

BBA 66127

QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA L-AMINOACIDE-OXYDASE DU FOIE DE DINDON (*MELEAGRIS GALLOPAVO L.*)

J. MIZON, G. BISERTE ET P. BOULANGER

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie (Equipe de recherche associée au CNRS No. 32) et Unité de Recherches de l'INSERM sur la Biochimie des Protéines, Lille (France)

(Reçu le 16 janvier, 1970)

SUMMARY

L-Amino acid oxidase (EC 1.4.3.2) from turkey liver was extracted from acetone powder (pyrophosphate buffer, pH 8.3) and then precipitated using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ between 25 and 50% saturation. Purification was performed through gel filtration and ion-exchange chromatography. No progress was made with gel filtration on Sephadex G-200 or DEAE-Sephadex A-50. The best results were obtained by chromatography on DEAE-cellulose and elution using 0.25 and 1 M NaCl; but the loss of activity was very high (approx. 90%). Specific activity could not be further improved; the enzyme became insoluble and was rapidly inactivated. The physico-chemical properties of the purest preparation were determined.

The enzyme preparation is homogeneous in agar gel and cellulose acetate electrophoresis, but still heterogeneous in polyacrylamide gel electrophoresis and ultracentrifugation.

The coenzyme has been identified as FMN; it is firmly bound to the protein. Mn^{2+} is a powerful activator; magnesium, iron and molybdenum are inactive; Cu^{2+} behaves like an inhibitor in the presence of Mn^{2+} .

Cell fractionation has been performed and the enzyme could be detected mostly in the mitochondrial fraction and also in the supernatant; sonication of the mitochondria enhanced the activity.

A comparison is made between L-amino acid oxidase of turkey liver (for which the name "avian L-amino acid oxidase" is proposed) and the other amino acid oxidases.

INTRODUCTION

Nous avons en 1952 (réfs. 1, 19-22) caractérisé dans le foie de dindon* (*Meleagris gallopavo L.*) une aminoacide-oxydase spécifique des acides aminés de la série L et

* La L-aminoacide-oxydase est également présente dans le tissu rénal. Elle se retrouve aussi chez d'autres gallinacés et palmipèdes.

plus spécialement des acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine, ornithine). Le mode d'action de cet enzyme (désamination oxydative en *a*) a été établi et les produits de la réaction identifiés. Nous rapportons ici les résultats de nos essais de purification de la L-aminoacide-oxydase et nous décrivons quelques caractéristiques de l'enzyme purifié: coenzyme, effecteurs, pH optimum, *etc.*, ainsi que sa localisation cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(A) Préparation de l'enzyme

L'ensemble des opérations est conduit à 4°. On opère généralement à partir de 32 g de poudre acétonique de foie de dindon mis en suspension et agités pendant 45 min dans 600 ml de tampon pyrophosphate de sodium 16.7 mM de pH 8.3 à 38°. La suspension est centrifugée 20 min à 10 000 × *g* et le précipité est éliminé.

Le surnageant est additionné de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jusqu'à 25 % de saturation. Après 20 min, on centrifuge dans les mêmes conditions et le précipité est éliminé. La concentration du surnageant est portée à 50 % de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et après 20 min, le précipité formé est centrifugé, puis redissous dans la quantité minimale de tampon pyrophosphate 16.7 mM de pH 8.3 et la solution obtenue est dialysée pendant une nuit contre 2 l du même tampon.

(B) Méthode de mesure de l'activité enzymatique

La méthode manométrique de Warburg est utilisée pour mesurer la consommation de O_2 correspondant à la désamination de la L-lysine, prise comme acide aminé de référence.

Incubation à 37° en atmosphère de O_2 dans des fioles à appendice latéral (volume total: environ 15 ml): dans le puits central: 0.2 ml de KOH à 25 % absorbée sur un papier filtre plissé; dans l'espace annulaire: tampon phosphate de sodium 0.1 M de pH 6.5: 1 ml; solution de catalase 4 mg dans 10 ml: 0.1 ml; solution de FMN 2 mg dans 10 ml: 0.1 ml; solution de MnSO_4 : 50 μmoles dans 10 ml: 0.1 ml; la quantité voulue de préparation enzymatique; de l'eau pour compléter le volume à 2.3 ml; dans l'appendice latéral: 0.2 ml d'une solution de L-lysine à 2.5 mmoles dans 10 ml de tampon phosphate 0.025 M, ajustée à pH 6.5 (concentration finale 0.02 M).

Après équilibration à 37°, la réaction est déclenchée en faisant basculer la solution de lysine dans l'espace annulaire; les lectures sont effectuées à intervalles de 10 min de la 5ème à la 65ème min.

L'activité est exprimée en μl de O_2 consommés par min: 1 unité = 1 μl de O_2 par min.

Dosage de l'ammoniaque. Il est effectué par une méthode mettant en oeuvre une fixation sur échangeur de cations, avec détermination de l'ammoniaque par la réaction de Berthelot (phénol-hypochlorite) (*cf. réf. 2*).

(C) Méthodes électrophorétiques

Electrophorèse en gélose. Les électrophorèses en gélose sont effectuées selon SCHEIDEGGER³ en tampon véronal de pH 8.2; révélation par le vert de lissamine et par une méthode enzymatique, selon AVRAMEAS ET URIEL⁴ (après séchage partiel, afin de réduire la couche de gélose à une épaisseur de 0.5 mm, les plaques sont incubées

à 37° dans le réactif suivant, préparé extemporanément: monochlorhydrate de L-lysine: 50 mg; bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphénylmonotétrazolium: 10 mg; solution de MnSO₄ à 50 μmoles dans 10 ml: 2 ml; tampon phosphate de sodium 0.01 M de pH 6.5: 40 ml; on ajoute au dernier moment 6 mg de méthosulfate de phénazine; après apparition de la coloration, les plaques sont lavées à l'eau acétique à 2% et séchées).

Electrophorèse sur acétate de cellulose. Les électrophorèses sur acétate de cellulose sont effectuées sur bandes Sepraphore III (17 cm × 2.5 cm) à l'aide de l'appareil à électrophorèse Jouan. La migration se fait en tampon véronal sodique 0.056 M de pH 8.6 pendant 105 min, la différence de potentiel étant de 140 V entre les réservoirs à électrodes. Les bandes sont ensuite colorées par l'Amidoschwarz.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide. Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont effectuées selon la technique décrite par URIEL⁵.

RÉSULTATS

(A) Essais de purification

(1) Fractionnement sur DEAE-cellulose

L'extrait purifié est déposé sur une colonne de 60 cm × 3 cm de DEAE-cellulose Cellex D (0.66 mequiv/g), équilibrée contre le même tampon pyrophosphate; la vitesse d'écoulement étant réglée à 40 ml/h, on lave avec environ 1 l de tampon: des protéines inactives sont ainsi éluées dans les premiers tubes. Le degré d'absorption de l'éluat, suivi à 254 nm, retombe à zéro. A l'aide d'une solution de NaCl 0.25 M tamponnée par du pyrophosphate 0.0167 M à pH 8.3, l'enzyme est élué en un pic asymétrique ou en deux pics inégaux plus ou moins confondus (Fig. 1), pour lesquels on trouve la même activité spécifique. La solution correspondant à ces deux pics est récupérée et précipitée par le (NH₄)₂SO₄ à demi-saturation.

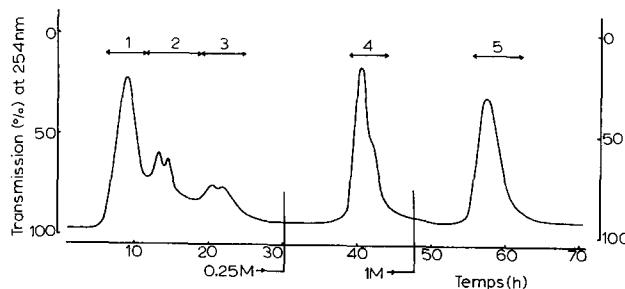


Fig. 1. Chromatographie de la L-aminoacide-oxydase sur DEAE-cellulose avec élation par NaCl 0.25 et 1 M. Récupération des pics: voir texte.

En dissolvant le précipité dans un tampon phosphate de sodium 0.025 M de pH 6.5 et en dialysant la solution obtenue contre le même tampon pour éliminer le (NH₄)₂SO₄ résiduel, on obtient une préparation, "enzyme purifié", stable à 4° pendant quelques semaines et stable après lyophilisation pendant plusieurs mois. Quand on fait le bilan de la purification de l'enzyme à partir de la poudre acétonique de foie, on

constate une perte d'activité importante. En effet, une partie appréciable de l'activité se retrouve dans tous les pics d'élution:

No. du pic (Fig. 1):	1	2	3	4	5
Volume total des fractions (ml)	15	7	6	18	6
Consommation de O ₂ ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	48	102	40	268	66

Cet échec partiel de la purification peut être attribué à l'insolubilisation de l'enzyme à des pH légèrement acides et aussi sans doute à une adsorption irréversible sur les supports de chromatographie.

Le passage de l'enzyme purifié sur une deuxième colonne de DEAE-cellulose, l'élution étant effectuée par divers gradients continuellement croissants de concentration de NaCl, n'a pas conduit à des résultats meilleurs.

(2) Gel-filtration sur Sephadex et DEAE-Sephadex

Nous avons cherché à purifier la préparation par gel-filtration sur colonne ascendante (100 cm \times 2,5 cm) de Sephadex G-200 en tampon pyrophosphate de sodium 16,7 mM de pH 8,3 et en tampon phosphate de sodium 0,025 M de pH 6,3: aucune augmentation de l'activité spécifique n'est obtenue et la perte d'activité totale est considérable. Il en est de même avec le DEAE-Sephadex A-50.

TABLEAU I

VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ EN FONCTION DE LA PURIFICATION

Préparation	Volume total (ml)	Poids de protéines (g)	Activité totale ($\mu\text{l de O}_2$ consommés par min)	Activité spécifique
1. Extrait brut	545	4,599	1526	0,33
2. Extrait purifié (après précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	6,5	1,515	1125	0,74
3. Enzyme purifié (après passage sur DEAE-cellulose)	17	0,293	218	0,74

C'est donc en définitive avec l'enzyme purifié défini en (1) que nous avons poursuivi notre étude. Quoiqu'il ne s'agisse certainement pas d'un enzyme pur, certains critères d'homogénéité sont positifs, notamment l'électrophorèse en gélose et sur acétate de cellulose; d'autre part, quand l'enzyme se sépare en deux pics, ceux-ci correspondent à une activité spécifique identique. L'étude des principaux caractères de l'enzyme nous paraît donc justifiée.

(B) Caractères électrophorétiques

En gélose, par révélation à l'Amidoschwarz et par révélation enzymatique, on met en évidence une seule bande importante ayant une vitesse de migration analogue à celle des β -globulines du sérum sanguin. Le résultat est comparable sur acétate de cellulose.

En gel de polyacrylamide, la préparation ne pénètre que partiellement dans le gel pour une concentration en acrylamide de 5%. La révélation spécifique est positive

pour la fraction qui a migré comme pour celle qui reste au point de dépôt. A une concentration en acrylamide de 3%, on obtient une zone protéique très étalée avec un renforcement localisé; mais la révélation par la méthode enzymatique est négative (dilution trop grande?).

(C) *Ultracentrifugation*

L'enzyme purifié a été soumis à l'ultracentrifugation en tampon phosphate 0.025 M + NaCl 0.2 M, de pH 6.5 (concentration 17 mg/ml). Trois composants ont été identifiés:

<i>Composant</i>	$s^0_{20,w}$	%
I	4.30	66
II	8.40	28
III	13.01	6

La préparation est donc hétérogène; l'activité spécifique relativement faible n'a pas permis de comparer les activités respectives des différents composants.

(D) *Spécificité vis-à-vis des substrats*

La L-aminoacide-oxydase du foie de Dindon désamine préférentiellement les L-aminoacides basiques et aromatiques (Tableau II)*.

TABLEAU II

ACTIVITÉ DE LA L-AMINOACIDE-OXYDASE DE FOIE DE DINDON VIS-À-VIS DES PRINCIPAUX ACIDES AMINÉS

Dispositions expérimentales: voir le texte. Les nombres entre parenthèses représentent les concentrations finales en substrat utilisées lors de l'essai comparatif.

<i>Substrat</i>	<i>% d'activité par rapport à la lysine</i>	<i>Valeurs apparentes de K_m (mM)</i> (pour une concn. de O_2 correspondant à une atmosphère de 100% de O_2)
L-Histidine	130 (10 mM)	6.2
L-Lysine	100	1.6
L-Phénylalanine	45 (20 mM)	3.5
L-Tyrosine	45	2.2
L-Arginine	45 (20 mM)	2.9
L-Ornithine	40 (20 mM)	6.2
L-Tryptophane	40 (10 mM)	2.2
L-Leucine	34 (10 mM)	10.0
L-Méthionine	10 (20 mM)	
D-Lysine	0	

* Il faut tenir compte, pour certains aminoacides, d'une consommation de O_2 qui se produit par simple incubation de l'aminoacide en l'absence de préparation enzymatique. Cette consommation reste assez faible dans le cas de la tyrosine, mais il n'en est pas de même pour

Parmi les aminoacides aliphatiques ramifiés la leucine est seule désaminée. La constante de Michaelis montre d'ailleurs la faible affinité de la leucine pour l'enzyme. Ce fait a déjà été signalé pour d'autres L-aminoacide-oxydases⁷. La L-cystéine est désaminée rapidement, mais une mesure précise est difficile par suite de la dégradation spontanée de cet aminoacide. L'activité est nulle vis-à-vis du glycocolle, de lalanine, des acides aminés dicarboxyliques (aspartique, glutamique et α -aminoacide), de la sérine, de la proline et de l'acide pipécolique.

Quand on mesure les activités relatives vis-à-vis de la lysine, de larginine et de la phénylalanine au cours des opérations de purification, les variations ne sont pas très significatives, ce qui est en faveur d'un enzyme unique.

La détermination des constantes de Michaelis permet surtout de mettre en évidence l'affinité particulière de l'enzyme pour la lysine.

Lhistidine, qui est l'acide aminé apparemment le plus rapidement désaminé, possède au contraire une des constantes les plus élevées; mais on constate que la quantité de O₂ consommée dépasse toujours notablement celle qui correspondrait à l'ammoniaque libérée: on peut donc envisager une oxydation ultérieure du produit de désamination.

Nous n'avons en aucun cas constaté l'inhibition par les concentrations élevées de substrat observée dans le cas de l'enzyme de venin de Serpent⁸.

La L-aminoacide-oxydase du foie de dindon n'oxyde pas les L- α -hydroxyacides (contrairement à la L-aminoacide-oxydase du rein de rat)⁹.

(E) pH optimum

Les principales aminoacide-oxydases animales étudiées ont des pH optimum d'action situés aux environs de 8, avec quelques variations (7.5-8.7) selon le substrat et l'origine de l'enzyme.

Le pH optimum de l'enzyme du foie de dindon est nettement plus bas: entre 6.5 et 7.0 pour la L-lysine. Le pyrophosphate de sodium, d'abord utilisé, a été abandonné au profit du phosphate de sodium dont le pouvoir est maximal dans la zone de pH voulu (Fig. 2). La forme de la courbe en tampon phosphate, plus étalée, se rapproche de celle qu'ont donnée NAKANO ET DANOWSKI⁹ pour la L-aminoacide-oxydase du rein de rat.

Au dessous de pH 6.0, la préparation enzymatique se trouble, l'activité restant cependant assez élevée. Par centrifugation, la majeure partie de l'activité accompagne le précipité, mais celui-ci se redissout très difficilement et incomplètement, ce qui est en faveur d'une dénaturation au moins partielle (voir (A)-(I)).

(F) Groupement prosthétique

Le coenzyme est assez fermement lié à la protéine: en effet, la préparation enzymatique n'est normalement pas activée par l'addition de FMN ou de FAD.

La dissociation peut cependant être réalisée partiellement par précipitation par le (NH₄)₂SO₄ à pH 3.2. A condition d'opérer en présence de manganèse, l'apoenzyme récupéré peut être réactivé par le FMN mais non par le FAD. On procède de la façon suivante:

lhistidine et le tryptophane qui, à une concentration finale de 0.01 M, peuvent consommer de 30 à 40 μ l de O₂ en 1 h. Cette oxydation ne se produit pas à lobscurité et il s'agit certainement d'une oxydation photochimique catalysée par la flavine; effectivement, elle ne s'observe pas en l'absence d'addition de FMN (voir à ce sujet réf. 6).

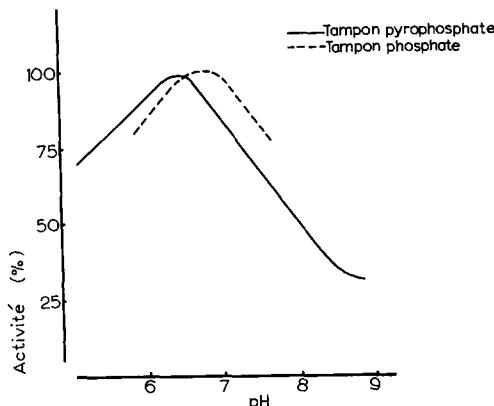


Fig. 2. Activité en fonction du pH. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité maximale dans le tampon considéré.

4 ml de préparation enzymatique (= 128 mg de protéine) sont dilués à 32 ml avec de l'eau et additionnés de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à raison de 300 mg/ml. On ajoute à froid, sous agitation, une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans H_2SO_4 0.5 M (220 mg/ml) jusqu'à pH 3.2. Après un repos de 10 min, la suspension est centrifugée 10 min à 10 000 × g. Le précipité est repris par 5 ml de tampon phosphate 0.025 M de pH 6.5 et la solution est complétée à 30 ml avec de l'eau. Le traitement par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à pH 3.2 est renouvelé et le précipité obtenu est repris par du tampon phosphate 0.1 M de pH 6.5 et amené à un volume de 5 ml. L'activité enzymatique est mesurée sur 0.5 ml de la préparation enzymatique ainsi obtenue. Les résultats sont reproduits dans le Tableau III.

De nombreux essais de dissociation plus poussée du coenzyme ont été effectués, afin d'obtenir un apoenzyme totalement inactif, mais les résultats ne sont pas plus démonstratifs, par suite de la dénaturation partielle de l'enzyme.

(G) Effecteurs

Le rôle important du manganèse a déjà été signalé à propos de la réactivation

TABLEAU III

ACTIVATION DE LA L-AMINOACIDE-OXYDASE PAR LE FMN

Dispositions expérimentales: voir le texte. Les additions de coenzyme et de manganèse varient et sont indiquées dans le tableau. Les quantités de manganèse sont exprimées en ml de solution de MnSO_4 à 50 μmoles pour 10 ml; les quantités de FMN ou FAD sont exprimées en ml de solution à 2 mg pour 10 ml.

Fiole	Mn^{2+}	FMN	FAD	$\mu\text{l de O}_2$ consommés en 1 h
1	0	0	0	39
2	0.1	0	0	40
3	0	0	0.1	42
4	0.1	0	0.1	50
5	0	0.1	0	45
6	0.1	0.1	0	83
7	0.1	0.05	0	72
8	0.1	0.05	0.05	74

de l'apoenzyme par le FMN. La concentration utilisée dans les essais (0.2 mM) permet de doubler l'activité initiale*. Le magnésium, qui avait été décrit comme activateur de l'enzyme de l'hépato-pancréas de *Cardium tuberculatum*⁷, ne peut ici remplacer le manganèse; le fer et le molybdène n'ont aucune influence. Le cuivre (concentration finale: de 1 mM) provoque une inhibition de 50% en présence de manganèse, mais n'a pratiquement pas d'action en son absence; il est probablement incapable de déplacer le manganèse qui reste fixé à l'enzyme et il ne peut entrer en compétition qu'avec les ions Mn²⁺ ajoutés au milieu d'incubation.

L'enzyme n'est pas inhibé par le (NH₄)₂SO₄, même à une concentration finale de 0.12 M, ni par l'acide benzoïque (concentration finale de 0.01 M).

(H) Répartition intracellulaire

Un fractionnement cellulaire a été effectué sur un foie de dindon prélevé immédiatement après sacrifice de l'animal. Il a été réalisé par la méthode de centrifugation différentielle dans le milieu de HOGEBOOM *et al.*¹¹ et selon CHAUVEAU *et al.*¹².

Une première détermination d'activité a fait apparaître une localisation très prépondérante de la L-aminoacide-oxydase dans les mitochondries, 3 fois plus actives que le surnageant cytoplasmique. Les mitochondries ont été soumises à un traitement sonique à 10 kcycles pendant 4 min; la suspension résultante, centrifugée 30 min à 40 000 g, donne un surnageant et un culot qui est remis en suspension dans le même tampon: l'activité totale est multipliée par 3, dont environ 2/3 dans le surnageant et 1/3 dans le culot.

Nos résultats diffèrent donc sensiblement de ceux de NAKANO *et al.*¹³ qui, opérant sur la L-aminoacide-oxydase du rein de rat, trouvent une activité 4 fois plus importante dans la fraction soluble que dans les mitochondries.

L'augmentation d'activité enregistrée après sonication fait ressortir l'accessibilité réduite de l'enzyme à son substrat, ainsi que la solubilisation difficile de la protéine enzymatique, qui reste en grande partie accrochée aux membranes mitochondrielles dans le sédiment.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos résultats permettent la comparaison de la L-aminoacide-oxydase du foie de dindon avec les autres aminoacide-oxydases, comparaison facilitée par le Tableau IV.

La propriété la plus caractéristique est la spécificité vis-à-vis des acides aminés basiques et surtout de la L-lysine. Toutes les aminoacide-oxydases étudiées jusqu'à présent (y compris la D-aminoacide-oxydase du rein de porc) désaminent préférentiellement les acides aminés "neutres", les acides aminés aromatiques et la méthionine se plaçant pour toutes les aminoacide-oxydases en seconde position.

L'affinité de l'enzyme pour la lysine est particulièrement élevée ($K_m = 1.6 \text{ mM}$); elle est nettement supérieure, par exemple, à celle de la L-aminoacide-oxydase du rein de rat vis-à-vis de son substrat le plus "actif", la leucine.

L'autre différence importante concerne le pH optimum, qui, pour les autres aminoacide-oxydases animales se situe dans la zone alcaline et qui est ici au voisinage de 6.5.

* NAKANO *et al.*¹⁰ ont constaté l'existence d'un activateur dialysable de la L-aminoacide-oxydase du rein de rat: on peut se demander s'il ne s'agit pas aussi d'ions métalliques.

TABLEAU IV
PROPRIÉTÉS COMPARÉES DES AMINOACIDE OXYDASES

	<i>L-Aminoacide-oxydase Rein de rat^{8,13,14}</i>	<i>L-Aminoacide-oxydase Venin de serpent¹⁵</i>	<i>L-Aminoacide-oxydase Neuros- pora crassa¹⁶</i>	<i>L-Aminoacide-oxydase Proteus vulgaris¹⁷</i>	<i>L-Aminoacide-oxydase Foie de dindon</i>	<i>D-Aminoacide-oxydase Rein de porc¹⁸</i>
Préparation	Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DEAE-cellulose; 1ère colonne gradient discontinu 2ème colonne gradient continu, Sephadex G-200, cristallisation	Chaufrage en présence de substrat, traitement par gel de phosphate de calcium, fractionnement par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialyse, cristallisation	Precipitation acétone à partir du milieu de culture	Désintégration sonique des bactéries et centrifugation	Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DEAE-cellulose	Chaufrage en présence de benzoate de sodium, colonne de gel de phosphate de calcium, cellulose, cristallisation
Coenzyme	FMN	FAD	—	—	FMN	FAD
Métal	—	—	—	—	Mn ²⁺	—
Inhibiteurs	Réactifs des SH	Iodoacétate, benzoate	Non inhibée par le benzoate, le cyanure	Non inhibée par l'iodoacétate, le benzoate. Inhibée par le cyanure en présence de O ₂ et bleu de méthylène	Non inhibée par le p-chloromercurobenzoate	Benzozoate, réactifs des SH
pH optimum	8.7	7.2-7.5	5.0 et 9.0	6.8	6.5-7	8.5
Substrat	Leu ($K_m = 13.1 \text{ mM}$), puis Met, ensuite Trp, Phe, Tyr, acides α -hydroxylés	Leu, Met, Phe, Tyr, Trp; inhibition par excès de substrat	Leu, α -aminobutyrique, Cys, α -aminoipique	Phé, Leu, Trp, Met, Norelu, Norval, Tyr	Lys ($K_m = 1.6 \text{ mM}$), His, Phe, Tyr, Trp, Arg, Orn, Leu, puis Met	Pro, puis Ala, Met, Ile, Val, Leu, Ser, Thr, Phe, Tyr, Trp, His, Orn
Poids moléculaire	314 000 (sous-unité 49 300)	130 000-140 000	—	—	—	91 000 (sous-unité 50 000)
Localisation cellulaire	Fraction soluble > mitochondries	—	—	—	Mitochondries > fraction soluble	Mitochondries

Le coenzyme est le FMN, ce qui rapproche l'enzyme de la L-aminoacide-oxydase du rein de rat et le distingue de la L-aminoacide-oxydase du venin de serpent et de la D-aminoacide-oxydase des Mammifères, dont le coenzyme est le FAD. L'activation par Mn²⁺ est assez caractéristique et ce fait n'a jamais été signalé pour les autres aminoacide-oxydases.

Plusieurs aminoacide-oxydases ont été purifiées par fractionnement au (NH₄)₂SO₄, chromatographie sur DEAE-cellulose, sur gel de phosphate de calcium, de Sephadex, et ont pu être obtenues cristallisées. Pour l'enzyme du foie de dindon, les procédés classiques ne nous ont pas conduits à des résultats satisfaisants. On observe une perte progressive de l'activité que l'addition de FMN et de Mn²⁺ ne permet de rétablir que très partiellement. L'enzyme subit certainement une modification de structure, ainsi qu'en témoignent l'étalement et la déformation du pic correspondant en chromatographie de gel-filtration. Ce comportement est à rapprocher de l'insolubilisation irréversible de l'enzyme au-dessous de pH 6.0. On a vu d'autre part que, dans les cellules, l'enzyme était accroché aux structures mitochondrielles et que la destruction de ces structures augmentait l'activité, comme si l'enzyme, "libéré", devenait plus accessible au substrat.

Nous avons vérifié que, comme les autres aminoacide-oxydases à FMN ou à FAD, la L-aminoacide-oxydase de foie de dindon se comportait comme une "oxydase vraie", directement ré-oxydable par le O₂; la ré-oxydation n'est pas accélérée par les transporteurs intermédiaires d'électrons, notamment ceux de la chaîne succin-oxydase.

Ainsi donc, la L-aminoacide-oxydase du foie de dindon apparaît dans le groupe des aminoacide-oxydases comme un enzyme très particulier, aussi bien du point de vue de sa spécificité que des conditions de son action et de son comportement au cours des opérations d'isolement et de purification. Nos travaux antérieurs^{1,19-22} ont montré d'autre part que sa signification métabolique la distinguait nettement des L-aminoacide-oxydases de Mammifères actuellement connues et que son rôle chez l'animal intact n'était certainement pas négligeable.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. Rend.*, 234 (1952) 1409.
- 2 J. H. HUTCHINSON ET D. H. LABBY, *J. Lab. Clin. Med.*, 60 (1962) 170.
- 3 J. J. SCHEIDECKER, *Intern. Arch. Allergy Bâle*, 7 (1955) 103.
- 4 S. AVRAMEAS ET J. URIEL, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 261 (1965) 584.
- 5 J. URIEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 969.
- 6 B. NATHANSON, M. BRODY, S. BRODY ET S. B. BROYDE, *Photochem. Photobiol.*, 6 (1967) 177.
- 7 J. ROCHE, P. E. GLAHN, PH. MANCHON ET NGUYEN-VAN THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1959) 111.
- 8 D. WELLNER ET A. MEISTER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2357.
- 9 M. NAKANO ET T. S. DANOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2075.
- 10 M. NAKANO, M. SAGA ET Y. TSUTSUMI, *Biochim. Biophys. Acta*, 185 (1969) 19.
- 11 G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER ET M. J. STRIEBICH, *J. Mol. Biol.*, 196 (1952) 111.
- 12 J. CHAUVEAU, Y. MOULE ET C. ROUILLER, *Exptl. Cell Res.*, 11 (1965) 317.
- 13 M. NAKANO, Y. TSUTSUMI ET T. S. DANOWSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 139 (1967) 40.
- 14 M. NAKANO, O. TARUTANI ET T. S. DANOWSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 168 (1968) 156.
- 15 A. MEISTER ET D. WELLNER, *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York, 2ème éd., 1963, p. 615.
- 16 H. A. KREBS, *The Enzymes*, Vol. 2, Part 1, Academic Press, New York, 1ère éd., 1951, p. 523.
- 17 P. K. STUMPF ET D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 387.
- 18 P. E. BRUMBY ET V. MASSEY, *Biochem. Prep.*, 12 (1968) 29.
- 19 P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. Rend.*, 235 (1952) 524.
- 20 P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. Rend.*, 238 (1954) 406.
- 21 P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. Rend.*, 241 (1955) 125.
- 22 P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. Rend.*, 241 (1955) 613.