

BBA 65630

CYTOCHROME b_2 (L-LACTATE DÉHYDROGÉNASE): ÉQUILIBRE ET PROCESSUS ÉLÉMENTAIRES DE LA RÉACTION DE COMBINAISON DU SUBSTRAT À L'ENZYME

MOTOHIRO IWATSUBO* ET CHANTAL CAPEILLÈRE

Service de Biophysique, Institut de Biologie Physico-chimique, 13, rue Pierre Curie, Paris (France)

(Reçu le 20 mars, 1967)

SUMMARY

Cytochrome b_2 (L-lactate dehydrogenase): substrate-enzyme reaction

The rate constants and equilibrium dissociation constants were measured in order to study the combination of the substrate to the cytochrome b_2 (L-lactate:ferri-cytochrome c oxidoreductase, EC 1.1.2.3) from yeast. A method of protection by the substrate to certain modifications of the enzyme was employed in determining the K_s for the ES complex; denaturation of the cytochrome b_2 by urea proved suitable for this purpose. Upon this action, a non-polarized flavine fluorescence appears, synchronized with an increase of protein fluorescence. The reaction rate of this process was measured by a fluorescence spectrophotometer.

The rate of modification of the cytochrome b_2 by urea decreases markedly in the presence of L-lactate or its analogue. The dissociation constant K_s of the ES complex, which is identical to the protection constant K_p , was thus determined. We obtained the values $K_s = 20-40 \mu\text{M}$ for L-lactate and $30-2600 \mu\text{M}$ for oxalate between pH 6 and pH 8. From these results and known kinetic measurements, we can calculate the rate constants concerned with substrate fixation:

$$K_m = 1.2 \text{ mM}, K_s = 20 \mu\text{M}, k_1 = 10^5 \text{ M}^{-1}, k_{-1} = 2 \text{ sec}^{-1}.$$

The second order velocity constant k_1 of the substrate fixation to the cytochrome b_2 , thus calculated, is in good agreement with the value obtained from a direct measurement by means of a stopped flow technique.

INTRODUCTION

La L-lactate déshydrogénase de la levure ou cytochrome b_2 (L-lactate:cytochrome c oxydo réductase, EC 1.1.2.3) a été obtenue, il y a une dizaine d'années, à l'état cristallisé par APPLEBY ET MORTON¹ qui ont mis en évidence sa nature flavohémoprotéique.

* Adresse actuelle: Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette, France.

De nombreux travaux portant sur cet enzyme ont été publiés depuis, tant sur la composition chimique^{2,3} que sur ses propriétés physicochimiques⁴.

Des études cinétiques, avec détermination des constantes de Michaelis relatives au substrat K_m , ont été faites soit par cinétique classique simple⁵⁻⁷, soit par cinétique utilisant un système à mélange rapide⁸⁻¹⁰.

C'est la seule approche qui ait été faite au problème de la combinaison de l'enzyme avec son substrat; or on sait depuis les travaux d'Haldane en 1920 que la constante cinétique K_m peut être, à priori, très différente de la constante de dissociation K_s du complexe enzyme-substrat. Deux observations parallèles de BAUDRAS¹¹ et d'IWATSUBO¹² avaient suggéré que, pour la L-lactate déshydrogénase, K_s devait être beaucoup plus petit que K_m .

Les méthodes, permettant la détermination de la constante de dissociation K_s du complexe enzyme-substrat, sont peu nombreuses et requièrent des conditions d'application très particulières. SLATER¹³ a suggéré une méthode basée sur la comparaison de K_m et V variant corrélativement avec la concentration d'un accepteur. BURTON¹⁴ a proposé une méthode plus générale utilisant l'effet protecteur apporté à l'enzyme par ses substrats ou d'autres effecteurs, inhibiteurs compétitifs par exemple, vis à vis d'un agent inactivant à action progressive. La protection se manifeste par une diminution plus ou moins importante de la vitesse d'inactivation; c'est à la protection de la D-amino acide oxidase contre la dénaturation thermique qu'il l'a utilisée. Il a émis l'hypothèse que cette protection correspond à la formation d'un complexe EP s'inactivant moins rapidement que l'enzyme E . Si K_p est la constante de dissociation du complexe EP , il en déduit que la vitesse d'inactivation obéit à une loi du type:

$$v = k E + k' EP = e \cdot \frac{k + k' P/K_p}{1 + P/K_p} = \frac{v_0 + v_\infty P/K_p}{1 + P/K_p}$$

$e = E + EP$ étant la concentration totale de l'enzyme.

v_0 et v_∞ les vitesses d'inactivation qui correspondent respectivement à une protection nulle et à une protection maximale.

Pour $P = K_p$ la vitesse d'inactivation est égale à $(v_0 + v_\infty)/2$, relation utilisée pour la détermination graphique de K_p constante de protection. Dans le cas d'inhibiteur compétitif, K_p s'identifie à la constante d'inhibition K_i . Ce type de méthode a été utilisée par la suite par LABEYRIE ET STACHIEWICZ¹⁵ sur l'inactivation de la D-lactate déshydrogénase de la levure par un chélateur, protégée par substrat ou inhibiteurs compétitifs, l'identité $K_i = K_p$ s'est montrée parfaitement réalisée. Ce qui justifie l'identification de K_p avec K_s pour le substrat; ainsi déterminé pour la D-lactate déshydrogénase, K_s est environ 200 fois plus petit que K_m alors que pour le D-amino acide oxydase, BURTON a trouvé $K_s = K_m$.

Dans le présent travail, nous avons appliqué le principe de cette méthode à la L-lactate déshydrogénase traitée par l'urée. L'action de l'urée sur cet enzyme se manifeste, non seulement par perte de l'activité enzymatique mais aussi par modification de propriétés physiques, comme la fluorescence de la flavine^{4,16,12}, celles des tyrosines et tryptophanes protéiques¹⁷ et la dissociation en sous-unités¹⁸.

La vitesse d'apparition de la fluorescence émise par le FMN libéré lors du traitement de l'enzyme par l'urée est diminuée si on traite l'enzyme en présence du substrat. Nous avons alors pensé utiliser un test de mesure de fluorescence pour

déterminer K_s , au lieu de faire appel à un test de mesure d'activité résiduelle qui est lent et plus ouvrageux.

Après avoir justifié l'emploi du test de fluorescence pour déterminer la constante de protection de certains effecteurs, nous avons étudié les caractères cinétiques de l'inactivation par l'urée en présence ou non d'effecteurs, puis déterminé les constantes de protections relatives à l'oxalate et au L-lactate ainsi que leurs variations en fonction du pH.

A titre comparatif, nous avons déterminé le K_m et V relatifs au L-lactate ainsi que la constante de vitesse de combinaison de l'enzyme au substrat, par des expériences de cinétique rapide utilisant la technique du "stopped flow".

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Matériel

La L-lactate déshydrogénase préparée à partir de la levure de boulangerie, (Springer) est obtenue à l'état cristallisé par la méthode d'APPLEBY ET MORTON¹. Les cristaux réduits sont ensuite dissous et traités selon la méthode de MORTON ET SHEPLEY¹⁹ qui permet d'obtenir l'enzyme recristallisé sous forme oxydée. L'apo-D-lactate déshydrogénase, dérivé sans flavine, est préparé à partir de cristaux réduits de L-lactate déshydrogénase, par un traitement acide au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ref. 20).

Acide L-lactique est préparé à partir de L-lactate de calcium (California Foundation for Biochemical Research) dissous dans l'eau avec Dowex 50-X2 (forme acide), passé sur une colonne de Dowex 50-X2 et neutralisé par NaOH. La concentration du L-lactate est mesurée enzymatiquement²¹ en prenant $A_{420} \text{ m}\mu$ ferri-cyanure = $1.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Oxalate de sodium (Merck) est mis en solution dans l'eau bidistillée.

Techniques

Fluorométrie

La fluorescence du FMN et la fluorescence protéique sont mesurées au moyen d'un spectrofluoromètre construit par un de nous. Les détails de ses caractéristiques ont été présentés dans les publications précédentes¹². La fluorescence flavinique est mesurée à $543 \text{ m}\mu$ après excitation à $435 \text{ m}\mu$. Ces 2 longueurs d'onde, correspondant aux points isobestiques de l'enzyme, ont été choisies de façon que, si celui-ci est réduit par le substrat, le taux d'absorption reste constant.

On enregistre le spectre d'émission de fluorescence protéique après excitation à $278 \text{ m}\mu$.

Polarisation de fluorescence

Pour mesurer la polarisation de la fluorescence du FMN, nous avons monté, sur le compartiment de la cuve de mesure, dans l'axe apposé au 2ème monochromateur (Fig. 1) un photomultiplicateur (150 AVP) muni d'un polarisateur rotatif de 0 à 90° et d'un filtre interférentiel ($550 \text{ m}\mu$).

Technique du "stopped flow"

La technique rapide de réduction de l'enzyme par le substrat et celle de réduc-

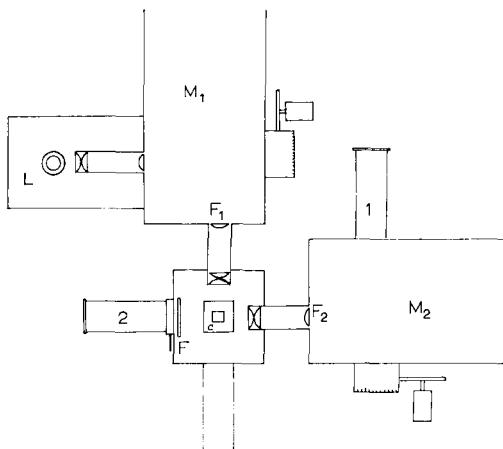


Fig. 1. Schéma du montage spectrofluorométrique. L, lampe au xénon XBO 450 W (Osram); $M_1 M_2$, monochromateurs à réseau; 1, photomultiplicateur EMI 9558QA; 2, photomultiplicateur Radiotéhnique 150 AVP; F_1 , fente de sortie du monochromateur d'excitation M_1 ; F_2 , fente d'entrée du monochromateur de fluorescence M_2 ; C, compartiment thermostatisé pour la cuve de mesure; F, filtre interférentiel ($550 \text{ m}\mu$) suivi d'un polariseur rotatif.

tion du ferricyanure par l'enzyme en présence de L-lactate, sont suivies au moyen d'un spectrophotomètre "stopped flow" Type Gibson-Durrum.

Une légère modification a été effectuée pour augmenter l'intensité d'entrée du monochromateur, en remplaçant la lampe et le miroir par une lampe quartz iodé Mazda (55 W, 12 V) et par un miroir concave. Ainsi, nous avons augmenté l'intensité de la lumière incidente d'un facteur 10 soit une amélioration du rapport signal sur bruit de fond d'un facteur 3, d'après la formule: $S/n = 1.9 \cdot 10^9 \sqrt{i/Af}$.

Une autre amélioration a été apportée en remplaçant le photomultiplicateur EMI 9558 Q par un de même marque, mais 9558 QA, sélectionné pour un rendement quantique plus élevé et un courant d'obscurité plus faible.

Nous avons vérifié, au moyen d'un oscilloscope Tektronics 502, les fluctuations des alimentations stabilisées de la haute tension du PM (Kepco 1500), et de la basse tension de la lampe (Sorensen QB 12-8). Pour la haute tension $\Delta E/E = 10^{-5}$, pour la basse tension $3 \cdot 10^{-5}$. Le bruit de fond type Schottky est de $0.5-1 \text{ mV}$ (de crête à crête) pour une constante de temps $t_0 = 1 \text{ msec}$ à $424 \text{ m}\mu$ avec $\Delta\lambda = 3 \text{ m}\mu$. Il correspond à une variation de l'absorbance de 0.0004 qui représente la plus petite variation détectable. A $424 \text{ m}\mu$, elle correspond à la différence d'absorbance des formes oxydée et réduite du cytochrome b_2 à la concentration de $1.5 \text{ m}\mu\text{M}$. La longueur d'onde du monochromateur a été souvent étalonnée par une lampe au mercure à basse tension Osram Hg₃ à 4358 Å. Le temps mort, c'est à dire le temps de demi-remplissage de la cuve d'observation de 20 mm, est de 5 msec à 10% près. Les seringues d'injection et le compartiment de cuve d'observation sont thermostatés à $25^\circ \pm 0.1^\circ$.

L'activité enzymatique

L'activité pour l'accepteur ferricyanure est mesurée à $420 \text{ m}\mu$ par un spectrophotomètre Zeiss, muni d'un enregistreur Sargent L dans les conditions suivantes: tampon phosphate 66 mM, EDTA = 0.33 mM, DL-lactate 66 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 0.83 mM, pH = 7.5 à 30°.

RÉSULTATS

Etude fluorométrique de l'action de l'urée

On sait que le FMN libre présente une fluorescence non polarisée, alors que fixé à l'enzyme (L-lactate déshydrogénase) il n'est pas fluorescent¹². En présence d'urée 3.13 M, nous avons pu détecter un accroissement progressif de la fluorescence flavinique du flavocytochrome b_2 , qui se stabilise à un certain niveau au bout de quelques dizaines de secondes. Le problème qui se pose, est de savoir si cette fluorescence acquise est due à une dissociation progressive de FMN fixé, ou à une fluorescence intrinsèque du FMN fixé, apparaissant par suite d'un remaniement configurationnel. C'est pourquoi nous avons étudié la polarisation de fluorescence de la solution enzymatique en présence d'urée.

Polarisation de fluorescence flavinique.

Ces expériences ont été faites dans des conditions telles que l'enregistrement de l'intensité de la lumière de fluorescence flavinique émise, s'effectue en même temps que la rotation continue du polariseur de 0 à 90° et de 90 à 0°. Cette mesure dynamique nous montre que le niveau de fluorescence présente une alternance régulière de minima et de maxima correspondant à 2 positions croisées du polariseur. La fraction de la lumière polarisée étant définie par $\rho = (F// - F\perp)/(F// + F\perp)$, on a trouvé pour L-lactate déshydrogénase en présence d'urée, 1.7% de polarisation, alors qu'avec le même montage, pour une solution de FMN libre de même concentration, le taux de polarisation s'élève à 1.3%. Cette différence n'est pas significative. Pour une flavoprotéine, la lipoate NAD oxydo réductase, WEBER ET MASSEY²² ont obtenu, à la même température, une valeur de ρ égale à 40%. Il y a donc lieu de penser que l'accroissement progressif de fluorescence observé correspond à une dissociation progressive du FMN fixé.

Fluorescence protéique. Une autre preuve, tendant à renforcer cette hypothèse, est fournie par l'étude de la fluorescence émise par les résidus aromatiques de la molécule protéique elle-même¹⁷. Lors d'une excitation à 278 m μ , l'apo L-lactate déshydrogénase (dérivé de l'enzyme sans flavine) présente un spectre d'émission de fluorescence protéique dont le maximum d'intensité se situe à 317 m μ . Dans les mêmes conditions, le spectre de fluorescence de L-lactate déshydrogénase non traitée est beaucoup moins intense, mais présente le même maximum dont l'intensité n'atteint environ que le tiers du niveau précédent. Lors du traitement de l'enzyme par l'urée, les spectres de fluorescence se déforment, comme on le voit sur la Fig. 2a; l'intensité maximale du pic situé au début à 317 m μ augmente d'abord, puis diminue (Fig. 2b) corrélativement avec un déplacement de pic vers le rouge. On peut donc distinguer deux phases dans le temps: la première sans déplacement du maximum d'émission des tyrosines et tryptophanes protéiques, correspondrait à la séparation de la flavine, l'autre plus lente, avec déplacement du maximum, correspondrait à une modification de la fluorescence intrinsèque de ces résidus due à une réorganisation configurationlle de la protéine.

Le parallélisme entre l'apparition de la fluorescence flavinique non polarisée et l'augmentation (1ère phase) de fluorescence protéique permet de conclure que le premier stade, observé lorsque l'enzyme est mis en présence d'urée 3.13 M, est une libération de la flavine.

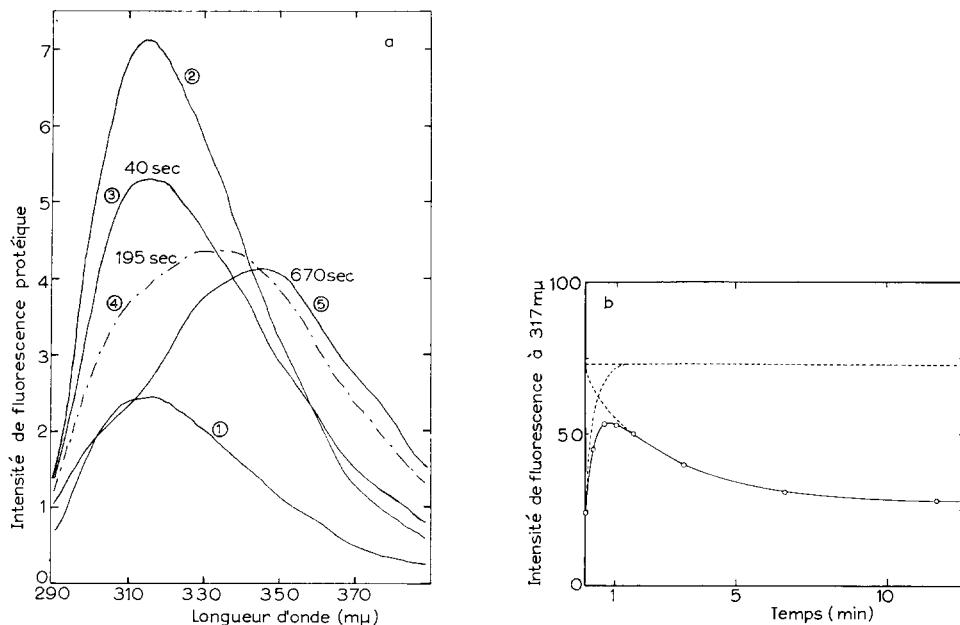


Fig. 2. a. Action de l'urée sur le spectre d'émission de fluorescence protéique du cytochrome b_2 . Enregistrement du spectre de fluorescence d'une solution de L-lactate déshydrogénase (cyt. b_2) (Courbe 1), d'apo-L-lactate déshydrogénase (Courbe 2), de L-lactate déshydrogénase dans 3.2 M urée (Courbes 3-5), à la concentration finale 2.94 μ M d'hème dans le tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.8 et 25°. Les Courbes 3-5 représentent l'évolution du spectre de fluorescence dans l'urée au cours du temps. b. Variation de l'intensité de fluorescence émise par la L-lactate déshydrogénase à 317 $m\mu$ au cours de temps, en présence d'urée. Longueur d'onde d'excitation = 278 $m\mu$. Longueur d'onde d'émission = 317 $m\mu$. ———, L-lactate déshydrogénase (2.94 μ M) en présence d'urée 3.13 M dans le tampon 0.2 M phosphate, EDTA 1 mM, pH 6.8, 25°. - - - - -, niveau atteint par apo-L-lactate déshydrogénase, dérivée de l'enzyme sans FMN, à la même concentration et dans le même tampon sans urée. On observe 2 phénomènes : le premier lié à la libération de FMN, l'autre correspondant à la transformation de la partie protéique de l'enzyme par l'urée. L'extrapolation de la phase lente comprise entre 2 min et 15 min d'enregistrement, compte tenu du niveau atteint par l'apo-L-lactate déshydrogénase seul, nous délimite la proportion de fluorescence liée à la transformation propre de l'enzyme par urée. Ce qui nous permet d'estimer dans la 1ère phase la proportion correspondant à la seule libération du FMN.

Problème de la réversibilité du phénomène mesuré. Dans les conditions de notre travail, c'est à dire en présence d'urée 3.13 M à 25° et pH entre 6 et 8, l'enzyme se transforme avec libération de FMN. Le problème se pose de savoir si cette réaction est réversible. On sait que si l'on traite l'enzyme par le parachloromercurisulfonate (PCMS), il y a libération irréversible du FMN fixé; l'enzyme, à même concentration, traité par urée 4 M, présente le même niveau final de fluorescence flavinique, atteint au bout de 3 à 4 sec: la dissociation de la flavine est donc alors complète. Après dilution (10 fois) du mélange enzyme-urée 3.13 M, on peut détecter une lente diminution progressive de la fluorescence flavinique (environ 10% de variation au bout de 10 min) indice d'une faible fixation; cette fixation est plus grande et plus rapide lorsque la solution de dilution contient du L-lactate ou de l'oxalate. Il est vraisemblable que l'affinité de l'enzyme pour la flavine a diminué après traitement par l'urée.

En conclusion, nous considérons que, lors de la mesure de l'intensité de fluo-

rescence flavinique, nous opérons dans des conditions où l'action de l'urée est pratiquement irréversible par dilution.

Détermination de K_p

On a constaté que la présence de L-lactate ou d'oxalate, lors du traitement de l'enzyme par l'urée, ralentit considérablement l'action de ce dernier: la cinétique d'apparition de la fluorescence flavinique non polarisée est plus lente. On peut dire qu'il y a protection de l'enzyme par ces effecteurs. Comme la libération de FMN est pratiquement irréversible dans ces conditions, l'étude de sa cinétique nous permet de déterminer la vitesse de transformation de l'enzyme par l'urée et de calculer K_p , constante de protection de l'effecteur, c'est à dire de connaître la constante de dissociation du complexe enzyme effecteur.

Après avoir étudié la cinétique de la réaction de transformation de l'enzyme par l'urée, nous avons déterminé les K_p de l'oxalate et du L-lactate à différents pH.

Caractères cinétiques de la dissociation de la flavine en présence d'urée

Nous ajoutons à une cuve, contenant du tampon phosphate ou de l'urée dissoute dans ce même tampon, une aliquote d'une solution de L-lactate déshydrogénase de manière à obtenir une concentration finale de l'ordre de $4 \mu\text{M}$. Nous observons un accroissement progressif de la fluorescence flavinique correspondant à une disso-

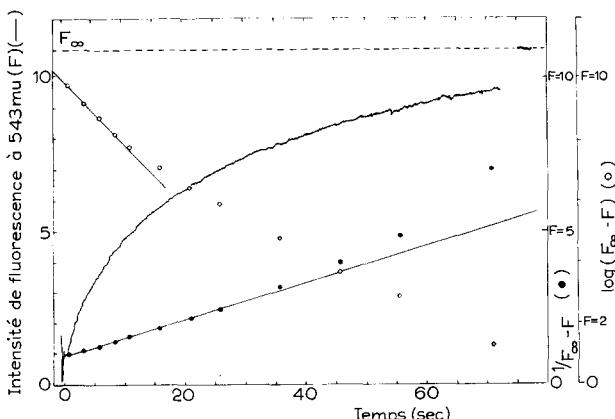


Fig. 3. Cinétique de dissociation du FMN de la L-lactate déshydrogénase par action de l'urée. Après excitation à $435 \text{ m}\mu$, la fluorescence émise est mesurée à $543 \text{ m}\mu$. On ajoute à une cuve contenant de l'urée 3.12 M dissous dans 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.25 et 25° , une aliquote de L-lactate déshydrogénase (concentration finale $3.38 \mu\text{M}$). ———, niveau final correspondant à la dissociation totale du FMN. ○—○, représentation de 1er ordre. ●—●, représentation de 2ème ordre.

ciation de FMN fixé. L'évolution de la réaction dans le temps est donnée par la Fig. 3: la représentation du 2ème ordre est linéaire jusqu'à environ 90% de la réaction totale; la représentation du 1er ordre est linéaire jusqu'à environ 50%. Comme nous nous sommes toujours placés au début de la réaction, nous avons choisi de mesurer la vitesse de transformation par l'inverse du temps donnant une variation déterminée de l'intensité de fluorescence.

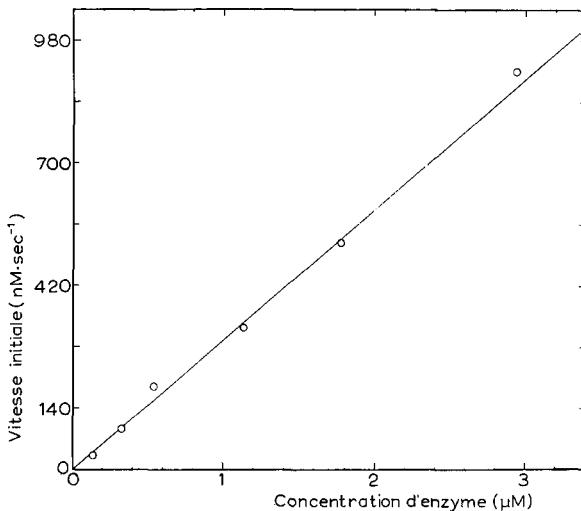


Fig. 4. Ordre de la réaction de transformation de l'enzyme par rapport à la concentration de celui-ci. On ajoute des quantités variables d'enzyme à une solution d'urée 3.13 M dans le tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.8 à 25°. En ordonnées: vitesse initiale de dissociation de FMN mesurée par la fluorescence flavinique. En abscisses: concentration de L-lactate déshydrogénase en μM .

Nous avons essayé de déterminer l'ordre de la réaction par rapport aux concentrations d'enzyme et d'urée.

Si on fait varier la concentration E d'enzyme en laissant fixe la concentration

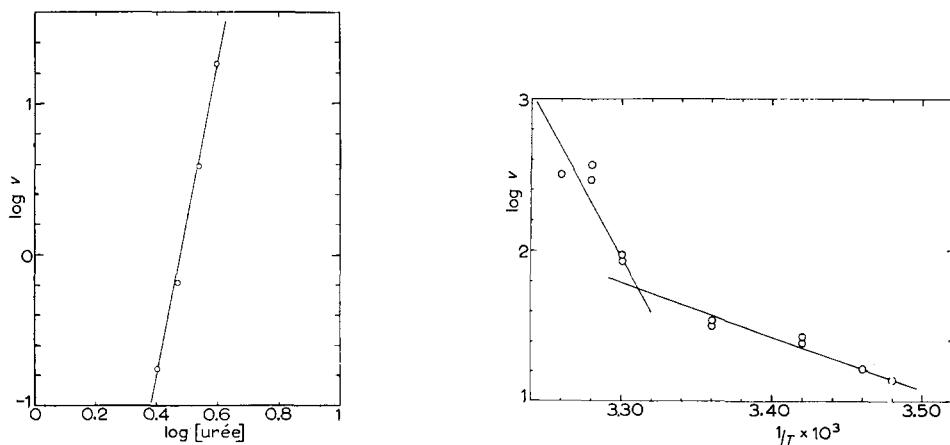


Fig. 5. Représentation logarithmique des variations de la vitesse de transformation v de l'enzyme en fonction de la concentration d'urée. On a traité par des concentrations variables d'urée (2.4–4 M) une solution d'enzyme (concentration finale 2.54 μM) dans un tampon 0.2 M phosphate pH 6.25 à 25°.

Fig. 6. Variation de la vitesse de transformation de l'enzyme par l'urée en fonction de la température. A une solution d'urée 3.34 M dans une tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA pH 6.25, on ajoute une aliquote de L-lactate déshydrogénase (concentration finale 2.54 μM). On fait varier la température de 15° à 30°.

de l'urée, la vitesse d'inactivation est proportionnelle à E . Donc la réaction est du premier ordre par rapport à l'enzyme (Fig. 4).

La Fig. 5 montre qu'en faisant varier la concentration d'urée à concentration fixe d'enzyme la vitesse d'inactivation varie exponentiellement avec la concentration d'urée, entre 1.5 et 4 M on a $v = [\text{urée}]^{10}$.

La variation de la vitesse d'inactivation avec la température entre 15 et 35° représentée par le graphique $\log v = f(1/T)$ (T température absolue) nous donne deux portions de droite avec rupture de pente vers 30°. L'énergie d'activation est voisine de 17 kcal/mole au dessous de 30° et de 83 kcal/mole au dessus (Fig. 6).

Effecteurs

Protection par l'oxalate. La vitesse de transformation de la L-lactate déshydro-

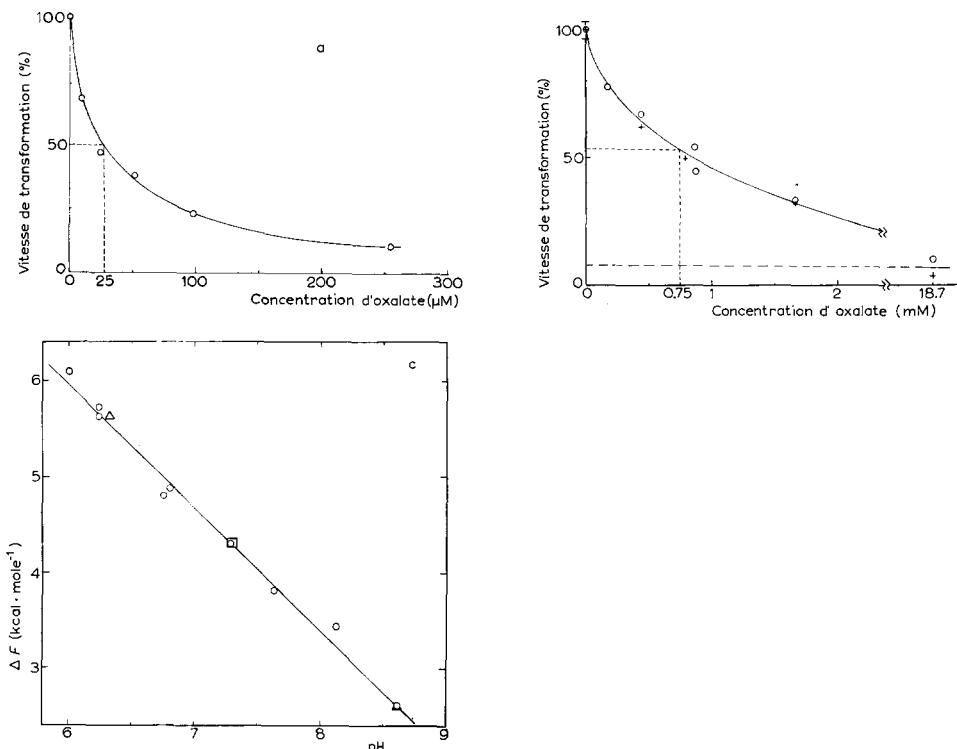


Fig. 7. a. Protection de l'enzyme natif par addition d'oxalate. A une solution de tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA pH 6.0 contenant urée 3.13 M et de l'oxalate à concentrations variables, on ajoute une aliquote de L-lactate déshydrogénase (concentration finale 3.34 μM) à 25°. En ordonnées: vitesse de transformation (%) de l'enzyme par l'urée, déterminée par étude de la cinétique d'apparition de la fluorescence flavinique. En abscisses: concentration d'oxalate (μM). b. La vitesse de transformation est mesurée par fluorescence protéique (○), et par fluorescence flavinique (+). On opère dans urée 3.13 M dissous dans 0.2 M phosphate 1 mM EDTA, pH 7.3 à 25° en présence de L-lactate déshydrogénase 4.53 μM . c. Variation de l'énergie libre de la réaction de dissociation du complexe enzyme-oxalate avec le pH. On opère sur une solution de L-lactate déshydrogénase (concentration finale comprise entre 3 et 4 μM suivant les pH) dans un tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA à 25°. ○, valeurs obtenues par détection de la fluorescence flavinique apparue lors du traitement de l'enzyme natif par l'urée 3.13 M; △, idem avec urée 4 M; ▲, idem avec urée 1.9 M; □, valeurs obtenues par détection de l'accroissement de la fluorescence protéique apparu lors de traitement de l'enzyme natif par urée 3.13 M.

génase par l'urée diminue en présence d'oxalate qui protège l'enzyme. Quand on mesure la variation de la vitesse de transformation en fonction de la concentration d'oxalate ajouté à l'enzyme natif, on peut déterminer la constante de protection K_p qui a été définie comme la concentration de protecteur donnant une demi-protection¹⁴.

Si on représente par v_∞ et v_0 les vitesses de transformation qui correspondent respectivement à une protection maximale et à une protection nulle, on peut déterminer graphiquement la valeur de K_p : c'est la concentration d'oxalate pour laquelle $v = 0.5(v_\infty + v_0)$. En faisant varier le pH du tampon phosphate, nous avons constaté que la protection complète par l'oxalate n'était obtenue que pour les pH inférieurs

TABLEAU I

VALEURS DE K_p POUR DIFFÉRENTS pH DANS L'URÉE 3.13 M À 25°.

K_p (μM)	pH							
		6	6.25	6.75	6.9	7.30	7.63	8.13
Oxalate	30	60	250		750	1400	2600	
Lactate	19	20		21	30		42	

à 6.5 alors qu'entre 6.5 et 8.7 il n'y avait que 90% de protection à concentration saturante (Fig. 7a). Nous avons observé que K_p ne varie pas en fonction de la concentration d'urée. En utilisant l'accroissement de la fluorescence protéique comme critère de transformation, nous avons obtenu à pH 7.2 la même valeur pour K_p que par l'intermédiaire de la fluorescence flavinique ($600 \mu\text{M}$) (Fig. 7b). La Fig. 7c nous montre que la variation d'énergie libre ΔF varie linéairement avec le pH. Nous avons récapitulé dans le Tableau I, les valeurs de K_p pour différents pH.

Protection par le L-lactate. Le L-lactate, même à des concentrations très faibles, protège l'enzyme vis à vis de l'urée. Nous avons mesuré la constante de protection K_p correspondant au L-lactate de la même manière que celle correspondant à l'oxalate. Mais pour diminuer toute consommation possible de L-lactate, puisque nous ne travaillons pas en anaérobiose, nous avons utilisé l'enzyme à faible concentration $0.4 \mu\text{M}$. Dans ces conditions les valeurs de K_p obtenues sont de l'ordre de $20 \mu\text{M}$ ce qui représente une valeur maximale (Fig. 8a). Pour lever le doute de la consommation de L-lactate nous avons fait appel à la méthode "stopped flow" afin de connaître la cinétique de réduction de l'enzyme en présence de l'urée. On distingue 3 phases: une réduction lente, le niveau d'oxydation du départ étant retrouvé au bout de 8 min environ. Dans l'hypothèse où la vitesse initiale de réduction resterait constante, nous avons calculé que la quantité de L-lactate présent serait consommée par l'enzyme au bout de 370 sec. Or, lors de la détermination de K_p , l'enregistrement des variations de fluorescence flavinique porte sur 10 sec au maximum, ce qui entraîne que 3% au plus de L-lactate sont consommés par l'enzyme. Donc la méthode précédente de détermination de K_p est applicable au L-lactate.

La variation d'énergie libre ΔF reste constante avec le pH (Fig. 8c). Nous avons récapitulé dans le Tableau I les valeurs de K_p pour différents pH.

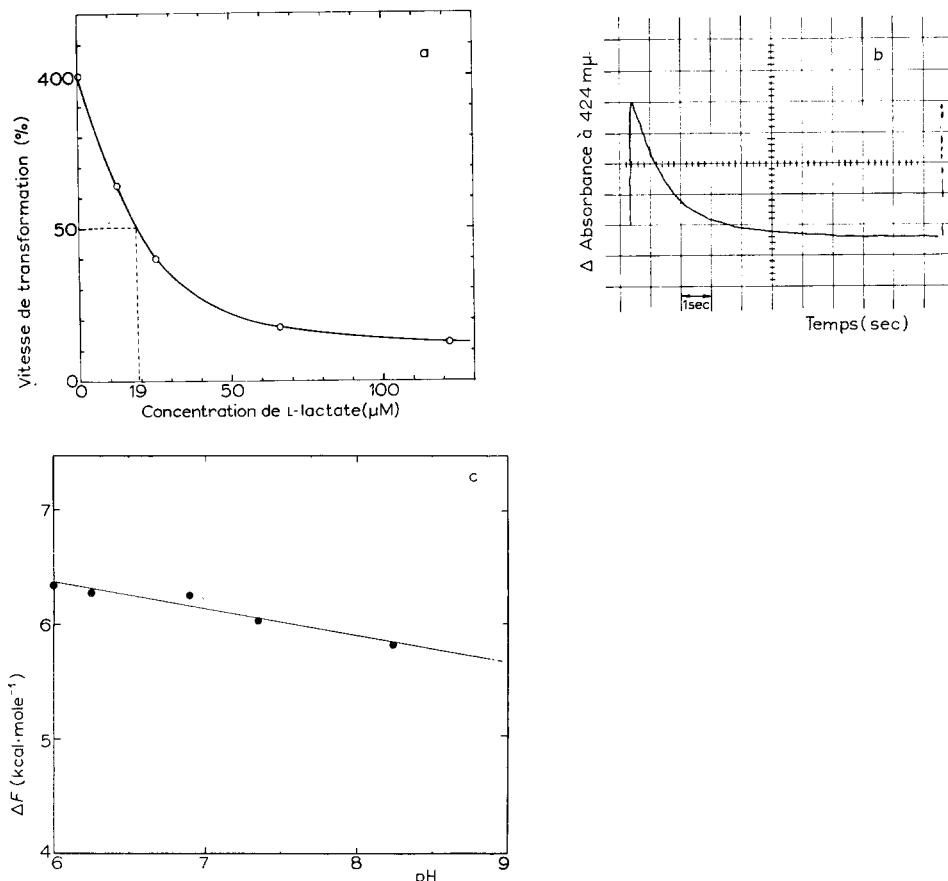
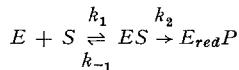


Fig. 8. a. Protection de la L-lactate déshydrogénase native par addition de L-lactate. A une solution d'urée 3.13 M dans un tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.0 à 25° contenant des quantités variables de L-lactate on ajoute l'enzyme (concentration finale de 0.36 μM). b. Enregistrement oscilloscopique de la cinétique de réduction de l'enzyme par le L-lactate en présence d'urée. On mélange avec le système de "stopped flow" une solution d'urée 6.26 M dans un tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.8 à 25°, en présence de L-lactate 64 μM , avec une solution d'enzyme (0.44 μM) dans le même tampon sans urée. c. Variation de l'énergie libre de la réaction de dissociation du complexe enzyme-substrat avec le pH. On opère sur une solution de L-lactate déshydrogénase (concentration finale 0.37 μM) dans 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA et à 25°. Valeurs obtenues par mesure de la fluorescence flavinique apparue lors du traitement de l'enzyme par urée 3.13 M.

Constantes cinétiques de la réaction enzymatique en présence d'urée

Pour confirmer la méthode précédente de détermination de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, nous avons jugé bon de déterminer la constante de Michaelis du lactate K_m dans urée ou tampon et les différentes constantes de vitesse intervenant dans celle-ci. Cette étude a été menée grâce à des expériences de cinétique rapide utilisant un appareil de type "stopped flow" (Gibson-Durrum).

La réduction de l'enzyme par le L-lactate se faisant selon le schéma général suivant :



k_1 , k_{-1} sont respectivement les constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe enzyme-substrat. k_2 est la constante de vitesse du transfert d'électron du substrat à l'enzyme. K_m est alors théoriquement égal à $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Détermination de K_m et k_2 . Pour obtenir les valeurs de K_m et V relatives au L-lactate, on mesure la vitesse initiale de réduction du ferricyanure en présence de l'enzyme et du substrat. On opère à ferricyanure saturant ($170 \mu\text{M}$), et on fait varier la concentration du L-lactate de 0.3 à 3 mM . La concentration de l'enzyme est de l'ordre de $3 \mu\text{M}$. On détecte le taux de réduction du ferricyanure en mesurant son

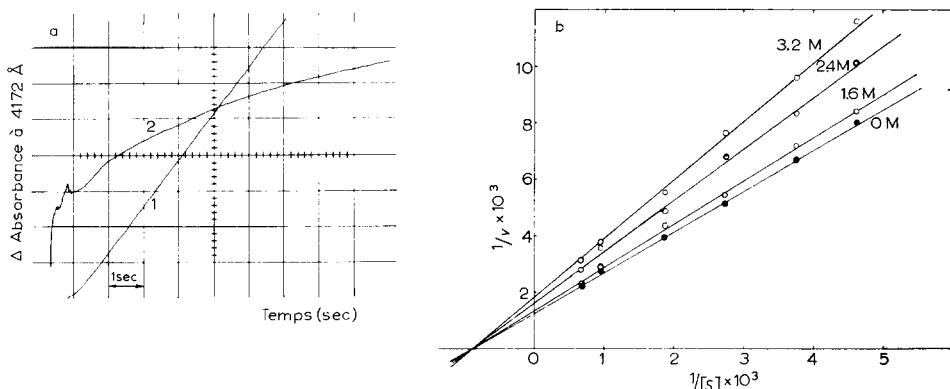


Fig. 9. a. Enregistrement oscilloscopique de la cinétique de la réaction globale enzyme, substrat (L-lactate), accepteur ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en présence d'urée. On mélange à l'aide d'un système "stopped flow", à volumes égaux, l'enzyme de concentration $2.33 \mu\text{M}$ en solution dans tampon 0.2 M phosphate, $\text{pH} = 7.3$, 1 mM EDTA, 25° , avec $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $170 \mu\text{M}$, L-lactate $726 \mu\text{M}$, urée variable dissout dans ce même tampon, à 25° . Courbe 1, urée 3.2 M (concentration finale); Courbe 2, urée 4 M (concentration finale). En ordonnées: variation de l'absorbance du $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 4172 \AA . b. Etude de l'influence de l'urée sur la réaction globale catalysée par l'enzyme: représentation de Lineweaver-Burk. Les courbes résultent de l'analyse des enregistrements oscilloscopiques de la réaction. Les expériences ont toutes été réalisées dans tampon 0.1 M phosphate, 0.5 mM EDTA à $\text{pH} 7.3$ et $t = 25^\circ$; la concentration finale d'enzyme dans le mélange est de $1.16 \mu\text{M}$. v représentant la vitesse initiale de réduction du $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. S étant la concentration finale de L-lactate. Différentes concentrations d'urée sont indiquées sur la figure (o, 1.6, 2.4 et 3.2 M).

absorbance à 4172 \AA , point isobestique de l'enzyme (les formes oxydée et réduite absorbent également) après avoir mélangé à volumes égaux les solutions suivantes (1) enzyme en solution dans le tampon, (2) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, substrat, urée, dissous dans le même tampon. L'absorbance du ferricyanure diminue linéairement au cours du temps (réaction d'ordre zéro) la pente mesure la vitesse de réduction du ferricyanure par l'enzyme (Fig. 9a). Les valeurs de K_m (L-lactate) sont calculées pour chaque concentration d'urée, à partir de la représentation en inverse $1/v = f(1/S)$ (Fig. 9b).

A partir de 4 M urée, l'inactivation de l'enzyme est trop rapide, et la viscosité de la solution trop grande, on ne peut plus déterminer la vitesse initiale.

Les résultats de cette étude (Fig. 9b) montrent, que K_m ne varie pas avec la

concentration d'urée, qui se comporte alors comme un inhibiteur non compétitif dans la réaction de réduction du ferricyanure par l'enzyme, en présence de L-lactate. Comme nous avons la relation $V = k_2 e$, nous déterminons en même temps K_m et k_2 . A 25° et pH 7.3 dans tampon 0.2 M phosphate, $K_m = (1.2 \pm 0.1)$ mM.

k_2 dépend de la concentration d'urée, mais à un très faible degré

Urée (M)				
	0	1.6	2.4	3.2
$k_2(\text{sec}^{-1})$	106	99	81	73

Notons que dans les conditions de ce travail, la vitesse de réduction du ferricyanure est plus rapide que la vitesse de transformation de l'enzyme par l'urée.

Détermination de k_1 . A faibles concentrations de substrat, c'est à dire au dessous de 1 mM ($S \ll K_m$), la vitesse de réduction de l'enzyme est limitée par la vitesse d'association du substrat à l'enzyme. Dans ces conditions, la constante de vitesse de formation du complexe ES peut être représentée par la constante de vitesse de réduction de l'enzyme.

En effet, on sait depuis Haldane que

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

dans le cas général, alors que $K_s = k_{-1}/k_1$; lorsque $K_s \ll K_m$ il s'en suit que $K_m = k_2/k_1$ donc $k_1 [E][S] = k_2 [ES]$.

D'autre part on peut mesurer, pour chaque valeur de S , par analyse de la portion initiale de la courbe de réduction de l'enzyme, la valeur de $k_2[ES]$, c'est à dire de $k_1[E][S]$. Puisque nous sommes dans une zone de concentration de substrat où S est très inférieur à K_m , la quantité d'enzyme libre peut être confondue avec la

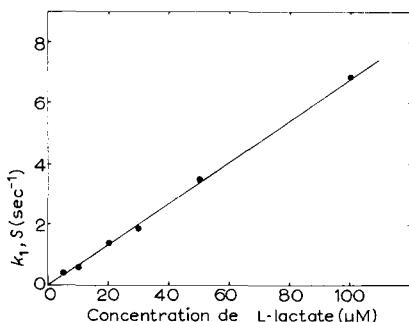


Fig. 10. Détermination de la constante de vitesse de fixation k_1 de l'enzyme au substrat. L'enregistrement oscilloscopique de la réaction de réduction de l'enzyme par le substrat nous permet de déterminer $k_1 S$ constante de 1er ordre. Les variations de $k_1 S$ en fonction de S (L-lactate) nous permettent d'obtenir k_1 . On a opéré dans tampon 0.2 M phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.7, 25° , à concentration finale d'enzyme à $52 \mu\text{M}$.

quantité totale d'enzyme, maintenue égale à $50 \text{ m}\mu\text{M}$ dans les différentes expériences. Dans ces conditions, la mesure des variations de l'état de réduction de l'enzyme au cours du temps nous permet d'obtenir la constante de vitesse k_1 . Pour éliminer l'intervention de la réoxydation par l'oxygène, donc la consommation de substrat, nous avons travaillé à faible concentration d'enzyme, $50 \text{ m}\mu\text{M}$ finale. Ainsi, nous n'avons observé aucune réoxydation de l'enzyme en cours de mesure, même à $5 \mu\text{M}$ de substrat. La réduction de l'enzyme observée, par celle de l'hème à $424 \text{ m}\mu$ montre une réaction du 1er ordre. La Fig. 10 montre la variation de $k_1 S$ en fonction de S variant entre 5 et $100 \mu\text{M}$, la pente de la droite obtenue nous donne la constante de vitesse de fixation du substrat à pH 7.3 et 25° .

<i>Urée (M)</i>		
0	3.2	
$k_1 (\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$	$10.2 \cdot 10^4$	$6.8 \cdot 10^4$

On voit que la constante de vitesse de fixation du substrat n'est pratiquement pas modifiée par la présence d'urée.

Comparaison des résultats obtenus dans l'urée 3.2 M et dans le tampon seul. Par définition de K_m et de K_s nous avons la relation

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

Comparons les valeurs de K_m et du rapport k_2/k_1 obtenues pour l'enzyme en présence ou non d'urée.

K_m est le même, compris entre 1.1 et 1.3 mM.

<i>Urée (M)</i>		
0	3.2	
$k_2 (\text{sec}^{-1})$	106	73
$k_1 (\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$	$10.2 \cdot 10^4$	$6.8 \cdot 10^4$
$k_2/k_1 (\text{M})$	$1.04 \cdot 10^{-3}$	$1.07 \cdot 10^{-3}$

Nous en déduisons qu'avec ou sans urée le rapport k_2/k_1 étant constant, K_s est constant (puisque K_m est lui-même constant).

Cette étude justifie ainsi la méthode précédente de détermination de K_s par traitement de l'enzyme par l'urée dans nos conditions expérimentales, puisque le comportement de l'enzyme est le même dans le tampon ou dans l'urée 3.2 M. Mais comme il sera discuté ultérieurement, ceci correspond au fait que dans la phase initiale que nous étudions, l'enzyme n'a pas encore été modifié par l'urée et que seule intervient l'action de l'urée en tant que milieu solvant.

DISCUSSION

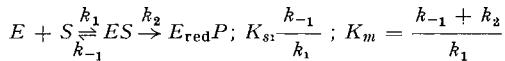
La méthode utilisée pour la détermination de K_s , est basée sur l'effet du L-lactate dans l'apparition de la fluorescence flavinique lorsque l'enzyme est mis en présence d'urée. Nous avons cherché à savoir à quoi correspondait l'apparition de cette fluorescence. RIPPA¹⁶ observant ce phénomène a pensé qu'il correspondait à un état fluorescent du FMN encore fixé à l'enzyme; or nos résultats qui montrent la non-polarisation de la fluorescence flavinique apparue lors de l'incubation de l'enzyme dans l'urée, et notre observation des accroissements synchronisés des fluorescences protéiques et flaviniques montrent de manière certaine, que l'apparition de la fluorescence flavinique correspond à la libération du FMN.

Après avoir discuté la valeur de la méthode employée pour déterminer la constante de dissociation K_s du complexe enzyme-substrat, nous verrons que les renseignements qu'elle nous apporte sur K_s nous permettent d'envisager la possibilité de déterminer les différentes constantes de vitesses de la réaction catalysée par l'enzyme et de mieux comprendre le mécanisme catalytique des flavoprotéines.

La protection apportée à l'enzyme par le L-lactate ou l'oxalate vis-à-vis de l'inactivation par l'urée présente les mêmes aspects que ceux décrits par BURTON¹⁴ et discutés par LABEYRIE ET STACHIEWITCZ¹⁵ pour d'autres enzymes. Nous retrouvons, en particulier, la correspondance entre la constante de protection K_p relative à l'oxalate $K_p = 1.4 \text{ mM}$ à 25° , pH 7.63, et la constante d'inhibition K_i , déterminée par cinétique classique¹¹ $K_i = 2 \text{ mM}$, à 30° , pH 7.6. Nous pouvons donc assimiler la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat K_s , à la valeur de K_p correspondant au substrat. Mais il est nécessaire maintenant de discuter les conditions particulières d'obtention du K_p relatif au substrat L-lactate par la méthode que nous avons utilisée. Comme l'urée et le substrat sont ajoutés ensemble à l'enzyme, il faut que le substrat soit effectivement fixé à l'enzyme, avant que ne se manifeste l'effet dénaturant de l'urée sur celui-ci et que la concentration de substrat reste apparemment constante pendant la durée de l'enregistrement. Il est évident que la valeur de K_p déterminée n'aura un sens physique sûr, que si la vitesse de fixation de lactate est grande par rapport à la vitesse de transformation de l'enzyme par l'urée. La détermination des constantes de vitesse de fixation par la méthode utilisant un système "stopped flow" a donné les valeurs suivantes: $k_1 = 6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ à pH 7.3, 25° dans urée 3.2 M. On calcule donc que pour une concentration de substrat de l'ordre de $5 \mu\text{M}$, plus faible quantité de lactate utilisée dans la détermination de K_p , la vitesse de fixation est de 0.34 sec^{-1} . Or la vitesse de transformation, telle que nous l'observons, dans les mêmes conditions, a une limite supérieure de 0.05 sec^{-1} , valeur obtenue en absence de substrat. Du reste le fait que $K_p = K_i$ pour l'oxalate confirmait que, la vitesse de fixation de ce dernier était grande par rapport à la vitesse de transformation de l'enzyme par l'urée. Le problème de la consommation du substrat, en cours d'expériences, peut être levé rapidement par la connaissance des résultats apportés par l'analyse des cinétiques de réduction de l'enzyme par le lactate en présence d'urée: celles-ci obtenues par emploi d'un système "stopped flow" montrent en effet que la concentration de lactate ne varie que de 2% au plus.

La connaissance de K_s et K_m nous permet, par le calcul, de déterminer k_1 ; le fait que la valeur calculée soit identique à la valeur expérimentale confirme alors le

principe de la mesure directe. En utilisant les notations classiques pour le schéma réactionnel suivant



on a trouvé en effet $K_s = 30 \mu\text{M}$, $K_m = 1.1 \text{ mM}$, $k_2 = 73 \text{ sec}^{-1}$ comme K_s est très inférieur à K_m , nous pouvons écrire $K_m = k_2/k_1$ d'où $k_1 = 73/1.1 \cdot 10^{-3} = 6.64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$; or expérimentalement on trouve $k_1 = 6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Cette bonne correspondance justifie la valeur de la méthode utilisée pour déterminer k_1 . Remarquons que nous pouvons calculer la constante de vitesse de dissociation k_{-1} du complexe enzyme-substrat

$$k_{-1} = k_1 K_s = 6.8 \cdot 10^4 \times 30 \cdot 10^{-6} = 2 \text{ sec}^{-1}$$

cette faible valeur reflète la forte interaction entre le substrat et l'enzyme au sein du complexe.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus pour la L-lactate déshydrogénase avec ceux obtenus pour d'autres flavoprotéines. Pour un certain nombre d'entre elles, comme notatine, glucose oxydase, NADH₂:cytochrome *c* réductase, SLATER¹³ a calculé les valeurs de k_1 qui se trouvent être de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ à 25°. Ce calcul a été fait à partir de données expérimentales fournies par Laser (notatine), Oguro (glucose oxydase) Vernon *et al.* (NADH₂:cytochrome *c* réductase), en portant les variations de K_m en fonction de V , lorsque varie la concentration de l'accepteur. Des résultats relatifs aux k_1 et K_s de la succinodéshydrogénase²³ ont été publiés dernièrement et se trouvent être du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans ce travail pour la L-lactate déshydrogénase: K_s voisin de $30 \mu\text{M}$, très petit devant K_m et $k_1 = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$.

EIGEN a montré que, lorsque la réaction d'association enzyme-substrat est limitée par la diffusion des molécules la constante de vitesse de second ordre k_1 a pour valeur maximale $10^9 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$: c'est le cas, par exemple, pour le système fumarase-fumarate. Les valeurs de k_1 obtenues jusqu'à présent pour différents enzymes par des méthodes variées, sont en général comprises entre 10^5 et $10^9 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$; ainsi la glutamique-aspartique transaminase fonctionnant avec le pyridoxal phosphate comme coenzyme et l'aspartate comme substrat présente un k_1 de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. L'obtention de valeurs assez faibles pour le k_1 des flavoprotéines est liée à une faible probabilité de fixation du substrat à l'enzyme qui peut alors être due soit à une conséquence de la nécessité d'une orientation stérique précise de l'enzyme par rapport au substrat soit à un changement configurationnel de la protéine favorisant la stabilisation du complexe *ES*.

REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et les moyens qu'ils ont mis à notre disposition. Monsieur le Professeur R. WURMSER qui nous a accueillis dans son service ainsi que Madame F. LABEVRIE, responsable du groupe d'Enzymologie.

Ce travail a été rendu possible grâce aux fonds mis à notre disposition par le C.N.R.S. et par la Délégation à la Recherche Scientifique et Technique (Comité de Biologie Moléculaire).

RÉSUMÉ

L'action de l'urée sur la L-lactate déshydrogénase (cytochrome b_2 ou L-lactate: ferricytochrome c oxydo réductase, EC 1.1.2.3) se manifeste, entre autre, par modifications de la fluorescence du groupement prosthétique flavinique FMN, et de celle des tyrosines et tryptophanes protéiques. A une concentration d'urée voisine de 3.1 M, nous avons constaté l'apparition de fluorescence flavinique non polarisée, synchronisée à une augmentation de la fluorescence protéique. Dans ces conditions, l'action de l'urée aboutit donc à une libération du FMN prosthétique. Par une méthode fluorométrique nous avons pu déterminer avec précision la vitesse de ce processus: la réaction de transformation de l'enzyme par l'urée est du premier ordre par rapport à la concentration d'enzyme et d'ordre 10 par rapport à celle de l'urée. Comme la présence de L-lactate ou d'oxalate diminue de façon marquée cette vitesse de transformation, nous avons utilisé ce phénomène pour déterminer la constante de dissociation des complexes enzyme-substrat ou enzyme-inhibiteur compétitif (méthode de protection). A 25°, pour des pH compris entre 6 et 8 la constante de dissociation du complexe enzyme-oxalate varie de 30 à 2600 μM alors que dans les mêmes conditions, celle relative au complexe enzyme-lactate, c'est-à-dire K_s est pratiquement constante: K_s est compris entre 20 et 40 μM .

Des expériences de cinétique rapide utilisant un appareil de type "stopped flow" (Gibson-Durrum) nous ont permis de déterminer la constante de Michaelis relative au L-lactate K_m en présence d'urée à concentrations variables ou de tampon 0.2 M phosphate ($K_m = 1.2 \pm 0.1 \text{ mM}$ à 25°, pH 7.3) et les différentes constantes de vitesse intervenant dans celle ci. L'urée se comporte comme inhibiteur non compétitif.

En opérant à très faibles concentrations de substrat la réaction d'association du substrat à l'enzyme devient limitante; celle-ci n'est pratiquement pas modifiée par la présence d'urée, elle passe de la valeur $10.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ à la valeur $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ pour des concentrations d'urée respectives de 0 ou 3.2 M, à 25° pH 7.3. Nous en avons déduit la vitesse de dissociation du complexe enzyme-substrat trouvée égale à 2 sec^{-1} .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. A. APPLEBY ET R. K. MORTON, *Nature*, 173 (1954) 749.
- 2 C. A. APPLEBY ET R. K. MORTON, *Biochem. J.*, 73 (1959) 539.
- 3 C. A. APPLEBY ET R. K. MORTON, *Biochem. J.*, 75 (1960) 258.
- 4 J. MC D. ARMSTRONG, J. H. COATES ET R. K. MORTON, *Nature*, 186 (1960) 1033.
- 5 R. K. MORTON, J. MC D. ARMSTRONG ET C. A. APPLEBY dans J. E. FALK, R. LEMBERG ET R. K. MORTON, *Haematin Enzymes*, Pergamon, New York, 1961, p. 501.
- 6 J. W. HINKSON ET H. R. MAHLER, *Biochemistry*, 2 (1963) 209.
- 7 E. BOERI ET L. TOSI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1956) 463.
- 8 R. K. MORTON ET J. M. STURTEVANT, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1614.
- 9 K. HIROMI ET J. M. STURTEVANT, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4662.
- 10 M. IWATSUBO, A. DI FRANCO ET C. CAPEILLÈRE, article en préparation.
- 11 A. BAUDRAS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1177.
- 12 M. IWATSUBO ET A. DI FRANCO, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 891.
- 13 E. C. SLATER, *Discussions Faraday Soc.*, 20 (1955) 308.
- 14 K. BURTON, *Biochem. J.*, 48 (1951) 458.
- 15 F. LABEYRIE ET E. STACHIEWICZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 136.
- 16 E. BOERI ET M. RIPPA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94 (1961) 336.
- 17 M. IWATSUBO ET A. DI FRANCO, article en préparation.
- 18 A. BAUDRAS, article en préparation.
- 19 R. K. MORTON ET K. SHEPLEY, *Biochem. J.*, 89 (1963) 257.
- 20 A. BAUDRAS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7 (1962) 310.

- 21 F. LABEYRIE, P. P. SLONIMSKI ET L. NASLIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 262.
- 22 C. WEBER ET V. MASSEY, communication personnelle.
- 23 D. V. DERVARTANIAN, W. P. ZEYLEMAKER ET C. VEEGER, dans E. C. SLATER, *Flavins and Flavoproteins*, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 183.
- 24 M. EIGEN, G. G. HAMMES, dans F. F. NORD, *Advan. Enzymol.*, Vol. XXV, Interscience, New York, 1963, p. 13.

Biochim. Biophys. Acta, 146 (1967) 349-366