

NÉCESSITÉ D'UN COENZYME POUR LE FONCTIONNEMENT DE LA DÉSULFINICASE

par

BERNADETTE BERGERET, FERNANDE CHATAGNER

ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

L'action de divers extraits de foie sur l'acide cystéinesulfonique¹ est susceptible de présenter des irrégularités notables, quoique ces extraits aient été obtenus dans des conditions apparemment identiques. Recherchant la cause de ces irrégularités, nous avons constaté qu'elles sont dues, au moins en partie, à une perte plus ou moins importante en un facteur indispensable au fonctionnement de la désulfénicase, perte qui a lieu au cours de la préparation de l'enzyme. Ce facteur est un coenzyme dont nous ignorons encore la nature; nous savons seulement qu'il est constitué par une molécule organique et que, en dehors du foie, il existe également dans la levure. Dans le présent travail, nous donnons quelques résultats expérimentaux qui mettent en évidence l'importance de ce coenzyme dans la désulfénation enzymatique de l'acide cystéinesulfonique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

La solution de désulfénicase est obtenue en traitant pendant 30 minutes à 0°, *n* g de poudre acétonique de foie de lapin² par *n*. 10 ml d'eau distillée. On centrifuge, lave le culot de centrifugation avec un peu d'eau qu'on ajoute à la solution enzymatique, et on complète le volume à *n*. 10 ml avec de l'eau. Le poids sec d'un tel extrait est de l'ordre de 30 mg par ml.

Les solutions de coenzyme débarrassées d'apoenzyme sont obtenues en traitant au bain-marie bouillant pendant 4 minutes la solution enzymatique précédente. On élimine par centrifugation les protéines coagulées par la chaleur, et on concentre sous vide, de telle sorte que 10 ml d'une telle préparation corresponde à un poids donné de la poudre acétonique extraite initialement. Le poids sec d'une solution de coenzyme contenant l'extrait de 1 g de poudre acétonique de foie dans 10 ml est de l'ordre de 10 à 15 mg par ml.

Les tubes utilisés dans les expériences et la mesure de l'activité des systèmes enzymatiques ont été décrits antérieurement¹. Les expériences sont faites ici en solution de bicarbonate de sodium à 0.16% et sous atmosphère d'azote contenant 10% d'anhydride carbonique; le pH du milieu est ainsi de 7.3. La température est de 35°, et la durée d'action est de 2 heures. Les résultats sont exprimés en micromolécules d'anhydride sulfureux dégagé.

1. Séparation du coenzyme par dialyse et réactivation de l'apoenzyme par addition de coenzyme

Dans 5 tubes contenant chacun 130 micromolécules de cystéinesulfinate de sodium dans 10 ml de solution de bicarbonate de sodium à 0.16%, on introduit:

Tube I: 10 ml de solution d'enzyme additionnée de bicarbonate de sodium à 0.16%, et correspondant à 1 g de poudre acétonique; cette solution est préparée extemporanément. Plus 5 ml de solution de bicarbonate.

Tube II: 10 ml de solution d'enzyme analogue à la précédente; mais cette solution a été préalablement maintenue pendant 7 heures à 0°. Plus 5 ml de solution de bicarbonate.

Tube III: 10 ml de solution d'enzyme analogue aux précédentes; mais cette solution a été préalablement dialysée pendant 7 heures à 0° contre une solution de bicarbonate de sodium à 0.16%. Plus 5 ml de solution de bicarbonate.

Tube IV: 10 ml de la solution d'enzyme dialysée comme dans le tube précédent, plus 5 ml d'une solution de coenzyme correspondant à 1 g de poudre acétonique, additionnée de bicarbonate de sodium à 0.16%.

Tube V: 5 ml de la solution de coenzyme utilisée dans le tube précédent, plus 10 ml de solution de bicarbonate.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I
INACTIVATION ET RÉACTIVATION DE LA DÉSULFINICASE
PAR ÉLIMINATION, PUIS ADDITION DE COENZYME

Tube	SO ₂ dégagé	Tube	SO ₂ dégagé
I	40	IV	30
II	29	V	6
III	5		

Les chiffres du Tableau I montrent que: 1. la désulfinicase perd son activité par dialyse; 2. son activité réapparaît après addition d'une solution de coenzyme; 3. la solution de coenzyme ne présente elle-même qu'une très faible activité; 4. le maintien de l'enzyme pendant 7 heures à 0° provoque une certaine inactivation.

2. Activation par le coenzyme d'un extrait non dialysé

Les solutions de désulfinicase obtenues par la méthode utilisée ici donnent normalement, sans addition supplémentaire de coenzyme, un dégagement d'anhydride sulfureux de 50 à 55 μ mol après 2 heures, pour 10 ml de solution enzymatique agissant sur 130 μ mol de cystéinesulfinate de sodium dans les conditions décrites; exceptionnellement, on obtient des préparations plus actives; mais on rencontre assez souvent des préparations fermentaires qui présentent une activité plus faible. Ces diverses préparations peuvent être généralement activées par addition de coenzyme. En voici un exemple:

Dans 5 tubes contenant chacun 130 micromolécules de cystéinesulfinate de sodium dans 10 ml de solution de bicarbonate de sodium à 0.32% et 10 ml de solution de désulfinicase, on introduit 5 ml de solution de coenzyme en concentrations croissantes, additionnées de bicarbonate à 0.16%. Dans un sixième tube, les 10 ml de solution de désulfinicase sont remplacés par 10 ml de solution de bicarbonate.

Le Tableau II présente les résultats obtenus.

Ces résultats montrent que l'addition de coenzyme donne à la préparation enzymatique une activité maximum qui ne peut être ensuite dépassée, quelle que soit la quantité de coenzyme ajoutée en excès.

TABLEAU II

ACTIVATION PAR LE COENZYME D'UNE SOLUTION DE DÉSULFINICASE

La concentration de la solution de coenzyme représentée par 1 est telle que 10 ml de solution correspondent à 1 g de poudre acétonique.

Tube	Solution de désulfinicase (ml)	Concentration de la solution de coenzyme	SO ₂ dégagé	
			absolu	corrigé*
I	10	0	31	31
II	10	1	51	45
III	10	2	65	54
IV	10	4	75	53
V	10	6	88	55
VI	0	2	11	—

* Corrections tenant compte de l'activité résiduelle des solutions de coenzyme; les chiffres corrigés représentent l'activité propre de la solution de désulfinicase réactivée.

3. Stabilité du coenzyme à la chaleur

Les expériences précédentes indiquent que les solutions de coenzyme obtenues après un chauffage de 4 minutes présentent encore par elles-mêmes une légère action sur l'acide cystéinesulfinique. Nous avons constaté qu'il est possible de supprimer pratiquement cette action en traitant la solution enzymatique au bain-marie bouillant pendant 15 minutes au lieu de 4. Mais on obtient alors des solutions de coenzyme sensiblement moins actives. L'expérience présentée ici est faite dans les conditions suivantes:

Dans 5 tubes contenant chacun 65 micromolécules de cystéinesulfinate de sodium dans 10 ml de solution de bicarbonate de sodium à 0.32%, on introduit soit 5 ml de solution de désulfinicase et 5 ml d'eau (S), soit 5 ml de solution de désulfinicase et 5 ml de solution de coenzyme, cette dernière correspondant à l'extraction de 2 g de poudre acétonique (SC), soit 5 ml de solution de coenzyme et 5 ml d'eau (C). Les résultats obtenus sont fournis par le Tableau III.

TABLEAU III

INFLUENCE DU TEMPS DE CHAUFFAGE SUR LE COENZYME

Contenu des tubes	Temps au bain-marie	SO ₂ dégagé	
		absolu	corrigé*
S	—	15	15
SC	4	38	32
SC	15	27	25
C	4	6	—
C	15	2	—

* Voir note du Tableau II.

4. Mise en évidence de la nature organique du coenzyme

Les cendres de la solution de coenzyme sont incapables d'activer l'apoenzyme de la désulfinicase. L'expérience est faite ici avec une solution de désulfinicase non préalablement dialysée, mais susceptible toutefois d'avoir son activité notablement accrue par addition de coenzyme. Les cendres sont obtenues par calcination dans une capsule de

platine de l'extrait sec de 10 ml de solution de coenzyme correspondant à 4 g de poudre acétonique. Le produit de cette calcination est dissous dans l'eau acidulée et la solution, ajustée à p_H 7.0 est ramenée à 10 ml. Chaque tube contient 65 micromolécules de cystéinesulfinate de sodium dans 10 ml de solution de bicarbonate de sodium à 0.32%. Les tubes sont additionnés en outre de soit 5 ml de solution de désulfénicase et 5 ml d'eau (S), soit 5 ml de solution de désulfénicase et 5 ml de solution de coenzyme (SC), soit 5 ml de solution de désulfénicase et 5 ml de solution de cendres (SM). Les poids secs, en mg par ml, des diverses solutions, sont les suivants: désulfénicase 30, coenzyme 38, cendres 6.5.

Le Tableau IV indique les résultats obtenus.

TABLEAU IV
ACTIONS COMPARÉES DU COENZYME ET DE SES CENDRES

Contenu des tubes	SO ₂ dégagé
S	24
SC	58
SM	2

Il apparaît ainsi que, non seulement les cendres n'ont aucun pouvoir activant vis-à-vis de la désulfénicase, mais que, au contraire, elles exercent une action inhibitrice nette. Le mécanisme de cette action est actuellement à l'étude.

5. Action de divers coenzymes sur la désulfénicase

La nature organique d'une partie au moins du coenzyme de la désulfénicase ayant été établie, il était intéressant de rechercher si des coenzymes connus étaient capables d'activer l'apoenzyme de la désulfénicase. Parmi ces coenzymes, deux sont particulièrement intéressants par suite de l'analogie des réactions auxquelles ils participent, réactions de décarboxylation, avec la désulfénation de l'acide cystéinesulfonique, ce sont la cocarboxylase et le phosphate de pyridoxal. Sans qu'il soit utile de donner ici de chiffres, disons que à la dose de 500 μ g par tube (20 ml), et en présence ou en absence de 1 mg de chlorure de magnésium, aucune activation de la désulfénicase n'a pu être mise en évidence avec les substances suivantes: cocarboxylase, phosphate de pyridoxal, pantothénate de calcium, lactoflavine. Il apparaît *a priori* peu probable que le phosphate de lactoflavine et les codéhydrogénases, que nous n'avons pas encore essayés, aient ici une action. Il semble donc que la codésulfénicase diffère des coenzymes actuellement connus.

6. Présence de la codésulfénicase dans la levure

On traite de la levure de boulangerie en la chauffant avec son poids d'eau à 100° pendant 15 minutes; le liquide obtenu après centrifugation contient le coenzyme, comme le montre l'expérience suivante:

Dans 3 tubes contenant chacun 65 micromolécules de cystéinesulfinate de sodium dans 10 ml de solution tampon de phosphates à p_H 7.35, on introduit:

Tube I: 5 ml de solution de désulfénicase moyennement active, plus 5 ml d'eau.

Tube II: 5 ml de la solution précédente de désulfénicase, plus 5 ml du liquide d'extraction de la levure.

Tube III: 5 ml du liquide d'extraction de la levure, plus 5 ml d'eau.

Les quantités d'anhydride sulfureux dégagé après 2 heures à 35° en atmosphère d'azote, sont données dans le Tableau V.

L'activation par l'extrait de levure, qui n'exerce lui-même aucune action sur l'acide cystéinesulfinique, est très nette.

Nous sommes heureux de remercier ici MM. GUNSALUS et WESTENBRINK qui nous ont aimablement envoyé les échantillons de phosphate de pyridoxal et de cocarboxylase utilisés ici.

TABLEAU V
ACTIVATION DE LA DÉSULFINICASE PAR UN EXTRAIT DE LEVURE

Tube	SO ₂ dégagé
I	16
II	47
III	0

RÉSUMÉ

La désulfinicase, inactivée par dialyse, récupère son activité après addition d'un extrait de foie incapable par lui-même d'agir sur l'acide cystéinesulfinique. L'activité des solutions de désulfinicase, même non dialysées, est généralement accrue par addition d'extrait de foie ou d'extrait de levure. Il apparaît ainsi que la désulfinicase nécessite pour son fonctionnement la présence d'un coenzyme, facilement dissociable de l'apoenzyme. Ce coenzyme est de nature organique et diffère de la cocarboxylase et du phosphate de pyridoxal.

SUMMARY

Desulphinacase, inactivated by dialysis, regains its activity after addition of a liver extract which itself is incapable of acting on cysteine-sulphinic acid. The activity of desulphinacase solutions, also undialysed ones, is generally increased by addition of liver extract or yeast extract. It thus appears that desulphinacase necessitates for its functioning the presence of a coenzyme, readily dissociable from the apoenzyme. This coenzyme is organic in nature and differs from cocarboxylase and pyridoxal phosphate.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Dialyse inaktivierte Desulfinicase erlangt ihre Wirksamkeit wieder nach Beifügung eines Leberextraktes der für sich selbst unfähig ist, auf Cysteinsulfinsäure einzuwirken. Die Wirksamkeit von Desulfinicase-Lösungen, sogar undialysierten, wird im Allgemeinen durch Zusatz von Leber- oder Hefeextrakten verstärkt. Es scheint also, dass die Desulfinicase zu ihrer Wirkung ein Coenzym braucht, welches leicht vom Apoenzym dissozierbar ist. Dieses Coenzym ist organischer Natur, jedoch verschieden von Cocarboxylase und von Pyridoxalphosphat.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT, F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 294.
² C. FROMAGEOT ET F. CHATAGNER, *Compt. rend.*, 224 (1947) 367.

Reçu le 17 mai 1949