

BBA 65617

DÉSAMINATION OXYDATIVE DE L'ACIDE L-HOMOCYSTÉINE-SULFINIQUE PAR LA L-GLUTAMODÉSHYDROGÉNASE DE FOIE DE BŒUF.  
INHIBITION DE L'ENZYME PAR L'ACIDE L-HOMOCYSTÉIQUE

BERNADETTE JOLLÈS-BERGERET

*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, 91-Orsay (France)*

(Reçu le 28 février, 1967)

## SUMMARY

*The oxidative deamination of L-homocysteinesulfinic acid by liver L-glutamate dehydrogenase. Enzyme inhibition by L-homocysteic acid*

1. L-Homocysteinesulfinic acid is reversibly deaminated by liver L-glutamate dehydrogenase (L-glutamate:NAD(P) oxidoreductase (deaminating), EC 1.4.1.3) with the formation of ammonia and  $\alpha$ -ketosulfinic acid. The rate of deamination at the optimum pH (pH 8.8) is about 65% of that observed for L-glutamic acid. The affinity of the enzyme for homocysteinesulfinic acid is ten times smaller than for glutamic acid.

2. L-Homocysteic acid is a strong inhibitor of the activity of the enzyme on its different substrates.

La L-glutamodéshydrogénase (L-glutamate:NAD(P) oxydoréductase (désaminante), EC 1.4.1.3), longtemps considérée comme ayant pour seul substrat aminé l'acide L-glutamique<sup>1-4</sup>, peut néanmoins catalyser d'après des expériences assez récentes<sup>5</sup> la désamination oxydative d'autres acides aminés de structure voisine de celle de l'acide glutamique: la L-norvaline qui présente en chaîne droite le même nombre d'atomes de carbone que l'acide dicarboxylique est, parmi ces autres acides aminés, celui dont la vitesse d'oxydation est la plus grande.

L'homocystéine et ses dérivés d'oxydation, l'acide homocystéinesulfinique et l'acide homocystéique, possèdent également une structure analogue à celle de l'acide glutamique, dans laquelle le groupement carboxylique en  $\gamma$  est remplacé respectivement par un groupe —SH, —SO<sub>2</sub>H ou —SO<sub>3</sub>H. STRECKER<sup>1</sup> a toutefois observé que la DL-homocystéine n'est pas un substrat pour la L-glutamodéshydrogénase.

Il est montré dans le présent travail que, seul parmi les dérivés utilisés ici de la série de l'homocystéine et contrairement aussi à l'acide cystéinesulfinique, l'acide homocystéinesulfinique est un bon substrat pour la L-glutamodéshydrogénase.

L'acide homocystéique, qui n'est pas attaqué, est un inhibiteur à la fois de l'oxydation de l'acide glutamique et de celle de l'acide homocystéinesulfinique. Quelques caractéristiques de l'action de l'enzyme sur son nouveau substrat sont décrites.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Origine des produits utilisés.* Acide L-glutamique (chlorhydrate), L-norvaline: Fluka; acides L-, D- et DL-homocystéinesulfiniques, acide L-homocystéique, synthétisés selon JOLLÈS-BERGERET<sup>6</sup>, acide L-cystéinesulfinique: Calbiochem; NAD (acide libre), NADP (sel de sodium), préparation de L-glutamodéshydrogénase de foie de bœuf "analytical reagent grade" en solution à 100 mg pour 10 ml dans la glycérine à 50%, lot No. 6176512: Boehringer.

*Méthodes.* La vitesse d'oxydation des substrats introduits est mesurée par l'augmentation de la densité optique à 340 m $\mu$ , due à la formation de NADH ou de NADPH, suivie au spectrophotomètre Zeiss PMQII dans des cuves de 1 cm. La composition exacte des milieux d'incubation, dont le volume est toujours de 2, 4 ml, est indiquée sous chaque tableau ou figure. Les expériences ont lieu en atmosphère ordinaire à la température de 20–22°. L'enzyme est ajouté au temps 0 et le milieu énergiquement agité. Les résultats sont exprimés généralement en activité par minute<sup>7</sup>, cette activité est calculée d'après l'accroissement de la densité optique observée dans les 40 secondes suivant l'addition de l'enzyme, compte-tenu des témoins sans substrat, sans enzyme ou sans coenzyme.

Le dosage de NADH est basé sur la valeur du coefficient d'extinction du produit à 340 m $\mu$ , valeur égale à  $6.22 \cdot 10^6$  cm<sup>2</sup>/mol (bibl. 8).

Le dosage de l'ammoniac formé est effectué sur une portion aliquote du milieu, après diffusion dans l'acide chlorhydrique 0.05 M en cellules de Conway, selon la méthode de RUSSELL<sup>9</sup>.

L'identification des composés présents dans les milieux après incubation est réalisée par chromatographie sur papier Whatman No. 1 après développement dans le solvant phénol-cau (8:2, vol./vol.), les agents révélateurs étant la ninhydrine pour les acides aminés, le réactif à l'iodoplatinate<sup>10</sup> pour les composés soufrés réducteurs, l'o-phénylènediamine pour les acides  $\alpha$ -cétoniques<sup>11</sup>.

#### RÉSULTATS

##### (1) Action de la L-glutamodéshydrogénase sur plusieurs acides aminés soufrés

Le Tableau I montre les résultats obtenus avec les acides aminés soufrés suivants: acides L-, DL- et D-homocystéinesulfiniques, acide L-homocystéique, acide L-cystéinesulfinique, en comparaison avec ceux trouvés dans les mêmes conditions avec l'acide L-glutamique et la L-norvaline. Il ressort de ce tableau que le seul acide aminé soufré pouvant être oxydé par la L-glutamodéshydrogénase est l'acide L-homocystéinesulfinique. La forme D de cet acide est inactive et inhibe sensiblement, dans le composé racémique, l'oxydation de la forme L (cf. (6)). L'acide L-homocystéique et l'acide L-cystéinesulfinique ne sont pas oxydés, même en utilisant dans les essais des concentrations d'enzyme 10 fois supérieures aux concentrations habituelle-

TABLEAU I

ACTION DE LA L-GLUTAMODÉSHYDROGÉNASE SUR PLUSIEURS ACIDES AMINÉS

Conditions des essais: tampon pyrophosphate de sodium-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.3 pour l'acide glutamique, pH 8.8 pour les autres acides aminés, NAD<sup>+</sup> 3  $\mu$ moles; acides aminés forme L ou D 50  $\mu$ moles, forme DL 100  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g.

Acide aminé	Activité relative de l'enzyme
Acide L-glutamique	100
Acide L-homocystéinesulfinique	67
Acide DL-homocystéinesulfinique	57
Acide D-homocystéinesulfinique	0
Acide L-homocystéique (1)*	0
Acide L-homocystéique (10)*	0
Acide L-cystéinesulfinique (1)*	0
Acide L-cystéinesulfinique (10)*	0
L-Norvaline	55

\* (1): quantité d'enzyme indiquée ci-dessus; (10): 10 fois cette quantité d'enzyme.

ment employées. Les pH choisis pour ces expériences correspondent aux pH optima d'action de l'enzyme pour l'oxydation de l'acide glutamique d'une part (pH 8.3 (bibl. 1)), pour l'oxydation de l'acide homocystéinesulfinique d'autre part (pH 8.8 *cf.* (5)). Dans les essais en tampon pyrophosphate rapportés ici, l'oxydation de la L-norvaline par rapport à celle de l'acide glutamique (55%) est beaucoup plus forte que celle indiquée par STRUCK ET SIZER<sup>5</sup> dans des conditions analogues de pH, mais en tampon Tris (17%). Nous avons retrouvé des résultats voisins de ceux de ces auteurs en utilisant du tampon Tris.

(2) *Inactivation par la chaleur de la L-glutamodéshydrogénase. Activité résiduelle vis-à-vis de l'acide L-glutamique et de l'acide L-homocystéinesulfinique*

En vue de savoir si l'acide L-homocystéinesulfinique est réellement substrat de la L-glutamodéshydrogénase et n'est pas désaminé par un autre composé éventuellement contenu dans la préparation enzymatique, des courbes d'inactivation par

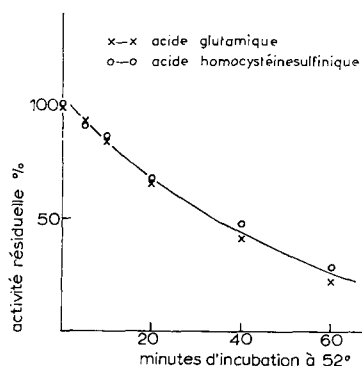


Fig. 1. Inactivation par la chaleur de la L-glutamodéshydrogénase. Conditions des essais: tampon pyrophosphate de sodium-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.8; NAD<sup>+</sup> 3  $\mu$ moles; acide L-glutamique 50  $\mu$ moles; acide DL-homocystéinesulfinique 100  $\mu$ moles; enzyme 0.4 ml (*cf.* texte).

la chaleur ont été réalisées (Fig. 1). L'enzyme est mis dans du tampon phosphate de potassium à pH 7.6 et incubé à 52°. A des intervalles de temps donnés, on prélève 0.2 ml auxquels on ajoute 1.8 ml du même tampon à 0°. Après centrifugation pour éliminer les protéines dénaturées, on utilise 0.4 ml du surnageant pour chaque essai. La Fig. 1 montre que, pour des périodes d'incubation allant jusqu'à 1 h, la perte d'activité relative vis-à-vis des 2 substrats a lieu à des vitesses identiques.

*(3) Bilan de la réaction de désamination oxydative de l'acide L-homocystéinesulfinique par la L-glutamodéshydrogénase*

L'action de la L-glutamodéshydrogénase sur l'acide L-glutamique aboutit à la formation en quantités équimoléculaires de NADH, d'ammoniac et d'acide oxo-2-glutarique<sup>7</sup>. Dans le cas de l'acide L-homocystéinesulfinique, des quantités équimoléculaires de NADH et d'ammoniac ont été trouvées (Tableau II). D'autre part, un acide  $\alpha$ -cétonique possédant un groupement sulfinyle a été décelé par chromatographie sur papier des milieux enzymatiques après incubation. Dans le solvant phénol-eau (8:2, vol./vol.) qui représente un des rares solvants essayés permettant de séparer cet acide cétonique de l'acide aminé initial, son  $R_F$  est de 0, 10,  $R_F$  identique à celui de l'acide  $\alpha$ -cétosulfinique obtenu après transamination de l'acide homocystéinesulfinique avec les acides pyruvique ou oxo-2 glutarique<sup>12</sup>. En ce qui concerne la quantité d'acide aminé transformé par l'enzyme, après 1 h comme après 20 h d'incubation, on constate le faible pourcentage de NADH ou d'ammoniac produits.

TABLEAU II

BILAN DE LA RÉACTION DE DÉSAMINATION OXYDATIVE DE L'ACIDE L-HOMOCYSTÉINESULFINIQUE PAR LA L-GLUTAMODÉSHYDROGÉNASE

Conditions des essais: tampon pyrophosphate-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.8; NAD<sup>+</sup> 6  $\mu$ moles; acide DL-homocystéine sulfinique 125  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g. Temps d'incubation: 1 h (Exp. 1); 20 h (Exp. 2, 3, 4).

Exp.	NADH ( $\mu$ moles)	NH <sub>3</sub> ( $\mu$ moles)
1	0.99	1.00
2	1.53	1.59
3	1.59	1.56
4	1.59	1.68

*(4) Réversibilité de la réaction de désamination de l'acide L-homocystéinesulfinique par addition d'ions ammonium*

Si des ions ammonium sont ajoutés au milieu enzymatique complet après une incubation prolongée, on constate (Fig. 2) une réoxydation du NADH. La réaction de désamination de l'acide L-homocystéinesulfinique est donc facilement réversible, comme le sont celles de l'acide L-glutamique<sup>1</sup> et de la L-leucine<sup>5</sup>, substrats du même enzyme.

*(5) Détermination du pH optimum et des constantes de Michaelis enzyme-substrat. Action du NADP.*

Le pH optimum d'action de la L-glutamodéshydrogénase vis-à-vis de l'acide

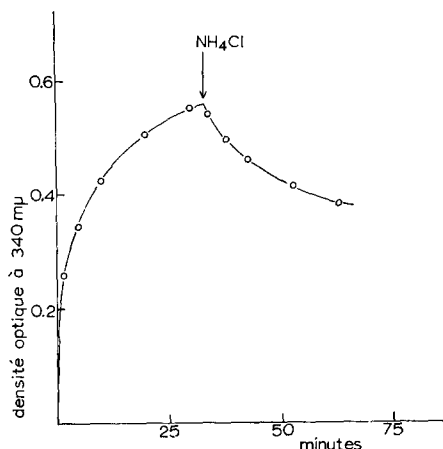


Fig. 2. Réversibilité de la réaction de désamination de l'acide L-homocystéinesulfinique par addition d'ions ammonium. Conditions des essais: Tampon Tris-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.3; NAD<sup>+</sup> 3  $\mu$ moles; acide DL-homocystéinesulfinique 100  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g. On ajoute 200  $\mu$ moles de NH<sub>4</sub>Cl au moment indiqué par la flèche.

L-homocystéinesulfinique se situe aux environs de 8.8, comme le montrent les courbes de la Fig. 3. Ce pH est plus élevé que le pH optimum (environ 8.3) indiqué pour l'acide glutamique<sup>1</sup>, mais il est nettement plus bas que celui (environ 9.8) observé pour la L-leucine<sup>5</sup>.

Les constantes de Michaelis de la L-glutamodéshydrogénase pour l'acide L-glutamique et pour l'acide L-homocystéinesulfinique sont calculées d'après les courbes de la Fig. 4, selon la méthode de LINEWEAVER ET BURK<sup>13</sup>. Elles sont égales à 1.1.

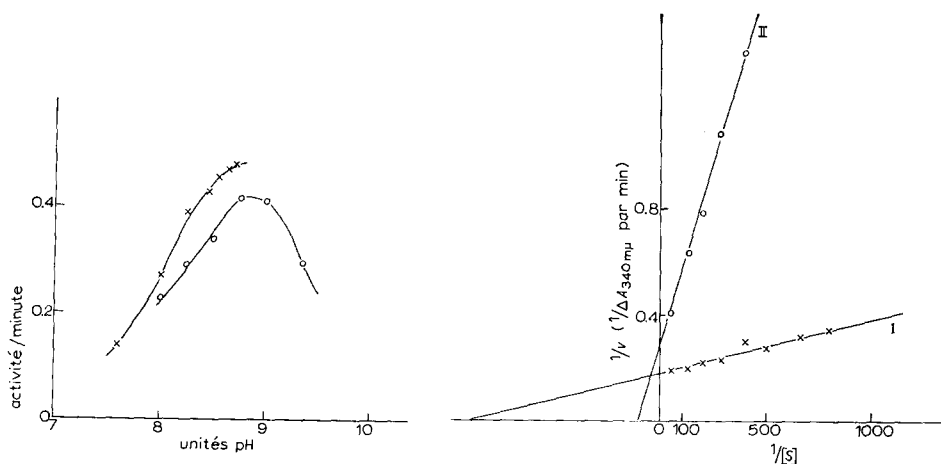


Fig. 3. Détermination du pH optimum d'action de la L-glutamodéshydrogénase sur l'acide L-homocystéinesulfinique. ×, tampon pyrophosphate de sodium-HCl; ○, tampon glycolle-KOH. Conditions d'expérience: tampon 240  $\mu$ moles; NAD<sup>+</sup> 3  $\mu$ moles; acide DL-homocystéinesulfinique 125  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g.

Fig. 4. Détermination de la constante de Michaelis du complexe enzyme-substrat pour l'acide L-glutamique (I) et pour l'acide L-homocystéinesulfinique (II). Conditions d'expérience: tampon Tris-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.3; H(NAD<sup>+</sup>) 3  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g.

$10^{-3}$  M pour l'acide glutamique et  $1.0 \cdot 10^{-2}$  M pour l'acide L-homocystéinesulfinique, à pH 8.3 en tampon Tris. On sait que, pour l'acide glutamique, la valeur de la constante de Michaelis enzyme-substrat varie beaucoup en fonction du pH et du tampon utilisé<sup>1</sup>. Nos résultats tendent donc seulement à montrer que, à un pH voisin du pH optimum d'action de l'enzyme sur les 2 substrats étudiés, l'affinité de l'enzyme pour l'acide glutamique est environ 10 fois plus grande que celle pour l'acide homocystéinesulfinique.

$NADP^+$  peut agir, en remplacement du  $NAD^+$ , comme coenzyme d'oxydation pour l'acide homocystéinesulfinique. L'activité de l'enzyme en présence de  $NADP^+$  est environ 60% de celle observée en présence de la même quantité de  $NAD^+$ . La moins grande efficacité du  $NADP^+$  par rapport à celle du  $NAD^+$  a été observée pour l'acide glutamique par OLSON ET ANFINSEN<sup>3,4</sup>.

(6) *Inhibition de la L-glutamodéshydrogénase par l'acide L-homocystéique. Action des acides D-homocystéinesulfinique et L-cystéinesulfinique*

On a vu que l'acide L-homocystéique n'est pas un substrat pour la L-glutamodéshydrogénase. Introduit en quantité équimoléculaire avec un des substrats de l'enzyme (acide L-glutamique, acide L-homocystéinesulfinique, L-norvaline), il inhibe fortement, de 40 à 90% selon le cas, l'oxydation de ces composés. Au moins en ce qui concerne l'acide glutamique et l'acide homocystéinesulfinique, l'inhibition est d'autant plus forte que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est moins grande.

Dans les mêmes conditions, l'acide D-homocystéinesulfinique inhibe sensiblement (15%) l'oxydation de la forme L du même composé et faiblement (6%) l'oxydation de l'acide glutamique. Quant à l'acide L-cystéinesulfinique, il n'est en aucun cas un inhibiteur.

TABLEAU III

INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DE LA L-GLUTAMODÉSHYDROGÉNASE PAR LES ACIDES L-HOMOCYSTÉIQUE, D-HOMOCYSTÉINESULFINIQUE ET L-CYSTÉINESULFINIQUE

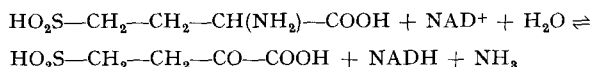
Conditions des essais: tampon pyrophosphate-HCl 240  $\mu$ moles, pH 8.3 (acide L-glutamique) et pH 8.8 (acide L-homocystéinesulfinique, L-norvaline);  $NAD^+$  3  $\mu$ moles; substrats et inhibiteurs 50  $\mu$ moles; enzyme 50  $\mu$ g. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition.

Acides aminés introduits	Substrats		
	Acide L-glutamique	Acide L-homocystéine-sulfinique	L-Norvaline
Acide L-homocystéique	41	86	93
Acide D-homocystéinesulfinique	6	15	—
Acide L-cystéinesulfinique	0	0	—

DISCUSSION

L'acide L-homocystéinesulfinique est désaminé oxydativement par la L-glutamodéshydrogénase, en présence de  $NAD^+$  ou  $NADP^+$ . Cette désamination aboutit à la production simultanée, en quantités équimoléculaires, de  $NH_3$  et de  $NADH$ , ainsi qu'à la genèse d'un acide cétosulfinique dont le mode de formation et le comportement chromatographique font penser qu'il est très probablement le même que

celui décelé dans les expériences de transamination de l'acide aminé avec les acides  $\alpha$ -cétoniques<sup>12</sup>. L'équation suivante, analogue à celle établie pour l'acide glutamique<sup>7</sup>, est proposée pour la réaction :

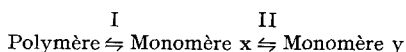


Dans nos conditions d'expérience, la réaction d'oxydation s'arrête avec un faible pourcentage d'acide aminé transformé; l'équilibre de la réaction peut être facilement déplacé par addition d'ions ammonium au milieu d'incubation.

La pureté de la préparation enzymatique utilisée, les expériences d'inactivation par la chaleur sont une garantie que la réaction est catalysée par la glutamodéshydrogénase elle-même. Comme dans le cas de l'acide glutamique<sup>7</sup>, seule la forme L de l'acide homocystéinesulfinique est oxydée, la forme D n'est pas attaquée et inhibe sensiblement l'oxydation de son isomère optique.

La comparaison de l'activité de l'enzyme sur l'acide glutamique et sur l'acide aminé soufré fait apparaître que ce dernier est oxydé à une vitesse appréciable (environ 65% de celle de l'acide glutamique). Dans ce sens, l'acide L-homocystéinesulfinique est un substrat supérieur à la L-norvaline et, a fortiori, aux autres acides aminés pouvant être oxydés par l'enzyme<sup>5</sup>. D'autre part, le pH optimum de la réaction pour l'acide homocystéinesulfinique (pH 8.8) se situe plus près du pH optimum pour l'acide glutamique (pH 8.3) que de celui déterminé pour d'autres acides aminés tels que la leucine (pH 9.8). Cependant l'affinité de l'enzyme est beaucoup plus grande (presque 10 fois) pour l'acide glutamique que pour l'acide homocystéinesulfinique au moins à pH 8.3.

Etant donné les connaissances que l'on a actuellement sur la glutamodéshydrogénase, grâce surtout aux travaux de FRIEDEN<sup>14</sup> et de BITENSKY, YIELDING ET TOMKINS<sup>15-17</sup>, d'après lesquels l'activité sur l'acide glutamique serait liée à l'existence d'une forme allostérique de l'enzyme, le monomère x, en équilibre d'une part avec le polymère se formant en solution concentrée, d'autre part avec le monomère y se formant aux pH plus alcalins et agissant plus spécialement sur l'alanine, selon l'équation suivante :



il serait intéressant de savoir si l'acide homocystéinesulfinique est substrat plus particulièrement du monomère x ou du monomère y. L'étude de l'action de composés tels que ADP ou l'hydroxyde méthylmercurique, de GTP ou du diéthylstilboestrol sur l'activité de l'enzyme vis-à-vis de l'acide aminé soufré serait susceptible de fournir une réponse valable puisque de tels composés ou bien empêchent la transformation du monomère x en monomère y, ou bien au contraire favorisent cette transformation<sup>15-17</sup>.

Seul parmi les composés étudiés de la série de l'homocystéine, et contrairement aussi à l'acide cystéinesulfinique, l'acide L-homocystéinesulfinique est substrat de la L-glutamodéshydrogénase. D'autre part, nous avons constaté que l'acide L-homocystéique est un puissant inhibiteur de l'action de l'enzyme, le caractère compétitif de cette inhibition étant hautement probable. Il est tentant de relier ces résultats à des observations antérieures et de suggérer quelques hypothèses. Contrairement à

l'acide cystéinesulfinique qui n'est ni substrat ni inhibiteur, l'acide L-homocystéine-sulfinique et l'acide L-homocystéique semblent tous deux pouvoir être fixés sur l'enzyme. La désamination ou la non-désamination de la molécule fixée pourrait alors être davantage liée à la structure interne de cette molécule qu'à sa position à la surface de l'enzyme. Or cette structure interne, dans la mesure où elle est livrée par l'étude des spectres infra-rouges, semble effectivement être différente entre le composé à groupement sulfinyle et le composé à groupement sulfonyl<sup>6</sup> et il est particulièrement intéressant de noter ici qu'il y a, si l'on compare les spectres, des zones d'absorption communes à l'acide homocystéinesulfinique et à l'acide glutamique et peu fréquentes chez les autres acides aminés. D'autre part, l'acide homocystéinesulfinique, comme l'acide glutamique, n'est pas attaqué par la D-aminoacide oxydase de rein de porc (B. JOLLÈS-BERGERET, résultat non publié).

L'inhibition même de l'enzyme par l'acide L-homocystéique mérite d'être soulignée: en effet, d'après les expériences détaillées de CAUGHEY, SMILEY ET HELLERMAN<sup>18</sup> sur les inhibiteurs compétitifs de la glutamodéshydrogénase, seul le D-glutamate parmi les acides aminés étudiés par ces auteurs est susceptible de donner une forte inhibition (plusieurs acides non aminés sont aussi de bons inhibiteurs). L'acide L-homocystéique représente donc, à notre connaissance, le premier exemple d'un acide aminé de forme L- inhibiteur puissant de la glutamodéshydrogénase.

Enfin, dans la perspective du métabolisme même de l'acide homocystéine-sulfinique en particulier et des acides aminés soufrés en général, il est intéressant de constater que la désamination oxydative du dérivé de l'homocystéine par la L-glutamodéshydrogénase du foie, enzyme à NAD ou NADP, constitue un des rares cas (à l'exception des méthyltransférases) où un acide aminé soufré, sans changer l'état d'oxydation de son groupement soufré, est substrat d'un enzyme autre que d'un enzyme à phosphate de pyridoxal.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Dr. F. CHATAGNER et le Professeur H. CLAUSER de l'intérêt porté à ce travail.

#### RÉSUMÉ

1. L'acide L-homocystéinesulfinique est désaminé oxydativement de façon réversible par la L-glutamodéshydrogénase du foie, avec production d'ammoniac et d'acide  $\alpha$ -cétosulfinique. La vitesse de désamination au pH optimum (pH 8.8) est environ 65% de celle observée avec l'acide L-glutamique. L'affinité de l'enzyme pour l'acide homocystéinesulfinique est environ 10 fois plus faible que pour l'acide glutamique.

2. L'acide L-homocystéique est un puissant inhibiteur de l'activité de l'enzyme sur ses différents substrats.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. J. STRECKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 32 (1951) 448.
- 2 H. J. STRECKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 46 (1953) 128.
- 3 J. A. OLSON ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 67.
- 4 J. A. OLSON ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 841.
- 5 J. STRUCK ET I. W. SIZER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 86 (1960) 260.
- 6 B. JOLLÈS-BERGERET, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 1265.
- 7 H. J. STRECKER, dans S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955, vol. 2, p. 220.
- 8 E. E. SNELL, *Biochemical Preparations*, Wiley and Sons, New York, 1953, vol. 3, p. 23.
- 9 J. A. RUSSELL, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 457.
- 10 J. TOENNIES ET J. J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- 11 T. WIELAND ET E. FISCHER, *Naturwiss.*, 36 (1949) 219.
- 12 B. JOLLÈS-BERGERET ET M. MARTY-LOPEZ, *Compt. Rend.*, 262 (1966) 930.
- 13 H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 14 C. FRIEDEN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 (1963) 410.
- 15 M. W. BITENSKY, K. L. YIELDING ET G. M. TOMKINS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 663.
- 16 M. W. BITENSKY, K. L. YIELDING ET G. M. TOMKINS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 669.
- 17 M. W. BITENSKY, K. L. YIELDING ET G. M. TOMKINS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1077.
- 18 W. S. CAUGHEY, J. D. SMILEY ET L. HELLERMAN, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 591.

*Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 45-53