

UTILISATION DE LA CENTRIFUGATION ANALYTIQUE POUR LA MESURE, AU SEIN D'UN EXTRAIT BRUT D'*E. Coli*, DU COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION DU COMPLEXE DE DÉCARBOXYLATION OXIDATIVE DU PYRUVATE

B. SCHMITT, H. KOLB* et R. COHEN

Institut de Biologie Moléculaire, C.N.R.S., Paris VII, 2, place Jussieu Paris 5ème, France

Received 1 October 1971

We have applied successfully the active enzyme analytical centrifugation method (A.E.C.) to the study of the well known pyruvate dehydrogenase complex (P.D.C.) in crude extracts from *E. coli*. It is not possible to study the complex in a spectrophotometer (through its dehydrogenase activity) due to NADH oxidase activities. The A.E.C. method, which overcomes this difficulty, can also be viewed as a refined spectrophotometric method.

1. Introduction

La méthode de centrifugation d'enzyme actif, en bref C.E.A., permet de mesurer, dans une centrifugeuse analytique, le coefficient de sédimentation de certains enzymes pendant qu'ils sont pleinement actifs et sans avoir à les purifier [1, 2]. Il était vraisemblable que cette méthode pouvait aussi être mise à profit dans la recherche de complexes polyenzymatiques dans les extraits bruts. Nous avons appliqué la méthode C.E.A. à l'étude du complexe de décarboxylation oxydative du pyruvate (P.D.C.), dans un extrait brut de *E. Coli*.

2. Matériel

On a utilisé la bactérie *E. Coli*, souche Crooks, fournie par l'Institut Pasteur, Paris. A l'exception du remplacement de cerelose par du glucose, les milieux de préculture et culture utilisés sont ceux décrits par S. Korkes [3]. Les cultures ont été faites dans des erlenmeyers ou des fioles à toxine avec agitation ou aération forcée pour des volumes jusqu'à 3 l, ou dans un fermenteur de 15 l pour un volume de 10 l. La température de culture a été 30° ou 37°; dans le cas de l'utilisation du fermenteur, elle a été de 37°. La

récolte a été faite soit en fin de phase exponentielle, soit en début de phase stationnaire.

2.1. Préparation de l'extrait brut

2 à 5 g de pâte bactérienne ont été suspendus dans du tampon phosphate de potassium 0,02 M pH 7,0, et homogénéisés dans un mélangeur Potter (rapport poids/volume: 2/5).

La suspension bactérienne (~15 ml) a été soniquée dans un désintégrateur MSE avec une sonde effilée pendant une durée variant de 10 à 25 min. La température est restée inférieure à 10°. Les débris cellulaires ont été séparés par centrifugation à 20.000 tpm pendant 30 min dans le rotor 30 d'une centrifugeuse Spinco modèle L.

2.2. Produits chimiques

Les produits chimiques de la qualité la meilleure sur le marché sont utilisés sans purification.

2.3. Centrifugations analytiques (Spinco modèle E)

Vitesse: 33450 tpm; température du rotor: mesurée à 0,1° près entre 20 et 27°; rotor An H ou An D; optique d'absorption avec monochromateur réglé sur 334 nm et fente 1 mm; cellules à frontière préformée à capillaire; volume de la solution de substrats: 0,5 ml; volume du dépôt: 25 à 30 microlitres d'une dilution 80 de l'extrait brut (concentration finale en protéines de l'ordre de 0,25 mg/ml). La quantité de PDC présente dans le dépôt est l'ordre de 50 nanogrammes.

* Adresse actuelle: Institut für Diabetesforschung, 8 München 23 Kölner Platz 1, R.F.A.

3. Méthodes

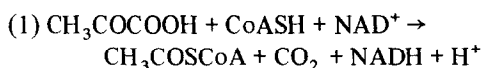
Dans la méthode C.E.A., une mince couche d'enzyme est déposée sur une solution contenant les substrats de la réaction considérée. Ce dépôt se fait dans une cellule de centrifugeuse analytique pendant l'accélération du rotor, à une vitesse de quelques milliers de tours par minutes. La réaction enzymatique est suivie par spectrophotométrie, en utilisant l'optique d'absorption de la centrifugeuse. De la distribution spatiale du produit formé pendant des intervalles de temps égaux, il est possible de déduire le coefficient de sédimentation de l'enzyme considéré. Pour ce travail, on a utilisé la méthode du calcul simplifié [4].

Avant d'effectuer le calcul, nous nous sommes assurés:

—d'une part que la quantité de produit formé varie bien linéairement avec le temps,

—d'autre part que l'extrapolation au temps du dépôt, de la droite $\ln r = f(t)$ qui relie la position de la couche d'enzyme au temps passe bien par le ménisque (à 0,5 mm près).

La décarboxylation oxydative du pyruvate procède comme l'indique la réaction globale suivante:



L'apparition du NADH formé dans cette réaction catalysée par un extrait brut ne peut être suivie dans une cuve de spectrophotomètre, puisque les activités lactate deshydrogénase principalement et NADH oxydase (chaîne respiratoire) présentes dans l'extrait, réoxydent instantanément le NADH qui est produit.

Au contraire, la mesure du NADH formé est possible pendant une centrifugation C.E.A. car l'activité lactate deshydrogénase reste au voisinage du ménisque et ne perturbe pas l'activité NAD⁺ réductase du PDC (fig. 1).

Par ailleurs, la valeur du coefficient de sédimentation n'est affectée que de manière négligeable par la viscosité de la préparation déposée: en effet, le remplacement, à titre de contrôle, de l'extrait brut défini plus haut par un extrait beaucoup plus visqueux obtenu par broyage dans un mortier, ne diminue que de 10% le coefficient de sédimentation.

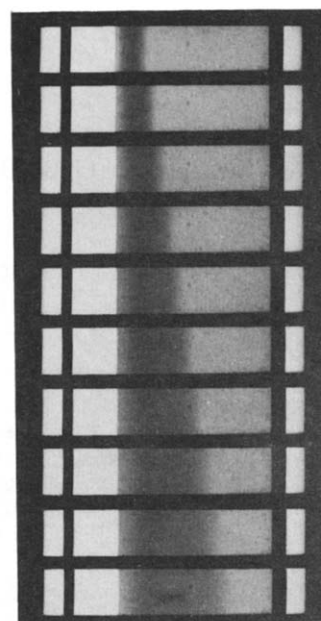


Fig. 1. Film d'une centrifugation à 33.450 tpm; photos toutes les 2 min.

3.1. Composition de la solution de substrats (sauf mention contraire)

Tampon PO₄K pH 7.0: 0.1 M; CoA: 6×10^{-4} M; NAD⁺: 3×10^{-3} M; Pyruvate: 2×10^{-3} M; TPP: 5×10^{-5} M; MgCl₂: 10^{-4} M; Mercaptoéthanol: 6×10^{-3} M.

4. Resultats et discussion

L'activité du PDC dans l'extrait brut, mesurée par densitométrie des photographies prises pendant la centrifugation (fig. 1) est voisine de 200 nM/min mg protéine, en bon accord avec [5]. Le coefficient de sédimentation observé ici $s_{20,w} = 59 \pm 4$ S, est voisin de celui du complexe purifié [5]; nous nous sommes assurés que des extraits bruts dont la concentration protéique varie d'un facteur deux donnent le même coefficient.

Afin d'identifier plus complètement l'activité observée avec celle du PDC, nous avons effectué plusieurs séries de centrifugation C.E.A. au cours desquelles nous avons fait varier d'une manière systématique tous les effecteurs de la réaction globale qu'il catalyse (réaction no. 1).

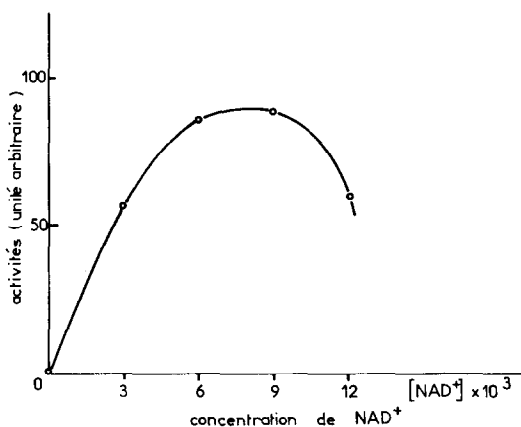


Fig. 2. Variation de l'activité NAD⁺ réductase du PDC en fonction de la concentration de NAD⁺, au cours d'une série de centrifugations.

4.1. Variation de la concentration de magnésium

Le milieu de croissance des bactéries contient du magnésium (0,02% MgSO₄). Un calcul approché nous montre que l'on a une concentration supérieure à 5×10^{-6} M Mg²⁺ dans la solution à 0,25 mg/ml protéines.

L'addition de Mg²⁺ dans la solution de substrats n'est pas nécessaire pour l'obtention d'une bonne activité. Toutefois, puisque la concentration du dépôt varie d'une expérience à l'autre, nous ajoutons du magnésium dans la solution de substrats dans tous les cas, de sorte que sa concentration soit de l'ordre de 10^{-4} M.

4.2. Variation de la concentration de TPP

L'activité varie peu en fonction de (TPP) entre 10^{-6} M et 6×10^{-3} M. Elle baisse lentement pour (TPP) $< 10^{-6}$ M. Il n'y a pas d'activité en absence de TPP.

4.3. Variation de l'agent réducteur

L'addition d'un agent réducteur est nécessaire pour une bonne activité. Une concentration de 5×10^{-3} M cystéine ou mercaptoéthanol est suffisante. Sans agent réducteur, on obtient une certaine activité, peut-être due à la présence de coenzyme A.

4.4. Variation de la concentration de pyruvate

Nous avons fait varier le pyruvate entre zéro et 10^{-2} M. L'activité, nulle en l'absence de pyruvate, est

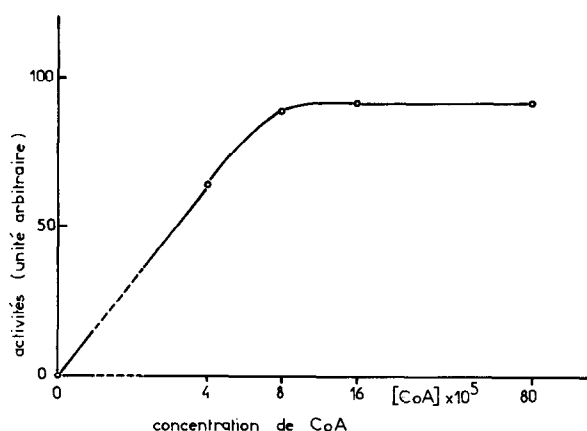


Fig. 3. Variation de l'activité NAD⁺ réductase du PDC en fonction de la concentration de CoA, au cours d'une série de centrifugations.

constante entre 5×10^{-4} M et 10^{-2} M. Nous choisissons une concentration de 2×10^{-3} M pour les expériences courantes et nous montrons dans le tableau no. 1 qu'autour de cette valeur, le coefficient de sédimentation ne varie pas de manière significative. D'autre part, l' α -cetobutyrate donne une activité nettement plus petite que le pyruvate.

4.5. Variation de la concentration de NAD⁺

Nous avons fait varier la concentration de NAD⁺ entre zéro et 12×10^{-3} M. L'activité est constante entre $6-9 \times 10^{-3}$ M. Au-dessus de 10^{-2} M, apparaît une inhibition de l'activité (fig. 2).

Dans les expériences usuelles, nous avons une concentration de NAD⁺ de 3×10^{-3} M à 4×10^{-3} M. Nous montrons sur le tableau 1 qu'une augmentation de (NAD⁺) jusqu'à 12×10^{-3} M ne modifie pas de manière significative la valeur du coefficient de sédimentation du PDC.

4.6. Variation de la concentration de coenzyme A

L'activité en fonction de (CoA) varie comme l'indique la fig. 3. Dans les expériences courantes, nous avons une concentration de (CoA) de l'ordre de 6×10^{-4} M et nous montrons dans le tableau 1, qu'autour de cette valeur, le coefficient de sédimentation du PDC ne varie pas de manière significative.

Tableau 1

Pyruvate ($\times 10^3$ M)	1	2	4
$s_{20,w}$ (en S)	61	$\begin{Bmatrix} 61 \\ 57 \end{Bmatrix}$	60
$NAD^+ \times 10^3$ M	3	6	9
$s_{20,w}$	62	58	61
$CoA \times 10^4$ M	3	6	12
$s_{20,w}$	55	$\begin{Bmatrix} 61 \\ 56 \end{Bmatrix}$	62

Valuers du coefficient de sédimentation du PDC présent dans l'extrait brut, pour plusieurs concentrations de NAD^+ , de CoA et de pyruvate.

4.7. Action d'acétyl CoA et GTP

Des auteurs [6] ont montré l'action inhibitrice sur PDC d'acétyl CoA et GTP. Dans nos conditions habituelles de centrifugation, nous avons ajouté de l'acétyl CoA à la concentration de 2×10^{-3} M. Nous avons constaté une inhibition de l'ordre de 50% de l'activité PDC. Nous avons noté un léger accroissement de $s_{20,w}$, sans signification eu égard à la précision de nos mesures.

Nous avons de même ajouté du GTP à la concentration de 5×10^{-3} M. Nous avons noté une inactivation en cours de centrifugation qui semble significative, de l'ordre de 30% de l'activité perdue en 12 min. Puisque l'activité n'est pas constante au cours du temps, il ne nous est pas possible de calculer le coefficient de sédimentation dans ces conditions.

5. Conclusions

La méthode de centrifugation analytique utilisée ici permet donc:

—de mettre en évidence, au sein d'un extrait brut un complexe polyenzymatique et de déterminer son coefficient de sédimentation lorsque l'un des substrats ou l'un des produits de la chaîne de réactions est observable (directement ou par couplage avec une autre précision) par voie spectrophotométrique.

—de parvenir à ce résultat et d'étudier spécifiquement les effets de divers effecteurs sur ce complexe alors même que, dans l'extrait brut, certains enzymes agissent sur le produit ou le substrat que l'on observe.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'un contrat de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat no. 67 00 508 du comité de biologie moléculaire); par ailleurs, l'un de nous (H.K.) a bénéficié d'une aide de Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg RFA. L'aide de Madame A. Larousse, collaboratrice technique au C.N.R.S. nous a été très précieuse.

References

- [1] R. Cohen et M. Mire, *European J. Biochem.*, sous presse.
- [2] R. Cohen et M. Mire, *European J. Biochem.*, sous presse.
- [3] S. Korkes, in: *Methods in Enzymology* Vol. 1, eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Academic Press, New York, 1955) p. 491.
- [4] R. Cohen et C.W. Hahn, *Cr. Hebd. Seances Acad. Sci. (Paris)* 260 (1965) 2077.
- [5] L.J. Reed and R. Willms, in: *Methods in Enzymology* Vol. 9, ed. W.A. Wood (Academic Press, New York, 1966) p. 252.
- [6] R. Schwartz and L.J. Reed, *Biochemistry* 6 (1970) 1434.