

BBA 66926

## PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE LA D-MANNONATE HYDROLYASE D'*ESCHERICHIA COLI*\*

JANINE M. ROBERT-BAUDOUY et FRANÇOIS R. STOEBER

Service de Microbiologie, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Villeurbanne (France)  
(Réçu le 9 janvier, 1973)

---

### SUMMARY

#### *Purification and properties of D-mannonate hydrolyase from Escherichia coli K 12*

1. D-Mannonate hydrolyase (EC 4.2.1.8), an enzyme of the hexuronate pathway, has been purified by ammonium sulfate precipitation, chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-200 gel filtration. The overall procedure results in a 61-fold purification with a yield of 34%.

2. Optimal conditions for enzyme assay have been established: glycylglycine buffer at pH 8.3, in the presence of ferrous sulfate and 2-mercaptoethanol as activators and protector.

3. Mannonate hydrolyase is inducible by glucuronate and fructuronate, but not by galacturonate and tagaturonate. It has a maximum activity between pH 7 and 8.5. Among numerous compounds tested, only mannonate is a substrate with a  $K_m$  of 20 mM. Several inhibitors of the enzyme have been studied, and the following three are competitive inhibitors: D-gluconate, D-mannitol and D-sorbitol. Some intermediates of the degradative hexuronate pathway activate the mannonate hydrolyase: D-glucuronate, D-galacturonate, D-tagaturonate and D-altronate.

4. Thermal inactivation of mannonate hydrolyase in the presence of urea indicates that at least 85% of the activity of the enzyme is homogeneous. The protection against heat denaturation by the competitive inhibitor D-gluconate confirms the nature of the inhibition.

5. The enzyme is inactivated by 1 mM *p*-chloromercuribenzoate.

6. The product of enzyme action on D-mannonate has been identified as 2-keto-3-deoxy-D-gluconate by paper chromatography.

---

### INTRODUCTION

La voie de dégradation du glucuronate et du galacturonate chez la souche ATCC 9637 d'*Escherichia coli* a été décrite par Ashwell et collaborateurs<sup>1-4</sup>.

Abréviation: PCMB, sel de sodium de l'acide *p*-chloromercuribenzoïque.

\* Ce mémoire est inclus dans les travaux présentés par Janine M. Robert-Baudouy pour l'obtention du grade de Docteur-ès-Sciences Physiques (Université Claude Bernard, Lyon).

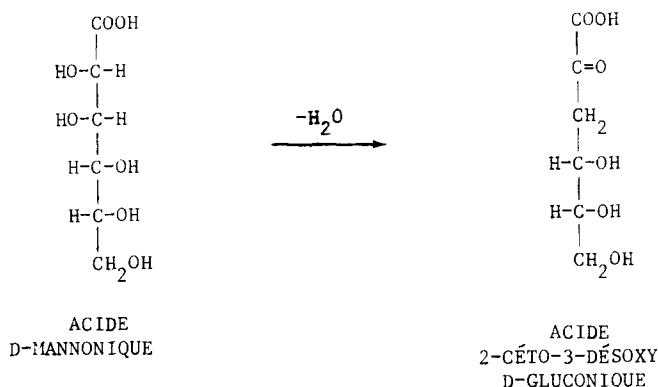


Fig. 1. Hydrolyse de l'acide D-mannonique en 2-céto-3-désoxy-D-gluconique.

La D-mannonate hydrolyase (EC 4.2.1.8) catalyse la transformation de l'acide D-mannonique en acide 2-céto-3-désoxy-D-gluconique, intermédiaire de la dégradation de l'acide D-glucuronique (Fig. 1).

Le but à atteindre étant la connaissance des mécanismes de régulation physiologiques et génétiques intervenant dans la biosynthèse des enzymes associées à la dégradation des hexuronates, il s'est avéré nécessaire d'approfondir l'étude biochimique de l'hydrolyase mannonique, avant d'aborder son analyse génétique notamment<sup>5</sup>.

Dans l'optique de ces recherches, après une mise au point relativement délicate, dont le détail, a déjà été décrit ailleurs<sup>6</sup>; un dosage spécifique de cette enzyme en extrait brut et purifié a été élaboré.

La purification de l'hydrolyase mannonique par une méthode originale, donne des résultats nettement supérieurs à ceux obtenus auparavant<sup>3</sup>.

Un certain nombre de propriétés biochimiques nouvelles, vérifiées pour la plupart, simultanément en extraits bruts et purifiés a été établi.

## MATÉRIEL

### Organisme

La souche d'*Escherichia coli* utilisée est K 12 S 3000 (Hfr H) auxotrophe pour la thiamine.

### Produits chimiques

Les produits suivants ont été synthétisés au laboratoire: D-altronate de calcium<sup>7</sup>, D-fructuronate<sup>1,8</sup>, D-tagaturonate<sup>8</sup>, 2-céto-3-désoxy-D-gluconate<sup>9</sup>, D-mannonolactone et amide-D-mannonique<sup>6,10,11</sup>.

## MÉTHODES

### Culture et récolte des bactéries

Les bactéries sont cultivées en aérobiose à 37 °C sur milieu minimum 63 (ref. 12) additionné de thiamine (0.5 µg/ml) en présence de glucuronate de potassium (18-50

mM) comme seule source de carbone et d'énergie. Récoltées en fin de phase exponentielle de croissance, les bactéries sont lavées deux fois par centrifugation dans du tampon Tris 10 mM, pH 7.0, et remises en suspension dans ce même tampon à raison de  $1.8 \cdot 10^{10}$ – $4.5 \cdot 10^{10}$  bactéries par ml (soit 12–30 mg de poids sec bactérien par ml).

#### *Extraction*

L'hydrolyase mannonique est extraite par traitement de 10 min à 0 °C à l'aide du désintégrateur sonique Raythéon (10 kHz). Après centrifugation (1 h à  $38\,000 \times g$ ) éliminant les débris cellulaires, l'extrait est fractionné en parties aliquotes de 1 ml et stocké à –20 °C. Dans ces conditions, l'activité enzymatique se maintient à 90% pendant un mois au moins.

#### *Dosage enzymatique*

L'activité de l'hydrolyase mannonique est mesurée par l'estimation de l'acide 2-céto-3-désoxy-D-gluconique selon la méthode de Waravdekar et Saslaw<sup>13</sup> modifiée par Weissbach et Hurwitz<sup>14</sup>.

Le milieu de la réaction enzymatique, préincubé 10 min à 37 °C, contient: tampon glycylglycine-soude 200 mM à pH 8.3; 2-mercaptoéthanol 50 mM; FeSO<sub>4</sub> 0.8 mM; extrait enzymatique convenablement dilué; mannonate de potassium 60 mM<sup>6</sup>. La réaction enzymatique est arrêtée par dilution du mélange réactionnel (1 vol.) dans le réactif suivant (3 vol.) = solution aqueuse d'acide trichloracétique à 100 g/l contenant du chlorure mercurique 20 mM (destiné à précipiter le 2-mercaptoéthanol). Après centrifugation à  $6000 \times g$  pendant 15 min, les surnageants sont dilués dans l'acide trichloracétique à 100 g/l de manière à ce que le mannonate non déshydraté n'excède pas 1.5  $\mu$ moles/ml et à ce que tout autre composé éventuellement présent n'interfère d'aucune façon avec le dosage chimique<sup>6</sup>. Un volume de 0.2 ml de surnageant dilué est oxydé par l'acide periodique pendant 20 min à la température ambiante (25 °C), puis chauffé avec l'acide thiobarbiturique<sup>14</sup>. Le complexe coloré formé est dosé en absorptiométrie à 549 nm. Dans ces conditions, 0.290 unité d'absorbance correspond à 0.01  $\mu$ mole de 2-céto-3-désoxy-D-gluconate présent dans le volume de surnageant soumis à l'oxydation periodique. Dans nos conditions standard les vitesses initiales sont une fonction linéaire de la quantité d'extrait enzymatique lorsque celle-ci varie dans un rapport de 1–50 au moins. L'unité enzymatique est définie par la quantité d'hydrolyase mannonique qui fait apparaître 1  $\mu$ mole de 2-céto-3-désoxy-D-gluconate par min. Les activités spécifiques sont exprimées en  $\mu$ moles de 2-céto-3-désoxy-D-gluconate apparu par min et par mg de protéine (unités/mg de protéine).

#### *Dosage des protéines*

Les protéines sont évaluées par la méthode de Lowry *et al.*<sup>15</sup>, ou celle de Warburg et Christian<sup>16</sup>.

#### *Inactivation thermique*

Le milieu d'inactivation constitué de tampon Tris 10 mM, pH 7.0, est préincubé à la température choisie. Le déclenchement de l'inactivation se fait instantanément par dilution au quart de l'extrait à inactiver dans le milieu préchauffé. L'activité au "temps zéro" d'inactivation est mesurée sur un échantillon prélevé immédiatement après la dilution. À intervalles de temps réguliers, on prélève très

rapidement une partie aliquote du mélange que l'on verse dans deux parties de milieu réactionnel exempt de substrat maintenu à 0 °C, puis on dose l'activité résiduelle.

#### *Identification du produit réactionnel*

La réaction enzymatique est conduite dans les conditions standard, de telle sorte que le surnageant contienne environ 10  $\mu$ moles de 2-céto-3-désoxy-D-gluconate par ml et une proportion de substrat décelable par chromatographie sur papier après traitement selon la technique de Hickman et Ashwell<sup>2</sup>. Les dépôts sont révélés par les réactifs au permanganate de potasse-periodate ou le phthalate d'aniline, capables de révéler tous les sucres<sup>17</sup>, la potasse méthanolique jointe à l'hydroxylamine, réactif des lactones<sup>17</sup> enfin le periodate-thiobarbiturate<sup>18</sup> susceptible de mettre en évidence les désoxy-oses.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Purification de l'hydrolyase mannonique*

Les différentes étapes de cette purification sont toutes réalisées à une température comprise entre 0 et 4 °C. Toutes les opérations de centrifugation durent 30 min à  $12\,000 \times g$ . L'extrait sonique brut provient de 3 l de culture (1.7 g de bactéries en poids sec).

*Précipitation des acides nucléiques.* 100 ml d'extrait brut sont précipités par le sulfate de protamine (21 ml à 20 g/l, 12 h). Après élimination du précipité le surnageant contient 6.5% d'acides nucléiques par rapport au matériel absorbant total<sup>16</sup>.

*Fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium.* Le surnageant de la fraction 40% de saturation en sulfate d'ammonium est porté à 75% de saturation et le culot correspondant, redissous dans 12 ml de tampon phosphate mono-disodique 10 mM, pH 7.0 (Tampon I) est abandonné une nuit. Après dialyse deux fois 15 h contre 500 ml de Tampon I, la fraction obtenue contient moins de 0.5% d'acides nucléiques<sup>16</sup>.

*Chromatographie sur DEAE-cellulose.* Le dialysat sert à charger une colonne (2 cm  $\times$  45 cm) de DEAE-cellulose (Serva: capacité 0.81) équilibrée en Tampon I additionné de 2-mercaptoéthanol 10 mM (Tampon II). Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl 0-0.4 M, dans le Tampon II avec un débit de 15 ml  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>. Les fractions (1.8 ml) 200 à 240, contenant la majorité de l'hydrolyase mannonique sont précipitées par le sulfate d'ammonium entre 65 et 90% de saturation. Le précipité est mis en solution en Tampon II et dialysé contre ce même tampon (500 ml) pendant deux fois 10 h.

*Filtration sur gel de Sephadex.* Le dialysat précédent est chromatographié sur colonne (2.5 cm  $\times$  39 cm) de gel de Sephadex G-200 (Pharmacia) équilibrée en Tampon II additionné de NaCl 100 mM. Les protéines sont éluées par le même tampon avec un débit de 2.5 ml  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>. Les fractions (de 2 ml) 27-50 contiennent la totalité de l'enzyme.

À ce stade l'hydrolyase mannonique a été purifiée 61 fois et 34% de l'activité totale initiale ont été conservés. Les différentes étapes de purification sont résumées dans le Tableau I.

#### *Caractère inductible de l'hydrolyase mannonique*

Le Tableau II montre que l'hydrolyase mannonique est de nature inductible

TABLEAU I

## PURIFICATION DE L'HYDROLYASE MANNONIQUE

La fraction la plus pure obtenue sur Sephadex G-200 porte le No. 38; elle contient 3.4% de l'activité initiale, son facteur de purification est égal à 78.

<i>Étape</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Protéines totales (mg)</i>	<i>Activité totale (unités)</i>	<i>Conserva- tion de l'activité en %</i>	<i>Activité spécifique en (unités/ mg pro- téine)</i>	<i>Facteur de purification</i>
Extrait sonique brut	100	1680	483	100	287	1
Surnageant-protamine	115.5	524	465	96	887	3.1
Dialysat (40-75% satd (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	14.4	357	345	71	966	3.4
Chromatographie sur DEAE- cellulose	100	70	250	52	3570	12.4
Filtration sur Sephadex G-200	46	9.2	163	34	17600	61

TABLEAU II

## INDUCTIBILITÉ DE L'HYDROLYASE MANNONIQUE

Les activités spécifiques sont exprimées en pourcentage du niveau induit par le D-glucuronate. L'inducteur analysé est ajouté dans la culture à la concentration de 20 mM en présence de glycérol 20 mM. Le glucose, le succinate et le glycérol employés seuls sont utilisés à la concentration de 20 mM.

<i>Inducteur</i>	<i>Activité spécifique relative</i>
Néant (glucose seul)	8
Néant (succinate seul)	10
Néant (glycérol seul)	10
D-Glucuronate	100
D-Fructuronate	60
D-Galacturonate	< 1
D-Tagaturonate	< 1
Amide-D-mannonique	450

et que seuls les deux premiers intermédiaires du rameau dégradatif du glucuronate l'induisent.

*Effet du pH*

Comme on le voit sur la Fig. 2, la zone de pH où l'enzyme est à la fois la plus stable à la préincubation et la plus active se situe entre pH 7.0 et 8.5. Aux pH inférieurs l'enzyme (en extraits bruts ou purifiés) se dénature progressivement (Tableau III). Il en va de même aux pH supérieurs à 8.5. La molarité du tampon de la réaction enzymatique variant de 50 mM à 300 mM ne modifie pas significativement l'activité hydrolyasique.

*Cofacteurs*

La perte d'aucun cofacteur présent dans les extraits bruts n'a pu être décelée par dialyse de ceux-ci pendant 24 h contre du tampon Tris 10 mM, pH 7.0.

TABLEAU III

EFFET DU pH ET DU TEMPS DE PREINCUBATION DE L'ENZYME À 37 °C SUR SON ACTIVITÉ

En présence de  $\text{Fe}^{2+}$  0.8 mM et 2-mercaptoéthanol 50 mM.

Temps de préincubation (min)	Activités enzymatiques relatives		
	pH 6.6	pH 7.0	pH 8.3
0	100	100	100
10	50	100	100
30	50	100	100
50	34	75	100

*Effets des ions*

Les conditions d'utilisation des ions dans le dosage de l'hydrolyase mannonique ont été décrites ailleurs<sup>6</sup>; les principaux résultats de leurs effets sont donnés ici :

(1) Le  $\text{Zn}^{2+}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Mg}^{2+}$ , le  $\text{K}^{+}$  et l' $\text{NH}_4^{+}$  sont sans effet, en présence ou en absence de 2-mercaptoéthanol dans le milieu.

(2) En l'absence de 2-mercaptoéthanol, le  $\text{Fe}^{2+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$ , le  $\text{Ni}^{2+}$  et le  $\text{Cu}^{2+}$  augmentent assez faiblement l'activité enzymatique, mais ils précipitent plus ou moins.

(3) En présence de 2-mercaptoéthanol les mêmes ions, ainsi que le  $\text{Co}^{2+}$  exaltent nettement l'activité hydrolyasique (Tableau IV). Le rôle du 2-mercaptoéthanol semble résulter en grande partie d'une meilleure solubilisation de l'ion qui se complexe à pH 8.3 avec le mercaptan. Pour le  $\text{Fe}^{2+}$  à 0.8 mM la concentration du 2-mercaptoéthanol donnant l'activité optimale est de 50 mM. De tous les thiols testés le 2-mercaptoéthanol est le plus actif, mais il n'a guère d'effet en l'absence de cation.

TABLEAU IV

EFFET DE DIVERS CATIONS SUR L'ACTIVITÉ DE L'HYDROLYASE MANNONIQUE

Une même quantité d'extrait enzymatique brut est préincubée 10 min à 37 °C et dosée dans chaque cas en présence des concentrations indiquées de cation et de 2-mercaptoéthanol 50 mM, les autres conditions du dosage étant par ailleurs celles du mode opératoire standard. La valeur variable (10-35) du témoin sans ion ni mercaptoéthanol traduit une dénaturation variable de l'enzyme au cours de la préincubation.

Nature de l'ion ajouté	Activités enzymatiques relatives						
	Concentration de l'ion ajouté (mM) :						
	10	5	1	0.8	0.5	0.4	0.1
$\text{CoSO}_4$	68	50	27	—	22	—	—
$\text{NiSO}_4$	68	54	47	—	41	—	—
$\text{MnSO}_4$	95	95	90	—	90	—	—
$\text{CuSO}_4$	58	40	32	—	32	—	—
$\text{FeSO}_4$	—	100	100	100	90	86	33

(4) L'action optimisante du couple  $\text{Fe}^{2+}$ -2-mercaptoéthanol paraît complexe (Tableau V). D'une part, il "active" de manière instantanée la réaction enzymatique (essais non préincubés); d'autre part il "stabilise" l'enzyme préincubée durant des temps croissant en sa présence. L'activation observée ne paraît pas relever d'une

TABLEAU V

EFFET STABILISATEUR ET ACTIVATEUR DU COUPLE  $\text{Fe}^{2+}$  (0.8 mM) + 2-MERCAPTOÉTHANOL (50 mM) SUR L'HYDROLYASE MANNONIQUE À pH 8.3

Un même extrait brut a été préincubé et dosé dans chaque cas en présence des facteurs mentionnés.

Temps d'incubation à 37 °C (min)	Activités enzymatiques relatives	
	Sans addition ou $\text{Fe}^{2+}$ seul	$\text{Fe}^{2+}$ + 2-mercaptoéthanol
0	25	100
10	6	100
30	4	100
50	4	100

renaturation instantanée de l'enzyme, car l'inactivation par préincubation sans fer-mercaptan est irréversible. Plusieurs hydrolyases exigeant de même la présence conjointe de fer et de mercaptan ont été décrites<sup>19-23</sup>.

#### *Effet de la concentration en substrat*

L'hydrolyase mannonique suit la loi de Henri-Michaelis entre les valeurs 2.5 mM et 125 mM de concentration en mannonate et la vitesse maximale expérimentale est atteinte vers 80 mM. Le  $K_m$ , identique pour les extraits bruts ou purifiés, est de 20 ( $\pm 10$ ) mM.

#### *Etude de la spécificité et des glucides effecteurs de l'enzyme*

*Recherche des substrats de l'hydrolyase mannonique.* Aucun des composés suivants présentant une certaine analogie avec le D-mannonate et susceptibles de donner par déshydratation un 2-céto-3-désoxyaldonate n'est substrat de l'hydrolyase mannonique en extraits bruts: D-arabono-1,4-lactone, L-gulonolactone, D-gulono-1,4-lactone, D-galactonolactone, D-talonolactone, D-gluconate, D-1,5-gluconolactone, D-glucuronate, D-glucuronamide, D-galacturonate, amide-D-mannonique. Le D-altronate analysé sur une fraction purifiée exempte d'hydrolyase altronique<sup>22</sup> ne l'est pas non plus. Même le D-glucarate<sup>24</sup> et le D-arabonate<sup>25</sup>, déshydratables par une hydrolyase spécifique en 2-céto-3-désoxyaldonate, sont sans effet. La spécificité d'action de l'hydrolyase mannonique paraît donc très étroitement limitée au seul mannonate.

#### *Analogues structuraux du mannonate inhibiteurs de l'hydrolyase mannonique.*

(1) Les glucides suivant sont dépourvus d'effet inhibiteur (à la concentration de 50 mM): le D-arabinose, le D-glucarate, le D-fructose, la L-gulonolactone, la D-gulono-1,4-lactone, la D-galactonolactone, le D-glucose, le D-arabonate.

(2) Les glucides suivants exercent un effet inhibiteur faible (10-20%): la D-arabono-1,4-lactone (70 mM), la D-talonolactone (60 mM), le D-mannose (250 mM), le L-rhamnose (250 mM), la D-glucuronolactone (60 mM).

(3) Les glucides suivants montrent un effet inhibiteur net (50-100%): le D-sorbitol (50 mM), le D-glucuronamide (50 mM), le D-gluconate (100 mM), la D-1,5-gluconolactone (60 mM), le D-mannitol (50 mM), l'amide D-mannonique (20 mM).

Le Tableau VI et les Figs 3, 4 et 5 résument l'étude des principaux inhibiteurs de la Catégorie 3. On peut remarquer (Fig. 4) que la très forte inhibition exercée par

TABLEAU VI

## ÉTUDE DE QUELQUES INHIBITEURS DE L'HYDROLYASE MANNONIQUE

Les dosages enzymatiques ont été réalisés avec un extrait brut en présence de substrat à cinq concentrations différentes s'échelonnant de 2.5–25 mM, et de l'inhibiteur ajouté au milieu juste avant le début de la réaction. Les  $K_i$  ont été déterminés en utilisant la représentation de Lineweaver et Burk<sup>26</sup> et celle de Dixon<sup>27</sup> qui donnent des résultats concordants.

Inhibiteur	Concentration (mM)	$K_i$ (valeur moyenne) (mM)	Nature de l'inhibition
D-Gluconate	10, 15, 20, 30	20	compétitive
D-Mannitol	25, 50	30	compétitive
D-Sorbitol	10, 15, 20, 30	9	compétitive
Amide-D-mannonique	0.02, 0.04, 0.1, 0.2	0.02	non-compétitive
Amide-D-glucuronique	30, 60	20	compétitive mixte

l'amide D-mannonique est complexe et qu'elle apparaît non-compétitive seulement aux fortes concentrations de substrat ( $K_i$  du Tableau VI déterminé ainsi). Pour les faibles valeurs de concentration en substrat les courbes ont une allure non linéaire. La cause de ce phénomène n'a pas été éclaircie. Le comportement de l'amide mannonique, analogue structural le plus proche du substrat, est inattendu: on aurait pensé trouver en lui un inhibiteur compétitif caractérisé.

L'examen de la configuration du substrat et des divers inhibiteurs compétitifs analysés suggère que la structure minimum reconnue par le site actif de l'hydrolyase mannonique est celle, inchangée, des carbones 3 à 6 du mannonate.

*Etude de quelques glucides activateurs de l'hydrolyase mannonique.* Un certain nombre d'intermédiaires de la chaîne dégradative des hexuronates activent l'hydrolyase mannonique: le D-glucuronate, le D-galacturonate, le D-tagaturonate et le D-altronate. Peu prononcé aux concentrations de mannonate relativement fortes (30 mM), cet effet devient très net aux faibles concentrations de substrat (6 mM) et

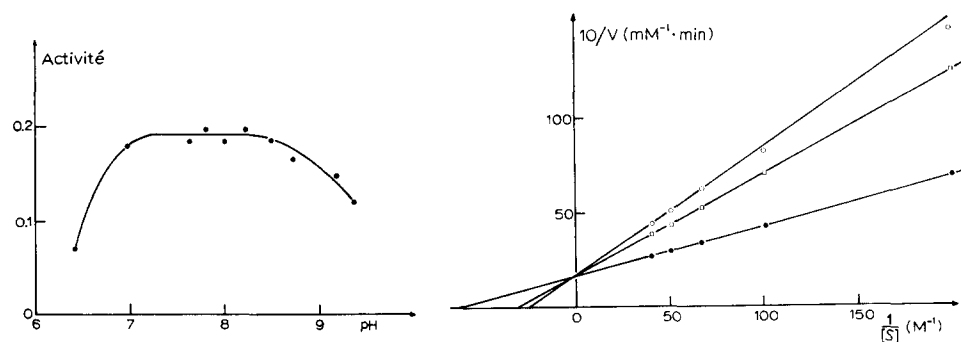


Fig. 2. Effet du pH sur l'activité de l'hydrolyase mannonique. Pour chaque pH testé la préincubation de 10 min précédant le dosage est faite au même pH que la mesure d'activité. En ordonnées, les activités hydrolyase mannonique sont exprimées en unités d'absorbance à 549 nm.

Fig. 3. Inhibition de l'hydrolyase mannonique par le D-gluconate. La représentation graphique est celle de Lineweaver et Burk<sup>26</sup>. ●—●, témoin; □—□, + gluconate 15 mM; ○—○, + gluconate 30 mM.



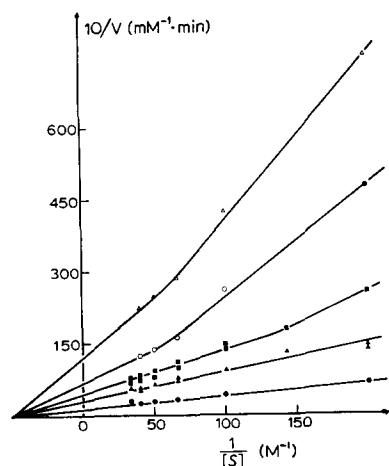


Fig. 4. Inhibition de l'hydrolyase mannonique par l'amide D-mannonique. La représentation graphique est celle de Lineweaver et Burk<sup>26</sup>. ●—●, témoin; ▲—▲, + amide D-mannonique 0.02 mM; ■—■, + amide D-mannonique 0.04 mM; ○—○, + amide D-mannonique 0.1 mM; △—△, + amide D-mannonique 0.2 mM.

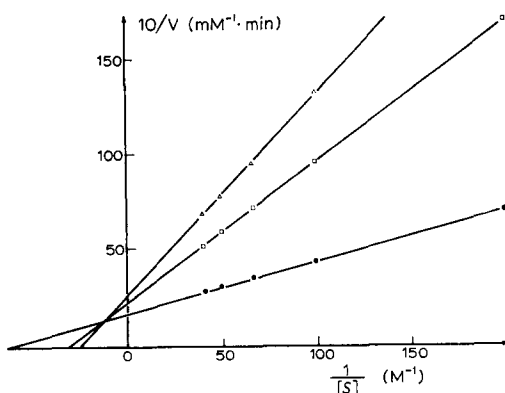


Fig. 5. Inhibition de l'hydrolyase mannonique par le D-glucuronamide. La représentation graphique est celle de Lineweaver et Burk<sup>26</sup>. ●—●, témoin; □—□, + D-glucuronamide 30 mM; △—△, + D-glucuronamide 60 mM.

augmente avec la concentration de l'intermédiaire (Tableau VII). En l'état actuel de nos connaissances ce phénomène reste difficile à interpréter, d'autant plus que la cinétique purement "michaélienne" de l'activité enzymatique à divers pH et de son inhibition compétitive laisse a priori peu de place à l'intervention de phénomènes

TABLEAU VII

ACTIVATION DE L'HYDROLYASE MANNONIQUE PAR CERTAINS GLUCIDES EN PRÉSENCE DE MANNO-NATE 6 mM (FRACTION ENZYMATIQUE PURIFIÉE 15 FOIS)

Glucides ajoutés	Concentration dans le milieu réactionnel (mM)	Activités enzymatiques relatives*
D-Glucuronate	2.5	100
	7.5	110
	25	140
	50	170
	75	190
D-Galacturonate**	50	150
D-Tagaturonate	45	260
	75	315
D-Altronate***	2	110
	25	150
	50	170

\* Les activités relatives sont exprimées par rapport à un témoin sans addition égal à 100.

\*\* Il n'est pas entièrement exclu que la fraction enzymatique utilisée contienne de l'isomérase uronique catalysant réversiblement l'isomérisation du galacturonate en tagaturonate; cette enzyme paraît cependant peu active dans nos conditions standard.

\*\*\* Fraction purifiée exempte d'activité hydrolyase altronique<sup>22</sup>.

allostériques. On est évidemment tenté d'envisager pour ces mécanismes un rôle régulateur dans la séquence dégradative des hexuronates, mais l'ensemble des observations relatives est difficile à coordonner dans cette optique.

### *Effet de la température*

Dans l'intervalle de température 25–49 °C, l'activité enzymatique obéit à la loi d'Arrhenius. L'énergie d'activation correspondante est de 34 kJ/mole (8 kcal/mole) et le  $Q_{10}$  de la réaction (calculé entre 32 et 42 °C) est voisin de 1.5.

### *Inactivation thermique*

À 52 °C l'hydrolyase mannonique (extraits bruts ou purifiés) suit une loi exponentielle de dénaturation jusqu'à 30% d'activité résiduelle au moins, avec une demi-vie de 2 min (Fig. 6). L'observation d'une cinétique à deux pentes n'exclut nullement l'homogénéité de l'espèce enzymatique étudiée. En effet, un même extrait inactivé dans des conditions différentes de température ou de teneur en NaCl ne donne jamais le même pourcentage d'activité la plus thermorésistante (extrapolé au temps zéro d'inactivation), alors que ce pourcentage serait fixe s'il existait dans l'extrait deux enzymes isofonctionnelles de thermostabilité différente. Ce phénomène de rupture de pente, observé par plusieurs auteurs sur des préparations enzymatiques totalement homogènes (refs 19, 28, 29 et Novel, G., résultats non publiés) pourrait être dû à la protection de l'enzyme par des molécules protéiques inertes venant s'agréger à celle de l'enzyme à partir d'un certain stade de dénaturation.

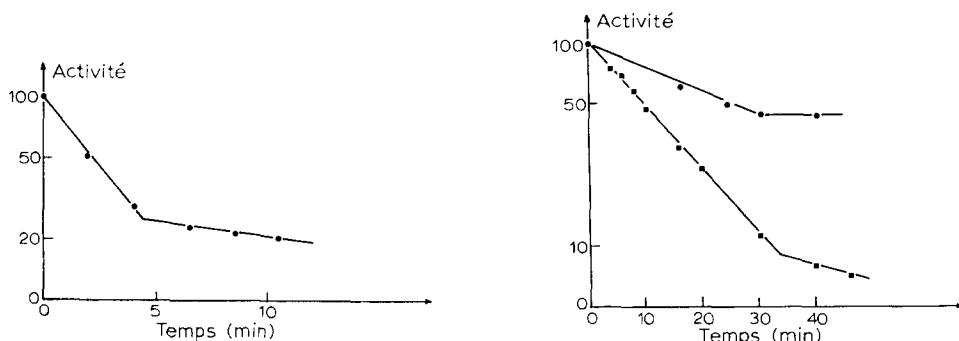


Fig. 6. Inactivation thermique de l'hydrolyase mannonique à 52.5 °C. En ordonnées logarithmiques figurent les activités résiduelles relatives après inactivation; en abscisses le temps d'inactivation.

Fig. 7. Effet de l'urée sur l'inactivation thermique de l'hydrolyase mannonique à 41 °C. En ordonnées logarithmiques figurent les activités résiduelles relatives après inactivation; en abscisses le temps d'inactivation. ●—●, témoin; ■—■, + urée 4 M.

### *Effet de l'urée sur l'inactivation thermique*

Le résultat précédent nous a conduits à utiliser l'urée pour tenter de modifier l'état d'agrégation protéique<sup>30–35</sup>. L'abaissement graduel de la température d'inactivation et l'augmentation progressive de la concentration en urée provoquent une très nette diminution concomitante de la proportion apparente d'enzyme thermorésistante. Dans les meilleures conditions obtenues (Fig. 7), la cinétique est linéaire

sans rupture jusqu'à 9% d'activité résiduelle (extrapolation à 16% sur l'axe des ordonnées). Il paraît probable que la deuxième pente observée n'est qu'un résidu de protection artefactuelle par agrégats et que l'activité de l'hydrolyase présente dans l'extrait brut est le fait d'une molécule protéique homogène (jusqu'à 85% de l'activité au moins). Cette affirmation est renforcée par l'existence d'un pic d'activité unique et bien homogène lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose; cette fraction est néanmoins inactivée par la chaleur selon une cinétique à deux pentes. Une confirmation de l'unicité de l'enzyme ressort de la caractérisation d'un gène de structure unique pour l'hydrolyase mannonique<sup>5</sup>.

#### *Effet protecteur de divers glucides vis à vis de l'inactivation thermique*

Les conditions restrictives du dosage chimique<sup>6</sup> ne permettent pas l'essai de protection par le substrat lui-même. Parmi les divers analogues stériques de ce dernier exerçant un effet inhibiteur, seul le D-gluconate protège l'enzyme contre la dénaturation thermique (Fig. 8). Les deux autres inhibiteurs compétitifs, D-sorbitol et D-mannitol, bien qu'ayant une affinité comparable à celle du gluconate pour l'enzyme, n'exercent aucune protection contre l'inactivation. Il faut remarquer que le D-gluconate est seul à posséder un groupement carboxyle en Position 1 comme le mannonate, ce qui pourrait éventuellement lui conférer un effet protecteur différentiel. Quoiqu'il en soit ce résultat suggère nettement une fois de plus que le gluconate se fixe sur le même site que le mannonate.

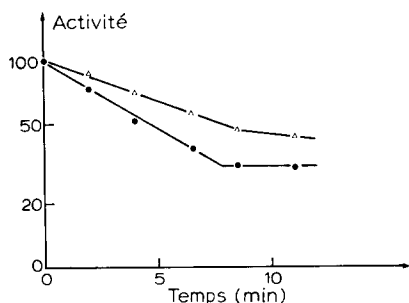


Fig. 8. Effet du D-gluconate sur l'inactivation thermique de l'hydrolyase mannonique à 49 °C. En ordonnées logarithmiques figurent les activités résiduelles après inactivation, en abscisses le temps d'inactivation. ●—●, témoin; △—△, + D-gluconate 12 mM.

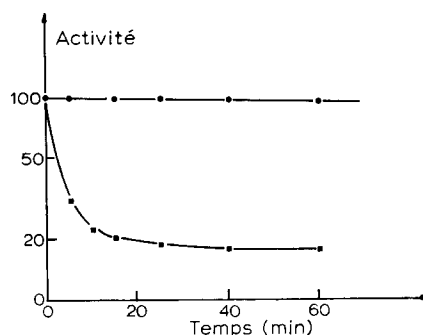


Fig. 9. Inactivation de l'hydrolyase mannonique par le PCMB. Un extrait brut très concentré (30 mg de poids sec par ml) est incubé à température ambiante en présence de PCMB 1 mM. Pour chaque temps d'inactivation une partie aliquote d'extrait est diluée dix fois dans le milieu réactionnel complet mais exempt de  $\text{Fe}^{2+}$  et 2-mercaptoéthanol (37 °C). En ordonnées logarithmiques figurent les activités résiduelles relatives; en abscisses le temps d'inactivation. Le témoin reste pendant le temps de l'inactivation à température ambiante (25 °C). ●—●, témoin sans PCMB; ■—■, + PCMB 1 mM.

#### *Effet du p-chloromercuribenzoate*

Ajouté en même temps que le substrat, le PCMB n'exerce aucun effet jusqu'à la concentration de 0.1 mM. À 1 mM de PCMB la vitesse décroissante de la réaction enzymatique dénote une dénaturation progressive de l'enzyme. Effectivement l'enzyme préincubée avec le PCMB 1 mM est progressivement inactivée (Fig. 9).

Le seuil de sensibilité de cette enzyme au PCMB (1 mM) est relativement élevé comparé à celui de l'enzyme homologue, l'hydrolyase altronique<sup>19</sup>. L'intervention de groupements SH actifs dans le fonctionnement de l'hydrolyase mannonique ne paraît donc pas prépondérante, mais elle n'est cependant pas inexistante: contrairement au 2-mercaptoéthanol qui est sans action, le dithiothréitol et le dithioérythritol (50 mM) doublent ou triplent respectivement l'activité hydrolyasique en l'absence de fer.

#### *Identification du produit réactionnel de l'hydrolyase mannonique*

Lors de la chromatographie des produits de la réaction enzymatique catalysée *in vitro* par l'hydrolyase mannonique, on révèle la présence d'une tache cochromatographiant avec le 2-céto-3-désoxy-D-gluconate authentique (aimablement fourni par J. Pouysségur) ( $R_F = 0.36$ ) et de deux autres taches identifiables à l'acide mannonique et à sa lactone, à l'exclusion de toute autre tache correspondant à l'un des intermédiaires de la séquence des hexuronates, pris comme témoins ou d'un quelconque autre glucide.

Le produit de la déshydratation du D-mannonate assurée par l'hydrolyase mannonique chez la souche K 12 S 3000 est donc très vraisemblablement du 2-céto-3-désoxy-D-gluconate déjà identifié par Smiley et Ashwell<sup>3</sup> chez la souche ATCC 9637.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Melle Gisèle Couchoux pour son excellente collaboration technique.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Biologie Moléculaire) et du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche Associée No. 177). Ce mémoire recouvre en partie les travaux présentés par J. M. Robert-Baudouy pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Physiques (Université Claude Bernard de Lyon).

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ashwell, G., Wahba, A. J. et Hickman, J. J. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1559-1570
- 2 Hickman, J. et Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1566-1570
- 3 Smiley, J. D. et Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1571-1575
- 4 Cynkin, M. A. et Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1576-1579
- 5 Robert-Baudouy, J. M., Portalier, R. M. et Stoeber, F. (1972) *Mol. Gen. Genet.* 118, 351-362
- 6 Robert-Baudouy, J. (1971) Thèse de 3ème cycle, Lyon
- 7 Pratt, J. W. et Richtmyer, N. K. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1906-1908
- 8 Ehrlich, F. et Guttman, R. (1934) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 67, 573-589
- 9 Pouysségur, J. et Stoeber, F. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 1419-1428
- 10 Hudson, C. S. et Isbell, H. S. (1929) *J. Am. Chem. Soc.* 51, 2225-2229
- 11 Glattfeld, J. W. E. et MacMillan, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 2480-2481
- 12 Sistrom, W. R. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 29, 579-587
- 13 Waravdekar, V. S. et Saslaw, L. D. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 24, 439
- 14 Weissbach, A. et Hurwitz, J. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 705-709
- 15 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 16 Warburg, O. et Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384-421
- 17 Lederer, E. (1960) *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique. Applications en Chimie Biologique*, Vol. II, pp. 38-41, Masson
- 18 Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1975

- 19 Jimeno-Abendano, J. (1968) Thèse Ingénieur-docteur, Lyon
- 20 Myers, J. W. et Adelberg, E. A. (1954) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40, 493-507
- 21 Kovachevich, K. et Wood, W. A. (1955) *J. Biol. Chem.* 213, 745-757
- 22 Robert-Baudouy, J., Jimeno-abendano J. et Stoeber, F. (1971) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* 272, 2740-2743
- 23 Herr, E. B. Sumner, Jr, J. B. et Yesair, D. W. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 29-39
- 24 Blumenthal, H. J. et Jepson, N. T. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 282-287
- 25 Stoolmiller, A. C. et Abels, R. H. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5764-5771
- 26 Lineweaver, H. et Burk, D. J. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-663
- 27 Dixon, M. (1953) *Biochem. J.* 55, 160-171
- 28 Reiner, J. M. (1964) in *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M. et Stotz, E. H., eds), Vol. 12, pp. 159-160, American Elsevier Publ. Co.
- 29 Pouysségur, J. et Stoeber, F. (1971) *Biochimie* 53, 771-781
- 30 Nozaki, Y. et Tanford, C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 4074-4081
- 31 Zipser, D. (1963) *J. Mol. Biol.* 7, 113-121
- 32 Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-196
- 33 Changeux, J. P. (1964) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46, 1151-1173
- 34 Shifrin, S. et Steers, J. R. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 133, 463-471
- 35 Harvey, R. A., Godefroy, T., Lucas Lenard, J. et Grunberg Manago, M. (1967) *Eur. J. Biochem.* 1, 327-333