

BBA 65910

## L'ATP:THIAMINE PYROPHOSPHOTRANSFÉRASE. PURIFICATION ET ÉTUDE DU MÉCANISME DE RÉACTION\*

FRANÇOISE THOMÉ-BEAU, LE THI LAN, ANNA OLOMUCKI ET NGUYEN VAN THOAI  
*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)*

(Reçu le 27 janvier, 1969)

## SUMMARY

*ATP:thiamine pyrophosphotransferase. Purification and reaction mechanism study*

1. ATP:thiamine pyrophosphotransferase (EC 2.7.6.2) from baker's yeast has been purified 200-fold.

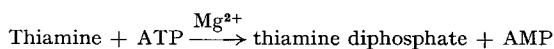
2. The enzyme SH groups are not very reactive. The kinase is not completely inhibited by *p*-chloromercuribenzoate, *N*-ethylmaleimide and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid even at high concentrations. Iodoacetic acid and iodoacetamide are unreactive.

3. The enzyme is fully inhibited by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid and strongly by 5-dimethylaminonaphthalene sulfonyl chloride and by maleic anhydride.

4. Some kinetic aspects of the reaction have been examined. The double reciprocal plots of initial velocity *versus* thiamine concentration at different levels of ATP concentration give a family of parallel lines. In agreement with this result, plotting  $1/\text{velocity}$  *versus*  $1/\text{concentration of ATP}$  for some different ATP/thiamine ratios yields straight lines intercepting on the ordinate axis at the same point. The results of kinetic studies are consistent with a "ping-pong" reaction mechanism.

## INTRODUCTION

La thiamine diphosphate est formée par phosphorylation de la thiamine, selon la réaction:



catalysée par la thiamine pyrophosphokinase (ATP:thiamine pyrophosphotransférase, EC 2.7.6.2). Cet enzyme et la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase (ATP:D-ribose-5-phosphate pyrophosphotransférase, EC 2.7.6.1) sont les deux seuls enzymes connus transférant un groupe pyrophosphoryle<sup>1,2</sup> à partir de l'ATP, tandis

Abréviations: PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; TNBS, acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique.

\* Groupe de recherche No. 6 du Centre National de la Recherche Scientifique.

que les autres phosphokinasas catalysent le transfert du groupe phosphoryle terminal du même nucléotide.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre une étude du mécanisme d'action de la thiamine kinase afin d'obtenir quelques éclaircissements sur le processus de transfert du groupe pyrophosphoryle. Dans ce but, nous avons entrepris la purification de l'enzyme de levure de boulangerie.

Bien que l'enzyme obtenu ne soit pas entièrement purifié, il est beaucoup plus actif que ceux décrits antérieurement<sup>3-8</sup>. Nous avons pu préciser certains de ses caractères par des expériences d'inhibition d'une part, et de cinétique d'autre part.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Produits*

La plupart des produits utilisés sont d'origine commerciale. On a contrôlé la pureté du thiamine diphosphate (Hoffmann-La Roche) par électrophorèse à haute tension et localisation des taches à l'aide du réactif molybdique<sup>9</sup>.

La DEAE-cellulose (Cellex-D, Bio-Rad) est traitée selon la réf. 10.

Le gel d'alumine C<sub>γ</sub> est préparé suivant la réf. 11.

##### *Électrophorèse à haute tension*

Elle est réalisée sur papier Whatman No. 1 à l'aide de l'appareil Shandon, dans le tampon pyridine 10%-acide acétique 0.4% (pH 6.5), à 6000 V pendant 45 min.

##### *Détermination de la concentration en protéines*

Les protéines sont évaluées spectrophotométriquement<sup>12</sup>.

##### *Mesure d'activité enzymatique*

Le thiamine diphosphate formé par l'action de la thiamine kinase est dosé à l'aide de la pyruvate carboxylase, préalablement débarrassée de son cofacteur<sup>13</sup>.

La combinaison entre apocarboxylase et thiamine diphosphate redonne l'enzyme actif, dont l'action sur le pyruvate s'accompagne d'un dégagement de CO<sub>2</sub> qu'on mesure manométriquement<sup>14</sup>.

##### *Formation du thiamine diphosphate*

La thiamine kinase (3-5 unités) est incubée 15 min à 37° avec l'ATP 0.015 M, la thiamine 0.006 M, l'acétate de magnésium 0.03 M en présence du tampon Tris-HCl 0.2 M (pH 8), dans un volume de 0.5 ml. La réaction est arrêtée par un chauffage de 5 min au bain-marie bouillant. Les milieux réactionnels sont ensuite refroidis à -10° et conservés congelés à cette température (quelques jours au maximum) jusqu'au moment du dosage du thiamine diphosphate formé.

L'activité est exprimée en unités enzymatiques par mg (activité spécifique) ou par ml.

On a défini l'unité enzymatique comme la quantité d'enzyme qui, dans nos conditions d'essai, forme 1 μmole de thiamine diphosphate en 1 h.

##### *Mesure du thiamine diphosphate formé*

La carboxylase de levure de brasserie est débarrassée de ses cofacteurs par lavage des cellules en milieu alcalin<sup>15</sup> selon des modalités empruntées à WESTENBRINK<sup>13</sup> et modifiées par nous.

Pour les essais, la levure lavée est mise en suspension dans le tampon citrate 0.5 M (pH 6), donnant un volume final de 10 ml par g de levure sèche initiale; la suspension renferme en outre le cofacteur métallique sous forme de  $\text{MnCl}_2$  0.03 M, et de la thiamine 0.006 M; cette dernière inhibe totalement toute hydrolyse du thiamine diphosphate.

Les mesures se font dans des fioles de Warburg en présence d'air et à 30°.

Le contenu des fioles de Warburg consiste en: 1 ml de suspension de levure lavée, l'échantillon de thiamine diphosphate à doser, 0.7 ml de tampon citrate 0.5 M (pH 6), placés dans le compartiment principal, et 0.3 ml de pyruvate de sodium 0.1 M dans le bras latéral; volume total, 3 ml.

Après une préincubation de 10 min à 30° permettant la recombinaison de l'apoenzyme et de ses cofacteurs, on mélange l'enzyme et le pyruvate; on suit le dégagement de  $\text{CO}_2$  toutes les 5 min pendant 15 min.

On a vérifié que la suspension de levure n'opère ni synthèse ni hydrolyse du thiamine diphosphate au cours de la mesure.

Le thiamine diphosphate formé est évalué par rapport à une courbe étalon de  $\text{CO}_2$  dégagé en fonction de quantités croissantes de thiamine diphosphate commercial (0.10–0.80  $\mu\text{mole}$ ).

## RÉSULTATS

### *Purification*

#### *Préparation de l'extrait brut*

La levure de boulangerie sèche (1600 g) est agitée mécaniquement pendant 2 h à 37° et pH 7 dans du phosphate disodique 0.1 M (4.8 l). La suspension est ensuite additionnée, à température ordinaire, de 280 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans 3.2 l d'eau; après une agitation de 30 min, la suspension est centrifugée à froid pendant 40 min à  $13\,000 \times g$ , ce qui fournit entre 6 et 8 l de surnageant.

La purification est poursuivie à froid entre 0 et 5°. On procède à la précipitation des protéines en ajoutant 40 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cristallisé pour 100 ml de solution, tout en maintenant le pH à 7; après une agitation de 30 min, l'ensemble est centrifugé pendant 30 min à  $13\,000 \times g$ ; le précipité est dissous dans 1.6 l de thiamine 0.1 mM, et la solution enzymatique obtenue est dialysée pendant 15 h contre 50 vol. de la même solution de thiamine, ce qui provoque la formation d'un important précipité blanc; on élimine celui-ci par une centrifugation de 20 min à  $59\,000 \times g$ . On recueille 2–3 l de surnageant renfermant 20–30 mg/ml de protéines, et constituant l'extrait brut.

#### *Traitement thermique et précipitation à la streptomycine*

On porte à 50° des portions de solution enzymatique d'environ 350 ml; cette température est maintenue pendant 5 min, puis on opère très rapidement le refroidissement à 5°. La solution devenue trouble est additionnée lentement et avec agitation d'une solution de sulfate de streptomycine à 5% dans l'eau, de façon à atteindre une concentration finale de 0.5% en streptomycine; l'agitation est poursuivie 30 min après la fin de l'addition, puis le mélange est centrifugé 20 min à  $13\,000 \times g$ ; le surnageant est recueilli et le pH ajusté à 7.

#### *Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$*

À la solution enzymatique, dont la concentration en protéines est ajustée à

15 mg/ml, on ajoute 25.5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par 100 ml de solution (45% de saturation); après 30 min d'agitation, le précipité est éliminé par une centrifugation de 30 min à  $13\,000 \times g$ . Le surnageant est additionné de 19.7 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par 100 ml de solution initiale (72% de saturation), et la suspension obtenue est gardée telle quelle jusqu'au stade suivant.

#### *Filtration sur Séphadex G-100*

Le Séphadex est équilibré avec une solution de Tris-HCl 0.05 M et NaCl 0.1 M à pH 8.

Les protéines précipitées au stade précédent sont isolées par centrifugation puis dissoutes dans le tampon d'équilibration du Séphadex. Le mélange est filtré sur des colonnes de Séphadex pour lesquelles on a établi un rapport: poids de protéines/volume de gel égal à 0.8; le débit est de 1-2 ml/cm<sup>2</sup> par h.

Le pic d'élution de l'enzyme se situe après la sortie de la majorité des protéines. La Fig. 1 illustre le fractionnement obtenu dans ces conditions.

On réunit les fractions ayant une activité spécifique égale ou supérieure à 150, et on précipite les protéines en ajoutant 51.6 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pour 100 ml de solution enzymatique (80% de saturation).

#### *Adsorption sur gel d'alumine $\text{C}_\gamma$*

L'adsorption de l'enzyme sur le gel d'alumine ainsi que les lavages et éluions

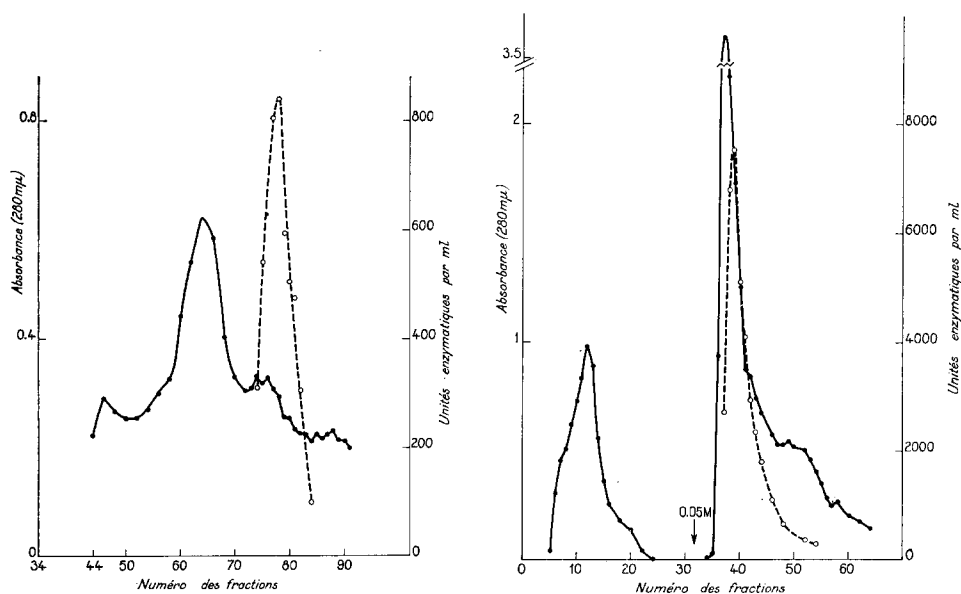


Fig. 1. Filtration de la thiamine kinase sur Séphadex G-100. Colonne: 6.1 cm  $\times$  90 cm. Protéines: 2140 mg dissous dans 23 ml de Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8). Filtration réalisée dans le même tampon à la vitesse de 48 ml/h. Fractions de 14.5 ml jusqu'au tube 50, et de 12 ml ensuite ●—●, absorbance à 280 mμ; ○—○, activité enzymatique exprimée en unités/ml.

Fig. 2. Chromatographie de la thiamine kinase sur DEAE-cellulose. Colonne: 1.2 cm  $\times$  12.5 cm. Protéines: 145 mg. Équilibration initiale avec le tampon phosphate 10 mM, ATP 0.05 mM, acétate de magnésium 0.1 mM (pH 7.8). Éluion de l'enzyme par le tampon phosphate 50 mM, de même composition et pH, mis sur la colonne comme indiqué. Fractions: 3 ml. ●—●, absorbance à 280 mμ; ○····○, activité enzymatique exprimée en unités/ml.

sont réalisés en utilisant des solutions plus ou moins concentrées en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , renfermant toutes la thiamine 0.1 mM et ajustées à pH 7.

Les protéines provenant de l'étape précédente (1270 mg) sont dissoutes dans 295 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 5% de saturation pour donner environ 4 mg/ml de protéines, et traitées par 3 fois leur poids de gel d'alumine. Après adsorption de l'enzyme sur le gel, ce dernier est lavé par une solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 10% de saturation. L'enzyme est élué 4 fois, chaque fois avec 60 ml de solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 25% de saturation. Les éluats sont ensuite réunis, et les protéines précipitées par dialyse contre une solution saturée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

#### *Chromatographie sur DEAE-cellulose*

La DEAE-cellulose est équilibrée avec du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.8), renfermant de l'ATP 0.05 mM et de l'acétate de magnésium 0.1 mM.

Les protéines (145 mg) en solution dans le même tampon sont dialysées contre 50 vol. de celui-ci pendant 16 h. La solution enzymatique, amenée à 6 mg/ml, est mise sur colonne (1.2 cm  $\times$  12.5 cm) à la vitesse de 15 ml/h. La colonne est lavée avec le même tampon. Après l'élimination des protéines inactives, on élue l'enzyme à l'aide du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.8), renfermant l'ATP et le magnésium; le débit est alors ralenti à 10 ml/h (Fig. 2). Les tubes les plus riches en enzyme sont réunis et les protéines précipitées par dialyse contre une solution saturée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

La fraction principale, d'activité spécifique 3550, est de 21 mg de protéines. Une autre fraction, de 7.8 mg et d'activité spécifique 2020, est également conservée, de la même manière que la précédente. L'ensemble de la purification est représenté dans le Tableau I.

La fraction la plus active résulte d'une purification d'environ 200 fois par rapport à l'extrait brut. Toutefois, l'électrophorèse de disque sur gel d'acrylamide de cette fraction montre encore la présence de plusieurs constituants protéiques.

#### *Recherche des résidus d'acides aminés essentiels à l'activité enzymatique*

Nous avons essayé de caractériser les différents résidus d'acides aminés essentiels à l'activité enzymatique. Nous nous sommes surtout attachés à étudier les groupements SH,  $\text{NH}_2$  et les résidus histidine. En conséquence, nous avons utilisé différents réactifs considérés comme relativement spécifiques de ces groupements.

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA THIAMINE KINASE

Fractions	Protéines (mg)	Unités enzymatiques totales	Activité spécifique (unités/mg)	Rendement (%)
Extrait brut	53 000	878 000	17.5	100
Traitement thermique et à la streptomycine	25 020	950 000	41.2	108
Fractionnement 45-72% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14 360	635 200	44*	72
Séphadex G-100	1 270	234 000	184.5	27
Gel d'alumine	145	159 000	1100	18
DEAE-cellulose	21.2	75 400	3350	8.6

\* L'activité spécifique obtenue par le fractionnement est de 68, mais au cours de la conservation de l'enzyme, elle tombe au chiffre indiqué.

TABLEAU II

## ESSAIS D'INHIBITION DE LA THIAMINE KINASE

Les solutions enzymatiques (0.284 mg de protéine par ml) sont préincubées avec les réactifs en présence de tampon Tris-HCl 0.2 M (pH 8), à 26°, et pendant les temps indiqués. L'enzyme est dilué 50 fois pour la mesure d'activité. Activité spécifique de l'enzyme: 3550. Les taux d'inhibition sont calculés par rapport à l'enzyme incubé dans les mêmes conditions sans inhibiteur; celui-ci perd une partie de son activité au cours des incubations de 60 min.

Essais	Réactifs	Concn. (mM)	Temps de préincubation (min)	Taux d'inhibition (%)
1	PCMB	0.1	30	38.5
		0.5	30	47
		1	30	58
2	N-Ethylmaleimide	0.5	60	0
		1	60	4
		5	60	42
		10	60	65.5
3	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque	0.83	60	0
		3.9	60	41
		8.3	60	52

TABLEAU III

## ESSAIS D'INHIBITION DE LA THIAMINE KINASE

Préincubations de l'enzyme avec les différents réactifs faites en présence de  $\text{KHCO}_3$  4% (pH 8) pour les Essais 1-4, et en présence de Tris-maléate 0.1 M (pH 6) pour l'Essai 5. Activité spécifique des enzymes: 3550 pour les Essais 1 et 2, voisine de 2000 pour les autres. La concentration en protéines dans les préincubations est de 0.042 mg/ml pour l'Essai 1, 0.1 mg/ml pour les Essais 3 et 4, et 0.2 mg/ml pour les Essais 2 et 5; cette dernière concentration en protéines est destinée à empêcher la dénaturation de l'enzyme dans les Essais 2 et 5 renfermant 1% d'acétone comme solvant des réactifs. Après la préincubation, l'enzyme est dilué de 10-50 fois suivant les cas dans le tampon Tris-HCl 0.2 M (pH 8) pour les essais d'activité.

Essais	Réactifs	Concn. (mM)	Préincubation		Taux d'inhibition (%)
			Temps (min)	Temp. (°)	
1	TNBS	0.5	10	37°	65
		1	10	37°	82
		2.5	10	37°	96
		6.25	10	37°	100
2	Chlorure de 5-méthylaminonaphtalène sulfonyle	0.1	10	37°	24.5
		0.25	10	37°	58.5
		0.5	10	37°	75
3	Anhydride maléique	100	10	0°	52
		200	10	0°	76
4	Diazotétrazole	1	30	0°	74
5	Diéthylpyrocarbonate	5	5	37°	23

*Réactifs des groupements SH*

Des essais préliminaires ayant montré que les groupes SH de l'enzyme étudié sont relativement inertes, des effets notables d'inhibition ne peuvent être obtenus, comme le montre le Tableau II, qu'en présence de concentrations assez élevées de réactifs et après un certain temps d'incubation.

L'enzyme peut être totalement inhibé par le *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) 1 mM, à condition de prolonger son action pendant 2 h. Cependant, l'inhibition due au PCMB 1 mM peut être totalement annulée par le dithiothreitol en excès, si ce dernier intervient dans les 5 premières minutes de la réaction (inhibition ne dépassant pas 28%).

Il faut enfin noter qu'aucune inhibition nette n'a pu être mise en évidence avec l'acide iodoacétique et l'iodoacétamide.

*Réactifs des groupements aminés*

Pour étudier la réactivité des groupements  $\text{NH}_2$ , nous avons utilisé en premier lieu l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) qui est d'un emploi facile<sup>16-21</sup>; relativement spécifique des groupements aminés<sup>22</sup>, il est susceptible d'attaquer également des groupements  $\text{SH}$ <sup>23,24</sup>. Mais étant donné l'absence de groupements SH très réactifs dans la thiamine kinase, l'emploi du TNBS apparaît ici comme assez sélectif.

Des essais faits dans différentes conditions nous ayant montré que l'enzyme peut être rapidement et totalement inhibé par le TNBS, nous avons utilisé d'autres réactifs agissant sur les groupements  $\text{NH}_2$ , tels que l'anhydride maléique<sup>25</sup> et le chlorure de 5-diméthylaminonaphtalène sulfonyle<sup>26-30</sup>.

Les Essais 1-3 du Tableau III montrent qu'une inhibition notable de la thiamine kinase peut être obtenue dans tous les cas.

*Réactifs des résidus histidine*

Nous avons également essayé de mettre en évidence le rôle éventuel de résidus histidine, ce qui est rendu difficile par le manque de réactifs spécifiques. Nous avons toutefois utilisé le diazo-1-H-tétrazole<sup>31-35</sup> et le diéthylpyrocarbonate<sup>36</sup>. D'après les résultats donnés dans le Tableau III (Essais 4 et 5), il semble que les inhibitions obtenues ne soient pas très significatives.

*Étude cinétique de la thiamine kinase*

Dans le cas des réactions enzymatiques faisant intervenir deux ou plusieurs substrats, on admet deux mécanismes de réaction possibles (du type "concerté" ou du type "ping-pong"), se distinguant par certaines caractéristiques cinétiques<sup>37</sup>.

Suivant la méthode d'étude cinétique fréquemment appliquée à ces réactions, nous avons mesuré les vitesses initiales de réaction en fonction des concentrations variables de thiamine, tout en maintenant fixe la concentration de l'ATP. Ces mesures ont été faites pour 4 concentrations différentes d'ATP. La Fig. 3 montre que les droites obtenues (inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration de thiamine) sont parallèles entre elles, ce qui est caractéristique du mécanisme "ping-pong".

De même, nous avons mesuré les vitesses initiales de réaction lorsque nous avons fait varier les concentrations des substrats maintenues dans un rapport constant. Avec la même représentation graphique que précédemment, nous avons obtenu des lignes droites pour les différents rapports ATP/thiamine, comme on le voit sur la Fig. 4.

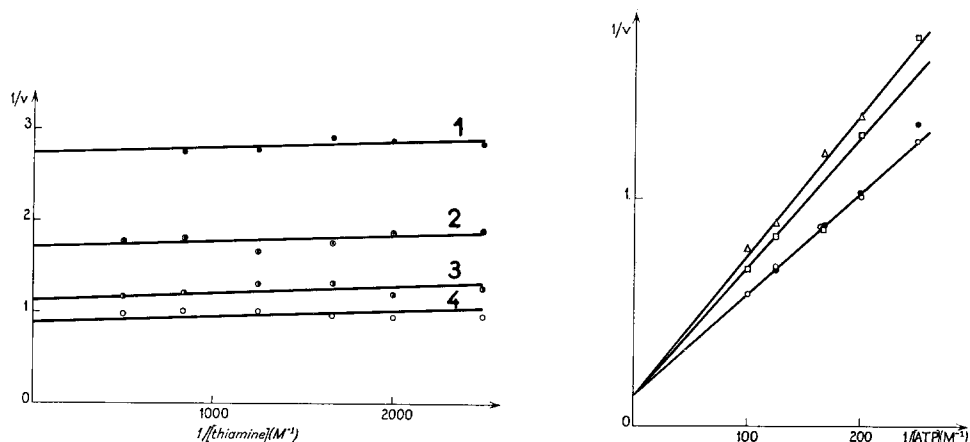


Fig. 3. Graphique de l'inverse des vitesses initiales de réaction en fonction de l'inverse des concentrations de thiamine. Milieux réactionnels: enzyme (activité spécifique 3550) 24 unités, Tris-HCl 0.1 M (pH 8), albumine 0.4 mg, thiamine comme indiqué, ATP 3 mM (1), 4 mM (2), 5 mM (3) et 7 mM (4); la concentration en acétate de magnésium est, dans chaque cas, double de celle d'ATP; volume 2 ml. Incubations pendant 10 min à 37°. Les milieux réactionnels sont préincubés 5 min à 37° avant l'addition d'enzyme. Abscisses: inverse des concentrations de thiamine exprimées en M. Ordonnées: inverse des vitesses initiales de réaction exprimées en  $\mu$ moles de TDP formées en 10 min.

Fig. 4. Graphique de l'inverse des vitesses initiales de réaction en fonction de l'inverse des concentrations d'ATP, pour différents rapports ATP/thiamine. Conditions de réaction et composition des milieux réactionnels comme à la Fig. 3, sauf pour les concentrations des substrats. ATP concentrations indiquées sur la figure. Rapports ATP/thiamine: courbe supérieure, 3.2; courbe moyenne, 4; courbe inférieure, 2.5 et 1.8. Abscisses: inverse des concentrations d'ATP exprimées en M. Ordonnées: inverse des vitesses initiales de réaction exprimées en  $\mu$ moles de TDP formées en 10 min.

## DISCUSSION

L'une des difficultés de l'étude de la thiamine kinase provient du mauvais rendement obtenu au cours de la purification de l'enzyme. Ceci tient à deux causes: la faible teneur en enzyme dans le matériel de départ, et son inactivation spontanée au cours de la purification.

La faible quantité d'enzyme présente dans la levure a été mise en évidence par de nombreux essais d'extraction des protéines à partir de levure de boulangerie soit fraîche, soit desséchée à l'air: ces essais n'ont pas permis d'obtenir de plus grandes quantités d'enzyme.

L'inactivation de la thiamine kinase en cours de purification constitue également un obstacle important pour l'obtention de l'enzyme pur. Les essais de protection ont été sans résultat. Le mercaptoéthanol et le dithiothreitol se sont montrés sans effet. La thiamine et l'ATP-Mg utilisés séparément ne paraissent avoir qu'un faible effet protecteur, qui n'a pas été négligé cependant. Le phosphate qui est un inhibiteur puissant est sans action.

Cependant, le protocole de purification adopté a permis d'obtenir un enzyme bien plus actif que ce qui a été obtenu jusqu'à présent<sup>3-8</sup>.

L'emploi des réactifs de groupements SH permet de définir les caractères suivants de la thiamine kinase: les groupements SH sont peu réactifs; d'autre part, ils



ne paraissent pas jouer un rôle primordial en ce qui concerne l'activité catalytique car, pour obtenir une inhibition totale de l'enzyme, il faut faire agir longtemps le PCMB assez concentré, et l'inhibition obtenue est irréversible. Les SH impliqués dans les réactions d'inhibition paraissent donc avoir un rôle plutôt structural.

En ce qui concerne les groupements  $\text{NH}_2$ , les expériences effectuées avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (rendu spécifique par l'absence de réactivité des groupements SH)<sup>22-24</sup> sont concluantes. Ce résultat est confirmé par les essais faits avec l'anhydride maléique<sup>25</sup> et avec le chlorure de 1-diméthylaminonaphtalène 5-sulfonyle, dont la spécificité est toutefois moins étroite<sup>26-30</sup>. Les groupements  $\text{NH}_2$  sont essentiels à l'activité de la thiamine kinase.

Les essais réalisés avec des réactifs des résidus histidine sont moins significatifs à divers points de vue. Ces réactifs, le diazo-1-H-tétrazole<sup>31-35</sup> et le diéthylpyrocarbonate<sup>36</sup> sont assez peu sélectifs; le diazotétrazole inhibe nettement la thiamine kinase mais le diéthylpyrocarbonate, employé à pH 6 pour limiter l'attaque aux groupements histidine, n'a qu'une faible action sur l'enzyme.

Enfin, l'étude cinétique de la thiamine kinase apporte un argument en faveur de l'existence d'un mécanisme de réaction du type "ping-pong", conduisant à l'hypothèse de la formation d'un intermédiaire enzymatique au cours du transfert de pyrophosphoryle.

On sait que la même méthode d'étude a fourni des résultats analogues pour plusieurs enzymes<sup>38-48</sup>. Dans la plupart de ces cas, on admet qu'il se forme un intermédiaire enzymatique phosphorylé; mais le transfert de groupe phosphoryle entre l'intermédiaire enzymatique et l'accepteur de phosphate n'a pu être mis en évidence que dans un seul cas<sup>45-47</sup>.

En ce qui concerne la thiamine kinase, et si l'on envisage l'hypothèse de la formation d'un intermédiaire enzymatique renfermant du phosphore, il paraît évident que cet intermédiaire devrait consister en une combinaison enzyme-pyrophosphoryle. Une combinaison de ce type paraît se former au cours de la réaction catalysée par la phosphoénol pyruvate synthase<sup>49</sup>, mais elle est instable, et l'intermédiaire fonctionnel de la réaction semble plutôt être la combinaison enzyme-groupe phosphorylé<sup>50-52</sup>. Par contre, une étude récente de la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase<sup>53</sup> semble indiquer que cet enzyme forme, au cours de la réaction, un intermédiaire qui pourrait renfermer le groupement pyrophosphoryle.

Il serait intéressant de préciser l'existence d'un tel intermédiaire dans le cas de la réaction catalysée par la thiamine kinase. En utilisant du  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  et de l' $[U^{14}\text{C}]\text{ATP}$  (marqué uniforme), nous avons d'ores et déjà déterminé que notre préparation purifiée d'enzyme fixe du phosphore par incubation avec le substrat nucléotidique, dans les conditions habituelles, mais pendant des temps courts, en l'absence de thiamine. Il reste toutefois à préciser si la protéine marquée par le  $^{32}\text{P}$  est effectivement l'intermédiaire supposé, la thiamine kinase-pyrophosphoryle.

## RÉSUMÉ

1. L'ATP:thiamine pyrophosphotransférase (EC 2.7.6.2) de levure de boulangerie a été purifiée environ 200 fois.

2. L'enzyme ne possède pas de groupements SH très réactifs. Le *p*-chloro-mercuribenzoate, la *N*-éthylmaléimide et l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque,

même à fortes concentrations, ne l'inhibent pas totalement. L'acide iodoacétique et l'iodoacétamide sont sans effet.

3. L'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique inhibe totalement l'enzyme. Le chlorure de 5-diméthylaminonaphtalène sulfonyle et l'anhydride maléique à concentration élevée l'inhibent fortement.

4. L'inverse des vitesses initiales de réaction en fonction de l'inverse des concentrations de thiamine donne, pour différentes concentrations fixes d'ATP-Mg, des droites parallèles. En confirmation de ce dernier résultat, l'inverse des vitesses initiales de réaction en fonction de l'inverse des concentrations d'ATP donne, pour différents rapports ATP/thiamine, des droites se coupant au même point sur l'axe des ordonnées. Ces résultats semblent indiquer un mécanisme de réaction du type "ping-pong".

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. SHIMAZONO, Y. MANO, R. TANAKA ET Y. KAZIRO, *J. Biochem. Tokyo*, 46 (1959) 959.
- 2 C. N. REMY, W. T. REMY ET J. M. BUCHANAN, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 885.
- 3 N. V. THOAI ET L. CHEVILLARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31 (1949) 204.
- 4 F. LEUTHARDT ET H. NIELSEN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1195.
- 5 E. P. STEYN-PARVÉ, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 310.
- 6 Y. KAZIRO, *J. Biochem. Tokyo*, 46 (1959) 1523.
- 7 Y. MANO, *J. Biochem. Tokyo*, 47 (1960) 283.
- 8 L. R. JOHNSON ET C. J. GUBLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 156 (1968) 85.
- 9 C. S. HANES ET F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- 10 E. A. PETERSON ET H. A. SOBER, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 5, Academic Press, New York 1962, p. 3.
- 11 R. WILLSTÄTTER, H. KRAUT ET O. ERBACHER, *Chem. Ber.*, (1925) 2448.
- 12 H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 461.
- 13 H. G. K. WESTENBRINK, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1955, p. 636.
- 14 T. P. SINGER, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 460.
- 15 K. LOHMAN ET P. SCHUSTER, *Naturwissenschaften*, 25 (1937) 26.
- 16 T. OKUYAMA ET K. SATAKE, *J. Biochem. Tokyo*, 47 (1960) 454.
- 17 A. F. S. A. HABEEB, *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 328.
- 18 S. KUBO, S. TOKURA ET Y. TONOMURA, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 2835.
- 19 S. TAKEMORI, K. WADA, K. ANDO, M. HOSOKAWA, I. SEKUZU ET K. OKUNUKI, *J. Biochem. Tokyo*, 52 (1962) 28.
- 20 K. YAGI, M. HARADA ET A. KOTAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 182.
- 21 R. HAYNES, D. T. OSUGA ET R. E. FEENEY, *Biochemistry*, 6 (1967) 541.
- 22 T. SHINODA, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 382.
- 23 A. KOTAKI, M. HARADA ET K. YAGI, *J. Biochem. Tokyo*, 55 (1964) 553.
- 24 R. B. FREEDMAN ET G. K. RADD, *Biochem. J.*, 108 (1968) 383.
- 25 P. J. G. BUTLER, J. I. HARRIS, B. S. HARTLEY ET R. LEBERMAN, *Biochem. J.*, 103 (1967) 78 P.
- 26 B. S. HARTLEY ET V. MASSEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 58.
- 27 I. M. KLOTZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 57.
- 28 W. R. GRAY ET B. S. HARTLEY, *Biochem. J.*, 89 (1963) 59 P.
- 29 M. KASUYA ET H. TAKASHINA, *Biochim. Biophys. Acta*, 99 (1965) 452.
- 30 R. D. HILL ET R. R. LAING, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 188.
- 31 H. HORINISHI, Y. HACHIMORI, K. KURIHARA ET K. SHIBATA, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 477.
- 32 H. HORINISHI, O. TAKENAKA ET K. SHIBATA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 113 (1966) 371.
- 33 M. SOKOLOVSKY ET B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 5 (1966) 3574.
- 34 M. SOKOLOVSKY ET B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 6 (1967) 700.
- 35 I. G. BAK ET R. SATO, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 328.
- 36 A. MÜHLRÁD, G. HEGYI ET G. TÓTH, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 2 (1967) 19.
- 37 W. W. CLELAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 104, 173, 188.
- 38 S. CHA ET R. E. PARKS, JR., *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1968.
- 39 W. RAY, JR. ET G. A. ROSCELLI, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1228.

- 40 T. L. HANSON ET H. J. FROMM, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4133.
- 41 M. HORI ET J. F. HENDERSON, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3404.
- 42 M. L. UHR, F. MARCUS ET J. F. MORRISON, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 5428.
- 43 T. HASHIMOTO ET P. HANDLER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3940.
- 44 K. M. PLOWMAN ET W. W. CLELAND, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4239.
- 45 N. MOURAD ET R. E. PARKS, JR., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19 (1965) 312.
- 46 N. MOURAD ET R. E. PARKS, JR., *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 271.
- 47 N. MOURAD ET R. E. PARKS, JR., *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3838.
- 48 M. G. COLOMB, J. G. LATURAZE ET P. V. VIGNAIS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24 (1966) 909.
- 49 K. BERMAN, N. ITADA ET M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 141 (1967) 214.
- 50 R. A. COOPER ET H. L. KORNBERG, *Biochem. J.*, 105 (1967) 49 C.
- 51 R. A. COOPER ET H. L. KORNBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 141 (1967) 211.
- 52 H. J. EVANS ET H. G. WOOD, *Federation Proc.*, 27 (1968) 588.
- 53 R. L. SWITZER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32 (1968) 320.

*Biochim. Biophys. Acta*, 185 (1969) 111-121