

BBA 61118

Fixation d'ADP, NADH et NADPH sur la glutamate déshydrogénase, déterminée par spectrophotométrie

L'objet de cette note est de montrer que par spectrophotométrie de différence il est possible de distinguer sur la L-glutamate:NAD(P) oxydoreductase (EC 1.4.1.3) (la glutamate déshydrogénase), 2 types de sites de fixation différents: l'un spécifique vis à vis de l'ADP et l'autre spécifique vis à vis de la nicotinamide.

La glutamate déshydrogénase accepte comme coenzyme, sur le même site catalytique, soit $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$, soit $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}$. Cependant, comme l'a montré FRIEDEN¹, des divergences apparaissent entre ces 2 types de coenzymes lorsqu'ils sont employés à de fortes concentrations: NAD^+ produit une activation de la désamination oxydative du glutamate et NADH produit une inhibition de la réaction inverse, alors que l'on n'observe rien de semblable avec NADP^+ et NADPH .

Par des études cinétiques, FRIEDEN a été amené à suggérer l'existence d'un second site de fixation pour les coenzymes NAD^+ et NADH . Ce second site ne serait pas catalytique mais jouerait un rôle indirect dans le contrôle de l'activité de l'enzyme et cela en rapport avec des phénomènes de dissociation moléculaire de l'enzyme en sous-unités.

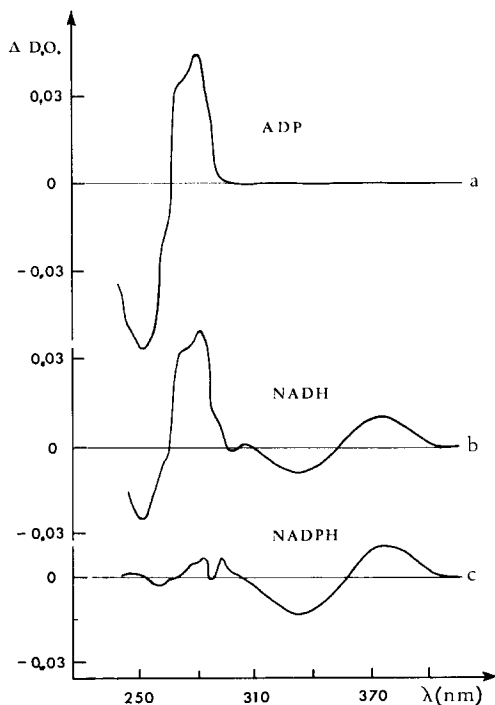


Fig. 1. Spectre de différence des complexes glutamate déshydrogénase-ADP, glutamate déshydrogénase-NADH ou glutamate déshydrogénase-NADPH. Dans une cuve à deux compartiments, sont ajoutés soit séparément (référence), soit mélangés (mesure), (1) la glutamate déshydrogénase (3 mg/ml en tampon 0.1 M Tris, pH 7.3, 20°) (2), soit 50 μM ADP(a), soit 50 μM NADH(b), soit 50 μM NADPH(c).

Sur la base de ces travaux nous avons entrepris l'étude directe de l'équilibre d'association de la glutamate déshydrogénase avec différents nucléotides qui possèdent tous trois une base adénine dans leur molécule: l'ADP, NADH et NADPH.

La glutamate déshydrogénase utilisée est extraite du foie de porc. Cet enzyme est préparé au laboratoire d'après la méthode de IWATSUBO^{2,3}. Il est recristallisé de 4 à 6 fois.

La méthode employée consiste à étudier par spectrophotométrie de différence, à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15 et de cuves à 2 compartiments, le déplacement du spectre d'absorption de la molécule de ligand fixée sur la protéine. Si cette molécule de ligand possède plusieurs chromophores il est possible, nous le verrons, de connaître ceux de ces groupes qui interviennent dans la fixation. La technique est très sélective et permet d'étudier simultanément la fixation de ligands sur des sites distincts de l'enzyme, comme le montrent les Figs. 1 et 2.

La Fig. 1 a représente la différence de spectre obtenue entre une solution de la glutamate déshydrogénase (3 mg/ml en tampon Tris 0.1 M (pH 7.3) à 20°) en présence d'ADP $5 \cdot 10^{-5}$ M, et un système de référence formé de 2 solutions juxtaposées de la glutamate déshydrogénase et d'ADP aux mêmes concentrations que ci-dessus.

Ce spectre de différence correspond à un déplacement bathochrome du spectre de l'adénine lors de sa fixation sur l'enzyme. L'amplitude de la différence est proportionnelle à la quantité d'ADP fixée.

L'étude du degré de saturation de l'enzyme en fonction de la concentration d'ADP nous a permis d'obtenir le nombre de sites n et la valeur de la constante d'association K , de la glutamate déshydrogénase pour ADP: $n = 18$ à 20 sites pour une masse molaire de l'enzyme de $1.1 \cdot 10^6$ et $K = 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Les Figs. 1b et 1c montrent des spectres de différence obtenus par la même technique et dans les mêmes conditions que celles de la Fig. 1a mais en absence d'ADP: soit avec $5 \cdot 10^{-5}$ M de NADH (Fig. 1b), soit avec $5 \cdot 10^{-5}$ M de NADPH (Fig. 1c).

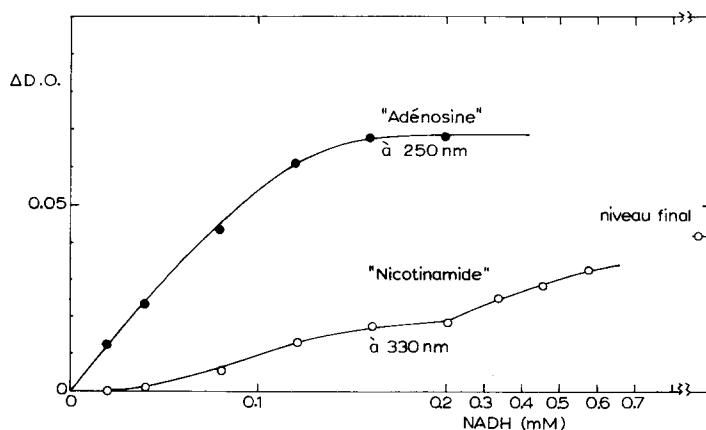


Fig. 2. Courbes de saturation de la glutamate déshydrogénase par NADH, obtenues à deux longueurs d'ondes différentes. Ordonnées: variation d'absorption du complexe enzyme-NADH mesurées respectivement à 250 nm (●—●); et à 330 nm. (○—○). Abscisses: concentration en NADH. La concentration de l'enzyme est égale à 3 mg/ml en tampon 0.1 M Tris, pH 7.3, 20°.

Il apparaît nettement que la fixation de NADH sur l'enzyme se traduit par un déplacement bathochrome de la bande d'absorption du groupe adénine et de la bande d'absorption du groupe nicotinamide, alors que, seule, cette dernière bande d'absorption donne un spectre de différence dans le cas de la fixation de NADPH.

L'étude des spectres de différence en fonction de la concentration croissante de NADH ajoutée à l'enzyme montre qu'il n'y a pas proportionnalité entre les variations de densité optique au niveau des bandes d'absorption de l'adénine et de la nicotinamide (Fig. 2): il n'y a donc pas fixation d'une même molécule de NADH sur 2 sites de l'enzyme mais, au contraire, fixation indépendante de NADH, sur des sites différents, soit par son groupe adénine avec une constante d'association $K_a = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, soit par son groupe nicotinamide avec une constante d'association plus faible $K_n = 4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

NADPH possède la même affinité que NADH pour le site de l'enzyme qui fixe la nicotinamide mais ne présente aucune affinité pour le second site.

La fixation de NADH sur le site „adénine” de l'enzyme est inhibée compétitivement par ADP, alors que sa fixation sur le site „nicotinamide” n'est pas affectée.

La glutamate déshydrogénase possède donc, en absence de substrat, 2 types de sites distincts et indépendants, capables de fixer le coenzyme NADH. Un premier site est étroitement spécifique de l'adénosine 5'-diphosphate et fixe soit ADP soit NADH, à l'exclusion de l'adénosine 2'-phosphate 5'-diphosphate de NADPH. Un second site spécifique de la nicotinamide est commun à NADH et NADPH. Le nombre de ces différents sites sur la glutamate déshydrogénase, tout au moins, en ce qui concerne l'ADP, pour lequel la mesure est relativement précise, est d'environ 20 sites, soit 1 site par sous-unité, en adoptant pour la masse molaire de la sous-unité la valeur 52 000 déterminée par APPELLA ET TOMKINS⁴.

Il est important de remarquer que les valeurs des constantes d'association que nous avons données ci-dessus, ont été obtenues en absence de substrat ou d'analogue du substrat. En effet nous avons mis en évidence que la formation du complexe ternaire glutamate déshydrogénase-coenzyme réduit-substrat (ou analogue) modifie

TABLEAU I

La glutamatedéshydrogénase 3 mg/ml, tampon Tris, (pH 7.3) 0.1 M, EDTA 10^{-3} M, 20°.

	Site "adénosine" K	Site "nicotinamide" K
<i>En absence de substrat</i>		
ADP	10^7 M^{-1}	0
NADH	$3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	} $4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$
NADPH	0	
<i>En présence d'acide D-glutamique* 1.5 mM</i>		
ADP	10^7 M^{-1}	0
NADH	$3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$	} 0.5 à $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
NADPH	0	
<i>En présence d'acide D-glutamique* 0.7 mM et NADH 37 μM</i>		
ADP	$3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$	0

* Nous obtenons les mêmes résultats en remplaçant d'acide D-glutamique par des concentrations 10 fois plus fortes d'acide L-glutamique).

considérablement l'affinité des différents sites de l'enzyme pour leur ligand spécifique comme le montre le Tableau I suivant.

D'après ce tableau, on voit qu'en absence de substrat NADH se fixe préférentiellement sur le site „adénosine” de l'enzyme alors qu'en présence d'acide D-glutamique, NADH se fixe préférentiellement sur le site „nicotinamide”. La formation du complexe ternaire la glutamate déshydrogénase-NADH-d'acide D-glutamique augmente 300 fois l'affinité du site „nicotinamide” pour NADH et NADPH, et diminue plus de 3000 fois l'affinité de l'enzyme pour ADP.

En présence du substrat il apparait de très fortes interactions entre les sites de fixation de la nicotinamide et de l'adénosine 5'-diphosphate, qui présentent les caractères d'une inhibition par exclusion réciproque (en cours de publication).

*Laboratoire de Biologie Physico-Chimique
de la Faculté des Sciences, Orsay, et
Service de Biophysique,
Institut de Biologie Physico-Chimique,
Paris (France)*

DOMINIQUE PANTALONI
MOTOHIRO IWATSUBO

- 1 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1960) 809.
- 2 M. IWATSUBO, H. WATARI, T. SOYAMA, K. ITO, S. NISHIMOTO ET K. HIRAOKA, *Koso Kagaku Shimpoziumu*, 12 (1965) 36.
- 3 H. KUBO, M. IWATSUBO, H. WATARI ET T. SOYAMA, *J. Biochem. Tokyo*, 46 (1959) 1.
- 4 E. APPELLA ET G. TOMKINS, *J. Mol. Biol.*, 18 (1966) 77.

Reçu le 30 juin, 1966

Manuscript révisé reçu le 12 octobre, 1966

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 217-220