

SUR L'ARGININEDÉSIMINASE ET SUR LA FORMATION ENZYMATIQUE DE CITRULLINE PAR LES LEVURES

par

JEAN ROCHE ET GABRIELLE LACOMBE

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)

Des recherches antérieures sur les déguanidases bactériennes^{1,2} nous ont conduit à envisager que la dégradation des guanidines monosubstituées est, en général, assurée soit par des hydrolases spécifiques génératrices d'urée (arginase, créatinase, glycyco-aminase), soit par l'argininedihydrolase, dont l'action donne directement naissance à de l'acide carbonique et à de l'ammoniac. La formation de citrulline aux dépens d'arginine a en outre été observée dans des cultures de divers microorganismes saprophytes^{3,4}, et, très récemment, dans celles de *Streptococcus faecalis*^{5,6,7} ou de *Staphylococcus aureus*⁸; l'enzyme catalysant ce processus, désigné sous les noms de guanidinedésimidase⁴ ou de métarginase⁵, n'a pas pu être extrait des cellules bactériennes. On a admis par ailleurs jusqu'ici que les levures renferment une arginase activable par l'ion manganèse⁹. Or, nous avons constaté que les levures de boulangerie métabolisent l'arginine au moyen d'un enzyme d'un tout autre type, générateur de citrulline. Le but de ce mémoire est de décrire l'extraction et les caractères de celui-ci, auquel nous proposons de donner le nom d'argininedésiminase. Ce terme paraît préférable à ceux antérieurement utilisés, car l'action de l'enzyme porte sur le groupe imine du radical guanidique de l'arginine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

a. Matériel d'étude et techniques

Le dosage de l'arginine a été opéré par la méthode de DUMAZERT ET POGGI¹⁰, celui de la citrulline par la méthode d'ARCHIBALD¹¹ et celui de l'ammoniac par déplacement au carbonate de lithium et titrage direct. Ces méthodes ont été appliquées au produit de la dialyse quantitative de milieux réactionnels, obtenu dans l'appareil d'HAMILTON ET ARCHIBALD¹².

b. Extraction de l'enzyme et identification des produits de son action sur la L-arginine

10 mg de levure de boulangerie pressée mis en suspension dans 20 ml d'un mélange tampon $4 \cdot 10^{-1} M$ aux phosphates de pH = 6.95 métabolisent 10 à 15 mg de L-arginine en 24 heures à 38°. L'enzyme opérant la dégradation de cet acide aminé a pu être séparé de la levure soit par plasmolyse, soit par extraction aqueuse après traitement à l'acétone. Dans le premier cas, il est présent dans le suc de plasmolyse (addition de chlorure de sodium pulvérisé à la levure pressée, abandon 2 heures à + 5° C de la masse liquéfiée et centrifugation), dont l'excès de chlorure de sodium est éliminé par dialyse à + 1° C; cette dernière opération inactive totalement l'enzyme si elle est poursuivie de 18 à 24 heures. Dans le second cas, l'enzyme souillé de quantités beaucoup moindres de protéines

Bibliographie p. 692.

cellulaires, peut faire l'objet d'un fractionnement; il est par ailleurs beaucoup plus stable et, comme on le verra, moins sensible à divers effecteurs que dans le suc de plasmolyse.

Les opérations permettant de le préparer sont alors les suivantes: la levure fraîche est traitée par un excès d'acétone refroidie à -10°C , essorée sur filtre de Büchner et séchée par aération. Elle est extraite 30 minutes à $+38^{\circ}\text{C}$ par deux fois son poids d'eau distillée et le liquide recueilli ($\text{pH} = 5.7-5.8$) est fractionné par l'éthanol à $+1^{\circ}\text{C}$. L'enzyme précipite à peu près intégralement entre des concentrations de 20 à 30% d'éthanol. Le produit de la macération aqueuse (30 minutes à $\text{pH} = 6.5-7.0$) de ces précipités présente un pouvoir argininolytique qu'une dialyse de trois jours ne réduit pas sensiblement. Il permet, en général, de dégrader à $\text{pH} = 6.5$ et à $+38^{\circ}\text{C}$, 1 à 2 mg de L-arginine en 2-6 heures par ml de solution enzymatique ramenée au volume initial de l'extrait de levure (teneur en N total inférieure à 0.05-0.1 mg par ml).

Le pH optimum d'action a été déterminé à $+38^{\circ}\text{C}$ dans des mélanges constitués par: solution enzymatique, 10 ml; solution tampon (aux phosphates alcalins ou acétoacétique) $2 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, 10 ml; chlorhydrate de L-arginine, 10.5 mg; toluène, 10 gouttes. Le dosage de l'arginine à des temps successifs (2.5 18 ou 24 heures) au cours de huit essais, dans lesquels le pH des milieux a été contrôlé au début et à la fin de l'expérience (variations en général supérieures à 0.1), a donné des résultats dont une partie a été reproduite dans la Fig. 1:

Le pH optimum est 6.2-6.5 et l'activité de l'enzyme est voisine de son maximum entre $\text{pH} = 5.8$ et 7.0, même dans la phase de la réaction où l'on mesure, à très peu près, la vitesse initiale de celle-ci; aucune différence sensible n'a été observée avec les divers mélanges tampon employés. Cette valeur, fort éloignée de celle du pH optimum de l'arginase bactérienne ($\text{pH} = 9.0$)¹³, est proche de celle caractérisant l'argininedihydrolase de divers microorganismes^{2, 14, 15}; aussi la nature du processus de dégradation de l'arginine par les levures méritait-elle d'être soumise à un nouvel examen.

Une première série d'essais a montré que l'arginase ne doit pas être mise en cause. En effet la disparition de l'arginine ne va de pair avec la formation d'urée à aucun pH compris entre 4.0 et 9.0, même en présence de $\text{SO}_4\text{Mn } 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, (recherche au xanthidrol négative) l'activité uréasique des préparations utilisées étant par ailleurs négligeable. Il a été établi en outre que de l'ammoniac prend naissance au cours de la dégradation de l'acide aminé, en sorte que ce processus devrait libérer simultanément de l'ornithine s'il traduisait l'action d'une argininedihydrolase. De la citrulline, de l'acide arginique ou son homologue cétonique pourraient également être présents si l'ammoniac provenait, dans le premier cas du groupement NH_2 du reste guanidique, et, dans le second, du groupement α aminé de l'arginine. L'étude qualitative des produits de la réaction a conduit à la mise en évidence de la citrulline, à l'exclusion des autres dérivés*.

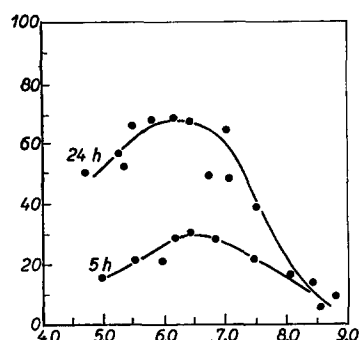


Fig. 1. pH optimum d'action de la dégradation de la L-arginine par des extraits de levure de boulangerie (argininedésiminase).

abscisses: pH.

ordonnées: % de l'arginine détruite dans les conditions expérimentales adoptées.

* Nous remercions Madame Y. ROBIN d'avoir bien voulu réaliser sur notre demande la caractérisation chromatographique des produits de la réaction étudiée.

La réaction jaune orangée à la diacétylmonoxime — donnée par la citrulline, mais non spécifique de celle-ci — devient rapidement positive dans les milieux où l'arginine est décomposée par l'enzyme. Il a été possible de caractériser la citrulline dans ceux-ci par chromatographie sur papier en opérant de la manière suivante: 20 mg de L-arginine ont été dissous dans 20 ml d'une solution d'enzyme dialysée et non additionnée de mélange tampon (extrait de levure traitée à l'acétone fractionné à l'alcool), et incubés 24 heures à $+ 38^{\circ}\text{C}$. Le milieu de $\text{pH} = 7.0$ et ne renfermant plus que 0.62 mg de l'acide aminé a été dialysé en fin d'expérience¹² contre 20 ml d'eau distillée, sous agitation pendant 4 heures, en renouvelant le liquide de dialyse toutes les heures. Les dialysats rassemblés et concentrés sous vide à 10 ml ont été soumis à la chromatographie sur papier Whatman N° 1 en utilisant le phénol saturé d'eau et additionné de 1% d'acide acétique comme phase solvante. La révélation des taches opérée à la ninhydrine sur des solutions témoins des corps purs a donné, dans les conditions adoptées, des valeurs de R_F égales à 0.73 pour l'arginine et à 0.62 pour la citrulline. Une tache de $R_F = 0.73$ s'est manifestée sur les chromatogrammes établis au temps zéro de l'action enzymatique, à l'exclusion d'une autre de $R_F = 0.62$. Celle-ci est, par contre, très importante sur les chromatogrammes établis à la fin de l'expérience, tandis que la première a, alors, pratiquement disparu (dégradation de 97% de l'arginine initialement présente). La tache de $R_F = 0.62$ est, par ailleurs, seule colorable en jaune orangé par la diacétylmonoxime.

De la citrulline se forme donc aux dépens de l'arginine.

c. Mode d'action de l'enzyme

L'étude quantitative de la réaction a porté sur les dosages de l'arginine, de la citrulline et de l'ammoniac. Quelques-uns des résultats obtenus ont été rassemblés dans le Tableau I, où on leur a juxtaposé les quantités de citrulline et d'ammoniac prenant théoriquement naissance molécule à molécule aux dépens de l'arginine.

TABLEAU I
FORMATION DE CITRULLINE ET D'AMMONIAC À PARTIR DE LA L-ARGININE
SOUS L'ACTION DE L'ENZYME EXTRAIT DES LEVURES

mg arginine disparus	mg NH_3		mg citrulline	
	dosés	théoriques	dosés	théoriques
8.87	—	—	9.02	8.92
9.07	—	—	8.75	9.12
9.73	—	—	9.00	9.78
15.10	0.54	0.52	—	—
25.50	2.05	2.05	—	—
30.40	2.40	2.40	—	—

Bien que le dosage de la citrulline soit moins précis que celui de l'ammoniac, la correspondance entre les données expérimentales et théoriques permet d'admettre que la dégradation enzymatique d'une molécule de L-arginine libère une molécule de citrulline et une molécule d'ammoniac.

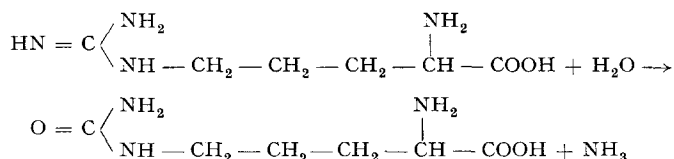
d. Spécificité et effecteurs de l'enzyme

Ni l'agmatine, ni la glycocyamine, ne subissent l'action de l'enzyme (avec ou sans addition de $\text{SO}_4 \text{Mn } 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$). Divers effecteurs de l'arginase de l'argininedihydrolase ou de la glycocyaminase ne se comportent pas identiquement vis-à-vis de celui-ci, selon qu'il provient d'un suc de plasmolyse ou d'extraits de levures traitées par l'acétone. Dans ces derniers, dont la stabilité au cours de la dialyse a déjà été signalée, et dans les produits de leur fractionnement par précipitation alcoolique, l'activité citrullinogène de l'enzyme est insensible à la présence de formateurs de complexes métalliques (azide de sodium $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ et diéthylthiocarbamate de sodium $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$), comme à celle de

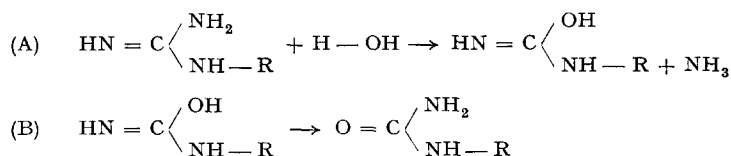
divers cations ($\text{SO}_4\text{Mn } 1 \cdot 10^{-3} M$, $\text{Cl}_2\text{Co } 1 \cdot 10^{-4} M$, $\text{NiCl}_2 2 \cdot 10^{-4} M$). Il en va tout autrement du suc de plasmolyse. Celui-ci conserve, après 4 à 6 heures de dialyse, une activité enzymatique notable, susceptible d'être renforcée par $\text{Cl}_2\text{Co } 1 \cdot 10^{-3} M$ (100–150%) et, à un degré moindre, par $\text{Cl}_2\text{Ni } 2 \cdot 10^{-4} M$ (70–80%), mais non par $\text{SO}_4\text{Mn } 1 \cdot 10^{-3}$ – $2 \cdot 10^{-4} M$. L'ion cuprique est alors fortement inhibiteur (80 à 90%) à des taux minimes ($\text{SO}_4\text{Cu } 1 \cdot 10^{-4} M$), même après addition d'ions cobalt. L'enzyme du suc de plasmolyse est régulièrement inactivé par une dialyse de 12 à 24 heures. Il est alors réactivable par Co^{++} et, plus encore, par Ni^{++} , mais non par Mn^{++} , les concentrations optima en sels des deux premiers étant $\text{Cl}_2\text{Co } 1 \cdot 10^{-3} M$ et $\text{Cl}_2\text{Ni } 2 \cdot 10^{-4} M$. La signification de ces faits sera examinée plus bas.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

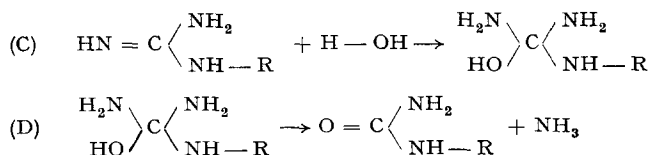
L'enzyme extrait des levures de boulangerie catalyse la formation de citrulline et d'ammoniac aux dépens de la L-arginine selon l'équation :



Nous proposons de le désigner sous le nom d'*argininedésiminase*, en raison de sa spécificité* et de la nature de son action globale (remplacement de l'imino-groupe du reste guanidique par un carbonyle). Cette dénomination ne préjuge pas du mécanisme intime de la réaction. La formation de citrulline aux dépens de l'arginine par des bactéries a été considérée⁴ comme une désamination du reste guanidique (A) suivie d'une tautomérisation (B) selon :



Ce mécanisme de dégradation d'un dérivé guanidique justifie l'adoption initiale du terme d'*argininedésimidase* pour l'enzyme citrullinogène. Il nous semble préférable d'envisager que, comme l'a admis KREBS dans le cas d'une étape intermédiaire de la désamination oxydative des acides aminés, l'imino-groupe fixe les éléments de l'eau (C) pour donner naissance à un composé instable, se décomposant spontanément suivant (D) :



* Dans le cas de *Streptococcus faecalis*⁶, il a été observé que l'acide arginique n'est pas dégradé par l'enzyme bactérien, dont la spécificité paraît également limitée à la L-arginine.

L'activation de l'iminogroupe par l'argininedésiminase permettrait alors son élimination du reste guanidique.

L'inégalité d'action de divers effecteurs selon l'origine des préparations appelle quelques remarques, car l'argininedésiminase se comporte comme un enzyme à constituant métallique typique dans les suc de plasmolyse, mais non dans les extraits des levures traitées par l'acétone fractionnés à l'éthanol. L'inactivation de l'enzyme par dialyse est, dans le premier cas, rapide et réversible sous l'influence des ions Co^{++} et Ni^{++} , tandis qu'elle n'a pratiquement pas lieu dans le second, les mêmes ions étant alors inefficaces. Aussi est-on conduit à envisager l'hypothèse d'une stabilisation de la région active de l'enzyme par un début de dénaturation dû à l'acétone ou à l'alcool. Pareil processus peut en effet avoir alors stabilisé une structure active de la protéine enzymatique dont un complexe métallique serait l'un des éléments constitutifs.

La signification biologique de l'existence d'une argininedésiminase dans certaines cellules mérite d'être brièvement discutée.

Les levures étudiées sont dépourvues d'arginase et il est possible que l'activité arginasique attribuée par EDLBACHER ET BAUR⁹ aux organismes de ce type doive être rapportée à une désiminase; nous n'avons toutefois pas retrouvé l'activation par les ions manganèses que signalent ces auteurs. De toute manière, l'enzyme que nous avons décrit dans les levures est probablement identique à celui de diverses bactéries d'où il n'a pas été possible de l'extraire³⁻⁸ et son existence implique que les unes et les autres métabolisent l'arginine en dehors du cycle de KREBS, comme certains invertébrés dépourvus d'arginase*. Pareille observation confère un intérêt particulier à l'étude de la dégradation de cet acide aminé par les cellules ou les organismes dans lesquelles cet enzyme fait défaut.

RÉSUMÉ

1. La levure de boulangerie renferme un enzyme donnant naissance à de la citrulline (1 mol) et à de l'ammoniac (1 mol), à partir de la L-arginine (1 mol).

2. L'enzyme citrullinogène ou *argininedésiminase* a été extrait des levures; il présente un pH optimum d'environ 6.5. Sa sensibilité à divers effecteurs varie selon les modalités de sa préparation; il se comporte dans le suc de plasmolyse comme un enzyme à constituant métallique dissociable (inhibition par des formateurs de complexe, par dialyse; réactivation par Co^{++} et Ni^{++}), mais non dans les extraits de levures traitées par l'acétone fractionnés à l'alcool. Ce fait peut être dû à la stabilisation d'une structure active par un début de dénaturation.

3. La présence d'argininedésiminase dans des cellules de levures dépourvues d'arginase implique qu'elles métabolisent l'arginine en dehors du cycle de KREBS.

SUMMARY

1. Baker's yeast contains an enzyme which forms 1 mol citrulline and 1 mol ammonia from 1 mol L-arginine.

2. Citrullinogenic enzyme, or *argininedésiminase*, has been extracted from yeast; it gives an optimum pH of about 6.5. Its sensitivity towards different effectors varies according to the method of its preparation; it behaves in plasmolysis sap as an enzyme with a dissociable metallic constituent (inhibition by complex formers, by dialysis; reactivation by Co^{++} and Ni^{++}), but not in the alcohol-fractionated extracts of acetone-treated yeast. This fact can be due to the stabilisation of an active structure by the beginning of denaturation.

3. The presence of argininedésiminase in yeast cells which contain no arginase implies that they metabolise arginine outside of the cycle of KREBS.

* Un travail poursuivi par l'un de nous sur ce sujet au Laboratoire maritime du Collège de France à Concarneau sera publié très prochainement.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bäckereihefe enthält ein Enzym, welches aus 1 Mol. L-Arginin je 1 Mol. Citrullin und 1 Mol. Ammoniak bildet.

2. Das Citrullin-bildende Enzym oder *Arginindesiminase* wurde aus der Hefe extrahiert; sein pH-Optimum beträgt ungefähr 6.5. Seine Empfindlichkeit gegen verschiedene Effektoren hängt von der Herstellungsweise ab; es verhält sich im Plasmolyse-Saft wie ein Enzym mit einem dissoziierbaren metallischen Bestandteil (Hemmung durch Komplexbildner, durch Dialyse; Reaktivierung durch Co^{++} und Ni^{++}), nicht aber in den mit Alkohol fraktionierten Auszügen aus mit Aceton vorbehandelter Hefe. Diese Tatsache kann der Stabilisierung einer aktiven Struktur durch eine beginnende Denaturierung zugeschrieben werden.

3. Die Gegenwart von Arginindesiminase in Hefezellen, welche keine Arginase enthalten, besagt, dass sie ausserhalb des KREBS'schen Cyklus Arginin metabolisieren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. ROCHE, H. GIRARD, G. LACOMBE, ET M. MOURGUE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 414.
- ² J. ROCHE, G. LACOMBE, ET H. GIRARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 210.
- ³ D. ACKERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 203 (1931) 66.
- ⁴ F. HORN, *Z. physiol. Chem.*, 216 (1933) 244.
- ⁵ S. TOMOTA, *Tokoku J. Exptl Med.*, 41 (1941) 317, cité d'après⁶.
- ⁶ S. AKAMATSU ET T. SEKINE, *J. Biochem.*, 138 (1951) 349.
- ⁷ V. A. KNIVETT, *Biochem. J.*, 50 (1952) xxx.
- ⁸ I. LOMINSKI, R. B. MORRISON, AND I. A. PORTER, *Biochem. J.*, 51 (1952) in the press.
- ⁹ S. EDLBACHER ET H. BAUR, *Z. physiol. Chem.*, 254 (1938) 275.
- ¹⁰ C. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 1381.
- ¹¹ R. M. ARCHIBALD, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 121.
- ¹² P. B. HAMILTON ET R. M. ARCHIBALD, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16 (1944) 136.
- ¹³ S. TOMOKA, *J. Biochem.*, 32 (1940) 307, 401; 33 (1941) 205.
- ¹⁴ G. M. HILLS, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1057.
- ¹⁵ C. F. NIVEN, K. L. SMILEY, ET J. M. SHERMANN, *J. Bact.*, 43 (1941) 561.

Reçu le 27 mars 1952