

BBA 45532

INFLUENCE DE L'ÉTHACRYNATE DE SODIUM SUR QUELQUES RÉACTIONS LIÉES AU MÉCANISME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

Y. GAUDEMER* ET B. FOUCHER

Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (France)

(Reçu le 6 juin, 1966)

SUMMARY

Influence of sodium ethacrynate on some reactions involved in the mechanism of oxidative phosphorylation

1. The effects of ethacrynate on the oxidation of several substrates, on the reversal of electron transfer and on different types of ATPase are described.

2. In phosphate medium, addition of ADP or 2,4-dinitrophenol strongly increases the inhibition of β -hydroxybutyrate oxidation; under these conditions, succinate oxidation is poorly inhibited (20 %).

3. In a non-phosphate medium, ethacrynate strongly inhibits succinate oxidation (80 %); this inhibition is dependent on the coupling state and the level of reduced pyridine nucleotides of the mitochondria. Phosphate and ethacrynate are competitive, and bovine serum albumin counteracts the inhibition by ethacrynate. After mitochondria preincubated with ethacrynate and succinate have been washed, the inhibition of succinate oxidation is still very substantial.

4. Arsenate-stimulated succinate oxidation is also strongly inhibited by ethacrynate; preincubation of arsenate with ethacrynate decreases the inhibition.

5. Reversal of electron transfer is strongly inhibited by ethacrynate, energy being supplied either directly by mitochondrial oxidation, or indirectly by adding ATP under anaerobic conditions.

6. Ethacrynate inhibits 2,4-dinitrophenol-stimulated ATPase and does not inhibit Mg^{2+} -stimulated ATPase; ATPase from frozen-thawed mitochondria is inhibited by ethacrynate only if these mitochondria have been washed after the freezing-thawing treatment.

INTRODUCTION

En 1962, VILKAS ET LEDERER¹ ont présenté un mécanisme possible d'intervention de l'ubiquinone dans les oxydations phosphorylantes, qui impliquait la formation transitoire d'une méthylène-quinone. Dans le but de vérifier cette hypothèse, ces

* Nouvelle adresse: Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, 69-Villeurbanne, France.

auteurs nous ont donné à étudier les effets de l'éthacrynate de sodium* sur les mitochondries, dont la structure présente une analogie avec une méthylène-quinone: le groupement



Dans un travail préliminaire², nous avons décrit les effets de l'éthacrynate sur quelques réactions impliquées plus ou moins directement dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes, et il s'est avéré que cette substance semblait agir à un niveau fondamental du métabolisme mitochondrial.

DUGGAN ET NOLL³ ayant suggéré que l'action de l'éthacrynate était en relation avec son activité sur les groupements -SH protéiques, cette étude nous a paru d'autant plus intéressante que l'intervention de groupements -SH dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes a déjà été proposée⁴⁻⁶. Les résultats présentés semblent également en faveur de cette hypothèse.

Dans ce travail nous avons étudié l'influence de l'éthacrynate sur l'oxydation de différents substrats, le transfert d'électrons en sens inverse et différents types d'activité ATPasique avec des mitochondries de foie de rat ou de coeur de boeuf.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits

L'acide éthacrynique nous a été fourni par le Dr. C. W. MUSHETT, Merck, Sharp et Dohme, Rahway (N.J.); ADP, ATP: produits des Pabst Laboratories; serum-albumine bovine: "fraction V from bovine plasma", Armour pharmaceutical company.

Méthodes

Préparation des suspensions mitochondriales

Les mitochondries de foie de rat sont préparées selon la méthode de WEINBACH⁷; elles sont sédimentées à 9000 × g et lavées 2 fois. Les mitochondries de coeur de boeuf sont préparées selon la technique de CRANE, GLENN ET GREEN⁸; elles sont sédimentées à 10000 × g et lavées 1 fois. Les protéines mitochondriales sont dosées selon la technique de JACOBS *et al.*⁹.

Dosage du phosphate minéral

Le phosphate minéral est dosé selon la technique de FISKE ET SUBBAROW¹⁰ après précipitation des protéines mitochondriales par l'acide trichloracétique 5 % (concentration finale).

Mesure de l'activité ATPasique

L'activité ATPasique est mesurée après incubation des mitochondries en présence d'ATP, par dosage du phosphate minéral libéré dans le milieu réactionnel; le milieu d'incubation est celui décrit par BRUNI¹¹ avec addition soit de 2,4-dinitrophénol 1 · 10⁻⁴ M, soit de MgSO₄ 1 · 10⁻³ M + désoxycholate de sodium 1 · 10⁻⁴ M.

Mesure du transfert d'électrons en sens inverse

Selon la méthode de ERNSTER¹² nous mesurons en présence de succinate la

* Ethacrynate de sodium, sel de sodium de l'acide éthacrynique: acide dichloro-2,3(méthylènebutyryl-2')-4-phenoxyacétique.

réduction endergonique de l'acétoacétate; le milieu a la composition suivante: tampon glycylglycine 20 mM (pH 7.5), MgCl_2 8 mM, KCl 50 mM, saccharose 62 mM.

Mesure des oxydations

Les mesures de consommation d'oxygène sont faites par la méthode directe de Warburg à 30° en présence d'air et de KOH 20 %; le milieu respiratoire utilisé pour les mitochondries de foie est celui décrit par ERNSTER (*cf.* ci-dessus). Le milieu respiratoire utilisé pour les mitochondries de coeur est celui décrit par KIELLEY¹⁴. Le volume final dans les cellules est de 2.1 ml.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Influence de l'éthacrynate sur l'oxydation de différents substrats

Influence de l'ADP et de l'ATP

Par polarographie²², nous avons vérifié que l'éthacrynate accélère légèrement l'oxydation du β -hydroxybutyrate dans des mitochondries en état 4, tandis qu'il inhibe fortement l'oxydation en état 3.

Par mesures manométriques (Fig. 1), l'addition d'ADP augmente fortement le pourcentage d'inhibition. L'addition d'ATP, au contraire, n'a aucun effet sur cette inhibition.

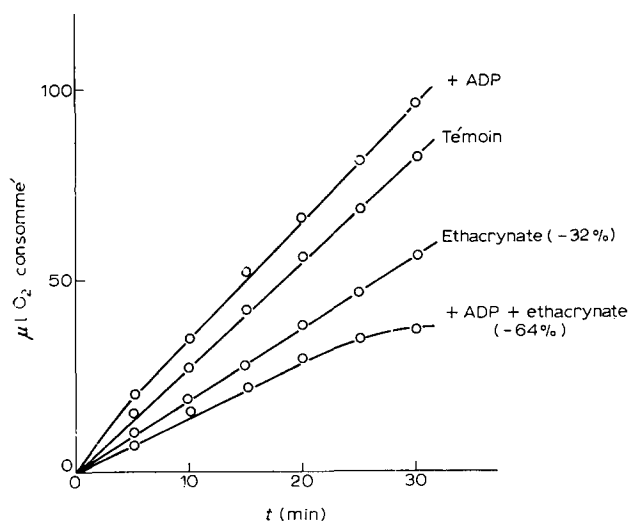


Fig. 1. Influence de l'ADP sur l'inhibition de l'oxydation du β -hydroxybutyrate par l'éthacrynate. Mitochondries de coeur de boeuf: 6 mg protéines par essai; milieu respiratoire selon KIELLEY¹⁴; éthacrynate, $1 \cdot 10^{-4}$ M préincubé 10 min avec les mitochondries. ADP, 10 μ moles ajouté après 10 min d'équilibration.

Influence du 2,4-dinitrophénol

L'addition de 2,4-dinitrophénol $5 \cdot 10^{-5}$ M (Fig. 2) qui provoque une stimulation de l'oxydation du β -hydroxybutyrate dans le témoin, augmente fortement l'inhibition de l'oxydation due à l'éthacrynate.

Influence du phosphate minéral

Si l'on supprime le phosphate minéral du milieu réactionnel, les pourcentages

d'inhibition des oxydations sont légèrement augmentés avec le β -hydroxybutyrate et le malate, et très fortement augmentés avec le succinate.

Si l'on préincube des mitochondries de foie avec le succinate et l'éthacrynate (Fig. 3a) l'oxydation provoquée par addition d'ADP + phosphate minéral est inhibée à 77 %; si l'on préincube le phosphate avec l'éthacrynate et le succinate (Fig. 3b), l'inhibition n'est plus que de 25 %; si l'on préincube l'ADP avec l'éthacrynate et le succinate (Fig. 3c) l'inhibition est de 84 %.

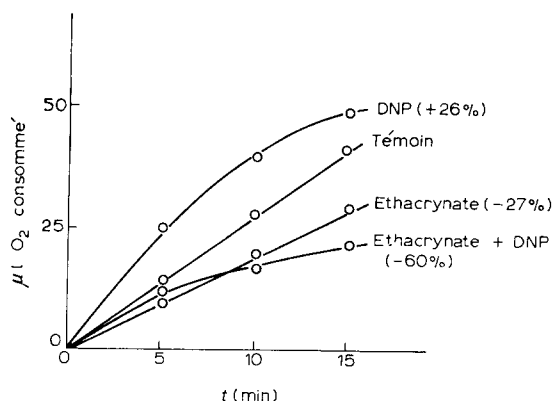


Fig. 2. Influence de l'éthacrynate sur l'oxydation du DL- β -hydroxybutyrate stimulée par le 2,4-dinitrophénol. Mitochondries de coeur de boeuf: protéines, 7 mg par essai; éthacrynate, $1 \cdot 10^{-4}$ M préincubé 10 min avec les mitochondries. 2,4-dinitrophénol (DNP), $5 \cdot 10^{-5}$ M ajouté après la préincubation. Conditions expérimentales cf. Fig. 1.

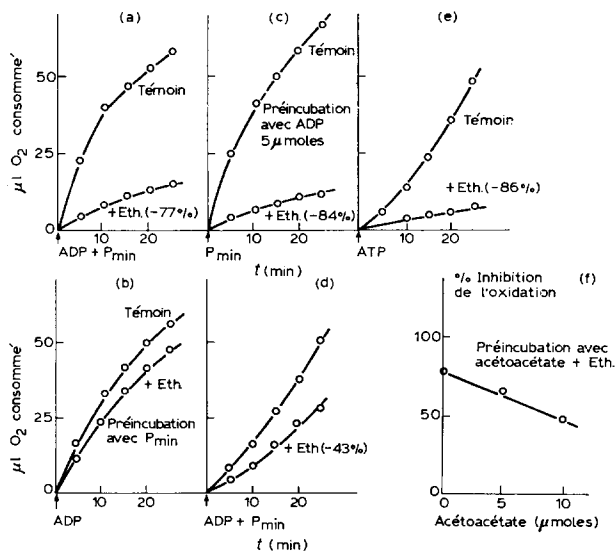


Fig. 3. Inhibition de l'oxydation du succinate par l'éthacrynate dans différentes conditions. Mitochondries de foie de rat: 4.8 mg protéines par essai; éthacrynate (Eth.), $1 \cdot 10^{-4}$ M préincubé 10 min avec les mitochondries et le succinate. ADP, 5 μ moles; ATP, 5 μ moles; phosphate minéral (P_{min}), 5 μ moles. Milieu respiratoire selon ERNSTER¹² (cf. MÉTHODES). Expériences a, b, c, e, f, mitochondries très couplées; expérience d, mitochondries faiblement couplées (cf. texte).

En faisant varier les concentrations respectives d'éthacrynate et de phosphate, et en utilisant la représentation de Lineweaver-Burk, nous avons établi qu'il y avait compétition entre le phosphate et l'éthacrynate (Fig. 4).

En utilisant des mitochondries faiblement couplées (obtenues en les maintenant 1 h à 25°) on voit (Fig. 3d) que l'inhibition est fonction du degré de couplage des mitochondries.

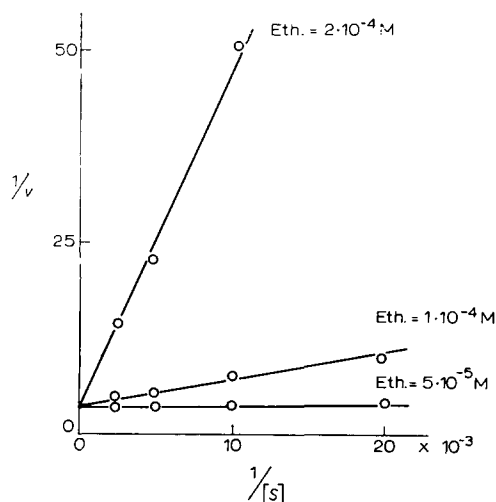


Fig. 4. Inhibition de l'oxydation du succinate par l'éthacrynate en fonction des concentrations en phosphate minéral et en éthacrynate. Mitochondries de foie de rat: 5.4 mg protéines par essai; milieu respiratoire selon ERNSTER¹² (cf. MÉTHODES); éthacrynate (Eth.); S, μ moles de phosphate minéral; v , μ atomes d'oxygène consommé/min. Le phosphate et l'éthacrynate sont préincubés 10 min avec les mitochondries et le substrat; les oxydations sont déclenchées par addition d'ADP (5 μ moles) + phosphate (5 μ moles) après 10 min; lorsqu'il y a préincubation de phosphate, la quantité de phosphate ajouté au temps zéro est diminuée d'autant.

TABLEAU I

INFLUENCE DU PHOSPHATE MINÉRAL PRÉINCUBÉ SUR L'INHIBITION DE L'OXYDATION DU SUCCINATE PAR L'ÉTHACRYNATE: OXYDATION STIMULÉE PAR ADP + PHOSPHATE ET OXYDATION STIMULÉE PAR 2,4-DINITROPHÉNOL

Mitochondries de foie de rat: 6 mg protéines par essai; milieu respiratoire selon ERNSTER¹²; succinate, 20 μ moles; l'éthacrynate est préincubé avec les mitochondries pendant 10 min; ADP (5 μ moles) + phosphate (5 μ moles) et 2,4-dinitrophénol ($1 \cdot 10^{-4}$ M) ajoutés après 10 min d'équilibration.

	Ethacrynate ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	P_{min} préincubé (0.5 μ mole)	AO (μ atomes O/min par mg protéine)	Inhibition (%)
ADP + phosphate	o		42	
	+		7.7	83
	+	+	33.4	20
2,4-Dinitrophénol	o		51	
	+		5.4	90
	+	+	26	49

L'oxydation du succinate provoquée par addition d'ATP (Fig. 3e) est également fortement inhibée par l'éthacrynate.

Enfin, si l'on abaisse le rapport NADH/NAD⁺ par addition d'acétoacétate (Fig. 3f), l'inhibition est diminuée.

D'autre part, si après préincubation des mitochondries avec l'éthacrynate et le succinate, on lave ces mitochondries par centrifugation, de telles mitochondries présentent toujours une forte inhibition de l'oxydation du succinate.

Le phosphate minéral préincubé lève aussi bien l'inhibition de l'oxydation du succinate par l'éthacrynate lorsque celle-ci est déclenchée, non plus par addition d'ADP + phosphate minéral, mais par addition de 2,4-dinitrophénol (Tableau I); cette levée est toutefois moins importante dans le deuxième cas.

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'ARSÉNIATE SUR L'INHIBITION DE L'OXYDATION DU SUCCINATE PAR L'ÉTHACRYNATE

Mitochondries de foie de rat: 6 mg protéines par essai; milieu respiratoire selon ERNSTER¹²; l'éthacrynate est préincubé 10 min avec les mitochondries et le succinate. L'arséniate est, suivant les conditions, soit ajouté après 10 min d'équilibration pour déclencher l'oxydation, soit préincubé avec les mitochondries et l'éthacrynate; dans tous les cas, la quantité totale d'arséniate ajouté est la même (concentration finale, $1 \cdot 10^{-3}$ M).

<i>Ethacrynate</i> ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	<i>Arséniate (M)</i>		<i>AO</i> (μ moles O/min par mg protéine)	<i>Inhibition</i> (%)
	<i>Préincubé</i>	<i>Ajouté après 10 min</i>		
o +	0	$1 \cdot 10^{-3}$	78 10	87
o +	$1 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$	79 33.2	58
o +	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	85.5 62.5	27

Influence de l'arséniate

Le Tableau II montre que l'éthacrynate $1 \cdot 10^{-4}$ M préincubé 10 min avec les mitochondries inhibe fortement l'oxydation du succinate stimulée par l'arséniate (87 %). Si l'on préincube les mitochondries avec le succinate, l'éthacrynate et des quantités croissantes d'arséniate, l'inhibition diminue progressivement. La réactivité de l'éthacrynate et de l'arséniate sont sensiblement les mêmes, puisque pour une même concentration de ces 2 substances ($1 \cdot 10^{-4}$ M) pendant la préincubation, l'inhibition est de 58 %.

Influence du glutamate

L'inhibition de l'oxydation du succinate n'est pas due à une accumulation d'oxalacétate^{15,16}; en effet, l'addition de glutamate (qui éliminerait toute trace d'oxalacétate par transamination) ne lève en rien cette inhibition.

Influence de la sérumalbumine bovine

L'addition de sérumalbumine bovine (4 mg de sérumalbumine/6 mg protéines mitochondriales par éthacrynate $1 \cdot 10^{-4}$ M) lève presque totalement l'inhibition de l'oxydation du succinate.

Influence de l'éthacrynate sur le transfert d'électrons en sens inverse

Le Tableau III montre que l'éthacrynate inhibe fortement le transfert d'électrons en sens inverse, quelle que soit l'origine de l'énergie qui le provoque. En aérobiose, l'inhibition est très importante (90 %) et diminuée si l'on ajoute de l'ADP + phosphate minéral ou de l'ATP; dans tous les cas, l'inhibition du transfert d'électrons est toujours nettement supérieure à celle de la consommation d'oxygène. En anaérobiose et en l'absence de Mg^{2+} (qui provoquerait une activité ATPasique importante) l'éthacrynate inhibe également fortement ce transfert.

TABLEAU III

INFLUENCE DE L'ÉTHACRYNATE SUR LE TRANSFERT D'ÉLECTRONS EN SENS INVERSE DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS

Mitochondries de foie de rat: 6 mg protéines par essai; conditions expérimentales selon ERNSTER¹² (cf. MÉTHODES); succinate 20 μ moles, acétoacétate 5 μ moles.

	Inhibition (%)		Rapports $\Delta AcAc/\Delta O$	
	Oxygène consommé (ΔO)	Acétoacétate disparu ($\Delta AcAc$)	Témoin	Avec éthacrynate
Air + Mg^{2+}				
O	36	91	0.51	0.07
ATP (5 μ moles)	16	55	0.42	0.23
ADP (5 μ moles)				
+ P_{min} (5 μ moles)	15	53	0.3	0.16
Azote sans Mg^{2+}				
ATP (5 μ moles)	—	70	—	—

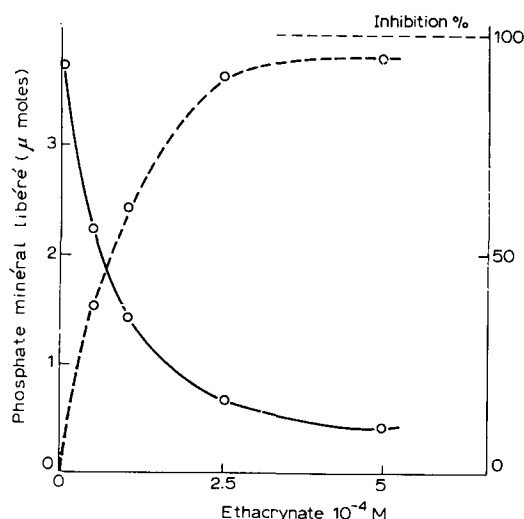


Fig. 5. Influence de l'éthacrynate sur l'ATPase stimulée par le 2,4-dinitrophénol. Mitochondries de coeur de boeuf: 3.5 mg prot./essai; milieu d'incubation selon BRUNI¹¹; ATP: 5 μ moles, éthacrynate préincubé 6 min avant l'addition du 2,4-dinitrophénol. —, libération de phosphate minéral dans le milieu; ----, inhibition par l'éthacrynate de l'ATPase stimulée par le 2,4-dinitrophénol.

Influence de l'éthacrynate sur différents types d'activité ATPasique

ATPase stimulée par le 2,4-dinitrophénol

L'éthacrynate préincubé 6 min avec les mitochondries inhibe l'activité ATPasique stimulée par le 2,4-dinitrophénol (Fig. 5). Pour une concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M, cette activité est inhibée presque complètement. Lorsque les concentrations en éthacrynate et 2,4-dinitrophénol sont équimoléculaires, l'inhibition est d'environ 50 %.

ATPase stimulée par le magnésium

L'ATPase stimulée par Mg^{2+} n'est pas inhibée par l'éthacrynate.

ATPase de mitochondries congelées-dégelées

L'activité ATPasique présente dans des mitochondries congelées puis décongelées n'est pas inhibée par l'éthacrynate (Fig. 6a); cependant, si on lave ces mitochondries après le traitement de congélation-décongélation, elles présentent toujours une activité ATPasique qui cette fois, est inhibée par l'éthacrynate (Fig. 6b).

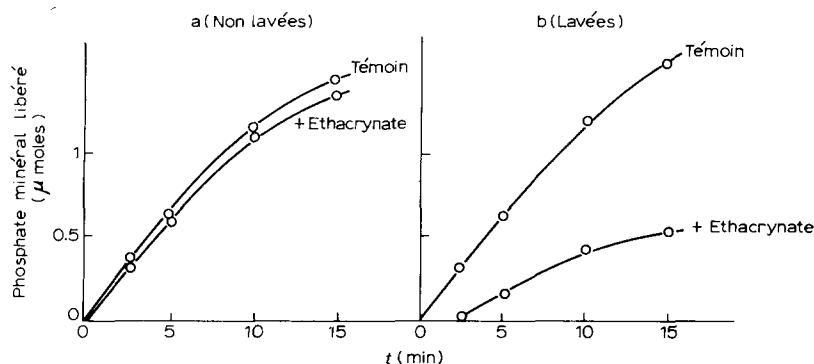


Fig. 6. Influence de l'éthacrynate sur l'ATPase de mitochondries de coeur de boeuf congelées-dégelées; effet du lavage. Protéines mitochondriales: 2.4 mg/essai; milieu respiratoire selon BRUNI¹¹; ATP 5 μmoles, éthacrynate (préincubé 6 min avant l'addition de l'ATP) $1 \cdot 10^{-4}$ M.

DISCUSSION

1. Ces résultats ne permettent pas de situer avec précision le lieu d'intervention de l'éthacrynate; cependant, plusieurs faits expérimentaux sont en faveur d'une intervention de l'éthacrynate sur le système responsable du couplage de l'énergie:

le fait que l'action inhibitrice de l'éthacrynate soit modifiée par la présence d'ADP ou de 2,4-dinitrophénol dans le milieu réactionnel et qu'elle dépende de l'état de couplage des mitochondries;

le fait que le phosphate et l'éthacrynate soient compétitifs dans la réaction d'oxydation du succinate;

l'inhibition du transfert d'électrons en sens inverse, en particulier dans le cas où les mitochondries sont en anaérobiose, l'énergie étant fournie par addition d'ATP;

l'inhibition de l'ATPase stimulée par le 2,4-dinitrophénol et la non inhibition de l'ATPase stimulée par le magnésium.

2. D'autres faits laissent supposer que l'action de l'éthacrynate est d'autant plus importante que les transporteurs de la chaîne respiratoire sont plus réduits:

l'inhibition très importante de l'oxydation du succinate mesurée avec des mitochondries en l'absence de système accepteur ADP + phosphate minéral; ces conditions sont précisément celles qui provoquent la réduction la plus complète des pyridine nucléotides²⁰;

la diminution progressive de l'inhibition de l'oxydation du succinate lorsqu'on abaisse le rapport NADH/NAD⁺;

le fait que l'inhibition de l'oxydation du succinate est d'autant plus faible que le milieu respiratoire est plus riche en oxygène (Y. GAUDEMER ET B. FOUCHER, résultats non publiés).

3. L'inhibition du transfert d'électrons en sens inverse par l'éthacrynate permet de situer son action au moins au niveau du premier site, mais n'exclut pas qu'il agisse en d'autres points de la chaîne respiratoire.

4. L'inhibition de l'oxydation du succinate par l'éthacrynate n'étant pas levée par le 2,4-dinitrophénol, et l'éthacrynate inhibant l'oxydation stimulée par le 2,4-dinitrophénol, il serait logique de penser que l'éthacrynate intervienne dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes avant le point d'action du 2,4-dinitrophénol. D'autre part, l'éthacrynate et le phosphate étant compétitifs, le phosphate devrait entrer dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes avant le point d'action du 2,4-dinitrophénol. Cette conclusion n'est pas en accord avec les théories les plus acceptées à l'heure actuelle²², selon lesquelles l'action du 2,4-dinitrophénol se situerait avant l'entrée du phosphate dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes.

5. En ce qui concerne la nature et le mécanisme d'intervention de l'éthacrynate, d'autres travaux seront nécessaires; comme nous le rappelons (INTRODUCTION) l'éthacrynate réagit avec des groupements -SH protéiques; il faut signaler à ce propos l'analogie de structure entre l'éthacrynate et les dérivés de l'acroléine tels que l'acrylate d'éthyle, qui sont des inhibiteurs compétitifs de groupements -SH (réf. 19). Le fait que la sérumalbumine empêche l'action de l'éthacrynate ne permet pas d'affirmer ou de confirmer cette hypothèse¹⁸. Si toutefois l'éthacrynate réagit avec des groupements -SH protéiques, le fait qu'il y ait compétition entre l'inhibiteur et le phosphate minéral impliquerait une interaction possible entre le phosphate minéral et ces groupements -SH dans le mécanisme des oxydations phosphorylantes.

6. Le fait, qu'après préincubation des mitochondries avec l'éthacrynate, l'inhibiteur ne peut être éliminé par lavage, semble bien indiquer qu'il réagit de manière irréversible avec les mitochondries.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur E. C. SLATER d'avoir bien voulu nous accorder un entretien au cours duquel nous avons pu discuter de ce travail.

Ce travail a bénéficié de la collaboration technique de Mademoiselle D. FENEUX et a été facilité par l'aide financière apportée par le C.N.R.S. (RCP 21).

RÉSUMÉ

1. Les effets de l'éthacrynate sur les oxydations de plusieurs substrats, le transfert d'électrons en sens inverse et différents types d'ATPase sont décrits.

2. En milieu phosphate, l'addition d'ADP ou de 2,4-dinitrophénol augmente

fortement l'inhibition de l'oxydation du β -hydroxybutyrate; dans ces conditions, l'oxydation du succinate est faiblement inhibée.

3. En milieu sans phosphate, l'éthacrynate inhibe fortement l'oxydation du succinate; cette inhibition dépend du couplage des mitochondries et du degré d'oxydoréduction des pyridine nucléotides. Le phosphate et l'éthacrynate sont compétitifs; la sérumbalbumine bovine lève proportionnellement cette inhibition. Après lavage des mitochondries préincubées avec l'éthacrynate et le succinate, l'inhibition de l'oxydation du succinate est toujours très importante.

4. L'oxydation du succinate stimulée par l'arséniate est également fortement inhibée par l'éthacrynate; l'arséniate préincubé avec l'éthacrynate diminue l'inhibition.

5. L'éthacrynate inhibe fortement le transfert d'électrons en sens inverse, l'énergie nécessaire étant fournie soit directement par l'oxydation mitochondriale, soit indirectement par addition d'ATP en anaérobiose.

6. L'éthacrynate inhibe l'ATPase stimulée par le 2,4-dinitrophénol et n'inhibe pas l'ATPase stimulée par le magnésium; l'ATPase de mitochondries congelées-dégelées n'est inhibée par l'éthacrynate que si ces mitochondries ont subi un lavage après le traitement de congélation-décongélation.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. VILKAS ET E. LEDERER, *Experientia*, 18 (1962) 546.
- 2 Y. GAUDEMER, B. FOUCHER ET D. GAUTHERON, *Compt. Rend.*, 261 (1965) 3899.
- 3 D. E. DUGGAN ET R. M. NOLL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109 (1965) 388.
- 4 A. FLUHARTY ET D. R. SANADI, *Biochemistry*, 2 (1963) 519.
- 5 M. V. RILEY ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2083.
- 6 D. E. GRIFFITHS, *Essays in Biochemistry*, 1 (1965) 91.
- 7 E. C. WEINBACH, *Anal. Biochem.*, 2 (1961) 335.
- 8 F. L. CRANE, J. F. GLENN ET D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 476.
- 9 E. E. JACOBS, M. JACOB, D. R. SANADI ET L. B. BRADLEY, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 147.
- 10 C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- 11 A. BRUNI, S. LUCIANI ET C. BORTIGNON, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 434.
- 12 L. ERNSTER, 1st IUB/IUBS International Symposium, Stockholm 1960, Biological Structure and Function, Vol. 2, p. 139.
- 13 P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 58 (1954) 699.
- 14 R. KIELLEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 574.
- 15 A. B. PARDEE ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 1085.
- 16 N. B. DAS, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1124.
- 17 E. C. SLATER ET W. C. HULSMANN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 47 (1961) 1109.
- 18 E. C. WEINBACH ET J. GARBUS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 169.
- 19 M. DIXON ET E. C. WEBB, *Enzymes*, 2nd Edition, Longmans, Londres, 1964, p. 342.
- 20 B. CHANCE ET G. HOLLUNGER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1534.
- 21 N. BERTIN, D.E.S. Fac. Sciences, Orsay, Juin 1966.
- 22 L. ERNSTER ET C. P. LEE, *Ann. Rev. Biochem.*, 33 (1964) 729.