

BBA 65685

ARGININE OXYGENASE DECARBOXYLANTE

V. PURIFICATION ET NATURE FLAVINIQUE

A. OLOMUCKI, D. B. PHO, R. LEBAR*, L. DELCAMBE** ET N. V. THOAI

Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris (France)

(Reçu le 15 août, 1967)

SUMMARY

Arginine oxygenase (decarboxylating). V. Purification and flavin nature

1. Arginine oxygenase (decarboxylating) from *Streptomyces griseus*, the enzyme which converts L-arginine into γ -guanidobutyramide, has been purified.
2. The enzyme contains a flavin cofactor identified as FAD.
3. Analytical ultracentrifugation seems to demonstrate reversible dissociation of the protein.

INTRODUCTION

L'enzyme extrait du mycélium de *Streptomyces griseus* (Waksman) dégrade la L-arginine selon un mode très particulier, transformant cet acide aminé en γ -guanidobutyramide¹⁻⁴.

Au cours de ce processus, un atome d'oxygène de l'air est incorporé dans le produit de la réaction⁵, l'autre atome de la molécule O₂ étant réduit en H₂O. Cet enzyme peut donc être classé parmi les monooxygénases⁶ ou 'oxygénases à fonction mixte'⁷.

Récemment un autre enzyme du même type a été purifié par TAKEDA ET HAYASHI^{8,9}. Il s'agit de la lysine oxygénase de *Pseudomonas*¹⁰ qui oxyde la L-lysine en δ -aminovaléramide⁸.

Les deux enzymes sont donc actuellement les seules oxygénases connues dégradant les acides aminés aliphatiques en amides par une oxygénéation décarboxylante.

Au cours de la réaction enzymatique catalysée par les oxygénases, l'activation de l'oxygène moléculaire nécessite la présence, comme cofacteur, soit des métaux, soit des nucléotides flaviniques^{6,11}.

Si de nombreux renseignements concernant les caractères et le mode d'action de l'arginine oxygénase décarboxylante ont pu être obtenus avec des préparations

* Laboratoire d'Immunopathologie. Centre INSERM, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France.

** Centre National de Production et d'Etude des Substances d'Origine Microbienne, Liège, Belgique.

enzymatiques partiellement purifiées, il était nécessaire de disposer de l'enzyme pur pour entreprendre la recherche des cofacteurs et une étude plus approfondie du mécanisme de son action.

Dans le présent travail, nous décrirons la méthode que nous avons mise au point pour obtenir des préparations homogènes et qui ont permis l'identification du cofacteur flavinique de l'arginine oxygénase décarboxylante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits utilisés

Le FAD et le FMN sont des produits commerciaux. Le FMN est purifié par filtration de la solution aqueuse sur une colonne de Séphadex G-10 à l'abri de lumière.

Le gel de phosphate de calcium est préparé d'après TISELIUS, HJERTÉN ET LEVIN¹², et le gel d'alumine C₇ d'après WILLSTÄTTER, KRAUT ET ERBACHER¹³.

DEAE-Séphadex A-50 est lavé et régénéré d'après les indications du fabricant (Pharmacia, Uppsala).

Les tampons et les solutions enzymatiques contiennent de la L-arginine 0.01 M, indispensable à la protection de l'enzyme contre l'inactivation par l'oxygène de l'air^{3,14}.

Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation a été réalisée à la station centrale d'ultracentrifugation analytique du Centre National de la Recherche Scientifique, sous la direction de Mme FILITTI-WURMSER.

Détermination de la concentration en protéines

Selon les rapports des absorbances, mesurées à 280 m μ et 260 m μ , des préparations enzymatiques, la concentration des protéines est évaluée par deux méthodes différentes. Pour des rapports plus faibles que 0.8, on emploie la méthode de LOWRY *et al.*¹⁵. Lorsqu'ils deviennent supérieurs à 0.8, on utilise la méthode spectrophotométrique et les protéines sont évaluées d'après la formule de KALCKAR¹⁶.

Mesure d'activité enzymatique

L'activité enzymatique est mesurée comme il a été déjà indiqué³ dans les respiromètres de Warburg à 37°, à pH 9.0 en atmosphère d'oxygène en présence de L-arginine 0.01 M. L'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui dans ces conditions produit une consommation de 1 μ mole d'oxygène par minute.

Recherche du coenzyme

Les analyses spectrales sont effectuées à 4° aux spectrophotomètres Beckmann modèles DU et DB. Le FAD est évalué spectrophotométriquement en utilisant le coefficient d'absorption moléculaire de 11.3 · 10⁻³ M⁻¹ · cm⁻¹ (bibl. 17), à 450 m μ pour la flavine libre et à 460 m μ pour la flavoprotéine.

(a) Afin de caractériser le coenzyme, nous l'avons séparé de la protéine en utilisant deux méthodes.

(i) Le coenzyme est libéré après la destruction de la protéine par action de l'acide trichloroacétique. On ajoute 0.2 ml d'acide trichloroacétique à 25% à 0.8 ml de

solution enzymatique contenant 8.6 mg de protéines par ml; on agite 10 min, on centrifuge le mélange. Le liquide surnageant est réservé et le précipité est lavé 2 fois, chaque fois avec 0.2 ml d'acide trichloroacétique à 5%. Le premier surnageant et les liquides de lavage réunis sont ajustés à pH 7 par addition de quelques cristaux de Tris; le coenzyme est dosé spectrophotométriquement.

(2) Dans d'autres essais, nous avons cherché à conserver l'apoenzyme; nous avons donc dissocié l'enzyme en employant la méthode de WARBURG ET CHRISTIAN¹⁸.

A 8.5 mg de protéine enzymatique dissous dans 1.7 ml de tampon phosphate 0.01 M-arginine 0.01 M (pH 7.0), on ajoute successivement 0.4 ml de mercaptoéthanol 0.001 M, 530 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solide (45% de saturation) et 0.5 ml de H_2SO_4 0.5 M. Le pH final du mélange est égal à 2. Après 10 min de contact à 4°, on ajoute encore 295 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solide pour amener la concentration de ce dernier à 60%. Après centrifugation, le surnageant est réservé et le précipité est lavé à froid avec 0.2 ml d'une solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contenant du mercaptoéthanol 0.001 M. Le surnageant et le liquide de lavage constituent la solution de coenzyme qui, après concentration sous vide, sert à son identification par chromatographie. L'apoenzyme après l'élimination du coenzyme est repris dans 2.0 ml de tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.4).

(3) Dans d'autres expériences de dissociation de l'holoenzyme, nous avons, selon STRITTMATTER¹⁹ et MASSEY ET CURTI²⁰, raccourci le temps de traitement à pH acide et ajouté du KBr 3 M, ce qui facilite le détachement du coenzyme flavinique de la protéine²¹. Chaque fois, l'apoenzyme est repris dans le tampon Tris-HCl 0.01 M, mercaptoéthanol 0.001 M (pH 7.4), et dialysé deux fois contre 500 ml du même tampon pendant 5 à 6 h à froid. La solution protéique est d'environ 5 mg/ml.

(b) La reconstitution de l'holoenzyme a été effectuée soit par dialyse de l'apoenzyme contre une solution de FAD commercial, soit par incubation de l'apoenzyme avec le FAD.

(1) Ainsi, 1.8 ml de la solution d'apoenzyme obtenue par la méthode a2, contenant 3.1 mg de protéine par ml, sont dialysés 1 nuit contre 25 ml de solution de FAD 10^{-5} M dans du Tris-HCl 0.05 M, mercaptoéthanol 0.05 M (pH 6.5).

(2) Dans une autre expérience, 0.52 mg d'apoenzyme est incubé 1 h à 20° en présence de 1 mg d'albumine cristallisée et de 4 μ moles de FAD ou de FMN dans 0.5 ml de tampon Tris-HCl 0.05 M, arginine 0.05 M, mercaptoéthanol 0.05 M, pH final du mélange 9.0.

(c) Pour identifier le coenzyme, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince de cellulose MN 300 ou de gel de silice Merck, ou encore de gel de silice sur feuille de plastique d'Eastman Kodak. Nous avons employé comme solvants les systèmes suivants: I, *n*-butanol-éthanol-eau (50:25:25, v/v/v); II, *tert*.-butanol-eau (60:40, v/v) (bibl. 22); III, phosphate disodique à 5% en solution aqueuse saturée d'alcool isoamylique²²; IV, alcool *tert*.-amylique-acide formique-eau (60:20:20, v/v/v) (bibl. 24). Les nucléotides flaviniques ont été repérés par fluorescence en exposant les plaques aux rayons ultraviolets.

Purification de l'enzyme

Production du mycélium. La production à grande échelle du mycélium de *Streptomyces griseus* doué d'activité enzymatique convenable a fait l'objet de longues recherches et a été décrite récemment²⁵. Le mycélium est séparé du milieu de culture

par centrifugation à 4°. Après lavage avec une solution de NaCl à 9% le mycélium est homogénéisé mécaniquement avec un poids égal de solution d'arginine 0.01 M (pH 7.0), puis congelé et conservé²⁵.

(A) Extrait brut. 3.4 kg de mycélium sont décongelés et laissés pendant environ 20 h à 4°. Une centrifugation à 39 000 \times g donne 2730 ml d'extrait acellulaire brut A contenant 59 g de protéines.

(B) Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40 et 65% de saturation. L'extrait brut est additionné à froid de 610 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé. Une petite quantité de précipité de protéines inactives est éliminée par centrifugation à 9000 tours/min. Le surnageant est ensuite additionné de 470 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé. Après 1 nuit à 4°, le précipité est recueilli par centrifugation à 39 000 \times g puis dissous dans 800 ml d'arginine 0.01 M (pH 7.0) (fraction B renfermant 39 g de protéines).

(C) Elimination des acides nucléiques. Dans les fractions A et B, le rapport des absorbances à 280 m μ et 260 m μ est d'environ 0.5. Les traitements par la streptomycine, la protamine ou le MnCl₂ n'ayant pas donné de résultats, nous avons eu recours à la méthode d'ALBERTSSON²⁶ qui consiste en un partage du mélange d'acides nucléiques et de protéines, entre deux phases liquides non miscibles, de polyéthylène glycol et de dextrane. Nous avons adopté un mode opératoire basé sur celui décrit par OKAZAKI ET KORNBERG²⁷.

La fraction B est diluée à 1600 ml pour avoir 25 mg de protéines par ml et additionnée à un mélange composé de 184 ml de dextrane 500 à 20% et 516 ml de polyéthylène glycol 6000 à 30% de sorte que leurs concentrations finales soient 1.6 et 6.4% respectivement. L'addition de 540 g de NaCl (concentration finale 4 M) est suivie d'une agitation de 2 h à 4°. Les phases non miscibles sont séparées par centrifugation à 4500 tours/min. Le surnageant de polyéthylène glycol contient les protéines tandis que le culot de dextrane renferme les acides nucléiques. La fraction protéique de 2400 ml est dialysée 1 nuit à 4° contre 20 vol. de tampon phosphate 0.01 M (pH 7.0). L'addition de 820 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 4200 ml de dialysat (35% de saturation) permet de séparer par décantation, suivie de centrifugation, les deux phases non miscibles: la phase supérieure de polyéthylène glycol contient une petite quantité d'enzyme (moins de 1%) et la phase inférieure aqueuse, la majeure partie de l'enzyme. La solution contenant l'enzyme (4090 ml) est additionnée de 989 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé (70% de saturation) et le précipité flottant à la surface du liquide est recueilli par décantation, puis par filtration sur Hyflo super cel. Ce précipité dissous dans 500 ml de tampon phosphate 0.01 M (pH 7.0), constitue la fraction C; elle contient 11.185 g de protéines.

(D) Traitement par le gel de phosphate de calcium. La fraction C est diluée à 1400 ml pour avoir environ 8 mg de protéines par ml. Elle est traitée par 55 g de gel (5 fois le poids de protéines) à pH 7.0 et à 4°. L'enzyme est quantitativement adsorbé; le lavage du gel avec 175 ml de tampon phosphate 0.03 M permet d'éliminer les protéines inactives. L'enzyme est ensuite élué avec 4 portions successives de 175 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 7.0. Les éluats réunis (682 ml) sont précipités par 270 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé (65% de saturation). Le précipité dissous dans 300 ml de tampon phosphate 0.01 M contient 1.665 g de protéines.

(E) Traitement par le gel d'alumine C_Y. La fraction D diluée à 400 ml pour avoir 4 mg de protéines par ml est traitée à pH 7.0 par 6.8 g (4 fois le poids de protéines) de gel d'alumine. L'enzyme est adsorbé et après un lavage du gel avec 80 ml de tampon phosphate 0.03 M, l'élution est effectuée par 4 traitements avec chaque fois 60 ml de

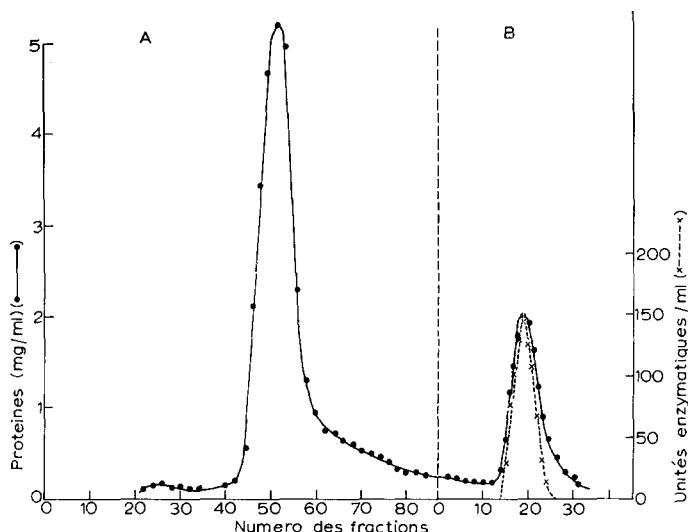


Fig. 1. Chromatographie sur DEAE-Séphadex des fractions éluées du gel d'alumine. Colonne: 48 cm \times 2 cm. 770 mg de protéines dans du tampon Tris-HCl 0.01 M, arginine 0.01 M (pH 7.4). A, lavage avec le même tampon additionné de NaCl 0.3 M; B, éluion par le gradient linéaire de NaCl de 0.3 à 0.45 M. ●—●, mg de protéines; ×---×, activité enzymatique en unités enzymatiques/ml.

tampon 0.1 M. Les éluats réunis ont un volume de 246 ml. Les protéines précipitées par 97 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (65% de saturation) sont ensuite redissoutes dans 70 ml de tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4). Cette fraction (E) contient 770 mg de protéines.

(F) Chromatographie sur DEAE-Séphadex. La fraction E est dialysée 1 nuit contre 70 vol. de tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4), diluée à 10 mg de protéines par ml et filtrée ensuite sur une colonne de DEAE-Séphadex de 48 cm \times 2 cm, équilibrée avec le même tampon. La vitesse d'écoulement est de 15 à 28 ml par h. On recueille des fractions de 7 ml. La colonne est d'abord lavée avec un volume de tampon initial puis avec 400 ml de ce même tampon additionné de NaCl 0.3 M. Une grande quantité de protéines inactives est ainsi éliminée (Fig. 1). Un gradient linéaire de concentrations croissantes de NaCl entre 0.3 et 0.45 M (volume: 600 ml) permet d'éluer l'enzyme. Les fractions douées d'activités spécifiques entre 66 et 67 unités enzymatiques/mg sont réunies. Elles constituent l'enzyme purifié F et contiennent 73 mg de protéines.

RÉSULTATS

Ainsi que le montre le Tableau I, la richesse en enzyme des différents lots de mycélium est très variable. En effet, la production de l'arginine oxygénase décarboxylante, enzyme induit³⁷, est influencée par de nombreux facteurs tels que l'aération, l'agitation, le pH, etc.²⁵. Le Tableau II rend compte du déroulement de la purification. Nous y avons consigné les résultats des traitements de deux lots de mycélium différents par leur richesse en enzyme. L'extrait brut 1 contient 4 fois moins d'unités d'enzyme par ml que l'extrait brut 2. Le taux de purification se trouve multiplié par 4 pour le premier extrait.

TABLEAU I

COMPARAISON DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES DIFFÉRENTS LOTS DE MYCÉLIUM
a, activité spécifique initiale; b, activité spécifique finale.

Lot de mycélium	Activité spécifique (unités enzymatiques/mg)		Taux de purification <i>b/a</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	
1	0.043	66.5	1600
2	0.056	67	1200
3	0.146	67.7	465
4	0.156	67.7	435

Nous traitons habituellement 3 à 4 kg de mycélium et nous obtenons suivant la richesse du mycélium 30 à 70 mg d'enzyme purifié.

Etude de l'enzyme par l'ultracentrifugation

L'enzyme purifié (fractions F) a été rechromatographié sur une deuxième colonne de DEAE-Séphadex. La Fig. 2 montre que le pic unique des protéines enzymatiques est parfaitement symétrique. Les fractions dont l'activité spécifique varie entre 66 et 67 unités enzymatiques/mg ont été rassemblées et soumises à l'ultracentrifugation analytique.

(a) *Vitesse de sédimentation.* La Fig. 3 indique que les 2 préparations (A et B) analysées contiennent un constituant principal dont la constante de sédimentation $s_{20,w}$ est égale à 10.7 et dont la teneur est de 95 ou 97%.

TABLEAU II

PURIFICATION DE L'ARGININE OXYGÉNASE DÉCARBOXYLANTE

Différentes étapes de purification décrites dans MÉTHODES.

Fractions	Protéines totales (mg)	280 $\mu\mu$	Activité enzymatique	rendement %	
		260 $\mu\mu$	unités enzymatiques totales		
<i>Préparation 1</i>					
A. Extrait brut	124 000	0.57	5200	0.043	100
B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-65 %	79 000		5650	0.071	
C. Dextrane-polyéthylène glycol	22 900	1.22	4900	0.214	95
D. Gel de phosphate de Ca	3 700	0.85	4070	1.10	78
E. Gel d'alumine	1 100	1.62	3760	3.40	72
F. DEAE-Séphadex	29	1.43	1900	66.5	36.5
<i>Préparation 2</i>					
A. Extrait brut	58 968	0.59	9200	0.156	100
B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-65 %	39 440	0.58	8500	0.217	92
C. Dextrane-polyéthylène glycol	11 185	1.14	8100	0.725	88
D. Gel de phosphate de Ca	1 665	0.89	7700	4.60	83.5
E. Gel d'alumine	770	1.59	6550	8.55	71.5
F. DEAE-Séphadex	73	1.37	4550	67.70	49.5

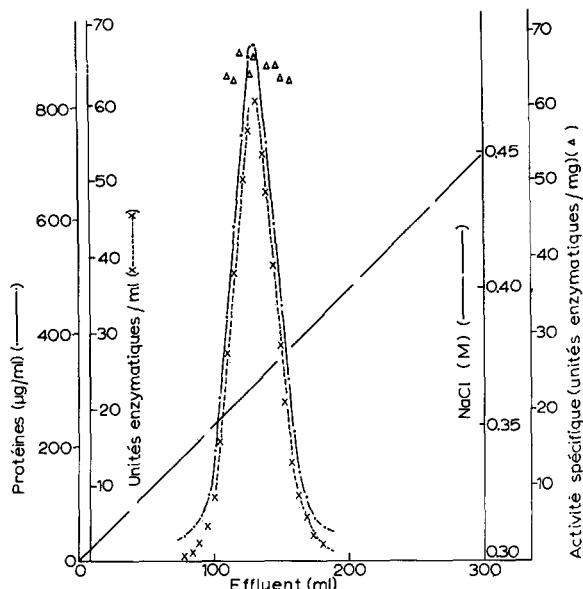


Fig. 2. Chromatographie sur DEAE-Sephadex de l'enzyme purifié. Mêmes conditions expérimentales que pour la Fig. 1. Colonne: 41 cm \times 1.4 cm. ●—●, mg de protéines; x---x, activité enzymatique en unités enzymatiques/ml; Δ , activité spécifique en unités enzymatiques/mg.

On observe en outre, la présence d'un (Fig. 3B) ou de deux (Fig. 3A) constituants mineurs plus légers. Il est cependant à remarquer que les concentrations relatives de tous ces différents constituants ne sont pas constantes : celles de la fraction principale diminuent, tandis que celles des autres fractions augmentent quand on diminue la teneur en protéines totales de la préparation analysée.

(b) *Approche de l'équilibre de sédimentation.* Des expériences à l'approche de l'équilibre de sédimentation, effectuées sur la même préparation que celle de la Fig. 3B, montrent aussi que le constituant principal se dissocie en donnant le constituant plus léger. Il y a dépendance entre les concentrations relatives de ces deux constituants et la concentration totale, car, à l'équilibre sédimentation-diffusion, on n'obtient pas une relation linéaire entre la diminution de concentration au ménisque et le gradient de concentration à ce même niveau (Fig. 4).

Dans ces conditions, le calcul des poids moléculaires n'est pas réalisable par cette méthode.

Identification du coenzyme flavinique

(a) *Analyse spectrale.* Les solutions enzymatiques purifiées présentent une coloration jaune très nette qui fait penser à la présence d'une flavine. Effectivement, le spectre de l'enzyme présente dans la zone du visible des maxima à $380\text{ m}\mu$ et $460\text{ m}\mu$ caractéristiques des flavoprotéines (Fig. 5, courbe 1). On observe un déplacement des bandes vers les grandes longueurs d'onde par rapport au FAD de référence (courbe 3). En présence du substrat et en anaérobiose, la couleur jaune disparaît tandis qu'apparaît une teinte gris-vertâtre. Celle-ci et non la turbidité peut expliquer l'absorption entre

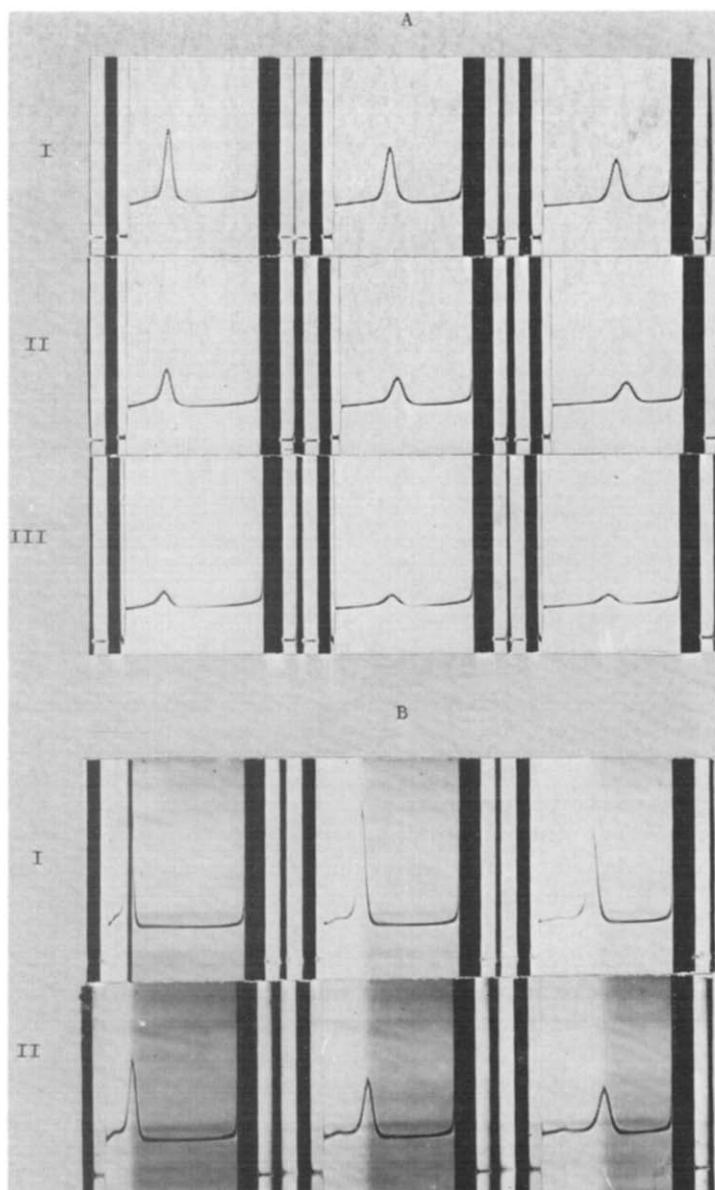


Fig. 3. Ultracentrifugation analytique de l'arginine-oxygénase décarboxylante purifiée. Tampon phosphate 0.01 M, arginine 0.01 M (pH 7.0). Vitesse de régime: 59 780 tours/min. Température: 4.5°. A. Concentrations en protéines totales: I, 11.5 mg/ml; II, 7.6 mg/ml; III, 3.8 mg/ml. Prises de vue après 34, 50 et 66 min. Concentrations relatives des 3 constituants en %: I, 0.80, 2.0, 97.2; II, 1.9, 3.95, 94.15; III, 2.44, 6.41, 91.15. B. Concentrations en protéines totales: I, 15.4 mg/ml; II, 10 mg/ml. Prises de vue après 19, 35 et 51 min pour I, et après 23, 39 et 55 min pour II. Concentrations relatives des 2 constituants en %: I, 4.73, 95.27; II, 7.28, 92.72.

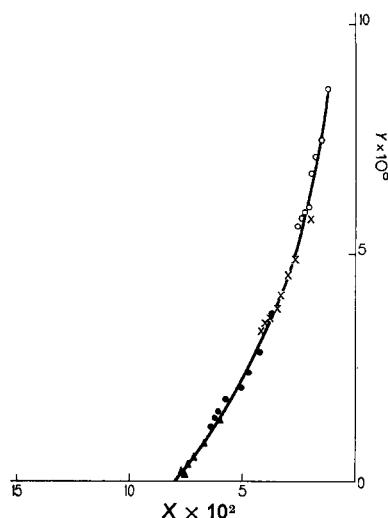


Fig. 4. Expérience d'approche de l'équilibre de sédimentation. En abscisses (de droite à gauche): diminutions de la concentration au ménisque; en ordonnées: gradients d'indice à ce même niveau pour des temps variables et des vitesses angulaires différentes²⁸:

$$Y = \frac{\delta n / \delta r}{\omega^2 r_m} G \quad X = \frac{1}{R^2 m} R^2 A y d R$$

G , facteur d'agrandissement; ω , vitesse angulaire; n , indice de réfraction; r , rayon de rotation; r_m , rayon de rotation au niveau du ménisque; R , rayon de rotation agrandi; R_m , rayon agrandi de rotation au niveau du ménisque; y , distance sur la projection du diagramme entre la ligne de base et le tracé du gradient d'indice, pour un rayon de rotation agrandi R . Concentration en protéines totales: 7.5 mg/ml. Tampon: phosphate 0.01 M, arginine 0.01 M (pH 7). Température: 0°. Vitesses: 9341 tours/min (○); 14 290 tours/min (x); 21 740 tours/min (●); 33 450 tours/min (▲).

550 m μ et 700 m μ observable sur l'enzyme (courbe 2) et non sur le FAD (courbe 1). L'enzyme non additionné d'arginine doit avoir retenu un peu du substrat qui a servi à sa conservation et présente également une légère absorption dans la zone des grandes longueurs d'onde (courbe 1). Le spectre est modifié: les deux pics à 380 m μ et 460 m μ

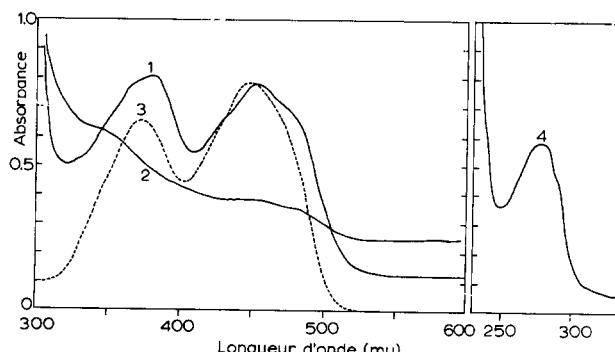


Fig. 5. Spectre d'absorption de l'arginine oxygénase décarboxylante en l'absence et en présence du substrat. 1, 5 mg/ml de l'enzyme dans le tampon phosphate 0.1 M (pH 7.0); 2, le même après addition de 0.1 ml d'arginine 1 M; 3, FAD $7.5 \cdot 10^{-5}$ M dans le tampon phosphate 0.1 M (pH 7.0); 4, enzyme intact ou apoenzyme.

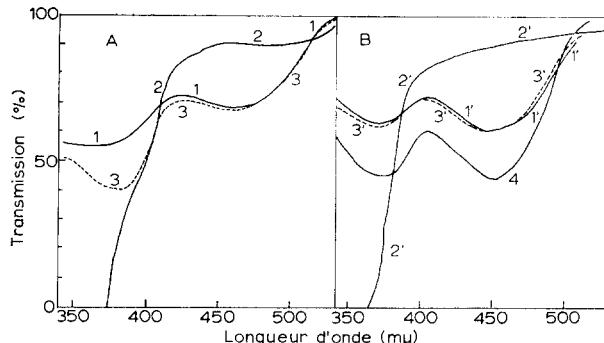


Fig. 6. Spectre de transmission de l'arginine oxygénase avant et après addition de dithionite. Enregistrement au spectrophotomètre Beckman enregistreur DB, avec une expansion d'échelle de 2 fois pour l'enzyme (A), et de 5 fois pour le coenzyme isolé (B,4), l'enregistreur étant réglé arbitrairement à 100% de transmission pour le début de l'enregistrement ($540\text{ m}\mu$), dans ces cas d'expansion d'échelle. A. Courbe 1, enzyme (4 mg/ml) dans le tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4); courbe 2, enzyme + dithionite; courbe 3, enzyme + dithionite après 5 min d'oxygénéation. B. Courbe 1', FAD $1.8 \cdot 10^{-5}$ M dans le tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4); courbe 2', FAD + dithionite; courbe 3', FAD + dithionite après 5 min d'oxygénéation; courbe 4, coenzyme de l'arginine oxygénase décarboxylante séparé de la protéine (voir MÉTHODES).

disparaissent (courbe 2). Une autre expérience a permis la décoloration complète par le dithionite (Fig. 6A, courbe 2); après oxygénéation, le spectre caractéristique réapparaît (Fig. 6A, courbe 3). Le même phénomène a lieu avec le FAD de référence (Fig. 6B, courbes 2' et 3').

Le coenzyme dissocié de la protéine présente un spectre identique à celui du FAD (Fig. 6B, courbes 4 et 1'). Le rapport des absorbances à $380\text{ m}\mu$ et $460\text{ m}\mu$ est

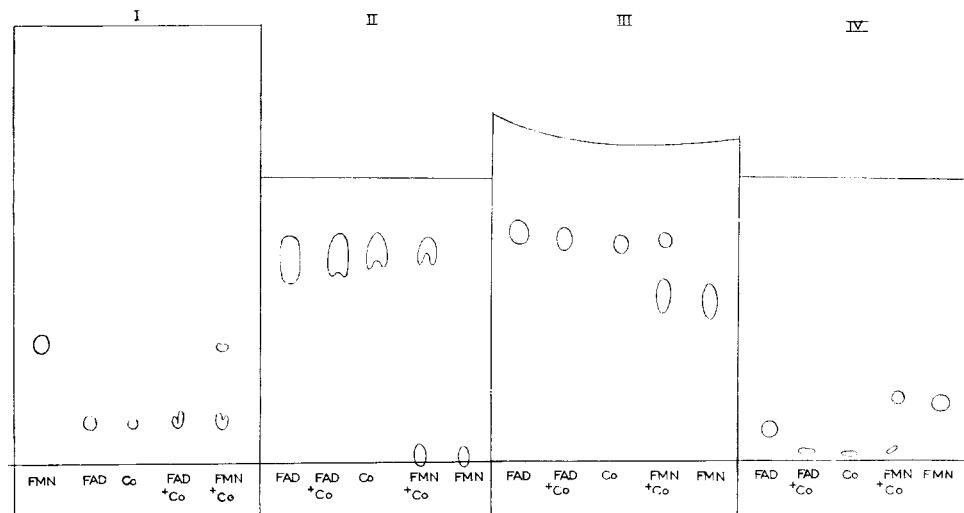


Fig. 7. Chromatographie sur couche mince du coenzyme de l'arginine oxygénase. Solvants décrits dans MÉTHODES. Supports: I, cellulose; II et III, gel de silice (Merck); IV, gel de silice imprégné de substance fluorescente (Eastman Kodak). Co, coenzyme.

TABLEAU III

RECONSTITUTION DE L'ENZYME DISSOCIÉ

Protéines	Activité spécifique (unités enzymatiques/mg)	% de l'activité initiale
A. Holoenzyme	24.6	100
Apoenzyme	2.6	9
Apoenzyme + FAD	15.3	59.5
B. Holoenzyme	65.5	100
Apoenzyme	1.1	1.7
Apoenzyme + FMN	2.16	3.3
Apoenzyme + FAD	14.3	21.8
C. Holoenzyme	61.5	100
Apoenzyme	3.16	5.1
Apoenzyme + FAD	21.3	34.5
D. Holoenzyme	63.2	100
Apoenzyme	28.2	45
Apoenzyme + FAD	49.0	77.5

- A. Enzyme dissocié par la méthode de WARBURG ET CHRISTIAN¹⁸. Réactivation par dialyse contre FAD 10^{-5} M (voir MÉTHODES).
- B. Enzyme dissocié comme dans A, mais en présence de KBr 1 M (bibl. 19 et 20). Réactivation par incubation de 0.52 mg d'apoenzyme avec 4 μ moles de FAD ou FMN.
- C. Même procédé que B sur un autre échantillon d'apoenzyme.
- D. Enzyme dissocié comme dans B, mais très rapidement par un seul traitement par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ acide.

plus grand que 1 dans le cas de l'holoenzyme tandis que, dans le coenzyme isolé, le rapport des absorbances à 375 m μ et 450 m μ est inférieur à 1.

Dans la zone des ayens ultraviolets, les spectres de l'holoenzyme et de l'apoenzyme présentent la même allure avec un maximum à 280 m μ et un épaulement à 290 m μ (Fig. 5, courbe 4).

(b) *Analyse chromatographique*. Ainsi que le montre la Fig. 7, en chromatographie

TABLEAU IV

RAPPORT COENZYME/APOENZYME

Exp.	FAD (mumoles)	Protéines (mg)	g protéines/mole FAD
A. Holoenzyme	50	6.92	138 000
Coenzyme séparé	51.6		134 000
B. Holoenzyme	34.5	4.53	131 000
C. Holoenzyme	58.8	7.95	135 000

A. Holoenzyme dans H₂O désionisée: 8.6 mg/ml. Coenzyme obtenu par action de l'acide trichloroacétique 5% (voir MÉTHODES).

B et C. Holoenzyme dissous dans le tampon phosphate 0.1 M (pH 7), reprécipité par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 65% de saturation et repris dans le même tampon.

B. 4.53 mg/ml. C. 7.95 mg/ml.

Détermination des protéines par spectrophotométrie, d'après KALCKAR¹⁶.

sur couche mince dans 4 solvants différents, les R_F du coenzyme coincident avec ceux du FAD et diffèrent très nettement de ceux du FMN.

(c) *Reconstitution de l'holoenzyme.* Afin de confirmer d'une autre façon l'identité du coenzyme de l'arginine oxygénase décarboxylante avec le FAD, nous avons procédé à la réassociation de l'apoenzyme avec le FAD commercial (voir MÉTHODES). Les résultats consignés dans le Tableau III montrent que l'enzyme inactivé par dissociation du coenzyme retrouve son activité dans une proportion de 21 à 77 % lorsqu'il est mis en présence de FAD. La méthode la plus efficace semble être la dialyse contre une solution de FAD 10^{-5} M. L'efficacité du FMN en tant que cofacteur est insignifiante.

(d) *Rapport coenzyme/apoenzyme.* Le Tableau IV montre les résultats du dosage du coenzyme effectués soit sur l'enzyme intact soit sur le coenzyme libéré de la protéine par l'action de l'acide trichloroacétique (voir MÉTHODES). Les deux procédés donnent des résultats comparables: on trouve 1 mole de FAD pour 130 000 g de protéines environ.

DISCUSSION

La méthode de purification décrite plus haut permet d'obtenir des préparations enzymatiques qui, se référant à un ensemble de faits, semblent être homogènes. La fraction unique E obtenue sur colonne de DEAE-Séphadex au cours de la préparation (Fig. 1), rechromatographiée sur une colonne analytique, présente un pic unique de protéines coincidant avec le sommet d'activité enzymatique (Fig. 2). A l'ultracentrifugation analytique, si les constituants mineurs observés étaient des impuretés, leur présence serait de plus en plus difficilement décelable avec la diminution de la concentration en protéines totales étudiées. En fait, et bien que les pourcentages indiqués ne peuvent être qu'approximatifs, l'évolution des concentrations relatives se produit en sens inverse.

L'étude à l'approche de l'équilibre de sédimentation et l'application de la théorie d'Archibald à des systèmes binaires^{38,39} ou ternaires²⁸ montrent la présence non de plusieurs segments de droite indiquant l'existence de plusieurs protéines indépendantes mais d'une courbe continue marquant l'interaction entre le constituant principal et les constituants mineurs.

L'ensemble de ces faits semble indiquer que la L-arginine oxygénase obtenue est homogène et qu'elle tend à se dissocier.

Le phénomène de dissociation spontanée de la protéine enzymatique en solution est fréquent. De nombreux travaux sur la D-amino-acide oxydase^{29,30} et sur la fructose phosphokinase³¹ en fournissent des exemples. Dans le cas de la D-amino-acide oxydase, la concentration de la protéine, le pH, la force ionique, la température jouent un rôle important dans l'équilibre association-dissociation. En présence d'ATP, la valeur de la constante de sédimentation de la fructose phosphokinase baisse³¹; il y a dépolymérisation. Pour ce type de protéines, il est très difficile de calculer le poids moléculaire réel; on peut seulement évaluer le poids moléculaire minimum (unitaire). Ainsi, le poids moléculaire minimum a été déterminé pour la D-amino-acide oxydase d'après la teneur en FAD (g de protéines par mole de FAD) et, pour la fructose phosphokinase, d'après le poids de protéines correspondant à une mole d'ATP fixé.

Pour l'arginine oxygénase décarboxylante, qui est une flavoprotéine, nous pouvons essayer également d'évaluer le poids moléculaire minimum en prenant comme

base de calcul la quantité de protéine correspondante à une mole de FAD fixé. Ainsi le poids moléculaire unitaire serait d'environ 130 000.

La présence de la flavine dans la molécule de l'arginine oxygénase décarboxylante est en accord avec le fait que de nombreuses monooxygénases purifiées dernièrement contiennent le cofacteur flavinique. Ainsi, la lysine oxygénase⁸, l'oxygénase de l'acide lactique³², l'imidazolacétate monooxygénase³³, la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase³⁴ sont des flavoenzymes. La présence de la flavine dans l'arginine oxygénase décarboxylante de *Streptomyces griseus* n'a pas pu être mise en évidence avant l'obtention de préparations enzymatiques très purifiées ; la grande quantité de pigments bruns empêchait toute étude spectrophotométrique. Les mêmes circonstances ont retardé l'identification par SUTTON^{35,36} de la flavine dans le lactate oxygénase.

En ce qui concerne la mécanisme de la réaction catalysée par l'arginine oxygénase décarboxylante, un certain nombre de données sont acquises.

La décoloration du FAD en l'absence d'oxygène et en présence du substrat prouve que la première étape consiste en la réduction du coenzyme par le substrat. Un atome d'oxygène activé est ensuite incorporé dans le produit de la réaction, l'autre étant réduit en H₂O, et le CO₂ est dégagé. L'enchaînement de ces différentes étapes reste à déterminer, de même que le mécanisme exact d'activation de l'oxygène.

La recherche des cofacteurs métalliques par les méthodes chimiques et par le spectre de résonance paramagnétique électronique est en cours.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame WURMSER de l'étude faite à l'ultracentrifugation analytique.

RÉSUMÉ

1. L'arginine oxygénase décarboxylante de *Streptomyces griseus* qui dégrade la L-arginine en γ -guanidobutyramide a été purifiée.
2. L'enzyme contient un cofacteur flavinique qui a été identifié au FAD.
3. L'ultracentrifugation analytique semble indiquer un phénomène de dissociation réversible de la protéine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. V. THOAI, J. L. HATT ET T. T. AN, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 589.
- 2 N. V. THOAI, J. L. HATT ET T. T. AN, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 116.
- 3 N. V. THOAI ET A. OLOMUCKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 533.
- 4 N. V. THOAI ET A. OLOMUCKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 552.
- 5 D. B. PHO, A. OLOMUCKI ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 118 (1966) 311.
- 6 O. HAYAISHI, *Proc. Intern. Congr. Biochem.*, 33 (1964) 31.
- 7 H. S. MASON, *Science*, 125 (1957) 1185.
- 8 H. TAKEDA ET O. HAYAISHI, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2733.
- 9 O. HAYAISHI, *Bacteriol. Rev.*, 30 (1966) 720.
- 10 N. ITADA, A. ICHIHARA, T. MAKITA, O. HAYAISHI, M. SUDA ET N. SASAKI, *J. Biochem. Tokyo*, 50 (1967) 118.
- 11 O. HAYAISHI, *Oxygenases*, Academic Press, New York, 1962, p. 1.
- 12 A. TISELIUS, S. HJERTÉN ET O. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- 13 R. WILLSTÄTTER, H. KRAUT ET O. ERBACHER, *Chem. Ber.*, 58 (1925) 2448.

- 14 A. OLOMUCKI, D. B. PHO ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 85 (1964) 480.
- 15 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 16 H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 461.
- 17 L. G. WHITBY, *Biochem. J.*, 54 (1953) 437.
- 18 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 298 (1938) 150.
- 19 P. STRITTMATTER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2329.
- 20 V. MASSEY ET B. CURTI, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3417.
- 21 H. THEORELL ET A. P. NYGAARD, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1649.
- 22 G. L. KILGOUR, S. P. FELTON ET F. M. HUENNEKENS, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2254.
- 23 C. E. CARTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1466.
- 24 C. S. HANES ET F. N. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- 25 L. DELCAMBE, D. B. PHO, F. REGNOUF ET A. OLOMUCKI, *Biotechnol. Bioeng.*, 7 (1965) 327.
- 26 P. A. ALBERTSSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 1.
- 27 T. OKAZAKI ET A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 259.
- 28 S. FILITTI-WURMSE ET C. GALLÉ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 713.
- 29 V. MASSEY, B. CURTI ET H. GANTHER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2347.
- 30 E. ANTONINI, M. BRUNORI, M. R. BRUZZESI, E. CHIANCONE ET V. MASSEY, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2358.
- 31 A. PARMEGGIANI, J. H. LUFT, D. S. LOVE ET E. G. KREBS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4625.
- 32 W. B. SUTTON, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 395.
- 33 Y. MAKI, S. YAMAMOTO, M. NOZAKI ET O. HAYASHI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25 (1966) 609.
- 34 K. HOSOKAWA ET R. Y. STANIER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2453.
- 35 W. B. SUTTON, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 309.
- 36 W. B. SUTTON, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 749.
- 37 N. V. THOAI, F. THOME-BEAU ET A. OLOMUCKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 115 (1966) 73.
- 38 S. R. ERLANDER ET J. F. FOSTER, *J. Polymer Sci.*, 37 (1959) 103.
- 39 R. TRAUTMAN, *J. Phys. Chem.*, 60 (1956) 1211.

Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 353-366