

POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION DE LA D-2-HYDROXYACIDE:
(ACCEPTEUR) OXYDORÉDUCTASE DE LA LEVURE ANAÉROBIE

MOTOHIRO IWATSUBO

*Service de Biophysique, Institut de Biologie physicochimique,
13 Rue Pierre Curie, Paris 5 (France)*

(Reçu le 6 février, 1963)

SUMMARY

*The oxidation-reduction potential of D-2-hydroxyacid: (acceptor)
oxydoreductase of anaerobic yeast*

The difference spectrum of oxidized enzyme minus D-lactate-reduced enzyme reveals the characteristic absorption bands of an oxidized flavin bound to the protein. The wavelengths of the peaks are: 455 $m\mu$ and 385 $m\mu$.

The oxidation-reduction potential of the FAD bound to the D-lactate dehydrogenase (D-2-hydroxyacid: (acceptor) oxydoreductase) of anaerobic yeast has been determined. A spectrophotometric study of the equilibrium between the flavin group and the D-lactate-pyruvate system gives values of $E_{mF} = -0.178$ Volt at pH 7.0 and 30°. The pH-dependance coefficient of this potential is $\Delta E_{mF}/\Delta pH = -0.03$ V.

INTRODUCTION

La D-lacticodéshydrogénase (D-2-hydroxyacide: (accepteur) oxydoréductase) de la levure anaérobie est un flavoenzyme dont le groupe prosthétique réversiblement dissociable est la FAD comme l'ont montré des expériences cinétiques d'activation, de protection et de réactivation spécifique après traitement acide¹⁻³. Ces expériences ont permis l'estimation de l'ordre de grandeur de la constante de dissociation du complexe apoenzyme-flavine à 10^{-8} M à pH 7 (voir réf. 4).

La détermination du potentiel d'oxydoréduction de cet enzyme a pu être faite de façon simple par la méthode spectrophotométrique en étudiant l'équilibre des formes réduite et oxydée du flavoenzyme avec le système D-lactate-pyruvate.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Toutes les solutions sont faites dans l'eau bidistillée sur Pyrex.

D-Lactate de calcium (California Foundation for Biochemical Research) dissous dans l'eau avec du Dowex 50 X2 (forme ammoniacale). La concentration de D-lactate est mesurée enzymatiquement⁵.

Pyruvate de sodium (Hoffmann-La Roche): solutions préparées juste avant l'expérience.

Abréviation: D-LDH, D-lacticodéshydrogénase.

Ferricyanure de potassium (Merck): on prend comme coefficient d'extinction la valeur $1.04 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{M}$.

D-Lactodéshydrogénase: préparée à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (souche 59 RL 5)⁶ cultivée en anaérobiose. L'extraction de l'enzyme est effectuée par congélation et dégel parce que le broyage de la levure par l'alumine ou par billes introduit trop de protéines inactives⁷. L'enzyme n'est pas stable dans des solutions de solvant organique même à -15° . Pour fractionner la protéine, nous avons utilisé seulement le sulfate d'ammonium.

Après dégel et addition d'un volume de tampon phosphate 40 mM contenant 100 mM de DL-lactate, on extrait la levure par incubation à 38° . Le pH est ajusté à 7.3 de temps en temps avec de l'ammoniaque concentrée. L'enzyme est précipité par le sulfate d'ammonium (0.7 saturation, pH 6.5). Le précipité, dissous dans le tampon phosphate, est chauffé en présence de DL-lactate 100 mM à 55° pendant 5 min pour dénaturer des protéines inactives. Le surnageant contenant l'enzyme est fractionné par le sulfate d'ammonium. Beaucoup d'alcool déshydrogénase cristallise à la concentration de sulfate d'ammonium 0.3–0.4 saturation. Après avoir éliminé celui-ci par centrifugation ($37\,000 \times g$, 30 min), on répète deux fois le fractionnement par le sulfate d'ammonium entre 0.45 et 0.65 saturation.

L'enzyme, dissous dans le volume minimum de tampon, est passé sur une colonne de Sephadex G-75 pour éliminer le sulfate d'ammonium et pour équilibrer la concentration de tampon à 40 mM. L'enzyme élué de la colonne de Sephadex est passé sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 équilibrée préalablement avec une solution de tampon phosphate 40 mM (pH 7.3) et DL-lactate 20 mM. Cette étape correspond à une adsorption des protéines inactives. L'enzyme passe la colonne sans être absorbé. On peut éliminer ainsi des protéines colorées qui gênent l'étude spectrophotométrique de la flavine fixée sur la D-LDH. L'enzyme élué de la colonne de DEAE-Sephadex est concentré après précipitation au sulfate d'ammonium puis passé sur une colonne de Sephadex G-50 pour éliminer de DL-lactate, le pyruvate et les traces de flavine libre. La solution d'enzyme est centrifugée au moyen d'une centrifugeuse Spinco modèle L à $145\,000 \times g$ pendant 30 min pour obtenir une solution complètement limpide. L'enzyme ainsi préparé a une activité spécifique correspondant à 3–4.5 (micromoles de D-lactate oxydé par 1 mg de protéine, pH 7.2, 30°). D'après le spectre différentiel de cet enzyme, l'activité moléculaire par groupe de FAD de l'enzyme est de 13 000.

Le spectre d'absorption est mesuré au spectrophotomètre Beckman modèle DU muni d'un compartiment thermostaté à $30^\circ \pm 0.2^\circ$. Nous avons utilisé des microcuvettes (trajet optique 10 mm, largeur 3 mm, volume de solution 0.5 ml). Dans les Figs. 1–3, toutes les lectures sont exprimées en valeurs corrigées de façon à tenir compte des dilutions. Afin d'obtenir la meilleure précision possible sur les mesures photométriques, nous avons pris des précautions particulières pour assurer la stabilité du spectrophotomètre. La lampe à tungstène est alimentée par une batterie d'accus de 120 A/h dont la décharge est compensée par une alimentation stabilisée. On fait circuler de l'air séché dans le compartiment du tube photoélectrique et de l'amplificateur. Le bruit de fond exprimé en degré d'absorption est $2 \cdot 10^{-4}$ (2000 Mohms, 1 sec.).

Le pH des solutions est mesuré à 30° immédiatement après la mesure spectro-

* L. NASLIN, communication personnelle.

photométrie avec un pH mètre Radiometer à électrode de verre type B. Cette électrode est étalonnée par rapport à un tampon standard phthalate acide de potassium 0.05 M. L'erreur est de l'ordre ± 0.01 pH.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Réduction par les substrats du FAD fixé sur la D-LDH

En utilisant une solution concentrée d'enzyme, on peut mesurer directement la réduction par le D-lactate ou par d'autres substrats du FAD fixé sur l'enzyme en suivant la variation de degré d'absorption à 450 $m\mu$. La vitesse de réduction de la flavine fixée est trop grande pour qu'elle puisse être mesurée avec cet appareillage. L'équilibre de réduction est atteint instantanément.

On sait que nos préparations de D-LDH, partiellement purifiées, peuvent en présence de ferricyanure, oxyder trois substrats différents, D-lactate, D- α -hydroxybutyrate, D-malate^{8,9}. Nous avons d'abord voulu savoir, (a) si le même flavoenzyme, la D-LDH, est responsable de l'oxydation de ces trois substrats, (b) si la préparation contient d'autres flavoprotéines ou flavines libres.

Lorsqu'on ajoute à des échantillons identiques de D-LDH purifiée, des quantités égales et saturantes de chacun des substrats, on observe une diminution immédiate du degré d'absorption à 450 $m\mu$ qui atteint exactement la même valeur dans les trois cas. Cette variation instantanée est suivie, la plupart du temps, d'une très lente diminution progressive. L'addition d'hydrosulfite seul à un échantillon identique d'enzyme produit une diminution d'absorption deux fois plus grande que l'addition des substances mentionnées.

TABLEAU I

VARIATION INSTANTANÉE DU SPECTRE FLAVINIQUE DE LA PRÉPARATION ENZYMATIQUE
PAR ADDITION DES SUBSTRATS DE LA D-LDH

Enzyme (40 U/ml), 490 μ l; D-lactate, 1.4 mM; D- α -hydroxybutyrate, 1.4 mM; D-malate, 1.4 mM; DPNH, 0.2 mM; pH 7.2. Lectures corrigées pour tenir compte des dilutions.

Substrats	AA_{450}
D-Lactate	0.027
D- α -Hydroxybutyrate	0.028
D-Malate	0.028
Mélange des trois substrats	0.029
DPNH	négligeable

L'addition simultanée des trois substrats, chacun à concentration saturante, donne la même variation d'absorption que l'addition d'un seul d'entre eux (Tableau I).

L'addition de flavines libres à ce système est suivie d'une lente réduction de celles-ci.

On peut donc conclure que la même fraction flavoprotéique, qui ne représente environ qu'une moitié des flavoprotéines totales, est réduite immédiatement par les D-lactate, D-malate, D- α -hydroxybutyrate, tandis que les autres flavoprotéines ne sont

réduites que très lentement. Les flavines libres ayant été éliminées par traitement sur Sephadex comme on l'a décrit dans la partie technique, il est logique que la fraction réduite immédiatement soit réellement un même flavoenzyme spécifique de ces trois substrats, la D-LDH.

Spectre différentiel de la D-LDH

Nous avons mesuré le spectre différentiel D-LDH oxydée — D-LDH réduite par le D-lactate (Fig. 1). Il présente des pics caractéristiques de la flavine. Un pic visible se trouve à 455 m μ , l'autre pic ultraviolet à 385 m μ . Ces deux pics sont déplacés

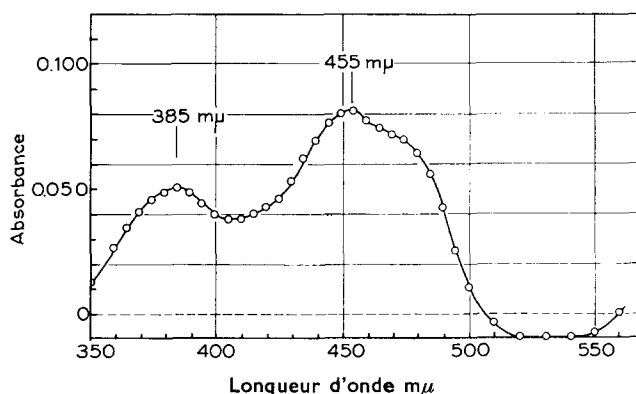


Fig. 1. Spectre différentiel de la D-LDH. Cuve de référence: enzyme, 490 μ l (110 U/ml); eau, 6.2 μ l. Cuve de mesure: enzyme, 490 μ l (110 U/ml); D-lactate, 6.2 μ l (concentration finale, 3.2 mM).

notablement (de 5 à 10 m μ) par rapport au spectre de FAD libre. Cette modification vers les longueurs d'onde plus grandes apparaît vraisemblablement en raison de l'interaction entre la flavine et l'apoenzyme.

Le spectre différentiel de la D-LDH montre une bande d'absorption négative notable dans la région entre 500 m μ et 550 m μ , beaucoup plus grande que les erreurs expérimentales de lecture et reproductible avec différentes préparations d'enzymes.¹⁰

La forme réduite présente donc une bande d'absorption à 530 m μ qui peut correspondre soit à une bande caractéristique du complexe enzyme-substrat, soit, plus probablement, à la forme semiquinonique du flavoenzyme qui absorbe généralement dans cette région du spectre. Ceci suggère que la réduction du flavoenzyme de D-LDH par le substrat pourrait mettre en jeu la formation d'une semiquinone correspondant au transfert d'un seul électron à chaque flavine oxydée.

Etude de l'équilibre

Comme la vitesse de l'autoxydation du flavoenzyme D-LDH réduit est négligeable par rapport à la vitesse de réduction par le substrat (inférieure à 2/10 000), on peut mesurer l'équilibre de la réaction entre la D-LDH et le D-lactate dans une cuve ordinaire en présence d'air.

Nous avons ajouté à une solution d'enzyme une quantité de D-lactate sensiblement plus grande que la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau. Le flavoenzyme est instantanément réduit et le degré d'absorption à 450 m μ diminue. Si l'on ajoute à ce système une certaine quantité de pyruvate, le degré d'absorption à 450 m μ augmente immédiatement (Fig. 2). Si l'on ajoute le pyruvate avant le D-lactate, la variation du degré d'absorption est moins grande qu'en absence de pyruvate. Les degrés d'absorp-

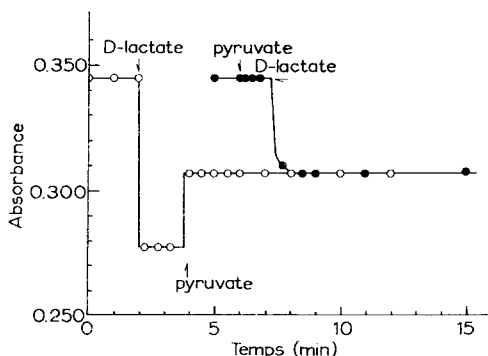


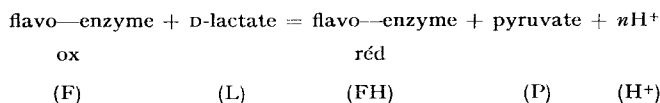
Fig. 2. Equilibre entre la D-LDH et le système D-lactate-pyruvate. Enzyme, 490 μ l (90 U/ml); D-lactate, 6.7 μ l (concentration finale, 3.5 mM); pyruvate, 6.8 μ l (concentration finale, 3.5 mM); pH 6.70.

tion à l'équilibre dans ces deux cas sont identiques à concentrations égales de D-lactate et pyruvate. La réaction est complètement réversible. Si l'on ajoute le ferricyanure (en quantité équivalente d'électrons) au lieu de pyruvate, on atteint encore le même équilibre.

Les concentrations des substances à l'équilibre ont été déterminées de la manière suivante: Concentration de l'enzyme total (F_t) = $1.10^{-4}(A_0 - A_l)$, Concentration de l'enzyme oxydé (F_{ox}) = $1.10^{-4}(A_{lp} - A_l)$, Concentration de l'enzyme réduit (F_{red}) = (F_t) - (F_{ox}), A_0 , A_l et A_{lp} sont respectivement les degrés d'absorption mesurés en absence de lactate et pyruvate, en présence de lactate seul, en présence de lactate et pyruvate. La lecture de degré d'absorption est corrigée par le facteur de dilution. Les concentrations de D-lactate et pyruvate, de l'ordre de 10^{-3} M, étant beaucoup plus grandes que les concentrations d'enzyme, on peut confondre les concentrations de lactate et pyruvate à l'équilibre avec les concentrations initiales ajoutées.

Variation de la constante apparente d'équilibre en fonction du pH

Supposons que le nombre des protons dissociés dans la réaction enzymatique est n . On peut écrire



la vraie constante d'équilibre est

$$K = \frac{(FH) (P) (H^+)^n}{(F) (L)}$$

on appelle la constante apparente à un certain pH

$$K_{ap} = \frac{(FH) (P)}{(F) (L)}$$

donc

$$K = K_{ap}(H^+)^n$$

et

$$\log K_{ap} = \log \frac{(FH) (P)}{(F) (L)} = \log K + n \text{ pH}$$

Nous avons porté $\log (FH)(P)/(F)(L)$ en ordonnées et le pH en abscisses (Fig. 3). On obtient une droite dans la région de pH de 6.3 à 7.5, de pente $\Delta \log K_{ap}/\Delta \text{pH} = 1$.

Puisque les groupes carboxyliques du D-lactate et du pyruvate sont complètement dissociés dans cette région de pH, il n'y a pas de variation de nombre de protons dans

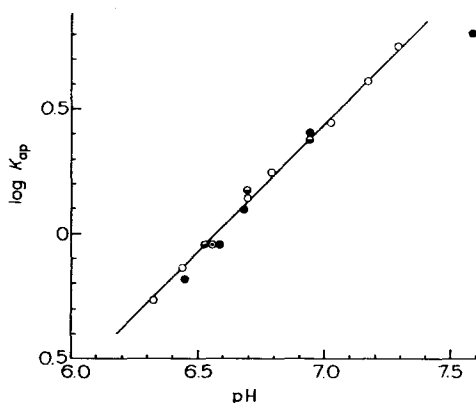
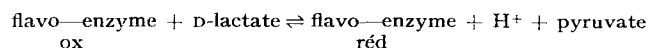


Fig. 3. Variation de la constante d'équilibre en fonction du pH. Enzyme, 375 μ l; tampon phosphate, 0.2 M, 127 μ l; D-lactate, 6.7 μ l (concentration finale, 3.5 mM); pyruvate, 6.8 μ l (concentration finale, 3.5 mM). \circ , \bullet et \bullet , trois préparations différentes de l'enzyme; \circ , équilibre mesuré avec le ferricyanure au lieu du pyruvate.

la réaction D-lactate \rightleftharpoons pyruvate. Il en résulte que la variation du nombre de protons observée est due à une dissociation d'un proton du flavoenzyme s'opérant au moment de la réduction de celui-ci. Le schéma réel est donc



Calcul du potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme

$$E_{mF} = E_{mL} + 0.030 \log K_{ap} (30^\circ)$$

On note par E_{mF} le potentiel de demiréduction du flavoenzyme. Selon une détermination récente¹¹, E_{mL} , valeur de E_m correspondant au système D-lactate-pyruvate est -0.190 V à pH 7, 27° avec $\Delta E_m/\Delta pH = -0.06$ V.

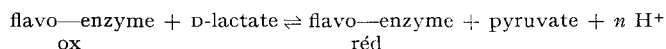
La valeur de $\log K_{ap}$ à pH 7.0 est 0.42.

Donc

$$\begin{aligned} E_{mF} &= -0.190 + 0.012 = -0.178 \text{ V} \\ \Delta E_{mF}/\Delta pH &= \Delta E_{mL}/\Delta pH + 0.03 \Delta \log K_{ap}/\Delta pH \\ &= -0.06 + 0.03 = -0.03 \text{ V} \end{aligned}$$

DISCUSSION

Nous avons déterminé le potentiel d'oxydoréduction de la D-lacticodéshydrogénase par l'étude de l'équilibre entre l'enzyme et le système D-lactate-pyruvate. Pour déterminer l'équilibre:



de façon exacte, il est nécessaire de connaître avec précision les concentrations réelles de chacune des formes moléculaires à l'équilibre. En ce qui concerne le lactate et le pyruvate, ces concentrations sont connues facilement avec une grande précision: ces réactifs sont ajoutés tous deux à des concentrations très grandes par rapport à celles des autres réactifs présents: enzyme, oxygène dissous, impuretés apportées par la préparation enzymatique (flavoprotéines, etc.). L'influence de cet oxygène dissous est ici extrêmement faible parce que la vitesse de réoxydation de l'enzyme réduit, comme nous l'avons montré spectrophotométriquement, est très petite dans nos conditions expérimentales. Les quantités de lactate et pyruvate à l'équilibre sont donc égales aux quantités initiales.

En ce qui concerne les formes réduite et oxydée du flavoenzyme à l'équilibre, elles sont évaluées spectrophotométriquement d'après la variation de degré d'absorption à 450 m μ obtenue immédiatement et spécifiquement lors de l'addition de l'un des substrats du flavoenzyme. Nous avons discuté plus haut (partie expérimentale) les faits expérimentaux qui conduisent à admettre que cette variation de densité correspond réellement à l'oxydoréduction de la D-LDH elle-même, d'autres flavoprotéines n'étant pas réduites dans nos conditions d'expérience.

Le fait que les potentiels des systèmes L/P et FH/F sont très voisins est une bonne condition pour obtenir une détermination correcte du potentiel de l'enzyme.

La différence des potentiels de demi-réduction concernant la D-LDH et le système L/P n'est pas grande dans le domaine de pH mesuré. A pH 6.7, les potentiels sont égaux; dans la région plus acide, celui de l'enzyme est plus élevé tandis qu'il est plus bas dans le domaine plus alcalin. Ce changement dépend de l'inégalité de $\Delta E_m/\Delta pH$ dans les deux cas (-0.06 V par unité de pH pour le système D-lactate-pyruvate, -0.03 V par unité de pH pour l'enzyme).

Le potentiel standard d'oxydoréduction de la D-LDH est d'environ 30 ou 40 mV plus haut que celui de FAD libre. Selon l'interprétation classique, cette différence signifierait que l'affinité de FAD réduit pour l'apoenzyme est plus grande que celle de FAD oxydé. D'après la formule de CLARK¹² et l'estimation 10^{-8} M pour la constante

de dissociation de FAD-enzyme, la constante de dissociation de FADH serait de l'ordre de 10^{-9} M.

Le potentiel de demi-réduction à pH 7 de la D-LDH est assez bas par rapport à celui des autres flavoprotéines: glucose oxydase (EC 1.1.3.4) (0.08 V)¹³, D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) (0.015 V)¹⁴, (−0.110 V)¹⁵, NADPH₂ diaphorase (EC 1.6.99.1) (−0.123 V)¹⁶, xanthine oxydase (EC 1.2.3.2) (−0.220 V)¹⁷.

Les pentes de variation de E_m en fonction du pH pour les flavoenzymes n'ont pas été suffisamment étudiées. Pour la D-aminoacide oxydase, on a montré que $\Delta E_m/\Delta pH = -0.025$ V par unité de pH (voir réf. 15), tandis que pour la NADPH₂ diaphorase, on a la valeur −0.06 V par unité de pH (voir réf. 16). Pour la D-LDH étudiée ici, la pente est de −0.03 V. D'autre part, on sait qu'une dissociation des protons intervient sur les flavines libres à pH 6.7 (voir réf. 18). Il n'a pas été possible de mettre en évidence un tel changement ni pour la D-LDH ni pour la NADPH₂ diaphorase dans la région de pH mesurée. Il est certain que le mode de dissociation de la flavine fixée n'est pas identique pour tous ces flavoenzymes.

Il a été montré à plusieurs reprises que dans la réduction des flavoenzymes, il y a une formation notable d'une forme semiquinonique. Le spectre d'absorption caractéristique de celle-ci se trouve dans la région de 500 à 600 m μ ¹⁹. Elle a pu être décelée au moyen de la résonance paramagnétique électronique²⁰⁻²². Cependant, l'absorption dans ce domaine de fréquences peut-être liée à l'excitation de certain complexe enzyme-substrat; l'examen de cette possibilité, l'étude cinétique de la formation très probable de semiquinone, et les caractéristiques de la résonance paramagnétique électronique, sont le but d'un prochain travail.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Monsieur le Professeur R. WURMSER, que je remercie bien vivement de l'intérêt qu'il y a porté. De nombreuses discussions avec Mme F. LABEYRIE m'ont été très précieuses. Je suis reconnaissant à Mlle L. NASLIN d'avoir préparé les levures utilisées pour les préparations d'enzyme.

RÉSUMÉ

Le potentiel d'oxydoréduction de la D-lactico-déshydrogénase (D-2-hydroxyacide: (accepteur) oxydoréductase) de la levure anaérobie a été déterminé spectrophotométriquement par l'étude de l'équilibre entre l'enzyme et le système D-lactate-pyruvate. La valeur obtenue pour E_m à pH 7.0 et à 30° est de −0.178 V avec la pente $\Delta E_m/\Delta pH -0.03$ V par unité de pH.

Le spectre différentiel de la D-LDH oxydée par rapport à la D-LDH réduite par le D-lactate, montre deux pics caractéristiques de la flavine, l'un à 455 m μ , l'autre à 385 m μ .

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. BAUDRAS, M. IWATSUBO ET F. LABEYRIE, *Compt. Rend.*, 260 (1960) 2621.
- ² M. IWATSUBO ET F. LABEYRIE, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 614.
- ³ M. IWATSUBO ET A. CURDEL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1962) 385.
- ⁴ M. IWATSUBO, résultats non publiés.
- ⁵ F. LABEYRIE, P. P. SLONIMSKI ET L. NASLIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 262.

- ⁶ P. GALZY, *Compt. Rend.*, 250 (1960) 3719.
- ⁷ P. P. SLONIMSKI ET W. TYSARSKI, *Compt. Rend.*, 246 (1958) 1111 et communication personnelle.
- ⁸ E. BOERI, T. CREMONA ET T. P. SINGER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2 (1960) 298.
- ⁹ F. LABEYRIE ET E. STACHIEWICZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 136.
- ¹⁰ C. GREGOLIN, T. P. SINGER, E. B. KEARNEY ET E. BOERI, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94 (1961) 790.
- ¹¹ F. LABEYRIE, L. NASLIN, A. CURDEL, ET R. WURMSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 509.
- ¹² M. W. CLARK, J. F. TAYLOR, T. H. DAVIS ET C. S. VESTLING, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 543.
- ¹³ T. YAMANO, Y. MIYAKE, K. AKI, K. KUSAI ET I. SEKUZU, *Tokushima J. Exptl. Med.*, 7 (1960) 169.
- ¹⁴ N. OKAMOTO, *Med. J. Osaka Univ.*, 11 (1959) 5669.
- ¹⁵ T. YAMANO, Y. MIYAKE ET K. AKI, *Tokushima J. Exptl. Med.*, 6 (1959) 137.
- ¹⁶ C. S. VESTLING, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 1600.
- ¹⁷ H. NIKI, *Med. J. Osaka Univ.*, 9 (1957) 59.
- ¹⁸ H. J. LOWE ET W. M. CLARK, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 983.
- ¹⁹ H. BEINERT, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 465.
- ²⁰ B. COMMONER, J. J. HEISE, B. B. LIPPINCOTT, R. E. NORBERG, J. V. PASSONNEAU ET J. TOWNSEND, *Science*, 126 (1957) 57.
- ²¹ B. COMMONER, B. B. LIPPINCOTT ET J. V. PASSONNEAU, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 1099.
- ²² H. KUBO, H. WATARI ET T. SHIGA, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 981.

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 568-576