

BBA 66734

DOSAGES COLORIMÉTRIQUES DES OXYDORÉDUCTASES ALDONIQUES D'*ESCHERICHIA COLI* K 12 : APPLICATIONS

RAYMOND C. PORTALIER* ET FRANÇOIS R. STOEBER

Service de Microbiologie, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Villeurbanne (France)

(Received May 24th, 1972)

SUMMARY

*Colorimetric estimations of aldonate oxidoreductases from *Escherichia coli* K 12 : Applications*

Altronate (EC 1.1.1.58) and mannonate oxidoreductases (EC 1.1.1.57), two NAD⁺ enzymes involved in the hexuronate pathway of *E. coli* K 12, respectively catalyze the reversible dehydrogenation of altronate or mannonate into tagaturonate or fructuronate.

1. The optimal conditions for quantitative colorimetric assays of these activities utilizing phenazine methosulfate as an intermediate agent for electron transfer from NADH to *p*-nitro blue tetrazolium have been determined.

In 0.2 M glycylglycine buffer (pH 9.0) in the presence of gelatin (10 or 20 µg/ml), phenazine methosulfate (33 µM) and 3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)-bis[2-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium] (0.25 or 0.5 mM), the apparent Michaelis constants for substrates are: K_m (NAD⁺) = 88 µM and K_m (altronate) = 90 µM for altronate oxidoreductase; K_m (NAD⁺) = 1 mM and K_m (mannonate) = 1.7 mM for mannonate oxidoreductase.

2. Applications of these new methods in various fields such as aldonate estimations, rapid and visual detection of aldonate oxidoreductases and characterization of specific mutants in the hexuronate pathway of *E. coli* are discussed.

INTRODUCTION

La D-altronate:NAD⁺-oxydoréductase (EC 1.1.1.58) et la D-mannonate:NAD⁺-oxydoréductase (EC 1.1.1.57) interviennent chez *Escherichia coli* K 12 dans la dégradation des acides D-galacturonique et D-glucuronique (Fig. 1). La première enzyme catalyse la réduction de l'acide D-tagaturonique en acide D-altronique, la seconde enzyme catalyse la réduction de l'acide D-fructuronique en acide D-mannonique : ces deux réactions ont lieu en présence de NADH et sont réversibles.

Abréviation: PMS, *N*-méthyl-phenazinium méthylsulphate.

* Ce mémoire sera inclus dans les travaux présentés par Raymond Portolier pour l'obtention du grade de Docteur-ès-Sciences Physique (Université Claude-Bernard de Lyon).

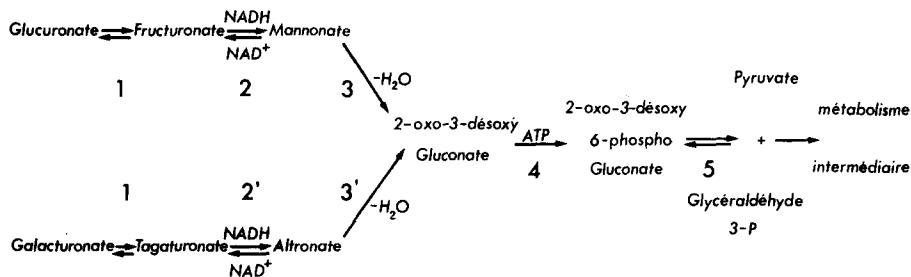


Fig. 1. Le métabolisme du glucuronate et du galacturonate chez *Escherichia coli*. Chaque étape numérotée d'un chiffre distinct est catalysée par une enzyme spécifique distincte.

Les purifications, propriétés générales et les mécanismes enzymatiques des deux oxydoréductases ont été décrits ailleurs¹⁻⁴. Ces études ont permis d'individualiser nettement les deux enzymes qui catalysent la transformation de composés aux structures très voisines. Il a été montré en particulier que les activités inverses des déshydrogénases aldoniques (oxydation des aldonates) sont sous la responsabilité d'une seule enzyme, l'aldonate oxydoréductase correspondante^{1,2}.

Sur la base de tels résultats étendus aux autres enzymes de la voie de dégradation⁵⁻⁶, il a été possible d'aborder l'étude des mécanismes de régulation physiologiques et génétiques qui coordonnent les biosynthèses des enzymes centrales de la voie métabolique décrite⁷. Il a alors été nécessaire de disposer de nouvelles méthodes d'estimation de ces enzymes notamment dans le but de caractériser des mutants spécifiques du système^{8,9}.

Dans le présent travail, nous décrivons la mise au point de nouvelles méthodes de dosage de l'altronate oxydoréductase et de la mannonate oxydoréductase, et donnons leurs principales applications. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de sels de tétrazolium^{10,11} dont la réduction, couplée aux réactions inverses des déshydrogénases, permet un dosage colorimétrique de ces dernières.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Organisme

La souche S 3000 (Hfr H) d'*Escherichia coli* K 12, auxotrophe pour la thiamine, a été utilisée comme source d'enzyme.

Produits chimiques

Les acides D-altronique et D-mannonique ont été synthétisés au laboratoire selon les techniques déjà décrites^{5,6}.

Les acides D-galacturonique et D-glucuronique proviennent de Serva Feinbiochemica, Calbiochem ou Sigma Chemical Company.

La N-méthyl-phenazinium méthylsulphate (PMS), le glycylglycine, la gélatine, le NAD⁺, le NADH et les sels de tétrazolium proviennent de Nutritional Biochemicals Company.

Méthodes

Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry *et al.*¹² avec la sérum albumine comme standard, ou par la méthode de Warburg et Christian¹³.

Dosages enzymatiques

Dosage colorimétrique de l'altronate oxydoréductase. Le milieu réactionnel standard contient par ml: 200 μ moles de tampon glycylglycine-NaOH, pH 9.0; 0.5 μ mole de NAD⁺; 0.5 μ mole d'altronate de potassium; 0.25 μ mole de chlorure de 3,3'-(3,3'-diméthoxy-4,4'-biphénylène)-bis[2-(*p*-nitrophényl)-5-phényl-2H-tétrazolium] (*p*-nitro tétrazolium); 0.033 μ mole de PMS; 10 μ g de gélatine, si nécessaire, et l'enzyme à la dilution appropriée.

Dosage colorimétrique de la mannonate oxydoréductase. Le milieu réactionnel standard contient par ml: 200 μ moles de tampon glycylglycine-NaOH, pH 9.0; 1 μ mole de NAD⁺; 1 μ mole de mannonate de potassium; 0.5 μ mole de *p*-nitro tétrazolium; 0.033 μ mole de PMS; 20 μ g de gélatine si nécessaire et l'enzyme à la dilution convenable.

Les activités enzymatiques sont mesurées par les modifications de l'absorption à 550 nm, à 37 ± 0.5 °C, à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UNICAM SP 800 équipé d'une enceinte thermostatée. A chaque essai, correspond toujours un témoin ne contenant pas d'altronate ou de mannonate.

Les vitesses initiales sont linéaires pendant au moins 5 min dans la plupart des essais.

L'unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à l'oxydation d'une μ mole d'aldonate par min. Les activités spécifiques sont exprimées en unité d'activité par mg de protéine.

Dosages in situ des oxydoréductases. Après croissance en boîtes de Pétri sur milieu gélosé (12 mg/ml) plus glycérol (4 mg/ml) en présence ou en absence de composés inducteurs (galacturonate ou glucuronate: 2 mg/ml), les colonies bactériennes sont traitées par le toluène à 37 °C. Après élimination du solvant, les colonies sont recouvertes des milieux réactionnels décrits ci-dessus et l'on observe le développement de la coloration.

Dosages des activités directes et inverses des oxydoréductases. Ceux-ci ont été décrits précédemment^{1,2}: leur principe repose sur les mesures des vitesses d'oxydation ou de réduction du coenzyme nicotinique par l'estimation des variations de l'absorption à 340 nm.

Dosages des déshydrases aldoniques. Les méthodes utilisées ont été décrites ailleurs⁶.

Culture, récolte et désintégration des bactéries

Les conditions sont identiques à celles qui ont déjà été définies¹.

Purification des aldonate oxydoréductases

Les extraits enzymatiques utilisés pour la mise au point des méthodes de dosage correspondent au dialysat de la troisième étape de la purification de ces enzymes^{1,2}. Les extraits bruts sont couramment utilisés pour les dosages de routine.

Les extraits purifiés utilisés pour doser l'altronate oxydoréductase ou la mannonate oxydoréductase proviennent de cultures s'étant développées en présence de galacturonate, ou de glucuronate respectivement.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Mises au point des méthodes de dosage

Effet de la concentration en enzyme

Dans les conditions de dosage définies (*cf.* Méthodes) il existe une relation linéaire entre les vitesses initiales et la quantité d'extrait enzymatique lorsque celle-ci varie d'un facteur 1-40, soit de 0.24-9.65 µg protéine/ml pour l'altronate oxydoréductase, et de 0.043-1.73 µg protéine/ml pour la mannonate oxydoréductase.

Effet du pH

En tampon glycylglycine-NaOH 0.2 M, les deux activités enzymatiques sont optimales à pH 9.0; dans ce tampon, la mannonate oxydoréductase conserve 68% d'activité à pH 8.0 et 31% à pH 9.5; aux mêmes valeurs de pH, l'altronate oxydoréductase conserve respectivement 12 et 69% d'activité.

En tampon Tris-HCl 0.2 M et à pH 9.0, les vitesses initiales diminuent de moitié pour l'altronate oxydoréductase et d'un facteur 5 pour la mannonate oxydoréductase.

Effet de la force ionique

Les vitesses initiales des deux activités augmentent avec la concentration du tampon glycylglycine comme le montre la Fig. 2. Les concentrations supérieures à 0.2 M sont à écarter car un phénomène de réduction aspécifique du sel de tétrazolium se superpose et risque d'interférer avec les mesures.

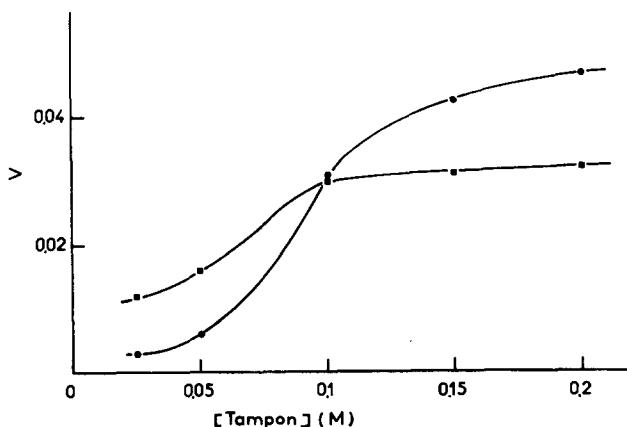


Fig. 2. Influence de la force ionique sur l'activité des aldonate oxydoréductases. ●—●, altronate oxydoréductase; ■—■, mannonate oxydoréductase. Le pH du tampon glycylglycine-NaOH utilisé est de 9.0; en ordonnées les vitesses initiales traduisent la variation de l' A_{550} nm par min.

Influence de la gélatine

Le diformazan du *p*-nitro tétrazolium montre des propriétés substantives pour certaines protéines dont la gélatine¹¹; celle-ci, en maintenant le diformazan finement dispersé, stabilise la suspension colloïdale du pigment et permet l'étude colorimétrique en solution aqueuse. On évite ainsi la laborieuse et peu précieuse technique d'extraction du chromogène par les solvants organiques.

La concentration optimum en gélatine est de 10 µg/ml pour l'altronate oxydo-

réductase et de 20 µg/ml pour la mannonate oxydoréductase. Pour des concentrations supérieures en gélatine, les cinétiques de mesure des activités ne sont plus linéaires mais deviennent exponentielles. La gélatine joue un rôle d'activateur: en présence de 10 µg de gélatine/ml, l'activité de l'altronate oxydoréductase est multipliée par 1.5; en présence de 20 µg de gélatine/ml, l'activité de la mannonate oxydoréductase est multipliée par un facteur 4 par rapport au témoin sans gélatine.

Influence de la concentration en PMS

La concentration optimale est égale à 16.5 µM pour les deux réactions; nous retiendrons cependant, comme concentration standard la valeur de 33 µM, étant donné que pour cette valeur, les cinétiques sont parfaitement linéaires.

En absence de PMS, les vitesses initiales sont égales à 5% environ des vitesses maxima.

Influence de la concentration en p-nitro tétrazolium

Ainsi que le montrent les courbes de la Fig. 3 dont l'allure est celle d'isothermes de Langmuir, les vitesses initiales dépendent fortement de la concentration en *p*-nitro tétrazolium. Les concentrations nécessaires en *p*-nitro tétrazolium sont respectivement égales à 0.25 mM pour l'altronate oxydoréductase et à 0.5 mM pour la mannonate oxydoréductase.

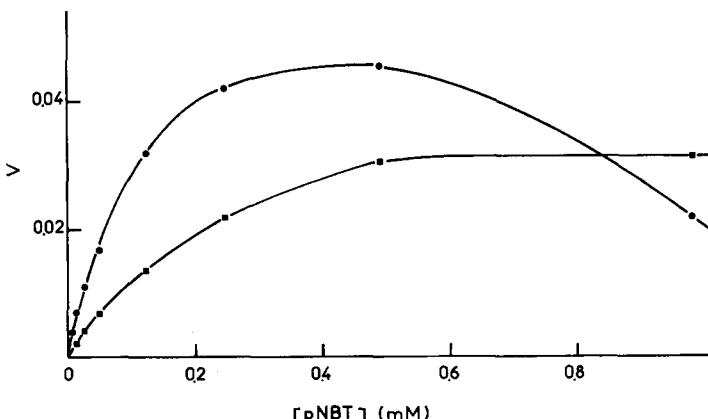


Fig. 3. Influence du *p*-nitro tétrazolium (pNBT) sur l'activité des aldonate oxydoréductases. ●—●, altronate oxydoréductase; ■—■, mannonate oxydoréductase. En ordonnées, les unités sont les mêmes que pour la Fig. 2.

Influence de la concentration en coenzyme

La variation des vitesses initiales en fonction de la concentration en NAD⁺ lorsque celle-ci varie dans l'intervalle $2.5 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ M suit une loi de type michaelien. Dans les coordonnées de Lineweaver et Burk on obtient des courbes linéaires d'où l'on déduit les valeurs des constantes de Michaelis apparentes du NAD⁺ pour les oxydoréductases: K_m (NAD⁺) apparent = 88 µM pour l'altronate oxydoréductase et K_m (NAD⁺) apparent = 1 mM pour la mannonate oxydoréductase. Les valeurs des concentrations saturantes apparentes en NAD⁺ sont respectivement égales à 0.5 mM pour la première enzyme et à 1 mM pour la seconde.

Influence de la concentration en substrat glucidique

Les mêmes études appliquées à la variation de la concentration en substrat

glucidique, altronate ou mannonate, conduisent à la détermination des constantes de Michaelis apparentes correspondantes: K_m (altronate) apparent = $90 \mu\text{M}$ pour l'altronate oxydoréductase et K_m (mannonate) apparent = 1.7 mM pour la mannonate oxydoréductase. Ces valeurs sont du même ordre et varient dans le même sens que les constantes de Michaelis des deux enzymes pour le coenzyme NAD⁺. Les valeurs des constantes de Michaelis apparentes des oxydoréductases pour leurs substrats, coenzyme et glucide, déterminées dans ces conditions, sont très proches de celles déterminées lors de l'étude des réactions inverses des mêmes enzymes^{1,2}.

Les valeurs des concentrations saturantes apparentes sont respectivement de 0.5 mM pour l'altronate et 1 mM pour le mannonate.

Effets de différents sels de tétrazolium

Outre la réduction du *p*-nitro tétrazolium, nous avons suivi la réduction d'un autre sel de ditétrazolium, le chlorure de $3,3'-(3,3'-\text{diméthoxy}-4,4'\text{-biphénylène})$ -bis[2-phényl-5(*m*-nitrophényl)-2H-tétrazolium] et de deux sels de monotétrazolium, le chlorure de 2-(*p*-iodophényl)-3-*p*-nitrophényl-5-phényl-2H-tétrazolium et le bromure de 3-(4,5-diméthyl thiazolyl-2)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium. Le ditétrazolium (absorption à 600 nm) a été éliminé à cause de la lenteur des réactions en sa présence. Le chlorure de monotétrazolium (absorption à 520 nm) et le bromure de monotétrazolium (absorption à 575 nm) permettent d'obtenir des vitesses initiales supérieures à celles obtenues avec le *p*-nitro tétrazolium. Ces deux sels n'ont cependant pas été retenus à cause de leur instabilité dans les conditions de dosage.

Courbes d'étalementage

La variation de l'absorption à 550 nm obéit à la loi de Beer-Lambert quand la concentration de diformazan (obtenu par réduction du *p*-nitro tétrazolium par l'hydrosulfite de sodium) varie dans l'intervalle 0-40 µg de diformazan/ml.

La Fig. 4 représente la courbe d'étalementage entre l'absorption à 550 nm ($A_{550 \text{ nm}}$) et la concentration de NADH ajoutée dans le milieu réactionnel contenant le *p*-nitro tétrazolium en excès, pour réduire le sel de tétrazolium; de cette courbe, on

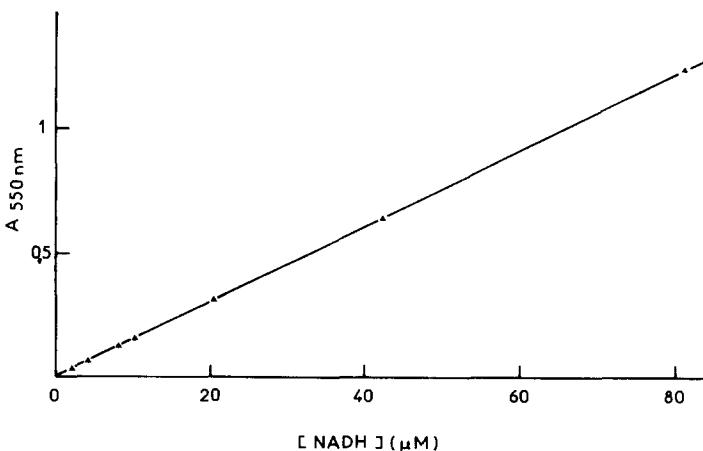


Fig. 4. Courbe d'étalementage: variation de l'absorption à 550 nm avec la concentration en NADH utilisé pour réduire le *p*-nitro tétrazolium (pNBT). Le milieu réactionnel utilisé contient par ml: 200 µmoles de tampon glycylglycine-NaOH, pH 9.0; 0.033 µmole de PMS; 20 µg de gélatine; 0.5 µmole de *p*-nitro tétrazolium et le NADH à la concentration indiquée.

déduit la relation 1 unité d'absorption (A_{550} nm) correspond à la formation de 65 nmoles de NADH/ml.

A partir de cette relation, il est possible d'apprécier les quantités d'altronate ou de mannonate oxydées dans les conditions réactionnelles décrites.

La variation de l' A_{550} nm (déterminée en fin de réaction) est proportionnelle à la quantité d'altronate engagée dans la réaction catalysée par l'altronate oxydoréductase quand l'enzyme est présente à de fortes concentrations et dans l'intervalle 0-50 nmoles d'altronate par ml de milieu réactionnel. La réaction catalysée par cette enzyme est à peu près totale dans nos conditions puisque la transformation de 64 nmoles d'altronate/ml correspond à une A_{550} nm = 1.

La même relation de proportionnalité entre la quantité de mannonate présente initialement et l' A_{550} nm au plateau est vérifiée dans l'intervalle 0-60 nmoles de mannonate/ml.

Le Tableau I permet de comparer les activités des oxydoréductases aldoniques dosées par les trois méthodes disponibles.

TABLEAU I

COMPARAISON DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES OXYDORÉDUCTASE ALDONIQUES SELON LA MÉTHODE DE DOSAGE UTILISÉE

Les activités spécifiques sont mesurées dans un même extrait purifié contenant les deux oxydoréductases.

Enzyme	Activités spécifiques (unités/mg protéine)		
	Activité directe	Activité inverse	Dosage colorimétrique
Altronate oxydoréductase	48 000	5 300	1 700
Mannonate oxydoréductase	34 200	10 700	5 000

Applications des méthodes de dosage décrites

En utilisant les courbes d'étalonnage présentées ci-dessus, on voit que les méthodes mises au point peuvent servir au dosage des acides altronique et mannonique.

Ces mêmes méthodes ont été très utiles lors des purifications des déshydrogénases aldoniques pour détecter ces enzymes dans les différentes fractions.

Le fait de disposer de méthodes de dosage qui engendrent un composé coloré est évidemment très utile dans toutes les manipulations (chromatographies, gradients, etc.) où se pose le problème de la détection rapide de fractions riches en enzyme.

Nous avons pu également appliquer les méthodes décrites dans le présent mémoire aux dosages des hydro-lyases aldoniques (D-altronate hydro-lyase, EC 4.2.1.7 et D-mannonate hydro-lyase, EC 4.2.1.8) qui catalysent les étapes 3' et 3 de la voie de dégradation décrite par la Fig. 1; ces enzymes ont pour substrat respectif, l'altronate ou le mannonate^{5,6}. Après un temps d'action de 10 min de quantités variables d'hydrolyase on prélève une partie aliquote du milieu réactionnel et l'on dose la concentration d'acide aldonique résiduel par l'une ou l'autre des méthodes de dosage décrites ci-dessus. On a ainsi pu vérifier la proportionnalité entre la quantité de substrat transformé et la quantité d'hydrolyase mannonique mise en jeu quand celle-ci varie d'un facteur 1-40. Dans l'intervalle 0-60 nM de mannonate/ml, les vitesses initiales de la mannonate oxydoréductase sont proportionnelles aux concentrations de man-

nonate; il est donc possible d'estimer les concentrations en mannonate non seulement par la mesure du plateau (variation de l'absorption à la fin de la réaction, en présence de l'enzyme à forte concentration, mais aussi par la mesure des vitesses initiales pour ces très faibles concentrations de substrat.

On a vérifié par dosage chimique du 2-oxo-3-désoxy-D-gluconate apparu⁶ la correspondance avec les quantités de mannonate consommé.

Lors des études physiologiques (R. Portalier, résultats inédits) concernant l'induction des oxydoréductases aldoniques, l'utilisation des méthodes colorimétriques s'est révélée très utile pour l'identification de composés inducteurs ou répresseurs de ces enzymes.

La dernière application des méthodes colorimétriques et la plus féconde sans doute a trait à la caractérisation de clones bactériens chez lesquels les niveaux en activités aldonate oxydoréductasiques sont modifiés par rapport à ceux du clone sauvage. La technique utilisée est décrite dans Méthodes: le traitement au toluène a pour double objet de rendre les membranes cellulaires perméables aux substrats des réactions et de détruire différemment les enzymes "parasites" (NADH-oxydase) qui interfèrent avec les dosages des oxydoréductases aldoniques.

Ainsi, ces tests colorimétriques nous ont permis d'identifier divers types de mutants spécifiques pour le système de dégradation des hexuronates: mutants de structure déficients en altronate ou en mannonate oxydoréductase (R. Portalier, résultats inédits), en altronate ou en mannonate hydrolyase^{8,9}. Dans les deux derniers cas, les mutants correspondants, chez lesquels les oxydoréductases sont superinduites et qui accumulent l'aldonate correspondant, sont caractérisés par des réactions particulièrement intenses.

Le fait que nous avons pu isoler des mutants de structure pour les oxydoréductases aldoniques est fortement en faveur de la spécificité des méthodes colorimétriques correspondantes.

De la même manière, nous avons pu isoler et caractériser des souches "pléiotropes négatives" déficientes en une oxydoréductase et en d'autres enzymes de la voie. Enfin, ces mêmes méthodes nous ont permis de caractériser des clones chez lesquels la synthèse des oxydoréductases est devenue constitutive (R. Portalier, résultats inédits).

REMERCIEMENTS

J. Robert-Baudouy nous a efficacement aidé à adapter les méthodes de dosage des oxydoréductases aldoniques aux dosages des hydrolyases aldoniques.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Action concertée "Biologie Moléculaire") et du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche Associée no. 177).

RÉSUMÉ

Les oxydoréductases altronique et mannonique dont le coenzyme est le NAD⁺, interviennent dans la voie de dégradation des hexuronates chez *Escherichia coli* K 12 et catalysent la déshydrogénération réversible de l'altronate ou du mannonate en tagaturonate ou en fructuronate.

1. Les conditions optimales de dosage quantitatif de ces enzymes par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation de la phénazine méthosulfate comme accepteur intermédiaire d'électrons, du NADH au *p*-nitro tétrazolium, ont été recherchées.

En tampon glycylglycine, 0.2 M, pH 9.0 en présence de gélatine (10 ou 20 µg/ml), de phénazine méthosulfate (33 µM) et de chlorure de 3,3'-(3,3'-diméthoxy-4,4'-biphényle)-bis[2-(*p*-nitrophényl)-5-phényl-2H-tétrazolium] (0.25 ou 0.5 mM), les constantes de Michaelis apparentes pour les substrats ont les valeurs suivantes: K_m (NAD⁺) = 88 µM et K_m (altronate) = 90 µM pour l'oxydoréductase altronique; K_m (NAD⁺) = 1 mM et K_m (mannonate) = 1.7 mM pour l'oxydoréductase manno-nique.

2. Des applications de ces nouvelles méthodes à différents domaines tels que le dosage des aldonates, la détection rapide et visuelle des oxydoréductases aldoniques et surtout la caractérisation de mutants spécifiques de la voie des hexuronates d'*E. coli*, sont présentées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. C. Portalier et F. R. Stoeber, *Eur. J. Biochem.*, 26 (1972) 50.
- 2 R. C. Portalier et F. R. Stoeber, *Eur. J. Biochem.*, 26 (1972) 290.
- 3 R. C. Portalier et F. R. Stoeber, *Eur. J. Biochem.*, sous presse.
- 4 R. C. Portalier et F. R. Stoeber, *Eur. J. Biochem.*, sous presse.
- 5 J. Jimeno-Abendano, Thèse de Docteur-ingénieur, Lyon, 1968.
- 6 J. Robert-Baudouy, Thèse de 3ème cycle, Lyon, 1971.
- 7 J. Baudouy-Robert, M. L. Didier-Fichet, J. Jimeno-Abendano, G. Novel, R. Portalier et F. Stoeber, *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 271 (1970) 370.
- 8 R. C. Portalier, J. M. Robert-Baudouy et F. R. Stoeber, *Mol. Gen. Genet.*, sous presse.
- 9 J. M. Robert-Baudouy, R. C. Portalier et F. R. Stoeber, *Mol. Gen. Genet.*, sous presse.
- 10 M. M. Nachlas, K. C. Tsou, E. de Souza, C. S. Cheng et A. M. Seligman, *J. Histochem. Cytochem.*, 5 (1957) 420.
- 11 M. M. Nachlas, S. I. Margulies et A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 499.
- 12 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 13 O. Warburg et W. Christian, *Biochem. Z.*, 310 (1941) 384.