

BBA 66271

## APPLICATION DE LA CONDUCTIMÉTRIE A L'ÉTUDE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

## BUTYRYLCHOLINESTÉRISE

MAXIME HANSS ET ANDRÉ REY\*

*Laboratoire de Biophysique, Unité P.C.E.M. de Bobigny, Rue M. Cachin, 93 Bobigny (France)*

(Reçu le 5 octobre, 1970)

## SUMMARY

*The conductivity method in the study of enzyme reactions. Butyrylcholinesterase*

Enzymatic reactions usually give rise to a conductivity change. By recording this physical property of the reacting medium, it is possible to study the enzyme kinetics. We give the principle of this method; we define the conductivity efficiency of the reaction which measures the sensitivity of the technic. This efficiency coefficient varies with the experimental conditions, particularly when different buffers are used.

The kinetics parameters of acetylcholine hydrolysis by the butyrylcholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8) are easily obtained by the conductivity method; the sensitivity is high. Our results agree with the literature values.

## INTRODUCTION

Ce travail porte sur l'étude conductimétrique de l'activité enzymatique d'une préparation de butyrylcholinestérase (acetylcholine acyl-hydrolase, EC 3.1.1.8). Son but est de rechercher les meilleures conditions expérimentales en vue d'adapter la technique conductimétrique au dosage rapide de l'activité cholinestérasique du sérum.

Dès 1903, HENRI ET DES BANCELS<sup>1</sup> employaient la méthode conductimétrique pour étudier la digestion de la gélatine par la trypsine. Depuis, il est exceptionnel de trouver dans la littérature scientifique des exemples d'application de la conductimétrie en enzymologie. ANDREEV *et al.*<sup>2</sup> ont signalé l'augmentation de conductivité qui accompagne la dégradation enzymatique de l'acétylcholine dans un tampon phosphate. AUGUSTINSSON<sup>3</sup> indique dans une revue générale qu'il est possible de titrer l'activité des cholinestérases par conductimétrie. Il s'agit là d'une erreur, le travail cité<sup>4</sup> porte sur une technique particulière de la méthode acido-basique.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

*(a) Principe de la méthode conductimétrique*

Nous utiliserons les définitions et symboles suivants.  $G$ : conductance ( $\Omega^{-1}$ );

\* Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie et de Toxicologie, Faculté de Pharmacie de Grenoble, 38-La Tronche, France.

$\sigma$ : conductivité spécifique ( $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );  $K$ : constante de cellule ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $K = \sigma/G$ ;  
 $\Lambda$ : conductivité équivalente d'un électrolyte ( $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ );  $\Lambda_0$ : conductivité  
 équivalente limite ( $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ );  $\lambda_0(i)$ : conductivité équivalente limite de l'ion  
 i;  $c$ : concentration ( $\text{équiv} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Nous rappelons la relation:  $\Lambda = 1000 (\sigma/c)$ .

D'une façon générale, toute réaction enzymatique est susceptible d'entraîner  
 une variation de la conductivité du milieu. Mais cette variation ne sera pas néces-  
 sairement proportionnelle au nombre de molécules de substrat transformées, en  
 particulier si les produits de la réaction sont des électrolytes faibles.

Il est toutefois possible de prévoir théoriquement la variation maximale de  
 conductivité en utilisant les conductivités équivalentes limites, qui sont indépen-  
 dantes des concentrations. Nous définirons alors le *rendement conductimétrique théo-  
 rique* de la réaction,  $R_T$ , par la variation:

$$R_T = \frac{\sum_i p_i \lambda_0(P_i) - \sum_i r_i \lambda_0(R_i)}{n} \quad (1)$$

où:  $\lambda_0(P_i)$  et  $\lambda_0(R_i)$  sont les conductivités équivalentes limites des ions de type i  
 existant avant la réaction ( $R_i$ ) et après la réaction ( $P_i$ ).  $p_i$  et  $r_i$  sont les nombres de  
 charges élémentaires des ions de type i avant la réaction ( $r_i$ ) et après la réaction ( $p_i$ )  
 lorsque la réaction stoechiométrique est écrite pour une molécule de substrat.  $n$  est  
 le nombre de liaisons dans une molécule de substrat sur lequel porte la réaction  
 enzymatique.

Les réactions enzymatiques ont lieu généralement dans des conditions de con-  
 centration et de force ionique telles que la définition précédente n'est pas valable;  
 de plus, il pourra exister des réactions secondaires avec le tampon habituellement  
 utilisé. Malgré ces difficultés, la notion de rendement théorique est intéressante car  
 elle permet de prévoir l'ordre de grandeur des variations maximales de conductivité  
 accompagnant une réaction, c'est-à-dire la sensibilité de la méthode. Inversement,  
 la détermination expérimentale de  $R_T$  pourra permettre dans certains cas de préciser  
 un mécanisme réactionnel.

En pratique, et surtout pour les électrolytes faibles, la variation de conductivité  
 dépendra beaucoup des conditions expérimentales (pH, nature du tampon, force  
 ionique, etc...). Elle pourra être supérieure ou inférieure au rendement théorique,  
 positive ou négative. C'est pourquoi il est utile de définir un *rendement conducti-  
 métrique expérimental*,  $R_E$ , qui mesure la sensibilité de la méthode dans des conditions  
 expérimentales données:

$$R_E = \frac{1000}{c \cdot n} \Delta \sigma \quad (\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}) \quad (2)$$

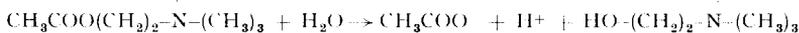
$\Delta \sigma$  est la variation totale de conductivité qui apparaît après la transformation en-  
 zymatique de  $c$  moles/l de substrat. Le facteur 1000 provient du choix des unités de  
 la conductivité (en  $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et de la concentration (molécule-g/l). D'une façon  
 générale,  $R_E$  doit être exprimé en  $\text{équiv}^{-1}$  car l'action enzymatique peut porter sur  
 plus d'une liaison par molécule de substrat. Dans le cas de l'acétylcholine,  $n = 1$  et  
 $R_E$  se rapporte indifféremment à la molécule de substrat ou à l'équivalent enzyma-  
 tique.

Si le rendement est indépendant de  $c$ , nombre de moles de substrat transformées,  
 il sera possible d'enregistrer la réaction par l'intermédiaire de la conductivité. Toute

étude enzymatique par conductimétrie devra donc être précédée d'une étape destinée à vérifier cette indépendance et à délimiter les meilleures conditions expérimentales.

Dans ce travail, nous étudions l'hydrolyse de l'acétylcholine par la butyrylcholinestérase. Que peut-on prévoir des variations de conductivité accompagnant cette réaction?

Le rendement théorique de la réaction:

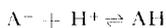


peut s'écrire:

$$R_T = \lambda_0(\text{CH}_3\text{COO}^-) + \lambda_0(\text{H}^+) + \lambda_0(\text{choline}) - \lambda_0(\text{acétylcholine})$$

La conductivité équivalente limite de l'eau est négligeable. La choline et l'acétylcholine sont sous forme de chlorure, donc ionisables; nous admettrons en première approximation que leurs mobilités sont égales.  $R_T$  ne dépendra finalement que de  $\lambda_0(\text{CH}_3\text{COO}^-) + \lambda_0(\text{H}^+)$ . La conductivité équivalente limite de l'acide acétique est connue<sup>5</sup>:  $\lambda_0 = 390.70$ . Lorsqu'une mole de substrat est dégradée dans 1 ml, la conductivité de la solution doit donc en principe augmenter d'environ  $391 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . En fait, cette valeur n'est atteinte qu'à concentration nulle car l'acide acétique est un électrolyte faible. A partir de la loi de dilution d'Ostwald et de la valeur de la constante de dissociation  $K_d$  de l'acide acétique,  $1.75 \cdot 10^{-5}$  M à  $25^\circ$  (réf. 6), il est possible de montrer que le rendement conductimétrique ne sera indépendant de la concentration en acide acétique formé que si celle-ci est très inférieure à  $K_d/4$ . Cette condition n'est pas généralement réalisable et, pour éviter la difficulté liée à la dissociation incomplète de l'acide acétique, il est préférable d'étudier la réaction en milieu alcalin. Le rendement est certes plus faible ( $A = 91 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2$  par équivalent d'acétate de sodium) mais les acétates sont des électrolytes forts.

La cinétique dépendant du pH, il est indispensable de l'étudier dans un milieu tamponné. Mais la nature du tampon utilisé intervient directement dans la variation de conductivité. Ainsi, l'accepteur de protons pourrait être un anion; dans ce cas l'effet tampon résultera de la réaction



Suivant que  $\lambda_0(\text{A}^-)$  est inférieur, égal ou supérieur à  $\lambda_0(\text{CH}_3\text{COO}^-)$ ,  $R_E$  sera positif, nul ou négatif.

L'idéal est d'utiliser comme tampon un accepteur de protons non chargé, par exemple une amine:



Comme  $\lambda_0(\text{R-NH}_2) = 0$ , le bilan final dans ce cas sera:

$$R_T = \lambda_0(\text{R-NH}_3^+) + \lambda_0(\text{CH}_3\text{COO}^-)$$

### (b) Produits utilisés

Butyrylcholinestérase extraite du sérum de cheval, fournie par "Schwarz Biochemical Corp." (lot No. 6701-P); activité spécifique: 4.5 U/mg. Chlorure d'acétylcholine "British Drug Houses", qualité "biochemical". En toute rigueur, il eût été préférable d'utiliser la butyrylcholine, substrat spécifique de l'enzyme étudié. Mais

le rapport de l'affinité de l'enzyme pour ces deux substrats n'est pas très élevé, de l'ordre de 4 en faveur de la butyrylcholine; le rapport des vitesses maximum est de 1.5 (réf. 7). De plus, il est d'usage de doser l'activité cholinestérasique du sérum à l'aide de l'acétylcholine.

Tampons: tampon Tris-HCl 0.06 M (pH 8.0); tampon citrate-NaOH (pH 6.0) (Titrisol Merck); tampon bicarbonate-HCl 0.025 M (pH 8.7). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée dans un appareil en silice.

### (c) Appareillage

La conductance des solutions est enregistrée à l'aide d'un pont de mesure Wayne-Kerr B-221 équipé de l'accessoire A-221 et d'un enregistreur. Nous utilisons une cellule de mesure Metrohm EA 645.7 ( $K = 6.25 \text{ cm}^{-1}$ ; volume utile: 25-30 ml). Elle est entourée d'un manchon à circulation d'eau relié à un thermostat. Les fluctuations thermiques sont inférieures à  $0.01^\circ$ . Les mesures sont effectuées à  $25^\circ$ ; leur précision relative est habituellement meilleure que  $10^{-4}$ .

Il n'est pas possible de contrôler le pH des solutions directement dans la cellule car la diffusion de KCl en provenance de l'électrode au calomel entraîne des erreurs trop importantes. Nous effectuons donc ces vérifications sur des prélèvements de faible volume (100-200  $\mu\text{l}$ ) à l'aide d'une électrode Tacussel ASP/TSP reliée à un pH-mètre Corning Modèle 12.

L'introduction des réactifs dans la cellule se fait au moyen de micropipettes de type Marburg (20 et 100  $\mu\text{l}$ ) et de microseringues Hamilton (0-50  $\mu\text{l}$ ).

### (d) Déroulement des mesures

Les mesures se déroulent habituellement de la façon suivante:

Après avoir introduit dans la cellule 25 ml d'eau, les solutions de tampon (1 ml) et de substrat (de l'ordre de 20-100  $\mu\text{l}$ ) sont ajoutées. La conductance et le pH sont ensuite éventuellement ajustés à la valeur désirée par de faibles volumes des solutions appropriées (KCl, NaOH, HCl). Nous effectuons une correction de volume de façon à rapporter tous les résultats à 26 ml.

Au terme d'une période plus ou moins longue, la conductance se stabilise. Nous entendons par là soit qu'elle reste constante, soit qu'elle varie suffisamment lentement et régulièrement, de sorte que par extrapolation l'on puisse déterminer la variation due à la réaction enzymatique. Introduisons un petit volume  $v$  de la solution d'enzyme. La réaction débute: la conductance augmente d'abord rapidement puis se stabilise progressivement lorsque toutes les molécules de substrat sont transformées. La Fig. 1 montre comment obtenir par extrapolation de la ligne de base l'augmentation totale de conductance  $\Delta G$ .

En réalité  $\Delta G$  est la somme de deux termes:  $\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_R$ ;  $\Delta G_0$  résulte de la conductivité propre de la solution introduite dans la cellule, en l'occurrence la solution d'enzyme.  $\Delta G_R$  est la variation due à la réaction enzymatique. Pour connaître  $\Delta G_R$ , qui représente la quantité intéressante, il faut donc mesurer  $\Delta G_0$  dans une deuxième expérience. A cet effet, une fois la réaction terminée, il suffit d'introduire dans la cellule la même quantité d'enzyme: la variation pratiquement instantanée de conductance alors observée sera  $\Delta G_0$  (au contraire, après introduction d'une petite quantité de substrat, une nouvelle augmentation progressive due à la réaction enzymatique serait apparue). Bien entendu, il est toujours possible de préparer des

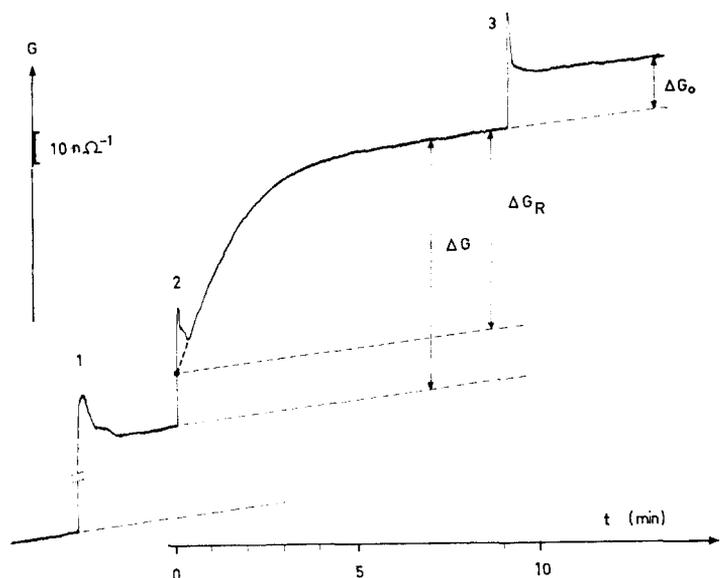


Fig. 1. 1, augmentation instantanée de la conductance d'une solution de Tris après introduction du substrat ( $20 \mu\text{l}$  d'acétylcholine  $1.10^{-1} \text{ M}$ ); 2, introduction de 1 mg de butyrylcholinestérase; 3, deuxième introduction de 1 mg d'enzyme.

solutions iso-conductrices d'enzyme et de substrat, de sorte que la variation observée ne soit due qu'à la transformation du substrat.

(e) *Détermination d'une activité enzymatique*

Soit  $[S]$  la concentration du substrat (en moles/l) dans le volume final  $V$ . Introduisons une certaine quantité d'enzyme  $E$  (en mg). A la fin de la réaction, la conductance aura varié de la quantité:

$$\Delta G_R = \frac{nR_E}{1000 K} [S]$$

Pour une petite quantité  $dS$  de substrat dégradé, la variation de conductivité sera:

$$d\sigma = \frac{nR_E}{1000} dS$$

La vitesse de variation de la conductivité est définie par:

$$\frac{d\sigma}{dt} = K \frac{dG}{dt} = \frac{nR_E}{1000} \frac{dS}{dt} \quad (\text{si } \frac{dR_E}{dt} = 0)$$

Au début de la réaction, et en excès de substrat,  $d\sigma/dt$  est généralement constant (réaction d'ordre zéro). Il faut pour cela que  $R_E$  soit également indépendant de  $t$ , c'est-à-dire de la quantité de substrat dégradé. Dans ces conditions, la mesure de  $dG/dt$  permet de déterminer l'activité enzymatique  $A'$  à l'aide de la formule:

$$A' = \frac{K \cdot V}{R_E} \frac{dG}{dt} \quad (3)$$

Cette relation pratique est valable pour les unités suivantes:  $A'$ : nombre d'unités internationales,  $U$  (quantité d'enzyme qui transforme  $1 \mu\text{equiv}$  de la liaison concernée par la réaction enzymatique, en  $1 \text{ min}$ , celle-ci étant étudiée aux conditions optimales, à  $25^\circ$ );  $(dG/dt)$ :  $\mu\Omega^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K$ :  $\text{cm}^{-1}$ ;  $V$ :  $\text{ml}$ ;  $R_E$ :  $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1}$ . L'activité spécifique  $A$  de la préparation d'enzyme est donnée par  $A = A'/E$ .

RÉSULTATS

(A) Détermination du rendement conductimétrique

Nature du tampon-pH

La valeur de  $R_E$  dépend a priori de nombreux facteurs. La nature du tampon employé pour fixer le pH influe particulièrement (Fig. 2). Ainsi,  $R_E$  passe d'une valeur positive pour le Tris, à une valeur négative pour le bicarbonate ou le citrate.

La Fig. 2 montre également que, pour le même tampon,  $R_E$  varie avec le pH. Dans cette expérience, la cellule est remplie avec: Tris  $1 \text{ ml}$ , eau distillée  $25 \text{ ml}$ . Le

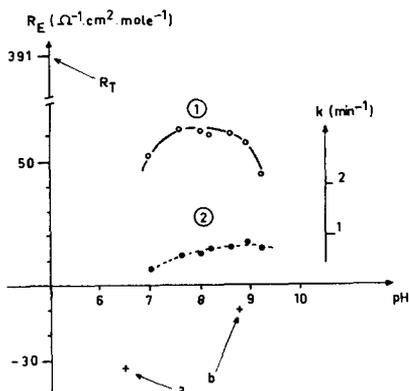


Fig. 2. Variations du rendement conductimétrique (1) et de la constante de vitesse (2) en fonction du pH, en milieu Tris-HCl. Les points a et b représentent les valeurs de rendement obtenues respectivement dans des milieux citrate et bicarbonate.

pH est ensuite ajusté à la valeur désirée par addition de NaOH ou de HCl. On introduit  $20 \mu\text{l}$  d'une solution d'acétylcholine  $0.1 \text{ M}$  (d'où  $[S] = 7.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) puis  $1 \text{ mg}$  d'enzyme (d'où  $[E] = 38 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Les résultats (Fig. 2, Courbe 1) indiquent un optimum de pH approximativement compris entre pH 7.5 et pH 8.5.

Force ionique

Nous faisons varier la force ionique entre  $3 \cdot 10^{-4}$  et  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  en ajoutant des quantités croissantes de KCl à un milieu réactionnel donné (tampon Tris, pH 7.65).  $R_E$  diminue lentement lorsque la force ionique augmente. La variation totale est faible (de l'ordre de 10%) et peut être expliquée par la seule diminution du coefficient d'activité des ions. Tant que la force ionique de différents milieux réactionnels reste du même ordre de grandeur, il sera possible d'en comparer les  $R_E$ , sans effectuer de corrections de force ionique.

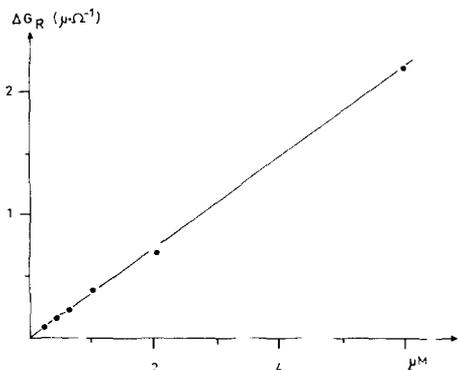


Fig. 3. Augmentation de conductance en fonction de la concentration en substrat.

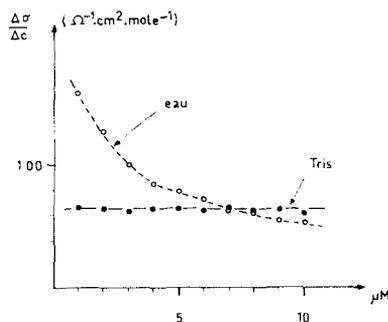


Fig. 4. Introduction de quantités croissantes d'acide acétique dans de l'eau distillée et dans le tampon Tris.

#### *Linéarité—reproductibilité*

Nous avons déterminé  $\Delta G_R$  en introduisant des quantités croissantes de substrat dans la cellule contenant: eau 23 ml, Tris 3 ml, enzyme 1 mg (pH 8.0;  $\sigma = 412 \mu\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Les résultats sont reportés sur la Fig. 3. Ils montrent que  $\Delta G_R$  est bien proportionnel au nombre de molécules de substrat hydrolysées.

La linéarité n'est observée que si le milieu est correctement tamponné. Cette condition est démontrée par l'expérience suivante. Nous pouvons remplacer en première approximation la réaction enzymatique par l'introduction d'acide acétique dans un milieu simple. Lorsque celui-ci est de l'eau distillée, l'augmentation de conductivité n'est pas proportionnelle aux quantités d'acide acétique ajoutées comme le montre la Fig. 4. Au contraire, en présence de Tris,  $\Delta\sigma/\Delta c$  reste constant. En effectuant 10 additions successives, nous avons trouvé une variation de conductivité équivalente de  $61 \pm 1.5 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$ .

Le rendement conductimétrique de la réaction enzymatique a été déterminé à partir de 10 additions successives de la même quantité de substrat ( $[S] = 1.87 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) dans la solution d'enzyme (pH 8.15;  $\sigma = 405 \mu\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Pour obtenir  $\Delta G_R$  à partir de  $\Delta G_0$ , on retranche aux valeurs observées  $\Delta G$  la moyenne  $\Delta G_0$  obtenue après 10 additions successives de substrat dans la même solution de Tris, mais sans enzyme. Nous trouvons  $R_E = 63 \pm 3 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$ .

La comparaison avec la valeur obtenue pour l'acide acétique montre qu'aux erreurs d'expérience près,  $R_E$  résulte principalement de l'apparition d'acide acétique dans le milieu.

#### *(B) Étude cinétique de la réaction*

##### *Mesure de la constante de vitesse*

A partir d'enregistrements semblables à celui de la Fig. 1 et après avoir retranché  $\Delta G_0$  de  $\Delta G$ , il est possible de déterminer l'ordre de la réaction.  $\Delta G_R$  est en effet proportionnel à la concentration initiale du substrat; si nous désignons par  $\Delta G_t$  l'augmentation de conductivité à l'instant  $t$ ,  $\Delta G_R - \Delta G_t$  sera proportionnel à la concentration restante du substrat à l'instant  $t$ . En portant sur un graphique la quantité  $2.3 \log [\Delta G_R / (\Delta G_R - \Delta G_t)]$  en fonction de  $t$ , on obtiendra une droite s'il

s'agit d'une réaction d'ordre 1 (et toujours dans l'hypothèse où les conditions expérimentales sont telles que  $R_E$  reste constant).

La Fig. 5 montre que la cinétique de la réaction est bien d'ordre 1. La pente de la droite obtenue donne la constante de vitesse  $k$  (en  $\text{min}^{-1}$ ).

La constante de vitesse dépend du pH. Nous trouvons par conductimétrie (Fig. 2, courbe 2) qu'il existe un maximum pour des pH compris entre 8.6 et 9.2 ( $[S] = 7.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[E] = 38 \text{ mg/l}$ ). Ce pH optimum est bien entendu indépendant du maximum observé pour  $R_E$  (Fig. 2, courbe 1). A une valeur donnée de pH nous avons fait varier la force ionique jusqu'à 0.015 M en ajoutant des quantités croissantes de KCl:  $k$  reste sensiblement constante.

Il existe dans la littérature de nombreuses valeurs différentes du pH optimum. Alors que LAIDLER<sup>8</sup> et BERGMANN<sup>9</sup> le situent autour de pH 8, HEILBRONN<sup>10</sup>, WILSON<sup>7</sup> et HASE<sup>11</sup> admettent une valeur voisine de 9. Ces divergences peuvent être expliquées

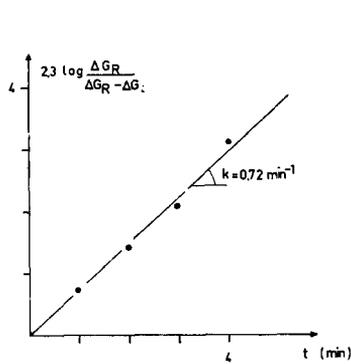


Fig. 5. Détermination de la constante de vitesse de la réaction enzymatique (pH 8.0, tampon Tris;  $E = 1 \text{ mg}$ ;  $[S] = 7.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ).

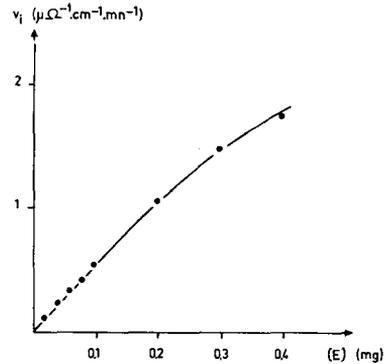


Fig. 6. Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale (pH 7.5, tampon Tris;  $[S] = 3.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ).

par la diversité des conditions expérimentales utilisées. WILSON et HEILBRONN ont également indiqué l'importance de la dénaturation de l'enzyme qui se produit plus facilement en milieu alcalin. Aussi, lorsque les temps d'incubation ou de réaction sont trop longs, l'optimum de pH sera apparemment décalé vers les valeurs acides. D'après WILSON, l'addition de gélatine préviendrait cette dénaturation. Comme nous le signalons plus loin, la stabilité de la préparation enzymatique que nous avons utilisée est excellente, ce qui explique un pH optimum voisin de 9.

*Étude de la vitesse maximum*

Pour une petite quantité d'enzyme (40  $\mu\text{g}$ ), nous avons mesuré la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en substrat,  $[S]$ . Aux concentrations élevées de substrat, les erreurs expérimentales deviennent notables en raison de la conductivité de l'acétylcholine. Il est néanmoins possible d'estimer la concentration optimum, qui est voisine de  $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . A ces concentrations, la cinétique est d'ordre 0 et il est facile de mesurer l'activité spécifique de l'enzyme utilisée.

La Fig. 6 montre que la vitesse initiale  $v_1$  est bien proportionnelle à la concen-

tration d'enzyme. Ceci justifie la mesure de l'activité d'un échantillon inconnu en déterminant le taux de variation conductimétrique  $d\sigma/dt$ . Nous avons trouvé ainsi  $A/E = 4.6$  U/mg, le fournisseur indique une valeur très proche de 4.5 U/mg.

WILSON<sup>7</sup> avait signalé une perte progressive de l'activité enzymatique en solution, effet supprimé par l'addition de gélatine. Ce point a été examiné dans les conditions suivantes: eau 25 ml, Tris 3 ml, acétylcholine  $1 \cdot 10^{-1}$  M 1 ml, butyrylcholinestérase 20  $\mu$ g, pH 8.0. Les variations de conductance sont enregistrées pendant 1 h:

$t$ (min):	5	10	20	30	40	50	60
$\Delta G/\Delta t$ ( $n\Omega^{-1}/\text{min}$ )	45	45	44.5	44.5	43.5	42.5	41.5

Il ressort de ces résultats que la vitesse de réaction est constante pendant au moins 0.5 h, ce qui indique une absence de dénaturation importante de l'enzyme. En ajoutant de la gélatine nous n'avons pas amélioré la stabilité de la réaction mais au contraire diminué la qualité de l'enregistrement.

#### *Étude de la constante de Michaelis*

Il est admis, en général implicitement, que la réaction enzymatique obéit à la loi de Henri-Michaelis-Menten. A l'aide d'un diagramme de Lineweaver et Burk par exemple, il sera possible de déterminer la constante de Michaelis  $K_m$  (Fig. 7). Nous trouvons des valeurs comprises entre 1 et  $3 \cdot 10^{-4}$  M.

Les valeurs de la littérature sont souvent plus élevées. WILSON<sup>7</sup>, ainsi trouve:  $K_m = 1.1 \cdot 10^{-2}$  M. Ces divergences proviennent de conditions expérimentales différentes. Comme pour les autres enzymes,  $K_m$  dépend du pH. HASE<sup>11</sup> a obtenu les résultats suivants:

pH	$K_m \times 10^4$ (M)
7	4
7.5	1.6
8	1.1

$K_m$  dépend aussi beaucoup de la force ionique. GREGOIRE *et al.*<sup>12,13</sup> ont ainsi montré que l'affinité de la cholinestérase sérique pour l'acétylcholine diminuait par addition de KCl:

KCl (M)	$K_m \times 10^4$ (M)
0	3.6
0.033	6.3
0.066	9.2
0.132	14
0.264	19

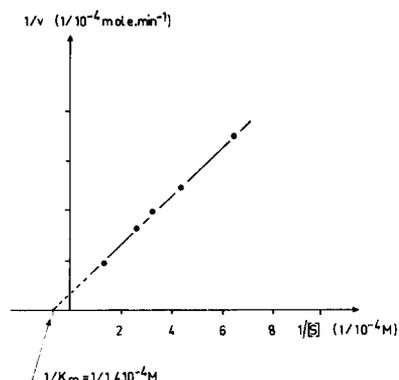


Fig. 7. Diagramme de Lineweaver-Burk (pH 8.0, tampon Tris;  $E = 1$  mg).

Compte-tenu des variations de pH et de force ionique, les valeurs de la constante de Michaelis obtenues par conductimétrie sont donc en bon accord avec celles de la littérature.

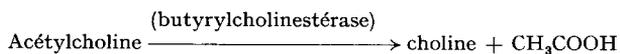
#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons recherché dans quelles conditions il était possible d'appliquer la méthode conductimétrique à l'étude de l'activité enzymatique de la butyrylcholinestérase.

Le choix des conditions expérimentales est très important; ainsi, suivant la nature du tampon utilisé, la réaction s'accompagnera d'une diminution (citrate, bicarbonate) ou d'une augmentation (Tris) de la conductivité.

Dans le tampon Tris-HCl, le rendement conductimétrique expérimental est de  $63 \pm 3 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ . Il reste constant au cours de la réaction; de plus il est indépendant de la concentration de substrat. Il diminue légèrement lorsque la force ionique augmente. En fonction du pH, il passe par un maximum situé autour de pH 8.

L'augmentation de conductivité en milieu alcalin est due aux réactions:



En effet, lorsqu'on ajoute de l'acide acétique à une solution de Tris, l'augmentation de conductivité rapportée à une mole d'acide est de  $61 \pm 1.5 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$ . Aux erreurs expérimentales près, cette valeur est identique au rendement conductimétrique de la réaction. Connaissant la conductivité équivalente limite de  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  ( $40.8 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ ), on déduit celle de  $\text{Tris-H}^+$ :  $20.2 \pm 1.5 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ . Par ailleurs, nous avons mesuré directement  $\lambda_0(\text{Tris-H}^+)$  et obtenu  $21.5 \pm 1 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$ . L'accord est donc satisfaisant et renforce l'hypothèse du schéma réactionnel précédent.

L'étude cinétique de la réaction peut être également entreprise par conducti-

métrie. Tous nos résultats sont interprétables à l'aide de la théorie de Henri-Michaelis-Menten. La constante de Michaelis, voisine de  $2 \cdot 10^{-4}$  M, est inférieure à certaines valeurs de la littérature; ceci peut être expliqué par la faible force ionique des solutions que nous avons étudiées.

Le principal inconvénient de la méthode conductimétrique est de ne pouvoir être utilisée à force ionique élevée (supérieure à  $1 \cdot 10^{-2}$  M très schématiquement). Lorsque le milieu est trop conducteur, l'influence des fluctuations thermiques et de la polarisation des électrodes se fait beaucoup sentir et il n'est plus possible de maintenir la précision nécessaire pour effectuer des dosages enzymatiques.

Cet inconvénient est compensé par la très grande sensibilité de la méthode à faible force ionique. Les réactions enzymatiques sont généralement étudiées à force ionique élevée. La principale raison de cette pratique résulte de l'emploi de tampons relativement concentrés. En effet, si la méthode adoptée pour étudier la réaction enzymatique n'est pas très sensible, la quantité de substrat transformée devra être assez élevée, d'où risque de variation du pH si le milieu n'est pas suffisamment tamponné. Dans ce cas, il sera impossible d'étudier la réaction à force ionique faible. Or, les résultats que nous avons présentés montrent que l'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente lorsque la force ionique diminue. Cet exemple fait apparaître l'intérêt des faibles forces ioniques pour l'étude de la réaction enzymatique. Dans le domaine des applications pratiques, il sera aussi possible d'atteindre la vitesse maximum de la réaction avec de plus faibles concentrations de substrat.

La méthode conductimétrique présente également la qualité fondamentale de ne pas être perturbée par la coloration des solutions et par la présence de précipités ou d'aggrégats en suspension.

Pour ces raisons nous pensons que la méthode présentée est susceptible d'applications non seulement en enzymologie fondamentale, mais aussi en biologie clinique. Une étude en cours a d'ores et déjà permis de montrer<sup>14-16</sup> que le dosage de l'activité cholinestérasique du sérum par cette nouvelle méthode était aussi précis, sensible et commode que par les techniques habituelles.

## RÉSUMÉ

Les réactions enzymatiques s'accompagnent généralement d'une variation de la conductivité électrique du milieu. L'enregistrement de ce paramètre physique permet d'étudier la cinétique enzymatique. Nous donnons le principe de cette méthode; en particulier, nous définissons la notion de rendement conductimétrique de la réaction; elle mesure la sensibilité de la technique. Ce rendement dépend beaucoup des conditions expérimentales, principalement de la nature du tampon.

L'étude cinétique de la dégradation de l'acétylcholine par la butyrylcholinestérase (acylcholine acyl-hydrolase, EC 3.1.1.8) peut ainsi être effectuée très facilement et avec une grande sensibilité. Les résultats obtenus sont en bon accord avec les données de la littérature.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 V. HENRI ET L. DES BANCELS, *Compt. Rend. Biol.*, IV (1903) 563.
- 2 U. S. ANDREEV, V. I. ROSENHART ET T. A. TORUVAROV, *Ukr. Biokhim. Zh.*, 37 (1965) 920.

- 3 K. B. AUGUSTINSSON, in G. B. KOELLE, *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer, Berlin, 1963, p. 112.
- 4 Brevet néerlandais No. 73307, le 15 septembre, 1953.
- 5 R. A. ROBINSON ET R. H. STOKES, *Electrolyte Solutions*, Butterworths, London, 2ème ed., 1959, p. 463.
- 6 R. A. ROBINSON ET R. H. STOKES, *Electrolyte Solutions*, Butterworths, London, 2ème ed., 1959, p. 339.
- 7 I. B. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 123.
- 8 K. J. LAIDLER, *Trans. Faraday. Soc.*, 51 (1955) 550.
- 9 F. BERGMANN, *Disc. Faraday. Soc.*, 20 (1955) 126.
- 10 E. HEILBRONN, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 1255.
- 11 E. HASE, *J. Biochem. Tokyo*, 39 (1952) 259.
- 12 J. GREGOIRE, J. GREGOIRE ET N. LIMOZIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37 (1955) 81.
- 13 J. GREGOIRE, N. LIMOZIN ET J. GREGOIRE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 147.
- 14 M. HANSS ET A. REY, communication au 2ème Congr. Franç. d'Electronique méd. et de Génie biol., Nancy, 1969.
- 15 A. REY, Thèse Pharmacie, Grenoble, 1970.
- 16 A. REY ET M. HANSS, *Clin. Chim. Acta*, 30 (1970) 207.

*Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 618-629