

327. Une méthode de fabrication de la déshydrase lactique¹⁾

par J. E. Chatelan-Fleury.

(18 X 49)

La respiration cellulaire, effectuée par les systèmes *Wieland-Warburg* (WWS, déshydrases) et *Warburg-Keilin* (WKS, cytochromes) est très altérée dans les tumeurs²⁾ où *Warburg* remarqua un excès d'acide lactique, malgré la présence d'oxygène³⁾.

Vannotti pensa employer thérapeutiquement le cytochrome C, soutenu par l'action couplée des systèmes déshydrasiques, pour rétablir les systèmes redox respiratoires perturbés, tout en utilisant l'action régulatrice d'autres réactions enzymiques du coenzyme I (CoI) et des flavoprotéines du système complet de la déshydrase lactique. Ces raisons furent cause de recherches sur la préparation d'une déshydrase lactique injectable.

*Hahn*⁴⁾ a exposé la fabrication et le contrôle d'une déshydrase lactique de la levure de bière. Depuis plusieurs années, nous avons utilisé cette méthode que nous avons perfectionnée pour obtenir des produits suffisamment actifs et purs. Nous avons utilisé, comme contrôle, la méthode de *Thunberg*⁵⁾ et les tubes *Thunberg* employés aux U.S.A.⁶⁾, mais en conservant les concentrations respectives des réactifs, selon *Hahn*⁵⁾, avec du lactate de sodium, au lieu de lithium. L'activité est donnée par le temps, en minutes, nécessaire à 37° pour décolorer le bleu de méthylène.

La déshydrase lactique a fait l'objet de beaucoup de travaux⁷⁾. Le mécanisme chimique de son action a été formulé par *Straub* de la façon suivante, avec le bleu de méthylène comme accepteur d'hydrogène:

1. acide lactique + CoI = acide pyruvique + CoIH₂;
2. CoIH₂ + diaphorase = CoI + diaphorase réduite;
3. diaphorase réduite + bleu de méthylène = diaphorase + leuco

du bleu de méthylène.

L'apodéshydrogénase lactique est indispensable à la réaction 1, ce qui rend donc nécessaire la présence simultanée de 3 produits: l'apodéshydrogénase lactique, le CoI, la diaphorase, chacun d'eux pouvant limiter la réaction globale.

¹⁾ Communication faite le 3 septembre 1949, à Lausanne, à la Société suisse de chimie.

²⁾ *C. Lichtenthaler*, Le Cytochrome et la respiration cellulaire, thèse, Lausanne, 1934, sous la direction du Professeur Dr. Vannotti, Policlinique Universitaire.

³⁾ *Warburg*, *Bioch. Z.* **204**, 482 (1929).

⁴⁾ *A. Hahn*, Einführung in die physiologisch-chemischen Arbeitsmethoden, Enke-Verlag, 1936.

⁵⁾ Ibidem, page 69.

⁶⁾ *W. W. Umbreit*, *R. H. Burris* et *J. F. Stauffer*, Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism, Fourth Printing, 1948, Burgess Publishing Co, Minneapolis, page 126.

⁷⁾ Par exemple: *Sumner* et *Somers*, Enzymes, second edition, 1947, Academic Press Inc. N. Y. Résumés dans chapitres XI, XII, XIII et dans littérature citée; *H. S. Corran*, *D. E. Green* et *F. B. Straub*, *Biochem. J.* **33**, 793 (1939); **34**, 483 (1940); *S. J. Bach*, *M. Dixon* et *L. G. Zervas*, *Nature* **149**, 48 (1942); **143**, 537 (1939).

Dixon a préparé l'apodéhydrogénase lactique très pure, mais très instable, puisque l'enzyme n'a pu être conservé que 2 à 3 heures. Il est parti de la levure des boulangers, séchée à l'air, qu'il a autolysée 5 heures à 38°. Nous sommes parti de levures de bière basses pour lesquelles une autolyse pareille s'est montrée beaucoup trop violente. Nous n'avons pas utilisé la précipitation avec le gel d'alumine pour éliminer le cytochrome C, les sels d'aluminium pouvant entrer en compétition avec ceux de magnésium et diminuer l'activité. L'adsorption par le gel de phosphate de calcium sépare bien l'apodéhydrase lactique de beaucoup de flavines, mais écarte aussi les flavoprotéines actives de nos levures, flavoprotéines que nous désirons conserver au lieu de nous adresser à un autre matériel pour les remplacer comme l'a fait *Straub*, dans son étude, à partir de cœurs de porc. Avec la purification de *Straub*, il ne reste pratiquement que la diaphorase I (voir¹).

Notre méthode est basée sur la précipitation du jus de *Lebedew* dans un mélange alcool-éther, comme l'a décrite *Hahn*²); mais selon la température du mélange alcool-éther (qui n'est pas donnée), il se produit une précipitation accompagnée d'une dénaturation plus ou moins grande des protéines. Si la précipitation a lieu à -20° et que tout le processus suivant soit fait à cette température, on retrouve par dissolution du précipité séché le *Lebedew* initial, à peu de chose près. Par contre, en conservant le mélange à -5° et en précipitant à cette température, on arrive d'un coup à éliminer tout le cytochrome C sous forme dénaturée, lors de la mise en solution du précipité sec. En réalité, suivant les conditions de température et de rapidité de travail, il s'agit d'une dénaturation fractionnée orientable à volonté. Nous avons précisé les conditions de p_H du *Lebedew*, ce qui permet d'éliminer les acides nucléiques.

Pour la précipitation des protéines et phosphatases, notre méthode de purification s'inspire d'un processus utilisé par *Dixon* et basé sur le fait que le *Thunberg* n'est pas modifié par un échauffement rapide en présence de lactate, à un p_H légèrement acide à neutre. Mais notre méthode diffère ensuite de celle de *Dixon* en ce sens qu'après acidification légère pour libérer l'acide lactique, ce dernier, soluble dans l'alcool-éther, sera éliminé par une deuxième précipitation, flavoprotéines, CoI, apodéhydrase lactique et sels étant précipités.

A la deuxième mise en solution, la forte concentration insolubilise certaines protéines. La catalase est précipitée par un sel de Mn. La solution centrifugée, filtrée à 0° sur filtre *Seitz* pour stérilisation, est mise en ampoules. Les ampoules doivent être congelées et gardées à

¹) *J. G. Dewan* et *D. E. Green*, *Nature* **140**, 1097 (1937); *Biochem. J.* **31**, 1069 (1937); **32**, 626 (1938); *H. von Euler* et *H. Hellström*, *Z. physiol. Ch.* **252**, 31 (1938); *E. P. Abraham* et *E. Adler*, *Biochem. J.* **34**, 119 (1940).

²) *A. Hahn*, *Einführung in die physiologisch-chemischen Arbeitsmethoden*, Enke-Verlag, 1936.

— 20° sur la neige carbonique dans un grand thermos; elles ne perdent que peu d'activité pendant un mois dans ces conditions. La solution peut aussi être congelée et séchée sous vide très poussé (lyophilisation); l'activité de ce produit en ampoules évacuées se conserve très bien à 0° (et naturellement encore mieux à -20°). Ce produit forme une poudre jaunâtre qui se dissout instantanément dans l'eau stérile et est prêt à l'injection immédiate sans perte d'activité, ce qui le rend très pratique pour l'expérimentation (*Thunberg* obtenu: 3 à 10 minutes pour un produit normal terminé).

Méthode de fabrication.

Matière première: levures de bières basses fournies par les Brasseries *Feldschlösschen* à Bâle, *Beauregard S.A.* à Fribourg, *Fertig Frères S.A.* à Orbe.

La levure doit être fraîche, transportée rapidement entourée de glace, puis lavée à l'eau distillée glacée, pressée fortement et séchée à 25° au maximum par un fort ventilateur envoyant l'air sur la levure éparpillée en faible couche sur du papier filtre (protéger contre les mouches!). Après séchage à l'air, qui dure 1—2 jours, elle est broyée au moulin et séchée sous vide et CaCl_2 . Cette levure séchée est conservée à la glacière. Avant l'autolyse, on broye très finement la levure dans un moulin à boules de porcelaine en présence de 10% de quartz pur, fin.

Autolyse: 400 g de levure (avec quartz) sont mis petit à petit dans 1200 cm³ d'eau distillée à 33°, sous brassage pour éviter la formation de grumeaux. On ajoute 1 mg de taurocholate de sodium pour permettre une bonne pénétration cellulaire par abaissement de la tension superficielle interphases. On ajoute 50 cm³ de toluène pur et brasse le tout de temps à autre pour homogénéisation. Veiller à ce que la température ne dépasse pas 33° et soit maintenue à 32—33° pendant 1 heure à 1 heure $\frac{1}{2}$ au maximum. Puis mettre le tout à refroidir à la glacière jusqu'au lendemain matin. On centrifuge fortement, à froid, et conserve le super qui forme le jus de *Lebedew*. Laver les dépôts en les broyant dans un mortier avec 300 cm³ d'eau distillée glacée. Centrifuger à froid, négliger les dépôts, ajouter ce super au jus de *Lebedew*. On obtient environ 1000 cm³ de *Lebedew* de p_{H} 6,0 à 6,6. — Vérifier que l'autolyse se fasse avec un p_{H} de 6,0 à 6,8, c'est-à-dire que les levures n'aient pas été neutralisées.

Première précipitation: en deux opérations simultanées pour les commodités de travail en laboratoire seulement.

Dans un mélange de 6 litres d'alcool pur et de 3 litres d'éther sec, refroidi à -5° (au frigo ou entouré d'un mélange réfrigérant glace-NaCl, le mélange alcool-éther ayant été préalablement refroidi à -15° dans un mélange neige carbonique-acétone en veillant à ce que l'alcool-éther ne soit pas pollué par l'acétone), on introduit en brassant très rapidement, 600 cm³ de *Lebedew* refroidi à 0—1°, en mince filet pour avoir une précipitation très floconneuse. On centrifuge à -5° ou laisse sédimenter au repos pendant $\frac{3}{4}$ d'heure à 1 heure à -5°. On fait une opération similaire avec les 400 cm³ de *Lebedew* restant, en utilisant 4000 cm³ d'alcool et 2000 cm³ d'éther. On décante très rapidement les supers clairs et incolores par siphonnage, puis on filtre rapidement les sédiments blancs, en utilisant pour chaque opération deux entonnoirs en porcelaine (diamètre 15 cm) munis de papier filtre rapide (à bandes noires) et refroidis latéralement par deux morceaux de neige carbonique, fixés par du leucoplaste. Le filtrage doit être fait à l'aide d'une trompe à eau à forte succion et l'on doit enlever avec une spatule de verre le fond de dépôt pour libérer le filtre qui tend à se colmater. On lave 3 fois sur le filtre avec de l'éther sec (séché sur CaCl_2 et filtré), refroidi à -5°. On place rapidement les précipités (petits morceaux, couche mince) avant qu'ils jaunissent sous l'influence de l'humidité de l'air et du réchauffement, dans une grande conserve à CaCl_2 où l'on fait un vide rapide avec une forte trompe pendant deux heures. On laisse reposer sous vide pendant la nuit, au frais. Le lendemain, le produit jaunâtre est broyé dans un mortier; il doit être sec et cassant, il ne doit pas sentir l'éther. Obtenu: 104 g de produit brut avec les deux opérations.

Première mise en solution: On met 624 g de glace (eau distillée congelée) dans un mortier froid et y mélange les 104 g de poudre brute en évitant de faire de l'écume, mais en écrasant les grumeaux formés. Après une heure au plus, une suspension glacée homogène est obtenue. On la centrifuge à froid à 0°. On lave les sédiments avec 104 g de glace fraîche. Les supers sont réunis et les culots jetés. On centrifuge encore fortement les supers à froid.

Précipitation thermique: On ajoute aux supers à 0° $104 \times 0,3 = 31,2$ cm³ de lactate de Na à 50%, de p_H 6,8 refroidi à près de 0°, et cela goutte à goutte en brassant sans faire d'écume. On porte très rapidement le mélange à 53° et on l'y maintient pendant 6 minutes, tout en brassant. On refroidit très rapidement en mettant le bécher dans de l'eau glacée, en brassant toujours. On centrifuge à 0° en ne conservant que le super. Suivant les levures, il faut laver les dépôts avant de les jeter, en les broyant dans un mortier avec 5 cm³ de phosphate de Na m/15, p_H = 6,8, à froid, pour récupérer des flavines absorbées; on centrifuge et réunit les supers. On ajoute aux supers, à froid, toujours à près de 0°, de l'acide acétique 0,1-n. froid, goutte à goutte, jusqu'à p_H 5,8. Par centrifugation à froid, on obtient un liquide jaune clair qui est immédiatement traité comme suit:

Deuxième précipitation: Procéder comme pour la première précipitation, mais en une seule opération: dans 6 litres d'alcool et 3 litres d'éther à – 5°, siphonner le super, filtrer le dépôt, ce dernier seul étant conservé; ensuite filtrage, lavage et séchage dans le vide, comme pour la première précipitation. Obtenu: 42 g de poudre jaunâtre.

Deuxième dissolution: Comme pour la première mise en solution, mais avec épuisement, avec un total de 84 g de glace pour 42 g de poudre. Centrifuger très fortement, à froid, et laver les précipités avec le minimum de glace. Centrifuger le mélange des supers. Cette opération est délicate, car il faut récolter les enzymes adsorbés; mais en suivant la marche des opérations avec le *Thunberg*, avec un peu de pratique, on arrive très bien à un bon résultat. Le liquide a un p_H de 6,0 à 6,4 et est refroidi extérieurement pendant les opérations par la neige carbonique. Il peut être congelé et conservé dans un thermos à neige carbonique sans perte d'activité, si l'on ne peut passer immédiatement aux opérations suivantes.

Additions de sels: On ajoute goutte à goutte à 0°:

$42 \times 0,01 = 0,42$ cm³ MnCl₂, solution à 2,5% (poids/volume) et ayant un p_H de 6,4,

$42 \times 0,01 = 0,42$ cm³ MgCl₂, solution saturée, p_H 6,4;

$42 \times 0,001 = 0,042$ cm³ CoCl₂, solution à 2,37% (poids/volume), p_H 6,4.

Le p_H de la solution enzymique est alors de 5,8 à 6,2. On centrifuge à froid et ne conserve que le super. On ajoute à froid environ 20 cm³ de phosphate de Na m/15, p_H = 6,8, puis une solution diluée de NaHCO₃ amenée au p_H = 7,2, jusqu'à ce que le liquide arrive au p_H = 6,8 à 7,0. Le but est de précipiter la catalase. Si la solution de NaHCO₃ est trop alcaline, l'activité est perdue très rapidement.

On centrifuge fortement à froid et stérilise par filtrage¹⁾ à froid sur filtre *Seitz*. On obtient environ 80 cm³ de solution, avec un *Thunberg* de 3 à 10 minutes.

Cette solution peut être lyophilisée¹⁾, à basse température, pour ne pas avoir de perte d'activité. Il faut prendre des ampoules à grande surface, car le produit sec empêche une dessiccation en profondeur. Le produit lyophilisé se présente comme une poudre jaunâtre flavinique.

Le contrôle de la pureté se fait par une analyse des enzymes autres que la déshydrase lactique, l'analyse spectrale et la détermination de la teneur en protéines.

RÉSUMÉ.

Nous décrivons un procédé permettant d'obtenir à partir de levures de bière basses une préparation de déshydrase lactique qui peut être conservée à basse température.

Policlinique universitaire,
Directeur Prof. Dr Vannotti, Lausanne.

¹⁾ Le filtrage stérile et la lyophilisation ont été faits avec les appareils de M. le Professeur *Hauduroy*, directeur de l'Institut de bactériologie de l'Université de Lausanne, auquel nous exprimons nos remerciements.