

IDENTITÉ DES FORMES SOLUBLE ET SOLUBILISÉE À PARTIR DES MITOCHONDRIES DE L'ALANINE α -CETOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE DE *LYCOPERSICON ESCULENTUM*

MICHÈLE GAZEY-REYJAL et JEAN CROUZET

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
34060 Montpellier Cedex, France

(Received 12 February 1976)

Key Word Index—*Lycopersicon esculentum*; Solanaceae; tomato; alanine aminotransferase; purification; kinetics; mitochondria.

Abstract—Alanine 2-oxoglutarate aminotransferase, extracted by Triton X-100 from tomato mitochondria, has been purified and its main kinetic characteristics determined. This form is more unstable than the soluble enzyme. However, the chromatographic patterns, effect of pH on stability, the pH optimum, the specificity and the apparent molecular weight show that it is the same enzyme and not an isoenzyme. This identity is confirmed by the results of kinetic studies and by the inhibition data by the products of the reaction for the two forms. The kinetic results also show that the two forms reversibly catalyze the transamination reaction between alanine and 2-oxoglutarate according the Ping Pong mechanism described for the soluble enzyme.

INTRODUCTION

Les travaux de Yu *et al.* [1,2] ont permis de mettre en évidence dans le fruit de la tomate, une alanine α -cétoglutarate aminotransferase E.C. 2-6-1-2. Les auteurs ont, par ailleurs, montré que cette enzyme était présente dans le surnageant et dans les préparations mitochondrielles. Dans un précédent article [3] nous avons décrit l'isolement et la purification de la fraction soluble de cette enzyme et donné ses principales caractéristiques cinétiques. Les résultats obtenus sont en accord avec un mécanisme Ping Pong Bi-Bi déjà mis en évidence dans le cas d'alanine aminotransferase animale [4,5]. Le présent travail porte sur la purification et l'étude cinétique préliminaire de la fraction alanine α -cétoglutarate aminotransférase isolée des mitochondries de la tomate et sur la comparaison de cette forme avec la forme soluble précédemment décrite.

RESULTATS

Préparation des mitochondries

Les mitochondries ont été obtenues par une technique voisine de celles décrites par Ku *et al.* [6] et Hobson [7]. Ayant recherché avant tout à maintenir l'activité alanine aminotransférase, nous avons été conduit à utiliser les agents protecteurs déjà employés pour l'étude de la fraction soluble de cette enzyme [3]: mercaptoéthanol, EDTA, polyclar AT. La solubilisation de l'enzyme est obtenue par action du Triton X-100 à 0,5% pendant 30 min à 4°.

Purification

Le schéma de fractionnement utilisé est sensiblement le même que celui que nous avons décrit pour la fraction soluble [3]. Cependant, l'étape de dialyse après précipi-

tation au sulfate d'ammonium, conduisant à une perte importante de l'activité, nous avons été amené à la remplacer par une chromatographie sur gel Sephadex G 25. L'instabilité de cette fraction de l'enzyme ainsi que les faibles quantités présentes ne nous ont pas permis de pousser la purification au-delà du stade de chromatographie sur DEAE Sephadex. La précipitation par le sulfate d'ammonium (50-65%) permet d'obtenir un facteur de purification de 20 pour un rendement de 28%. Après chromatographie sur DEAE cellulose, la préparation enzymatique est purifiée 45 fois avec un rendement de 6,5%.

Stabilité thermique

L'enzyme ainsi purifiée reste stable pendant plusieurs mois lorsqu'elle est congelée à -20°. Elle est relativement stable, au moins pendant 1 heure à 40-45°, mais à partir de 50°, on observe une désactivation très rapide, l'activité n'est plus que de 50% de sa valeur initiale au bout de 10 min et tombe à 10% de cette valeur après 1 hr.

A cette température, ni le phosphate de pyridoxal $0,5 \times 10^{-4}$ M, ni la sérum-albumine, n'exercent d'effet protecteur. L'alanine 0,1 M et le mercaptoéthanol 0,1 M assurent une très légère protection, de même que le maléate 0,1 M (anologue de substrat). La meilleure stabilisation est obtenue avec l' α -cétoglutarate 0,05 M.

Stabilité à pH acide et pH optimum

L'activité de l'enzyme a été déterminée après incubation à 4° pendant 24 H dans des tampons Tris/HCl pH 7,4; phosphate pH 6,5, citrate pH 5,5, 5 et 4,5 contenant de l'alanine 10 mM, du mercaptoéthanol 10 mM et du glycérol 5%. Une baisse notable d'activité apparaît au-dessous de pH 6,5. Ce résultat est identique à celui qui a été obtenu avec la fraction soluble [3].

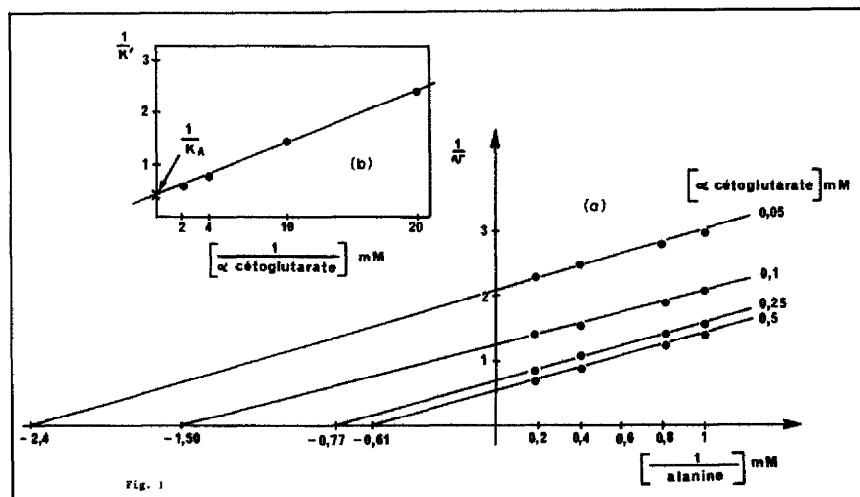


Fig. 1. Détermination de la constante de Michaelis pour l'alanine. a—Tracés primaires obtenus pour la transamination entre l'alanine et l'α-cétoglutarate, réaction directe. Représentation selon Lineweaver et Burk avec l'alanine comme substrat variable (1, 1,25, 2,5 & 5 mM) pour différentes concentrations en α-cétoglutarate (0,05, 0,1, 0,25 & 0,5 mM). Tampon Tris-HCl pH 7,25; b—Tracé secondaire. Les valeurs négatives des inverses de la constante de Michaelis apparente $1/K'$ sont portées en fonction des inverses des concentrations en α-cétoglutarate.

Le pH optimum se situe entre pH 7,2 et 7,3, le pH optimum a été évalué à 7,25 pour l'enzyme soluble [3].

Poids moléculaire

Le poids moléculaire de l'enzyme, déterminé par gel filtration sur Sephadex G-200 est de $100\,000 \pm 5000$, identique à celui de la forme soluble.

Spécificité

Aucun des acides aminés ou α-céto-acides suivants: L-valine, L-méthionine, L-thréonine, L-isoleucine, L-phénylalanine, α-cétoisovalérate, glyoxylate n'est substrat de cette enzyme.

Détermination des constantes cinétiques

Nous avons déterminé la constante de Michaelis pour chacun des substrats: L-alanine, α-cétoglutarate, pyruvate et L-glutamate pour les réactions directe et inverse. Une

représentation en double inverse de la vitesse initiale en fonction de la concentration du premier substrat, pour différentes concentrations fixes en second substrat, donne une famille de droites parallèles.

La représentation des points d'intersection de l'axe des abscisses en fonction de l'inverse de la concentration du second substrat (tracé secondaire: Fig. 1) permet la détermination de la constante de Michaelis pour chacun des substrats (K_a , K_x , K_g , K_p respectivement pour l'alanine, l'α-cétoglutarate, le glutamate et le pyruvate).

La détermination des vitesses maximum de la réaction directe V_d et de la réaction inverse V_i se fait en portant sur un graphe les valeurs correspondant aux points d'intersection de l'axe des ordonnées en fonction de l'inverse de la concentration de l'un des substrats de la réaction directe ou de la réaction inverse. Les points correspondant s'alignent sur une droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées permet de déterminer $1/V_d$ et $1/V_i$. L'alanine aminotransférase solubilisée à partir des mitochondries catalyse la réaction directe de transamination avec une vitesse quatre fois plus grande que celle de la réaction inverse.

La constante d'équilibre de la réaction a été calculée en utilisant la relation d'Haldane [8]:

$$K_{eq} = \left[\frac{V_d}{V_i} \right]^2 \times \frac{K_p K_g}{K_a K_x}$$

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 1, nous les avons comparés à ceux obtenus précédemment avec la fraction soluble de l'enzyme [3].

Inhibition par les produits de la réaction

Cette étude a été réalisée de façon comparative sur les fractions soluble et solubilisée à partir des mitochondries.

Dans le cas de la réaction directe, le glutamate agit comme inhibiteur compétitif, *vis-à-vis* de l'alanine, l'inhibition *vis-à-vis* de l'α-cétoglutarate est du type mixte, K_m

Tableau 1. Constantes cinétiques des fractions soluble et solubilisée

Constantes	Fraction solubilisée	Fraction soluble (3)
K_a	2,5 mM	2,8 mM
K_x	0,25 mM	0,28 mM
K_g	2,5 mM	2,3 mM
K_p	0,075 mM	0,09 mM
K_{eq}^*	4	5

K_a = constante de Michaelis pour l'alanine; K_x = constante de Michaelis pour l'α-cétoglutarate; K_g = constante de Michaelis pour le glutamate; K_p = constante de Michaelis pour le pyruvate.

$$* K_{eq} = \left[\frac{V_d}{V_i} \right]^2 \frac{K_p K_g}{K_a K_x}$$

Relation de Haldane.

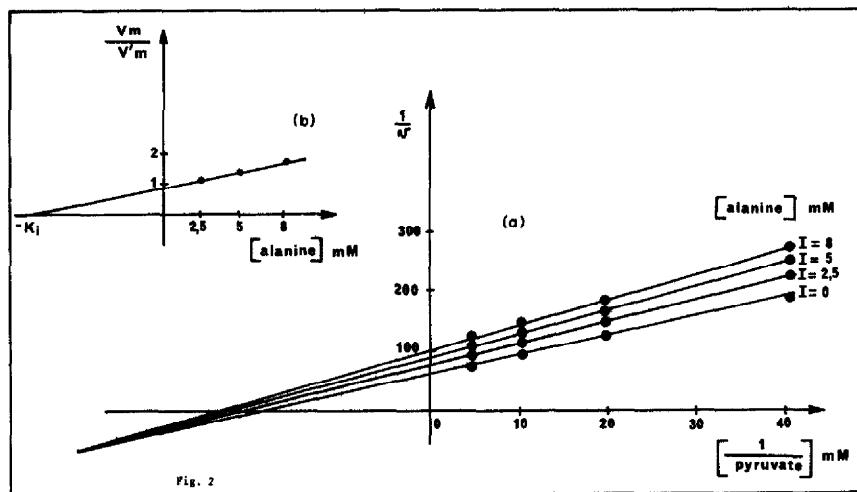


Fig. 2. Inhibition de la réaction inverse par l'alanine, produit de la réaction. a—Représentation selon Lineeweaver et Burk avec le pyruvate comme substrat variable (0,025, 0,5, 0,1 & 0,2 mM) pour différentes concentrations en alanine (0, 2,5, 5 & 8 mM). Tampon Tris-HCl pH 7,25; b—Tracé secondaire. Les rapports V_m/V'_m sont portés en fonction de la concentration en inhibiteur (alanine).

et V_{\max} varient simultanément en présence d'inhibiteur (Fig. 2).

Pour la réaction inverse l'alanine se comporte, comme un inhibiteur compétitif *vis-à-vis* du glutamate et non compétitif, à l'égard du pyruvate. Les constantes d'inhibition pour chaque forme de l'enzyme et pour chaque inhibiteur sont consignées dans le Tableau 2.

DISCUSSION

On sait [9] que dans les cellules animales, l'alanine aminotransférase est présente sous forme de deux isoenzymes qui sont localisées, l'une dans le cytoplasme, l'autre dans les mitochondries. Dans le cas de l'enzyme du cœur de rat, Zeigenbein [10] a montré qu'il était possible de séparer ces deux isoenzymes par chromatographie sur DEAE-cellulose, l'enzyme mitochondriale n'est pas adsorbée alors que la forme soluble ne peut être éluee que par un gradient de chlorure de sodium. Dans le cas de *loliu m temulentum* Thomas et Stoddart [11] observent le même comportement pour la fraction contenue dans les chloroplastes et pour l'isoenzyme cytoplasmique.

En ce qui concerne les enzymes extraites de la tomate, l'alanine α -cétoglutamate aminotransférase que nous avons solubilisée à partir des mitochondries est, comme nous l'avons déjà signalé beaucoup plus labile que la

forme soluble de cette enzyme, puisqu'elle est très fortement inactivée au cours du processus de dialyse. Nous attribuons cette instabilité au traitement subit par l'enzyme lors de sa préparation et plus particulièrement à l'action du Triton X-100 utilisé pour provoquer l'éclatement des mitochondries. Indépendamment de cette différence dans le comportement des deux enzymes, plusieurs arguments nous permettent de suggérer qu'il s'agit d'un seul et même type d'enzyme. Les stabilités thermiques et *vis-à-vis* du pH des deux formes sont sensiblement les mêmes. On ne note pas de différence dans la valeur des poids moléculaires apparents et dans les deux cas, nous avons des enzymes très spécifiques n'admettant que l'alanine comme substrat.

Par ailleurs, le fait que le comportement en chromatographie d'échange d'ion sur DEAE-cellulose et DEAE Sephadex soit le même pour les deux formes, elles sont toutes deux retenues par ces deux types de supports, nous permet de penser qu'il ne s'agit pas d'isoenzymes.

L'étude des caractères cinétiques des formes soluble et solubilisée à partir des mitochondries, nous confirment dans ce point de vue. D'une part, les constantes de Michaelis obtenues pour chacun des substrats, et pour les réactions directes et inverses sont très voisines de celles obtenues pour la fraction soluble [3]. D'autre part, les phénomènes d'inhibition par les substrats des réactions directe et inverse sont semblables pour les deux formes

Tableau 2. Constantes d'inhibition par les produits de la réaction

	Constantes	Fraction solubilisée	Fraction soluble
Réaction directe*	K_I^a	1,80 mM	1,72 mM
	K_I^s	4,30 mM	4 mM
Réaction inverse†	K_I^g	5,3 mM	4,8 mM
	K_I^p	8,5 mM	8,78 mM

* Réaction directe avec comme produit inhibiteur le glutamate.

† Réaction inverse avec comme produit inhibiteur l'alanine. K_I^a = constante d'inhibition de l' α cétoglutamate par le glutamate. K_I^s = constante d'inhibition de l'alanine par le glutamate. K_I^g = constante d'inhibition du glutamate par l'alanine. K_I^p = constante d'inhibition du pyruvate par l'alanine.

de l'enzyme et les constantes d'inhibition ont des valeurs indentiques dans les deux cas.

Le comportement cinétique de l'enzyme (soluble et solubilisée), ainsi que les données d'inhibition par les produits, nous confirment que cette enzyme catalyse reversiblement la réaction de transamination selon un mécanisme Ping Pong Bi-Bi. En effet, l'alanine et le glutamate se lient tous les deux à la forme pyridoxal-5' phosphate de l'enzyme. Donc, lorsque nous avons ces deux substrats en présence il y a inhibition du type compétitif, alors que lorsque nous mettons en présence le glutamate et l' α -cétoglutarate ou bien l'alanine et le pyruvate, nous avons deux substrats qui se lient chacun à une forme de l'enzyme: les acides aminés à la forme pyridoxal-5' phosphate, les α -cétoacides à la forme pyridoxamine-5' phosphate de l'enzyme. Les premiers résultats que nous avons obtenus dans l'étude de l'inhibition par certains analogues de substrat (maléate et amino-4 butyrate) [12] vont également dans le même sens.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. Nous avons utilisé les variétés Saint-Pierre (achetée sur le marché local) et Heinz 1370 provenant de la Station Expérimentale de Puyricard [13] France.

Détermination de l'activité enzymatique. Nous avons suivi la formation du pyruvate en déterminant la vitesse d'oxydation du NADH catalysée par la lactate déshydrogénase [13]. Pour l'étude de la réaction inverse la transamination a été couplée avec la réaction d'oxydation catalysée par la glutamate déshydrogénase en présence de NADH dont on suit les variations de concentration en fonction du temps [5,14]. L'étude de la spécificité de substrat a été faite en utilisant les techniques suivantes: (1) dosage des dinitro-2,4 phénylhydrazones dans le cas des acides aminés branchés (valine, leucine, isoleucine) [15]. (2) détermination du glutamate formé au cours de la réaction [16] pour la méthionine, la thréonine et la phénylalanine. (3) détermination du pyruvate formé lorsqu'on étudie les différents acides cétoniques: glyoxylate, α -cétoisocaproate et α -cétoisovalérate.

Autres méthodes analytiques. Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry [17] après précipitation à l'acide trichloracétique [18]. La concentration en protéine est calculée par référence à une gamme étalon de sérum-albumine bovine. Les solutions enzymatiques ont été concentrées sur membrane de collodion. Le poids moléculaire apparent a été déterminé par gel chromatographie sur Sephadex G-200 selon Laurent et Killander [19].

Préparation de l'enzyme: Les fruits (3 kg) sont homogénéisés dans du tampon phosphate 0,2 M, pH 7,5 (poids à volume) contenant du mercaptoéthanol 10 mM, de l'EDTA 5 mM, du polyclar AT 2% (poids à volume) et du saccharose 0,4 M. L'homogénat est amené rapidement à pH 7,5 avec KOH 1 M et centrifugé à 3500 g pendant 20 min. Le surnageant est stabilisé par la L-alanine 10 mM et la L-cystéine 10 mM, puis centrifugé à 20000 g pendant 30 min. Le culot obtenu est remis en suspension dans un volume minimum de tampon phosphate 0,2 M, pH 7,5 contenant du mercaptoéthanol 10⁻³ M, de l'alanine 10⁻² M, du saccharose 0,4 M. Le volume ainsi recueilli est doublé par addition du même tampon puis centrifugé à 3500 g pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant recueilli est centrifugé pendant 20 min à 20000 g. Le culot obtenu est remis en suspension dans le

tampon phosphate 0,2 M, pH 7,5, puis on ajoute du Triton X-100 0,5% pour faire éclater les mitochondries. Après 30 min d'agitation à 4°, le mélange est centrifugé pendant 30 min à 20000 g et le surnageant est utilisé pour la purification de l'enzyme.

Purification de l'enzyme. La solution ainsi obtenue est précipitée par addition d'une solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium. Les protéines qui précipitent à 50% de saturation en sulfate d'ammonium sont éliminées et celles qui précipitent entre 50 et 64% de saturation sont recueillies par centrifugation à 20000 g pendant 15 min et reprises par du tampon phosphate 10⁻² M, pH 7,5, renfermant du mercaptoéthanol 10⁻² M, de la L-alanine 10⁻² M, de la cystéine 5 × 10⁻³ M et du glycérol 5% (tampon A). Le culot est ensuite chromatographié sur une colonne de Sephadex G-25 (1,5 cm × 40 cm) équilibrée avec du tampon phosphate 10⁻² M, pH 7,5, contenant du mercaptoéthanol 10⁻³ M et du glycérol 5% (tampon A'). Les fractions renfermant l'activité enzymatique sont rassemblées et disposées sur une colonne DEAE-cellulose (1 × 12 cm) équilibrée avec le tampon précédent. L'élution est assurée par un gradient linéaire de phosphate de potassium 0,01 à 0,2 M. Les fractions actives sont concentrées sur membrane de collodion. La solution concentrée est dialysée contre du tampon Tris-HCl 210⁻² M, pH 7 contenant du mercaptoéthanol 10⁻² M, de l'alanine 10⁻² M et du glycérol 5% (tampon B) et déposée sur une colonne de DEAE Sephadex (1 × 12 cm) équilibrée avec tampon B. Les protéines sont élues par un gradient linéaire de 0,1-0,35 M en KCl dans le tampon B. Les fractions actives sont réunies et concentrées sur membrane de collodion. L'enzyme ainsi purifiée peut être congélée et reste stable plusieurs mois.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. H. Yu, L. F. Olson et D. K. Salunkhe (1968) *Phytochemistry* **7**, 555.
2. M. H. Yu et M. Spencer (1970) *Phytochemistry* **9**, 341.
3. J. Rech et J. Crouzet (1974) *Biophys. Biochem. Acta* **350**, 392.
4. S. Hopper et H. L. Segal (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3189.
5. B. Bulos et P. Handler (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3283.
6. H. S. Ku, H. K. Pratt, A. B. Spurr, W. M. Harris (1968) *Plant Physiol.* **43**, 883.
7. G. E. Hobson (1969) *Qual. Plant. Mater. Veg.* **XIX**, 1-3, 155.
8. J. B. S. Haldane (1930) *Enzymes*. Longmans Green, London.
9. J. H. Wilkinson (1970) *Isoenzymes*. Chapman & Hall, London.
10. R. Ziegenbein (1966) *Nature* **212**, 935.
11. H. Thomas et J. L. Stoddart (1974) *Phytochemistry* **13**, 1053.
12. M. Gazeu-Reyjal (résultats non publiés).
13. A. Karmen (1955) *J. Clin. Invest.* **34**, 131.
14. M. H. Saier et W. T. Jenkins (1966) *J. Biol. Chem.* **242**, 91.
15. M. S. Coleman et F. B. Armonstrong (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **277**, 56-66.
16. S. Chesne et J. Pelmont (1973) *Biochimie* **55**, 237.
17. D. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
18. J. F. Clark et W. B. Jakoby (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 6065.
19. T. C. Laurent et J. Killander (1964) *J. Chromatog.* **14**, 317.