

RELATION MÉTABOLIQUE ENTRE L'ARGININE ET L'ACIDE γ -AMINOBTYRIQUE DANS LE FRUIT DE *CASTANEA SATIVA*: ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE L'ARGINASE

M. TIXIER et A. M. DESMAISON

Laboratoire de Chimie Biologique, U.E.R. de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, Limoges, France

(Révisé reçu le 10 Janvier 1980)

Key Word Index—*Castanea*; Fagaceae; arginine; γ -aminobutyric acid; arginine ureohydrolase.

Abstract—Analysis of the free amino acid pool in the chestnut fruit (*Castanea sativa*) shows that it is high in γ -aminobutyric acid. A metabolic connection between arginine and γ -aminobutyric acid is evident. Three enzymatic activities are involved: L-arginine ureohydrolase, L-ornithine 2-oxo-acid aminotransferase and L-glutamate carboxylase.

INTRODUCTION

L'acide γ -aminobutyrique est connu depuis longtemps comme un constituant universel de l'azote soluble végétal [1]. Sa présence en quantité importante dans des fruits de *Castanea sativa* a été signalée 1977 [2]. Plus récemment [3] il a été décrit comme l'un des acides aminés libres les plus abondants dans les graines de Fagacées.

Par ailleurs des châtaignes d'espèces et de variétés différentes (*C. sativa*, *C. molissima*, *C. crenata*, *C. sativa* \times *C. crenata*) ont montré des taux importants d'arginine libre [4]. La prédominance de l'arginine ou celle de l'acide γ -aminobutyrique selon l'échantillon étudié a conduit à

envisager une relation métabolique entre ces deux dérivés: une étude préliminaire de l'arginase a été effectuée. Les résultats obtenus sont rapportés; une utilisation par la plante, de cette séquence métabolique est proposée.

RÉSULTATS

L'étude de l'azote aminé libre de différents fruits de *Castanea* ayant montré des variations inverses dans les taux respectifs de l'acide γ -aminobutyrique et de l'arginine comme l'indique le Tableau 1 une voie métabolique reliant ces deux acides aminés a été recherchée.

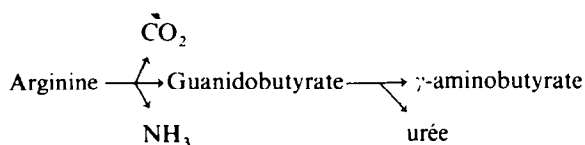
Tableau 1. Amino acides libres de châtaigne = taux global exprimé en mg pour 100 g de graine sèche

Espèces et variétés	Taux global des a.a. libres (mg/100 g)	Arginine		Gaba	
		(mg/100 g)	(%)	(mg/100 g)	(%)
<i>Castanea sativa</i>					
Var. Bourrue (76)	985	10	1,1	236	24
Var. Bourrou (77)	1400	224	16	196	14
Var. Rousse M.M.	369	1,73	0,74	129	35
Rousse G.	209	8,36	4	50	24
Belle épine	714	21,4	3	85	12
Sardonne	806	35,46	4,4	95	11,8
Bouche rouge	659	28,9	4,4	112	17
Nouzillard	406	25,98	6,4	69	17
<i>C. crenata</i> (76)	1754	217,49	12,4	122,78	7
<i>C. crenata</i> (77)	915	110	12,1	7	0,77
<i>C. molissima</i> (76)	556	77,84	14	33	6,1
<i>C. molissima</i> (77)	805	95,79	11,9	10,46	1,3
M 15 (<i>C. sativa</i> \times <i>C. crenata</i>)	636	31,16	4,9	72,5	11,4
Hybride (<i>C. sativa</i> var. Laguëpie \times <i>C. crenata</i>)	380	24,7	6,5	33	8,7

Taux d'arginine et d'acide γ -aminobutyrique exprimés en mg pour 100 g de graine sèche et en pourcentage par rapport à la totalité des acides aminés libres.

L'expérimentation a été faite sur un échantillonnage de *Castanea sativa* var. 'Bourrué'.

La voie la plus directe qui est celle décrite par Van Thoai [5] chez *Streptomyces griseus* et qui fait intervenir une décarboxylation oxydative de l'arginine n'a pu être mise en évidence.



L'incubation d'une suspension enzymatique en présence d'arginine provoque une dégradation très importante de l'arginine avec seulement une augmentation très modérée de l'acide γ -aminobutyrique [4]. Ces résultats conduisent à penser que, si elle existe, cette voie de dégradation est peu importante chez *Castanea*. Par contre, l'apparition d'ornithine libre et de sels ammoniacaux suggère une activité arginasique.

La présence d'une arginase a en effet été démontrée. Les conditions optima d'activité ont été étudiées et sont les suivantes: pH = 9,4; 40°; MnCl_2 0,001 M (Fig. 1). L'activité arginasique moyenne de *Castanea sativa* var. 'Bourrué' est, dans les conditions opératoires optima, de 1,62 μmol d'arginine dégradée en 1 min par 1 g de graine fraîche (ou 3,25 μmol par g de matériel végétal sec, compte tenu du taux d'hydratation). Cette activité est comparable à celle d'autres graines [6-9].

La présence d'ornithine libre n'ayant jamais été trouvée dans les fruits de *Castanea* [4], le devenir métabolique de cet acide aminé formé au cours de l'action de l'arginase a été recherché. Une ornithine aminotransférase a pu être mise en évidence, par incubation d'une suspension enzymatique avec un substrat formé d'ornithine 0,01 M d'acide α -cétonique 0,02 M (acide pyruvique ou acide α -cétoglutarique), de phosphate de pyridoxal 0,018 M en milieu tamponné phosphate 0,1 M pH = 8,0, à 20°. L'activité ornithine aminotransférase (Orn. A.T.) est plus intense sur l'acide α -cétoglutarique (Tableau 2) que sur l'acide pyruvique. La dégradation de l'arginine par l'arginase et l'action de l'ornithine aminotransférase conduisent à l'acide glutamique.

Une troisième activité enzymatique a été démontrée: une glutamate carboxylyase, très active (Tableau 3). Le substrat contient de l'acide glutamique 0,01 M, du phosphate de pyridoxal 0,018 M dans un milieu phosphate 0,1 M, pH = 5,8: en 2 hr, à 20° nous observons la dégradation de 1,87 μmol d'acide glutamique et la formation de 1,10 μmol de GABA par ml de milieu réactionnel.

Tableau 2. Activité ornithine α -cétoglutarate aminotransférase

	Ornithine	Acide glutamique
Temps zéro	4,25	0,55
1 hr	3,82	1,14
5 hr	2,56	1,88
13 hr	1,70	3,43

Concentration des amino acides en μmol par ml de milieu réactionnel (pH 8; θ : 20°).

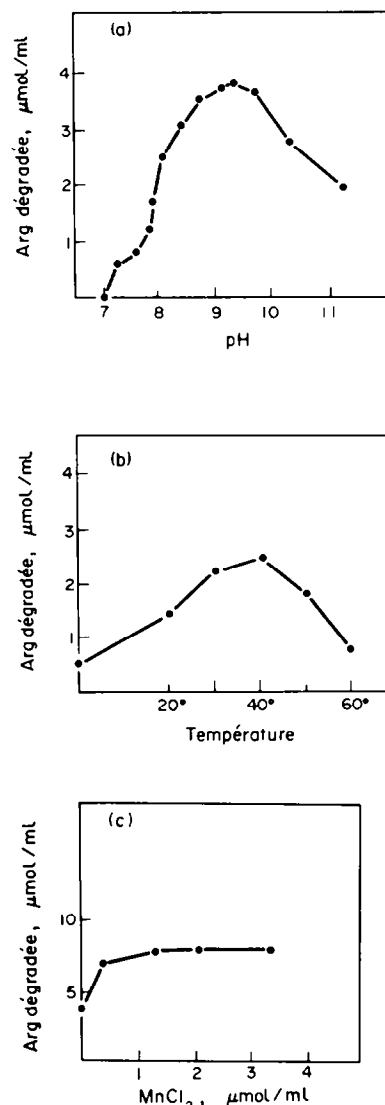


Fig. 1. Conditions optima d'activité de l'arginase de *Castanea sativa*. (a) Activité en fonction du pH. (b) activité en fonction de la température. (c) activité en fonction de la concentration en Mn.

DISCUSSION

La présence des trois activités enzymatiques démontrées dans le fruit de *Castanea sativa* est en faveur d'une séquence métabolique reliant l'arginine et l'acide γ -aminobutyrique (Fig. 2).

Tableau 3. Activité Glutamate carboxylyase

	Acide glutamique	Acide γ -aminobutyrique
Temps zéro	4,89	0,92
2 hr	3,02	2,02
20 hr	0,44	4,60

Concentration des amino acides en μmol par ml de milieu réactionnel (pH 5,8; θ : 20°).

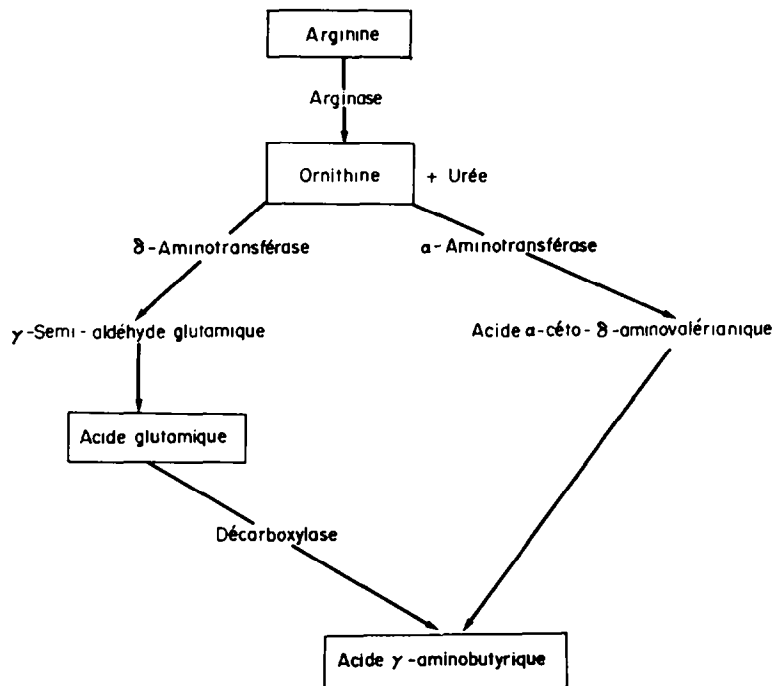


Fig. 2.

Ces trois enzymes ont été souvent retrouvées chez les végétaux et en particulier dans les graines de Légumineuses et de Cucurbitacées. C'est ainsi, par exemple, que chez *Pisum sativum* ont été décrites une arginase [10] une ornithine transaminase [11] et une glutamate décarboxylase [12]; une relation métabolique entre l'arginine et l'acide γ -aminobutyrique a été signalée dans *Cucurbita moschata* [13]. D'autre part, le rôle particulièrement important de l'arginine a été mis en évidence dans de nombreuses graines [7, 9, 14-16]. Cet acide aminé stocké au sein de protéines de réserve constitue une source d'azote utilisable pour le développement de l'embryon et de la jeune plantule. Cette utilisation semble, quelle que soit la voie métabolique suivie, variable selon les espèces, conduire à l'acide γ -aminobutyrique. L'accumulation de protéines basiques constatées au cours de la maturation du fruit de *Castanea sativa* [4] rend très probable le rôle joué par l'arginine au moment de la germination de cette graine. De plus, l'existence d'une γ -aminobutyrate transaminase [4] chez cette espèce oriente le métabolisme de l'acide γ -aminobutyrique, par l'acide succinique provenant de cette transamination, vers le cycle énergétique de Krebs.

Il semble bien que, comme chez d'autres espèces, le métabolisme très actif de l'arginine chez *Castanea sativa*, par la voie enzymatique décrite ici, puisse fournir à la graine en germination les apports énergétiques et azotés indispensables au développement de l'embryon et de la jeune plantule.

Mais par ailleurs, la mise en évidence plus récemment d'acide argininosuccinique dans le fruit de *Castanea sativa* [3] indiquerait l'existence probable d'un cycle de Krebs-Henseleit. Déjà ce cycle de l'urée a été décrit chez le Pin d'Alep [9, 17, 18] et plus récemment chez *Vitis vinifera* [19-21]. L'ornithine que l'on ne trouve pas à l'état libre pourrait être utilisée soit dans le cycle de l'urée producteur

d'azote, soit dans la formation de l'acide γ -aminobutyrique fournisseur d'acide succinique et d'énergie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Toutes les analyses ont été faites sur l'amande: le fruit est privé de son péricarpe et de la pellicule ou 'tan' qui enveloppe la graine. Les espèces étudiées, ont été récoltées à maturité (1976 et 1977) et conservées par congélation à -20° . Ce sont: *Castanea sativa* (var. Bourrue—Nouzillard—Bouche rouge—Sardonne—Belle épine—Rousse); *Castanea molissima*; *Castanea crenata*; hybrides résultant de croisement: *C. sativa* \times *C. crenata*, marigoule 15; hybride: *C. sativa* Laguëpie \times *C. crenata*.

L'extraction des amino acides libres est effectuée de la façon suivante: un poids *p* d'amande dilacéré au hachoir, puis broyé durant 3 min à l'ultra-turax (Janke Kunkel Type 18/2 24000 V/min) avec 4 parties d'HCl 0,1 N.

Le mélange est agité 15 min à la temp. de 20° puis filtré sur papier. Le filtrat déféqué (acide sulfosalicylique 3% p/v) est centrifugé à 3000 tr/min durant 10 min. Les acides aminés sont dosés globalement par la réaction à la ninhydrine selon la technique de Thomas Reymond [22]. La solution étalon (E 20) est une solution équimoléculaire ($3 \mu\text{mol/ml}$ dans HCl 0,1 N) de chacun des 20 amino acides (Sigma) préalablement identifiés comme existant à l'état libre dans le fruit de *Castanea* [4] *sativa*, *molissima*, *crenata*. E 20 = Asp-Thr-Ser-Asn-Glu-Gln-Gly-Ala-Val-Cys-SS-Met-Ile-Leu-Tyr-Phe- γ -Abu-Trp-Lys-His-Arg: soient $60 \mu\text{mol}$ ou 8,86 mg d'amino acides pour 1 ml de solution étalon.

Les solutions extractives sont concentrées par évapn sous courant d'air froid à $+4^{\circ}$, pendant 24 hr, en sac à dialyse (Visking tubing 24011 Poly Labo). La concentration, exprimée en 'E 20' est ramenée à 1 mg à 4 mg/ml. Le pH des solutions ainsi obtenues est égal à $1 \pm 0,15$. Ces solutions sont utilisées pour l'analyse au Technicon NC 2P.

La technique d'analyse des acides aminés est celle préconisée par la firme Technicon [23]. Les solutions d'étalonnage utilisées sont 'E 20' et une solution Technicon de norleucine (2,5 $\mu\text{mol/ml}$). Le dépôt des solutions étalon est de 25 μl . Les solutions à doser sont utilisées à des prises d'essai de 25–100 μl . L'injection est faite manuellement au sommet des colonnes de résines (Chromobeads C3) sous pression d'azote (200 mbar). Le fractionnement est réalisé à l'aide de 2 colonnes: l'une fractionne les acides aminés acides et neutres, la deuxième les basiques. L'élution est assurée par le passage successif de trois tampons sur chacune des 2 colonnes: colonne A (LiOH 0,3 N) pH = 2,69; pH = 3,31, pH = 4,15 colonne B: pH = 3,72 (LiOH 0,5 N); pH = 5,07 (LiOH 0,5 N); pH = 6,14 (LiOH N).

Le débit à la sortie des colonnes est de 0,45 ml/min. Le passage des tampons sur les colonnes est programmé de manière automatique. L'analyse de l'effluent est effectuée par la réaction à la ninhydrine. Le dosage de chacun des amino acides est effectué à l'aide de la mesure de la surface des pics d'élution: 2 modes de calculs ont été utilisés: (a) utilisation d'un étalon interne de norleucine = calcul en $\mu\text{mol/ml}$; (b) calcul en pourcentage: 'un coefficient ninhydrine' a été calculé pour chacun des 20 amino acides à partir de 15 chromatogrammes étalons par rapport à la norleucine, les surfaces des pics d'élution des amino acides des 'chromatogrammes dosages' ont été pondérées par ces coefficients ninhydrine: chacun des amino acides est alors évalué en pourcentage de la totalité.

La mise en évidence des activités enzymatiques a été faite sur des échantillons de *Castanea sativa* var. Bourrue par la mesure de la modification de concentration des amino acides au cours de la réaction, par comparaison avec un milieu témoin inactivé par dénaturation protéique (TCA 20% = 0,5 ml pour 4 ml de mélange réactionnel).

La 'suspension enzymatique' est réalisée par broyage en milieu tampon de 1 partie (d'amande) et 3 parties de tampon; le milieu réactionnel est réalisé par mélange à parties égales substrat + broyat enzymatique.

Les amino acides sont dosés à l'auto analyseur Technicon en utilisant l'étalon norleucine. L'étude des conditions optima de l'arginase a été faite grâce au dosage spécifique de l'arginine selon la technique de Rosenberg [24].

BIBLIOGRAPHIE

1. Steward, F. C., Zacharius, R. M. et Pollard J. K. (1955) *Ann. Acad. Sci. Fenn.* **21**, 323.
2. Desmaison, A. M., Le Roux, T. et Tixier, M. (1977) *Bull. Soc. Pharmac. Bordeaux* **116**, 65.
3. Kasai, T., Larsen, P. O. et Sorensen, H. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1911.
4. Desmaison, A. M. (1978) Thèse d'Etat es Sciences Pharmaceutiques, Limoges no. 1.
5. Thoai, N. V. et Olomucki, A. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 533.
6. Guittou, Y. (1957) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **245**, 1157.
7. Guittou, Y. (1964) Thèse Doctorat es Sciences Naturelles. Toulouse.
8. Brunel-Capelle, G. et Bailly, Fenech (1967) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **265**, 792.
9. Citharel, L. et Citharel, J. (1975) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **281**, 877.
10. Goas, G. (1965) *C.R. Acad. Sci., Gpe II* **261**, 4217.
11. Kleczkowski, K. D. et Kretovich, V. L. (1960) *Biochemistry (Biokhimiya)* **25**, 164.
12. Dixon, R. O. D. et Fowden, L. (1961) *Ann. Bot.* **25**, 513.
13. Chou, K. H. et Splittstoesser, W. E. (1972) *Physiol. Plant.* **26**, 110.
14. Boulter, D. et Barber, J. T. (1963) *New Phytol.* **62**, 301.
15. Splittstoesser, W. E. (1969) *Phytochem* **8**, 753.
16. Splittstoesser, W. E. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 361.
17. Citharel, L. et Citharel, J. (1976) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **282**, 1167.
18. Citharel, L. et Citharel, J. (1977) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **284**, 295.
19. Roubelakis, K. A. et Kliever, W. M. (1978) *Plant Physiol.* **62**, 337.
20. Roubelakis, K. A. et Kliever, W. M. (1978) *Plant Physiol.* **62**, 340.
21. Roubelakis, K. A. et Kliever, W. M. (1978) *Plant Physiol.* **62**, 344.
22. Thomas Reymond (1958) *Techniques de Biochimie*. Baillière et Fils Ed.
23. Technicon International Division, (1975) Technical report No. 9, March 1974, Technicon International Division, Geneva.
24. Rosenberg, H., Ennor, A. H. et Morrison, J. F. (1955) *Biochem. J.* **63**, 153.