

Departamento de Bioquímica
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Madrid (Espagne)
Directeur Prof. A. Santos Ruiz

Modification de la constante de Michaelis-Menten de la decarboxilase tyrosinique par un détergent

por Rufino Cosin

(Recibido para publicar el 5 de septiembre de 1955)

En travaillant avec des solutions sursaturées de L Tyrosine comme substratum on réussit la saturation de l'enzyme de la tyrosine décarboxilase et par conséquent on peut faire la détermination de la constante de Michaelis-Menten (1) ce qui a donné la supposition que dans ces conditions (solutions sursaturées et Ph 5,5 et 30°) on peut faire des études quantitatives de la tyrosine decarboxilase par l'action d'un détergent.

On a employé le détergent cationique Bromure de Cethyl Triméthilammonium (B. C. T. A.).

Si nous faisons l'application des équations de Michaelis-Menten que relationnent la vitesse de réaction avec la concentration de l'enzyme et du substratum nous pouvons connaître l'activité et l'affinité de la décarboxilase tyrosinique par rapport au substratum c'est-à-dire la constante de Michaelis-Menten (2).

$$v = \frac{V [S]}{K + [S]} \quad (a)$$

Ou bien pour être plus exact on peut appliquer les méthodes graphiques de Lineweaver et Burk (3) qui transforment

les équations de Michaelis-Menten en une ligne droite selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (b)$$

Méthodes

On obtient l'enzyme qui décarboxile la Tyrosine du *Streptococcus Faecalis* (A. T. C. C.) (8043), qui se cultive dans un milieu qui contient la peptone, extrait de levure, glucose, pyridoxal-phosphate plus tyrosine et cystine (4).

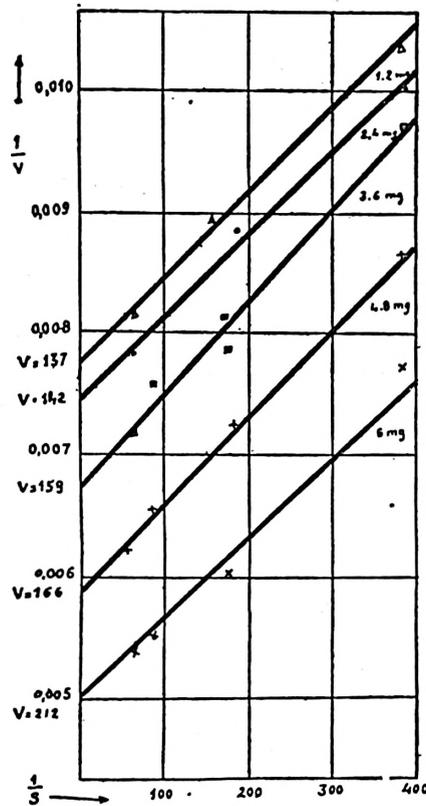


Figure 1

Relation entre $1/v$ et $1/S$ à des concentrations distinctes d'enzyme exprimées en mg. de poids sec de *Streptococcus faecalis*.

On fait la culture précédente dans laquelle on sème la culture définitive. On emploie cette culture intermédiaire dans la proportion de 4 cc. pour litre de milieu définitif.

Une fois on sème le milieu définitif, on place dans l'étuve à 37° ; après vingt heures la croissance est suffisante et la formation des décarboxilases arrive alors à son maximum le Ph qui était alors de 7,2 en faisant l'innoculation baisse alors à 4,4 à la fin de l'incubation.

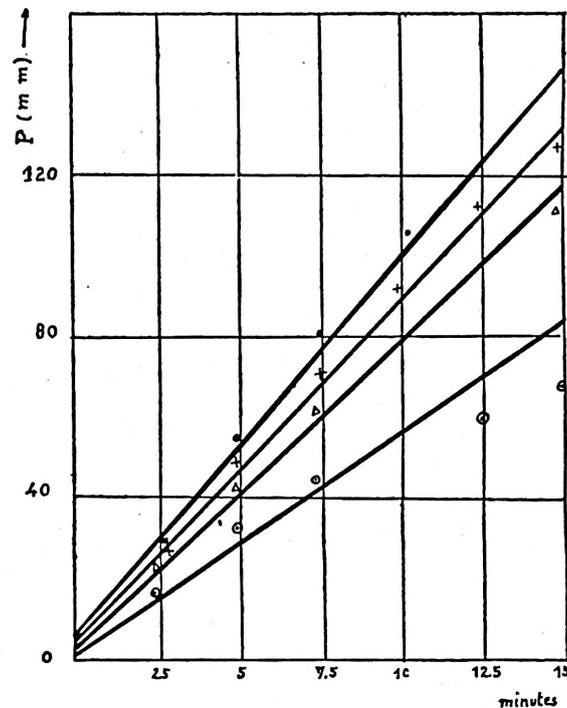


Figure 2

Decarboxylation de tyrosine valeurs P (m m) corrigées par rapport au temps.

On refroidit alors à 0°. Nous employons une suspension bactérienne en centrifugant le milieu et en lavant le résidu à basse température avec la solution saline isotonique pour suspendre finalement en tampon d'acétates de Ph 5,5 puis l'on prend un échantillon que l'on désèche à l'étuve à 110° jusqu'à poids constant.

SUBSTRATUM.

Etant donné l'instabilité des solutions de tyrosine nous avons employé plusieurs concentrations de la L tyrosine qui vient de la solution 0,0130 M jusqu'à 0,0052 M. Dans quelques séries figurent toutes les concentrations et dans beaucoup les deux premières.

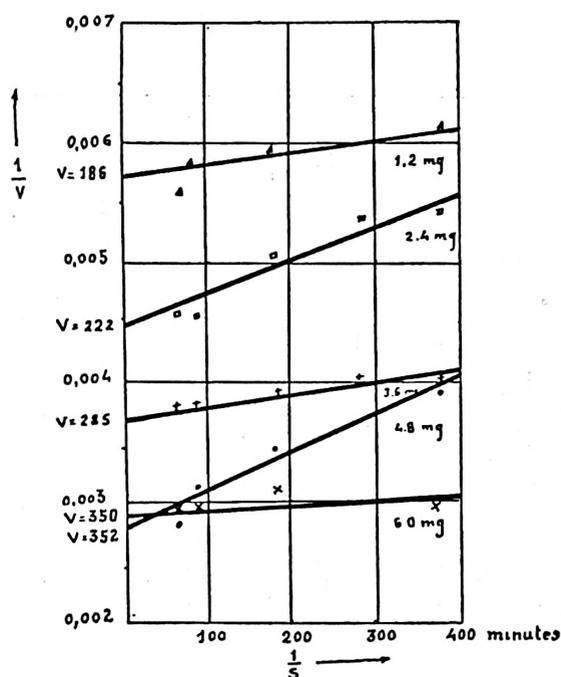


Figure 3

Relation entre $1/v$ et $1/S$ à des concentrations distinctes d'enzyme exprimées en mg. de poids sec de *Streptococcus Faecalis* avec l'addition de 0.33 mg. BCTA.

On a recommencé d'autres séries, ou bien certaines manquent et ceci est dû, au peu de stabilité de la solution de tyrosine, si on prolonge le temps de l'expérimentation, ou si l'on ne surveille pas la température pour que les fioles ne se refroidissent pas, après vingt minutes des noyaux de cristallisation commencent à se former les résultats sont faux.

La tyrosine se dissout dans la quantité requise de tampon d'acétates M/5 de Ph 5'5 en réchauffant jusqu'à solution complète, puis refroidir ensuite (40°) et on filtre chaud.

DETERGENTS

On a employé exclusivement le Bromure de Cethyl Triméthylammonium (B. C.T. A.). La quantité employée a été la même dans toutes les séries, soit $4,4 \times 10^{-6} M$ que l'on place tout d'abord dans le bras latéral de la fiole de Warburg et ensuite on remplit avec 0,40 cc. de suspension bactérienne.

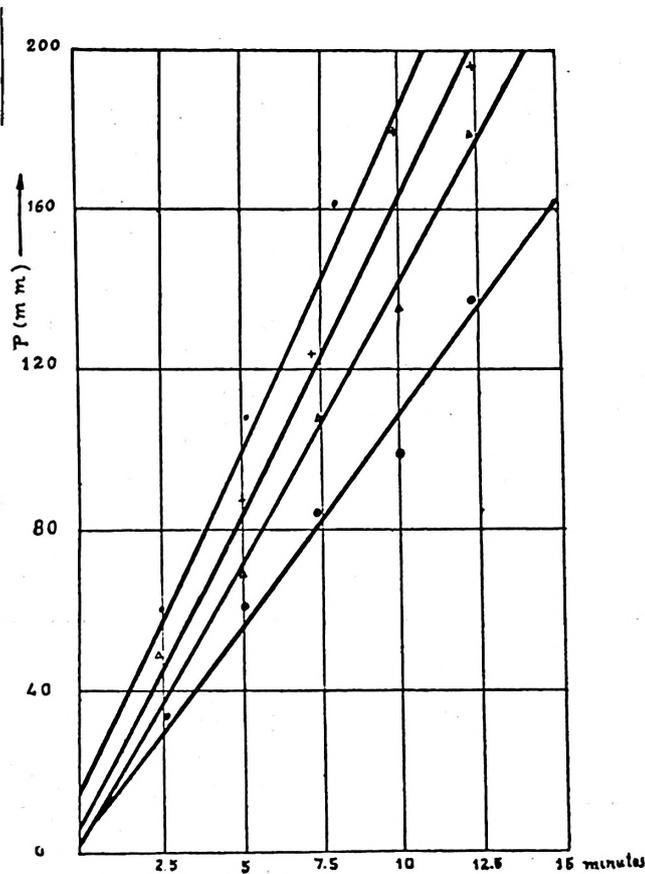


Figure 4

Decarboxilation de tyrosine valeurs P (m m) corrigees par rapport au temps.

Sur la graphique de la Fig. 1 et 2 la quantité de la suspension bactérienne est exprimée comme poids sec et correspond à la quantité d'enzyme [E] que l'on employe dans chacune des séries des tables de résultats. On soit 1,2 — 2,4 — 3,6 — 4,8 — 6,0 mgrs/fiole, etc.

TABLE DE RESULTATS N.° 1

1 [S]	2 v	3 1/S	4 1/v	5 V	$K = \frac{S(V-v)}{v}$
0.0104 M	123	97	0.00813	137	0.0011
0.0052	112	192	0.00892		0.0011
0.0026	96	384	0.01041		0.0011
0.0104	128	97	0.00781	142	0.0011
0.0052	112	192	0.00892		0.0013
0.0026	100	384	0.01000		0.0010
0.0130	136	76	0.00735	159	0.0019
0.0104	130	97	0.00769		0.0016
0.0052	128	97	0.00781		0.0010
0.0026	104	384	0.00961		0.0013
0.0130		76	0.00650	166	0.0010
0.0104	147	97	0.00678		0.0013
0.0052	137	197	0.00725		0.0010
0.0026	121	384	0.00870		0.0010
0.0130	201	76	0.00546	212	0.0008
0.0104	180		0.00555		0.0019
0.0052	147	197	0.00632		0.0017
0.0026	158		0.00680		0.0011
					0.0012

Signe	Fiole Nr	Tyrosine [S]	Augmentation dans la gra- phique mm/15 m	Kv	Velocité de reaction μ l/h./cc.
●	2	0.0130	201	1.3 ⁸	332
+	3	0.0104	180	1.24	331
△	4	0.0052	158	1.32	278
⊙	5	0.0026	147	1.25	248

TABLE DE RESULTATS N.º 2

1 [S]	2 v	3 1/S	4 1/v	5 V	6 $K = \frac{S(V-v)}{v}$
0.0104 M	180	97	0.00552	186	0.0003
0.0052	172	192	0.00581		0.0004
0.0026	168	384	0.00595		0.0004
0.0026	164	384	0.00609		0.0003
0.0130	224	76	0.00454	222	0.0001
0.0104	216	97	0.00450		0.0002
0.0052	190	192	0.00502		0.0004
0.0026	188	384	0.00531		0.0004
0.0026	188	384	0.00531		0.0004
0.0130	272	76	0.00367	285	0.0003
0.0130	272	72	0.00367		0.0003
0.0104	268	97	0.00373		0.0005
0.0052	262	192	0.00381		0.0004
0.0026	261	384	0.00383		0.0002
0.0130	340	76	0.00294	350	0.0003
0.0104	340	197	0.00294		0.0003
0.0052	324	192	0.00308		0.0005
0.0026	300	384	0.00300		0.0004
0.0130	368	76	0.00271	352	0.0007
0.0104	327	97	0.00305		0.0010
0.0052	292	192	0.00341		0.0008
0.0026	267	384	0.00374		0.0004

Signe	Flole Nr	Tyrosine [S]	Augmentation dans la graphique mm/15 m	Kv	Velocité de reaction μ 1/h./cc.
●	7	0.0130	368	1.24	648
+	9	0.0104	327	1.38	553
△	10	0.0052	293	1.33	519
⊙	11	0.0026	267	1.24	358

VITESSE DE DECARBOXILATION

On la mesure employant la technique manométrique de Warburg utilisant l'air dans la phase gazeuse, et à 30° les lectures se faisaient toutes les 2,5 minutes pour obtenir une plus grande densité de points dans les graphiques. Les mesures se faisaient dans la partie droite de la courbe totale, c'est à dire, dans les premières vingt minutes.

VITESSE MAXIMA

Nous avons suivi le procédé graphique de Lineweaver et Burk qui part de l'équation de Michaelis Menten (a)

qui par transformation algébrique arrive à l'équation de Lineweaver et Burk. dans laquelle en présentant $1/v$ face à $1/S$ (Fig. 1) (Fig. 2), les poids seront en ligne droite (b) (Table de Resultats n.° 1).

On donne sur le même graphique la valeur de V . La pente est donc K_s/S . On peut calculer K_s .

Comme l'on peut voir, la valeur de K_s dans les graphiques reste presque constante bien que la quantité d'enzyme varie d'une gran façon et corresponde à des valeurs de V , de 132 à 212.

Dans les mêmes expériences (table de résultats n.° 2 et graphiques de decarboxilation, Figs. 3 et 4) avec un ferment de la même culture et des quantités égales et employant le B. C. T. A. la valeur de K_s demeure aussi constante dans la Fig. 3, bien que les courbes soient différentes et par conséquent la valeur de constante K_s comme conséquence de la activation enzymatique par le détergent.

On trouve dans les tables de résultats n.° 1 et 2, colonne 6. la série de valeurs de K_s dans les 2 séries d'expériences et leur valeur moyenne.

Discussion

Dans les travaux de Hugues (5) et Krebs (6) la quantité de détergent employé n'est pas proportionnelle à la vitesse de décarboxilation, car lors qu'on arrive à un certain limite une augmentation de la concentration de détergent n'augmente pas la vitesse de réaction mais celle-ci reste stationnaire.

Il semble plus logique de penser que la vitesse de décarbo-

xilation est proportionnelle à la saturation plus ou moins grande du complexe Protein/Détergent ou, en définitive, la saturation agirait comme une loi du tout ou rien.

Ainsi, donc, pour notre essai il fallait employer une même concentration de B. C. T. A. dans toutes les séries avec variations dans la quote de la suspension bactérienne.

On suppose aussi d'après cela qu'à chaque unité de Ph correspondent aussi complexes différents et par conséquent l'activité enzymatique doit être très différente mais l'épreuve expérimentale n'est pas facile dans la décarboxilation tyrosinique à cause de la marge étroite de l'activité qu'elle possède par rapport au Ph.

Cependant nos travaux avaient pour but vérifier si le B. C. T. A., comme dans d'autres décarboxilases, accélèrerait aussi le dégagement de gaz carbonique.

Nous soupçonnions pour cela que les concentrations de substratum utilisées par les auteurs qui n'avaient pas trouvé cette augmentation dans la vitesse de réaction par le B. C. T. A. n'étaient pas les plus adéquates, car en utilisant des suspensions de tyrosine comme substratum, à cause de la basse solubilité de ce dernier, l'enzyme ne parvenait pas à être saturé par le substratum.

En employant des solutions supérieures à la saturation nous avons trouvé que le B. C. T. A. accélère le dégagement de gaz carbonique dans la décarboxilation de la tyrosine lorsqu'on emploie des suspensions bactériennes.

L'explication la plus possible de l'accélération de la réaction serait de supposer que le détergent provoque des agglomères moléculaires avec l'augmentation relative à la superficie enzymatique et par conséquent une augmentation de la réceptivité pour le substratum.

La variation de l'affinité de l'enzyme que nous avons vérifiée appuie ce point de vue, car la constante de Michaelis varie 8 fois sa valeur normale, s'est à dire qu'on pouvait expliquer l'activation en supposant que le centre réactif réagit avec le détergent et celui-ci à son tour additionne d'autres groupes réactifs (oxyhydriles du substratum à ceux propres de l'enzyme).

Conclusions

Nous avons étudié l'influence des détergents sur l'apoférmement de la décarboxilase tyrosinique et dans une série d'expériences nous avons calculé la constante de Michaelis-Menten qui est égale à 0.0012 M et sous l'action des détergents en conséquence de l'activation la constante devient 8 fois plus petite et arrive à avoir la valeur de 0.0004 M.

Bibliographie

- (1) DÍAZ CADAVIECO, G. DE LA FUENTE : *Rev. Esp. Fisiol.*; **10**, 103, 1954.
- (2) MICHAELIS, L., and MENTEN, M. I. : *Biochem Z*; **49**, 333.
GRASSMANN, W., TRUPKE, J., in FLASCHENTRAGER, B.
- (3) LINNEWEAVER, H., and BURK, D. : *J. Am. Soc.*; **56**, 658, 1934.
- (4) BARTON - WRIGHT, R. C. : Practical Microbiol Method Ashe Labor 54.
- (5) HUGHES : *J. Am. Chem. Soc.*; **72**, 452, 1950.
- (6) KREBS, H. A. : *Biochem J.*; **43**, 53, 1948.