

L'ALCOOL DESHYDROGÉNASE DE TOMATE (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*): ÉTUDE CINÉTIQUE ET MÉCANISME D'ACTION

M. NICOLAS*, J. CROUZET* et C. AYMARD†

*Laboratoire de Biochimie Appliquée et Laboratoire de Biologie Physicochimique, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060-Montpellier Cédex, France

(Reçu le 6 avril 1979)

Key Word Index—*Lycopersicon esculentum*; Solanaceae; tomato; alcohol dehydrogenase; kinetic parameters; ordered bi-bi mechanism.

Abstract—In order to investigate the enzymatic mechanism of tomato alcohol dehydrogenase, kinetic studies were carried out at pH 5.8 and 9.4 for the forward and reverse reactions, respectively. Primary double reciprocal plots for several fixed concentrations of the associated substrate in all cases intersect, suggesting a sequential mechanism. Exploitation of secondary plots (slope-intercept values on the primary plots versus the reciprocals of the non-varied substrates) gives the following values: K_m s 500 μ M for MeCHO, 30 μ M for NADH, 2700 μ M for EtOH, 12 μ M for NAD⁺; K_i s 40 μ M for MeCHO, 3 μ M for NADH, 10⁴ μ M for EtOH and 45 μ M for NAD⁺. The results obtained in product inhibition studies agree with an ordered bi-bi mechanism for both forward and reverse reactions. Application of Cleland's rules shows that the coenzyme was the first substrate to complex with the enzyme in both cases.

INTRODUCTION

Il est possible de mettre en évidence une activité alcool deshydrogénase dans un grand nombre de tissus animaux [1–3] et végétaux [4–7] ainsi que chez les microorganismes [1]. Cependant, la plupart des travaux publiés à ce jour et plus particulièrement les études relatives au mécanisme d'action de ce type d'enzyme ont été réalisés en utilisant des alcool deshydrogénases de foie d'animaux ou de levure [1] comme matériel de départ. Les alcool deshydrogénases d'origine végétale ont fait l'objet d'un nombre plus restreint de publications, traitant le plus souvent de problèmes relatifs à la purification ou à la spécificité de ces enzymes.

Dans un précédent travail [8, 9] nous avons décrit la purification et la caractérisation d'une alcool deshydrogénase extraite du fruit de tomate, précédemment signalée par Rhodes [7]. Le présent article traite de l'étude cinétique de la réaction catalysée par cette enzyme afin d'en préciser le mécanisme d'action.

RÉSULTATS

Étude des vitesses initiales en absence d'inhibiteur

Les mesures correspondant aux vitesses initiales des réactions directe et inverse ont été exploitées selon la méthode d'Alberty [10] et Cleland [11]. Les inverses des vitesses initiales sont portés en fonction de l'inverse des concentrations en chacun des substrats pour

différentes concentrations en coenzyme et de l'inverse des concentrations de chacune des deux formes du coenzyme pour différentes concentrations en substrat. Nous obtenons dans ces conditions les réseaux primaires.

Pour la réaction directe (réduction de l'aldéhyde), les déterminations ont été réalisées à pH 5,8, pH optimum de l'enzyme fonctionnant dans le sens hydrogénasique [8]. En ce qui concerne la réaction inverse nous avons opéré à un pH égal à 9,4 voisin du pH optimum de l'enzyme = 9,8 [8]. Sur la Fig. 1a, l'inverse de la vitesse initiale est portée en fonction de l'inverse de la concentration en éthanol pour différentes concentrations en NAD⁺. Le réseau réciproque pour la même réaction est également formé de droites concourantes.

Pour la réaction directe nous obtenons des faisceaux de droites qui convergent en des points d'abscisses fortement négatives du fait des faibles valeurs des constantes cinétiques d'inhibition. En portant les valeurs des pentes et des intersections relevées sur les tracés primaires en fonction de l'inverse des concentrations en substrat associé nous obtenons les tracés secondaires. Nous avons donné sur la Fig. 1b les tracés secondaires pour l'oxydation de l'alcool (pente et intersection en fonction de l'inverse de la concentration en NAD⁺).

Dans tous les cas les tracés linéaires obtenus nous permettent de calculer les différentes constantes cinétiques dont les valeurs sont consignées dans le Tableau 1.

Étude des inhibitions par les produits de la réaction

L'activité pour la réaction 'directe' de l'alcool deshydrogénase de tomate est inhibée en présence d'éthanol et de NAD⁺, de même l'activité pour la

†Adresse actuelle: Laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaires U.S.T.L.

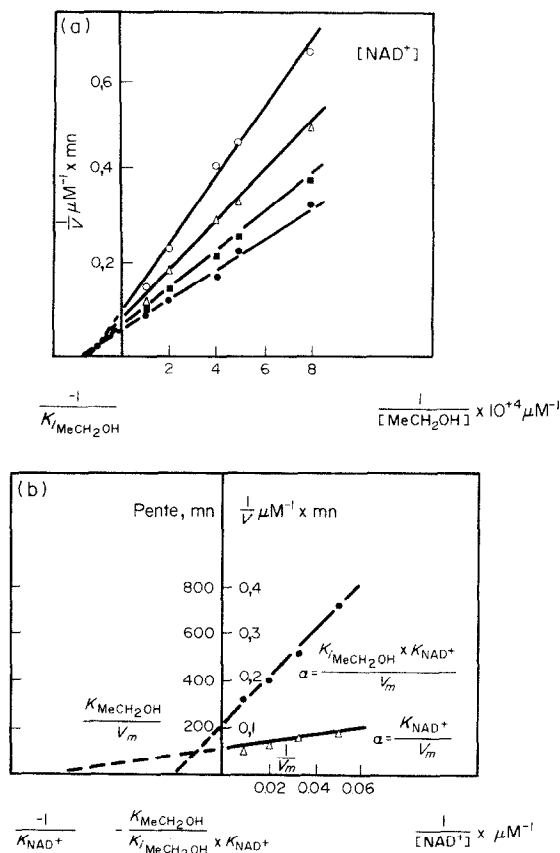


Fig. 1. (a) Tracé primaire: variation de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en éthanol pour différentes concentrations fixes en NAD^+ : ● 108,3 μM ; ■ 52,2 μM ; Δ 31,0 μM ; ○ 20,5 μM . (b) Tracés secondaires: variation des intersections (Δ) et des pentes (●) relevées sur la Fig. 1a en fonction de l'inverse de la concentration en NAD^+ .

réaction 'inverse' est inhibée par l'acétaldéhyde et le NADH. Les résultats reportés sur les Figs. 2a et 2b indiquent que l'acétaldéhyde est un inhibiteur non compétitif mixte vis-à-vis de l'éthanol et que le coenzyme NADH est un inhibiteur compétitif vis-à-vis du coenzyme NAD^+ . Les différents types d'inhibition observés sont donnés dans le Tableau 2.

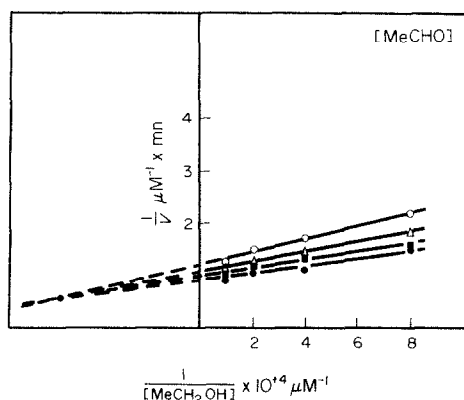


Fig. 2. (a) Inhibition de la 'réaction inverse' par l'acétaldéhyde. Représentations en double inverse avec l'éthanol pris comme substrat variable pour différentes concentrations en acétaldéhyde: ● 250 μM ; ■ 500 μM ; ○ 1000 μM . La concentration en substrat associé NAD^+ est de 100 μM .

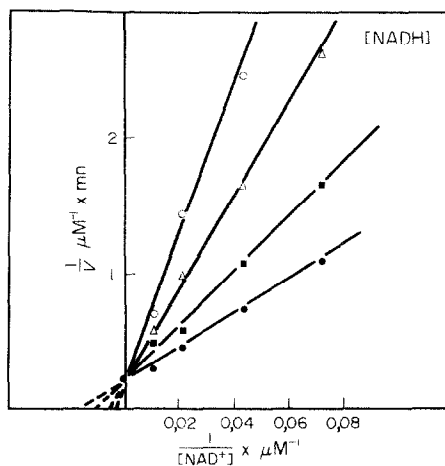


Fig. 2. (b) Inhibition de la 'réaction inverse' par le NADH. Représentations en double inverse avec le NAD^+ pris comme substrat variable pour différentes concentrations en NADH: ● sans NADH; ■ 8,8 μM ; Δ 17,6 μM ; ○ 26,4 μM . La concentration en substrat associé éthanol est de $10 \times 10^3 \text{ } \mu\text{M}$.

Tableau 1. Paramètres cinétiques de l'alcool déshydrogénase de tomate

Substrat	Constante de Michaelis (μM)	Constante cinétique d'inhibition (μM)
a { Acétaldéhyde NADH	$K_m^{\text{MeCHO}} = 500$	$K_i^{\text{MeCHO}} = 40$
	$K_m^{\text{NADH}} = 30$	$K_i^{\text{NADH}} = 3$
b { Ethanol NAD ⁺	$K_m^{\text{MeCH}_2\text{OH}} = 2700$	$K_i^{\text{MeCH}_2\text{OH}} = 10 \times 10^3$
	$K_m^{\text{NAD}^+} = 12$	$K_i^{\text{NAD}^+} = 45$

Les paramètres ont été déterminés à pH 5,8 pour la réaction directe (a) et à pH 9,4 pour la réaction inverse (b).

Tableau 2. Inhibition par les produits de la réaction de l'alcool deshydrogénase de tomate, types d'inhibition et valeurs des constantes d'inhibition

Sens de la réaction	Inhibiteur	Substrat variable	Type d'inhibition	Constantes d'inhibition (μM)		
				K_i	$K_{i(\text{pente})}$	$K_{i(\text{intersection})}$
Direct	Ethanol	Acétaldéhyde	non compétitif	$7,4 \times 10^3$		
		NADH	non compétitif mixte		21×10^3	$7,2 \times 10^3$
	NAD ⁺	Acétaldéhyde	non compétitif mixte		260	31
		NADH	compétitif	15		
	Acétaldéhyde	Ethanol	non compétitif mixte		96	225
		NAD ⁺	non compétitif mixte		140	53
Inverse	NADH	Ethanol	non compétitif mixte		10	27
		NAD ⁺	compétitif	10		

Le substrat associé est à concentration non saturante.

Les inhibitions pour l'éthanol vis-à-vis du NADH et pour l'acétaldéhyde vis-à-vis du NAD⁺ n'ont pu être identifiées comme non compétitives mixtes qu'après analyses graphiques selon Eadie et Dixon du fait de la convergence peu marquée apparaissant sur la représentation en double inverse. En portant les valeurs des pentes et des intersections relevées sur les graphes primaires obtenus en fonction des concentrations en inhibiteur, nous obtenons des tracés secondaires qui permettent la détermination des différentes constantes d'inhibition dont les valeurs sont rassemblées dans le Tableau 2.

DISCUSSION

Dans tous les cas les réseaux primaires obtenus sont formés de droites concourantes, le point d'intersection a toujours une abscisse négative, alors que l'ordonnée est négative lorsque les variables sont le NADH et l'acétaldéhyde et positive lorsque les variables sont le NAD⁺ et l'éthanol. Ces données expérimentales sont en accord [11, 12] avec l'existence d'un mécanisme séquentiel, de type bi-bi ordonné en régime stationnaire ou bi-bi aléatoire à l'équilibre.

Pour ces mécanismes l'équation de vitesse est de la forme:

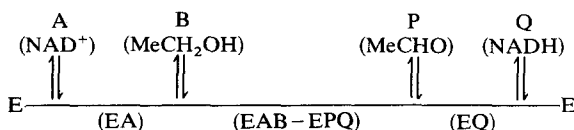
$$v = \frac{V_{\max}(A)(B)}{K_{iA}K_B + K_A(B) + K_B(A) + (A)(B)}$$

où V_{\max} représente la vitesse maximale de la réaction déterminée à concentration saturante en substrat et en coenzyme, K_A et K_B les constantes de Michaelis des substrats A et B et K_{iA} la constante d'inhibition cinétique de A.

Les valeurs relatives des constantes de Michaelis pour l'acétaldéhyde et l'éthanol et le fait que la constante cinétique d'inhibition de l'éthanol ($10 \times 10^3 \mu\text{M}$) soit très supérieure à celle de l'acétaldéhyde (40

μM) semblent indiquer que l'enzyme fonctionne préférentiellement dans le sens de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol. Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par Eriksson [4] à partir des constantes d'équilibre et du rapport de concentrations NAD⁺/NADH dans le cas de l'alcool deshydrogénase de pois et par Bruemmer et Roe [5] à partir des constantes de Michaelis apparentes pour l'enzyme d'orange.

Afin de préciser la nature du mécanisme séquentiel mis en évidence nous avons entrepris l'étude de l'inhibition par les produits de la réaction. Les résultats de cette étude (Tableau 2) sont en accord avec un mécanisme séquentiel bi-bi ordonné. De plus, l'application des règles de Cleland [11] montre qu'aussi bien dans le cas de la réaction directe que dans celui de la réaction inverse le coenzyme est lié en premier à l'enzyme ce qui conduit au schéma réactionnel ci-dessous:



Une telle fixation préliminaire obligatoire du coenzyme (réduit ou oxydé selon le sens réactionnel) a déjà été signalée pour plusieurs oxydoréductases NAD(H) dépendantes: Portalier [12] pour la réduction du D-tagaturonate en altronate par la D-altronate NAD⁺-oxydoréductase d'*Escherichia coli*, par Michel *et al.* [13] et Laurent *et al.* [14] pour la réaction d'oxydation de l'oestradiol par la 17 β hydroxystéroïde deshydrogénase isolée de l'ovaire de brebis ou du foie de rat et Morita *et al.* [15] dans le cas de la glycolaldéhyde d'*Escherichia coli*.

EXPÉRIMENTAL

Les tomates utilisées dans cette étude, cultivées en plein champ nous ont été aimablement fournies soit par un producteur local (variétés Marmande-Saint-Pierre et F 7) soit par la Station Expérimentale de la Conserve de Puyricard (variétés 24 A et ROMA VF). Le stade de maturité est le stade rouge défini par Besford et Hobson [16]. Le NAD^+ et le NADH proviennent de chez Boehringer, l'alcool (Merck) et l'acétaldéhyde (Fluka) sont des produits hautement purifiés (plus de 99% en chromatographie en phase gazeuse) et sont redistillés avant utilisation. Les autres produits proviennent de chez Merck, Fluka ou Sigma.

Tous les réactifs ont été préparés avec de l'eau désionisée redistillée. La verrerie a été soumise à l'action d'un bain de HNO_3 dilué au demi (7 N) pour éliminer les traces de détergent avant abondant rinçage à l'eau désionisée redistillée.

Préparation de l'enzyme. Nous avons utilisé des préparations purifiées d'alcool deshydrogénase de tomate, obtenues selon les techniques décrites dans un précédent travail [8, 9]. La fraction utilisée est celle obtenue après purification par chromatographie d'affinité sur 'Blue Sepharose CL-6B' (Pharmacia) suivie d'une chromatographie sur Sephadex G 200.

Essais enzymatiques. Les vitesses de réaction ont été déterminées par la mesure des variations d'absorbance du NADH à 340 nm (cellules de 1 cm de trajet) et à une température de 25°. La 'réaction directe' correspond à la réduction de l'acétaldéhyde, le NADH est le substrat associé; au cours de la 'réaction inverse' l'éthanol est oxydé en présence de NAD^+ . Pour la réaction directe, les milieux réactionnels sont constitués ainsi: tampon phosphates de sodium 50 mM pH=5,8, NADH et acétaldéhyde en concentrations variables, 50 μl d'extrait enzymatique et de l'eau pour un volume final de 3 ml. Pour la réaction inverse, les milieux réactionnels sont constitués ainsi: tampon glycine-NaOH 50 mM pH=9,4, NAD^+ et éthanol en concentrations variables, 50 μl d'extrait enzymatique et de l'eau pour un même volume final. La cuve témoin contient les mêmes réactifs et un volume de solution enzymatique inactivée thermiquement. Dans les deux cas, après quelques minutes d'incubation à 25°, la réaction est initiée par addition de 50 μl de solution enzymatique. La vitesse de réaction est nulle

lorsque l'un ou l'autre des substrats ou la solution enzymatique sont omis dans le milieu réactionnel. Pour les études d'inhibition par les produits de la réaction, les milieux réactionnels définis ci-dessus contiennent en outre NAD^+ et éthanol pour le sens direct, NADH et acétaldéhyde pour le sens inverse. L'unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 μmol de substrat par min, dans les conditions décrites ci-dessus.

Remerciements.—Les auteurs remercient la Station Expérimentale de la Conserve de Puyricard [13] et Monsieur M. Clement pour la fourniture du matériel végétal utilisé dans cette étude.

RÉFÉRENCES

1. Sund, H. et Theorell, H. (1963) dans *The Enzymes* (Boyer, P., Lardy, H. et Myrback, K., eds.) 2nd edn, Vol. VII, pp. 25-83. Academic Press, New York.
2. Markovic, O., Theorell, H. et Rao, S. (1971) *Acta Chem. Scand.* **25**, 195.
3. Arslanian, M., Pascoe, E. et Reinhold, J. (1971) *Biochem. J.* **125**, 1039.
4. Eriksson, C. (1968) *J. Food Sci.* **33**, 525.
5. Bruemmer, J. et Roe, B. (1971) *J. Agric. Food Chem.* **19**, 266.
6. Hatanaka, A., Kajiwarra, T., Tomohiro, S. et Yamashita, H. (1974) *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1835.
7. Rhodes, M. (1973) *Phytochemistry* **12**, 307.
8. Nicolas, M. et Crouzet, J. (1976) *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **283**, 559.
9. Nicolas, M. et Crouzet, J. (1980) *Phytochemistry* (in press).
10. Alberty, R. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1928.
11. Cleland, W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104, 173, 188.
12. Portalier, R. (1972) *Eur. J. Biochem.* **30**, 211.
13. Michel, F., Nicolas, J. C. et Crastes de Paulet, A. (1975) *Biochimie* **57**, 1131.
14. Laurent, C., de Lauzon, S., Christeff, N., Cittanova, N. et Jayle, M. (1978) *Biochimie* **60**, 1181.
15. Morita, H., Tani, Y., Ogata, K. et Yamada, H. (1978) *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2077.
16. Besford, R. et Hobson, G. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1255.