

BBA 66503

ETUDE DU CENTRE ACTIF DE L'HOMOSERINE DEHYDRATASE  
DU FOIE DE RAT

DANIELLE DEME ET FERNANDE CHATAGNER

*Laboratoire de Chimie biologique, 96 Boulevard Raspail, Paris, 6 (France)*

(Reçu le 2 août, 1971)

## SUMMARY

*Studies of the active center of rat liver homoserine dehydratase*

Kinetic studies of the desulphydratation of L-homocysteine by purified rat liver homoserine dehydratase (L-homoserine hydro-lyase (deaminating), EC 4.2.1.15, formerly known as cystathionase) were performed in the presence of L-cysteine or L-homoserine. L-Homoserine competitively inhibits the desulphydratation of L-homocysteine and does not alter the desulphydratation of L-cysteine when this substrate is used at saturating concentration. When L-homocysteine and L-cysteine were both present in the mixture, the production of  $H_2S$  was larger than the production observed when only one of the substrates was employed, although it remained less than the expected sum resulting from the unmodified degradation of both substrates.

On the other hand, D-cysteine competitively inhibits the desulphydratation of L-cysteine and noncompetitively inhibits the desulphydratation of L-homocysteine. When D-cysteine and L-homoserine were present in the mixture, an inhibition of the deamination of L-homoserine was observed, as well as a production of D-allocystathionine. D-Homoserine and D-homocysteine are without effect on the reactions catalyzed by homoserine dehydratase.

In addition, the effect of L-cysteine, L-serine, L-alanine, L-methionine and S-methyl-L-cysteine on the enzyme catalyzed reactions were determined.

The results are in keeping with the hypothesis that the active center of homoserine dehydratase is "double", *i.e.* constituted of two sites, one involved in the binding of L-homoserine and of L-homocysteine to the protein, the other involved in the binding of L-cysteine. Some properties of this center are described.

## INTRODUCTION

L'homosérine déhydratase du foie de rat (L-homoserine hydro-lyase, EC 4.2.1.15) est un enzyme à phosphate de pyridoxal (PLP) qui catalyse la dégradation de nombreux substrats<sup>1-9</sup>. Parmi ceux-ci, certains, que nous appellerons substrats "simples" possèdent une seule fonction aminoacide, une fonction hydroxyle ou thiol

Abréviation: PLP, 5'-phosphate de pyridoxal.

et trois ou quatre atomes de carbone, alors que d'autres, les substrats "doubles", ont deux fonctions aminoacides et une fonction thioéther ou disulfure. On peut alors se demander si l'enzyme a un seul centre actif capable de fixer n'importe lequel de ces substrats. La synthèse enzymatique de L-cystathionine à partir de L-cystéine et de L-homosérine par l'homosérine déhydratase<sup>10,11</sup> implique que ces deux molécules soient présentes simultanément sur l'enzyme, ce qui suggère l'existence de deux sites, l'un permettant la fixation de la L-cystéine, l'autre celle de la L-homosérine. Peut-on alors retenir l'hypothèse déjà formulée<sup>10,12</sup> selon laquelle le centre actif de l'homosérine déhydratase est "double" et, plus précisément, envisager que ce centre actif est composé de deux sites différents, l'un acceptant les substrats "simples" à trois atomes de carbone, l'autre, les substrats "simples" à quatre atomes de carbone?

Pour apporter une réponse à cette question, nous avons mené une étude cinétique en "steady state" en utilisant de l'homosérine déhydratase hautement purifiée et nous avons recherché d'une part quelle est l'influence de la présence d'un substrat sur la dégradation d'un autre substrat, d'autre part quel est l'effet des isomères D des substrats ainsi que de quelques substances de structures voisines de celles des substrats sur les réactions catalysées par l'enzyme.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Purification de l'homosérine déhydratase*

Elle est effectuée, selon une méthode déjà décrite<sup>9,13</sup> à partir de foies de rats utilisés immédiatement après le sacrifice des animaux. Les préparations obtenues sont homogènes à l'ultracentrifugation ou ne présentent au plus que 10% de protéines contaminantes. Leur activité spécifique est de 55 à 60  $\mu$ moles H<sub>2</sub>S par h par mg, le substrat étant la L-cystéine. La concentration en enzyme est déterminée comme indiqué par MATSUO ET GREENBERG<sup>1,2</sup>.

##### *Mesure des activités enzymatiques*

###### *Mesure des désulfhydrations de la L-homocystéine et de la L-cystéine*

Les solutions de L-cystéine et de L-homocystéine sont faites extemporanément, la L-homocystéine étant préparée à partir de la L-homocystéine thiolactone<sup>14</sup>. Les réactions de désulfhydration sont effectuées pendant 20 min à 37° dans des fioles de Warburg en utilisant les techniques déjà décrites<sup>9</sup>; l'hydrogène sulfuré est dosé selon BADINGS ET VAN DER POL<sup>15</sup>. Les vitesses initiales des réactions sont exprimées en  $\mu$ moles de H<sub>2</sub>S par h par mg de homosérine déhydratase.

###### *Mesure des désaminations de la L-homosérine et de la L-cystine*

Les désaminations sont mesurées par dosage des acides cétoniques<sup>16</sup> produits,  $\alpha$ -cétobutyrate dans le cas de la L-homosérine, pyruvate dans celui de la L-cystine. Quand un aminothiol est présent dans le milieu, les désaminations sont conduites en anaérobiose, et en présence de dithiothréitol 10<sup>-3</sup> M lorsque le substrat est la L-homosérine; de plus, avant le dosage, la thiazolidine formée entre l'aminothiol et l'acide cétonique est hydrolysée<sup>17</sup>. Les vitesses initiales des réactions sont exprimées en  $\mu$ moles d'acide cétonique formé par h par mg d'enzyme. Pour les études cinétiques, la concentration en enzyme est telle que la quantité de substrat dégradé au cours de la réaction ne dépasse pas 5% de la quantité initiale; dans ces conditions, les activités sont directement proportionnelles à la concentration en enzyme et les vitesses de

dégradation restent constantes. Quand le substrat est la L-cystine, nous n'avons observé, dans les conditions adoptées, aucune formation de  $H_2S$  provenant de la décomposition, par des mécanismes enzymatiques ou non, de la thiocystéine formée<sup>8</sup>.

#### *Analyse des acides aminés du milieu réactionnel*

Elle est effectuée comme précédemment<sup>10</sup>. Lorsque le milieu contient de l'homocystéine et de la cystéine, lors de l'analyse un pic apparaît, caractéristique du disulfure mixte<sup>18</sup>, donc élue dans nos conditions immédiatement après la norleucine, disulfure qui se forme lors du passage sur la colonne. Pour éviter cette formation, à la fin de la réaction enzymatique les groupements thiols sont bloqués par alkylation avec un excès d'iodoacétate.

#### RÉSULTATS

##### *Effets observés lorsque deux substrats sont présents*

###### *Effet de la L-homosérine sur la désulphydratation de la L-homocystéine*

La L-homosérine inhibe compétitivement la désulphydratation de la L-homocystéine. La constante de dissociation  $K_i$  du complexe enzyme-L-homosérine déterminée à partir des représentations selon Lineweaver et Burk (Fig. 1) et selon Dixon d'autre part a une valeur identique ( $2 \cdot 10^{-2} M$ ) à celle de la constante de dissociation apparente  $K_m$  de l'enzyme pour la L-homosérine.

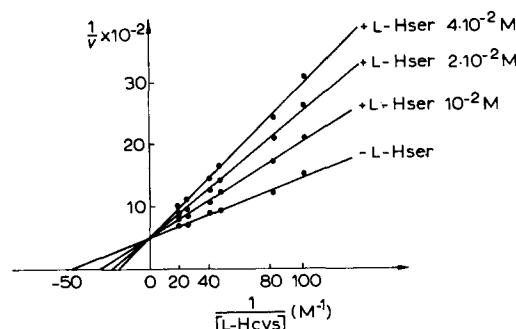


Fig. 1. Action de la L-homosérine sur la désulphydratation de la L-homocystéine. Représentation de Lineweaver et Burk. La réaction enzymatique est effectuée pendant 20 min à 37° en anaérobiose. Le milieu réactionnel (1.6 ml) contient du tampon phosphate  $10^{-1} M$  (pH 7.3), du dithio-thréitol  $10^{-3} M$ , les substrats et l'enzyme dilué dans une solution de PLP; la dilution est telle que, pendant la réaction, la formation de  $H_2S$  soit comprise entre 0.04 et 0.5  $\mu$ moles. Les vitesses initiales sont exprimées en  $\mu$ moles de  $H_2S$  par h par mg de homosérine déhydratase. La concentration du milieu en PLP est  $2.5 \cdot 10^{-4} M$ . L-Hser est L-homosérine, L-Hcys est L-homocystéine.

###### *Effet de la L-homosérine sur la désulphydratation de la L-cystéine*

Pour de fortes concentrations en L-cystéine, la désulphydratation de ce substrat n'est pas modifiée par la présence de L-homosérine, même si celle-ci est en concentration saturante. Lorsque la concentration en L-cystéine est faible, une inhibition apparaît, d'autant plus importante que les concentrations en L-homosérine sont plus fortes (Fig. 2). Cette inhibition est indépendante de la concentration du milieu en coenzyme.

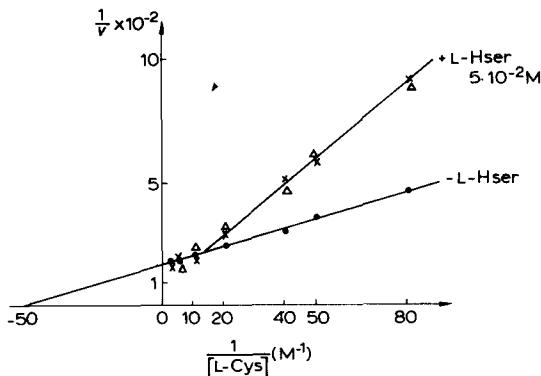


Fig. 2. Action de la L-homoséristine sur la désulphydration de la L-cystéine. Les conditions expérimentales, le milieu réactionnel et les abréviations sont analogues à ceux décrits dans la légende de la Fig. 1.  $\triangle$ — $\triangle$ , concentration du milieu en PLP est  $7.5 \cdot 10^{-4}$  M;  $\times$ — $\times$ , concentration du milieu en PLP est  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M.

#### *Effet de la L-homocystéine sur la désulphydration de la L-cystéine*

Le Tableau I montre que la quantité de  $H_2S$  formée lorsque les deux substrats sont présents simultanément dans le milieu, et ceci même à des concentrations saturantes, est toujours supérieure à celle qui apparaît lorsqu'un seul des substrats est utilisé, mais reste cependant toujours inférieure à la somme des quantités de  $H_2S$  dosées à partir de l'un et l'autre substrat employés séparément dans les mêmes conditions, et ceci quelle que soit la concentration du milieu en dithiothréitol.

TABLEAU I

#### MESURE DES DESULPHYDRATIONS DE LA L-CYSTEINE ET DE LA L-HOMOCYSTEINE

Les vitesses de désulphydration des aminothiols sont exprimées en  $\mu$ moles de  $H_2S$  par 20 min. Entre les parenthèses sont indiquées les sommes des vitesses de désulphydration mesurées séparément à partir de chacun des deux substrats. La quantité de  $H_2S$  manquante quand les deux substrats sont présents simultanément dans le milieu est exprimée en pour cent.

L-Homocystéine, concн. initiale (M)	Vitesses de désulphydration ( $\mu$ moles $H_2S$ par 20 min)					
	0	$10^{-1}$	$7.5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$1.25 \cdot 10^{-2}$
0	0	0.21	0.18	0.16	0.13	0.08
$4 \cdot 10^{-2}$	0.13	0.27 (0.34)	0.25 (0.31)	0.23 (0.29)	0.20 (0.26)	0.17 (0.21)
$H_2S$ manquant (%)		20	19	21	23	19
$10^{-2}$	0.06	0.22 (0.27)	0.20 (0.24)	0.18 (0.22)	0.15 (0.19)	0.11 (0.14)
$H_2S$ manquant (%)		19	17	18	21	21

L'hypothèse de la formation, au cours de l'incubation, du disulfure mixte est à éliminer car ce disulfure n'apparaît pas lors de l'analyse des acides aminés du milieu. L'homoséristine déhydratase est donc incapable de condenser en disulfure mixte la L-cystéine et la L-homocystéine, mais elle peut désulphydrer simultanément ces deux substrats; ce dernier résultat confirme des observations antérieures<sup>19</sup>.

#### *Effet de la L-cystine sur la désulphydration des aminothiols*

En milieu neutre, une réaction d'échange entre un thiol et un disulfure est possible<sup>20</sup> et une telle réaction chimique se produit dans nos conditions expérimentales. Cette réaction rend complexe l'étude de l'effet de la L-cystine sur la désulphydration

de la L-homocystéine. En revanche, elle ne gêne pas l'étude de l'action de la L-cystine sur la désulhydratation de la L-cystéine.

La L-cystine ( $10^{-3}$  M et  $1.25 \cdot 10^{-3}$  M) inhibe compétitivement la désulhydratation de la L-cystéine (Fig. 3). La constante de dissociation  $K_i$  du complexe enzyme-L-cystine est de  $2 \cdot 10^{-3}$  M, valeur cinq fois supérieure à celle de la constante de Michaelis de l'enzyme pour la L-cystine, qui est de  $3 \cdot 10^{-4}$  à  $4 \cdot 10^{-4}$  M.

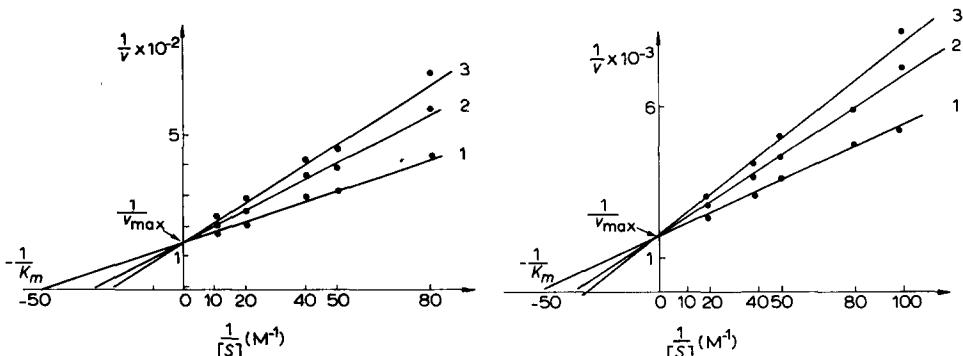


Fig. 3. Action de la L-cystine sur la désulhydratation de la L-cystéine. Les conditions expérimentales, le milieu réactionnel et les abréviations sont analogues à ceux décrits dans la légende de la Fig. 1. Courbe 1, pas de L-cystine; Courbe 2, L-cystine  $10^{-3}$  M; Courbe 3, L-cystine  $1.25 \cdot 10^{-3}$  M.

Fig. 4. Action de la L-cystine sur la désamination de la L-homoséristine. Les conditions expérimentales, le milieu réactionnel et les abréviations sont analogues à ceux décrits dans la légende de la Fig. 1. Courbe 1, pas de L-cystine; Courbe 2, L-cystine  $8 \cdot 10^{-5}$  M; Courbe 3, L-cystine  $10^{-4}$  M.

#### Effet de la L-cystine sur la désamination de la L-homoséristine

Dans des conditions de concentrations saturantes en substrat, la vitesse de désamination de la L-homoséristine est environ cent fois plus grande que celle de la L-cystine.

En présence de  $30 \mu\text{g}$  d'enzyme, la désamination de la L-homoséristine ( $5 \cdot 10^{-3}$  M) est très fortement inhibée (Fig. 4) par la L-cystine ( $1.7 \cdot 10^{-3}$  à  $8 \cdot 10^{-4}$  M).

En présence de  $15 \mu\text{g}$  d'enzyme et d'une concentration en L-cystine telle qu'aucune formation de pyruvate—provenant de la L-cystine—ne soit décelable, la désamination de la L-homoséristine ( $5 \cdot 10^{-2}$  à  $10^{-2}$  M) est compétitivement inhibée par la L-cystine ( $10^{-4}$  et  $8 \cdot 10^{-5}$  M). Dans ces conditions, les déterminations de la constante de dissociation du complexe enzyme-L-cystine donnent des valeurs comprises entre  $1.9 \cdot 10^{-4}$  et  $1.3 \cdot 10^{-4}$  M, donc inférieures à la constante de dissociation apparente  $K_m$ .

#### Effets des isomères D de quelques substrats

Aucun acide aminé “simple” ou “double” de configuration D n'est substrat de l'homoséristine déhydratase. Cependant la L-allocystathionine<sup>1,2</sup> et la mesocystine<sup>8</sup> sont des substrats de l'enzyme. La détermination de la valeur du  $K_m$  de l'enzyme pour la mesocystine a donné  $1.5 \cdot 10^{-3}$  M.

Nous avons constaté que la D-homocystéine et la D-homoséristine sont sans effet sur les différentes activités que nous avons mesurées mais que la D-cystéine inhibe ces activités.

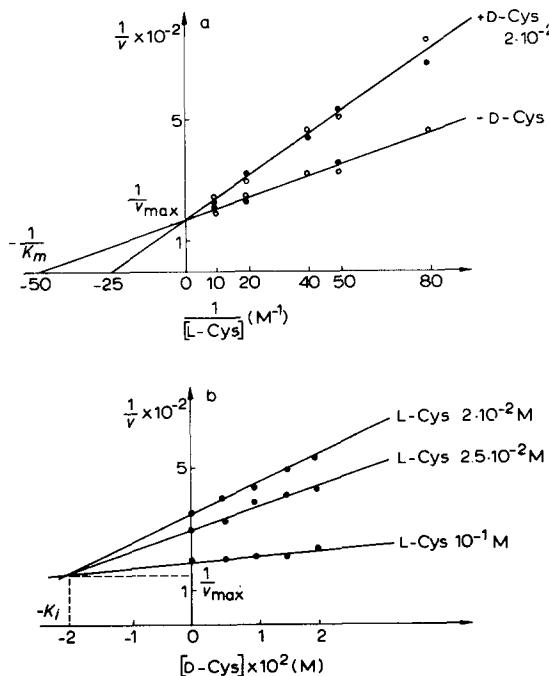


Fig. 5. Action de la D-cystéine sur la désulphydratation de la L-cystéine. La réaction enzymatique est effectuée pendant 20 min à 37° en anaérobiose. Le milieu réactionnel (1.6 ml) contient du tampon phosphate 10<sup>-1</sup> M (pH 7.3) du dithiothréitol 10<sup>-3</sup> M, la D-cystéine et la L-cystéine préparées ex-temporanément, et l'enzyme dilué dans une solution de PLP; la dilution est telle que, pendant la réaction, la formation de H<sub>2</sub>S soit comprise entre 0.04 et 0.5 mole. Les vitesses initiales sont exprimées en μmoles de H<sub>2</sub>S par h par mg de homosérine déshydratase. a. Représentation de Lineweaver et Burk. ●—●, concentration du milieu en PLP est 7.5 · 10<sup>-4</sup> M; ○—○, concentration du milieu en PLP est 5 · 10<sup>-4</sup> M. b. Représentation de Dixon. Concentration du milieu en PLP est 5 · 10<sup>-4</sup> M.

#### Effet de la D-cystéine sur la désulphydratation de la L-cystéine

La D-cystéine (5 · 10<sup>-3</sup> à 2 · 10<sup>-2</sup> M) inhibe compétitivement (Fig. 5) la désulphydratation de la L-cystéine (10<sup>-2</sup> à 10<sup>-1</sup> M); elle se fixe donc sur l'enzyme sur le même site que la L-cystéine.

Cette inhibition est indépendante de la concentration du milieu en coenzyme bien que le PLP forme, avec les aminothiols, des complexes stables, les thiazolidines<sup>21</sup>.

#### Effet de la D-cystéine sur la désulphydratation de la L-homocystéine

La D-cystéine, aux mêmes concentrations que celles précédemment employées, inhibe de façon non compétitive la désulphydratation de la L-homocystéine (Fig. 6), et ceci quelle que soit la concentration du milieu en coenzyme. Cette inhibition n'est pas due à la formation du disulfure mixte L-homocystéine-D-cystéine, et elle est indépendante de la concentration du milieu en dithiothréitol.

#### Effet de la D-cystéine sur la désamination de la L-homosérine

La D-cystéine inhibe la désamination de la L-homosérine; cette inhibition est du type mixte, selon la nomenclature de WEBB<sup>22</sup>. Comme le montre la Fig. 7, pour une concentration donnée en D-cystéine, l'addition de PLP lève partiellement l'inhibition, et cette inhibition devient de type non compétitif lorsque le PLP est en excès.

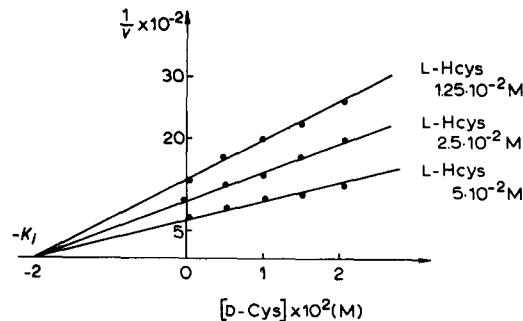


Fig. 6. Action de la D-cystéine sur la désulfhydratation de la L-homocystéine. Représentation de Dixon. Les conditions expérimentales, le milieu réactionnel et les abréviations sont analogues à ceux décrits dans la légende de la Fig. 1. La concentration du milieu en PLP est  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

Cette observation suggère que la D-cystéine provoque une désaturation du site de la L-homoséride en coenzyme. L'inhibition résiduelle que l'on constate même en présence d'un excès de PLP est, au moins en partie, due à la réaction de condensation de la L-homoséride et de la D-cystéine en D-allocystathionine. En effet, une telle réaction a lieu dans nos conditions expérimentales car la D-allocystathionine, qui n'est pas substrat de l'enzyme<sup>23</sup> apparaît sur le diagramme des acides aminés: elle est élueée juste avant la L-cystathionine.

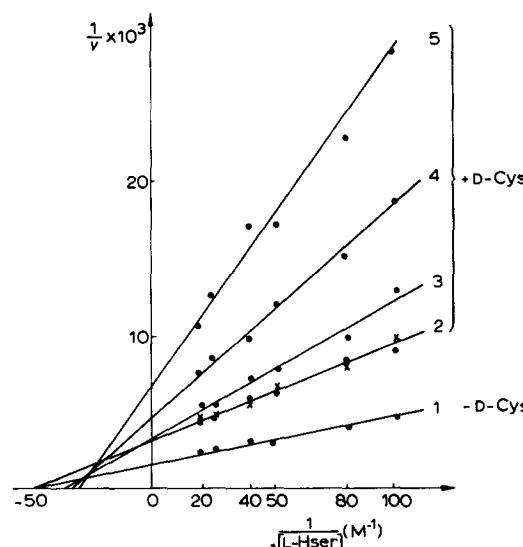


Fig. 7. Action de la D-cystéine sur la désamination de la L-homoséride. Influence du PLP. Représentation de Lineweaver et Burk. Concentration de PLP: Courbe 1,  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M et  $2.5 \cdot 10^{-3}$  M; Courbe 2,  $2.5 \cdot 10^{-3}$  M (x) et  $1.75 \cdot 10^{-3}$  M (●); Courbe 3,  $1.25 \cdot 10^{-3}$  M; Courbe 4,  $7.5 \cdot 10^{-3}$  M; Courbe 5,  $2.5 \cdot 10^{-2}$  M. La vitesse initiale est exprimée en  $\mu$ moles d'α-cétobutyrate par h par mg d'enzyme. Les abréviations sont analogues à celles décrites dans la légende de la Fig. 1.

*Effets de quelques acides aminés ayant des structures voisines de celles des substrats*

Nous avons utilisé les acides aminés suivants: L-sérol, L-alanine, L-méthionine et S-méthyl-L-cystéine.

Les préparations de homosérol déhydratase sont complètement dépourvues d'activité de L-sérol déhydrase; d'autre part, la L-alanine n'est pas substrat de l'enzyme et, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons observé aucune dégradation des acides aminés S-substitués (L-méthionine, S-méthyl-L-cystéine) même lorsqu'ils sont employés à de fortes concentrations.

L'effet de ces quatre acides aminés sur la dégradation de divers substrats a été examiné et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II.

TABLEAU II

NATURE DES INHIBITIONS PROVOQUÉES PAR LA L-ALANINE, LA L-SÉROL, LA S-MÉTHYLCYSTEINE ET LA L-MÉTHIONINE SUR LA DÉGRADATION DE DIVERS SUBSTRATS DE L'HOMOSÉROL DÉHYDRATASE

Acide aminé	Substrat	Effet	$K_i$ (M)
L-Alanine	L-Cystéine	Inhibition compétitive	$6 \cdot 10^{-3}$
	L-Homocystéine	Inhibition compétitive	$3 \cdot 10^{-3}$
	L-Homosérol	Inhibition compétitive	$3 \cdot 10^{-3}$
L-Sérol	L-Cystéine	Inhibition compétitive	$5 \cdot 10^{-2}$
	L-Cystine	Inhibition compétitive	$5 \cdot 10^{-2}$
	L-Homocystéine	Inhibition complexe	
S-Méthyl-L-cystéine	L-Homosérol	Inhibition incompétitive	$2.5 \cdot 10^{-2}$
	L-Cystéine	Inhibition compétitive	$10^{-1}$
	L-Homocystéine	Inhibition compétitive	$3 \cdot 10^{-2}$
L-Méthionine	L-Homosérol	Inhibition compétitive	$3 \cdot 10^{-2}$
	L-Cystéine	Sans effet	
	L-Cystine	Sans effet	
S-Méthyl-L-cystéine	L-Homocystéine	Inhibition compétitive	$1.2 \cdot 10^{-1}$
	L-Homosérol	Inhibition compétitive	$1.2 \cdot 10^{-1}$

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

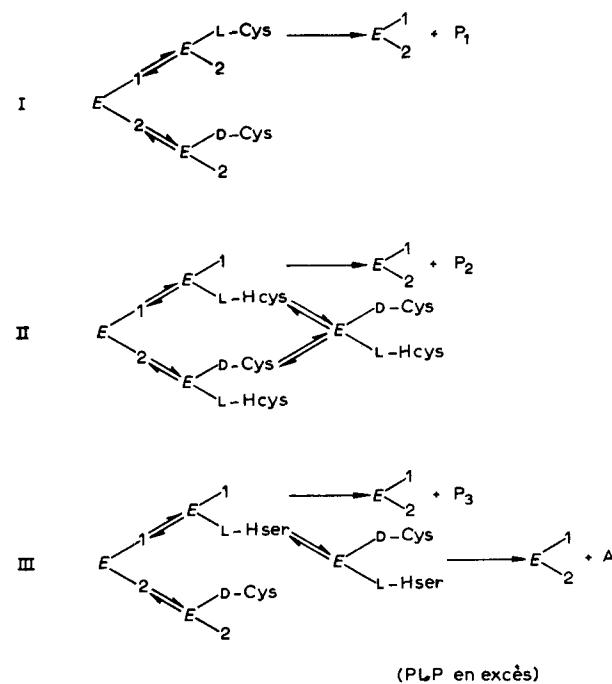
Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent de définir certaines conditions nécessaires pour qu'une molécule soit substrat de l'homosérol déhydratase et apportent quelques précisions sur les propriétés du centre actif de l'enzyme.

Pour être substrats, les acides aminés "simples" doivent être de configuration L; aucun acide aminé D n'est dégradé; d'autre part, ils doivent posséder une fonction thiol ou hydroxyle; cette condition est nécessaire: ni la L-alanine, ni la S-méthyl-L-cystéine ni la L-méthionine ne sont substrats, mais elle n'est pas suffisante: la L-sérol n'est pas dégradée.

Les acides aminés "doubles" peuvent être de configuration DL: la L-allocystéine et la mesocystéine sont substrats, mais ils se fixent plus difficilement sur l'enzyme que leurs analogues LL. D'autre part, diverses observations renforcent l'hypothèse de l'existence, sur l'enzyme, d'un centre actif "double" composé de deux sites, l'un fixant la L-cystéine, l'autre la L-homocystéine et la L-homosérol. En effet, la L-homosérol, qui inhibe compétitivement la désulfhydratation de la L-homocystéine, se fixe sur le même site que cette dernière, mais la L-homosérol ne modifie pas la vitesse de désulfhydratation de la L-cystéine lorsque celle-ci est employée à de fortes

concentrations, ce qui indique que le site de fixation de la L-homosérine est différent de celui de la L-cystéine. Ceci est en accord avec la constatation de la désulfhydratation simultanée de la L-cystéine et de la L-homocystéine utilisées l'une et l'autre à des concentrations saturantes; en accord également avec les faits observés en présence de D-cystéine: celle-ci provoque une inhibition compétitive de la désulfhydratation de la L-cystéine, et une inhibition non compétitive de la désulfhydratation de la L-cystéine, et une inhibition non compétitive de la désulfhydratation de la L-homocystéine et de la désamination de la L-homosérine.

Il apparaît de plus que l'un de ces sites—que nous appellerons site L—n'accepte que les acides aminés à quatre atomes de carbone et de configuration L, et catalyse leur dégradation; en effet, la D-homosérine et la D-homocystéine n'inhibent aucune activité enzymatique et ne se fixent donc pas sur l'enzyme. L'autre site—que nous appellerons site DL—est capable de fixer les acides aminés à trois atomes de carbone, de configuration L ou D, et catalyse la dégradation des acides aminés de configuration L. On peut donc écrire les équations suivantes:



I = site "DL", 2 = site "L".  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  = respectivement produits de dégradation de la L-cystéine, de la L-homocystéine et de la L-homosérine. A = D-allo-cystathionine.

D'autre part, ces deux sites sont en quelque sorte interdépendants: l'enzyme, saturé en L-homocystéine, est capable de dégrader la L-cystéine, mais avec une moins grande efficacité, et réciproquement. Cependant cette interdépendance ne semble pas liée à des modifications conformationnelles d'un site provoquées par la présence sur

ce site d'un substrat ou d'un inhibiteur. En effet, la fixation de D-cystéine sur le site DL empêche la dégradation des substrats à quatre atomes de carbone mais ne modifie pas leur affinité pour le site L; de même, la saturation du site L par la L-homosérine n'entraîne pas de modification de l'affinité de l'enzyme pour la D-cystéine.

Ces deux sites ne sont pas chevauchants: la fixation de L-méthionine sur le site L n'est pas accompagnée d'une modification de la désulhydratation de la L-cystéine, et, si la L-alanine et la S-méthyl-L-cystéine sont des inhibiteurs compétitifs de la dégradation des trois substrats "simples", les constantes de dissociation des complexes enzyme-L-alanine et enzyme-S-méthyl-L-cystéine sont différentes suivant que l'activité mesurée est soit la désulhydratation de la L-cystéine soit la désamination de la L-homosérine ou la désulhydratation de la L-homocystéine. De plus, il semble probable qu'une molécule de l'un ou l'autre de ces effecteurs se fixe sur chaque site: dans le cas de la L-alanine, ceci est en accord avec les résultats obtenus lors des dosages des groupements thiols de l'homosérine déhydratase<sup>13</sup>. On peut noter que la L-alanine, malgré la faible réactivité de sa chaîne latérale, présente une grande affinité pour les deux sites. Dans ce cas, la présence du groupement aminoacide suffit pour qu'il y ait fixation sur l'enzyme. Par contre, l'existence dans une molécule (L-sérine, L-cystéine) d'un atome de soufre ou d'oxygène possédant deux doublets électroniques libres rend plus difficile la fixation de ces molécules sur l'enzyme.

On peut noter également l'importance de l'encombrement stérique: l'affinité de chaque site pour les acides aminés "simples" diminue au fur et à mesure que la dimension de la molécule augmente. Par ordre d'affinité décroissante, le site L fixe la L-alanine, la L-homosérine ou la L-homocystéine, la S-méthyl-L-cystéine, la L-méthionine; pour le site DL, on trouve la L-alanine, la D-cystéine ou la L-cystéine, la S-méthyl-L-cystéine.

Une autre observation concerne la "dissymétrie", en quelque sorte, du centre actif. En effet, le site DL permet la désulhydratation de la L-cystéine mais ne catalyse aucune dégradation de l'analogue hydroxylé, la L-sérine; d'autre part, sur le site L, la L-homosérine se désamine très rapidement alors que la L-homocystéine n'est que difficilement désulhydratée. L'homosérine déhydratase condense la L-homosérine et la L- ou la D-cystéine respectivement en L-cystathionine ou en D-allocystathionine, mais elle est incapable de condenser en L-cystathionine la L-homocystéine et la L-sérine. De même, l'homosérine déhydratase est incapable de former un disulfure mixte à partir de la L-homocystéine et de la L- ou de la D-cystéine bien que l'enzyme fixe ces trois substances.

Les résultats obtenus lorsque la L-cystine est employée comme l'un des substrats montrent que au moins certains substrats "doubles" peuvent se fixer sur l'un et l'autre des sites des substrats "simples": la L-cystine inhibe compétitivement la dégradation de la L-homosérine et celle de la L-cystéine. De plus, les valeurs des constantes de dissociation du complexe enzyme-L-cystine sont différentes quand les substrats sont soit la L-cystéine soit la L-homosérine. On peut alors se demander, étant données la faible taille de la molécule de L-cystine et la présence, sur cette molécule, de deux fonctions aminoacides susceptibles de réagir avec l'enzyme, si une même molécule de L-cystine vient se fixer sur le centre actif "double", c'est-à-dire sur l'un et l'autre site. Cependant nous n'avons pas observé d'inhibition par un excès de substrat. Notons toutefois que nous avons été limités par la faible solubilité de la L-cystine et que la plus forte concentration de L-cystine employée au cours de ces

recherches ( $1.8 \cdot 10^{-3}$  M) reste inférieure à la constante de dissociation du complexe L-cystine-siite de la L-cystéine.

En conclusion, si l'interprétation de certaines observations reste encore à faire, en particulier celles qui se rapportent à divers phénomènes d'inhibition, l'ensemble des résultats obtenus est en accord avec l'hypothèse de l'existence sur l'homosérine déhydratase du foie de rat d'un centre actif "double" composé de deux sites.

#### RÉSUMÉ

Des études cinétiques de la désulphydratation de la L-homocystéine par l'homosérine déhydratase purifiée à partir de foies de rats ont été faites en présence de L-cystéine ou de L-homosérine. La L-homosérine inhibe compétitivement la désulphydratation de la L-homocystéine mais ne modifie pas la désulphydratation de la L-cystéine lorsque ce substrat est utilisé à des concentrations saturantes.

Lorsque de la L-homocystéine et de la L-cystéine sont simultanément présentes dans le milieu d'incubation, la production d'hydrogène sulfuré est supérieure à celle observée à partir de l'un ou l'autre substrat employé seul, mais elle reste inférieure à la somme que l'on devrait obtenir si la dégradation de l'un et l'autre de ces substrats n'était pas modifiée.

D'autre part, la D-cystéine inhibe de façon compétitive la désulphydratation de la L-cystéine, et de façon non compétitive la désulphydratation de la L-homocystéine. Lorsque de la D-cystéine et de la L-homosérine sont présentes dans le milieu d'incubation on observe, d'une part une inhibition de la désamination de la L-homosérine, et d'autre part une production de D-allocystathionine.

La D-homosérine et la D-homocystéine ne modifient aucune des activités catalysées par l'homosérine déhydratase.

Les effets provoqués par la L-cystine, la L-séroline, la L-alanine, la L-méthionine et la S-méthyl-L-cystéine sur les réactions catalysées par l'enzyme ont été déterminés.

L'ensemble des résultats obtenus est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le centre actif de l'homosérine déhydratase du foie de rat est "double", c'est-à-dire formé de deux sites, l'un permettant la fixation de la L-cystéine sur la protéine, l'autre celle de la L-homosérine ou de la L-homocystéine. Quelques propriétés de ce centre actif sont décrites.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. O. Durieu-Trautmann pour sa participation aux discussions à propos de ce travail, ainsi que Mademoiselle C. Portemer et Monsieur G. de Billy qui ont apporté une efficace contribution à la réalisation de ces expériences.

Ces recherches ont bénéficié de subventions du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de recherches No. 43) et de la Ligue Nationale Française contre le Cancer.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 Y. MATSUO ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 545.
- 2 Y. MATSUO ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 561.
- 3 Y. MATSUO ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 507.

- 4 Y. MATSUO ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 516.
- 5 D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVI ET B. G. MORI, *Enzymologia*, 22 (1960) 11.
- 6 D. M. GREENBERG, P. MASTALERZ ET A. NAGABHUSHANAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 158.
- 7 J. LOISELET ET F. CHATAGNER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 33.
- 8 J. LOISELET ET F. CHATAGNER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 595.
- 9 M. P. ROISIN ET F. CHATAGNER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 481.
- 10 F. CHATAGNER, M. TIXIER ET C. PORTEMER, *FEBS Lett.*, 4 (1969) 231.
- 11 G. E. GAULL, Y. WADA, K. SCHNEIDMAN, D. K. RASSIN, H. H. TALLAN ET J. A. STURMAN, *Pediatr. Res.*, 5 (1971) 265.
- 12 J. LOISELET, Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Paris, 1966.
- 13 D. DEME, O. DURIEU-TRAUTMANN ET F. CHATAGNER, *Eur. J. Biochem.*, 20 (1971) 269.
- 14 J. L. WIEBERS ET H. R. GARNER, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 12.
- 15 H. T. BADINGS ET J. J. G. VAN DER POL, *Neth. Milk Dairy J.*, 19 (1965) 283.
- 16 T. E. FRIEDMANN ET G. E. HAUGEN, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 415.
- 17 J. BRÜGGEMANN ET M. WALDSCHMIDT, *Biochem. Z.*, 335 (1962) 408.
- 18 G. FRIMPTER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) PC 51.
- 19 C. FROMAGEOT ET P. DESNUELLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24 (1942) 2169.
- 20 J. L. WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1963, p. 639.
- 21 M. V. BUELL ET R. E. HANSEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 6042.
- 22 J. L. WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1963.
- 23 A. MEISTER, *Biochemistry of the Amino Acids*, 2ème éd., Academic Press, New York, 1965, p. 757.

*Biochim. Biophys. Acta*, 258 (1972) 643-654