

velocities of various «active esters», test conditions have been chosen so that «pseudo-first order» reactions occur; this allows the characterization of the different «active esters» based on a half-value period which is independent of concentration.

On one of the «active esters» examined the activation energy was ascertained under both pseudo-first and second order reaction conditions.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG. Basel

214. L'inhibition de la décarboxylase de l'acide glutamique par le complexe cuivrique de l'isoniazide

par J. MAURON et E. BUJARD

Dédié au Prof. Dr. F. LEUTHARDT à l'occasion de son 60^e anniversaire

(8 VI 63)

Introduction. – Il est fort bien connu que le coenzyme des décarboxylases bactériennes est généralement constitué par le pyridoxal-phosphate. Il a été ainsi possible de scinder certaines décarboxylases bactériennes (de la lysine, tyrosine, arginine, ornithine) en apoenzyme et coenzyme et de réactiver l'apoenzyme avec le pyridoxal-phosphate¹). Cependant, cette preuve directe de la participation du dérivé de la vitamine B₆ à l'activité décarboxylante n'a pas été faite dans chaque cas.

Une preuve indirecte et moins rigoureuse peut alors suppléer à cette carence: l'inhibition de l'enzyme par les réactifs du groupe carbonyle. Or, la décarboxylase de l'acide glutamique du *Clostridium Welchii* S.R. 12 n'est que très peu inhibée par ces réactifs et on n'a pas pu séparer un coenzyme, si bien que GALE¹) avait mis en doute la présence de pyridoxal-phosphate dans cette décarboxylase, ainsi que dans celle de l'histidine provenant du *Cl. Welchii* également.

A la suite des travaux de DAVISON²) sur le mécanisme de l'inhibition des décarboxylases par l'isoniazide, où l'auteur entrevoit dans l'inhibition progressive par l'isoniazide un nouveau test pour déceler la présence de pyridoxal-phosphate dans un enzyme, nous nous sommes proposé de revoir la question de la nature du coenzyme de cette décarboxylase, en étudiant le mécanisme de son inhibition par l'isoniazide.

Partie expérimentale

Décarboxylase. – Le *Clostridium Welchii* S.R.12 employé comme source de l'enzyme est cultivé selon KREBS³). Après centrifugation et lavages, les bactéries sont suspendues dans l'eau et lyophilisées. Cette poudre de bactéries, préparée en grand et conservée sous vide a servi à tous les essais.

Homogénat: Pour chaque essai, les bactéries sont suspendues; la poudre lyophilisée est reprise dans une solution de NaCl 0,45% puis homogénéisée dans l'appareil de POTTER. L'homogénat contient en majeure partie des cellules intactes. Sauf indication contraire, les essais sont faits avec l'homogénat.

¹) E. F. GALE, The bacterial amino acid decarboxylases. *Advances Enzymol.* VI, 1 (1946).

²) A. N. DAVISON, *Biochim. biophysica Acta* 79, 131 (1956).

³) H. A. KREBS, *Biochem. J.* 43, 51 (1948).

Extrait: A titre comparatif, des extraits sont préparés en broyant les bactéries suspendues dans un peu d'eau glacée avec de la poudre de verre. La pâte ainsi formée est reprise dans l'eau salée (0,45%) et la suspension, centrifugée à froid à 10 000 tours pendant 15 min. Le surnageant, libre de tout débris cellulaire, a été utilisé pour les essais. Les résultats ne diffèrent guère de ceux obtenus avec l'homogénat.

Substrats. – L'isonicotinylhydrazide (isoniazide, INH) a été mis gracieusement à notre disposition par la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G., Bâle. – Le monochlorhydrate de pyridoxal provenait de la NUTRITIONAL BIOCHEMICAL CORPORATION et le glutamate de Na de la maison ACCENT (Chicago). – Le cétaulon (bromure de cétyltriméthylammonium) provenait de la maison FLUKA, Buchs, St-Gall. – L'isonicotinylhydrazone du pyridoxal a été préparée comme précédemment⁴).

Méthodes. – *Détermination de l'activité résiduelle*: La décarboxylation de l'acide glutamique a été suivie manométriquement dans l'appareil de WARBURG à 30°. 0,5 ml d'homogénat, correspondant à 3 mg de poudre de bactéries lyophilisées, est introduit dans la partie centrale d'une fiole de WARBURG à deux appendices. Du tampon acétate (pH 4,5; conc. finale 0,125 N) contenant du cétaulon (conc. finale $4,5 \cdot 10^{-3}$ M) et de l'eau distillée sont ajoutés. Les essais préliminaires ayant montré que l'isoniazide est sans effet sur la décarboxylase, ce dernier est également pipeté dans la partie centrale. La solution d'inhibiteur (CuSO_4) est mise dans un des deux appendices et le substrat (glutamate de Na, conc. finale $2,2 \cdot 10^{-2}$ M) dans l'autre. Dans les conditions standard, l'essai s'effectue dans l'air. Les essais où l'air est remplacé par de l'azote sont mentionnés expressément. Après équilibration, le CuSO_4 est versé dans la partie centrale à intervalles fixes.

A la fin de l'incubation avec l'inhibiteur, le substrat en excès est ajouté et l'activité enzymatique déterminée. Pour cela, la production de CO_2 est mesurée de 5 en 5 minutes, aussi longtemps qu'elle reste essentiellement linéaire (25–30 min). Le développement de CO_2 a été calculé selon la méthode simplifiée des carrés minimums⁵) et l'activité enzymatique exprimée en $\text{mm}^3 \text{CO}_2/\text{min}$ pour 10 mg de décarboxylase. La cinétique de l'inhibition enzymatique est traitée d'une manière semblable à celle de l'inhibition de la choline-estérase par les organophosphates⁶).

Détermination de K_s et K_i : Pour établir ces constantes de dissociation, la décarboxylase est incubée en présence de substrat seul ou de substrat et d'inhibiteur. Le centre de la fiole WARBURG contient le tampon + cétaulon (conc. finale $4 \cdot 10^{-3}$ M), le glutamate de Na en concentrations croissantes, puis l'isoniazide et le CuSO_4 de concentration «effective» constante. L'appendice renferme l'enzyme (3 mg). La quantité de CO_2 produite pendant les 10 minutes suivant l'addition de l'enzyme divisée par 3 a été prise comme mesure de la vitesse de décarboxylation. La réciproque de cette valeur ($1/v$) est placée en ordonnée et la réciproque de la concentration en substrat ($1/s$) en abscisse d'un graphique selon LINEWEAVER & BURK⁷). Les valeurs pour K_s et K_i sont établies d'après ces graphiques. K_s a aussi été estimée en prolongeant la droite $1/v = K_s/(V_{\max} \cdot s) + 1/V_{\max}$ vers la gauche jusqu'à ce qu'elle coupe l'abscisse à la valeur $1/s = -1/K_s$ (DIXON⁸)).

Ces constantes de dissociation sont des constantes apparentes, puisque nous ne travaillons pas avec un enzyme purifié.

Mesures spectrophotométriques: Les spectres d'absorption de 220 à 500 $\mu\mu$ ont été établis avec le spectrophotomètre BECKMAN modèle DB pour le pyridoxal, l'isoniazide et l'isonicotinylhydrazone du pyridoxal, tous à la concentration $5 \cdot 10^{-5}$ M, à pH 4,5 et en présence de cétaulon. Le spectre du complexe cuivrique de l'isonicotinylhydrazone du pyridoxal a été mesuré 60 min après avoir mélangé les deux solutions équimolaires de l'hydrazone INH-pyridoxal et de CuSO_4 (conc. finales $5 \cdot 10^{-5}$ M). L'addition d'une quantité dix fois supérieure de cuivre modifie à peine le spectre, ce qui montre que l'équilibre est en faveur du complexe cuivrique de l'hydrazone, comme nous l'avions déjà observé précédemment⁴). La formation du complexe cuivrique de l'hydrazone INH-pyridoxal à partir d'isoniazide, pyridoxal et Cu^{++} a été suivie à 400 $\mu\mu$, où les substances de départ ne montrent aucune absorption.

Les mesures ont été effectuées à température ordinaire ($\sim 25^\circ$). Les concentrations utiles pour suivre la vitesse de réaction sont entre 1 et $3 \cdot 10^{-4}$ M.

⁴) J. MAURON & E. BUJARD, Bull. Soc. chim. belges 65, 140 (1956).

⁵) W. N. ALDRIDGE, W. K. BERRY & D. R. DAVIES, Nature 164, 925 (1949).

⁶) W. N. ALDRIDGE, Biochem. J. 46, 451 (1950).

⁷) H. LINEWEAVER & D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934).

⁸) M. DIXON, Biochem. J. 55, 170 (1953).

Résultats

a) *Inhibition par l'isoniazide*: La première constatation que nous avons faite est celle de l'extraordinaire résistance de la décarboxylase de l'acide glutamique à l'isoniazide. En effet, même à une concentration 0,5 M d'isoniazide l'inhibition n'est que de 14% en 45 minutes. Selon VILTER⁹⁾, DAVISON²⁾ et nous-mêmes⁴⁾, l'inhibition des enzymes à pyridoxal-phosphate serait due à la formation d'une hydrazone entre pyridoxal et isoniazide. La grande inertie de l'isoniazide dans le cas qui nous occupe concorde avec la constatation de GALE¹⁰⁾, à savoir l'insensibilité de la décarboxylase de l'acide glutamique envers les réactifs du groupe carbonyle. L'inhibition par l'isoniazide proposée par DAVISON²⁾ comme nouveau critère distinctif de tous les enzymes à vitamine B₆ s'est donc avéré dès le début inopérant. Il fallait en conclure soit que la décarboxylase que nous étudions ne contenait pas de pyridoxal-phosphate, soit que le coenzyme était stériquement empêché de réagir avec l'inhibiteur. Optant pour cette dernière hypothèse, nous avons cherché à activer la réaction de l'isoniazide avec le coenzyme par l'addition d'ions cuivriques. Nous avons en effet observé dans une étude précédente¹¹⁾ que l'inhibition de la transaminase glutamico-pyruvique par l'isoniazide était plus que centuplée par l'addition de cuivre.

b) *Inhibition par le complexe INH-Cu⁺*: Nous avons d'abord étudié l'effet du Cu⁺⁺ sur la formation de l'isonicotinylhydrazone du pyridoxal. Après avoir établi les spectres d'absorption de l'isoniazide, du pyridoxal, de l'hydrazone et du complexe

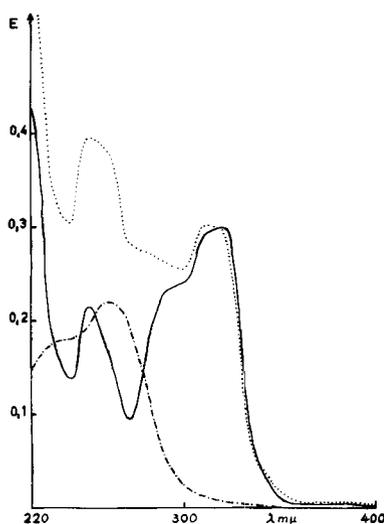


Fig. 1. Spectres d'absorption dans tampon

acétate pH 4,5 avec cétavlon
 - · - · - Isoniazide (INH);
 — Pyridoxal-HCl;
 · · · · INH + Pyridoxal-HCl

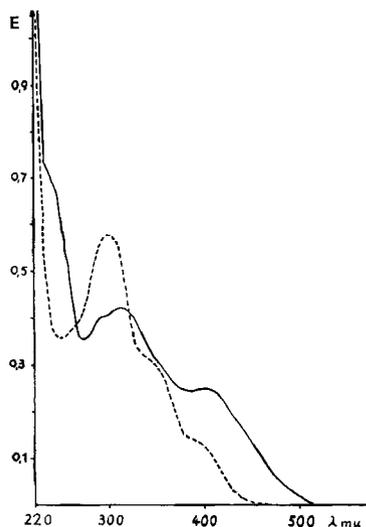


Fig. 2. Spectres d'absorption dans tampon

acétate pH 4,5 avec cétavlon
 - - - - Hydrazone INH-Pyridoxal;
 — Complexe cuivreux de l'hydrazone
 INH-Pyridoxal

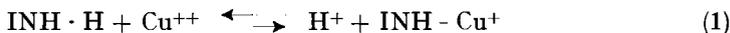
⁹⁾ R. W. VILTER, J. P. BIEHL, J. F. MUELLER & B. I. FRIEDMAN, *Federation Proc.* **13**, 776 (1954).

¹⁰⁾ E. S. TAYLOR & E. F. GALE, *Biochem. J.* **39**, 52 (1945).

¹¹⁾ J. MAURON, *Voeding* **16**, 482 (1955).

cuvrique de l'hydrazone (Fig. 1 et 2), nous avons suivi la formation de l'hydrazone à 400 μ . Mis en présence en solution diluée, le pyridoxal (conc. $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$) et l'isoniazide (conc. $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$) ne réagissent pas ensemble dans le laps d'un jour. Il suffit d'ajouter du Cu^{++} (CuSO_4 : $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$) pour que l'hydrazone se forme. Dans ces conditions, la réaction peut être suivie jusqu'à la fin et on peut lui appliquer l'expression du premier ordre. Il s'agit vraisemblablement d'une réaction bimoléculaire, où la concentration de l'un des composants reste pratiquement constante.

Or, selon PAPOFF & TURCHI¹²⁾ l'isoniazide forme avec les ions cuivriques un complexe 1:1 selon l'équation:



avec une constante d'équilibre $K = 5,3 \cdot 10^{-4}$.

Nous devons alors admettre que c'est ce complexe cuivrique de l'isoniazide qui se lie au pyridoxal par l'intermédiaire du groupe phénolique de ce dernier et que la formation de l'hydrazone en est facilitée. La concentration de $\text{INH} - \text{Cu}^+$ est maintenue constante au cours de la réaction, le complexe se reformant à partir du pool de $\text{INH} \cdot \text{H} + \text{Cu}^{++}$.

Afin d'établir une relation entre l'effet du Cu^{++} sur cette formation de l'hydrazone (réaction bimoléculaire) et sur l'inhibition de la décarboxylase par l'isoniazide, nous avons étudié la cinétique de l'inhibition de l'enzyme par le complexe cuivrique de l'isoniazide.

Comme il n'est pas possible d'avoir en solution à pH 4,5 du complexe $\text{INH} - \text{Cu}^+$ sans avoir un excès d'ions Cu^{++} libres, il nous fallait d'abord examiner l'action inhibitrice du cuivre seul. L'enzyme s'est montré plus sensible envers le cuivre

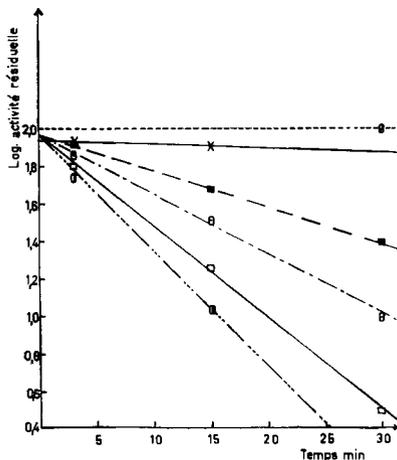


Fig. 3. Inhibition de la décarboxylase par isoniazide, Cu^{++} et $\text{INH} - \text{Cu}^+$

⊗	INH	0,1M		
×	—	Cu^{++}	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$		
■	- - -	Cu^{++}	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ + INH $7,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$	→	$0,18 \cdot 10^{-4} \text{M}$
○	- · - · -	Cu^{++}	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ + INH $1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	→	$0,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$
□	—	Cu^{++}	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ + INH $3,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$	→	$0,71 \cdot 10^{-4} \text{M}$
●	- · - · -	Cu^{++}	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ + INH $6,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$	→	$1,34 \cdot 10^{-4} \text{M}$

¹²⁾ P. PAPOFF & N. TURCHI, *Ricerca sci.* 28, 812 (1958).

qu'envers l'isoniazide. En présence de Cu^{++} $0,001\text{M}$ l'inhibition est de 20% en 45 minutes.

Ceci étant acquis, nous avons ajouté aux ions cuivriques, dont la concentration était maintenue constante à un niveau bas, des quantités croissantes d'isoniazide. L'inhibition de la décarboxylase était renforcée par la présence d'isoniazide, et cela en fonction des quantités d'isoniazide ajoutées, c'est-à-dire de la formation du complexe INH-Cu^+ (v. fig. 3, où le log. de l'activité résiduelle est représenté en fonction de la durée d'action de l'inhibiteur). Pour une concentration donnée d'inhibiteur on obtient des droites, indiquant que la réaction manifeste les caractéristiques d'une réaction monomoléculaire lorsque la concentration de l'inhibiteur est constante:

$$K_1 t = \ln [a/(a - x)], \tag{2}$$

où a = activité initiale, x = diminution de l'activité due à l'inhibiteur, t = temps en minutes et K_1 = constante de vitesse de la réaction monomoléculaire.

Si b = l'activité résiduelle exprimée en %, on a

$$K_1 t = \ln (100/b) \tag{3}$$

Cette équation (3) est dérivée de la formule conventionnelle pour une réaction bimoléculaire quand une des substances réagissantes est en excès, à savoir, dans notre cas

$$K_2 t = \frac{1}{I} \ln \frac{100}{b} \tag{4}$$

où I représente la concentration molaire de l'inhibiteur et K_2 la constante de vitesse

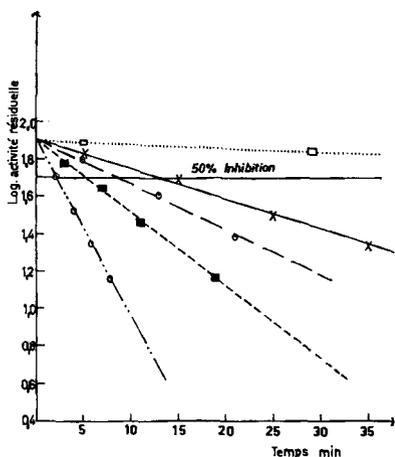


Fig. 4. Cinétique de l'inhibition de la décarboxylase par INH-Cu^+

- | | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| □ $\text{Cu}^{++} 1,00 \cdot 10^{-3}\text{M}$ | INH-Cu^+ |
| × ——— $\text{Cu}^{++} 5,00 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | × ——— $0,31 \cdot 10^{-4}\text{M}$ |
| ○ ——— $\text{Cu}^{++} 6,25 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | ○ ——— $0,48 \cdot 10^{-4}\text{M}$ |
| ■ ——— $\text{Cu}^{++} 7,50 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | ■ ——— $0,68 \cdot 10^{-4}\text{M}$ |
| ○ ···· $\text{Cu}^{++} 1,00 \cdot 10^{-3}\text{M}$ | ○ ···· $1,17 \cdot 10^{-4}\text{M}$ |
| $\text{INH} = 8 \text{ fois } \text{Cu}^{++}$ | Incubation sous N_2 |

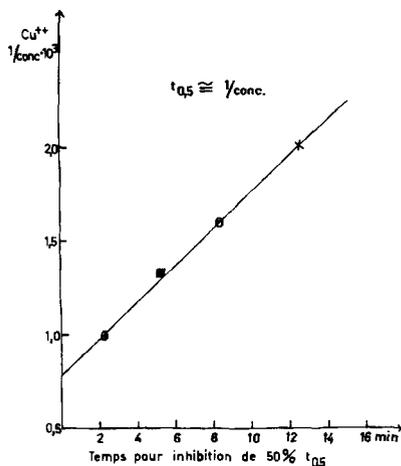


Fig. 5 Démonstration que le temps pour une inhibition de 50% est inversement proportionnel à la concentration

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| Cu^{++} | |
| × $5,00 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | |
| ○ $6,25 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | $\text{INH} = 8 \text{ fois } \text{Cu}^{++}$ |
| ■ $7,50 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | |
| ○ $1,00 \cdot 10^{-4}\text{M}$ | Incubation sous N_2 |

pour une réaction bimoléculaire. Quand I est une constante, $K_2 I = K_1$ nous retom bons dans l'équation (3).

Dans l'étude cinétique résumée dans la figure 4, ce n'est plus la concentration en cuivre mais le rapport $\text{Cu}^{++} : \text{INH}$ qui est maintenu constant (1:8), et l'incubation a été effectuée sous azote. Pour chaque concentration d'inhibiteur une droite différente est obtenue comme précédemment. Aussi bien dans la figure 3 que dans la figure 4 une légère anomalie apparaît: les droites ne convergent pas sur l'ordonnée à la valeur $\log 2,0$, mais un peu au-dessous. Ceci est dû au fait que le cuivre à lui seul a une faible action inhibitrice sur la décarboxylase et que cet effet est en partie instantané.

La démonstration que le temps pour une inhibition de 50% est inversement proportionnel à la concentration de l'inhibiteur est apportée dans la figure 5. Ceci confirme que la réaction d'inhibition – ou son étape la plus lente – est de nature bimoléculaire. En effet, si nous introduisons dans l'équation (4) $b = 50$ et $t = t_{0,5}$, nous avons

$$t_{0,5} = \frac{1}{K_2 I} \ln 2 = \frac{1}{I} \cdot K. \quad (5)$$

La constante de vitesse bimoléculaire $K_{2 \text{ app.}}$ pour l'inhibition de la décarboxylase a été estimée selon l'équation (4) en utilisant les données contenues dans la figure 4. I , la concentration de l'INH-Cu⁺, est calculée d'après (1). Dans ces conditions d'expérience (incubation sous N₂; INH = 8 × Cu⁺⁺) $K_{2 \text{ app.}}$ a une valeur de $\sim 1,4 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Nous n'avons pas étudié systématiquement la cinétique d'inhibition lors de l'incubation dans l'air, mais nous avons trouvé que la vitesse d'inhibition est ralentie dans ces conditions. La vitesse de réaction est encore plus sensible à l'absence de cétaвлон, détergent cationique présent dans tous nos essais de décarboxylation. Si on l'omet, la vitesse de réaction est fortement réduite (fig. 6). L'effet du cétaвлон n'est pas dû à une augmentation de la perméabilité cellulaire, car la même observation est faite avec l'extrait de décarboxylase, ne contenant aucune cellule (fig. 6). Ceci est conforme à l'observation de HUGHES¹³⁾, qui a montré

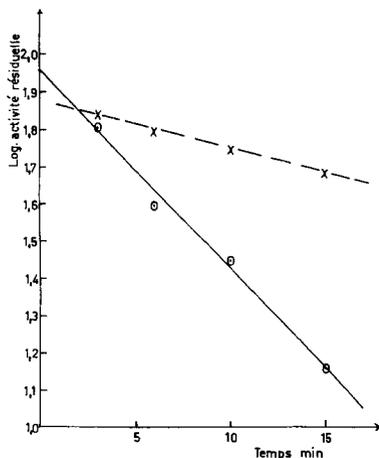


Fig. 6. Influence du cétaвлон sur l'inhibition de la décarboxylase

$\text{Cu}^{++} 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
 INH = 4 fois Cu^{++}
 INH-Cu⁺ $0,62 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 × — — — sans cétaвлон
 ○ — — — avec cétaвлон
 Extrait de décarboxylase

¹³⁾ D. E. HUGHES, *Biochem. J.* 45, 325 (1949).

que l'activation de la décarboxylation de l'acide glutamique par le cétavlon se manifeste aussi bien avec les bactéries intactes qu'avec l'extrait de l'enzyme. Nous reviendrons sur cette question de l'action du cétavlon lors de la discussion de son effet sur K_i .

En résumé, l'inhibition de la décarboxylase par l'INH-Cu⁺ est progressive et suit la loi du premier ordre pour une réaction bimoléculaire (pseudomonomoléculaire) lorsqu'un des composants est en excès. La réaction entre INH-Cu⁺ et pyridoxal montre les mêmes caractéristiques.

c) *Incubation simultanée de l'enzyme avec l'inhibiteur et le substrat*: Afin de déterminer la constante de MICHAELIS d'une part et la nature de l'inhibition par l'INH-Cu⁺ d'autre part, la décarboxylase a été incubée avec des quantités croissantes de substrat en présence d'une quantité constante d'inhibiteur. Une difficulté apparut cependant immédiatement: celle de maintenir le taux d'inhibiteur constant pour des quantités croissantes de substrat. En effet, le complexe INH-Cu⁺ est en équilibre, selon (1), avec un excès d'ions cuivriques libres. Or, ces derniers forment avec le substrat, à savoir l'acide glutamique, un complexe cuivrique diminuant ainsi la concentration en Cu⁺⁺ et déplaçant alors l'équilibre de (1) vers la gauche. Afin de maintenir la concentration en INH-Cu⁺ constante pour des teneurs croissantes en acide glutamique, il fallait ajouter progressivement du Cu⁺⁺ et de l'isoniazide. L'excès nécessaire pour maintenir la concentration en INH-Cu⁺ constante a été déterminé empiriquement en prenant comme mesure de sa concentration son action inhibitrice sur la décarboxylase.

La manière de procéder ressort de la figure 7. Dans un même essai la décarboxylase est incubée pendant un temps fixe (ici: 15 min) avec trois concentrations d'inhibiteur seul (ici: [Cu⁺⁺] = $6,5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-3} M et $1,5 \cdot 10^{-3}$ M; [INH] = toujours 4 fois conc. du Cu⁺⁺) ainsi qu'avec la concentration la plus forte d'inhibiteur et trois concentrations de glutamate (ici: 10^{-3} M, $3 \cdot 10^{-3}$ M et $2 \cdot 10^{-2}$ M). Le log de l'activité résiduelle est placé en fonction de la concentration en Cu⁺⁺. Les trois points avec l'inhibiteur seul sont reliés par une ligne, qui est approximativement une droite pour des activités résiduelles entre 40 et 4%. Les valeurs obtenues en présence de glutamate sont rapportées sur cette droite, où elles correspondent à certaines concentrations en Cu⁺⁺ sur l'abscisse. Ainsi, l'inhibition obtenue avec une teneur $1,5 \cdot 10^{-3}$ M en Cu⁺⁺, $6 \cdot 10^{-3}$ M en INH et $3 \cdot 10^{-3}$ M en glutamate est égale à celle observée avec une concentration $1,18 \cdot 10^{-3}$ M de Cu⁺⁺ et $4,72 \cdot 10^{-3}$ M de INH en l'absence de glutamate. La concentration «effective» du Cu⁺⁺ a donc diminué de 21% en présence de glutamate $3 \cdot 10^{-3}$ M. C'est là l'excès de cuivre et d'isoniazide qu'il faudra ajouter au taux désiré de Cu⁺⁺ et d'isoniazide quand le glutamate a une concentration $3 \cdot 10^{-3}$ M. Pour les différentes teneurs en glutamate cet excès à ajouter est établi par extrapolation graphique en dessinant la diminution de la concentration «effective» du Cu⁺⁺ en fonction du log de la teneur en glutamate. Les valeurs ainsi calculées ont été ajustées par l'expérience et elles ont permis de maintenir le degré d'inhibition constant pour des concentrations variables de glutamate.

Il était alors possible de procéder à la détermination de la nature de l'inhibition. Le graphique selon LINEWEAVER & BURK⁷⁾ présenté dans la figure 8 montre qu'il s'agit d'une inhibition compétitive. En effet, l'interception sur l'ordonnée ($1/V_{max}$) n'est pas modifiée par la présence de l'inhibiteur. A partir de plusieurs essais du même type la constante de MICHAELIS et la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur K_i ont été estimées (Tableau, p. 1904). La concentration de l'inhibiteur (INH-Cu⁺) a été calculée selon (1).

Ces valeurs de K_s et K_i montrent que l'enzyme a une affinité plus grande pour l'inhibiteur que pour le substrat.

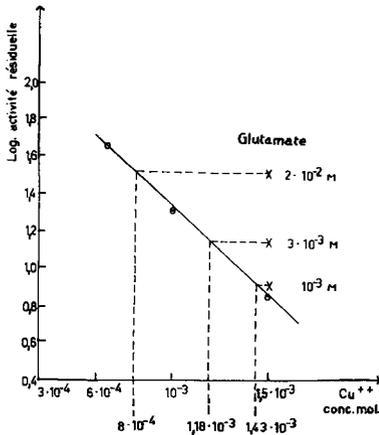


Fig. 7. Estimation de la concentration « effective » de l'INH-Cu⁺ en présence de glutamate
 ○ Inhibition de la décarboxylase par Cu⁺⁺ + 4 INH; × Inhibition de la décarboxylase par Cu⁺⁺ 1,5·10⁻³ M + INH 6·10⁻³ M en présence de glutamate

Nous avons vu plus haut que la vitesse d'inhibition de la décarboxylase était beaucoup plus lente en l'absence de cétavlon. Il était alors intéressant de voir si l'omission du cétavlon modifiait l'affinité de l'inhibiteur pour la décarboxylase. Dans la figure 9 un essai d'inhibition avec et sans cétavlon est représenté. Il montre qu'en effet si le cétavlon est omis, K_i est à peu près doublée, c'est-à-dire que l'affinité

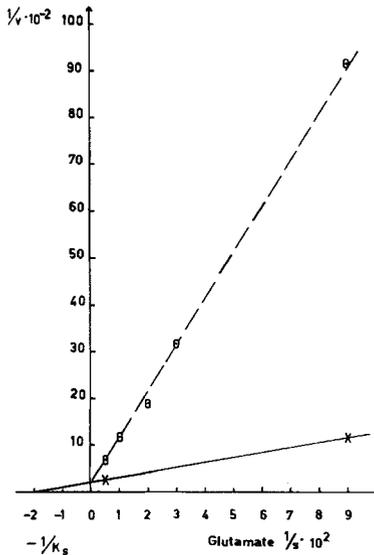


Fig. 8. Inhibition de la décarboxylase par INH-Cu⁺. Graphique selon LINEWEAVER & BURK. Détermination de K_i et K_s
 × — Glutamate, conc. 2·10⁻² M et 1,11·10⁻³ M
 ○ — — — Glutamate, conc. de 2·10⁻² à 1,11·10⁻³ M + INH-Cu⁺ à la conc. « eff. » de 1·10⁻⁴ M

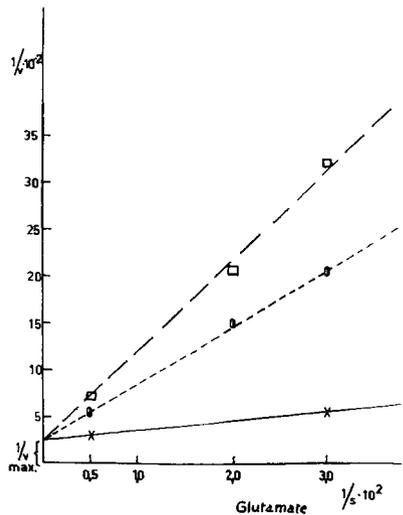


Fig. 9. Influence du cétavlon sur l'inhibition de la décarboxylase par INH-Cu⁺
 × — Glutamate, conc. 2·10⁻² et 3,3·10⁻³ M
 ○ — — — Glutamate, conc. de 2·10⁻² à 3,3·10⁻³ M + INH-Cu⁺, conc. « eff. » 1·10⁻⁴ M sans cétavlon
 □ — — — Glutamate, conc. de 2·10⁻² à 3,3·10⁻³ M + INH-Cu⁺, conc. « eff. » 1·10⁻⁴ M avec cétavlon

apparente de l'inhibiteur pour l'enzyme est diminuée de moitié. Cette action du cétavlon se manifeste de même manière avec l'extrait de décarboxylase.

Le cétavlon ayant le pouvoir de modifier l'affinité apparente entre enzyme et inhibiteur, nous avons étudié s'il avait aussi un effet sur l'affinité entre la décarboxylase et son substrat. La figure 10 montre que tel n'est pas le cas dans nos conditions d'expérience (pH 4,5), puisque les constantes de MICHAELIS sont identiques, avec ou sans cétavlon. Le détergent agit par contre sur l'enzyme comme si un faible inhibiteur non compétitif était éliminé. Sur ce point précis nos résultats diffèrent de ceux de HUGHES¹³⁾, qui avait trouvé, à pH 4,1 il est vrai, que le cétavlon influençait l'enzyme en présence de substrat, d'une manière qui correspondrait à la suppression d'un inhibiteur compétitif. Quoiqu'il en soit, il est assez malaisé de fournir une explication valable pour l'effet divergent du cétavlon sur K_s , où il est nul, et sur K_i , qu'il diminue. Rappelons cependant que certains détergents forment avec des protéines des complexes (NEURATH¹⁴⁾), et que HUGHES¹³⁾ a montré que dans un extrait de *Cl. Welchii* S.R.12 le cétavlon précipitait toute l'activité décarboxylante et que le précipité se colorait en jaune vif avec le méthylorange, témoin de la formation de micelles dues au détergent¹⁵⁾. Il est donc probable que c'est dans la formation de ces micelles qu'il faille chercher la cause de l'effet du cétavlon.

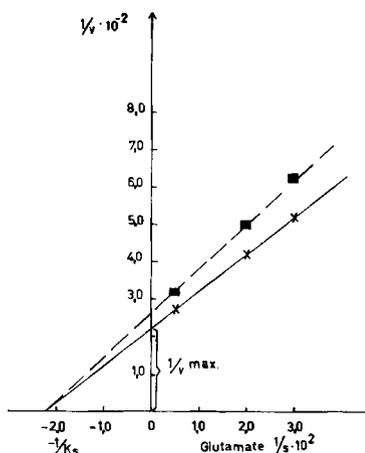


Fig. 10. Influence du cétavlon sur l'affinité de la décarboxylase pour le glutamate
 × ——— Glutamate avec cétavlon
 ■ - - - Glutamate sans cétavlon

L'incubation sous azote accélérant l'inhibition de l'enzyme, nous avons également étudié l'effet de l'azote sur l'affinité apparente entre la décarboxylase et le complexe cuivrique de l'isoniazide. Comme on pouvait s'y attendre, cette affinité est un peu augmentée quand l'air est remplacé par de l'azote, tandis que l'affinité entre enzyme et substrat est diminuée (Tableau).

Enfin, après avoir démontré la nature compétitive de l'inhibition de la décarboxylase par l' INH-Cu^+ , il y avait intérêt à connaître le caractère de l'inhibition, beaucoup plus faible, par le cuivre seul. La figure 11 révèle que cette inhibition est essentiellement du type non compétitif¹⁶⁾. Le cuivre agit probablement sur

¹⁴⁾ F. W. PUTMAN & H. NEURATH, J. biol. Chemistry 160, 397 (1945).

¹⁵⁾ G. S. HARTLEY, Trans. Faraday Soc. 30, 444 (1923).

¹⁶⁾ L'augmentation de la pente de la droite obtenue avec l'inhibiteur est un peu plus forte que l'augmentation correspondante de la valeur $1/v \text{ max}$ sur l'ordonnée. Il est donc possible que l'inhibition par le Cu^{++} ne soit pas purement non compétitive. Nos données ne sont pas suffisantes pour trancher la question, d'autant plus que pour maintenir le taux en Cu^{++} constant nous devons augmenter fortement la concentration en cuivre total parallèlement à l'accroissement du taux en glutamate.

des groupes actifs de l'apoenzyme. Son affinité pour l'enzyme est cent fois plus faible que celle de l'INH-Cu⁺.

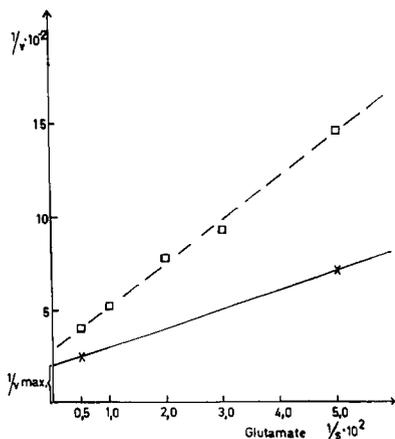


Fig. 11

Inhibition de la décarboxylase par Cu⁺⁺
 × ——— Glutamate, conc. $2 \cdot 10^{-2} M$ et $2 \cdot 10^{-3} M$;
 □ - - - - Glutamate, conc. de $2 \cdot 10^{-2}$ à $2 \cdot 10^{-3} M$ + Cu⁺⁺ conc. «eff.» $1,3 \cdot 10^{-3} M$

Dans le Tableau les valeurs moyennes des constantes de dissociation K_s et K_i sont indiquées. Il s'agit d'estimations, faites à partir d'essais répétés dans diverses conditions expérimentales. Elles résument en quelque sorte les résultats obtenus lors de l'incubation simultanée de la décarboxylase avec le substrat et l'inhibiteur.

Décarboxylase de *Cl. Welchii* S.R.12. Estimation de K_s et K_i selon LINEWEAVER & BURK⁷⁾

Conditions expérimentales	Substrat	Inhibiteur	K_s app	K_i app
Usuelles (air; cétaïlon)	acide glutamique	—	M	M
Sans cétaïlon	acide glutamique	—	$\sim 5 \cdot 10^{-3}$	
Sous azote	acide glutamique	—	$\sim 10^{-2}$	
Usuelles	acide glutamique	Cu ⁺⁺		$\sim 10^{-3}$
Usuelles	acide glutamique	INH-Cu ⁺		$\sim 1,2 \cdot 10^{-5}$
Sans cétaïlon	acide glutamique	INH-Cu ⁺		$\sim 2,2 \cdot 10^{-5}$
Sous azote	acide glutamique	INH-Cu ⁺		$\sim 0,8 \cdot 10^{-5}$

Discussion. — Les essais exposés ici, sur le mécanisme de l'inhibition de la décarboxylase de l'acide glutamique du *Cl. Welchii* par le complexe cuivrique de l'isoniazide, montrent la très grande résistance de cet enzyme à l'isoniazide et la non moins surprenante activation de l'inhibiteur par le cuivre. En effet, bien que nous n'ayons pas déterminé K_i pour l'isoniazide à cause de son inactivité, on peut estimer que cette constante aurait une valeur de l'ordre de 1M. La constante de dissociation correspondante pour l'INH-Cu⁺ est d'environ $10^{-5} M$, c'est-à-dire que l'addition d'ions cuivriques à l'isoniazide augmente son affinité pour la décarboxylase d'environ 100000 fois, affinité qui est alors même supérieure à celle du substrat. Nous avons vu d'autre part que l'INH-Cu⁺ entrainait en compétition avec l'acide glutamique pour la place sur l'apoenzyme, tandis que le cuivre ne le faisait pas. Le complexe cuivrique de l'isoniazide se lie donc à l'apoenzyme au même endroit que le substrat et son accès est facilité, tandis que l'isoniazide seul est empêché de rejoindre le site actif. Il nous faut alors rechercher un mécanisme commun à la

liaison de l'acide glutamique et de l'INH-Cu⁺ à l'enzyme. Or, le seul mécanisme connu qui permette une telle interprétation est celui qui fait intervenir le pyridoxal-phosphate comme coferment. En effet, selon la théorie générale proposée par METZLER, IKAWA & SNELL¹⁷⁾, pour le mécanisme de toutes les réactions catalysées par les enzymes contenant le pyridoxal-phosphate, l'acide aminé s'attache à ce dernier par une liaison aldimine qui se forme entre le groupe α -aminé de l'acide aminé et la fonction aldéhyde du pyridoxal-phosphate, tandis que le groupe phénolique de ce dernier est relié à l'azote de l'aldimine et à la fonction carboxyle de l'acide aminé par l'intermédiaire d'un ion métallique hypothétique. Le chélate ainsi formé représente un système planaire de doubles liaisons qui permet le déplacement d'une paire d'électrons d'une des liaisons du carbone α vers l'azote hétérocyclique fortement électrophile (fig. 12). Selon BRAUNSTEIN¹⁸⁾ l'ion métallique n'est probablement pas nécessaire à l'action enzymatique, la fonction du métal étant reprise par un groupe approprié de l'apoenzyme (pont hydrogène ou autre). Nous proposons un mécanisme analogue, impliquant les mêmes groupes fonctionnels du coenzyme, pour expliquer l'inhibition par l'INH-Cu⁺: le cuivre du complexe se lierait d'abord au groupe phénolique du pyridoxal-phosphate en déplaçant soit le métal soit un pont hydrogène de l'apoenzyme natif, et ensuite l'hydrazone se formerait entre l'isoniazide et le pyridoxal-phosphate, conduisant à un chélate analogue à celui qui s'établit avec le substrat et le coenzyme (fig. 12). L'action catalytique

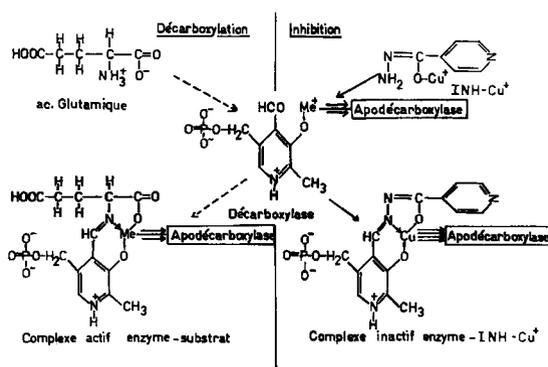


Fig. 12

Mécanisme proposé pour la formation des complexes enzyme-substrat (ES) et enzyme-INH-Cu⁺ (EI)

Cette représentation est très simplifiée. Elle doit être complétée par les remarques suivantes:

- La présence du métal n'a pas été démontrée, il peut être remplacé par d'autres groupes appropriés de l'apoenzyme.
- L'apoenzyme est aussi lié par d'autres liaisons au coenzyme (N hétérocyclique; phosphate; aldéhyde).
- La fonction aldéhyde du coenzyme est protégée, probablement par une liaison aldimine avec un groupe ϵ -aminé d'un résidu de lysine de l'apoenzyme. La formation de ES et EI se ferait alors par «transaldimination»¹⁹⁾.

¹⁷⁾ D. E. METZLER, M. IKAWA & E. E. SNELL, J. Amer. chem. Soc. 76, 648 (1954).

¹⁸⁾ A. E. BRAUNSTEIN, dans «Enzymes» (P. BOYER, H. LARDY & K. MYRBÄCK, Eds.), 2nd Ed., Vol. 2, p. 113 (1960).

¹⁹⁾ YU. M. TORCHINSKY, Biochim. biophys. Res. Commun. 10 (5), 401 (1963).

du cuivre que nous avons observée dans la formation de l'isonicotinylhydrazone du pyridoxal est en faveur d'une telle hypothèse. Il nous reste à expliquer pourquoi l'isoniazide seul ne réagit pratiquement pas avec le pyridoxal-phosphate de cette décarboxylase. En effet, il est généralement admis que l'isoniazide inhibe les enzymes à pyridoxal-phosphate par formation d'une hydrazone avec ce dernier, mais tous les auteurs²⁾²⁰⁾ trouvent que l'efficacité de l'isoniazide comme inhibiteur est relativement mauvaise. Ainsi DAVISON²⁾ observe une faible affinité entre la décarboxylase de l'acide cystéine-sulfonique et l'isoniazide ($K_i = 4 \cdot 10^{-2} \text{M}$). Le comportement de la décarboxylase du *Cl. Welchii* n'est donc pas essentiellement différent de celui des autres enzymes de ce groupe, la dissemblance est plutôt graduelle, l'association entre coenzyme et enzyme étant spécialement forte dans ce cas. Il est d'ailleurs bien établi aujourd'hui que dans plusieurs enzymes à pyridoxal-phosphate, la fonction aldéhyde de ce dernier n'est pas libre, mais liée à l'apoenzyme par une liaison aldimine avec le groupe ϵ -aminé de la lysine situé à l'emplacement catalytique de l'apoenzyme (BRAUNSTEIN¹⁸⁾, TURANO *et al.*²¹⁾). Aussi est-il très probable que dans la décarboxylase de l'acide glutamique une liaison du même type intervienne, liaison que seule la formation du chélate avec le cuivre parvient à dissocier.

Nos résultats et les vues actuelles sur le mécanisme des réactions catalysées par le pyridoxal-phosphate concordent avec l'hypothèse de la présence de ce coenzyme dans la décarboxylase de l'acide glutamique du *Cl. Welchii* S.R. 12.

Nous remercions Mademoiselle F. MOTTU de la préparation de la poudre lyophilisée de *Cl. Welchii*.

SUMMARY

The kinetics of the inhibition of the glutamic acid decarboxylase of *Cl. Welchii* S.R. 12 by the copper complex of isonicotinylhydrazide (INH) has been studied. While the decarboxylase is extremely resistant to INH, it is readily inhibited by the copper complex of INH. The rate of inhibition follows the characteristics of a bimolecular reaction.

The simultaneous incubation of the decarboxylase with substrate and inhibitor shows that INH-Cu^+ competes with the substrate for the same site on the enzyme. A possible mechanism of inhibition is proposed, involving the formation of a chelate between pyridoxal-phosphate, copper and INH. Our data strongly suggest that the decarboxylase of *Cl. Welchii* contains pyridoxal-phosphate as a prosthetic group.

Laboratoire de Recherche
des Produits NESTLÉ, Vevey (Suisse)

²⁰⁾ R. M. HICKS & J. CYMERMAN-CRAIG, *Biochem. J.* **67**, 353 (1957); W. T. JENKINS, S. ORLOWSKI & I. W. SIZER, *J. biol. Chemistry* **234**, 2657 (1959); V. BONAVIDA & V. SCARDI, *Biochem. Pharmacol.* **2**, 58 (1959).

²¹⁾ C. TURANO, P. FASELLA, P. VECCHINI & A. GIARTOSIO, *Atti Accad. naz. Lincei, Rendic. Cl. Sci. fis. mat. natur.* **30**, 532 (1961).