

BBA 66272

APPLICATION DE LA CONDUCTIMÉTRIE A L'ÉTUDE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

SYSTEME URÉE - URÉASE

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. The urea-urease system

The conductivity of an urea solution changes when this substrate undergoes enzymatic hydrolysis. The experimental conditions under which these variations can be used for kinetics studies are examined.

Linearity and sensitivity are very pH- and buffer-dependent. The conductivity efficiency is higher in a citrate buffer ($112 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1}$) than in a Tris buffer ($78 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1}$).

The sensitivity of this method is high. It has thus easily been possible to record the enzymatic hydrolysis of a few nmoles of urea. Our kinetic parameters are identical to the published values.

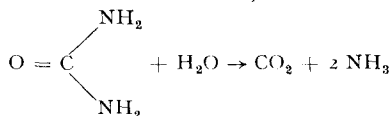
It is not yet possible to demonstrate the exact origin of the observed conductance rise. We think that the quantitative explanation of this variation may yield informations about the reaction mechanism.

INTRODUCTION

La méthode conductimétrique a été utilisée par quelques auteurs à l'étude du système urée-uréase (urée amidohydrolase, EC 3.5.1.5)¹⁻⁴ d'un emploi exceptionnel en enzymologie; ces travaux sont toutefois restés fragmentaires. Nous nous proposons ici d'étudier plus en détail les possibilités et les limites du procédé conductimétrique.

Le principe général de la méthode a déjà été décrit dans un travail précédent⁵ auquel nous renvoyons le lecteur.

Dans le cas de l'urée, la réaction globale d'hydrolyse s'écrit:



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

CO_2 et NH_3 s'hydratent pour former H_2CO_3 et NH_4OH , lesquels se dissocient plus ou moins complètement suivant le pH du milieu; il en résulte alors une augmentation de conductivité.

La réaction précédente est probablement simplifiée. Différents auteurs ont montré que la réaction enzymatique entraînait la formation de carbamate⁶⁻⁸. Selon RUBIN⁹ l'uréase n'hydrolyse qu'une liaison amide. Mais le carbamate intermédiaire ainsi formé est instable en milieu acide ou neutre et se décompose en CO_2 et NH_3 (ref. 8). Quel que soit le mécanisme de la réaction, il convient de tenir compte de deux valences par molécule d'urée dégradée.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Produits utilisés

Uréase "Sigma" Type IV titrant 2000-4000 unités Sigma/g suivant les lots utilisés.

Urée "Merck" (qualité "pour usage biochimiques"). Solution stock à 2 g/l conservée à 4°.

Tampons (solutions stock):

tampons citrate-HCl (pH 4.00) (Titrisol Merck); tampons citrate-NaOH (pH 6.00) (Titrisol Merck); tampon Tris-HCl environ 0.1 M (pH 7.5-9.0).

Appareillage

Celui-ci, déjà décrit dans un article antérieur⁵, a été utilisé sans modification sauf pour l'enregistrement de la Fig. 8, obtenu avec une cellule à agitation rapide en cours de développement.

L'activité d'une préparation uréasique est déterminée suivant le protocole antérieurement décrit pour le système acétylcholine-butrylcholestérase⁵. Par contre, le rendement conductimétrique expérimental de la réaction d'hydrolyse de l'urée est évalué selon un protocole simplifié. L'addition d'une solution d'urée dans une solution tampon contenant l'uréase entraîne une variation de conductance ΔG , alors que la variation ΔG_0 correspond à l'introduction d'un même volume d'eau. Dans ces conditions, la variation de conductance liée à la réaction enzymatique sera:

$$\Delta G_R = \Delta G - \Delta G_0$$

RÉSULTATS

(A) Détermination du rendement conductimétrique

Nature de tampon—pH

Le choix du tampon est important car il peut modifier l'activité de l'enzyme. Nous avons évité le tampon phosphate qui est connu comme ayant une réaction inhibitrice complexe sur l'uréase^{4,10}. Le tampon borate a également été éliminé pour son effet inhibiteur¹¹.

Suivant la gamme de pH explorée, deux tampons différents ont été adoptés: tampon citrate-NaOH en milieu acide et tampon Tris-HCl en milieu basique. L'étude en fonction de la concentration montre que le citrate ne présente pas d'effet spécifique sur la cinétique. Il est connu par ailleurs que le Tris n'a pas d'action inhibitrice¹².

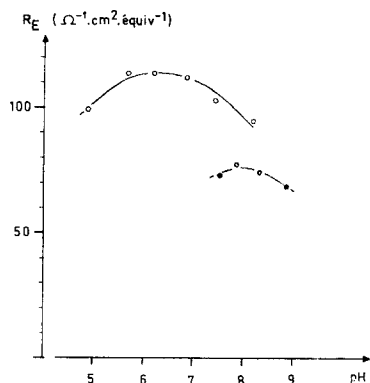


Fig. 1. Variation du rendement conductimétrique avec le pH. ●—●, tampon Tris; ○—○, tampon citrate.

Les résultats obtenus avec ces deux tampons sont reportés sur la Fig. 1.

Le maximum observé du rendement conductimétrique R_E en fonction du pH diffère suivant la nature du tampon: il est à pH environ 8 pour le Tris et à pH environ 6 pour le citrate. Par ailleurs, avec ce dernier R_E est plus important.

Force ionique

L'influence de la force ionique sur R_E , étudiée pour deux valeurs de pH (6.5 et 7.0), est pratiquement nulle dans les conditions suivantes: tampon citrate, concentration d'uréase 660 mg · l⁻¹, concentration d'urée 6.66 M.

Quantité d'enzyme

A pH est à force ionique constante (pH 7.0; $\sigma = 310 \mu\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) R_E diminue légèrement (<7%) lorsque la quantité d'enzyme varie de 66 à 660 mg/l⁻¹.

Cette diminution pourrait être expliquée par la formation de carbamates avec la protéine; mais elle reste faible, du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales et nous négligerons ce phénomène.

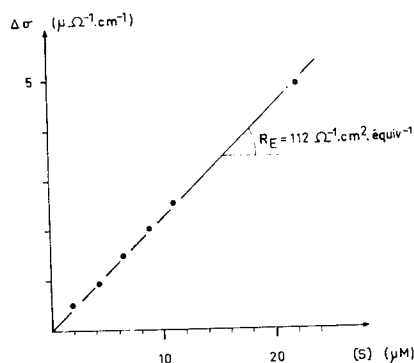


Fig. 2. Augmentation de conductivité apparaissant lors de la dégradation de quantités croissantes d'urée(tampon citrate, pH 7.0; 25°). La pente de la droite obtenue permet de calculer R_E .

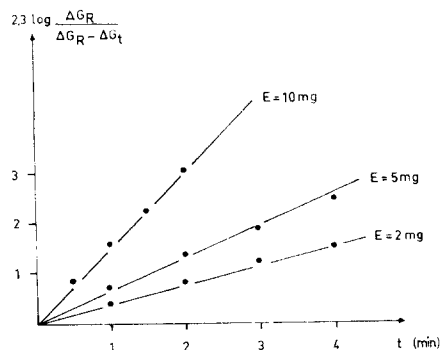


Fig. 3. Vérification de la loi cinétique du premier ordre (tampon citrate, pH 7.0; σ environ $310 \mu\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $[S] = 2.2 \mu\text{M}$) pour différentes quantités d'uréase.

Quantité de substrat—linéarité

Comme l'indique la Fig. 2, l'augmentation de conductivité est bien proportionnelle à la quantité de substrat dégradée en milieu citrate (concentration du tampon comprise entre $1 \cdot 10^{-3}$ et $3 \cdot 10^{-3}$ M). Dans les conditions optimales de pH nous trouvons:

$$R_E = 112 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1} \quad (\text{citrate})$$

La linéarité a été observée jusqu'à la concentration d'urée de $22.2 \mu\text{M}$. Au delà, le pH commence à varier.

Le domaine linéaire est plus important lorsque le milieu est tamponné par le Tris. Ainsi, avec le tampon Tris-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M ajusté à pH 7.65, le pH atteindra 8.2 après la dégradation complète de $1.4 \cdot 10^{-3}$ M. Toutefois, R_E varie très peu de pH 7.65 à pH 8.20. Il restera donc indépendant de la concentration de substrat jusqu'à 1 à $2 \cdot 10^{-3}$ M approximativement pour la concentration de tampon $5 \cdot 10^{-3}$ M. C'est effectivement ce que nous avons constaté. Nous adopterons pour R_E la valeur suivante, obtenue dans le Tris à pH 8.1:

$$R_E = 78 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1} \quad (\text{Tris})$$

Quel que soit le tampon, en augmentant sa concentration il est évidemment possible d'étudier l'hydrolyse de plus grandes quantités de substrat. Mais la conductivité globale de la solution augmente, la précision et la sensibilité des mesures diminuent. Il faut également noter que le domaine linéaire est défini par rapport à la quantité de substrat dégradé et non à la concentration initiale. Il est en fait possible d'étudier la cinétique en présence de concentrations élevées de substrat, tant que la réaction n'aura pas suffisamment progressé pour dépasser le domaine linéaire.

*(B) Etude de la cinétique enzymatique**Ordre de la réaction*

Dans nos conditions expérimentales (excès d'enzyme et domaine linéaire pour R_E), la variation de $2.3 \log [\Delta G_R / (\Delta G_R - \Delta G_t)]$ en fonction de t est linéaire (Fig. 3); il est alors possible de déduire la constante k . Connaissant k , il sera facile de calculer la vitesse initiale, v_i , à l'aide de la relation: $v_i = k [S]$, où $[S]$ est la concentration initiale en substrat. Ces paramètres cinétiques sont indépendants de R_E .

pH optimum

La constante de vitesse a été étudiée en fonction du pH en milieu citrate par addition progressive de NaOH. En zone alcaline, l'effet tampon du citrate est en principe nul; il existe toutefois un certain effet tampon résiduel que nous attribuons à la protéine enzymatique. En mesurant le pH au début et à la fin de la réaction, nous avons constaté que les écarts sont inférieurs à 0.1 unité pH. Tous les essais ont été effectués avec 20 mg ($660 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) d'uréase et $0.2 \mu\text{mole}$ ($6.6 \mu\text{M}$) d'urée. Nous avons à chaque fois vérifié que la réaction se déroulait dans un domaine linéaire et qu'elle était bien du premier ordre. La Fig. 4 résume les résultats obtenus. Elle indique un optimum de pH voisin de pH 7.2. De part et d'autre, la constante de vitesse diminue rapidement. En dessous de pH 6, l'enzyme devient partiellement insoluble.

Cet optimum de pH est indépendant du maximum de R_E en fonction du pH.

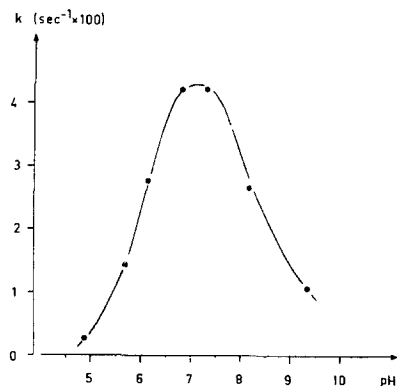


Fig. 4. Variation de la constante de vitesse en fonction du pH (tampon citrate; $[S] = 6.6 \mu\text{M}$; $E = 20 \text{ mg}$).

Force ionique

Nous avons étudié l'influence de la force ionique sur k à deux valeurs de pH, en augmentant la concentration du tampon citrate-NaOH. Le pH est maintenu à la valeur désirée en ajoutant de petites quantités de NaOH ou HCl. Nous remplaçons l'étude de la force ionique par celle de la conductivité globale des solutions.

La Fig. 5 indique que k diminue régulièrement lorsque la force ionique augmente à pH 7. Au contraire, elle reste constante à pH 6.5. Comme nous venons de constater que le pH optimum enzymatique se situe en milieu très faiblement alcalin, il est déjà possible de conclure qu'il dépend en toute rigueur de la force ionique.

Vitesse maximale—constante de Michaelis

La vitesse initiale de la réaction a été étudiée en fonction de la concentration en substrat ($3 \cdot 10^{-4} \text{ M} \leq [S] \leq 3 \cdot 10^{-1} \text{ M}$). Les conditions expérimentales étaient les

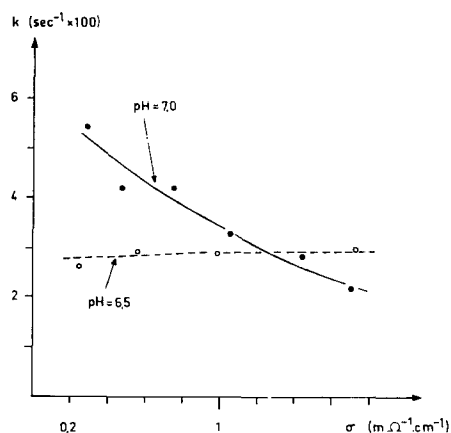


Fig. 5. Influence de la force ionique sur la constante de vitesse (mesures faites en tampon citrate, à 2 valeurs différentes de pH; $[S] = 6.66 \mu\text{M}$; $E = 2 \text{ mg}$).

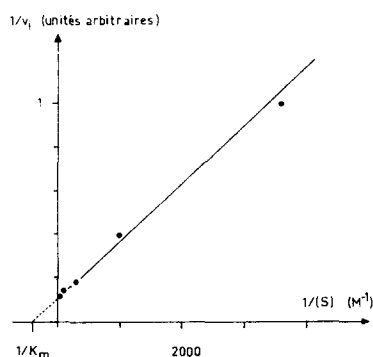


Fig. 6. Détermination de la constante de Michaelis.

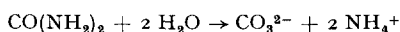
suivantes: pH 6.4; tampon citrate-NaOH $4.5 \cdot 10^{-3}$ M; uréase 20 μ g. La vitesse maximale est obtenue dans ces conditions pour $[S] \geq 3 \cdot 10^{-2}$ M et reste constante même pour les plus grandes concentrations d'urée.

La constante de Michaelis a été déterminée à l'aide d'un diagramme de Lineweaver et Burk (Fig. 6). Nous avons trouvé $K_m = 2.5 \cdot 10^{-3}$ M à pH 6.5, tampon citrate. L'équation de Michaelis est vérifiée pour toutes les concentrations de substrat étudiées (jusqu'à $3 \cdot 10^{-1}$ M).

En présence d'un excès de substrat ($[S] = 3 \cdot 10^{-2}$ M), la vitesse initiale est proportionnelle à la quantité d'enzyme. De plus, la réaction reste d'ordre 0 pendant au moins 15 min. Ces résultats justifient l'emploi de la méthode conductimétrique à la détermination des activités spécifiques de préparation uréasiques.

DISCUSSION

Admettons une hydrolyse complète de l'urée suivant la réaction globale simplifiée:



Il serait possible de calculer le rendement conductimétrique R_T à partir des valeurs connues de la conductivité équivalente limite des ions:

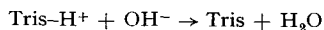
$$\lambda_0(\text{NH}_4^+) = 73.5 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1} \quad (25^\circ)$$

$$\lambda_0(\text{CO}_3^{2-}) = 69.3 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1} \quad (25^\circ)$$

Sachant qu'en première approximation $\Lambda_0(\text{urée}) = \Lambda_0(\text{eau}) = 0$, l'application de la Formule 1 (ref. 5) donnera:

$$R_T = 142.8 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1}$$

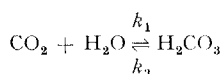
Cette valeur est différente du rendement conductimétrique expérimental ($R_E = 113$ et $78 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{equiv}^{-1}$ pour le tampon citrate et le tampon Tris respectivement). La première explication de cette divergence consiste à tenir compte du fait que les électrolytes libérées par la réaction enzymatique sont des électrolytes faibles. Connaissant les constantes de dissociation de l'acide carbonique ($K_1 = 4.3 \cdot 10^{-7}$ M; $K_2 = 5.6 \cdot 10^{-11}$ M) et de l'ammoniaque ($K = 1.7 \cdot 10^{-5}$ M), il est possible de calculer les variations de R_E avec le pH¹⁴. L'ordre de grandeur des valeurs ainsi obtenues est compatible avec les données expérimentales. Cette explication est cependant insuffisante. Il faut également faire intervenir les réactions secondaires avec le tampon. Ainsi, en l'absence de tampons, la réaction alcalinise rapidement le milieu, dont le pH se fixe alors au voisinage de 9 (ref. 15). En milieu tamponné avec le tris, la réaction suivante a lieu



Elle indique une diminution de R_E en présence de tampon Tris. Connaissant le pH du milieu et $\lambda_0(\text{Tris-H}^+)$, il serait alors théoriquement possible de prévoir la variation de conductivité. Mais d'autres phénomènes peuvent intervenir qui rendent ce calcul illusoire. Le principal provient du mécanisme même de la réaction. Ainsi, suivant que l'on admet ou non la formation d'un carbamate comme produit de la réaction⁹, le

calcul de R_E sera modifié. De plus, l'hydratation de CO_2 n'est en principe ni complète ni instantanée.

Pour la réaction :



EDSALL ET WYMAN¹⁶ rapportent la valeur suivante :

$$[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{CO}_2] = 0.00258 \text{ à } 25^\circ$$

Autrement dit, plus de 99% du CO_2 se trouve sous forme non hydratée, laquelle ne participe pas à la conductivité électrique du milieu. Par ailleurs, la constante de vitesse k_1 est de l'ordre de 0.03 sec^{-1} à 25° (ref. 16), c'est à dire comparable à la constante de vitesse de la réaction enzymatique. La cinétique observée par conductimétrie devrait donc être complexe si l'apport de l'acide carbonique à la conductivité totale était significatif et si la réaction d'hydratation était simple. Or l'expérience montre que, dans toutes les conditions, la cinétique déterminée par conductimétrie est du premier ordre et que la constante de vitesse est proportionnelle à la quantité d'urée, ce qui n'est pas compatible avec la conclusion précédente. Il serait possible de lever cette difficulté en admettant que, dans nos conditions expérimentales, il existerait un catalyseur de la réaction d'hydratation. Mais, en l'état actuel de nos recherches, il n'est pas possible d'affirmer cette hypothèse.

Quoi qu'il en soit, nous voyons ainsi que la méthode conductimétrique permet de mettre en évidence un problème qui ne pouvait pas être décelé à l'examen des résultats obtenue avec les techniques habituelles, toutes basées sur le dosage de l'ammoniac. Des études complémentaires permettront peut-être de donner une interprétation quantitative de R_E et par là d'apporter des éléments nouveaux sur le mécanisme intime de la réaction enzymatique.

Ainsi que l'avaient déjà observé KISTIAKOWSKY *et al.*⁴, la diminution de la constante de vitesse lorsque la concentration des électrolytes augmente n'apparaît que pour $\text{pH} \geq 7$. Ce facteur modifie la valeur de l'optimum enzymatique du pH, il dépend en effet de la force ionique en milieu alcalin. Nous avons obtenu un pH optimum de 7.2 (tampon citrate). LYNN¹⁷ le situe à pH 6.5 dans un tampon maléate 0.3 M et entre pH 7.0 et pH 8.0 pour un tampon Tris 0.3 M.

L'inhibition progressive de la réaction à pH 7.0 obtenue en augmentant la concentration du tampon citrate pourrait être interprétée comme un effet spécifique de l'anion citrate. Nous pensons que la principale raison est un simple effet de sel comme l'admettent KISTIAKOWSKI *et al.*⁴ pour de nombreux autres électrolytes.

Certains auteurs^{15,16}, trouvant qu'au delà de 0.1 M environ la vitesse de réaction diminuait lorsque $[S]$ augmentait, ont admis que la cinétique de l'urée n'obéissait pas à la loi de Michaelis-Menten pour des concentrations élevées d'urée. Ils postulèrent plusieurs explications à ce phénomène (présence de deux sites indépendants avec constantes de Michaelis différentes, ou bien deux sites voisins identiques avec interactions). Nous n'avons pas retrouvé ces anomalies. Dans nos conditions expérimentales (tampons citrate $4.5 \cdot 10^{-3}$ M; pH 6.5) l'urée utilisée entraîne une hydrolyse de substrat dont la cinétique suit la loi de Michaelis-Menten pour des concentrations d'urée allant de $3 \cdot 10^{-3}$ à $3 \cdot 10^{-1}$ M. La constante de Michaelis ($K_m =$

$2.5 \cdot 10^{-3}$ M) est accord avec celles trouvées dans la littérature: entre 2 et $3 \cdot 10^{-3}$ M pour HARMON ET NIEMAN²⁰; entre 2 et $7 \cdot 10^{-3}$ M pour LYNN¹⁷ et LYNN ET YANWICK^{21,22}, suivant le pH et la nature du tampon.

Nous avons précédemment souligné les qualités et les limites de la méthode conductimétrique⁵. Dans le cas particulier du système urée-uréase, après avoir indiqué son apport original dans la discussion du mécanisme réactionnel, il convient d'insister sur sa sensibilité, qui apparaît sur l'enregistrement de la Fig. 7. Nous avons utilisé cette sensibilité pour mettre au point un microdosage de l'urée sanguine^{14,23,24}: la concentration d'urée est ainsi mesurée en moins de 4 min sur 20 μ l de plasma; les

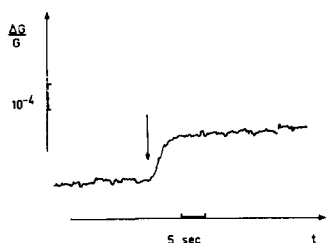


Fig. 7. Seuil de détection conductimétrique de la réaction enzymatique. 2 nmoles d'urée sont ajoutées (\downarrow) à une solution d'uréase (la conductivité de la solution d'urée est préalablement ajustée à celle de la solution d'enzyme, de sorte qu'en l'absence de réaction aucune variation de conductance ne serait observée).

premiers résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par les techniques colorimétriques classiques. Un autre avantage sur celles-ci est de pouvoir doser directement l'urée sur une gamme très étendue de concentration.

RÉSUMÉ

Nous étudions dans quelles conditions la variation de conductivité qui accompagne l'hydrolyse de l'urée par l'uréase peut être utilisée pour enregistrer la réaction enzymatique.

La linéarité et la sensibilité de la méthode dépendent beaucoup du pH et de la nature du tampon. Le rendement conductimétrique est plus élevé dans un tampon citrate ($112 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$) que dans un tampon Tris ($78 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{équiv}^{-1}$).

La sensibilité de cette méthode est grande. Il est ainsi possible d'enregistrer très commodément l'hydrolyse enzymatique de quantités d'urée aussi faibles que quelques nanomoles. Les paramètres cinétiques sont en bon accord avec les valeurs déjà publiées.

Dans l'état actuel de nos recherches, il n'est pas encore possible d'affirmer la cause exacte de l'augmentation de conductivité observée. Nous pensons que de nouveaux renseignements sur le mécanisme de la réaction pourront être apportés par l'étude quantitative de ces variations.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. OEHME, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 620.
- 2 W. CHIN ET W. KROONTJE, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1757.
- 3 P. BOURELLY ET V. BOURELLY-DURAND, *J. Chim. Phys.*, 65 (1965) 673.

- 4 G. B. KISTIAKOWSKY, P. C. MANGELSDORF, JR., A. J. ROSENBERG ET H. R. WILLIAM, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5015.
- 5 M. HANSS ET A. REY, *Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 618.
- 6 J. B. SUMNER, dans J. B. SUMNER ET K. MYRBACK, *The Enzymes*, Academic Press, New-York, 1951, p. 886.
- 7 J. H. WANG ET D. A. TARR, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1955) 2160.
- 8 G. GORIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 268.
- 9 M. RUBIN, *Progress in Clinico-Chemical Methods*, Vol. 3, Karger, New York, 1968, p. 6.
- 10 G. D. FASMAN ET C. NIEMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1646.
- 11 R. PERLES ET J. E. COURTOIS, dans P. BOULANGER ET J. POLONOVSKI, *Traité de Biochimie Générale*, Masson, Paris, 1964, (2ème rédaction), p. 439.
- 12 M. C. WALL ET K. J. LAIDLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 43 (1953) 299.
- 13 R. A. ROBINSON ET R. H. STOKES, *Electrolyte Solutions*, Butterworths, London, 1965, p. 463.
- 14 A. REY, Thèse Pharmacie, Grenoble, 1970.
- 15 G. B. KISTIAKOWSKY ET W. H. R. SHAW, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2751.
- 16 J. T. EDSALL ET J. WYMAN, *Biophysical Chemistry*, Vol. I, Academic Press, New-York, 1958, p. 550 et suivantes.
- 17 K. R. LYNN, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 205.
- 18 G. B. KISTIAKOWSKY ET A. J. ROSENBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5020.
- 19 K. J. LAIDLER ET J. P. HOARE, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 2699.
- 20 K. M. HARMON ET C. NIEMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 177 (1949) 601.
- 21 K. R. LYNN ET P. E. YANKWICK, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 512.
- 22 K. R. LYNN ET P. E. YANKWICK, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 333.
- 23 M. HANSS ET A. REY, communication au 2ème Congr. Franç. d'Electronique Méd. et de Génie Biol., Nancy, 1969.
- 24 A. REY ET M. HANSS, à paraître prochainement.

Biochim. Biophys. Acta, 227 (1971) 630-638