

BBA 65964

OCTOPINE DÉSHYDROGÉNASE

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS CATALYTIQUES

NGUYEN VAN THOAI, CLAUDE HUC, DANG BA PHO ET ANNA OLOMUCKI

Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris (France)

(Reçu le 26 Mars, 1969)

SUMMARY

Octopine dehydrogenase: Purification and catalytic properties

1. Octopine dehydrogenase, an NAD^+ enzyme, which catalyzes the dehydrogenation of octopine into arginine *plus* pyruvate, has been purified from muscles of *Pecten maximus*. It is homogeneous on analytical ultracentrifugation and disc electrophoresis.

2. The enzyme contains no such metal cofactor as Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} .

3. The Michaelis constants are: $1.5 \cdot 10^{-3}$ M for octopine, arginine and pyruvate, $1.5 \cdot 10^{-4}$ M for NAD^+ and $4 \cdot 10^{-5}$ M for NADH.

4. Substrate analogs with a guanidyl (guanidinobutane) or a carboxyl group (valeric acid) or both of them (δ -guanidinovaleric acid) are competitive inhibitors of the octopine forming reaction. In the dehydrogenation reaction, compounds with only one of these groups are competitive inhibitors whereas those possessing both guanidyl and carboxyl groups are not.

INTRODUCTION

L'octopine déshydrogénase, extraite du muscle de certains invertébrés marins, est un enzyme à NAD^+ , catalysant la réduction réversible du produit de condensation chimique de l'arginine et du pyruvate¹⁻⁴.

Chez les invertébrés renfermant de l'octopine déshydrogénase dans leurs muscles, la lactate déshydrogénase musculaire est très peu active ou totalement absente^{4,5}. Il serait donc possible que, chez ces invertébrés, le pyruvate provenant de la glycolyse assure, principalement avec l'arginine libérée de la phosphoarginine et grâce à l'octopine déshydrogénase, la formation de l'octopine, la synthèse de l'acide lactique devenant tout à fait secondaire. L'octopine déshydrogénase jouerait le rôle de la lactate déshydrogénase dans le métabolisme de l'acide pyruvique.

D'autres travaux ont mis en évidence, dans les tissus végétaux cancéreux, l'existence de l'octopine déshydrogénase^{6,7} et d'un enzyme catalysant le même type de réaction avec la lysine ou l'ornithine et le pyruvate, produisant respectivement la

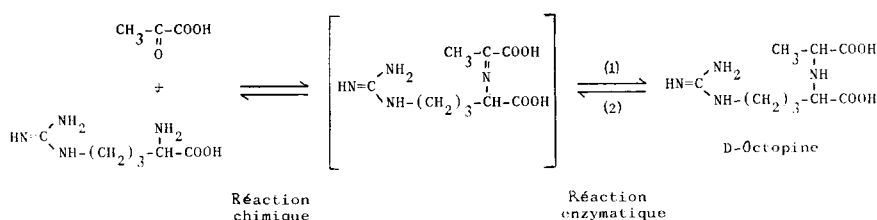


Fig. 1. Réaction catalysée par l'octopine déshydrogénase.

lysopine et l'acide octopinique⁶⁻⁸. On pourrait en rapprocher aussi la formation enzymatique de saccharopine, formée par condensation de la lysine (par son groupement ε -NH₂) avec l' α -cétooglutarate dans les tissus animaux^{9,10} ou chez les micro-organismes¹¹. Cette réaction pourrait, d'après les auteurs, jouer un certain rôle dans le métabolisme de la lysine.

L'octopine déshydrogénase semble donc faire partie d'un nouveau groupe de déshydrogénases, toutes caractérisées par le même type de substrat, une base de Schiff, et conduisant toutes au blocage d'un produit essentiel de métabolisme, le pyruvate ou l' α -cétooglutarate.

Il nous a semblé intéressant d'approfondir le mécanisme d'action de l'octopine déshydrogénase et, éventuellement, de la comparer avec les autres déshydrogénases du même type. Nous avons donc entrepris sa purification à partir des muscles de *Pecten maximus* L. et abordé l'étude de la réaction enzymatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits utilisés

Les acides gras ou aminés ou α -cétoniques et les chélateurs sont des produits commerciaux, recristallisés au besoin.

Le guanidinobutane et l'acide δ -guanidinovalérique sont préparés par amidination de l'amine ou de l'acide δ -aminé correspondant au moyen de la S-méthylisothiourée¹².

L'octopine a été synthétisée par la méthode de IZUMIYA *et al.*¹³.

NAD⁺ et NADH (Calbiochem, grade A) sont utilisés tels quels. Leur concentration est déterminée d'après leur coefficient d'extinction molaire respectif: $18 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 260 m μ pour NAD⁺ et $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 340 m μ pour NADH.

Les gels de Sephadex G-100 et de DEAE-Sephadex A-50 sont préparés et régénérés d'après les indications du fabricant (Pharmacia, Uppsala). Le gel de phosphate de calcium est préparé d'après TISELIUS *et al.*¹⁴.

Mesure de l'activité enzymatique

Celle-ci est déterminée spectrophotométriquement d'après l'apparition ou la disparition de NADH, suivant le sens de la réaction.

Les mesures sont effectuées à 33° et à 340 m μ , au spectrophotomètre Unicam SP 800, avec un enregistreur Electro-synthèse P-62 permettant d'apprécier les variations d'absorbance à 0.001 unité près. Les variations sont linéaires pendant au moins 1 min d'enregistrement.

L'enzyme est ajouté au milieu réactionnel, préincubé pendant 5 min à 33° et dont la composition est la suivante: octopine $6 \cdot 10^{-3}$ M, NAD^+ $1 \cdot 10^{-3}$ M, tampon glycine-soude 0.1 M et pH 9.8 pour la Réaction 2; L-arginine $4 \cdot 10^{-3}$ M, pyruvate de sodium $4 \cdot 10^{-3}$ M, NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, tampon phosphate 0.1 M et pH 6.6 pour la Réaction 1.

Dans les expériences d'inhibition par les analogues de substrat ou par les chélateurs, le produit est ajouté au milieu réactionnel avant la préincubation.

L'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de mesure adoptées, provoque l'apparition ou la disparition d'1 μ mole de NADH en 1 min.

Mesure des protéines

Celles-ci sont évaluées spectrophotométriquement d'après les absorbances mesurées à 280 et 260 m μ , suivant la formule de Warburg et Christian¹⁵.

Ultracentrifugation

Elle a été réalisée au laboratoire de Mme Filitti-Wurmser.

Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide

Nous avons utilisé l'appareil "Poly-Prep" de Buchler et la technique décrite par ORNSTEIN ET DAVIS^{16,17} et JOVIN *et al.*¹⁸.

La migration des protéines vers l'anode s'effectue dans un système discontinu de tampons alcalins, le tampon supérieur étant Tris-glycine 0.052 M (pH 8.9), le tampon inférieur et celui d'élution Tris-HCl 0.1 M (pH 8.1).

À titre d'exemple: pour 57 mg de protéines, nous avons utilisé 60 ml de gel de résolution (7.5% d'acrylamide) polymérisé chimiquement et 12 ml de gel de concentration (2.5% d'acrylamide) photopolymérisé. La protéine est dissoute dans 9 ml de tampon Tris-phosphate 0.059 M (pH 7.2) contenant dithiothréitol 0.1 mM, sucrose 3% et 0.1 ml de bleu de bromophénol 0.01%. Un courant de 50 mA sous tension de 250 V a été appliqué. L'appareil d'électrophorèse a été relié à un collecteur de fractions permettant de recueillir des fractions de 3 ml. L'élution s'effectuait à la vitesse de 0.6 ml/min. L'enzyme est apparu 60 min après la sortie du bleu de bromophénol.

Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide

Nous avons utilisé l'appareil Acrylophor (Pleuger, Wijnegem, Belgique) et la méthode, légèrement modifiée, d'ORNSTEIN ET DAVIS^{16,17}, adaptée par REISFELD *et al.*¹⁹.

L'électrophorèse s'effectue sur des colonnes de gel de polyacrylamide de 0.6 cm de diamètre et 3.5 cm de longueur. La colonne de gel est composée de deux couches superposées: l'inférieure consiste en 0.85 ml de gel de résolution et la supérieure en 0.15 ml de gel de concentration dont la composition est celle utilisée pour l'électrophorèse préparative.

L'échantillon de protéine de 5–50 μ g contenant du sucrose 5–10% est déposé au sommet du tube ainsi qu'une goutte de solution de bleu de bromophénol 0.001%. Le système de tampons discontinu est également celui de l'électrophorèse préparative. Un courant d'environ 3 mA par tube, sous une tension de 80 V, est appliqué pendant 1 h.

Après la migration, les colonnes de gel sont placées pendant 30 min dans le bain de coloration composé de 6 g d'Amidoschwarz par l d'acide acétique 7%. La décoloration s'opère également par électrophorèse dans l'acide acétique 7% avec un courant de 7 mA par tube et sous tension de 80 V.

Purification de l'octopine déshydrogénase

A. *Extrait brut.* Les muscles adducteurs de *Pecten* sont disséqués, lavés à l'eau distillée et congelés à -20° . Ils peuvent être gardés ainsi plusieurs mois. Ils sont ensuite coupés en morceaux et homogénéisés avec de l'eau distillée glacée, par portions de 700 g de muscles dans 3 fois leur poids d'eau. Après une agitation de 30 min à 4° , la suspension est centrifugée 30 min à $27\,700 \times g$. Le surnageant est gardé et le résidu musculaire réextrait avec 1 fois 1/2 son poids d'eau distillée à 4° pendant 30 min. Après une centrifugation de 30 min à $27\,700 \times g$, le surnageant réuni au premier extrait constitue l'extrait brut. Toutes les opérations ultérieures sont conduites à 4° .

B. *Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.* L'extrait brut est additionné à froid de 288 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé par l de solution et ajusté à pH 7.5. Après 30 min d'agitation, le précipité formé est éliminé par centrifugation de 30 min à $16\,300 \times g$. Le surnageant est ensuite additionné de la même façon de 237 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cristallisé par l de solution. Après une nuit à 4° , le précipité est recueilli par centrifugation à $16\,300 \times g$, puis dissous dans du tampon phosphate $5 \cdot 10^{-3}$ M, EDTA $1 \cdot 10^{-4}$ M (pH 6), à raison de 150 ml pour 700 g de muscles traités. Ceci constitue la Fraction B.

C. La Solution B est dialysée 20 h contre 16 l du même tampon. L'abondant précipité blanchâtre est éliminé par centrifugation pendant 5 h à $75\,000 \times g$. Le surnageant constitue la Fraction C.

D. *Traitement par le gel de phosphate de calcium.* La Fraction C est ajustée à pH 7.0 avec NH_4OH diluée et traitée par une quantité de gel de TISELIUS *et al.*¹⁴ correspondant à 5 fois le poids de protéines. L'enzyme n'est pas adsorbé. Après centrifugation à $16\,300 \times g$, le surnageant est réservé et le gel lavé une fois avec le tampon phosphate $5 \cdot 10^{-3}$ M (pH 7). Les surnageants réunis constituent la Fraction D, qui est ensuite précipitée par 600 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l de solution et additionnée de dithiothréitol à une concentration finale de $1 \cdot 10^{-5}$ M.

À ce stade et sous forme de suspension en solution concentrée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, l'enzyme est suffisamment stable pour être conservé à 4° et accumulé en attendant d'être soumis aux opérations ultérieures de purification.

E. *Chromatographie sur DEAE-Sephadex.* La Fraction D résultant de 4 traitements successifs de 700 g de muscles congelés est centrifugée. Le précipité est dissous dans 160 ml de tampon Tris-HCl $2 \cdot 10^{-2}$ M, arginine $1 \cdot 10^{-3}$ M, EDTA $1 \cdot 10^{-4}$ M et dithiothréitol $1 \cdot 10^{-5}$ M (pH 7.5), contenant NaCl $5 \cdot 10^{-2}$ M. L'enzyme est ensuite dialysé une nuit contre le même tampon. Après la dialyse, la solution contenant 6230 mg de protéines est amenée à environ 18 mg de protéines par ml. Elle est partagée en 2 portions de 174 ml chacune, qui sont filtrées simultanément sur deux colonnes (62 cm \times 3.2 cm) de DEAE-Sephadex, préalablement équilibrées avec le même tampon. Les colonnes sont développées par 260 ml du même tampon et lavées avec 3 fois leur volume de ce tampon additionné de NaCl $1 \cdot 10^{-1}$ M. Une grande quantité de protéines inactives est ainsi éliminée. L'enzyme est ensuite élué à la

vitesse de 60 ml/h par le même tampon, additionné de NaCl $1.8 \cdot 10^{-1}$ M. Les fractions ayant une activité spécifique supérieure à 300 sont réunies et concentrées par dialyse contre une solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ renfermant EDTA $1 \cdot 10^{-4}$ M, dithiothréitol $1 \cdot 10^{-5}$ M et arginine $1 \cdot 10^{-3}$ M (pH 7).

F. *Chromatographie sur Sephadex G-100*. La Fraction E est centrifugée et le précipité dissous dans 7.5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 0.1 M, arginine $1 \cdot 10^{-3}$ M, EDTA $1 \cdot 10^{-4}$ M, dithiothréitol $1 \cdot 10^{-5}$ M (pH 7.5). La solution est filtrée sur une colonne (86 cm \times 2.8 cm) de Sephadex G-100, préalablement équilibrée avec le même tampon. Le filtrat est recueilli par portions de 5 ml à raison de 30 ml/h. Les fractions ayant une activité spécifique d'environ 900 sont réunies. On ajoute à la solution NAD^+ $5 \cdot 10^{-3}$ M et on précipite par 600 mg/ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

RÉSULTATS

Purification de l'enzyme

Le Tableau I rend compte des différentes étapes de la purification et de son rendement. À partir de 2800 g de muscles de Pecten on peut obtenir environ 50 mg d'enzyme pratiquement pur.

TABLEAU I

PURIFICATION DE L'OCTOPINE DÉSHYDROGÉNASE DE *P. maximus*

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité enzymatique		Rendement (%)
		Unités enzyma- tiques totales	Unités enzyma- tiques par mg	
A. Extrait brut		386 100		100
B. Fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	37 050	364 000	10.2	94.5
C. Dialyse et centrifugation prolongée	11 160	318 000	28.5	82.5
D. Gel de phosphate de calcium	6 250	268 000	43	70
E. DEAE-Sephadex	490	183 500	375	47.5
F. Sephadex G-100	50	45 500	910	12

L'analyse à l'aide de l'ultracentrifugation, effectuée sur la Fraction F utilisée à la concentration de 10 ng/ml, permet de constater l'homogénéité de la protéine (Fig. 2).

Au contraire, l'électrophorèse analytique de la même fraction (Fig. 3B) montre la présence d'une trace d'impureté à côté d'une bande protéique principale. L'impureté est éliminée après électrophorèse préparative dans l'appareil Poly-Prep de Buchler (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES) et on obtient une fraction enzymatique d'activité spécifique = 1000 (Fig. 3C).

Recherche d'un cofacteur métallique éventuel

Un certain nombre de déshydrogénases contiennent du zinc qui joue un rôle à la fois catalytique et structural (alcool déshydrogénases de levure et de foie de cheval,

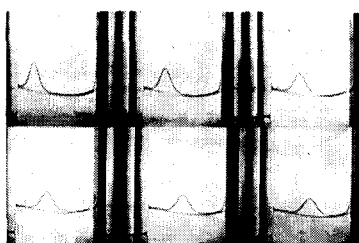


Fig. 2. Ultracentrifugation analytique de l'octopine déshydrogénase purifiée. Tampon phosphate 0.1 M (pH 7.4); protéines: 10 mg/ml; vitesse de régime: 59 780 tours/min; température: 4°; prises de vue après 96, 128, 160, 176, 192 et 200 min.

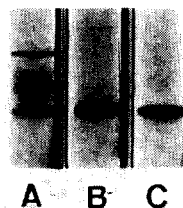


Fig. 3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'octopine déshydrogénase (0.020 mg de protéines) (A) après DEAE-Sephadex; (B) après Sephadex G-100; (C) après électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide.

glutamodéshydrogénase). Nous avons donc entrepris la recherche d'un cofacteur métallique éventuel dans l'octopine déshydrogénase.

Nous avons d'abord essayé l'action inhibitrice de différents chélateurs de métaux. Comme l'indique le Tableau II, l'action de ces corps, même à des concentrations relativement élevées, est assez faible. Les inhibitions les plus nettes ont été obtenues avec le zincon, le diéthylthiocarbamate de sodium et le NaN_3 .

Les essais d'inactivation par dialyse contre l'*o*-phénanthroline $2 \cdot 10^{-3}$ M ou le diéthylthiocarbamate de sodium $1 \cdot 10^{-3}$ M n'ont pas donné de résultats.

TABEAU II

INHIBITION INSTANTANÉE DE L'OCTOPINE DÉSHYDROGÉNASE PAR DES CHÉLATEURS

Inhibiteurs	Concn. (M)	Inhibition (%)
α, α' -Dipyridyl	$2.5 \cdot 10^{-2}$	10
EDTA	$8 \cdot 10^{-2}$	7.5
	$1.6 \cdot 10^{-1}$	19
<i>o</i> -Phénanthroline	$5 \cdot 10^{-3}$	8
	$9 \cdot 10^{-3}$	19
Zincon	$5 \cdot 10^{-4}$	30
Diéthylthiocarbamate	$1 \cdot 10^{-2}$	10
	$2 \cdot 10^{-2}$	22
	$3 \cdot 10^{-2}$	47
NaN_3	$2 \cdot 10^{-1}$	33
	$4 \cdot 10^{-1}$	58
	$8 \cdot 10^{-1}$	86

Une analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique effectuée sur l'enzyme pur n'a pas permis de trouver des quantités appréciables de Zn^{2+} , de Cu^{2+} ou de Fe^{2+} . Des traces seulement de ces métaux ont pu être décelées.

Détermination des constantes de Michaelis

Dans la réaction de déshydrogénation (Réaction 2), les courbes de saturation de l'enzyme par l'octopine (Fig. 4A) ou par NAD^+ (Fig. 4B) ont fourni pour valeurs respectives de K_m $1.5 \cdot 10^{-3}$ M dans le premier cas et $1.5 \cdot 10^{-4}$ M dans le second.

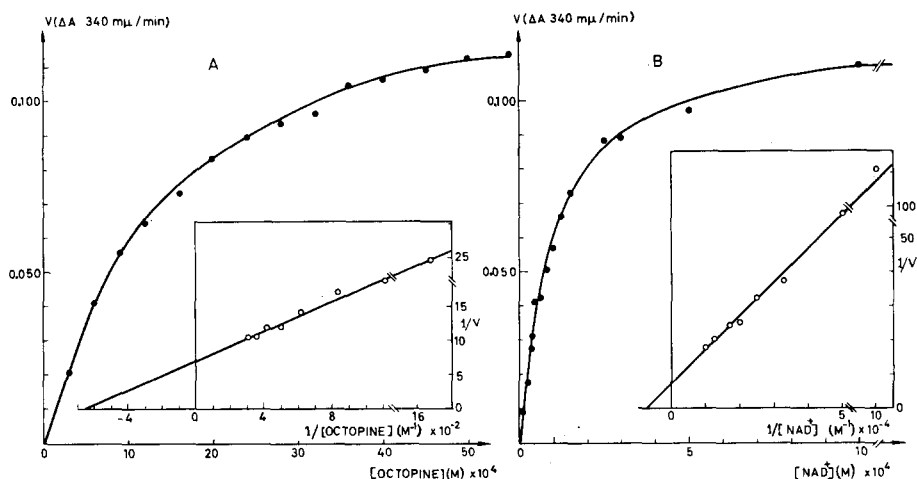


Fig. 4. Déterminations de K_m pour la Réaction 2. (A) Concentrations croissantes d'octopine. (B) Concentrations croissantes de NAD^+ .

Dans la réaction d'hydrogénation (Réaction 1), le véritable substrat étant le produit de condensation de L-arginine et de pyruvate³, la représentation graphique de la saturation de l'enzyme par leurs mélanges équimoléculaires donne des courbes sigmoïdes (Fig. 5), expression d'une réaction bimoléculaire.

Les courbes n'affectent le type michaelien que lorsqu'elles sont tracées en fonction des quantités croissantes de l'un des constituants du mélange arginine *plus* pyruvate en présence d'une concentration saturante de l'autre ($4 \cdot 10^{-3}$ M). Les

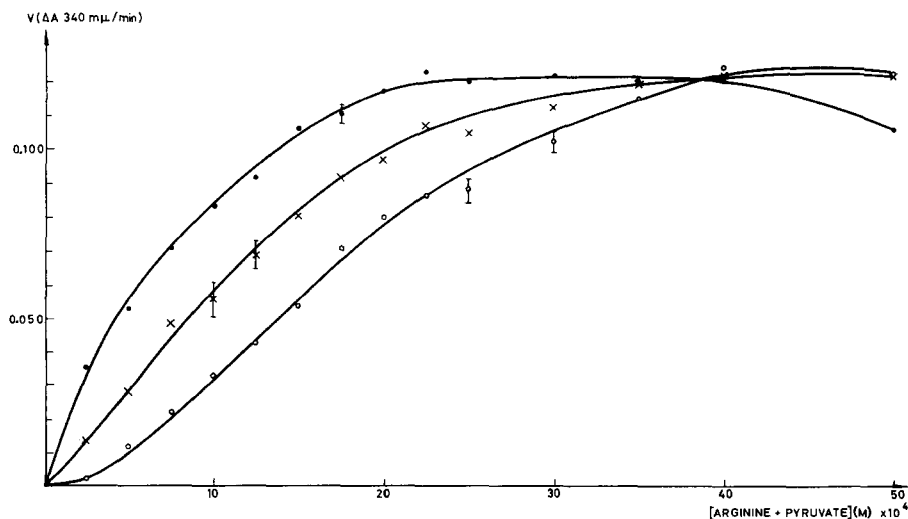


Fig. 5. Courbe de saturation de l'octopine déshydrogénase par des mélanges équimoléculaires arginine *plus* pyruvate (○—○); les mêmes mélanges en présence de l'arginine $2 \cdot 10^{-3}$ M (×—×) et en présence de l'arginine $6 \cdot 10^{-3}$ M (●—●).

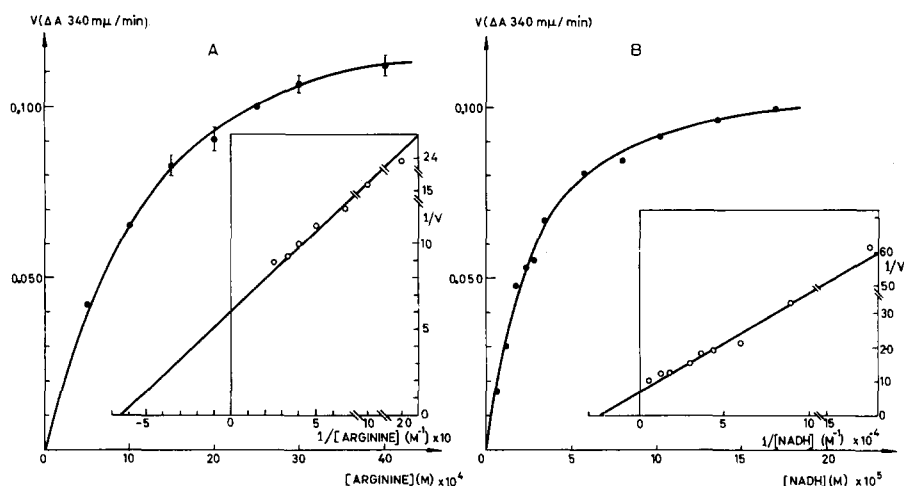


Fig. 6. Détermination de K_m pour la Réaction 1. (A) Concentrations croissantes en substrat. (B) Concentrations croissantes en NADH.

valeurs du K_m calculées sont respectivement de $1.5 \cdot 10^{-3}$ M pour le substrat (Fig. 6A) et de $4 \cdot 10^{-5}$ M pour NADH (Fig. 6B).

Effets des analogues de substrat

Pour préciser la nature des interactions enzyme-substrat, nous avons étudié l'action sur l'enzyme d'un certain nombre d'analogues de substrat, possédant une ou plusieurs fonctions caractéristiques de ce dernier: groupements guanidique, carboxylique et aminé, seuls ou associés. Le Tableau III montre l'effet inhibiteur des composés utilisés.

Nous avons voulu ensuite préciser le type de ces inhibitions. La Fig. 7 montre

TABLEAU III

INHIBITION (%) DE L'OCTOPINE DÉSHYDROGÉNASE PAR DIFFÉRENTS ANALOGUES DE SUBSTRAT

Inhibiteurs	Concentration (M)					
	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$
A. Réaction de déshydrogénation						
Acide δ -guanidinovalérique		71	92			
Acide γ -guanidinobutyrique		33	71	85		
L-Arginine		28	68	81		
D-Arginine			16		56	66
Homoarginine			15		48	61
Agmatine			14		37	45
Guanidinobutane			20		62	85
Acide aminovalérique					29	47
B. Réaction de formation d'octopine						
Acide δ -guanidinovalérique	59		100			
Octopine		27	48*			
Guanidinobutane					55	70
Acide aminovalérique					35	65

* Pour $2 \cdot 10^{-3}$ M.

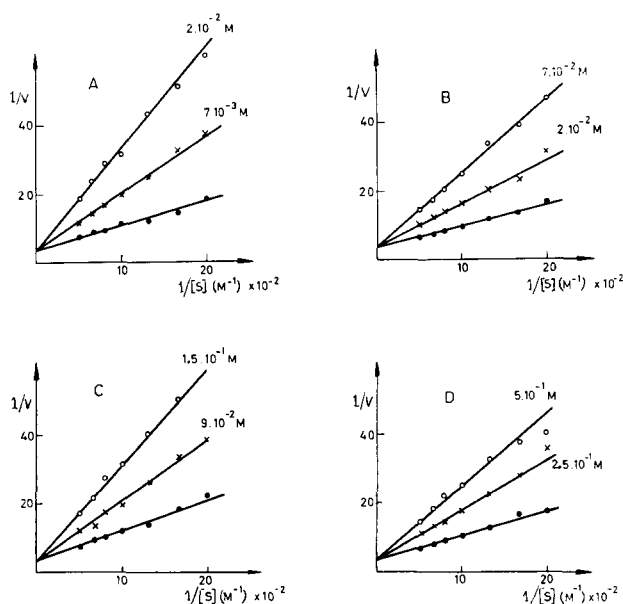


Fig. 7. Inhibitions compétitives par les analogues de substrat, dans la Réaction 2. (A) Guanidinobutane $7 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-2}$ M. (B) Agmatine $2 \cdot 10^{-2}$ et $7 \cdot 10^{-2}$ M. (C) Acide valérique $9 \cdot 10^{-2}$ et $1.5 \cdot 10^{-1}$ M. (D) Acide γ -aminobutyrique $2.5 \cdot 10^{-1}$ et $5 \cdot 10^{-1}$ M. Substrat: octopine.

que dans la Réaction 2 l'inhibition exercée par le guanidinobutane, l'agmatine, l'acide valérique et l'acide γ -aminobutyrique est compétitive. Celle produite par l'acide δ -aminovalérique et par l'arginine est non-compétitive (Fig. 8). L'action de l'acide δ -guanidinovalérique est plus complexe: la Fig. 8 montre qu'avec l'augmentation de la concentration en inhibiteur, la v_{\max} diminue, mais la K_m diminue également.

Dans la Réaction 1 (Fig. 9), les inhibitions sont compétitives, qu'il s'agisse du guanidinobutane, des acides valérique et δ -guanidinovalérique, ou encore de l'octopine qui peut être considérée, dans ce sens-ci, comme l'analogue hydrogéné de substrat. Les résultats sont les mêmes, que l'on fasse varier l'un ou l'autre des composants du mélange arginine *plus* pyruvate, l'autre étant maintenu à concentration saturante.

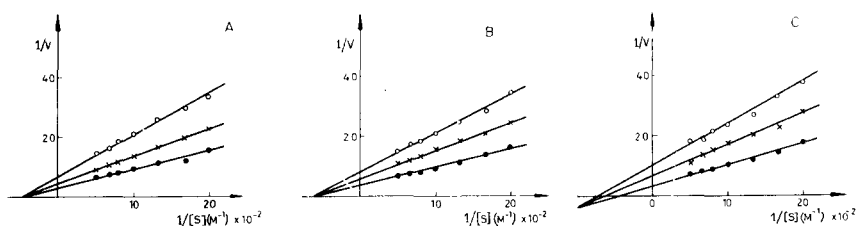


Fig. 8. Inhibitions non compétitives par les analogues de substrat, dans la Réaction 2. (A) Acide δ -aminovalérique $3 \cdot 10^{-2}$ et $1 \cdot 10^{-1}$ M. (B) L-Arginine $9 \cdot 10^{-4}$ et $2 \cdot 10^{-3}$ M. (C) Acide δ -guanidinovalérique $1.5 \cdot 10^{-4}$ et $4 \cdot 10^{-4}$ M. Substrat: octopine.

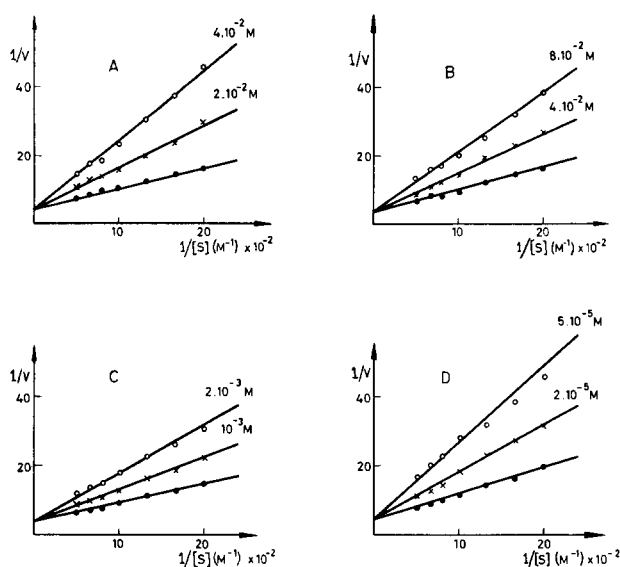


Fig. 9. Inhibitions compétitives par les analogues de substrat, dans la Réaction 1. (A) Guanidinobutane $2 \cdot 10^{-2}$ et $4 \cdot 10^{-2}$ M. (B) Acide valérique $4 \cdot 10^{-2}$ et $8 \cdot 10^{-2}$ M. (C) Octopine $1 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-3}$ M. (D) Acide δ -guanidinovalérique $2 \cdot 10^{-5}$ et $5 \cdot 10^{-5}$ M. Substrat: arginine plus pyruvate.

DISCUSSION

La méthode de purification décrite plus haut permet d'obtenir des préparations enzymatiques homogènes à l'ultracentrifugation analytique et à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'activité spécifique du produit final est très élevée.

L'octopine déshydrogénase ne semble pas contenir de métal. Elle ressemble en cela à la plupart des déshydrogénases lactiques et diffère des autres déshydrogénases telles que les alcool déshydrogénases de levure et de foie de cheval, et la glutamodéshydrogénase, qui contiennent du Zn^{2+} , ce métal jouant un rôle à la fois structural et catalytique.

Les effets inhibiteurs, d'ailleurs peu importants, qu'exercent certains chélateurs sur l'octopine déshydrogénase sont comparables à ceux signalés par VESTLING *et al.*²⁰ sur la lactate déshydrogénase de foie de rat. Ils pourraient être dus aux interactions d'une autre nature que la formation des complexes métalliques.

Dans l'étude cinétique de la réaction de formation de l'octopine (Réaction 1), la forme sigmoïde de la courbe de vitesse en fonction des quantités équimoléculaires croissantes d'arginine et de pyruvate reflète la superposition de deux réactions³, l'une chimique: la condensation spontanée de l'acide α -aminé et de l'oxoacide, l'autre enzymatique: la réduction de la base de Schiff à l'aide de NADH. En favorisant la formation du produit de condensation par l'emploi à concentration saturante de l'un des constituants de la réaction, on obtient à nouveau les courbes michaeliennes classiques.

La possibilité que l'octopine déshydrogénase soit un enzyme allostérique a été écartée du fait que les différents analogues des substrats et du coenzyme, comme le

changement du pH de la réaction, ne modifiaient guère la cinétique de celle-ci. Cet enzyme de petit poids moléculaire (environ 50 000) n'est d'ailleurs pas dissociable en sous-unités (travaux non publiés).

L'étude de l'inhibition par les analogues de substrats semble montrer qu'il existe sur l'enzyme au moins deux sites impliqués dans la fixation du substrat: l'un réagissant avec le groupement guanidique du substrat, l'autre avec l'un des carboxyles de ce dernier. En effet, dans la Réaction 1, l'inhibition exercée par les analogues de substrat est compétitive, qu'ils possèdent seulement un groupement guanidique (guanidinobutane) ou un groupement carboxylique (acide valérique) ou les deux associés (acide δ -guanidinovalérique, octopine).

L'inhibition est du même type, que l'on fasse varier l'un ou l'autre des composants du mélange arginine *plus* pyruvate, l'autre étant maintenu à concentration saturante.

Dans la Réaction 2, le guanidinobutane et l'acide valérique sont des inhibiteurs compétitifs. Par contre, les composés: arginine, acides δ -amino- et δ -guanidinovalérique, bien que possédant à la fois un groupe basique et un groupe acide séparés par une longueur de chaîne adéquate et, par conséquent, capables de bloquer sur l'enzyme les deux sites de fixation correspondants, ne sont pas des inhibiteurs compétitifs.

Il est possible que les complexes binaires octopine déshydrogénase-NAD⁺ et octopine déshydrogénase-NADH, de conformation moléculaire sans doute différente, réagissent de façons diverses aux mêmes analogues de substrat. L'étude actuellement en cours, de spectrophotométrie différentielle des complexes binaires et ternaires, doit apporter d'autres précisions à ce sujet.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur F. Rousselet (du Laboratoire du Professeur M. Girard, Faculté de Pharmacie de Paris) pour l'analyse des métaux.

Ce travail a été réalisé avec l'aide technique de Madame F. Lefebure et grâce, en partie, au crédit du Centre National de la Recherche Scientifique (G.R. No. 6).

RÉSUMÉ

1. L'octopine déshydrogénase, enzyme à NAD⁺, qui catalyse la déshydrogénation de l'octopine en arginine *plus* pyruvate, a été purifiée à partir des muscles de *Pecten maximus*. L'enzyme est homogène à l'ultracentrifugation analytique et à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2. L'enzyme ne renferme pas de cofacteur métallique du type Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺.

3. Les constantes de Michaelis sont de $1.5 \cdot 10^{-3}$ M pour l'octopine, l'arginine et le pyruvate, $1.5 \cdot 10^{-4}$ M pour NAD⁺ et $4 \cdot 10^{-5}$ M pour NADH.

4. Les composés chimiques possédant un groupement guanidique (guanidinobutane) ou carboxylique (acide valérique) ou les deux fonctions associées (acide δ -guanidinovalérique) sont inhibiteurs compétitifs dans la réaction de formation de l'octopine. Dans la déshydrogénation de celle-ci, les analogues de substrat possédant une seule des fonctions précédentes sont inhibiteurs compétitifs; au contraire, ceux des produits renfermant à la fois les deux groupements guanidique et carboxylique ne sont pas inhibiteurs compétitifs.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1959) 446.
- 2 N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 735.
- 3 N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 221.
- 4 Y. ROBIN ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 233.
- 5 F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1969, sous presse.
- 6 A. MENAGE ET G. MOREL, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 4795.
- 7 B. LEJEUNE, *Compt. Rend.*, 265 (1967) 1753.
- 8 B. LEJEUNE ET M. F. JUBIER, *Compt. Rend.*, 266 (1968) 1189.
- 9 J. HUTZLER ET J. DANCIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 158 (1968) 62.
- 10 K. HIGASHINO, K. TSUKADA ET I. LIEBERMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20 (1965) 285.
- 11 P. P. SAUNDERS ET H. P. BROQUIST, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3435.
- 12 E. SCHUTTE, *Z. Physiol. Chem.*, 279 (1943) 52.
- 13 N. IZUMIYA, R. WADE, M. WINITZ, M. C. OTEY, S. M. BIRNBAUM, R. J. KOEGEL ET J. P. GREENSTEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 652.
- 14 A. TISELIUS, S. HJERTÉN ET Ö. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- 15 E. LAYNE, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1955, p. 451.
- 16 L. ORNSTEIN ET B. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.
- 17 L. ORNSTEIN ET B. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 404.
- 18 T. JOVIN, A. CHRAMBACH ET M. NAUGHTON, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 351.
- 19 R. A. REISFELD, U. J. LEWIS ET D. E. WILLIAMS, *Nature*, 195 (1962) 281.
- 20 C. S. VESTLING, W. T. HSIEH, H. TERAYAMA ET J. N. BAPTIST, *Acta Chem. Scand.*, 17 (1963) S 23.

Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 46-57