

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 euxinus* 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- $\pi$  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: 1570-1610  $\text{cm}^{-1}$ , 2900-3400  $\text{cm}^{-1}$  pour l'hyaluronidase des testicules de bovins (réactif Merck) et 1060-1110  $\text{cm}^{-1}$ , 1310-1320  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$  et l'absorption maximale à 2200  $\text{cm}^{-1}$  pour l'hyaluronidase animale, contre 1220-1300  $\text{cm}^{-1}$  et l'absorption maximale à 2300  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$ , 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 barbitturé, 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 cystéine, 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 Constanta, 18, 245.  
ROSOIU N., VOINESCU I., 1985 b - Cercetări Marine (Recherches marines) IRCM Constanta, 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 Constanta, 19, 165.  
ROSOIU N., CRASMARU M., PANAIT M., 1986 c - Cercetări Marine (Recherches marines), IRCM Constanta, 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.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 32, 1 (1990).

La biocalcification chez le Corail rouge, *Corallium rubrum*.  
2. Approches Biochimique et Physiologique

Denis ALLEMAND et Marie-Christine GRILLO

Centre Scientifique de Monaco, Laboratoire de Biologie Marine, Musée Océanographique, MC 98000 (Monaco)

Bien que le squelette du Corail rouge de Méditerranée (*Corallium rubrum*) représente sa valeur économique, il est surprenant de constater que son mode de formation n'a jamais été étudié. Afin de tenter de combler cette lacune, le but de notre travail est, par une approche multidisciplinaire, de comprendre les mécanismes de biocalcification chez cette espèce.

Une étude morphologique des tissus à l'origine de la formation des structures calcifiées est présentée dans la commission zoobenthos. Le présent rapport montre nos résultats préliminaires concernant la composition de la matrice organique des structures squelettiques, ainsi qu'une approche physiologique grâce à la mesure de la production d'acidité et de la cinétique d'absorption de calcium par la colonie.

Plusieurs octocoralliaires ont déjà servi de modèle biologique pour étudier la biocalcification (Kingsley et Watabe, 1983, 1989; Goldberg, 1988). Parmi ceux-ci, le Corail rouge présente l'originalité de posséder un axe central entièrement calcifié, alors que celui-ci est en grande partie constitué, chez la plupart des autres espèces, par une matrice comatée de nature protéique faiblement calcifiée (Kingsley et Watabe, 1983). Cette différence fournit donc matière à une étude comparative qui permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de la biocalcification et de son contrôle.

## ANALYSE BIOCHIMIQUE DES STRUCTURES CALCIFIEES

En collaboration avec P. Simon (Musée d'anthropologie préhistorique de Monaco), nous avons montré, par diffractométrie à rayons X, que la phase minérale des deux types de structures calcifiées (spicules et squelette axial) est constituée de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) cristallisé sous la forme de calcite fibreuse. On note aussi la présence d'une faible quantité de magnésium.

Quel que soit le type de formation squelettique, il apparaît qu'elle possède toujours une phase organique (dite matrice organique) liée à la phase minérale, dont la proportion est cependant très variable (de 0,01 % à presque 20 %) (Weiner et al., 1983). Cette matrice organique joue un rôle important dans le contrôle de la biocalcification (Lowenstam et Weiner, 1989). Il est cependant admis dans la littérature que le squelette du Corail rouge manque totalement de matrice organique (Bayer, 1964).

Les fractions squelettiques (spicules et axe) sont obtenues après avoir dissous les tissus (NaOH N). Elles sont ensuite décalcifiées (à l'acide acétique pH4 ou à l'EDTA 0,5M pH8). A ce stade, nous avons obtenu une fraction organique représentant de 0,5 (squelette axial) à 0,9 % (spicules) du poids initial du squelette. Cette matrice organique se présente sous deux formes (séparées par centrifugation 10 000 g):

- l'une insoluble représentant de 55 % (axe) à 59 % (spicules) de la fraction organique,
- l'autre soluble.

L'analyse de cette phase organique montre qu'elle est composée d'environ 70 % de carbohydrates,

25 % de protéines et 5 % de lipides.  
Afin de déterminer le poids moléculaire des protéines des deux fractions, nous avons effectué une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS. Il n'a pas été possible de colorer ces protéines de façon classique (coomassie, argent). Cette difficulté, signalée par Venkatesan et al. (1986) lors de l'isolation de la matrice organique des spicules d'Oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*), a été contournée en réalisant une iodation des protéines. Il semblerait qu'une protéine de 50 kD soit présente dans les deux phases. La phase insoluble possède en outre une (des) protéine(s) de haut poids moléculaire (sup. à 300 kD).

La proportion de matrice organique trouvée dans les structures squelettiques du Corail est cependant très inférieure à celle d'autres Octocoralliaires pour lesquels des valeurs de 4 à 6 % dans les spicules ont été rapportées (Kingsley et Watabe, 1983; Goldberg, 1988). Les valeurs que nous avons trouvées se rapprochent beaucoup plus des coquilles de Mollusques (Cariou et Morse, 1988) ou des pièces squelettiques d'Oursin (Weiner et al., 1983).

CINETIQUE D'ABSORPTION DE  $^{45}\text{Ca}$  PAR UNE COLONIE

Nous avons suivi l'incorporation de  $^{45}\text{Ca}$  dans les différents compartiments d'une colonie de Corail rouge (tissus, squelette axial, spicules) de 30 minutes à 24 heures. L'équilibre isotopique est atteint dans les tissus en 5 heures environ. A partir de ce moment, on peut estimer que les RAS se sont équilibrés entre le calcium tissulaire et le calcium dans l'eau de mer. Le dépôt de calcium dans les structures squelettiques peut alors être calculé (les valeurs de flux de  $^{45}\text{Ca}$  sont calculées par rapport à la quantité de protéines tissulaires de la colonie ou du morceau de colonie étudié):

tissus:	4,96 +/- 0,69 nmol Ca/ (soit 198 ng Ca)/ 24h. mg protéine.
squelette:	6,20 +/- 1,45 nmol Ca (soit 248 ng Ca)/ 24h. mg protéine.
Spicules:	17,10 +/- 3,90 nmolCa (soit 684 ng Ca)/ 24h. mg protéine.

Ces résultats montrent que les spicules sont le siège d'une intense activité de calcification. Afin de déterminer si l'activité de calcification était homogène dans l'ensemble de la colonie, nous avons mesuré la répartition du  $^{45}\text{Ca}$  dans les différents compartiments de l'apex à la base de la colonie. Nos résultats ne montrent que de faibles différences (non significatives) en ce qui concerne le calcium absorbé par les tissus ou déposés sur le squelette axial. Par contre, les spicules présents dans les zones apicales et basales présentent une activité de calcification variant d'un facteur 2 par rapport à la zone médiane de la colonie. La quantité de spicules par rapport à la quantité de protéines reste cependant constante dans toute la colonie. Cette répartition suggère que les zones basales et apicales de la colonie sont le siège d'une spiculogénèse intense. Par contre, la formation de l'axe central est constante de la base à l'apex de la colonie. Kingsley et Watabe (1989) ont montré, chez *Leptogorgia virgulata*, une répartition similaire de l'absorption de  $^{45}\text{Ca}$  au niveau des spicules et des tissus.

Nous avons d'autre part étudié les mécanismes de transport de calcium. Celui-ci est saturable, et possède une affinité pour le calcium ( $K_m$ ) de l'ordre de 6 mM.

EVOLUTION DE L'EXCRETION D' $\text{H}^+$  PAR UNE COLONIE

Afin de mesurer l'activité métabolique générale d'une colonie de Corail, nous avons mesuré son excrétion globale d'acide sur des périodes de temps variables. Nos résultats montrent que la production de  $\text{H}^+$  n'est pas constante dans le temps. Elle évolue autour d'une valeur moyenne de 0,15  $\mu\text{equiv. H}^+$ /30 min. pour une colonie d'environ 50 polypes, mais peut être totalement nulle sur des périodes de temps variable de quelques minutes à plus d'une heure. Cette production de  $\text{H}^+$  est fonction du nombre de polypes ouverts. Ces résultats suggèrent que l'activité métabolique du Corail est variable dans le temps, sans que l'on puisse cependant en dégager un cycle net. Il faut donc s'attendre à ce que la calcification présente aussi de telles variations.

Les résultats préliminaires présentés ici permettent d'esquisser un premier modèle de la biocalcification chez le Corail rouge (*Corallium rubrum*).

## REFERENCES

- BAYER F.M. (1964). Bull. Mar.Sci. Gulf & Caribb. 14: 465-478.  
CARIOLOU M.A., MORSE D.E. (1988). J. Comp. Physiol. B. 157: 717-729.  
GOLDBERG W.M. (1988). Histochem. 89: 163-170.  
KINGSLEY R.J., WATABE N. (1983). Comp. Biochem. Physiol. 76B: 443-447.  
KINGSLEY R.J., WATABE N. (1989). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 133: 57-65.  
LOWENSTAM H.A., WEINER S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press.  
VENKATESAN M., SIMPSON R.T. (1986). Exp. Cell. Res. 166: 259-264.  
WEINER S., TRAUB W., LOWENSTAM M.A. (1983). Organic matrix in calcified exoskeletons. In: Biomineralization and biological metal accumulation. Westbroek P. et De Jong E.W. eds., Reidel Publishing Company, pp 205-224.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 32, 1 (1990).