

## MISE EN EVIDENCE PAR OXYDATION PHOTOCHEMIQUE OU ENZYMATIQUE DU RADICAL LIBRE DU CATECHOL

ANNE-MARIE LE CLERC, JACQUES MONDY ET PIERRE DOUZOU

*Laboratoire des Substances de l'Intendance, Paris (France)*

ET

SERGE LISSITZKY

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille (France)*

(Reçu le 13 juin, 1958)

---

### SUMMARY

*Demonstration of the free radical of catechol by photochemical or enzymic oxidation*

A spectrographic study of the oxidation of catechol showed that in a rigid medium (96° alcohol at 100° K), after brief exposure to intense irradiation with the wavelength absorbed in u.v. light, a transitional configuration existed, the properties of which were those of the corresponding free radical (semiquinone).

The same observation can be made when catechol is exposed to the action of pure polyphenol oxidase of mushroom, under similar experimental conditions.

---

### INTRODUCTION

L'oxydation des orthodiphénols catalysée par la polyphénoloxydase de Champignon conduit à la formation de composés de structure classiquement orthoquinonique dont l'évolution en milieu aqueux aboutit, par des mécanismes discutés, à la formation de pigments de type mélanique. La réalité de l'existence des *o*-quinones correspondants à certains *o*-diphénols (tels que le catéchol et la 3,4-dihydroxyphénylalanine) comme produits de leur déshydrogénation enzymatique n'a pu être établie qu'indirectement (étant donné l'instabilité de ces corps en solution aqueuse) grâce à des données spectrophotométriques ou par régénération partielle d'*o*-diphénol, à partir des milieux d'incubation supplémentés en réducteurs (acide ascorbique, hydrosulfite de sodium).

L'oxydation *o*-diphénol-*o*-quinone implique un transport de deux électrons vers le milieu solvant avec formation de deux protons. Or certains faits expérimentaux observés dans l'oxydation du catéchol par la polyphénoloxydase ou l'oxyde d'argent ne paraissent interprétables que si l'on suppose un processus de transfert à un électron, c'est-à-dire la formation d'un radical PH· (semi-quinone) entre l'*o*-diphénol (PH<sub>2</sub>) et la quinone (P). En effet, FORSYTH ET QUESNEL<sup>1</sup> puis BOUCHILLOUX ET LISSITZKY<sup>2</sup> ont montré que dans des conditions expérimentales très variées (pH, force ionique, rapport enzyme/substrat) on pouvait mettre en évidence chromatographique-

ment, la formation intermédiaire des trois isomères tétrahydroxylés du diphenyle, composés eux-mêmes oxydables ultérieurement par l'enzyme. La présence de ces composés ne peut être expliquée que par la dimérisation des formes de résonance du radical  $\text{PH}\cdot$ .

L'objet de ce travail est de rapporter les résultats obtenus dans la recherche expérimentale de cette configuration transitionnelle formée soit par voie photochimique, soit par voie enzymatique.

#### MÉTHODE ET MATÉRIEL

Les radiations électromagnétiques qu'absorbe sélectivement un composé donné sont le plus souvent caractéristiques de celui-ci, et sont responsables de son spectre. Dans la majorité des cas, ces radiations provoquent une simple activation de la molécule et n'ont un intérêt photochimique que dans la mesure où leur multiplication est réalisée par l'utilisation d'arcs très puissants.

L'intensité de ces sources de lumière assure l'éventuelle absorption consécutive de plusieurs quanta, mais la probabilité d'un tel processus est limitée par la vie moyenne d'un état excité ( $10^{-7}$ – $10^{-8}$  sec). Les transitions d'intérêt photochimique demeurent de ce fait indiscernables, tant par cette base de temps que par leur caractère "exceptionnel".

Les travaux de LEWIS<sup>3</sup>, JABLONSKY<sup>4</sup> et KASHA<sup>5</sup> ont néanmoins démontré que les composés organiques non saturés pouvaient donner des configurations métastables et parfois quasi-stables qu'il est possible d'observer dans des conditions expérimentales que voici :

Certains systèmes de solvants, tels que le mélange éther-alcool-pentane (2:5:5) ou l'alcool éthylique à 96°, congèlent sans cristalliser, ce qui autorise leur investigation spectrale aux basses températures (+ 100° K).

La rigidité de telles solutions permet d'améliorer l'intensité de l'absorption lumineuse et atténue certaines éventualités de désactivation: la proportion des transitions d'intérêt photochimique s'accroît dans des proportions telles que l'existence d'une configuration métastable ne peut alors passer inaperçue.

Elle est caractérisée par sa couleur, parfaitement stable à basse température, mais disparaissant par réchauffement.

Nos recherches relatives aux configurations transitionnelles du catéchol ont été réalisées sur ces bases théoriques et expérimentales.

Ce composé présente un spectre d'absorption caractérisé, dans le domaine spectroscopiquement accessible, par une bande très intense culminant à 2800 Å. Les radiations centrées sur ce domaine provoquent une photo-oxydation de rendement médiocre (pourvu que l'on s'adresse à des solutions aqueuses ou alcooliques pures et dégazées): on perçoit la coloration du dérivé quinonique et le spectre ultra-violet se transforme, la bande initiale s'étalant vers les courtes longueurs d'onde et le maximum s'atténuant.

Pour l'étude des configurations transitionnelles on a choisi un système solvant qui glace sans cristalliser et n'affecte donc pas la densité optique du milieu irradié et spectrographié: l'éthanol à 96° spectroscopiquement pur. Le catéchol y est soluble aux concentrations propres à l'analyse spectrale ( $5 \cdot 10^{-4}$  à  $1 \cdot 10^{-4}M$ ).

La solution placée dans une cuve de quartz à faces parallèles, est immergée dans

un bain d'azote liquide. Après avoir effectué la détermination spectrale\* de ce milieu, on procède à des irradiations intenses au moyen d'un tube spiralé à vapeur de mercure fonctionnant sous haute tension (10 watts de puissance lumineuse). Les temps d'irradiation s'échelonnent entre 30 sec et 3 min. On réalise alors une nouvelle détermination spectrale, puis on laisse la température s'équilibrer avec celle du milieu ambiant (20°) et l'on procède à l'enregistrement photographique du dernier spectre.

Le catéchol utilisé a été purifié par deux recristallisations dans le benzène.

La polyphénoloxydase de Champignon a été préparée par KERTÉSZ<sup>6</sup> que nous remercions pour cette préparation. Elle est homogène à l'ultracentrifugation et l'électrophorèse. Son activité spécifique exprimée selon HOGEBOM ET ADAMS<sup>7</sup> est de 90,900 unités/ml (chaque ml contenant 13,3 mg de matière non dialysable).

### RÉSULTATS

(1) La congélation des solutions alcooliques, portées à 100° K à l'aide d'un bain d'azote liquide, permet d'accroître l'intensité du maximum d'absorption du spectre caractéristique du catéchol pur.

La comparaison des spectres a et b de la Fig. 1 souligne la différence qui affecte les intensités à 293° K et à 100° K.

(2) En même temps, elle révèle la modification qui affecte le spectre du catéchol ainsi piégé: en général, les conditions qui président à l'enregistrement du spectre et qui sont invariables (temps de pose 30 sec dont 5 sec d'illumination à l'aide d'un arc au cadmium destiné à étalonner les longueurs d'onde des clichés) favorisent l'apparition d'un épaulement situé sur le flanc de la bande orienté vers les grandes longueurs d'onde.

On a tracé en pointillé l'évolution que peut subir cet épaulement en fonction

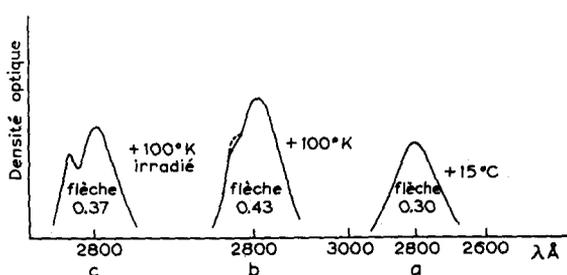
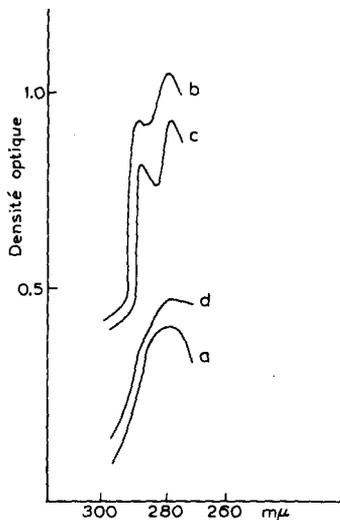


Fig. 1. Spectres d'absorption en lumière ultraviolette des solutions de catéchol ( $5 \cdot 10^{-4} M$ ) dans l'alcool à 96°. a: à 288° K. b: à 100° K (azote liquide). c: à 100° K après une irradiation de 30 sec. Ordonnées: unités arbitraires.

Fig. 2. Spectres d'absorption du catéchol dans l'alcool à 96° ( $5 \cdot 10^{-4} M$ ). a: à 288° K. b: à 100° K après 30 sec d'irradiation. c: à 100° K après 90 sec d'irradiation. d: à 288° K après réchauffement.



\* On a utilisé un spectrographe Jobin-Yvon-Zélande à optique de quartz, de 16 cm de dispersion entre 2300 et 4000 Å. L'étalonnage de la plaque photographique a été effectué au moyen d'un gradateur de glan Jobin-Yvon et l'enregistrement photométrique à l'aide du microphotomètre de Chalonge.

des modifications qui affectent l'enregistrement (prolongation du temps de pose, par exemple).

(3) La courbe c représente le spectre d'absorption enregistré à l'issue d'une intense et brève illumination: la bande qui se laissait auparavant deviner, apparaît fort nettement. Elle culmine à 2875 Å, démontre une forte intensité et, de plus, paraît se former puis se développer au détriment de la première qui culmine à 2800 Å (détail des tracés Fig. 2).

(4) Enfin, le réchauffement des solutions ainsi expérimentées permet d'observer que le spectre d'absorption a recouvré ses caractéristiques initiales et que la solution ne présente plus la coloration jaune pâle qu'elle développait en milieu rigide irradié.

#### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

1. Si l'on adopte les critères par lesquels MICHAELIS<sup>8</sup> conclut à la caractérisation de radicaux semi-quinoniques, la réversibilité des tracés spectraux et des manifestations de coloration ici observées permettent d'envisager l'existence de la configuration transitionnelle PH·.

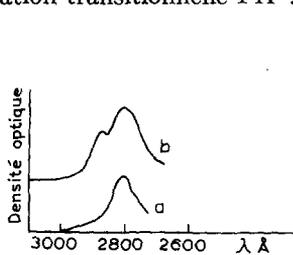


Fig. 3. Fond continu du spectre d'une solution rigide de catéchol dans l'alcool à 96°. a: avant irradiation. b: après irradiation.

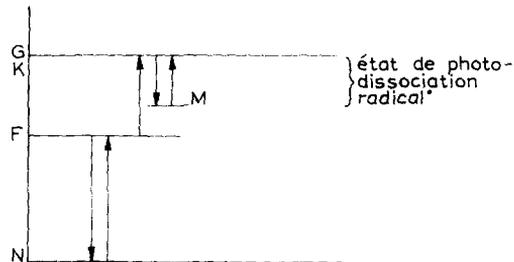


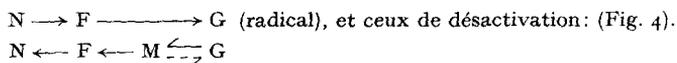
Fig. 4. Schéma des processus d'absorption. N = état fondamental de la molécule, F = état d'excitation sans conséquences photochimiques, M = configuration métastable.

2. Cependant, de sérieuses réserves doivent être formulées dans le cas présent: si l'on examine la Fig. 3, il apparaît que la coloration est le fait d'une bande dont le flanc étalé pénètre dans le domaine visible et non d'une bande culminant dans celui-ci.

En outre, l'écart séparant les deux bandes observées en milieu rigide irradié pose un délicat problème d'interprétation.

D'ordinaire, l'écart énergétique séparant les niveaux électroniques excités (G) et métastable est assez faible, ce qui se traduit par un important effet bathochrome sur le spectre caractéristique d'une telle transition par rapport à celui qui représente la transition: état fondamental N  $\rightleftharpoons$  1er état excité F.

En résumé, les processus successifs d'absorption se schématisent ainsi:



3. La nouvelle bande observée en milieu rigide pourrait être également attribuée à un état vibratoire particulier (et excité) de la molécule revenue à son état électronique fondamental à l'issue d'une transition d'excitation pure et simple.

Toutefois il apparaît qu'une nouvelle transition affectant un tel état vibratoire provoque la dissociation de la fonction phénol et le transfert de l'un de ses électrons vers la solution.

Telle est du moins la conclusion que permet de formuler la photo-oxydation de solutions fluides et rigides, intensément irradiées par des sources émettant des radiations en soi dépourvues d'intérêt photochimique et qui devraient donc subir deux processus d'absorption successifs.

4. L'addition aux solutions alcooliques de catéchol à basse température ( $-10^{\circ}$  à  $-20^{\circ}$ )\* de polyphénoloxydase pure de Champignon (0.1 ml dans 5 ml de solution de catéchol  $10^{-4} M$ ) et la congélation immédiate d'un tel milieu ont pour effet d'amorcer puis d'immobiliser les réactions qui opposent cet enzyme au catéchol.

Malgré la température initiale et les conditions du milieu défavorables à l'oxydation, celle-ci n'en est pas moins intense et rapide si, au lieu de piéger instantanément les réactifs, on laisse la réaction se poursuivre à la température ambiante, ce qui indique que l'enzyme n'a pas été, au moins totalement, dénaturé au cours des manipulations.

Les spectres obtenus après congélation ( $+ 100^{\circ} K$ ) sont consignés dans la Fig. 5. La molécule de catéchol est dans un état identique à celui que lui conférerait précédemment une intense et brève irradiation.

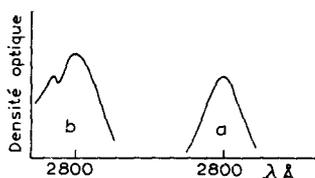


Fig. 5. Spectres d'absorption du catéchol dans l'alcool à  $96^{\circ}$  ( $1 \cdot 10^{-4} M$ ) en l'absence et en présence de polyphénoloxydase. a: 5 ml de solution de catéchol à  $288^{\circ} K$ . b: 5 ml de catéchol  $1 \cdot 10^{-4} M$  dans l'alcool à  $96^{\circ} + 0.1$  ml de solution de polyphénoloxydase pure à  $100^{\circ} K$ . Ordonnées arbitraires.

Nous en concluons que sa configuration, et sa nature radicalaire, sont identiques quel que soit l'agent qui provoque l'oxydation.

La coloration jaune est la même que celle observée soit par photooxydation, soit dans les premiers stades de l'oxydation en milieu aqueux dans les conditions de milieu optimum (tampon aux phosphates  $0.1 M$  de  $pH = 6.8$ ,  $0.005$  ml de solution enzymatique pour 3 ml de solution de catéchol  $0.025 M$ ,  $37^{\circ}$ ). On a par ailleurs vérifié que dans l'alcool à  $96^{\circ}$  les mêmes intermédiaires diphenyliques peuvent être mis en évidence.

On peut conclure de ces expériences que la nature radicalaire du composé jaune obtenu est la même quel que soit l'agent qui provoque l'oxydation du catéchol (radiations électromagnétiques ou polyphénoloxydase).

Il se confirmerait ainsi que le terme de "complexe activé" attribué aux réactifs à un certain stade du chemin d'une réaction correspond en fait à la forme potentielle maximum de l'un d'eux, en l'occurrence à l'état de radical. Dans le cas présent, l'affinité des réactifs permet de figer une proportion décelable de telles formes. Il ne

\* Cette valeur est obtenue en plaçant les cuves à expérience remplies de la solution de catéchol préalablement refroidie à  $-20^{\circ}$ , dans l'atmosphère du vase Dewar contenant l'azote liquide au sein duquel on procédera à l'immersion des cuves aussitôt après addition de polyphénoloxydase.

doit pas en être ainsi de toutes les réactions, mais on peut penser que nombre de réactions enzymatiques bénéficieraient d'un tel concours de circonstances favorables.

#### RÉSUMÉ

L'étude spectrographique des milieux d'oxydation du catéchol en milieu rigide (alcool à 96° à 100° K) après une intense et brève irradiation par la longueur d'onde qu'il absorbe en ultraviolet, montre l'existence d'une configuration transitionnelle que ses propriétés permettent d'assimiler au radical libre (semiquinone) correspondant.

L'action de la polyphénoloxydase pure de Champignon sur le catéchol dans les mêmes conditions conduit à des constatations expérimentales identiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> W. G. C. FORSYTH ET E. C. QUESNEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 155.
- <sup>2</sup> S. BOUCHILLOUX ET S. LISSITZKY, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) sous presse.
- <sup>3</sup> G. N. LEWIS ET D. LIPKIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 2801.
- <sup>4</sup> A. JABLONSKY, *Nature*, 151 (1933) 839.
- <sup>5</sup> M. KASHA, *Chem. Revs.*, 41 (1947) 401.
- <sup>6</sup> D. KERTESZ ET R. ZITO, *Nature*, 179 (1957) 1017.
- <sup>7</sup> G. H. HOGEBOM ET M. H. ADAMS, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 275.
- <sup>8</sup> L. MICHAELIS, *Transactions of the 4rd Conference of John Macy Foundation*, Vol. I, Academic Press, New York, 1950.

## THE EFFECT OF CHYMOTRYPSIN ON THE MOLECULAR WEIGHT OF DESOXYRIBONUCLEIC ACID PREPARATIONS

J. HERMANS, JR.\*

*Laboratory for Inorganic and Physical Chemistry, University of Leiden (Netherlands)*

(Received June 5th, 1958)

---

#### SUMMARY

Three preparations of DNA which did not dissolve in water were rendered soluble by treatment with chymotrypsin; the light-scattering molecular weights proved to be about 6 million. For eleven soluble preparations whose molecular weights ranged from 6 to 15 million, the molecular weights were likewise reduced to about 6 million.

Moreover, whereas the reciprocal of the reduced light scattering of several of the original samples decreased with increasing concentration of DNA, this abnormal behavior disappeared on treatment with chymotrypsin. The results are interpreted as meaning that a DNA unit exists with a molecular weight of about 6 million and that samples whose molecular weight is appreciably higher are aggregates of DNA molecules linked by protein.

---

\* Present address: Chemistry Department, Cornell University, Ithaca, N.Y.