

PREPARATION ET PROPRIETES DE DERIVES de L'ARGINASE INSOLUBLES DANS L'EAU

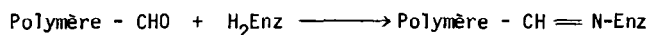
Eric BROWN et Roger JOYEAU

Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences - Route de Laval -
72000 - LE MANS

(Received in France 12 January 1973; received in UK for publication 15 January 1973)

A notre connaissance du moins, aucune préparation d'arginase insolubilisée n'a été décrite dans la littérature ; en ce qui nous concerne, nous avons cherché à insolubiliser cette enzyme à l'aide de nouveaux supports macromoléculaires linéaires, solubles dans CHCl_3 mais insolubles dans l'eau et que nous avons décrits récemment (1) ; ces polymères sont des "polyméthacrylates de vanilline" (Vanacryls), ou des copolymères d'alcool allylique et de "méthacrylate de vanilline" (Covanacryl-p, le chiffre p indiquant le nombre de moles de méthacrylate de vanilline utilisées par mole d'alcool allylique dans la polymérisation). Ils sont obtenus par polymérisation radicalaire des monomères correspondants, et l'analyse élémentaire (C, H) montre que les compositions des copolymères correspondent à celles des mélanges de monomères utilisés. En dépit de la présence de groupements OH, les covanacryls apparaissent comme relativement peu hydrophiles, et sont semblables en cela à l'homopolymère correspondant, le Vanacryl.

Les groupements aldéhydes de ces différents supports sont susceptibles de réagir en milieu aqueux sur les groupements aminés libres des enzymes Enz-NH_2 pour donner des dérivés insolubles enzyme/polymère selon la réaction probable :



On agite pendant 20 heures à 4° une suspension de 50 mg de polymère et 5 mg d'arginase (de Koch Light) dans 4 cm^3 de tampon maléate MnCl_2 , $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7. Les dérivés obtenus sont filtrés et lavés avec une solution NaCl M puis avec de l'eau jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique. Les dérivés sont ensuite conservés à 4° en suspension dans un tampon maléate MnCl_2 , $2 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7.

Après avoir procédé à l'activation des dérivés en plaçant les suspensions à 37° pendant 4 heures (2), on effectue les mesures d'activité arginasique par dosage de l'urée formée par hydrolyse enzymatique de l'arginine (3).

Une droite d'étalonnage permet de déterminer la masse m_1 (mg) d'arginase native ayant la même activité qu'un mg de dérivé insoluble.

On détermine la masse m_2 (μg) de protéine fixée par unité de masse (mg) de support, par un dosage des protéines restées en solution après la réaction de fixation (4) et par différence avec la masse d'enzyme mise en jeu. Le taux d'activité enzymatique résiduelle (AER) du dérivé insoluble par rapport à l'arginase de départ est défini par le rapport $100 \frac{m_1}{m_2}$.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-après :

Support	m_2 (μg)	AER (%)
Vanacryl	45	20
Covanacryl-5	35	37
Covanacryl-3	42	56
Covanacryl-1	38	72

Le polyaldéhyde semble présenter les propriétés requises pour insolubiliser l'arginase de façon acceptable. La masse m_2 de protéine insolubilisée est à peu près constante pour les différents supports utilisés mais l'AER semble étroitement liée à la valeur du rapport entre le nombre des fonctions alcools et le nombre des fonctions aldéhydes présentes sur le polymère. L'augmentation relative du nombre des fonctions alcools par rapport aux fonctions aldéhydes entraîne une élévation très notable de l'AER des dérivés insolubles correspondants.

La similitude des courbes d'activités en fonction du pH de la forme native et de la forme insolubilisée de l'arginase indique que l'insolubilisation ne produit pas d'altération notable du microenvironnement ionique de l'enzyme. D'autre part, l'activité des dérivés est encore égale à 50 % après plus de 2 mois (ces dérivés étant conservés en suspension dans du tampon pH 7).

Afin d'étudier l'utilisation en continue de préparations d'arginase insolubilisée, nous avons confectionné une colonne d'enzyme insolubilisée à travers laquelle nous avons fait percoler une solution de chlorhydrate d'arginine. Les résultats montrent une brusque perte d'activité de la colonne, environ 50 %, pendant les premières 24 h, suivie d'une relative stabilisation. Après 6 jours de fonctionnement l'activité de la colonne est de 30 % de l'activité initiale.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) E. BROWN et A. RACOIS - Tetrahedron Letters, 1972, (50), 5077.
- (2) M.S. MOHAMED et D.M. GREENBERG - Arch. Biochem. Biophys., 1945, 8, 349.
- (3) D.M. GREENBERG - The Enzymes., P.D. BOYER, H.A. LARDY et K. MYRBACK - Academic Press, 1960 4, 257.
- (4) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR et R.J. RANDALL - J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.