

151. La synthèse biologique de la glutamine

par J. Frei et F. Leuthardt.

(21 III 49)

*Krebs*¹⁾ a montré que la synthèse de la glutamine à partir d'acide glutamique et d'ammonium a lieu dans les coupes de rein, de cerveau et dans la rétine; mais par contre celles de foie restèrent inactives. *Leuthardt* et *Bujard*²⁾ ont réalisé cette synthèse de la glutamine, en présence d'ions Mg^{+2} et d'acide adénosine-triphosphorique, dans le foie, en homogénéisant cet organe dans l'appareil de *Potter* et *Elvehjem*³⁾. La même différence entre le tissu intact et le tissu homogénéisé a été trouvée dans la réaction de *Borsook* et *Dubnoff*⁴⁾ (synthèse de l'arginine à partir de citrulline et d'acide glutamique); cette réaction n'est également pas observée dans les coupes de foie et nécessite la présence de magnésium et d'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.) (*Cohen* et *Hayano*⁵⁾).

De même *Speck*⁶⁾ et *Elliot*⁷⁾ ont pu préparer des poudres acéto-actives, synthétisant la glutamine en présence d'ions Mg^{+2} et d'A.T.P., le premier à partir de foie de Pigeon et le second à partir de la matière grise de cerveau de Mouton. En remplaçant l'ammonium par l'hydroxylamine, les deux auteurs précités purent montrer la formation d'un acide hydroxamique (correspondant probablement à la glutamine) et le doser colorimétriquement selon la méthode de *Lipmann* et *Tuttle*⁸⁾ pour les acyl-phosphates; il y aurait donc sans doute formation intermédiaire de glutamylphosphate pouvant réagir avec l'hydroxylamine: d'où la présence nécessaire d'A.T.P. devant fournir l'«energy-rich phosphate bond» (*Lipmann*⁹⁾).

Jusqu'ici les procédés de détermination de la glutamine étaient basés, soit sur la diminution de l'ammonium présent, soit sur l'hydrolyse du groupe amide de la glutamine (*Krebs*¹⁾, *Speck*⁶⁾, *Elliot*⁷⁾).

1) *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **29**, 1951 (1935).

2) *F. Leuthardt* et *E. Bujard*, *Helv. med. acta* **14**, 274 (1947).

3) *V. R. Potter* et *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **114**, 495 (1936).

4) *H. Borsook* et *J. W. Dubnoff*, *J. Biol. Chem.* **141**, 717 (1941).

5) *P. P. Cohen* et *M. Hayano*, *J. Biol. Chem.* **166**, 239 (1946).

6) *J. F. Speck*, *J. Biol. Chem.* **168**, 403 (1947).

7) *W. H. Elliot*, *Nature* **161**, 128 (1948).

8) *F. Lipmann* et *L. C. Tuttle*, *J. Biol. Chem.* **159**, 21 (1945).

9) *F. Lipmann*, *Adv. in Enzymol.* **1**, 99 (1941).

*Leuthardt et Bujard*¹⁾ ont hydrolysé la glutamine selon *Vickery* et collaborateurs²⁾ à 100° et p_H 6,5, et dosé selon *Sobel* et collaborateurs³⁾ l'ammonium provenant du groupe amide, après avoir, au préalable, enlevé le NH₄⁺ primitif au moyen de permutite. Les dosages de l'acide glutamique et de la glutamine par le *Clostridium Welchii* S. R. 12, mis au point par *Gale*⁴⁾ et *Krebs*⁵⁾, nous fournirent le principe d'une méthode beaucoup plus spécifique; cette bactérie décarboxyle quantitativement l'acide glutamique et la glutamine, cette dernière seulement en présence de bromure de cétyl-triméthyl-ammonium, en hydrolysant au préalable le groupe amide; l'ammoniaque libérée peut être alors dosée selon les méthodes usuelles.

Partie expérimentale.

Méthodes.

Animaux. Nous avons utilisé des rats albinos adultes qui avaient reçu une nourriture optimale; environ 48 heures avant les expériences. les animaux furent mis à jeun.

Homogénats. 2 g de foie de rat, refroidis à la glace, furent homogénéisés pendant 45 secondes dans l'appareil de *Potter et Elvehjem*⁶⁾, soit avec 6 cm³ de milieu *Lehninger*⁷⁾ sans Mg⁺², soit avec 6 cm³ d'une solution isotonique de ClK.

Mitochondries. Celles-ci furent préparées avec du ClK isotonique et de la mannite selon la méthode de *Leuthardt et Müller*⁸⁾.

Milieu. Dans quelques expériences, nous avons employé pour 4,0 cm³ de volume total d'incubation 1,7 cm³ de solution *Lehninger*⁷⁾ sans Mg⁺²; pour d'autres, nous avons essayé de respecter l'isotonicité du milieu par rapport au sang (environ 310 μ éq./cm³). Celle-ci étant ajustée avec une solution de ClNa-ClK, le rapport ClNa/ClK restant le même que dans le milieu *Lehninger*⁷⁾. Le p_H final était approximativement de 7,0 ± 0,1.

Substrats. L'acide glutamique employé provenait de *F. Hoffmann-La Roche & Cie*; l'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.) fut préparé selon les méthodes combinées de *Needham*⁹⁾, *Kerr*¹⁰⁾ et *Le Page*¹¹⁾.

Incubation. Les essais furent secoués à l'air pendant 30 minutes à 38° dans des erlenmeyers de 25 cm³.

Défécation. La réaction fut arrêtée par déprotéinisation durant 2 minutes au bain-marie et le tout clarifié par centrifugation.

¹⁾ *F. Leuthardt et E. Bujard*, *Helv. med. acta* **14**, 274 (1947).

²⁾ *H. B. Vickery, G. W. Pucher, H. E. Clark, A. C. Chibnall et R. G. Westall*, *Biochem. J.* **29**, 2710 (1935).

³⁾ *A. E. Sobel, A. M. Mayer et S. P. Gottfried*, *J. Biol. Chem.* **156**, 355 (1944).

⁴⁾ *E. F. Gale*, *Biochem. J.* **39**, 46 (1945).

⁵⁾ *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **43**, 51 (1948).

⁶⁾ *V. R. Potter et C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **114**, 495 (1936).

⁷⁾ *A. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* **161**, 438 (1945).

⁸⁾ *F. Leuthardt et A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948).

⁹⁾ *D. M. Needham*, *Biochem. J.* **36**, 113 (1942).

¹⁰⁾ *S. E. Kerr*, *J. Biol. Chem.* **139**, 121 (1941).

¹¹⁾ *G. A. Le Page*, dans *W. W. Umbreit, R. H. Burris et J. F. Stauffer*, *Manometric techniques and related methods*, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

Méthodes analytiques.

Méthode I. Dans quelques expériences nous avons employé à titre de comparaison la méthode d'hydrolyse de la glutamine à 100° et p_{H} 6,5 de *Vickery* et collaborateurs¹⁾ (utilisée aussi par *Leuthardt* et *Bujard*²⁾), l'excès de ClNH_4 étant préalablement enlevé à l'aide de permutite selon *Leuthardt* et *Bujard*²⁾). L'ammonium libéré après l'hydrolyse fut dosé selon la microméthode de *Sobel* et collaborateurs³⁾ et titré avec la microburette de *Rehberg* avec ClH 0,1-n. ou 0,05-n.

Méthodes utilisant le *Clostridium Welchii* S.R. 12: *Gale*⁴⁾ et *Krebs*⁵⁾ ont montré que le *Cl. Welchii* S. R. 12 décarboxyle quantitativement et spécifiquement l'acide glutamique et la glutamine. Cette dernière est auparavant désamidée, et en plus la présence d'un détergent, le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium (cetavlon) est alors nécessaire. Dans le cas particulier, seule la libération de NH_3 après la désamidation nous intéresse, la décarboxylation ne nous sert à rien, vu l'excès d'acide glutamique présent. Pour le traitement avec le *Cl. Welchii*, nous avons utilisé une suspension de bactéries dans ClNa à 0,45% préparée selon *Krebs*⁵⁾). Le p_{H} pour cette incubation fut ajusté à 4–5 au moyen d'un tampon acétate de concentration finale 0,2-m. La quantité de «cetavlon» employée comme dans les essais de *Krebs*⁵⁾ et *Hughes*⁶⁾ était de 10 mg pour 2 cm^3 de solution contenant la glutamine synthétisée à partir de l'acide glutamique. Le volume final était de 4,5 cm^3 pour 0,5 cm^3 de suspension de bactéries. La désamidation est pratiquement terminée au bout de 1 heure à 1 heure et demie d'incubation à 38°. Le rendement moyen contrôlé avec de la glutamine pure préparée d'après le procédé de *Vickery* et collaborateurs⁷⁾ est de 95%. Des substances employées, seul le fumarate semble inhiber l'action du *Cl. Welchii* S. R. 12. La vitesse de réaction est pourtant un peu plus faible que dans une solution simple de glutamine, tampon acétate, «cetavlon» et bactéries.

Méthode II. Primitivement nous avons éliminé avec de la permutite (*Leuthardt* et *Bujard*²⁾), comme dans la méthode précédente, l'excès d'ammonium n'ayant pas été fixé sous forme de glutamine, puis dosé le NH_3 résultant du traitement avec le *Cl. Welchii*, à l'aide de l'appareil de *Parnas* et collaborateurs⁸⁾, modifié en ce sens que la base distillée fut directement recueillie dans de l'acide borique teinté avec l'indicateur employé par *Sobel* et collaborateurs⁹⁾; le titrage a lieu comme dans la méthode I.

Méthode III. Nous avons constaté par ailleurs que la glutamine est également adsorbée par la permutite, environ 20 à 30% selon les concentrations, ce qui donne des résultats peu constants. Ceci nous a incités à chercher un alcali déplaçant quantitativement à température ordinaire le NH_3 sans hydrolyser la glutamine pendant la distillation selon *Sobel*²⁾, laquelle dure environ 30 minutes. Une solution saturée de K_2CO_3 remplit les conditions, mais une solution de borax et d'hydroxyde de sodium (25 cm^3 d'une solution de borax saturée à 20° + 75 cm^3 NaOH n.) est d'un effet plus sûr. La titration de l'ammonium se fait aussi à l'aide de la microburette de *Rehberg*. Ce procédé permet donc de doser l'ammoniaque avant et après l'incubation avec le *Cl. Welchii*; la différence nous donne la quantité de glutamine formée à partir d'acide glutamique et de ClNH_4 avec l'homogénéat

¹⁾ *H. B. Vickery, G. W. Pucher, H. E. Clark, A. C. Chibnall et R. G. Westall, Biochem. J.* **29**, 2710 (1935).

²⁾ *F. Leuthardt et E. Bujard, Helv. med. acta* **14**, 274 (1947).

³⁾ *A. E. Sobel, A. M. Mayer et S. P. Gottfried, J. Biol. Chem.* **156**, 355 (1944).

⁴⁾ *E. F. Gale, Biochem. J.* **39**, 46 (1945).

⁵⁾ *H. A. Krebs, Biochem. J.* **43**, 51 (1948).

⁶⁾ *D. E. Hughes, Biochem. J.* **43**, XVI (1948).

⁷⁾ *H. B. Vickery, G. W. Pucher et H. E. Clark, J. Biol. Chem.* **109**, 39 (1935).

⁸⁾ *J. K. Parnas et J. Heller, Bioch. Z.* **152**, 1 (1924); *J. K. Parnas et A. Klisiecki, Bioch. Z.* **173**, 224 (1926).

⁹⁾ *A. E. Sobel, A. M. Mayer et S. P. Gottfried, J. Biol. Chem.* **156**, 355 (1944).

de foie de rat. D'autre part, la détermination selon *Sobel* et collaborateurs¹⁾ a l'avantage d'être plus rapide et plus pratique que celle selon *Parnas*²⁾, tout en étant aussi exacte.

Résultats.

Il s'agissait tout d'abord de reproduire les résultats de *Leuthardt* et *Bujard*³⁾ et de les comparer aux nôtres, ce qui revient à confronter la méthode de détermination de la glutamine par hydrolyse à 100° et p_H 6,5 de *Vickery* et collaborateurs⁴⁾ et celle avec le Cl. *Welchii* S. R. 12, plus spécifique, de *Krebs*⁵⁾. La fig. 1 donne cette comparaison en montrant, de plus, les effets de l'A.T.P., des ions Mg^{+2} , de l'acide glutamique et de l'ammonium glutamine/cm³.

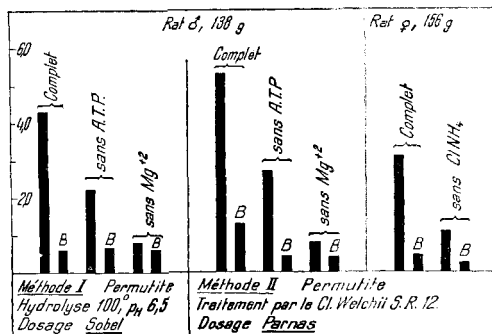


Fig. 1.

Dans tous les essais: 0,5 cm³ d'homogénats et 1,7 cm³ de solution *Lehninger*⁶⁾ sans Mg^{+2} , pour 4,0 cm³ de volume total. En outre $CINH_4$ 8,0 µm/cm³, acide glutamique 26,0 µm/cm³, A.T.P. 1,0 µm/cm³ et SO_4Mg 2,6 µm/cm³.

N. B. B = essais à blanc, c'est-à-dire sans acide glutamique.

Effet du malonate et du fumarate.

Le malonate inhibe la formation de la glutamine à partir d'acide glutamique et d'ammonium; le fumarate supprime, partiellement du moins, cette inhibition (résultats également trouvés par *Leuthardt* et *Bujard*⁷⁾). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-contre.

Fractionnement de l'homogénat.

Dans le dessein de localiser dans la cellule hépatique le ferment synthétisant la glutamine, nous avons centrifugé l'homogénat pendant 15 minutes à $0^\circ \pm 1^\circ$ à 3600 t/min. (environ 1500 g). Le surnageant fut mis de côté et le résidu suspendu dans un volume de ClK isotonique égal à celui du liquide surnageant. Les activités du surnageant et du résidu purent ainsi être mesurées séparément.

¹⁾ A. E. Sobel, A. M. Mayer und S. P. Gottfried, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).

²⁾ J. K. Parnas et J. Heller, Bioch. Z. **152**, 1 (1924); J. K. Parnas et A. Klisiewicz, Bioch. Z. **173**, 224 (1926).

³⁾ F. Leuthardt et E. Bujard, Helv. med. acta **14**, 274 (1947).

⁴⁾ H. B. Vickery, G. W. Pucher, H. E. Clark, A. C. Chibnall et R. G. Westall, Biochem. J. **29**, 2710 (1935).

⁵⁾ H. A. Krebs, Biochem. J. **43**, 51 (1948).

⁶⁾ A. Lehninger, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

⁷⁾ F. Leuthardt et E. Bujard, résultats non publiés.

Tableau I.

Dans tous les essais: 0,5 cm³ d'homogénat et 1,7 cm³ de solution *Lehninger*¹⁾ sans Mg⁺², pour 4,0 cm³ de volume total; en outre ClNH₄ 8,0 μm/cm³, A.T.P. 1,0 μm/cm³, et SO₄Mg 2,6 μm/cm³. Méthode de dosage de la glutamine: distillation selon *Sobel*²⁾ du NH₃ avant et après l'incubation avec le Cl. Welchii; la différence donne la quantité de glutamine formée.

Essais	Acide glutamique μm/cm ³	Fumarate μm/cm ³	Malonate μm/cm ³	Glutamine formée μm/cm ³
Rat ♂ 179 g	26,0	—	—	5,5
	—	—	—	0,4
	26,0	—	5,0	2,5
	—	—	5,0	0,9
	26,0	—	10,0	1,4
	—	—	10,0	1,0
Rat ♂ 191 g	26,0	—	—	6,3
	—	—	—	1,5
	26,0	2,5	—	5,9
	—	2,5	—	0,6
	26,0	2,5	10,0	3,2
	—	2,5	10,0	2,1
	26,0	—	10,0	2,0
—	—	10,0	1,6	

Le tableau II montre une diminution très nette des activités, soit celle du surnageant, soit celle du résidu; même si l'on ajoute les activités du surnageant et du centrifugat, on ne retrouve pas celle de l'homogénat complet. Par contre, si on suspend à nouveau le résidu dans le surnageant (au moyen de l'appareil de *Potter et Elvehjem*³⁾) on peut montrer que la centrifugation ne détruit rien du système, c'est-à-dire qu'on retrouve l'activité première de l'homogénat complet non centrifugé.

L'addition d'une quantité plus grande d'A.T.P. (jusqu'à 3 μm/cm³) au surnageant n'augmente en rien l'activité de celui-ci; on constate même une inhibition.

D'après ce que nous avons constaté de l'activité du résidu (tableau II), il était à prévoir que celle des mitochondries serait également très faible; c'est en effet ce que nous avons trouvé (tableau III).

Discussion et résumé.

1. Les résultats de *Speck*⁴⁾, d'*Elliot*⁵⁾ et plus spécialement ceux de *Leuthardt* et *Bujard*⁶⁾ sont confirmés au moyen du *Clostridium Welchii* S. R. 12. L'influence des sels de magnésium, du triphosphate d'adénosine (A.T.P.) et des sels d'ammonium est également prouvée.

¹⁾ *A. Lehninger*, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

²⁾ *A. E. Sobel*, *A. M. Mayer* et *S. P. Gottfried*, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).

³⁾ *V. R. Potter* et *C. A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **114**, 495 (1936).

⁴⁾ *J. F. Speck*, J. Biol. Chem. **168**, 403 (1947).

⁵⁾ *W. H. Elliot*, Nature **161**, 128 (1948).

⁶⁾ *F. Leuthardt* et *E. Bujard*, Helv. med. acta **14**, 274 (1947).

Tableau II.

Centrifugation de l'homogénat, 15 minutes à 0° (1500 g). Dans tous les essais: 0,5 cm³ soit d'homogénat (H), soit de surnageant (S), soit de résidu (R), et 1,7 cm³ de solution *Lehninger*¹⁾ sans Mg⁺⁺ pour 4,0 cm³ de volume total. En outre ClNH₄ 8,0 μm/cm³, SO₄Mg 2,6 μm/cm³. Méthode de dosage de la glutamine: distillation selon *Sobel*²⁾ du NH₃ avant et après l'incubation avec le Cl. Welchii. La différence donne la quantité de glutamine formée.

Essais	Acide glutamique μm/cm ³	A.T.P. μm/cm ³	H, S ou R	Glutamine formée μm/cm ³
Rat ♂ 143 g	26,0	1,0	H	5,0
	—	1,0	H	0,2
	26,0	1,0	S	1,0
	—	1,0	S	0,6
	26,0	1,0	R	1,8
	—	1,0	R	0,6
Rat ♂ 191 g	26,0	1,0	H	5,5
	—	1,0	H	0,6
	26,0	1,0	S + R = H*)	5,2
	—	1,0	S + R = H*)	0,6
	26,0	1,0	S	0,8
	—	1,0	S	0,3
	26,0	1,0	R	1,4
	—	1,0	R	0,1
Rat ♂ 183 g	26,0	1,0	H	4,9
	—	1,0	H	0,9
	26,0	1,0	S	1,7
	—	1,0	S	0,9
	26,0	3,0	S	0,8
	—	3,0	S	0,0

*) Résidu resuspendu dans le surnageant: on retrouve l'activité première de l'homogénat non centrifugé!

2. Nous obtenons une inhibition avec le malonate qui semble être, partiellement du moins, supprimée par le fumarate (résultats également obtenus par *Leuthardt* et *Bujard*³⁾). Le malonate diminue probablement la concentration de l'A.T.P., en empêchant la resynthèse de ce dernier. Une action semblable du malonate et du fumarate s'observe aussi dans la réaction de *Borsook* et *Dubnoff*⁴⁾, dans laquelle l'A.T.P. est également indispensable (*Fahrländer*, *Favarger* et *Leuthardt*⁵⁾, *Cohen* et *Hayano*⁶⁾). Le malonate inhibe l'oxydation ultérieure

1) *A. Lehninger*, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

2) *A. E. Sobel*, *A. M. Mayer* et *S. P. Gottfried*, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).

3) *F. Leuthardt* et *E. Bujard*, résultats non publiés.

4) *H. Borsook* et *J. W. Dubnoff*, J. Biol. Chem. **141**, 717 (1941).

5) *H. Fahrländer*, *P. Favarger* et *F. Leuthardt*, Helv. **31**, 942 (1948).

6) *P. P. Cohen* et *M. Hayano*, J. Biol. Chem. **166**, 239 (1946).

Tableau III.

Expériences avec des mitochondries préparées selon *Leuthardt et Müller*¹⁾. Dans tous les essais: 1,7 cm³ de milieu *Lehninger*²⁾ sans Mg⁺⁺; en outre CINH₄ 8,0 μm/cm³, A.T.P. 1,0 μm/cm³ et SO₄Mg 2,6 μm/cm³. Méthode de dosage de la glutamine: distillation selon *Sobel*³⁾ du NH₃ avant et après traitement par le Cl. Welchii; la différence donne la quantité de glutamine formée.

Essais	cm ³ /4,0 cm ³		Acide glutamique μm/cm ³	Fumarate μm/cm ³	Glutamine formée μm/cm ³
	Homogénat	Mito- chondries			
Rat ♂ 251 g	0,5	—	26,0	—	5,3
	0,5	—	—	—	0,6
	0,2	—	26,0	—	1,8
	0,2	—	—	—	0,6
	—	1,0	26,0	—	1,2
	—	1,0	—	—	0,4
	—	0,5	26,0	—	0,7
	—	0,5	—	—	0,6
Rat ♂ 196 g	0,5	—	26,0	—	5,5
	0,5	—	—	—	0,4
	—	1,0	26,0	2,5*)	1,6
	—	1,0	—	2,5*)	1,0
	—	1,0	26,0	—	1,2
	—	1,0	—	—	0,6

*) On peut constater également que, pour les mitochondries, le fumarate active la réaction étudiée.

du succinate, donc la resynthèse oxydative de l'A.T.P.; l'addition de fumarate permet de contourner la barrière du malonate. Le succinate toujours présent en petites quantités provient de l'acide glutamique.

3. Les quelques essais de fractionnement (centrifugation, mitochondries) opérés sur l'homogénat en vue de localiser le ou les ferments dans la cellule montrent qu'on a affaire à un système complexe. Probablement s'agit-il de plusieurs ferments, ou d'un seul et de co-facteurs répartis dans différentes parties de la cellule.

Les cultures de Cl. Welchii S. R. 12 ont été faites à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich; nous remercions bien vivement le Prof. Dr A. Grumbach de son aimable assistance.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

1) *F. Leuthardt et A. F. Müller*, Exper. **4**, 478 (1948).

2) *A. Lehninger*, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

3) *A. E. Sobel, A. M. Mayer und S. P. Gottfried*, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).