicolus ponticus* (ROSOIU et al., 1986 c).

Afin d'obtenir une enzyme à haute pureté utilisable dans l'industrie pharmaceutique, nous avons continué les recherches sur l'hyaluronidase extraite et purifiée à partir de l'espèce *Engraulis encrassicolus ponticus*, en initiant une étude biochimique et spectrale qui sera comparée à l'hyaluronidase obtenue des testicules de bovins (réactif Merck et médicament injectable d'importation "Hyason").

Les valeurs d'absorption mesurées à 230-300 nm de quelques solutions aqueuses d'hyaluronidase des testicules de bovins (réactif Merck) et d'hyaluronidase de poisson, de 300 UI/ml, sont très proches, les variations s'inscrivant en $\Delta E = 0,008$. Les absorptions à 280 nm et à 260 nm, pour les deux hyaluronidases, s'inscrivent dans les limites admises par la Pharmacopée Britannique. Les différences entre les valeurs d'absorption à 270 nm et à 290 nm sont très proches, étant respectivement de 0,045 pour l'hyaluronidase testiculaire et de 0,040 pour celle obtenue du poisson.

De l'examen des spectres en UV des deux hyaluronidases, on observe que l'allure des courbes est presque identique, présentant une bande d'absorption entre 260 nm et 290 nm, caractéristique pour les transitions du type n-n' spécifiques des liaisons hétérogènes. À 278 nm on obtient les maximums d'absorption identiques, ce qui suppose l'existence d'un composant hétérocyclique dans les deux préparations.

L'examen des spectres en IR prouve que les bandes d'absorption des deux hyaluronidases se trouvent dans des domaines voisins, et l'allure des courbes est semblable; on remarque néanmoins certaines bandes avec des domaines différents d'absorption, à savoir: 1530-1610 cm^{-1} , 2900-3400 cm^{-1} pour l'hyaluronidase des testicules de bovins (réactif Merck), et 1060-1110 cm^{-1} , 1310-1320 cm^{-1} pour l'hyaluronidase extraite et purifiée des viscères de poisson. En même temps, on observe certaines bandes qui apparaissent dans des domaines du même ordre de grandeur, mais légèrement déplacées, et l'absorption maximale à des longueurs d'onde voisines (1280-1340 cm^{-1} et l'absorption maximale à 2200 cm^{-1} pour l'hyaluronidase animale, contre 1220-1300 cm^{-1} et l'absorption maximale à 2300 cm^{-1} pour l'enzyme extraite du poisson).

Nous sommes d'avis que ces données, ainsi que l'allure des courbes, un peu différentes dans le domaine 1000-1160 cm^{-1} , sont dues à la présence de certains ingrédients de stabilisation dans l'enzyme animale, qui manquent dans le cas de l'enzyme extraite du poisson.

Les électrophorogrammes obtenus par migration en gel d'agarose en tampon barbiteur, à un pH de 8,9, mettent en évidence le même nombre de fractions protéiques, une répartition similaire et des mobilités identiques, les deux hyaluronidases étant des produits enzymatiques homogènes.

En conclusion, malgré les différences spectrales signalées, en raison des caractéristiques de similitude nombreuses, nous estimons que les deux hyaluronidases analysées présentent des similitudes structurales. En même temps, la teneur relativement grande en calcium nous autorise à considérer l'hyaluronidase provenant d'anchois comme une Ca-enzyme, formée de 16 acides aminés, parmi lesquels prédominent la cystine, la cystéine, la tyrosine, l'asparagine et la méthionine. La teneur élevée des groupements -SH et -S-S, donnée par les acides aminés soufrés, confère à l'hyaluronidase de poisson un haut degré de thermostabilité et une activité maximale à +40°C et +60°C (ROSOIU et al., 1986 c, 1987).

À un pH voisin de la neutralité, identique à celui des liquides de l'organisme, l'hyaluronidase d'anchois manifeste une intense activité enzymatique "in vitro", d'au moins 50 USP/mg et 25 UI/mg respectivement, et, en même temps, une intense activité spécifique "in vivo", de dépolymérisation du tissu interstitiel, semblable à celle de l'échantillon d'importation: le médicament injectable "Hyason" (ROSOIU et al., 1989).

Références bibliographiques

- ROSOIU N., SERBAN M., VOINESCU I., 1985 a - Cercetări Marine (Recherches marines), IRCM Constanța, 18, 245.
 ROSOIU N., VOINESCU I., 1985 b - Cercetări Marine (Recherches marines) IRCM Constanța, 18, 235.
 ROSOIU N., VOINESCU I., 1986 a - Rapp.Comm.int.Mer Médit., 30, 2.
 ROSOIU N., PANAIT M., 1986 b - Cercetări Marine (Recherches Marines), IRCM Constanța, 19, 165.
 ROSOIU N., CRASMARU M., PANAIT M., 1986 c - Cercetări Marine (Recherches Marines), IRCM Constanța, 19, 157.
 ROSOIU N., SERBAN M., VOINESCU I., POPESCU M., 1987 - Rev.roum.Biochim., 24, 1, 61.
 ROSOIU N., SERBAN M., TANASESCU M., POPESCU M., CRASMARU M., 1989 - Rev.roum.Biochim., 26, 2, 145.