

Le carbamyl-phosphate, intermédiaire dans la dégradation de la créatinine par des extraits enzymatiques d'*Eubacterium sarcosinogenum*

L'importance biologique du carbamyl-phosphate, en tant que donneur du groupement carbamyl, a été mise en évidence chez les bactéries¹ et chez les animaux supérieurs². Les résultats obtenus se rapportent principalement au rôle du CAP dans le métabolisme de la citrulline.



Toutefois, il existe une différence importante dans le mécanisme de ces réactions: réversibles chez les bactéries, elles sont irréversibles chez les animaux supérieurs². C'est la réversibilité des réactions (1) et (2) dans les systèmes bactériens qui rend le CAP doublement important en tant qu'intermédiaire, puisqu'il peut servir non seulement comme donneur du groupement carbamyl, mais peut également, en présence d'ADP, conduire à la formation d'ATP.

Il sera montré, dans le présent travail, que le CAP est un intermédiaire dans la dégradation de la créatinine par des extraits acellulaires d'*Eubacterium sarcosinogenum*, Ls*.

Le milieu de culture et la préparation des extraits acellulaires ont été décrits antérieurement³.

Il a été montré précédemment³ que la dégradation anaérobique de la créatinine par *Eubact. sarcosinogenum* Ls. en sarcosine, NH₃ et CO₂ est associée à l'esterification de l'orthophosphate. Les expériences dans lesquelles on a utilisé [³²P]orthophosphate ont permis de mettre en évidence l'incorporation d'une partie de ce phosphate dans les polyphosphates minéraux³. Il a été également démontré⁶ que l'incubation d'un extrait enzymatique de ces bactéries, en présence de créatinine, d'ADP et de [³²P]-orthophosphate, conduit à la formation de [³²P]ATP. Cette formation est liée à la dégradation de la créatinine, mais le mécanisme de ces réactions était resté obscur.

Au cours d'une étude récente, nous avons observé la présence, dans les extraits de *Eubact. sarcosinogenum* Ls d'une carbamyl-phosphate synthétase et d'une ornithine transcarbamylase, enzymes catalysant respectivement les réactions (1) et (2). Les activités de ces deux enzymes ont été mesurées par la formation de la citrulline en employant comme donneur, soit le carbamate + ATP (1), soit le CAP (2), l'ornithine étant l'accepteur du groupe carbamyl.

A la suite de ces observations une expérience a été effectuée dans laquelle la source de carbamyl a été remplacée par la créatinine. Le Tableau I montre la formation de citrulline dans ces conditions. Le CAP transféré sur l'ornithine pour former la citrulline ne peut alors provenir que de la créatinine. Le Tableau I montre également que le rapport de NH₃ formé (soit sous forme libre, soit sous forme de carbamyl fixé sur l'ornithine) sur créatinine disparue, est ici inférieur à 2, alors qu'il est sensiblement égal à 2 avec des extraits dialysés. Ceci suggère que d'autres accepteurs d'NH₃ ou du groupe carbamyl peuvent être présents dans les extraits non dialysés. Si au

Abbréviations: CAP, carbamyl-phosphate; ADP, ATP, adénosine diphosphate et triphosphate; Pm, Tris, tris(hydroxy)méthylaminométhane.

* La bactérie anaérobique stricte provisoirement désignée "Clostridium Ls" dans des publications antérieures^{3,4} a été récemment déterminée⁵ et appelée: *Eubacterium sarcosinogenum nov. sp. # Ls.*

TABLEAU I

MISE EN ÉVIDENCE DE LA FORMATION DE CARBAMYL-PHOSPHATE AU COURS DE LA DÉGRADATION DE LA CRÉATININE PAR LES EXTRAITS D'*Eubacterium sarcosinogenum* LS

Le système complet contient: 0.3 ml d'extrait non dialysé (5.3 mg protéines); 10 μ moles de créatinine; 100 μ moles de tampon Tris, pH 8.5; 10 μ moles de $MgCl_2$; 10 μ moles d'ornithine; 5 μ moles d'ATP (ou d'ADP) dans un volume final de 1 ml. Incubation de 60 min à 31°. Réaction arrêtée par addition de 0.1 ml acide trichloroacétique 40%. Les dosages sont effectués sur le surnageant après centrifugation (créatinine, créatine et NH_3 sont dosés par les méthodes indiquées antérieurement³) (la citrulline est dosée par la méthode d'ARCHIBALD, modifiée⁷).

	Créatinine disparue (μ moles)	NH_3 formé (μ moles)	Citrulline formée (μ moles)
Système complet	5.54	5.6	3.21
Sans créatinine	0	0	0.15
Sans ornithine	3.46	6.50	0.09
Sans enzyme	0	0	0
Système complet à temps 0	0	0	0

* Les quantités de créatinine transformée en créatine ont été déduites de ces chiffres.

lieu d'ornithine on ajoute de l'acide aspartique au mélange réactionnel, il y a formation d'acide ureido-succinique que nous avons pu mettre en évidence par chromatographie sur papier.

Dans d'autres expériences effectuées dans des conditions identiques à celles résumées dans le Tableau I, mais dans lesquelles on a employé la [2-¹⁴C]créatinine (marquée dans le carbone guanidique), 40 à 60% de la radioactivité a été trouvée dans la citrulline avec une activité spécifique très voisine de celle de la créatinine au départ.

Bien que ces résultats montrent que le CAP est formé à partir de la créatinine, ils ne permettent cependant pas d'affirmer qu'il est un intermédiaire dans la dégra-

TABLEAU II

INCORPORATION DU CARBONE 2-¹⁴C DE LA CRÉATININE DANS LE CARBAMYL-PHOSPHATE EN ABSENCE ET EN PRÉSENCE DE CO_2 EN EXCÈS

Le système complet contient: 0.1 ml d'extrait enzymatique (2.1 mg protéine dans l'Exp. A et 3 mg dans l'Exp. B); 20 μ moles K_2HPO_4 ; 50 μ moles tampon Tris, pH 8.5; 6 μ moles de [2-¹⁴C]-créatinine (marquée dans le carbone guanidique); A.S. = 13,100 coups/min; 5 μ moles carbamyl-phosphate (sel de Lithium) (SIGMA); 10 μ moles $MgCl_2$. Dans l'Exp. B un échantillon parallèle contenait en plus 40 μ moles $NaHCO_3$. Volume final: 0.5 ml. Incubation 60 min à 31°. Le CAP a été séparé du mélange réactionnel par chromatographie sur papier (solvant: isobutanol-isopropanol- NH_3 - H_2O (40:20:1:39). R_F respectifs: CAP, 0.26; créatinine, 0.55; créatine, 0.39. Les éluats des taches correspondant au CAP ont été concentrés par lyophilisation et leurs radioactivités déterminées. Dans l'Exp. A, le ¹⁴CO₂, provenant du carbamyl-phosphate, a été obtenu par la décomposition de ce dernier dans les cellules de Conway, à l'aide de H_2SO_4 5 N, puis absorbé dans la soude. Le Na_2CO_3 a été ensuite transformé en $BaCO_3$. La radioactivité de ce dernier composé a été déterminé en tenant compte de l'absorption propre du $BaCO_3$.

Expériences	Créatinine disparue (μ moles)		2- ¹⁴ C de la créatinine incorporé dans le CAP (coups/min)				2- ¹⁴ C sous forme de ¹⁴ CO ₂ (ccoups/min)
			Sans CO_2		Plus CO_2		
	A	B	A	B	A	B	
Système complet	6.0	3.7	8525	3608	—	3058	5700
Système complet avec enzyme inactivée	0	0	0	125	—	209	0

dation de la créatinine. En effet, on pouvait admettre que le CAP provient exclusivement d'une synthèse *de novo* à partir de CO₂ et de NH₃ (produits finaux de la fermentation de la créatinine) par l'action de la CAP-synthétase. Pour montrer qu'il est également un intermédiaire nous avons effectué une expérience dans laquelle la [2-¹⁴C]créatinine a été incubée avec CAP en absence de CO₂ ou en présence de CO₂ en excès, dans les conditions indiquées dans le Tableau II (en absence de nucléotides). Ce Tableau montre qu'une partie de la radioactivité est retrouvée dans le CAP isolé du mélange réactionnel. Le fait que la présence d'un excès de CO₂ dans la réaction ne change pratiquement pas la radioactivité incorporée dans le CAP (Tableau II, Expt. B) prouve que cette incorporation n'est pas due à un échange entre le CO₂ provenant de la créatinine et le CAP ajouté. Un tel échange aurait pu être catalysé par des traces d'ATP présentes dans l'extrait. Le Tableau II montre également que la radioactivité du CAP se retrouve, après sa décomposition chimique, dans le CO₂ qui en résulte. La diminution de la radioactivité observée dans le CO₂ ainsi obtenu est sans doute due à la décomposition partielle, au cours des multiples opérations, du CAP, composé d'une stabilité relative.

Ces résultats permettent de conclure que le CAP est un intermédiaire dans la dégradation de la créatinine, telle qu'elle est catalysée par des extraits accellulaires d'*Eubact. sarcosinogenum* Ls. Ces extraits peuvent, par ailleurs, catalyser, en présence de créatinine et d'ATP (Tableau I), la synthèse *de novo* de CAP et son transfert sur différents accepteurs. Le mécanisme enzymatique de la formation du CAP, ainsi que son rôle dans le métabolisme de la créatinine, seront décrits ultérieurement.

Ce travail a bénéficié d'une subvention de "National Institutes of Health, Public Health Service, U.S.A."

*Institut de Biologie-Physico-Chimique,
13 rue Pierre Curie, Paris V (France)*

JEKISIEL SZULMAJSTER

- ¹ M. E. JONES, L. SPECTOR ET F. LIPMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 819.
- ² R. L. METZENBERG, L. M. HALL, M. MARSHALL ET P. P. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 229 (1957) 1019.
- ³ J. SZULMAJSTER ET R. GARDINER, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 165.
- ⁴ J. SZULMAJSTER, *Compt. rend.*, 249 (1960) 1962.
- ⁵ J. SZULMAJSTER ET P. KAISER, *Ann. inst. Pasteur*, 98 (1960) 774.
- ⁶ J. SZULMAJSTER, expériences non publiées.
- ⁷ S. RATNER dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Acad. Press, New York, Vol. II, 1955, p. 359.

Reçu le 24 mai 1960

Biochim. Biophys. Acta, 44 (1960) 173-175

Inhibition of enzymes by Atebrin

Inhibition of an enzymic reaction by Atebrin is frequently interpreted in the biochemical literature as a proof that a flavoprotein is involved in the reaction, especially when the inhibition is reversed by FMN or FAD. It is assumed that the drug competes with the flavin for the apo-enzyme.

It is the purpose of the present communication to draw attention to the fact,

Abbreviations: FMN, flavin mononucleotide; FAD, flavin-adenine dinucleotide; TPN, TPNH, oxidized and reduced triphosphopyridine nucleotide; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.