

SUR L'ACTION L-AMINOACIDE OXYDASIQUE DE  
*CL. SPOROGENES* ET DE *CL. SACCHAROBUTYRICUM* EN  
PRÉSENCE D'OXYGÈNE

par

ALBERT JEAN ROSENBERG

*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

ET

B. NISMAN

*Institut Pasteur, Garches (France)*

AUBEL, ROSENBERG ET DE CHEZELLES<sup>1</sup> ont montré, en étudiant l'influence de l'air sur les anaérobies stricts, la désamination de la L-alanine, à l'air, par *Cl. sporogenes*, et ROSENBERG<sup>2</sup> a constaté la désamination de la L-alanine, à l'air, par *Cl. saccharobutyricum*. Ce même auteur<sup>3</sup> a expliqué cette désamination oxydative par l'intervention de la L-aminoacide-oxydase, avec, pour conséquence, l'influence léthale de l'oxygène sous forme d'eau oxygénée. Dans le présent travail nous montrons que les suspensions de *Cl. sporogenes* et de *Cl. saccharobutyricum* lavés sont capables de désaminer un grand nombre d'acides aminés par voie oxydative, en présence d'air, donc dans des conditions non physiologiques pour des anaérobies stricts. Ce fait est d'autant plus remarquable que ces clostridies n'attaquent que très peu d'acides aminés en anaérobiose, la plupart de ceux-ci étant dégradés par la réaction de STICKLAND pour *Cl. sporogenes* et par la transamination via ac. glutamique ou ac. aspartique pour *Cl. saccharobutyricum*<sup>4</sup>. D'une manière générale, il est connu que les clostridies n'attaquent que peu d'aminoacides.

Au cours de ce travail nous avons essayé dix aminoacides avec les suspensions de *Cl. sporogenes* lavé et treize avec les suspensions de *Cl. saccharobutyricum* lavé. Cinq ont été désaminés avec absorption d'oxygène par *Cl. sporogenes* et six par *Cl. saccharobutyricum*. Les bilans d'oxygène absorbé et d'ammoniaque dégagé ont été établis. Les 2-4 dinitrophénylhydrazones de quatre acides cétoniques formés ont été isolées. On a montré la formation de l'eau oxygénée au cours de la désamination oxydative pour *Cl. sporogenes*; pour *Cl. saccharobutyricum*, cette question n'est pas résolue. Nous employons le terme L-aminoacide oxydase pour désigner l'enzyme catalysant la désamination oxydative, avec consommation d'oxygène, des acides aminés naturels par les suspensions des deux clostridies. Nous ferons remarquer que les phénomènes que nous décrivons sont observés avec les bactéries intactes et que l'existence des enzymes invoquées dans le présent travail ne sera complètement justifiée qu'après isolement à l'état pur.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

## Techniques

1. *Préparation des suspensions bactériennes.* Les cultures de *Cl. sporogenes* et de *Cl. saccharobyticum* sur bouillon de cœur de cheval ou de bœuf non glucosé, âgées de 15-16 heures, sont centrifugées et le culot bactérien lavé une fois avec NaCl à 9%o. On recentrifuge et on amène la suspension bactérienne à la dilution désirée avec les solutions de NaCl à 9%o.

2. *Acides aminés.* Les acides aminés utilisés sont des produits HOFFMANN-LA ROCHE.

3. *Mesure d'absorption d'oxygène.* Les mesures d'oxygène consommé sont faites par la méthode manométrique de WARBURG. La composition des solutions dans les fioles est indiquée dans les tableaux respectifs. En présence de KCN le logement central contient le mélange de KREBS<sup>5</sup>. La réaction terminée, le contenu de la fiole est déprotéinisé avec un volume égal d'ac. trichloracétique à 8 %, et des prises aliquotes sont prélevées pour le dosage d'ammoniaque. L'ammoniaque est dosé dans l'appareil de PARNAS ET HELLER, par nesslérisation, pour *Cl. sporogenes* et selon la méthode de RAYNAUD ET GROS<sup>6</sup> pour *Cl. saccharobyticum*.

4. Pour l'isolement et la caractérisation des acides cétoniques, voir le protocole d'expérience.

5. La catalase a été préparée par la méthode de KEILIN ET HARTREE<sup>7</sup>.

## RÉSULTATS

1. *Cl. Sporogenes*

La Fig. 1 montre la consommation d'oxygène en fonction du temps par une quantité croissante de suspension microbienne seule ou en présence d'une quantité constante de substrat (20  $\mu$ M de L-alanine = 448  $\mu$ l).  $O_2(\mu)$

On voit sur les courbes 1, 2 et 3 une diminution rapide de l'absorption de l'oxygène et ceci dès le commencement, ce qui indique une rapide destruction de l'enzyme. En effet, le substrat n'est que faiblement oxydé. La quantité de suspension employée dans les courbes 4 et 5 est suffisante, malgré la destruction rapide, pour que l'acide aminé soit complètement oxydé. C'est la raison pour laquelle nous employons des suspensions denses. Il faut remarquer la quantité importante d'ammoniaque libéré dû à l'autolyse — jusqu'à 29 micromols — avec la suspension la plus dense sans substrat. Celle-ci est probablement responsable de la destruction du système enzymatique en question. On trouvera dans la Fig. 2 les quantités d'oxygène absorbé et d'ammoniaque dégagé en fonction des quantités croissantes de bactéries et en présence de L-alanine. Cette figure montre que même quand le substrat est incomplètement oxydé, le rapport  $O_2/NH_3 = 1$ , comme dans le cas de l'oxydation complète de l'amino-acide.

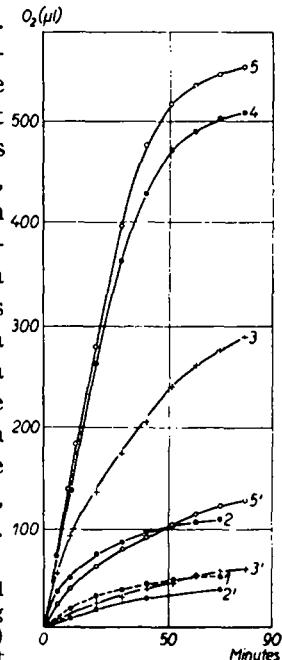


Fig. 1. (*Cl. sporogenes*). Oxydation de la L(+) alanine: 0.2 ml = 448  $\mu$ l en fonction de quantités croissantes de suspension bactérienne. 1) 3 mg (poids sec); 2) 6 mg; 3) 9 mg; 4) 12 mg; 5) 15 mg. Les courbes (2'), (3') et (5') représentent l'absorption d'oxygène sans substrat et correspondent aux courbes 2, 3 et 5, respectivement.

TABLEAU I  
(*Cl. sporogenes*)

RAPPORT ENTRE  $O_2$  ABSORBÉ ET  $NH_3$  DÉGAGÉ

Les fioles de Warburg avec logement latéral contiennent 1.0 ml de suspension (15 mg de poids sec); aminoacide, correspondant à 0.2 ml de solution M/10 de l-aminoacide; tampon de phosphate (SØRENSEN), m/15 à pH 7.4. Volume: 3 ml. 0.2 ml KOH à 10% dans le logement central avec papier filtre. Gaz: air. T = 37°. Durée 100 minutes.

Substrat	$O_2$ absorbé en micromols	$NH_3$ dégagé en micromols	$\frac{O_2}{NH_3}$
D-alanine . . .	1.2	1.0	
L-alanine . . .	18.8	16.7	1.11
DL-alanine . . .	21.7	20	1.1
L-leucine . . .	18	22	0.82
DL-isoleucine . .	24	28	0.86
L-valine . . .	22	26	0.85
DL-méthionine . .	6.2	13.3	0.47
L-phénylalanine .	2.7	11.3	
L-tryptophane .	3	4	
L-aspartate . . .	3	4	
L-histidine . . .	0	0	
L-proline . . .	0	0	

Le Tableau I systématisé la relation entre l'oxygène consommé et l'ammoniaque dégagé avec les dix acides aminés essayés.

Les suspensions de *Cl. sporogenes* lavé désaminent oxydativement cinq ac. aminés. Seuls les amino-acides naturels sont métabolisés. Ce sont: lalanine, la valine, la leucine,

l'isoleucine et la méthionine. La phénylalanine n'absorbe qu'un faible quantité d'oxygène, mais elle est fortement désaminée. Cette désamination diffère donc de celle des cinq acides aminés ci-dessus. Pour lalanine, la valine, la leucine et l'isoleucine, le rapport mol oxygène absorbé/mol ammoniaque dégagé = 1. Ces acides aminés absorbent donc 2 atomes d'oxygène par molécule d'ammoniaque. Par contre, la méthionine n'absorbe qu'un atome d'oxygène par molécule d'ammoniaque. Ceci semblerait indiquer qu'il y a différents enzymes responsables pour la désamination des différents acides aminés. Dans le même sens, doit être interprété le fait que le séjour à l'air, entraîne des pertes d'activité notables, mais sélectives. Ainsi, de jeunes suspensions après 6 heures de séjour à la glacière, nattaquent plus que lalanine, et non la leucine.

a) *Formation des acides  $\alpha$ -cétoniques.* Nous

avons isolé les acides  $\alpha$ -cétoniques correspondant aux acides aminés suivants: valine, leucine, isoleucine, méthionine.

20 ml d'un mélange contenant 500 micromols d'acide aminé dans du tampon de phosphate M/15  $pH = 7.0$  et une suspension correspondant à 20 mg d'azote bactérien sont agités à l'air à 37°. Lorsque toute consommation d' $O_2$  a cessé, on déprotéinise.

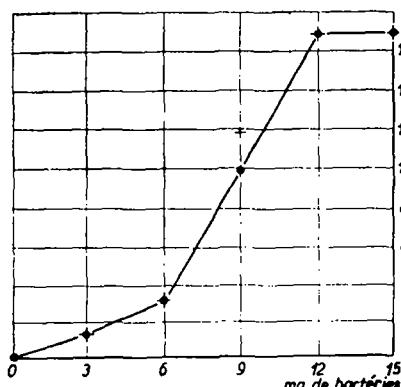


Fig. 2 (*Cl. sporogenes*). Oxygène absorbé (-) et ammoniaque dégagé (+) en millimolécules, en fonction de quantités croissantes de suspension. ( $O_2$  et  $NH_3$  de la suspension sans substrat défaillé)

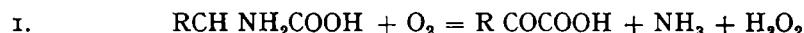
TABLEAU II  
Analyses faites au service de Microchimie de l'Institut Pasteur

2-4 dinitrosophényl hydrazone de	PF	Pf trouvé	N % calc.	N % trouvé	S % calc.	S % trouvé
Ac. $\alpha$ -céto $\beta$ -méthylbutyrique	194°	192°	18.9	18.3		
Ac. $\alpha$ -céto $\beta$ -méthylvalérianique	170°	170°	18.06	17.64		
Ac. $\alpha$ -céto $\gamma$ -méthylvalérianique	155°	155°	18.06	17.85		
Ac. $\alpha$ -céto $\gamma$ -méthiobutyrique	151°	151°	18.07	16.08	9.75	7.18

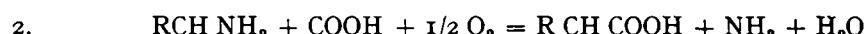
On centrifuge et on filtre; puis on ajoute au filtrat une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0.8% dans HCl 2N en évitant tout excès par rapport à l'acide cétonique formé. Les hydrazones précipitent presque instantanément. On filtre sur Iéna; le précipité est lavé avec HCl 2N et séché.

En revanche, nous n'avons pas pu isoler l'acide pyruvique provenant de la désamination de lalanine. La réaction avec la carboxylase ou la précipitation par la 2-4 dinitrophénylhydrazine ont été négatives. Pourtant, nous n'avons pas constaté l'absorption d'oxygène avec l'acide pyruvique + suspension microbienne dans l'appareil de Warburg. Aussi, est-il possible que la disparition de l'acide pyruvique soit due à son oxydation par l'eau oxygénée, produit de la réaction l-amino-acide oxydasique. Et ceci nous amène à considérer la formation de l'eau oxygénée.

b) *Eau oxygénée*. Nous avons vu qu'il y a deux atomes d'oxygène consommé par molécule d'ammoniaque dégagé avec lalanine, la valine, la leucine et l'isoleucine. L'oxydation des acides aminés se ferait donc d'après la réaction connue:



avec l'amino-acide oxydase du rein ou du foie et en présence de la catalase, la réaction s'écrit:



Il est connu que *Cl. sporogenes* ne contient pas de catalase. Si l'eau oxygénée se forme et ne disparaît pas plus vite par des réactions secondaires qu'elle ne réagit avec la catalase, la consommation d'oxygène doit tomber de moitié, parallèlement avec le quotient respiratoire en présence de la catalase. Aussi avons nous recherché l'influence de la catalase sur la consommation d'oxygène et de dégagement d'ammoniaque avec lalanine et la leucine. D'après le Tableau III la présence de la catalase n'influence ni l'absorption d'oxygène ni le dégagement d'ammoniaque.

TABLEAU III  
(*Cl. sporogenes*)

INFLUENCE DE LA CATALASE SUR LE RAPPORT OXYGÈNE CONSUMMÉ/AMMONIAQUE DÉGAGÉ  
Conditions expérimentales comme dans le Tableau I + 0.1 ml d'une solution concentrée de catalase.  
Durée: 100 minutes.

Substrat	O <sub>2</sub> absorbé en micromols	NH <sub>3</sub> dégagé en micromols	$\frac{O_2}{NH_3}$
L-alanine	18	20.5	0.84
L-leucine	16	23	0.7
DL-méthionine	6.4	15.7	0.4

Une légère augmentation d'ammoniaque en présence de catalase s'observe avec la suspension seule comme si la catalase, dans les suspensions sans substrat, favorisait l'autolyse.

Le  $O_2$  avec lalanine seule est égal à 0.8 et avec lalanine + catalase à 0.8. Les courbes en présence ou en absence de catalase avec lalanine, ou avec la leucine ont la même allure. (Courbes 4 et 5 Fig. 3). La catalase n'a donc pas d'action protectrice sur les suspensions de cette clostridie + acide aminé à l'air. De plus, si l'eau oxygénée est formée, la catalase n'agit pas sur elle de façon catalasique.

La détection de très faibles quantités d'eau oxygénée est pourtant possible grâce aux travaux de KEILIN ET HARTREE<sup>8</sup>. L'action peroxydasique de la catalase dans l'oxydation couplée change le rapport  $O_2$  consommé/ $NH_3$  dégagé de 1:1 à 2:1. Ainsi, en ajoutant de l'éthanol au système: alanine + catalase + suspension, nous avons trouvé une augmentation du double de la consommation d' $O_2$ , l'ammoniaque formé restant constant (Tableau IV et Fig. 3).

Il reste à expliquer la consommation importante d'oxygène en présence d'éthanol + catalase + suspension. La suspension seule n'attaque pas l'éthanol, tout en absorbant à elle seule 4 à 5 micromols d'oxygène et en formant, aux dépens de ses produits d'autolyse, l'eau oxygénée, laquelle, en présence de la catalase agit peroxydasiquement sur l'alcool éthylique.

TABLEAU IV

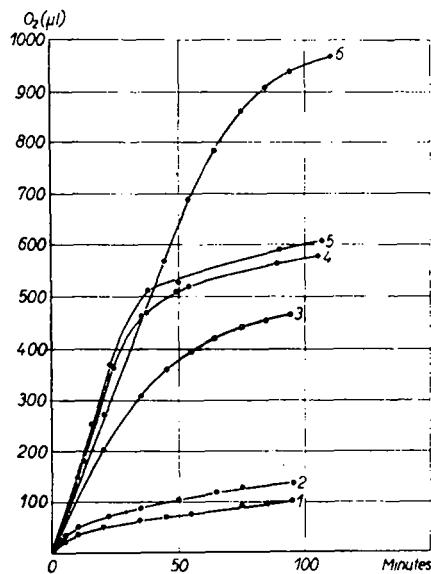
*(Cl. sporogenes)*

## INFLUENCE DE L'ÉTHANOL SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET SUR LE DÉGAGEMENT D'AMMONIAQUE EN PRÉSENCE DE SUSPENSION BACTÉRIENNE + ACIDE AMINÉ + CATALASE

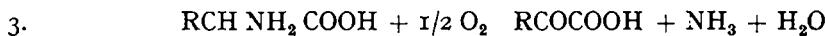
Fiole de Warburg avec deux logements latéraux, contenant 1 ml de suspension 0.2 ml de M/10 acide aminé; 0.1 ml de solution concentrée de catalase, 0.2 ml M/10 EtOH + tampon de phosphate; pH = 7.4; 0.2 ml KOH avec papier filtre. Gaz: air. T = 37°. Durée: 100 minutes.

Substrat	$O_2$ absorbé en $\mu M$		$NH_3$ dégagé en $\mu M$	
	sans EtOH + Cat.	avec EtOH + Cat.	sans EtOH + Cat.	avec EtOH + Cat.
L-alanine	17.5	37.5	20.5	25.3
L-leucine	16	33	20	21

c) *Désamination oxydative de la DL-méthionine.* La méthionine est désaminée oxydativement avec la même vitesse que les quatre acides aminés, mais d'après un schéma différent. En effet, le système méthionine + suspension ne consomme qu'un atome d'oxygène par molécule d'ammoniaque dégagé au lieu de 2 comme avec les autres acides



aminés. La catalase n'a pas d'action, ni sur l'absorption d' $O_2$ , ni sur le dégagement d' $NH_3$ . La 2-4 dinitrophénylhydrazone de l'acide cétonique correspondant à la méthionine a été isolée et caractérisée (Tableau II). La méthionine est donc désaminée à l'air par la suspension de *Cl. sporogenes* suivant la réaction 3.



La L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris* (bactérie aérobie) isolée et étudiée par STUMPF ET GREEN<sup>9</sup> agit également suivant l'équation 3.

d) *Action des inhibiteurs.* Le Tableau V résume l'action de KCN de l'alcool iso-octylique et de  $NaN_3$  sur la désamination oxydative de lalanine et de la leucine.

TABLEAU V

INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR LA DÉSAMINATION OXYDATIVE DE L'ALANINE ET DE LA LEUCINE  
PAR *Cl. sporogenes* ET PAR *Cl. saccharobutyricum*

	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>Cl. saccharobutyricum</i>
	p.c. de l'inhibition	
KCN M/300 . . . . .	100	0
Alc. iso-octylique (Sol. sat.) . . . . .	100	100
$NaN_3$ M/250 . . . . .	0	0

D'après les travaux de STUMPF ET GREEN, KCN et l'alcool iso-octylique inhibent la L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris*, mais non celle des tissus animaux. Nous avons obtenu une inhibition de 100% avec les deux inhibiteurs, pourtant, la désamination à l'air de lalanine et de la leucine par les suspensions de *Cl. sporogenes* se fait avec production d' $H_2O_2$ .

## 2. *Cl. saccharobutyricum*

Les suspensions de *Cl. saccharobutyricum* désaminent en présence d'oxygène six acides aminés sur les treize essayés (Tableau VI). Ce sont: la leucine, l'isoleucine la

TABLEAU VI  
(*Cl. saccharobutyricum*)

40 micromols d'acide aminé correspondant à la forme L, 1 ml de suspension (15 mg de poids sec). Tampon de phosphate à pH: 7.4. Volume total: 3 ml. Dans le logement central à 2 ml KOH à 10%. Durée d'expérience: 120 minutes.

Substrat	$O_2$ abs. en micromols	$NH_3$ dégagé en micromols	$\frac{O_2}{NH_3}$
L-alanine . . . . .	27	26	1.03
DL-isoleucine . . . . .	18	22.4	0.83
L-leucine . . . . .	27	45	0.60
L-valine . . . . .	9.6	19.2	0.50
DL-méthionine . . . . .	22.7	40	0.51
DL-sérine . . . . .	8.45	11	0.76
L-aspartate . . . . .	11.2	24.2	0.32
L-glutamate . . . . .	5.7	19.4	0.18
L-arginine . . . . .	0	0	
L-histidine . . . . .	0	0	
L-ornithine . . . . .	0	0	
L-proline . . . . .	0	0	
L-glycine . . . . .	0	0	

valine, l'alanine, la méthionine et la sérine. Ici également, il n'y a que la forme naturelle qui soit attaquée.

L'aspartate et le glutamate sont fortement désaminés sans absorption appréciable d'oxygène. Aussi la désamination de ces deux acides aminés se fait-elle par un mécanisme différent de celui des six acides aminés mentionnés plus haut. La même remarque est valable également pour l'histidine.

Le rapport de la consommation d'oxygène sur l'ammoniaque dégagé montre que la valine, la méthionine, la leucine absorbent un atome d'oxygène par molécule d'ammoniaque dégagé, l'isoleucine, l'alanine et la sérine consomment deux atomes d'oxygène par molécule d'ammoniaque dégagé. Nous avons isolé et identifié les mêmes acides cétoniques qu'avec *Cl. sporogenes*. Nous n'avons pas pu isoler l'acide pyruvique provenant de l'alanine ou de la sérine, confirmant ainsi les observations antérieures, — concernant l'alanine — de l'un de nous<sup>2</sup>. Est-il oxydé par l'eau oxygénée problématique, formée au cours de la désamination ou par un autre mécanisme?

a) *Recherche de l'eau oxygénée*. Pour les acides aminés suivants: isoleucine alanine, sérine qui absorbent deux atomes d'oxygène par molécule d'ammoniaque dégagé, il est naturel de supposer la formation de l'eau oxygénée. Nous avons cherché à la mettre en évidence par les mêmes méthodes que pour *Cl. sporogenes*. L'addition de la catalase seule n'a pas donné de résultats, comme pour *Cl. sporogenes* (Tableau VII).

TABLEAU VII  
(*Cl. saccharobutyricum*)

INFLUENCE DE LA CATALASE SUR LE RAPPORT: OXYGÈNE CONSOMMÉ AMMONIAQUE DÉGAGÉ. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES COMME POUR LE TABLEAU VI + 0.1 ml D'UNE SOLUTION CONCENTRÉE DE CATALASE

Substrat	O <sub>2</sub> absorbé en micromols	NH <sub>3</sub> dégagé en micromols	O <sub>2</sub> NH <sub>3</sub>
DL-isoleucine . . . . .	23.5	23.2	1.0
DL-méthionine . . . . .	22.4	42	0.53

Le test de KEILIN ET HARTREE, appliqué aux suspensions de *Cl. saccharobutyricum*, ne donne pas un résultat sans équivoque. En effet, l'éthanol seul, ajouté à la suspension,吸吸 de l'oxygène et la quantité d'oxygène absorbé avec l'alanine + éthanol + catalase est égal à la somme de l'oxygène absorbé dans les réactions de l'alanine + suspensions et d'éthanol + suspensions respectivement. Cette question n'est donc pas résolue. Il est à remarquer cependant, que la suspension de *Cl. saccharobutyricum* + éthanol consomme la même quantité d'oxygène que la suspension de *Cl. sporogenes* + éthanol + catalase (13 micromols).

b) *Action des inhibiteurs*. Le Tableau V résume l'action des inhibiteurs. Ce qui est à remarquer, c'est que KCN n'inhibe pas l'action amino-oxydasique de *Cl. saccharobutyricum*, tandis qu'il inhibe celle de *Cl. sporogenes*. L'inhibition par l'alcool iso-octyllique est de 100%, comme avec l'autre clostridie.

#### DISCUSSION

Nous ne dirons ici que quelques mots sur la formation de l'eau oxygénée. Nous avons montré sa présence dans les suspensions de *Cl. sporogenes* au cours de l'action

L-amino-acide oxydasique par le test de KEILIN ET HARTREE. Nous traiterons ce sujet dans un prochain mémoire avec ses conséquences sur le problème général de l'action léthale de l'oxygène sur les clostridies, comme l'un de nous l'a déjà fait<sup>3</sup>.

En ce qui concerne l'action de la catalase, nous avons montré qu'elle n'exerce pas d'action protectrice sur les suspensions, qu'elle n'agit pas catalasiquement sur l'eau oxygénée présente dans les suspensions. Cette non-protection par la catalase en présence de l'eau oxygénée est à souligner. En effet, l'action protectrice de la catalase contre l'eau oxygénée formée ou ajoutée a été observée par différents auteurs. Ainsi d'après SEVAG<sup>10</sup>, FUJITA ET KODAMA<sup>11</sup>, l'addition de la catalase aux suspensions des pneumocoques à l'air, les protège contre l'effet toxique de l'eau oxygénée. LWOFF ET MOREL<sup>12</sup> avec *Proteus vulgaris*, *B. subtilis*, *B. coli* et BIRKENSHAW ET RAISTRICK<sup>13</sup>, dans le cas de *Staphylococcus aureus*, ont mis en évidence l'action protectrice de la catalase.

Cependant, si la catalase n'agit pas catalasiquement dans les suspensions de *Cl. sporogenes*, elle agit peroxydасiquement en oxydant l'éthanol ajouté par  $H_2O_2$  formée dans l'oxydation primaire des acides aminés. Ce fait soutient les vues de KEILIN ET HARTREE<sup>8</sup> sur la fonction biologique de la catalase dans les oxydations couplées.

Quant à l'enzyme catalysant la désamination oxydative des acides aminés naturels dans les suspensions de *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*, il appartient au groupe des L-amino-acide oxydases. Ce groupe comprend :

1. La L-amino-acide oxydase du rein et du foie isolée par la méthode de WURMSER ET FILITTI-WURMSER<sup>14</sup>, par BLANCHARD, GREEN, NOCITO ET RATNER<sup>15</sup> et étudiée par ce même groupe de chercheurs.

2. La L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris*, isolée et étudiée par STUMPF ET GREEN<sup>9</sup>. Celle des tissus animaux oxyde les substrats en consommant une molécule d'oxygène avec formation d'eau oxygénée, tandis que celle de *Proteus vulgaris* ne consomme qu'un atome d'oxygène sans formation d'eau oxygénée.

La différence entre les deux enzymes se manifeste également envers les inhibiteurs. D'après STUMPF ET GREEN, KCN et l'alcool caprylique sont sans action sur la L-amino-acide oxydase des tissus animaux, tandis qu'ils inhibent la L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris*. Dans les deux cas, le bleu de méthylène peut remplacer l'oxygène comme accepteur d'hydrogène.

En ce qui concerne l'action L-amino-acide oxydasique des suspensions de *Cl. sporogenes*, si elle ressemble avec lalanine, la leucine, la valine et l'isoleucine, à celle des tissus, l'inhibition de la désamination par KCN et l'alcool iso-octylque, cependant l'en différencie. L'action L-amino-acide oxydasique de *Cl. saccharobutyricum* sur l'isoleucine, sur lalanine et sur la sérine, ressemble plus à celle des tissus, puisque KCN n'a pas d'action inhibitrice, bien qu'elle s'en différencie par l'inhibition par l'alcool iso-octylque. La désamination oxydative de la méthionine par *Cl. sporogenes* ressemble, et du point de vue de l'absorption d' $O_2$  et de l'action de KCN et de l'alcool iso-octylque, à celle de la L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris*. La désamination oxydative de la valine, de la leucine et de la méthionine ressemble à celle de la L-amino-acide oxydase de *Proteus vulgaris* en ce qui concerne l'absorption d'oxygène, mais en diffère par la non-inhibition par le cyanure de potassium.

On note une différence quand on remplace l'oxygène par un colorant comme accepteur d'hydrogène. Le bleu de méthylène ( $E'_o = 0.011$  V à  $pH\ 7$ ) peut remplacer l'oxygène aussi bien avec la L-aminoacide oxydase des tissus qu'avec celle de *Proteus vulgaris*. Or, d'après les résultats d'AUBEL, ROSENBERG ET DE CHEZELLES<sup>4</sup>, si le bleu de crésole

( $E'_o = 0.032$  V à pH 7) peut remplacer l'oxygène avec les suspensions de *Cl. sporogenes*, il n'en est pas de même pour *Cl. saccharobutyricum*. Les acides aminés se sont montré de faibles donneurs d'hydrogène avec la suspension de cette clostridie.

En résumé, l'action L-amino-acide oxydasique des suspensions de *Cl. sporogenes* et de *Cl. saccharobutyricum* ne cadre, d'une manière complète, ni avec les propriétés de la L-amino-acide oxydase des tissus, ni avec celle de *Proteus vulgaris*.

De plus, l'action L-amino-acide oxydasique des suspensions de *Cl. sporogenes* diffère de celle de *Cl. saccharobutyricum*: 1) par l'inhibition produite par KCN sur la première; 2) par le comportement différent envers le bleu de crésyle comme accepteur d'hydrogène.

Enfin, ni les suspensions de *Cl. sporogenes*, ni celles de *Cl. saccharobutyricum* n'agissent de la même façon sur les différents acides aminés, bien que l'action des suspensions de *Cl. sporogenes* soit plus uniforme. En effet, elles désaminent oxydativement, en consommant un ou deux atomes d'oxygène. Ces faits sembleraient indiquer: 1) qu'il existe d'autres amino-acides oxydases, différentes de celles des tissus et de celles de *Proteus vulgaris*; 2) qu'il y aurait diverses L-aminoacide oxydases pour les différents groupes d'acides aminés.

## RÉSUMÉ

1. Les suspensions de *Cl. sporogenes* et de *Cl. saccharobutyricum*, à l'air, sont capables de désaminer oxydativement un grand nombre d'acides aminés.
2. Seules les formes naturelles des acides aminés sont attaquées.
3. Avec *Cl. sporogenes* le rapport mol. O<sub>2</sub> absorbé : mol NH<sub>3</sub> dégagé est égal à un pour lalanine, la valine, la leucine et l'isoleucine. Le même rapport est égal à 0.5 pour la méthionine.
4. Avec *Cl. saccharobutyricum* le rapport mol O<sub>2</sub> absorbé : mol NH<sub>3</sub> dégagé est égal à un pour lalanine, la leucine, la sérine et à 0.5 pour la valine, la leucine et la méthionine.
5. Les 2-4 dinitrophénylhydrazones, des acides α-cétoniques correspondant aux acides aminés suivants: valine leucine, isoleucine, méthionine ont été isolés et identifiés. L'acide pyruvique, provenant de lalanine ou de la sérine, disparaît dans des réactions secondaires.
6. La formation de l'eau oxygénée a été démontrée avec les suspensions de *Cl. sporogenes* par le test de KEILIN ET HARTREE (oxydation couplée). Pour *Cl. saccharobutyricum*, cette question n'est pas résolue.
7. La catalase ajoutée ne protège pas les suspensions contre l'eau oxygénée; elle n'agit pas catalytiquement, mais d'une manière peroxydasique.
8. Le système enzymatique catalysant l'action L-aminoacide oxydasique est discuté.

## SUMMARY

1. Suspensions of *Cl. sporogenes* and of *Cl. saccharobutyricum* are capable, in air, of deaminating oxydatically a great number of amino-acids.
2. Only the natural forms of amino-acids are attacked.
3. With *Cl. sporogenes* the ratio mols oxygen absorbed : mols ammonia given off is equal to one for alanine, valine, leucine and isoleucine. This ratio is 0.5 for methionine.
4. With *Cl. saccharobutyricum* the same ratio is equal to one for alanine, leucine and serine, and to 0.5 for valine, isoleucine and methionine.
5. The 2-4 dinitrophenylhydrazones of the keto-acids corresponding to the following amino-acids: valine, leucine, isoleucine, methionine, were isolated and identified. The pyruvic acid formed from alanine or serine disappears in secondary reactions.
6. The formation of hydrogen peroxide was demonstrated with suspensions of *Cl. sporogenes* using the KEILIN-HARTREE test (coupled oxidation). This question is not cleared up for *Cl. saccharobutyricum*.
7. The catalase added does not protect the suspensions from hydrogen peroxide; it does not act as a catalase but as a peroxidase.
8. The enzymatic system which catalyses the L-amino-acid oxidase action is discussed.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Suspensionen von *Cl. sporogenes* und *Cl. saccharobutyricum* können an der Luft eine grosse Zahl von Aminosäuren oxydativ desaminieren.
2. Nur die natürlichen Formen der Aminosäuren werden angegriffen.
3. Mit *Cl. sporogenes* ist das Verhältnis des aufgenommenen Sauerstoffes zum abgegebenen Ammoniak in Mol für Alanin, Valin, Leudin, und Isoleucin gleich 1. Für Methionin ist dieses Verhältnis gleich 0.5.
4. Mit *Cl. saccharobutyricum* ist dieses Verhältnis gleich 1 für Alanin Leucin und Serin und gleich 0.5 für Valin, Isoleucin und Methionin.
5. Die 2-4 Dinitrophenylhydrazone der  $\alpha$ -Ketosäuren, welche den folgenden Aminosäuren entsprechen: Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, wurden isoliert und identifiziert. Die Brenzweinsäure, welche aus dem Alanin oder dem Serin stammt, verschwindet in Nebenreaktionen.
6. Die Bildung von Wasserstoffsperoxyd durch Suspensionen von *Cl. sporogenes* wurde durch den KEILIN-HARTREE'schen Test (gekoppelte Oxydation) nachgewiesen. Für *Cl. saccharobutyricum* ist diese Frage nicht gelöst.
7. Katalase schützt die Suspensionen nicht gegen Wasserstoffsperoxyd; sie wirkt hier nicht als Katalase sondern als Peroxydase.
8. Das Fermentsystem welches die L-Aminosäureoxydasewirkung katalysiert wird erörtert.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> E. AUBEL, A. J. ROSENBERG ET N. DE CHEZELLES, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 1152.
- <sup>2</sup> A. J. ROSENBERG, *Bull. soc. chim. biol.*, 28 (1946) 357.
- <sup>3</sup> A. J. ROSENBERG, *Thèse de Sciences*, Paris 1946.
- <sup>4</sup> E. AUBEL, A. J. ROSENBERG ET N. DE CHEZELLES, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1358.
- <sup>5</sup> H. A. KREBS, *Biochem. J.*, 29 (1935) 1620.
- <sup>6</sup> M. RAYMOND ET F. GROS, *Ann. inst. Pasteur*, 73 (1946) 1004.
- <sup>7</sup> D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 148.
- <sup>8</sup> D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 293.
- <sup>9</sup> P. K. STUMPF ET D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 387.
- <sup>10</sup> H. G. SEVAG, *Biochem. Z.*, 267 (1933) 211.
- <sup>11</sup> A. FUJITA ET T. KODAMA, *Biochem. Z.*, 277 (1935) 171.
- <sup>12</sup> A. LWOFF ET M. MOREL, *Ann. inst. Pasteur*, 68 (1942) 323.
- <sup>13</sup> J. H. BIRKINSHAW ET H. RAISTRICK, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 359.
- <sup>14</sup> R. WURMSER ET S. FILITTI-WURMSER, *Compt. rend. soc. biol.*, 128 (1938) 475.
- <sup>15</sup> M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO ET S. R. RATNER, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 421.

Reçu le 17 novembre 1948