

Biochemie. — *L'influence des conditions de l'expérience sur le dosage chronométrique de la peroxydase.* Par H. G. DEX. Laboratoires de Unilever, Rotterdam. (Communicated by Prof. L. G. M. BAAS BECKING.)

(Communicated at the meeting of September 26, 1942.)

Récemment nous avons donné dans ces pages (Proceedings Vol. XLV, N° 7, 1942) l'exposé d'une méthode chronométrique pour le dosage de la peroxydase.

Il paraît utile de considérer de plus près les réactions qui s'effectuent entre l'acide ascorbique, la tolidine et le peroxyde d'hydrogène sous l'influence de la peroxydase.

§ 1. *Cinétique de la réaction.*

Dans le sens chimique et stoechiométrique, la réaction, qui s'effectue pendant le dosage, revient à une oxydation de l'acide ascorbique, jointe à la réduction d'une quantité équivalente de peroxyde d'hydrogène. La concentration de l'ortho-tolidine ne change pas pendant la réaction; cette substance peut donc être considérée comme un catalyseur dans le sens classique. D'un point de vue électronique la réaction consiste en le passage de deux électrons de la molécule d'acide ascorbique à une molécule de peroxyde d'hydrogène liée à la peroxydase et activée par celle-ci.

Nous avons déjà démontré qu'on peut remplacer l'acide ascorbique par un autre réducteur quelconque d'un potentiel d'oxydo-réduction assez bas, pourvu que celui-ci n'exerce pas d'action toxique sur la peroxydase.

Parmi les substances examinées de ce point de vue (pyrocatechol, hydroquinone, pyrogallol, para-phénylènediamine, p.N-méthylaminophenol, p. oxyphenylglycine, hydrate d'hydrazine et alloxanthine) il n'y avait que l'hydroquinone et l'alloxanthine qui ont été trouvées utilisables au besoin.

Les autres substances montrent des inconvénients divers: Le pyrocatechol, par exemple, se combine avec l'ortho-tolidine en présence d'un oxydant pour donner un colorant violet. Les autres substances ont des propriétés toxiques per se — comme l'hydrazine — ou bien les produits qui se forment pendant leur oxydation se montrent toxiques. Cette toxicité se manifeste en ceci, que quand on double la quantité de la substance réductrice, la durée de la réaction n'est pas doublée, ou à peu près, mais multipliée hors de toute proportion jusqu'à devenir infinie.

Par contre, en employant comme réducteur l'hydroquinone ou bien l'alloxanthine (respectivement l'acide dialurique), nous avons trouvé, qu'avec des quantités équivalentes de ces corps, pourtant si dissemblables d'un point de vue chimique, la durée de la réaction est exactement la même que celle que l'on trouve avec une quantité correspondante d'acide ascorbique. Nous n'avons pas eu l'occasion de mettre à l'épreuve la cystéine et le glutathion comme réducteurs, mais les expériences de M. JAYLE (9) font prévoir, que ces deux substances ne changeront pas non plus la durée de la réaction.

Tous ces réducteurs ne sont que des sources d'électrons servant à la réduction de la sémiquinone, qui se forme par oxydation de l'ortho-tolidine.

Puisque, grâce à l'acide ascorbique, la concentration de l'ortho-tolidine reste constante pendant la durée de la réaction, ce n'est que la concentration du peroxyde d'hydrogène qui change et l'on pourrait s'attendre à ce que la réaction prenne un cours (pseudo-) monomoléculaire. Ceci doit se manifester quand on exécute une série d'expériences avec des quantités variables, de plus en plus grandes, d'acide ascorbique. Il est facile de calculer, à l'aide de la formule $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$, les relations qui doivent exister entre t_{20} , t_{30} , t_{40} , etc., quand x se monte à 20 %, 30 %, 40 % etc. de a . Le tableau suivant donne,

dans la seconde colonne, les valeurs de $\frac{tx}{t_{20}}$ dans le cas d'une réaction monomoléculaire; dans la dernière colonne se trouvent les valeurs de $\frac{tx}{t_{20}}$ pour le cas d'une réaction rectiligne (ordre zéro).

x	$\frac{tx}{t_{20}}$ monomoléc.	$\frac{tx}{t_{20}}$ rectiligne
20 %	1.00	1.00
30 %	1.60	1.50
40 %	2.29	2.00
50 %	3.11	2.50
60 %	4.11	3.00
70 %	5.40	3.50
80 %	7.21	4.00
90 %	10.31	4.50

Il est en effet possible, que c'est la concentration de l'o-tolidine qui détermine le cours de la réaction ou qui la limite. Dans ce cas les durées de la réaction seront simplement proportionnelles aux quantités d'acide ascorbique introduites, puisque la concentration de l'o-tolidine reste constante.

Les expériences montrent qu'en général ceci n'est pas le cas. Dans la plupart des expériences les valeurs de $\frac{tx}{t_{20}}$ se trouvent situées entre celles de la réaction monomoléculaire et celle de la réaction rectiligne; les valeurs trouvées dépendent des quantités relatives de peroxyde d'hydrogène et d'ortho-tolidine. Aux concentrations d'o-tolidine peu élevées jointes à des concentrations de peroxyde élevées, la réaction montre une tendance à devenir rectiligne; dans le cas de concentrations normales et élevées d'ortho-tolidine et de concentrations très petites de peroxyde, la vitesse de la réaction est limitée par ce dernier corps et la réaction suit un cours pratiquement monomoléculaire.

Il nous paraît d'ailleurs illusoire pour le moment de vouloir exprimer le cours de la réaction dans une formule mathématique, qui devrait en outre tenir compte des faits suivants:

Comme nous le montrerons, l'activité de la peroxydase dépend de la valeur absolue de la concentration du H_2O_2 et celle-ci change pendant la réaction. Ensuite il n'y a pas de relation simple entre l'activité de la peroxydase et la concentration du H_2O_2 . L'activité montre un „optimum” à des concentrations de H_2O_2 , qui dépendent, comme nous avons pu le démontrer, non seulement de la nature de la peroxydase, de sa pureté et de sa concentration, mais également de la concentration du substratum, dans ce cas de celle de l'o-tolidine.

C'est pour ces raisons que nous avons choisi les conditions du dosage telles, que la concentration du peroxyde d'hydrogène ne diminue que de 5 % pendant la réaction. Dans ces circonstances les déviations d'un cours rectiligne de la réaction deviennent négligeables.

§ 2. Influences diverses.

L'optimum de concentration du peroxyde d'hydrogène.

On a reconnu depuis longtemps, que l'activité de la peroxydase change avec la concentration du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. En augmentant cette concentration l'activité de la peroxydase augmente également jusqu'à une concentration dite „optimum” pour diminuer ensuite à des concentrations plus élevées encore.

Or, si on calcule les concentrations optima trouvées par différents auteurs, on peut établir le tableau suivant.

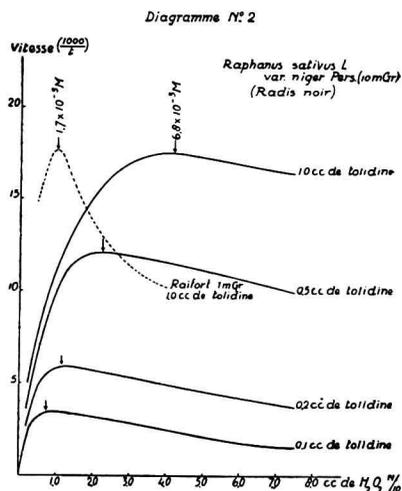
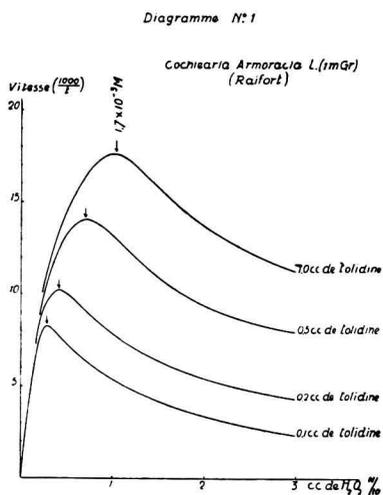
Source de la peroxydase	Réaction employée	Molarité optima du H_2O_2	Auteur
Raifort	Leucobase du vert de malachite	7.4×10^{-5}	WILLSTÄTER et WEBER (13)
Pommes de terre	Réactif Na-di	4.1×10^{-3}	GUTHRIE (6)
Raisins	Gaïacol	$2.5 \text{ à } 5 \times 10^{-4}$	HUSSEIN et CRUISS (8)
Navets	Leucobase du 2.6. dichloro-phénol-indophénol	1.7×10^{-2}	DIEMAIR et HÄUSSER (2)

Ces écarts de concentration, qui donnent comme concentration optima $7,4 \times 10^{-5}$ M. d'une part et $1,7 \times 10^{-2}$ M. (c.à.d. 250 fois plus élevées) de l'autre, peuvent apparaître surprenants, mais les études cinétiques de la réaction par MANN (10) ont démontré, que la concentration optima du H_2O_2 dépend de facteurs multiples, comme par exemple du p_h du milieu, de la nature du substratum et de la concentration de celui-ci.

Ainsi, selon MANN, la concentration optima du H_2O_2 se trouve dans les expériences avec la leucobase du vert de malachite à 6×10^{-5} M. à un p_h 4, mais à $2 \text{ à } 5 \times 10^{-4}$ M. à un p_h 3, 2, dépendant de la concentration de la leucobase. Pour l'emploi du gaïacol comme substratum le même auteur a trouvé des concentrations optima variant de 2×10^{-2} M. pour les concentrations élevées à 5×10^{-3} M. pour les concentrations faibles.

Dans tous les cas la concentration optima devient plus élevée quand le substratum devient plus concentré, ce qui confirme l'hypothèse de HALDANE (7), que non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais également le substratum doit entrer en combinaison avec l'enzyme, dans ce cas avec la peroxydase.

Nos recherches montrent le même phénomène: Si on augmente la quantité d'ortho-tolidine, la concentration optima du H_2O_2 s'élève également, comme le montre le diagramme No. 1 pour la peroxydase du raifort.



Le diagramme No. 2 montre en outre un phénomène nouveau. Tandis que la peroxydase du raifort montre une concentration optima de $1,7 \times 10^{-3}$ M. de H_2O_2 quand on emploie 1 cc de la solution d'ortho-tolidine à 0,5 %, la peroxydase du radis noir (*Raphanus sati-*

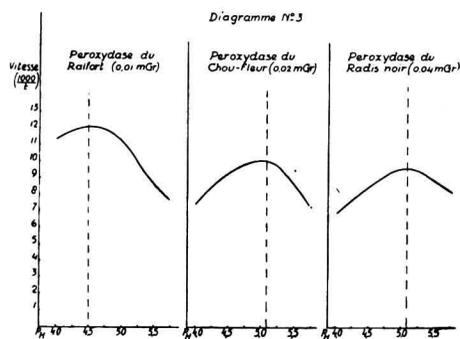
vus L. var. niger Pers.), autre Crucifère, montre dans les mêmes conditions une concentration optima située à $6,8 \times 10^{-3}$ M. donc quatre fois plus élevée. La peroxydase du raifort paraît aussi beaucoup plus sensible aux changements de concentration de H_2O_2 que la peroxydase du radis noir. Il se peut, que cette dernière soit plus ou moins stabilisée par des substances secondaires, qui se trouvent dans l'extrait (non purifié) et que les différences entre les deux peroxydases s'effaceront à la purification. C'est une étude enzymologique à entreprendre!

Mais nous sommes encore bien loin d'une explication mathématique complète de l'action de la peroxydase.

L'optimum du p_h du milieu de réaction.

Les recherches sur l'optimum du p_h de l'activité de la peroxydase ont montré que celui-ci se trouve aux p_h de 4 à 6. Ce n'est que le pyrogallol qui, employé comme substratum, paraît donner un optimum situé aux environs de p_h 8. Ce p_h élevé paraît bien anormale pour un enzyme végétal, mais il a été confirmé par les études de GETCHELL et WALTON (5) en 1931. La méthode de WILLSTÄTTER et STOLL (12) pour la détermination de la „Purpurogallinzahl" s'effectuant dans de l'eau distillé, c.à.d. dans un milieu non tamponné, doit de ce fait bien manquer de reproductibilité, puisque la réaction s'effectue dans une région où l'activité est très influencée par le p_h , lequel ne peut pas être bien constant dans les conditions choisies.

Nos recherches sur l'optimum de p_h ont montré, que pour les plantes examinées, l'activité est la plus grande à un p_h de 5,0 à 5,1. Une exception remarquable est fournie par la peroxydase du raifort, qui est la plus active à un p_h de 4,5. La variation de l'activité par le changement du p_h est montrée dans le diagramme No. 3 pour quelques cas typiques.



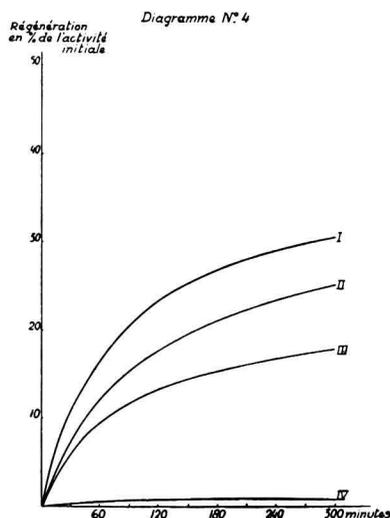
Influence du tampon employé.

Quelques expériences ont été faites dans des milieux dont le p_h 5 avait été établi respectivement par le citrate, l'acétate, le phosphate et le biphtalate. Dans aucune de ces expériences la durée de la réaction n'a été modifiée. Par conséquent, aucune „activation" ne s'est montrée dans ces conditions par le phosphate; il est utile de le noter en vue des expériences de SMIRNOW (11). D'autre part, le choix de l'agent tampon n'est pas indifférent; les tampons au citrate possèdent un avantage supplémentaire, qui n'est pas négligeable: Les extraits végétaux peuvent en effet contenir des traces d'ions ferriques qui, comme on le sait, sont capables de bleuir la benzidine et l'o-tolidine. Ceci est vrai en solution aqueuse par exemple ou bien dans un tampon à l'acétate. Par contre, dans un milieu contenant du citrate, les ions ferriques sont rendus complètement inoffensifs, parceque en présence de l'acide citrique l'ion ferrique donne des complexes, dont le potentiel d'oxydation est trop bas pour causer une oxydation des diamines en question, sans toutefois être assez bas pour pouvoir agir de réducteur.

§ 3. Régénération partielle de l'activité peroxydasique après l'inactivation thermique.

Nous allons conclure en relatant quelques observations sur ce curieux phénomène, que nous avons observé dans le courant de nos recherches et que nous ignorions auparavant. Il n'y a en effet que peu de manuels, dont celui de H. VON EULER (3), qui mentionnent le phénomène de la régénération. Celui-ci a été étudié pourtant dès 1902/3 par BACH et CHODAT (1) et plus amplement encore en 1924 par GALLAGHER (4). Nous pouvons confirmer tout à fait les expériences du dernier auteur. La simplicité de notre méthode chronométrique, qui permet de déterminer l'activité d'un extrait toutes les 5 ou 10 minutes la rend particulièrement avantageuse pour l'étude de la régénération, phénomène très remarquable, qui mérite plus d'attention qu'il n'a reçu jusqu'ici.

Le diagramme No. 4 donne le résultat d'une série d'expériences avec un extrait de choux de Bruxelles, préparé comme il a été décrite, puis respectivement porté à l'ébullition et refroidi aussitôt après (I), et bouilli pendant 1, 2 et 5 minutes (II, III et IV). Après ce traitement les extraits ont été gardés à la température ambiante. La régénération de l'activité est une fonction hyperbolique ou exponentielle du temps pendant lequel l'extrait a eu l'occasion de se rétablir.



Il nous paraît difficile de se prononcer sur la cause de ce curieux phénomène. On peut penser à une dissociation de la peroxydase à une température élevée, qui séparerait le phéron de l'agon, et à une lente association consécutive de ces deux constituants à la température ambiante. Dans ce cas on doit admettre une thermostabilité relativement grande du phéron; l'agon, c.à.d. la partie hématine de la peroxydase, étant probablement stable aux températures ne dépassant pas 100° C.

BIBLIOGRAPHIE.

1. A. BACH et R. CHODAT, Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Ueber Peroxydase. Ber. 36, 600 (1903).
2. W. DIEMAIR et H. HÄUSSER, Zur Kenntnis der Peroxydasen. 1. Ein neues colorimetrisches Bestimmungsverfahren mit 2.6-Dichlorphenol-Indophenol und 1-Ascorbinsäure im Pulfrich Photometer. Z. anal. Chem. 122, 12—24 et 173—182 (1941).
3. H. v. EULER, Chemie der Enzyme II Teil 3ter Abschnitt. Die Katalasen und die Enzymen der Oxydation und Reduktion. München 1934.
4. P. H. GALLAGHER, Biochem. J. 18, 39 (1924).

5. R. W. GETCHELL et J. H. WALTON, Some factors influencing the activity of peroxidase. *J. Biol. Chem.* **91**, 419—433 (1931).
 6. J. D. GUTHRIE, A method for the determination of peroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 242—244 (1931).
 7. J. B. S. HALDANE, *Enzymes*, London 1930.
 8. A. A. HUSSEIN et W. V. CRUESS, Properties of the oxidizing enzymes of certain vinifera grapes. *Food Research*, **5**, 637—648 (1940).
 9. M. F. JAYLE, Etude comparative de l'action catalytique des peroxydases végétales et de l'hémoglobine. *Bull. de la Soc. de Chimie biologique*, Tome **21**, 14—47 (1939).
 10. P. J. G. MANN, The kinetics of peroxidase action. *Biochem. J.*, **25**, 918—930 (1931).
 11. A. J. SMIRNOW, *Biochem. Z.* **155**, 1 (1925).
 12. R. WILLSTÄTTER et A. STOLL, Ueber Peroxydase. *Ann.* **416**, 21 (1918).
 13. R. WILLSTÄTTER et H. WEBER, Zur quantitativen Bestimmung der Peroxydase. *Ann.* **449**, 156 (1926).
-