

BBA 65675

# INHIBITION DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE ERYTHROCYTAIRE BOVINE B PAR DIFFERENTS AGENTS CHELATEURS A pH 7.4

SERGE CARPY

*Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, Karlsruhe (Deutschland)*

(Reçu le 6 juillet, 1967)

## SUMMARY

### *Inhibition by chelating agents of bovine erythrocyte carbonic anhydrase B at pH 7.4*

1. The purified isoenzyme of carbonic anhydrase (carbonate hydro-lyase, EC 4.2.1.1) was isolated from a commercial extract by chromatography on Sephadex G-75 and DEAE-cellulose.

2. The kinetics of inhibition are characterized by an immediate decrease of activity following the addition of chelators. Thereafter inactivation proceeds at a slow rate. No correlation was found between the degree of inactivation and the conditional stability constants valid for the 1:1 Zn chelates.

3. Using  $^{65}\text{Zn}$  as a tracer it could be shown that the slow inhibition is due to a mobilization of Zn from the enzyme.

4. All these findings may be explained by the assumption that the immediate inactivation is caused by the formation of a ternary complex; since the Zn-protein complex is inert, the dissociation of this intermediate ternary complex, *i.e.* the mobilization of Zn from the enzyme, proceeds rather slowly.

## INTRODUCTION

Certains agents chélateurs, tels que les acides éthylènediaminetétracétique (EDTA) et diéthylènetriaminepentacétique (DTPA), sont des médicaments efficaces de plus en plus employés pour le traitement de contaminations biologiques par les métaux lourds, radioactifs ou non. Cependant, leur application thérapeutique prolongée provoque en second lieu une lésion néphrotique létale<sup>1</sup>. Un agent chélateur n'étant généralement pas sélectif pour la mobilisation d'un métal défini, les manifestations toxiques observées peuvent s'expliquer par la chélation d'ions métalliques (tel que

Abréviations: BADS, 2,2'-bis[di(carboxyméthyl)amino]diéthylsulfure; BATE, 1,2-bis[2-di(carboxyméthyl)aminoéthylthio]éthane; BMEDA, N,N'-bis(β-mercaptoprothyl) éthylènediamine-N,N'-diacétique; DTPA, diéthylènetriaminepentacétique; EDTA, acide éthylènediaminetétracétique; MEIDA, acide N-2-mercaptoprothyliminodiacétique; PENTEN, N,N,N',N'-tétra-(2-aminoéthyl)éthylène-diamine; TREN, 2,2',2"-tri-(aminotriéthyl)amine.

$Zn^{2+}$  (bibl. 2)), activateurs ou cofacteurs d'enzymes comme la phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1) et l'anhydrase carbonique (EC 4.2.1.1) qui jouent un rôle fonctionnel essentiel dans le cortex rénal, et l'inhibition des enzymes correspondants<sup>3-5</sup>. Contrairement à la phosphatase alcaline<sup>6</sup>, l'anhydrase carbonique s'avère particulièrement résistante à l'action des agents chélateurs<sup>7,8</sup>; HO ET STURTEVANT<sup>9</sup> relataient même une activation par l'EDTA. Cependant l'extrait enzymatique employé pour les essais n'était généralement pas pur, ce qui pourrait expliquer cette résistance inattendue et certaines controverses dans les résultats; les recherches n'ont pas été effectuées de façon systématique.

Nous avons étudié l'influence d'agents chélateurs différant par leurs propriétés chélatrices sur l'activité enzymatique d'un extrait d'anhydrase carbonique hautement purifié en fonction de différents paramètres; par marquage de l'enzyme au  $^{65}Zn$  nous avons pu déterminer le mécanisme de l'inhibition. En raison de la nature du problème qui nous préoccupe, à savoir la pathogénie des agents chélateurs, les expériences ont été effectuées au pH physiologique sanguin 7.4.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### Enzyme

L'enzyme étudié est l'isoenzyme B (bibl. 10) de la carbonate hydro-lyase (EC 4.2.1.1), communément dénommée anhydrase carbonique, d'erythrocytes bovins, isolé chromatographiquement à partir de l'extrait commercial de Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland.

Une chromatographie d'absorption sur colonne de DEAE-cellulose de cet extrait (activité spécifique dans les conditions décrites ci-dessous  $5.3 \cdot 10^4$  U.I.) permet la séparation d'au moins 5 composés protéiques différents, dont 2 seulement possèdent l'activité enzymatique recherchée — et représentant seulement 45% ( $37.7\% + 7.3\%$ ) en poids de l'extrait brut — et de  $(NH_4)_2SO_4$  ( $10.4\%$  en moyenne) (Fig. 1).

L'isolement des fractions actives est facilité si l'extrait enzymatique commer-

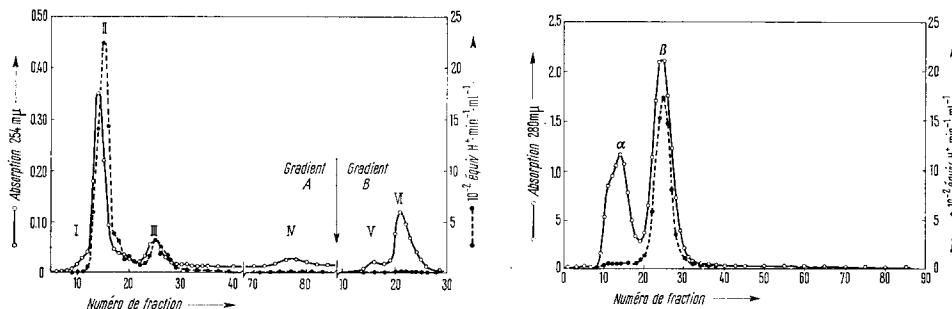


Fig. 1. Chromatographie de l'extrait commercial d'anhydrase carbonique sur DEAE-cellulose. Charge 50 mg. Elution à pH 6.80 par un gradient continu concave de concentration A (4 à 50 mM, cf. texte) puis par un gradient linéaire B (50 à 500 mM tampon). ○—○, Absorption mesurée à 253.7 mμ à l'aide d'un Uvicord (LKB); ●---●, activité enzymatique.

Fig. 2. Chromatographie de l'extrait commercial d'anhydrase carbonique sur gel Sephadex G-75. Charge 50 mg. Elution à pH 6.80, tampon 5 mM  $Na_2HPO_4$  (25 ml/h). Colonne 1.5 cm × 130 cm. ○—○, Absorption à 280 mμ; ●---●, activité enzymatique. Fraction α: protéines de poids mol. > 45 000; fraction β: protéines de poids mol. voisin de 30 000.

cial est au préalable chromatographié sur Sephadex G-75. Cette filtration moléculaire permet la séparation des protéines de poids moléculaire voisin de celui de l'anhydrase carbonique (poids mol. 30 000 (bibl. 11)) d'une part, de l'hémoglobine (VI) et du composé I d'autre part (Fig. 2);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dépourvu d'absorption ultraviolette, est élué bien après les protéines. Après déminéralisation par passage sur une colonne de résine échangeuse d'ions AG 11 A 8 (Bio Rad Laboratories, Richmond; élution à l'eau tridistillée 120 ml/h), la fraction " $\beta$ ", enzymatiquement active, est immédiatement congelée et lyophilisée.

Les isoenzymes II et III sont isolés par chromatographie sur DEAE-cellulose (colonne diamètre 1.5 cm  $\times$  20 cm) de la fraction  $\beta$ . Avant emploi la cellulose (capacité d'échange 0.63 méquiv/g) est purifiée selon PESCE *et al.*<sup>12</sup> et mise en suspension dans 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.80). Les solutions tampon sont stérilisées à l'étuve (120°, 15 min), additionnées de quelques gouttes de chloroforme et conservées au réfrigérateur au plus 48 h pour éviter les contaminations microbiennes de l'enzyme et les modifications du chromatogramme; les colonnes sont, de plus, préparées aussi aseptiquement que possible et refroidies à 12°. La charge (40–50 mg) est éluée à l'aide d'un gradient continu concave de concentration (4 à 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.80), 400 ml), formé par un Autograd (Technicon Chromatography Corp., New York), dont on utilise les 3 premières chambres (Fig. 1, gradient A). Chacun des enzymes II et III est déminéralisé et lyophilisé. Le degré de pureté des produits obtenus est testé par renouvellement de la chromatographie sur DEAE-cellulose d'une part, et par électrophorèse rapide sur cellogel (Serva, Heidelberg) d'autre part. Le composé II (activité spécifique  $12 \cdot 10^4$  U.I.) s'est montré pratiquement homogène (>97%) et est considéré comme suffisamment pur pour permettre les études envisagées. Une solution aqueuse à 1 mg/ml de cette protéine dans du tampon 10 mM phosphate ou véronal de sodium à 3° est stable pendant plus de 2 semaines en absence de microorganismes. Cette solution, employée comme solution mère pour nos dilutions, est toutefois renouvelée chaque semaine. Par contre le composé III (7.3% seulement de l'extrait commercial) n'a jamais pu être isolé à un degré de pureté suffisant. Les propriétés physico-chimiques et biochimiques de l'enzyme II, qui ont conduit à son identification avec l'isoenzyme anhydrase carbonique bovine B, sont relatées dans le cadre des résultats.

#### *Préparation d'enzyme marqué au $^{65}\text{Zn}$*

L'anhydrase carbonique bovine B ( $3.2 \cdot 10^{-5}$  M) est d'abord inactivée à >99% à pH 5.0 (bibl. 13) en milieu tampon 10 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  par incubation (60 min, 37°) avec 10 mM 1,10-phénanthroline. La réactivation de l'enzyme a lieu par addition d'un excès de Zn ( $\text{CH}_3\text{COO}$ )<sub>2</sub> (bibl. 13) (20 mM), marqué au  $^{65}\text{ZnCl}_2$  sans porteur à raison de 0.5 C/mole, et séparation par filtration moléculaire sur Sephadex G-25 (colonne 2 cm  $\times$  40 cm, élution par 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) après neutralisation avec 0.1 M NaOH jusqu'à pH 7.4 (cette opération s'accompagne d'une précipitation de  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  et de protéine dénaturée (*cf.* LINDSKOG<sup>14</sup>)). L'identification des produits s'effectue par mesure de l'activité enzymatique et de l'absorption à 280 m $\mu$  (protéine), 264.5 m $\mu$  (1,10-phénanthroline) et 270 m $\mu$  (chélate Zn-1,10-phénanthroline). On élimine le  $\text{Zn}^{2+}$ , radioactif ou non, fixé de façon non spécifique sur l'enzyme, par incubation (60 min, 25°) avec  $10^{-4}$  M EDTA. EDTA est séparé par chromatographie sur Sephadex G-25. Après déminéralisation (résine AG 11 A8, Bio Rad Laboratories) et lyophilisation, l'extrait d'anhydrase carbonique marqué au  $^{65}\text{Zn}$  (seulement 15 à 20% de la

quantité traitée) possède une radioactivité spécifique (mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations ANC 660 (A.C.E.C., Louvain) à cristal NaI(Tl) creux) de 30 impulsions/min par mg environ et une activité enzymatique réduite de 70-75% (dénaturation au cours de la lyophilisation).

### *Composition en acides aminés*

L'enzyme est hydrolysé selon GUNDLACH, STEIN ET MOORE<sup>15</sup> et l'analyse effectuée selon SPACKMAN, STEIN ET MOORE<sup>16</sup> (Autoanalyzer Technicon). La teneur en acides aminés est déterminée à l'aide d'une machine à calculer (IBM 7070, programme Fortran<sup>17</sup>) d'après la méthode de SCHÜSSLER ET JUNG<sup>18</sup> pour laquelle les valeurs arrondies de NYMAN ET LINDSKOG<sup>10</sup> pour l'anhydrase carbonique bovine B sont considérées comme valeurs théoriques (Tableau I).

### *Détermination de l'activité enzymatique*

L'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique est déterminée à 6° par mesure de la vitesse maximale d'hydration du CO<sub>2</sub> en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H<sup>+</sup> selon la méthode à pH-stat de LEIBMAN, ALFORT ET BOUDET<sup>19</sup>. Le milieu réactionnel est constitué par 25 ml de tampon 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), dans lequel perle 15 l/h CO<sub>2</sub> 4.6% dans N<sub>2</sub>. A ce pH l'activité mesurée représente 80% de l'activité maximale atteinte à pH 7.9. Dans ces conditions la vitesse de réaction enzymatique ( $V_E$ ) est proportionnelle à la concentration d'enzyme dans l'intervalle de concentrations mesurables (1 à  $25 \cdot 10^{-10}$  M). L'erreur standard atteint  $\pm 7\%$ .

### *Agents chélateurs*

Leur solubilité dans le tampon 8 mM phosphate à pH 7.4 doit être, si possible,  $\geq 0.1$  M. Il s'agit de: EDTA; DTPA; 2,2'-bis[di(carboxyméthyl)amino]diéthylsulfure (BADS); 1,2-bis[2-di(carboxyméthyl)aminoéthylthio]éthane (BATE); *N,N'*-bis(β-mercaptopoéthyl)éthylénediamine-*N,N'*-diacétique (BMEDA); acide *N*-2-mercaptopoéthyliminodiacétique (MEIDA); L-cystéine; cystéamine; D-pénicillamine; méthionine; 5-mercaptopyrodoxine; 6-mercaptopurine; éthylénediamine; diéthylénetriamine; triéthylénenetramine; 2,2',2''-tri-(aminotriéthyl)amine (TREN); *N,N,N',N'*-tétra-(2-aminoéthyl)éthylénediamine (PENTEN); 1,10-phénanthroline.

EDTA, 5-mercaptopyrodoxine et 1,10-phénanthroline sont des produits de Merck (Darmstadt), L-cystéine, cystéamine, méthionine, 6-mercaptopurine, éthylénediamine et diéthylénetriamine des produits de Fluka (Buchs, Suisse), D-pénicillamine un produit de Heyl (Berlin), BMEDA un produit de Bracco Industria Chimica (Milan); les composés DTPA, MEIDA, BADS, BATE, triéthylénenetramine et PENTEN ont été aimablement mis à notre disposition par Geigy (Bâle), et TREN par le Prof. G. SCHWARZENBACH (Zürich).

Les 6 premiers composés ont été employés à l'état de Na chélates, le DTPA aussi à l'état de Ca ou Zn chélate. Diéthylénetriamine et PENTEN ont été distillés selon SCHWARZENBACH<sup>20</sup>.

Les solutions de mercaptanes sont fraîchement préparées avant usage et placées immédiatement sous atmosphère N<sub>2</sub> à 3°.

L'étude de l'influence de ces agents chélateurs a été conduite selon deux procédés différents. Elle est basée sur la spécificité de Zn<sup>2+</sup> pour l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique<sup>21</sup>. La mobilisation de ce cofacteur entraîne une inhibition de

l'enzyme qui lui est proportionnelle. Dans le premier l'inhibition éventuelle entre l'enzyme ( $E$ ) et le chélateur ( $L$ ) a lieu à  $6^\circ$  pendant la détermination de l'activité enzymatique: inhibition immédiate. L'agent chélateur est ajouté au tampon de la cuve à titration avant l'arrivée du  $\text{CO}_2$  pour la mesure d'activité. Un grand excès moléculaire de chélateur ( $[L]/[E] > 10^5$ ) doit être employé pour inhiber l'anhydrase carbonique ( $1.3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ), entraînant ainsi une élévation importante de la force ionique (cf. Fig. 3) et, par là-même, une inhibition de l'enzyme (cf. RÉSULTATS). Une interaction éventuelle entre  $L$  et  $\text{CO}_2$  restant possible et la réaction d'inhibition étant sans doute incomplète, on considère les résultats ainsi obtenus avec réserve. Dans le second procédé on élimine les difficultés ci-dessus en incubant l'enzyme ( $3.2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) à  $37^\circ$  avec différents excès d'agent chélateur (sous 1 atm  $\text{N}_2$ ) avant la détermination de l'activité résiduelle à  $6^\circ$ ; le milieu de mesure contient alors  $10^{-4} \text{ M}$  EDTA afin d'éviter une réactivation éventuelle par des traces  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , etc.<sup>22</sup>. Cette méthode permet une étude cinétique de l'inhibition.

## RÉSULTATS

### *Propriétés et identification de l'isoenzyme II*

L'isoenzyme II a un coefficient d'extinction  $E_1^1 \text{ cm}^{-1} \text{ m}\mu$  à  $280 \text{ m}\mu$  de 16.8; le rapport  $A_{280\text{m}\mu}/A_{260\text{ m}\mu}$  est de 1.8 (LINDSKOG<sup>11</sup> relate pour ce rapport 1.6 et LIEFLÄNDER<sup>23</sup>

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE BOVINE B (bibl. 10) ET DE L'ENZYME II

Acide aminé	<i>Anhydrase carbonique bovine B</i>		<i>Enzyme II*</i>
	Valeurs déterminées <sup>10</sup>	Valeurs arrondies	
Asp	$32.1 \pm 0.3$	32	$32.2 \pm 0.4$
Thr	$14.5 \pm 0.3$	14	$11.6 \pm 0.3$
Ser	$16.1 \pm 0.7$	16	$10.4 \pm 0.6$
Glu	$23.7 \pm 0.7$	24	$23.8 \pm 0.8$
Pro	$19.5 \pm 0.4$	20	**
Gly	$20.2 \pm 0.5$	20	$19.8 \pm 0.4$
Ala	$16.9 \pm 0.3$	17	$16.9 \pm 0.3$
Val	$19.9 \pm 0.1$	20	$19.7 \pm 0.4$
Cys	< 0.2	0	< 0.1
Met	$3.1 \pm 0.1$	3	$3.0 \pm 0.1$
Ile	$5.0 \pm 0.2$	5	$5.0 \pm 0.3$
Leu	$26.2 \pm 0.4$	26	$25.9 \pm 0.1$
Tyr	$7.9 \pm 0.1$	8	$7.9 \pm 0.1$
Phe	$11.3 \pm 0.2$	11	$11.2 \pm 0.2$
Lys	$18.7 \pm 0.3$	19	$19.1 \pm 0.3$
His	$11.3 \pm 0.2$	11	$10.8 \pm 0.2$
Arg	$9.0 \pm 0.2$	9	$9.1 \pm 0.1$
Trp	**		**

\* Ces résultats sont les moyennes issues d'une triple analyse de deux hydrolysats différents. Les valeurs de Ser et Thr, n'ayant pas été rapportées au temps d'hydrolyse zéro, sont entachées d'une erreur par défaut.

\*\* Non déterminé.

1.7 à pH 8). L'absorption molaire pour un poids moléculaire de 31 000 est  $\epsilon_m = 52\,000 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$  à pH 7.4 ( $I = 0.01$ ), valeur différant quelque peu des résultats publiés (56 000 (bibl. 11) et 58 000 (bibl. 23)) mais déterminés à pH 8.

L'activité enzymatique spécifique de l'isoenzyme II ( $12 \cdot 10^4$  U.I.) se rapporte à 6° et pH 7.4, la méthode de détermination employée ne permettant pas les mesures à 25°. Elle est du même ordre de grandeur que celle de l'anhydrase carbonique humaine B ( $4.4 \cdot 10^4$  U.I.) et nettement plus faible que celle de l'anhydrase carbonique humaine C ( $1.3 \cdot 10^6$  U.I.) (bibl. 24).

Une détermination approchée du poids moléculaire a été effectuée selon WHITAKER<sup>25</sup> sur gel Sephadex G-200 (colonne 1.5 cm × 140 cm). Cette méthode donne un poids mol. de  $32\,000 \pm 2000$ , valeur en bon accord avec la littérature<sup>10,11</sup>.

La composition en acides aminés est en accord parfait avec celle de NYMAN ET LINDSKOG<sup>10</sup>, ce qui nous permet de conclure à l'identité de notre enzyme II avec l'isoenzyme anhydrase carbonique bovine B.

L'énergie d'activation apparente de la réaction enzymatique catalysée par l'isoenzyme anhydrase carbonique bovine B, et déterminée entre 0 et 15° d'après la relation d'Arrhénius, est  $A = 1.7$  kcal/M ( $Q_{10} = 1.1$ ) contre 12.7 kcal/M ( $Q_{10} = 2.6$ ), en accord avec DAVIS<sup>26</sup> pour la réaction spontanée. Cette différence motive le choix d'une basse température pour la mesure de l'activité enzymatique.

La zone de proportionnalité  $V_E = k$  [substrat] est trop étroite ( $2 \leq \text{débit } CO_2 + N_2 \leq 6$  l/h) et, dans ce domaine, le débit est trop imprécisément mesurable, pour permettre la détermination de la constante de Michaelis de l'isoenzyme.

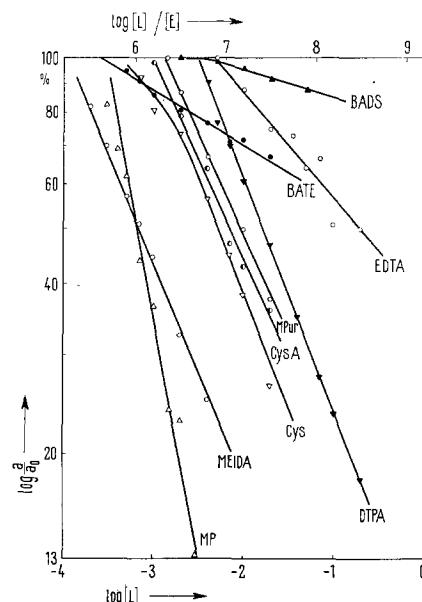
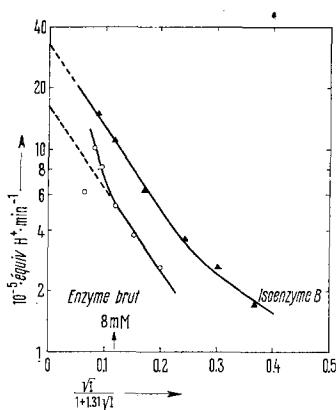


Fig. 3. Influence de la force ionique sur la détermination de l'activité enzymatique de l'isoenzyme B ( $1.3 \cdot 10^{-8}$  M) et de l'extrait commercial (enzyme brut) à 6°. Ordonnée, vitesse de réaction enzymatique maximale (pH 7.4); abscisse, force ionique du milieu de mesure (tampon  $Na_2HPO_4$ ).

Fig. 4. Inhibition immédiate de l'enzyme par différents agents chélateurs en fonction de leur concentration.  $[E] = 1.3 \cdot 10^{-8}$  M, température 6°. MP, 5-mercaptopurine; Cys, L-cystéine; CysA, cystéamine et MPur, 6-mercaptopurine.

La force ionique du tampon a une influence essentielle sur l'activité de l'anhydrase carbonique bovine B (Fig. 3).  $V_E$  vérifie la relation corrigée de Debye-Hückel

$$\log V_E = B \frac{I^4}{1 + 1.31 I^4} + \text{constante, pour laquelle le nombre de charges élémentaires impliquées dans la réaction est } B = 4 \text{ (valeur différente de celle de DAVIS<sup>27</sup>)}$$

La Fig. 3 montre aussi l'influence des impuretés de l'extrait enzymatique sur cette relation lorsque  $I < 0.12$ . Pour les essais envisagés, la force ionique du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $I = 0.12$  soit 8 mM) a été choisie en raison à la fois d'un pouvoir tampon suffisamment élevé et d'une force ionique aussi faible que possible.

### Influence des agents chélateurs

L'activité enzymatique résiduelle ( $a$ ) sous l'influence des agents chélateurs est rapportée à l'activité du contrôle ( $a_0$ ), mesurée en absence de ligant, et exprimée en % (erreur < 10%).

### Inhibition immédiate

L'activité résiduelle portée en fonction de  $[L]/[E]$  sur un diagramme à axes logarithmiques forme une courbe d'inhibition linéaire dont la pente  $k$  diffère selon l'agent chélateur mais reste toujours nettement < 1 (Fig. 4). Le Tableau II résume les valeurs de  $k$ , et indique les concentrations de chélateur pour lesquelles l'inactivation de l'enzyme atteint 50%. Les résultats obtenus avec les polyamines éthylènediamine-PENTEN doivent être considérés avec réserve, car ces substances réagissent rapide-

TABLEAU II

## INHIBITION IMMÉDIATE DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE BOVINE B PAR DIFFÉRENTS AGENTS CHÉLATEURS

$I_{50}$  = concentration ( $10^{-3}$  M) du chélateur pour laquelle l'inhibition atteint 50%;  $k$  = coefficient de régression (erreur 7-10%) des courbes d'inhibition (Fig. 4);  $K'_{LZn}$  = constante de stabilité effective<sup>30</sup> du chélate 1:1 à pH 7.4, calculée à partir des constantes de formation brutes et des constantes de basicité des agents chélateurs<sup>31,32</sup> selon SCHWARZENBACH<sup>30</sup>.  $[E] = 1.3 \cdot 10^{-9}$  M, température 6°.

Agent chélateur	$\log K'_{LZn}$	$I_{50}$	$-k$
EDTA	13.4	170	0.20
DTPA	14.2	16	0.40
BADS	11.8	270	0.10
BATE	—	»	—
BMEDA	—	1.2	0.37
MEIDA	11.7	0.68	0.38
L-Cystéine	5.9	5.2	0.41
Cystéamine	3.7	7.0	0.35
D-Pénicillamine	6.0	110	0.16
5-Mercaptopyridoxine	2.1	0.66	0.83
6-Mercaptopurine	—	9.0	0.37
Methionine	—	»	—
Ethylènediamine	2.7	4.0	0.27
Diéthylènetriamine	4.7	7.0	0.22
Triéthylènetétramine	7.7	3.7	0.13
TREN	8.3	6.2	0.34
PENTEN	8.2	1.3	0.40
1,10-Phénanthroline	6.4	*	*

\* Techniquement non mesurable.

ment à 6° avec le substrat pour former des carbamates<sup>28</sup> en libérant des H<sup>+</sup> supplémentaires, dont la titration augmente notablement la force ionique du milieu de mesure d'activité. De plus, les ligants des carbamates et vraisemblablement aussi leurs constantes  $K'_{LZn}$  diffèrent de ceux des amines correspondantes. La composition du milieu ne pouvant pas être déterminée simplement pour les amines autres que l'éthylènediamine, il s'avère impossible de donner une interprétation raisonnable de ces résultats. Le remplacement du CO<sub>2</sub> par le *p*-nitrophénylacétate pour l'étude de l'influence de ces polyamines sur l'activité estérasique de l'anhydrase carbonique<sup>29</sup> n'a pas donné meilleure satisfaction: les amines hydrolysent totalement le substrat en quelques secondes!

### Cinétique de l'inhibition

Des essais préalables de stabilité ont montré qu'une incubation de 24-30 h à pH 7.4 n'affectait pas l'activité de l'enzyme même à force ionique élevée (0.5 M CH<sub>3</sub>COONa); à pH 5.0 l'incubation ne doit pas être prolongée au-delà de 5 h. L'influence des Na chélates d'EDTA et DTPA est résumée dans le Tableau III. En

TABLEAU III

ACTIVITÉ ENZYMATIQUE (% DU CONTRÔLE) AU COURS DE L'INCUBATION AVEC DIFFÉRENTS EXCÈS MOLÉCULAIRES D'EDTA OU DE DPTA  
[E] = 3.2 · 10<sup>-7</sup> M, température 37°.

Durée d'incubation	$\log [EDTA]/[E]$				$\log [DTPA]/[E]$			
	4	5	5.8	6.2	4	5	5.8	6.2
2 min	117	130	130	126	100	117	102	101
7 min	110	120	115	108	99	97	100	97
1 h	122	121	117	105	97	108	91	79
2 h	105	91	94	77	106	99	87	86
6 h	103	96	90	75	116	108	99	82
24 h	100	104	92	78	96	93	86	76
*	84	80	71	60	93	92	86	71

\* Activité enzymatique après 24 h d'incubation rapportée à l'activité maximale mesurée au cours de l'incubation.

présence de Na<sub>3</sub>[Zn-DTPA] l'activité de l'anhydrase carbonique atteint encore 111% pour [L]/[E] = 10<sup>5</sup> et 120% pour un excès de 10<sup>6</sup> après 24 h d'incubation; dans ce cas l'activation mesurée à *t* = 2 min est 24% respectivement 84%. Avec Na<sub>3</sub>[Ca-DTPA] en excès à 10<sup>6</sup> l'activité à *t* = 24 h est encore 104%.

L'inhibition de l'anhydrase carbonique bovine B par MEIDA est une réaction du premier ordre, à cause de [L] ≫ [E], au cours des 5 premières heures d'incubation (Fig. 5). Dans ce domaine la période d'inactivation (*t<sub>1/2</sub>*) de l'enzyme caractérise l'effectivité de l'agent chélateur (Tableau IV). L'écart de la linéarité observé est vraisemblablement dû à l'oxydation de MEIDA en disulfite.

L'influence de 1,10-phénanthroline se traduit de même par une réaction du premier ordre pendant toute la durée de l'incubation (Fig. 6). La période de l'inactivation exponentielle à pH 7.4 pour différents excès de 1,10-phénanthroline est relatée

TABLEAU IV

PÉRIODE D'INACTIVATION ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) PAR MEIDA ET 1,10-PHÉNANTHROLINE POUR DIFFÉRENTS EXCÈS MOLAIRES ( $[L]/[E]$ ), ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE RÉSIDUELLE ( $a/a_0$ ) APRÈS 24 h D'INCUBATION  
 $[E] = 3.2 \cdot 10^{-7}$  M, température 37°.

Agent chélateur	$[L]/[E]$ (en $10^4$ )	$t_{\frac{1}{2}}$ (h)		$a/a_0$ (%)
		pH 7.4	pH 5.0	
MEIDA	1.5	6.4	21	
	6.0	3.0	5.1	
	15.0	2.0	0.0	
	30.0	1.5	0.0	
1,10-Phénanthroline	0.6	43	0.25	65
	1.5	25	0.10	40
	3.0	9	0.06	12

dans le Tableau IV, où les valeurs correspondantes à pH 5.0 sont données à titre de comparaison. A pH 5.0 l'inhibition est environ 160 fois plus rapide qu'au pH physiologique, ce qui confirme les observations déjà faites<sup>21</sup>.

La Fig. 6 montre les courbes d'inactivation de l'anhydrase carbonique sous l'influence de méthionine, BADS, BATE, L-cystéine et cystéamine en excès molaire  $3 \cdot 10^5$  comparées avec celles de MEIDA pour le même excès et de 1,10-phénanthroline (excès  $3 \cdot 10^4$  seulement). On constate ici qu'une comparaison directe des valeurs  $t_{\frac{1}{2}}$  (déterminées au cours des premières heures d'incubation) ne reflète pas exactement les différences d'effectivité définitive des chélateurs: en effet, par exemple, la période

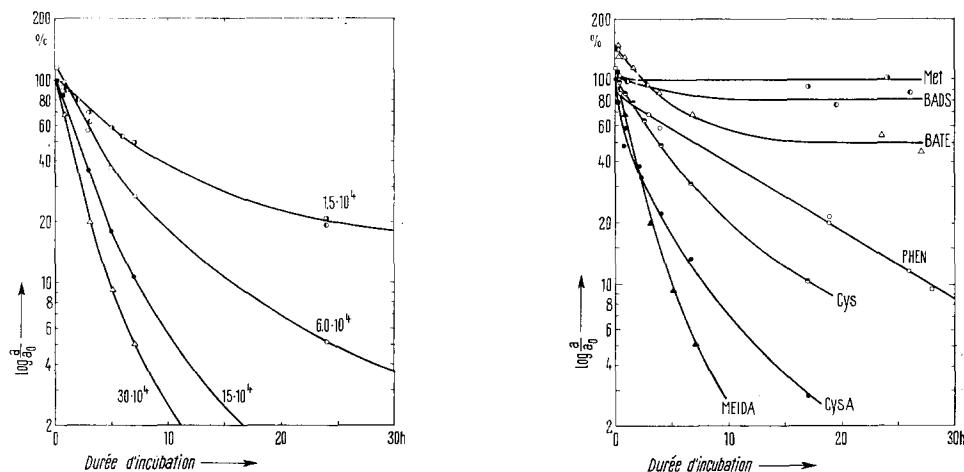


Fig. 5. Cinétique de l'inhibition de l'enzyme incubé avec différents excès de MEIDA ( $1.5 \cdot 30 \cdot 10^4$ ). L'incubation pour  $[L]/[E] = 1.5 \cdot 10^4$  a été effectuée en tampon 8 mM phosphate (●) et 10 mM véronal (○); sinon elle a toujours lieu en milieu phosphate.  $[E] = 3.2 \cdot 10^{-7}$  M; température 37°.

Fig. 6. Cinétique de l'inhibition de l'enzyme incubé avec différents agents chélateurs. Excès de chélateur  $3 \cdot 10^5$ ; sauf dans le cas de 1,10-phénanthroline:  $3 \cdot 10^4$ . Tampon 8 mM phosphate.  $[E] = 3.2 \cdot 10^{-7}$  M; température 37°. Met, méthionine; PHEN, 1,10-phénanthroline; Cys, L-cystéine et CysA, cystéamine.

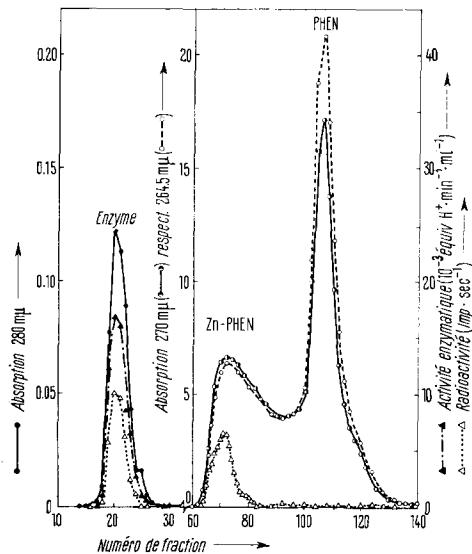


Fig. 7. Isolement de l'enzyme marqué au  $^{65}\text{Zn}$  par chromatographie sur Sephadex G-25 après incubation à  $37^\circ$  avec 1,10-phénanthroline (PHEN), 24 h, pH 7.4 (première méthode). Colonne 2 cm  $\times$  40 cm. Elution avec 4 mM phosphate (fractions de 3 ml). A l'incubation  $[E] = 3.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  et  $[1,10\text{-phénanthroline}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ .

d'inhibition par BATE est 5 h contre 4 h, valeur voisine, par la L-cystéine, alors qu'après 24 h d'incubation l'activité enzymatique résiduelle atteint encore 50% en présence de BATE et seulement 7% environ avec la L-cystéine.

#### Expériences avec $^{65}\text{Zn}$ à pH 7.4

Dans une première méthode, basée sur l'inhibition d'enzyme marqué au  $^{65}\text{Zn}$  — conditions d'incubation (18 à 24 h):  $[E] = 3.2 \text{ à } 10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , tampon 8 mM phosphate (pH 7.4),  $[\text{MEIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ,  $[1,10\text{-phénanthroline}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ,  $37^\circ$  — on observe une répartition de la radioactivité originale entre l'enzyme et à l'agent

#### TABLEAU V

RADIOACTIVITÉ LIÉE À L'ENZYME ET À L'AGENT CHÉLATEUR APRÈS INCUBATION ET ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-25

On donne entre parenthèses la répartition en % de la radioactivité totale de l'éluat. A l'inhibition  $[E] = 3.2 \text{ à } 10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{MEIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ,  $[1,10\text{-phénanthroline}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , température  $37^\circ$ .

Agent chélateur	Inhibition (%)	Radioactivité (imp./sec)		
		Totale		Liée à l'enzyme
		Charge	Eluat	
MEIDA	98	48	49	1 (2)
1,10-Phénanthroline 66	96	96	93	35 (38)
1,10-Phénanthroline 76	159	159	162	40 (25)
				122 (75)

chélateur après l'inhibition et leur isolement (filtration moléculaire sur Sephadex G-25). La Fig. 7 montre le chromatogramme obtenu lorsque l'enzyme radioactif a été incubé avec 1,10-phénanthroline. Le Tableau V rapporte les résultats quantitatifs correspondants pour MEIDA et 1,10-phénanthroline.

Dans la seconde méthode l'enzyme incubé n'est pas marqué. Après son inhibition (tampon véronal) on ajoute un excès, par rapport à l'agent chélateur, de  $Zn(CH_3COO)_2$  marqué au  $^{65}ZnCl_2$  (*cf.* MATÉRIEL ET MÉTHODES). Si l'inhibition observée à l'incubation a lieu par mobilisation du cofacteur enzymatique, l'addition de  $Zn^{2+}$  marqué doit permettre la réactivation de l'anhydrase carbonique et, ainsi, son marquage au  $^{65}Zn$ . Cependant, l'excès de  $Zn^{2+}$  ajouté conduit à une inhibition secondaire de l'enzyme<sup>26</sup>, qui est totalement levée par son élimination (Sephadex G-25)<sup>33</sup>. Une incubation de l'enzyme avec  $10^{-4}$  M  $Zn(CH_3COO)_2$  (concentration choisie en raison de la solubilité du Zn à pH 7.4) marqué au  $^{65}ZnCl_2$  (2.5 mC/mole) en absence d'agent chélateur permet de vérifier l'absence d'un échange du cofacteur enzymatique avec  $Zn^{2+}$  du milieu au cours de l'addition de l'excès de  $Zn(CH_3COO)_2$ . La radioactivité de l'enzyme réactivé, isolé par filtration moléculaire (G-25), est indiquée dans le Tableau VI.

TABLEAU VI

RADIOACTIVITÉ DE L'ENZYME APRÈS INHIBITION D'UN ESSAI NON MARQUÉ ET RÉACTIVATION PAR NEUTRALISATION DE L'AGENT CHÉLATEUR AVEC  $Zn(CH_3COO)_2$  MARQUÉ AU  $^{65}Zn$   
A l'inhibition  $[E] = 6.4 \cdot 10^{-5}$  M, température 37°.

Agent chélateur	Inhibition (%)	Radioactivité (imp./sec)	
		Calculée*	Mesurée
MEIDA	95	29	26 (90%)
1,10-Phénanthroline	83	141	113 (80%)

\* D'après la radioactivité spécifique de  $^{65}Zn(CH_3COO)_2$  pour un échange à 100% du cofacteur enzymatique avec  $Zn^{2+}$  marqué du milieu.

## DISCUSSION

Nos expériences montrent qu'une réaction a lieu entre l'anhydrase carbonique bovine B et les agents chélateurs, conduisant à l'inhibition de l'enzyme et à la mobilisation du cofacteur. Le mécanisme de l'inhibition n'est pas simple car l'action des chélateurs se manifeste par une inhibition immédiate (Fig. 4) s'accroissant ensuite avec la durée de l'incubation, et par une activation (<50%) de courte durée observable en incubation seulement.

L'activation semble dépendre davantage de la concentration que de la nature de l'agent chélateur. Elle n'est pas due à la chélation d'ions inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, présents à l'état de traces dans les réactifs, car elle a lieu aussi avec les solutions traitées avec  $10^{-4}$  M EDTA et seulement pour  $[L]$  élevée. L'activation (6×) observée par HO ET STURTEVANT<sup>9</sup> avec EDTA, et attribuée par ces auteurs à la modification de la conformation protéique au centre actif, ne semble pas, de par son ordre de grandeur d'une part et de sa méthode d'observation d'autre part, devoir être com-

parée avec celle-ci. Nos résultats expérimentaux ne permettent pas de donner une meilleure explication de ce phénomène.

La mobilisation du Zn de l'enzyme par un agent chélateur peut être considérée à première vue comme une substitution nucléophile  $\text{I}$  ( $S_{\text{NI}}$ ):  $E\text{Zn} \rightleftharpoons E$  (apoenzyme) +  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+} + L \rightleftharpoons \text{ZnL}$ , ces équilibres étant déterminés par les constantes  $K'_{E\text{Zn}}$  et  $K'_{L\text{Zn}}$  respectivement. Dans ce cas l'activité enzymatique résiduelle serait donnée par la relation

$$\log \frac{a}{a_0} = - \log \frac{K'_{L\text{Zn}}}{K'_{E\text{Zn}}} \cdot \frac{[L]}{[E]},$$

obtenue d'après un raisonnement analogue à celui de CATSCH<sup>1</sup> et où  $[L]$  et  $[E]$  sont les concentrations totales des réactifs mis à réagir et non pas des formes non complexes; cette relation indique qu'en coordonnées logarithmiques l'activité résiduelle  $a/a_0$  est proportionnelle à l'excès  $[L]/[E]$  et que le coefficient de proportionnalité est  $-1$ . La relation n'est valable que si  $a/a_0 < 1$ ; pour  $a/a_0 \approx 1$  (début de l'inhibition) la pente de la courbe passe progressivement de  $0$  à  $-1$ . Or, les droites d'inhibition obtenues montrent une pente  $\ll 1$  et l'absence de corrélation entre l'effectivité des agents chélateurs et  $K'_{L\text{Zn}}/K'_{E\text{Zn}}$  (Fig. 4). De plus, une inhibition immédiate est mise en évidence, alors que le mécanisme  $S_{\text{NI}}$  prévoit une réaction lente. Par contre un mécanisme  $S_{\text{N}2}$ , impliquant la formation d'un complexe ternaire intermédiaire protéine-Zn-chélateur:



permet d'expliquer tous les résultats. La formation d'un tel complexe est d'autant plus plausible que la spécificité du Zn pour l'activité de l'anhydrase carbonique<sup>21</sup> laisse supposer sa participation directe à la réaction enzymatique<sup>14,34,35</sup> et aussi la disponibilité d'au moins  $1$  de ses  $4$  liaisons de coordination. Par là-même on est autorisé à penser que le complexe ternaire est inactif. Par décomposition ce complexe conduit à la mobilisation du Zn d'une part, et à l'élévation du degré d'inhibition par déplacement de l'Équilibre  $\text{I}$  d'autre part. Cette décomposition a lieu relativement lentement, comme le montrent nos expériences d'incubation, car l'anhydrase carbonique constitue en elle-même un complexe *robuste* (terminologie de SCHWARZENBACH<sup>36</sup>), et explique la seconde partie de la cinétique.

L'inhibition immédiate de l'enzyme observée aux fortes concentrations d'agents chélateurs peut être due à la fois à l'élévation de la force ionique (effet non spécifique) et au pouvoir chélateur propre des anions (effet spécifique). L'effet spécifique semble être le plus important, car à force ionique équivalente l'inhibition décroît dans l'ordre  $\text{DTPA} \approx \text{phosphate} > \text{acétate} > \text{EDTA} > \text{NaCl}$  ou  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (le phosphate et l'acétate peuvent former des complexes). Les pentes des courbes de la Fig. 4 étant  $\ll 1$ , l'effet non spécifique est sans importance pour la conclusion: absence de mobilisation directe du cofacteur enzymatique.

L'activation au début de l'incubation masque l'inhibition immédiate et l'activité mesurée, résultant de la superposition de ces deux effets, ne correspond pas à l'inhibition réelle. L'impossibilité d'une étude séparée de ces effets contraires empêche l'analyse quantitative de la cinétique générale de l'inhibition. L'activité enzymatique résiduelle à un instant  $t$  est déterminée qualitativement selon

$$\ln \frac{a}{a_0} = -\ln (1 + K \cdot [L]) - \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \cdot k t$$

où le premier terme, indépendant de  $t$ , correspond à l'inhibition immédiate, et le second à la réaction du premier ordre observée par incubation; la constante  $K$  est la constante d'équilibre de la première étape du mécanisme proposé et  $k$  la constante de vitesse de la seconde étape (la constante de vitesse  $-k$  de la réaction opposée peut être négligée par rapport à  $k$ ). Cette relation exprime bien les faits observés, à savoir l'augmentation de l'inhibition immédiate et la diminution du temps demi-réaction ( $t_{1/2}$ ) lorsque  $[L]$ , c'est-à-dire  $[L]/[E]$ , augmente.

La formation d'un complexe ternaire explique l'absence d'une corrélation entre l'inhibition de l'anhydrase carbonique et  $K'_{Zn}$ , ainsi qu'un coefficient de régression  $k < 1$  (Fig. 4). En effet l'inhibition ne résulte pas de la mobilisation des  $Zn^{2+}$  libres, décrite par  $K'_{Zn}$ , mais d'une chélation *in situ*, à laquelle prennent part quelques ligants seulement des chélateurs. La nature et la répartition moléculaire des atomes ligant et l'encombrement stérique des agents chélateurs jouent donc un rôle déterminant pour leur effectivité: MEIDA > cystéamine > L-cystéine > 1,10-phénanthroline > BATE > BADS  $\simeq$  DTPA  $\simeq$  EDTA. Les difficultés expérimentales rencontrées au cours de l'étude de l'influence des polyamines ne nous a pas permis de préciser l'importance du facteur stérique. La plus grande effectivité des mercaptans et de 1,10-phénanthroline s'accorde parfaitement avec le fait déjà observé que Zn préfère les ligants S et N à O (bibl. 37).

L'importante inhibition de l'anhydrase carbonique par 1,10-phénanthroline n'est pas contraire aux résultats de LINDSKOG ET NYMAN<sup>22</sup> (10% d'inhibition seulement après 24 h) — ces auteurs dialysant l'enzyme contre un faible excès (40 environ) de chélateur — et elle correspond aux observations effectuées au cours de l'inactivation de métallodéhydrogénases<sup>38</sup>; cette dernière inhibition peut de même s'expliquer par formation d'un complexe ternaire<sup>39</sup>.

Le but de nos expériences était de préciser l'hypothèse de la néphrotoxicité des agents chélateurs par inhibition de l'anhydrase carbonique. Bien que l'enzyme étudié soit isolé d'erythrocytes et non pas du cortex rénal on est en droit de généraliser nos résultats, car tous les isoenzymes connus de l'anhydrase carbonique sont des Zn-complexes 1:1 dont le comportement *in vitro* à l'égard des inhibiteurs est identique<sup>22,40</sup>. Nos expériences montrent que l'inhibition de l'anhydrase carbonique est possible mais seulement sous l'action d'un grand excès d'agent chélateur qui n'est certainement jamais atteint dans l'organisme au cours de l'administration de doses toxiques. On peut donc affirmer que la néphrotoxicité des agents chélateurs n'est sans doute pas due à l'inhibition de l'anhydrase carbonique. Par contre le mécanisme d'inhibition tel que nous l'avons postulé permet, en temps que "modèle", d'intéressantes implications théoriques pour le problème général de la néphrotoxicité par les agents chélateurs. Ce point est discuté par ailleurs<sup>41</sup>.

## RÉSUMÉ

1. L'isoenzyme anhydrase carbonique bovine B a été isolé pur à partir d'un extrait commercial par chromatographie sur Sephadex G-75 et DEAE-cellulose.
2. La cinétique de l'inhibition se caractérise par une décroissance immédiate

de l'activité enzymatique après l'addition des chélateurs. L'inhibition s'accroît ensuite lentement. On observe l'absence d'une corrélation entre le degré d'inhibition de l'enzyme et les constantes de stabilité effectives des agents chélateurs pour leur Zn chélate, 1:1.

3. Le marquage de l'enzyme au  $^{65}\text{Zn}$  montre que l'inhibition lente est due à la mobilisation du Zn enzymatique par les chélateurs.

4. Tous ces faits trouvent une explication dans la formation d'un complexe ternaire intermédiaire inactif enzyme-Zn-agent chélateur. Ce complexe se forme rapidement et explique l'inhibition immédiate. Le complexe enzymatique protéine-Zn étant inerte, la dissociation du complexe ternaire, c'est-à-dire la mobilisation du Zn, a lieu beaucoup plus lentement.

#### REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de la Communauté Européenne de l'Energie Atomique, Bruxelles, Belgique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. CATSCH, *Radioactive Metal Mobilization in Medicine*, C. Thomas, Springfield, 1964, p. 24 et p. 151.
- 2 F. HAVLÍČEK, *Strahlentherapie*, 134 (1967) 296.
- 3 H. FOREMAN, C. FINNEGAR ET C. C. LUSHBAUGH, *J. Am. Med. Assoc.*, 160 (1956) 1042.
- 4 A. CATSCH, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 246 (1964) 316.
- 5 O. G. ARKHIPOVA ET N. K. DEMOKIDOVA, *Farmakol. Toksikol.*, 28 (1965) 92.
- 6 V. NIGROVIČ, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 249 (1964) 206.
- 7 R. P. DAVIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 5674.
- 8 H. KELLER ET U. H. PETERS, *Z. Physiol. Chem.*, 317 (1959) 228.
- 9 C. HO ET J. H. STURTEVANT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 (1960) 20.
- 10 P. O. NYMAN ET S. LINDSKOG, *Biochim. Biophys. Acta*, 85 (1964) 141.
- 11 S. LINDSKOG, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 218.
- 12 A. PESCE, R. H. MCKAY, F. STOLZENBACH, R. D. CAHN ET N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1754.
- 13 S. LINDSKOG ET B. G. MALMSTRÖM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2 (1960) 213.
- 14 S. LINDSKOG, *Biochemistry*, 5 (1966) 2641.
- 15 H. G. GUNDLACH, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1754.
- 16 D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.
- 17 I. LANGNER, *Bericht Kernforschungszentrum, Karlsruhe*, 247 (1966).
- 18 H. SCHÜSSLER ET H. JUNG, *Z. Naturforsch.*, 22 b (1967) 610.
- 19 K. C. LEIBMAN, D. ALFORT ET R. A. BOUDET, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 131 (1961) 271.
- 20 G. SCHWARZENBACH, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 947.
- 21 S. LINDSKOG ET B. G. MALMSTRÖM, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1129.
- 22 S. LINDSKOG ET P. O. NYMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 85 (1964) 462.
- 23 M. LIEFLÄNDER, *Z. Physiol. Chem.*, 235 (1964) 125.
- 24 B. H. GIBBONS ET J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2539.
- 25 J. R. WHITAKER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1950.
- 26 R. P. DAVIS, dans P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 5, Academic Press, New York, 2ième Ed., 1961, p. 559.
- 27 R. P. DAVIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 5209.
- 28 A. JENSEN ET R. CHRISTENSEN, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 486.
- 29 R. E. TASHIAN, D. P. DOUGLAS ET Y. S. L. YU, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14 (1964) 256.
- 30 G. SCHWARZENBACH ET H. FLASCHKA, dans W. KOCH, *Die Chemische Analyse*, Vol. 45, *Die Komplexometrische Titration*, F. Enke, Stuttgart, 5ième Ed., 1965, p. 12.
- 31 L. G. SILLÉN ET A. E. MARTELL, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, The Chemical Society, London, Special Publication No. 17, 1964, Section II, p. 357.

- 32 G. R. LENZ ET A. E. MARTELL, *Biochemistry*, 3 (1964) 745.  
33 S. CAPRY, *Bericht Kernforschungszentrum, Karlsruhe*, 582 (1967).  
34 A. DOBRY-DUCLAUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 895.  
35 J. E. COLEMAN, *Biochemistry*, 4 (1965) 2644.  
36 G. SCHWARZENBACH, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 451.  
37 J. E. COLEMAN ET B. L. VALLEE, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2244.  
38 B. L. VALLEE, F. L. HOCH, S. J. ADELSTEIN ET W. E. C. WACKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5879.  
39 B. L. VALLEE, T. L. COOMBS ET R. J. P. WILLIAMS, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 397.  
40 S. LINDSKOG, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 945.  
41 A. CATSCH, A.-E. HARMUTH-HOENE, F. HAVLÍČEK ET S. CAPRY, *Symp. on Diagnosis and Treatment of Deposited Radionuclides*, Richland, Washington, 1967, sous presse.

*Biochim. Biophys. Acta*, 151 (1968) 245-259