

Remerciements

Je tiens à remercier le docteur Claude Godin pour la peine qu'il s'est donnée et les encouragements prodigués tout au long de ce travail.

Je remercie aussi les docteurs W.G. Martin et Henry Schneider du Conseil National des Recherches pour leurs précieux conseils et l'utilisation de leurs laboratoires.

Une partie de ce travail n'aurait pu être accomplie sans l'aide technique de M.J.W.L.C. Christ et je désire l'en remercier.

Je veux enfin remercier tous les membres du Département de Biologie pour leur bienveillance et leur collaboration et spécialement Mme Liette LaRose qui a dactylographié le manuscrit.

Les bourses qui m'ont été données par le Gouvernement du Québec m'ont aussi été d'une aide très précieuse.

TABLE DES MATIERES

	Page
Remerciements.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Abréviations.....	xii
Résumé.....	xiv
Abstract.....	xv
INTRODUCTION.....	1
I. Considérations générales sur la structure des protéines.....	1
A. Degré d'organisation.....	1
B. Mécanisme d'interaction des sousunités.....	3
1) Géométrie de l'association.....	3
2) Structure quaternaire & allostérie.....	6
II. Organisation structurale de la glutamique déshydro- génase.....	7
a) Nomenclature.....	7
b) Sources.....	7
c) Activité enzymatique.....	8
d) Relation entre la structure et l'activité en- zymatique de la GDH du foie de boeuf.....	9

	Page
e) Problèmes relatifs à l'explication du comportement de la GDH au moyen du modèle de Monod.....	12
f) Considérations sur les méthodes d'analyse....	14
METHODES EXPERIMENTALES.....	16
I. Propriétés de l'enzyme naturelle.....	16
A. Détermination de l'activité enzymatique.....	16
B. Détermination du poids moléculaire par fil- tration sur gel	19
1. À l'aide du Sephadex G-200.....	19
a) Préparation de la colonne.....	19
b) Standardisation.....	20
2. A l'aide du Sepharose 4B.....	22
a) Préparation de la colonne.....	22
b) Standardisation.....	23
C. Ultracentrifugation.....	24
1. Préparation de la solution.....	24
2. Concentration de GDH.....	24
3. Ultracentrifugation.....	24
D. Chromatographie sur DEAE cellulose.....	25
1. Préparation de la cellulose.....	25
2. Filtration de la GDH sur Sephadex G-25	26

3.	Chromatographie sur DEAE cellulose.....	27
E.	Electrophorèse sur acétate de cellulose...	28
II.	Stabilité de l'enzyme.....	30
III.	Dissociation de la glutamique déshydrogénase en sousunités.....	31
1.	Dénaturation.....	32
2.	Réduction des liens sulfhydryls.....	33
3.	S-carboxyméthylation.....	33
IV.	Caractérisation des sousunités.....	35
1.	Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.....	35
2.	Electrophorèse des sousunités.....	37
3.	Détermination de l'acide aminé N-terminal de la GDH.....	38
A.	Analyse qualitative des dinitrophénylamino- acides.....	39
i)	Hydrolyse.....	39
ii)	Extraction.....	39
iii)	Chromatographie des dérivés éthéroso- lubles.....	40
iv)	Chromatographie des dérivés hydrosolu- bles.....	41

B. Analyse quantitative de la DNP-alanine....	42
1. DNP-DL-alanine-1- ¹⁴ C.....	42
i) Synthèse.....	42
ii) Pureté.....	43
a) Electrophorèse.....	43
b) Chromatographie sur cellulose.....	44
c) Concentration.....	44
2) Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-GDH.....	45
3) Chromatographie de la DNP-alanine.....	46
4) Elution et dosage des taches.....	46
5) Détermination de la radioactivité.....	47
V. Succinylation de la GDH.....	48
1) Succinylation.....	48
2) Propriétés de l'enzyme succinylée.....	50
a) Activité enzymatique.....	50
b) Ultracentrifugation.....	51
c) Electrophorèse.....	51
d) Filtration sur gel Sepharose 4B.....	52
RESULTATS.....	53
I. Propriétés de la GDH.....	53

A.	Poids moléculaire.....	53
1)	Sur Sephadex G-200.....	53
2)	Sur Sepharose 4B.....	59
3)	Ultracentrifugation.....	66
a)	Vitesse de sédimentation.....	66
b)	Coefficient de friction.....	67
c)	Coefficient de diffusion.....	71
d)	Calcul du poids moléculaire.....	71
B.	Chromatographie sur DEAE cellulose.....	72
C.	Electrophorèse sur acétate de cellulose...	72
II.	Stabilité de l'enzyme.....	75
III.	Dissociation de la glutamique déshydrogénase en sousunités.....	80
1)	Carboxyméthylation.....	80
2)	Mercuribenzoylation.....	83
IV.	Caractérisation des sousunités.....	84
1)	Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.....	84
2)	Electrophorèse des sousunités.....	88
3)	Détermination de l'acide aminé en position N-terminale de la GDH.....	91
A.	Analyse qualitative des dinitrophénylamino- acides.....	91

i) Chromatographie des dérivés éthéro-	
solubles.....	91
ii) Chromatographie des dérivés hydrosol-	
ubles.....	92
B. Analyse quantitative de la DNP-alanine...	95
a) DNP-DL-alanine-1- ¹⁴ C.....	95
i) Electrophorèse.....	95
ii) Chromatographie sur cellulose....	95
iii) Concentration.....	98
b) Détermination du pourcentage d'humid-	
ité dans la DNP-GDH.....	98
c) Elution et dosage des taches.....	102
i) Courbe étalon de "quenching".....	102
ii) Radioactivité spécifique de la DNP-	
DL-alanine-1- ¹⁴ C.....	102
d) Calcul de la concentration de DNP-ala-	
terminal.....	102
e) Calcul du poids moléculaire des sous-	
unités.....	106
V. Propriétés de l'enzyme succinylée.....	108
1) Densité optique.....	108

2) Activité enzymatique.....	109
3) Vitesse de sédimentation.....	109
4) Electrophorèse.....	109
5) Filtration sur gel Sepharose 4B.....	113
DISCUSSION.....	114
I. Propriétés de la GDH.....	114
A. Poids moléculaire.....	114
1) Sur Sephadex G-200.....	114
2) Sur Sepharose 4B.....	115
3) Ultracentrifugation.....	117
4) Calcul du poids moléculaire.....	117
B. Homogénéité de la GDH.....	118
II. Stabilité de la GDH.....	119
III. Dissociation de la GDH en sousunités.....	121
IV. Caractérisation des sousunités de la GDH.....	123
A. Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.....	123
B. Détermination de l'acide aminé en posi- tion N-terminale de la GDH.....	124
1) Analyse qualitative des dinitrophényla- minoacides.....	124

	Page
2) Analyse quantitative de la DNP-alanine N-terminale.....	125
V. Propriétés de la GDH succinylée.....	131
A. Coefficient d'extinction.....	131
B. Vitesse de sédimentation.....	132
C. Rayon Stokes de la GDH succinylée.....	133
CONCLUSION.....	136
REFERENCES.....	139

LISTE DES FIGURES

x

Page

1.	Détermination du poids moléculaire des protéines sur Sephadex G-200.....	55
2.	Détermination du rayon Stokes "a" des protéines sur Sephadex G-200.....	57
3.	Filtration de la GDHase sur Sepharose 4B.....	61
4.	Détermination du rayon Stokes "a" des protéines sur Sepharose 4B.....	64
5.	Ultracentrifugation de la GDH naturelle.....	69
6.	Vitesse de sédimentation de la GDH.....	70
7.	Chromatographie de la GDH sur DEAE cellulose.....	73
8.	Chromatographie de la GDH sur DEAE cellulose.....	74
9.	Electrophorèse de la GDH sur acétate de cellulose...	76
10.	Activité de la GDH dans le phosphate à pH 7.6.....	77
11.	Activité de la GDH dans le phosphate à pH 7.6 et 25°C	79
12.	Activité de la GDH en fonction de la période d'incubation à 25°C.....	81
13.	Activité de la GDH en fonction de la période d'incubation à 25°C.....	82
14.	Détermination du poids moléculaire des protéines sur Sephadex G-200 en présence de détergent (SDS).....	86
15.	Détermination du rayon Stokes "a" sur Sephadex G-200	87
16.	Electrophorèse de la CM-GDH sur acétate de cellulose	90

17.	Chromatographie bidimensionnelle de la fraction éthérosoluble de l'hydrolysat de DNP-GDH.....	90a
18.	Cochromatographie de la fraction éthérosoluble de l'hydrolysat de DNP-GDH et d'échantillons connus.....	94
19.	Electrophorèse de la DNP-DL-ala-1- ¹⁴ C à pH 2.....	96
20.	Chromatographie de la DNP-DL-ala-1- ¹⁴ C sur cellulose.	99
21.	Courbe étalon de DNP-alanine.....	100
22.	Courbe étalon de "quenching".....	104
23.	Ultracentrifugation de la GDH succinylée.....	110
24.	Vitesse de sédimentation de la GDH succinylée.....	111

LISTE DES TABLEAUX

Page

1.	Volume d'élution des protéines sur Sephadex G-200.....	54
2.	Rayon moyen des pores du Sephadex G-200.....	60
3.	Volume d'élution des protéines sur Sepharose 4B.....	60
4.	Résumé des mesures du poids moléculaire de la GDH.....	63
5.	Volume d'élution des protéines sur Sepharose 4B.....	65
6.	Rayon moyen des pores du Sepharose 4B.....	65
7.	Rayon moyen de la GDH.....	68
8.	Vitesse de sédimentation de la GDH.....	68
9.	Activité initiale de la GDH dans le phosphate.....	68
10.	Stabilité de la GDH dans le phosphate.....	78
11.	Activité et stabilité de la GDH.....	78
12.	Cinétique de la formation des sousunités à l'aide du Sephadex G-200.....	78
13.	Elution des protéines sur G-200 en présence de détec- gent SDS.....	85
14.	Constante d'équilibre des protéines sur Sephadex G-200.	89
15.	Rayon effectif des protéines sur Sephadex G-200.....	89
16.	Valeurs, R_f , des DNP-aminoacides en chromatographie bidimensionnelle.....	93
17.	Valeurs, R_f , de la fraction éthérosoluble de l'hydroly- sat de DNP-GDH.....	93
18.	Valeurs, R_f , de la fraction hydrosoluble de l'hydroly- sat de DNP-GDH.....	93

19.	Chromatographie unidimensionnelle de la DNP-ala-1- ¹⁴ C...	97
20.	Absorption de la DNP-ala à 360 mu.....	97
21.	Analyse quantitative des aminoacides de la DNP-GDH.....	101
22.	Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-GDH	101
23.	Détermination du degré de "quenching" à l'aide d'échan- tillons étalonnés.....	103
24.	Radioactivité spécifique de la DNP-ala-1- ¹⁴ C.....	105
25.	Radioactivité de la fraction éthérosoluble de l'hydro- lysat de DNP-GDH.....	105
26.	Détermination quantitative du dérivé N-terminal de la GDH.....	107
27.	Poids moléculaire des sousunités de la GDH.....	107
28.	Vitesse de sédimentation de la GDH succinylée.....	112
29.	Rayon moyen de la GDH succinylée.....	112

Abréviations

xiv

ADP	diphosphate d'adénosine
CM-GDH	glutamique déshydrogénase carboxyméthylée
DEAE	déthylamino-éthyle
DNP	dinitrophényl
DNP-ala	N-dinitrophénylalanine
DNP-glu	acide N-dinitrophényl glutamique
DNP-NH ₂	dinitroaniline
DNP-OH	dinitrophénol
EDTA	acide éthylène-diaminetétra-acétique
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzène
GDH	glutamique déshydrogénase
GTP	triphosphate de guanosine
Ile	isoleucine
Leu	leucine
NAD	nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADH	nicotinamide-adénine-dinucléotide, forme réduite
NADP	nicotinamide-adéine-dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate, forme réduite.
PMB	p-hydroxy-mercurybenzoate
POPOP	1,4-bis-2-(5-phényloxazolyle)-benzène
PPO	2,5-diphényloxazole

SBMV	Southern Bean Mosaic Virus
SDS	dođécylsulfate de sodium
SH	sulphydryle
Val	valine

Résumé

On a étudié la structure de la glutamique déshydrogénase du foie de boeuf. A l'aide du Sepharose 4B, on a déterminé que l'enzyme a un rayon Stokes de 9.52 μ à une concentration de 0.8 mg/ml. Après 24 heures d'incubation dans un détergent, le lauryl sulfate de sodium, l'enzyme est complètement dissociée en sousunités d'un poids moléculaire de 50,000 et d'un rayon Stokes approximatif de 2.93 μ . L'analyse du dérivé N-terminal ne révèle que l'alanine dont on trouve 0.91 mole par 47,500 g de GDH. On conclut que six monomères de la GDH d'un poids moléculaire de 50,000 s'associent pour donner un protomère et quatre protomères s'associent, à leur tour, pour donner un oligomère d'un poids moléculaire de 1.2 millions. On a aussi trouvé que l'enzyme était le plus stable dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.6. La succinylation de la GDH augmente le rayon Stokes de la molécule et sa solubilité, mais détruit l'activité enzymatique.

Abstract

The structure of beef liver glutamate dehydrogenase was studied. A Stokes radius of 9.52 μ was found on Sepharose 4B. A 24 hour treatment with a detergent, sodium lauryl sulfate, completely dissociates the enzyme into subunits. These have a molecular weight of 50,000 and a Stokes radius of approximately 2.93 μ . Alanine was obtained as the only N-terminal residue. A quantitative analysis gave 0.91 mole of N-terminal alanine per 47,500g of enzyme. The oligomer of 1.2 million molecular weight seems to be composed of four protomers and each protomer is composed of six monomers. The enzyme is the most stable in 0.1M phosphate buffer at pH 7.6. Succinylation of the enzyme increases its Stokes radius and its solubility, but destroys the glutamate dehydrogenase activity.

INTRODUCTION

I. Considérations générales sur la structure des protéines.

A. Degré d'organisation.

On peut considérer les protéines à différents niveaux d'organisation structurale, soit au niveau des structures primaire, secondaire, tertiaire (75) et quaternaire (12).

1) Primaire - Ce premier degré d'organisation protéique consiste en la séquence des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Cette séquence est déterminée génétiquement lors de la biosynthèse.

2) Secondaire - La structure primaire d'une chaîne polypeptidique détermine l'entourage immédiat des résidus intrapeptidiques; une interaction entre ces résidus amène la chaîne à se replier pour former une hélice \mathcal{L} (90) ou toute autre structure. Cette orientation spatiale de la chaîne polypeptidique donne la structure secondaire.

3) Tertiaire - La structure hélicoidale d'une chaîne polypeptidique ne pourrait expliquer à elle seule la forme globulaire de certaines protéines. L'interaction des résidus éloignés les uns des autres

sur une même chaîne ou sur des chaînes différentes d'une même protéine, force le polypeptide à se replier; les liaisons sulfhydryles intra ou inter-peptidiques forment des boucles; d'autres liaisons telles que les liens hydrogènes entre la tyrosine et les groupements carboxyles, les liaisons hydrophobes et les forces de van der Waals amènent la protéine à acquérir une structure spatiale différente de celle que donnerait l'interaction entre les résidus voisins. Toutes ces forces donnent à la protéine sa structure tertiaire.

4) Quaternaire - Certaines protéines sont composées de plusieurs chaînes polypeptidiques reliées les unes aux autres par des liens non-covalents. On dit que ces protéines ont une structure quaternaire. Chacune des chaînes a ses propres structures primaire, secondaire et tertiaire. La plupart des protéines d'un poids moléculaire excédant 50,000 semblent être composées de sous-unités (68) (122). La structure quaternaire des protéines est détruite par les agents dénaturants couramment employés en chimie des protéines comme la guanidine, l'urée ou les détergents.

La structure quaternaire d'une protéine peut être étudiée par différentes méthodes: a) l'analyse au rayon X b) le microscope électronique c) l'analyse des groupements aminés et carboxyles terminaux d) l'analyse des hydrolysats enzymatiques ou "fingerprint" e) l'ultracentrifugation, l'électrophorèse et la chromatographie f) la détermination du nombre de centres actifs.

Cette structure quaternaire de la protéine, comme ses structures secondaire et tertiaire est directement reliée à la séquence des acides aminés qui composent la protéine. La structure finale adoptée par une protéine est définie par une portion du DNA, soit le gène structural de cette protéine. Une mutation causant une substitution de l'acide glutamique par la valine dans la molécule d'hémoglobine modifie la molécule et cause l'anémie falciforme (65).

B. Mécanisme d'interaction des sousunités.

1) Géométrie de l'association.

Les agents de dénaturation comme les détergents, l'urée et la guanidine brisent la structure quaternaire des protéines sans attaquer les liaisons

covalentes (85); l'association des sousunités se fait donc par des forces secondaires et non covalentes. Selon Tanford (124), ces interactions non-covalentes sont les liaisons hydrogènes, les forces coulombiques d'attraction et de répulsion, les interactions protéine-solvant, les liaisons hydrophobes et les forces de van der Waals. L'influence de chacune de ces forces sur l'ensemble de la molécule est difficilement mesurable, mais les sousunités s'associent de façon à conférer à la molécule naturelle une structure stable et spécifique (82).

Monod et coll. (82) ont tenté d'expliquer cette association à l'aide d'un modèle. Une molécule polymérique qui contient un nombre fini de sousunités identiques est un oligomère. Chacune de ces sousunités est un protomère qui, une fois dissocié complètement, forme des monomères. L'ensemble des groupements ou résidus d'un protomère qui le lie à un autre protomère est une aire d'association. Les aires d'association qui lient deux protomères forment le domaine d'association de la paire. Si l'association est hétérologue le domaine d'association est

constitué d'aires d'association différentes; si l'association est isologue le domaine d'association est fait d'aires d'association identiques.

Une association isologue a un axe de symétrie double; chaque groupement "x" d'un protomère qui se lie à un groupement "y" d'un autre protomère fournit à l'autre protomère un groupement "y" pour former un deuxième lien "xy". Une association isologue tend à donner des polymères finis formés d'un nombre pair de protomères. Dans une association hétérologue le domaine d'association n'a pas de symétrie et cette association donne généralement des polymères formés d'un nombre indéfini de protomères. Si une protéine s'associe à la fois par des domaines isologues et hétérologues l'oligomère contient un nombre minimum de six protomères. Ces modèles ont pu être vérifiés pour certaines protéines (54) (91) (94) (130).

Il existe un nombre restreint de combinaisons possibles des monomères ou des protomères (71). Cette restriction vient du fait que la molécule polymérisée doit avoir assez d'espace sur sa surface pour accommoder les groupes chargés de chacune des sousunités (36).

2) Structure quaternaire et allostérie.

L'interaction hème-hème dans la molécule d'hémoglobine a été longtemps le seul exemple d'une interaction entre des sites spécifiques et distincts dans une protéine (11) (136). L'étude des enzymes ayant un rôle dans le contrôle du métabolisme par Monod et coll. (83) a révélé que ces enzymes avaient le même comportement cinétique que l'hémoglobine. Ces protéines, appelées allostériques, montrent une dépendance sigmoïde de la vitesse initiale de la réaction à la concentration du substrat. Cette anomalie résulte de la liaison du substrat à plus d'un site sur l'enzyme. Cette interaction, dite homotrope, est toujours coopérative. Certaines molécules, appelées affecteurs allostériques, qui sont très souvent les produits terminaux d'une chaîne métabolique, peuvent aussi être liées à l'enzyme et influencer profondément sur son activité catalytique. Les effets hétérotropes peuvent activer ou inhiber l'enzyme.

Ces interactions allostériques semblent être reliées à un changement dans la conformation de ces protéines. Selon le modèle de Monod et coll. (83), ces protéines allostériques sont des oligomères où

les protomères occupent des positions équivalentes. La conformation de chacun des protomères est influencée par son association avec les autres protomères. Aussi la symétrie de l'oligomère est conservée lors d'une transition allostérique.

II- Organisation structurale de la glutamique déshydrogénase.

a) Nomenclature.

La glutamique déshydrogénase (GDH) sur laquelle portent le présent travail est, selon la nomenclature systématique, la glutamate: NAD oxidoreductase (déaminante) et porte le numéro 1.4.1.2. de la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie (42). Le nom trivial de cette enzyme, étant généralement utilisé dans la littérature, on utilisera ce même nom.

b) Sources.

La glutamique déshydrogénase a été isolée de plusieurs sources, mais principalement des animaux (129) (29), des plantes supérieures et des champignons (109) (76). Chez les plantes supérieures la GDH se retrouve surtout dans les mitochondries des feuilles (109)

et les chloroplastes (76). La GDH du chien de mer (25) et de différentes sources bactériennes (72) a aussi été isolée et purifiée. La glutamique déshydrogénase du foie de boeuf est de loin celle qui a été le plus étudiée à la fois parce que le foie de boeuf a été la première source connue de l'enzyme et qu'on peut acheter dans le commerce la GDH recristallisée.

c) Activité enzymatique

La GDH catalyse la réaction suivante:

$$\text{L-glutamate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{cétoglutarate} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+$$

Dans certaines conditions, la GDH peut désaminer l'alanine pour donner le pyruvate. La GDH du foie de boeuf n'est pas spécifique pour NAD, elle peut aussi utiliser NADP comme coenzyme. D'autre part, les GDH isolées des plantes ou des bactéries sont spécifiques pour l'un ou l'autre des coenzymes (44). Deux glutamique déshydrogénases, respectivement spécifiques pour le NAD ou le NADP, ont été isolées de Neurospora (116) et de Thiobacillus novellus (72). L'utilisation de l'un ou l'autre coenzyme par la GDH du foie peut être un facteur de contrôle

du métabolisme cellulaire, Frieden (49) a trouvé que l'ATP n'avait pas d'effet sur l'oxidation du NADPH tandis qu'il inhibait fortement l'oxidation du NADH. Aussi la GDH du foie possède un deuxième site spécifique pour le NADH et non pour le NADPH (49). La position importante qu'occupe cette enzyme entre le métabolisme des produits azotés et le cycle des acides tri-carboxyliques laisse supposer que l'emploi spécifique de l'un ou l'autre des co-enzymes peut influencer l'équilibre des fonctions cataboliques et anaboliques (117).

L'activité de la GDH dans la mitochondrie produit en premier lieu le NADPH qui est utilisé directement ou oxydé par le NAD dans une transhydrogénation (100).

d) Relation entre la structure et l'activité enzymatique de la GDH du foie de boeuf.

La structure et l'activité de cette enzyme peuvent être modifiées par différentes petites molécules présentes dans la mitochondrie. Olson et Anfinsen (88) ont cristallisé l'enzyme pour la première fois en 1952 et ont trouvé un poids moléculaire de 1 million à une concentration supérieure à 1 mg par ml. Le tableau 4 montre que les valeurs trouvées par différents auteurs varient entre 7×10^5 et 2 millions. Cette molécule se dissocie par dilution en des particules ayant un poids moléculaire variant entre 250,000 (88) et 450,000 (49). Récemment, Eisenberg (34) a trouvé une valeur de $313,000 \pm 3,000$ par extrapolation à concentration zéro; la faible erreur expérimentale

de cette expérience et la coïncidence avec la valeur de 330,000 \pm 2,000 rapportée par Corman et Kaplan (25) pour la GDH du foie de chien de mer nous porte à accepter cette valeur comme poids moléculaire de l'enzyme dissociée par dilution. Ces unités de 300,000 peuvent être dissociées en les traitant avec des agents dénaturants et l'on obtient des sousunités d'un poids moléculaire variant entre 43,000 et 60,000 (67) (80) (69) (78) (34) (5). La détermination du résidu en position N-terminale a révélé la présence de 17-23 moles d'alanine et 1-2 moles d'acide glutamique par 10^6 g de GDH (67) (5).

Les formes de poids moléculaires 300,000 et 1 million, que l'on nomme provisoirement polymère et monomère, sont en équilibre rapide (88) (51). L'enzyme diluée aux concentrations utilisées dans les dosages enzymatiques (10 μ M) existe principalement sous forme de monomère (48) mais les deux formes de GDH, polymère et monomère, sont actives (37) (43). L'équilibre entre ces deux formes de GDH peut être déplacé par l'addition de petites molécules. En présence de NADH, $ZnCl_2$ (126), certains stéroïdes (138) et le GTP (135) désagrègent l'enzyme en monomères, inhibent l'activité de glutamique déshydrogénase (17) (49) et stimulent l'activité d'alanine déshydrogénase de l'enzyme (126) (17). L'ADP protège l'enzyme contre la désaggrégation et la perte d'activité (126) (49). Il semblait donc y avoir une relation entre le degré de polymérisation de la GDH et son activité enzymatique

(126). Aussi en mesurant l'activité d'alanine déshydrogénase en fonction de la concentration de l'enzyme, Tomkins et coll. (126) ont remarqué que l'activité était proportionnelle à la concentration à de faibles concentrations. En augmentant la quantité d'enzyme dans le milieu, l'activité d'alanine déshydrogénase atteignait un plateau; une proportionnalité entre l'activité d'alanine déshydrogénase et la concentration de l'enzyme fut cependant obtenue à de plus fortes concentrations en présence de NADH et de GTP. Fisher (37) et Frieden (45) ont par la suite démontré que la relation entre l'association et la dissociation de la GDH et son activité enzymatique n'était que circonstancielle. Les facteurs qui influent sur l'association de la GDH modifient en même temps son activité et sa conformation (70). Des études immunologiques (126) ont montré que l'enzyme dans ces différentes conditions existait sous trois formes. Le modèle proposé par Tomkins et coll. (17) (18) (70) est le suivant:

Polymère $\xrightarrow{\text{Dilution}}$ monomère x $\xrightarrow{\text{NADH - GTP}}$ monomère y.

Le monomère x obtenu par dilution possède l'activité d'alanine et de glutamique déshydrogénase. Le monomère y obtenu par l'addition de NADP et de GTP, Zn^{++} ou de diéthylstilbestrol n'a pas l'activité de glutamique déshydrogénase, ne s'associe pas et possède une activité accrue d'alanine déshydrogénase. Toutes ces formes ont des confor-

mations différentes qui modifient l'affinité de l'enzyme pour les coenzymes (47).

On a vu que la GDH du foie de boeuf peut utiliser NADH ou NADPH comme coenzyme. L'enzyme lie très fortement l'un de ces coenzymes au site actif, mais il existe un autre site non-actif où le NADH est lié spécifiquement. L'affinité de l'enzyme au second site est moindre qu'au site actif, mais ces deux sites sont mutuellement influencés (120). L'enzyme possède aussi un autre site non-actif spécifique pour les nucléotides dérivés de la purine. Les nucléotides liés à ce site influencent le degré de polymérisation et l'activité enzymatique en modifiant la conformation de la molécule (120).

e) Problèmes relatifs à l'explication au moyen du modèle de Monod du comportement de la GDH.

Selon Monod, Changeux et Jacob (83), les enzymes qui ont un rôle important dans la régulation métabolique ont deux caractéristiques principales:

- 1) ces enzymes possèdent un site spécifique, autre que le site actif, pour des petites molécules, autres que le substrat, qui altèrent l'activité enzymatique.
- 2) Ces enzymes montrent une dépendance sigmoïde de la vitesse initiale de la réaction à la concentration du substrat ou d'un affecteur.

La position importante qu'occupe l'acide glutamique entre le métabolisme des composés azotés et le cycle de Krebs, laisse peu de doutes sur le fait que la GDH a un rôle de régulation. Aussi l'influence des nucléotides de la purine sur l'activité enzymatique est un fait très bien connu. Récemment, Frieden (43) et Colman ont démontré qu'à concentration physiologique de GDH, on obtenait le comportement sigmoïde des molécules allostériques. Le modèle suggéré par Monod, Wyman et Changeux (82) (22) pour expliquer la structure quaternaire de ces protéines ne peut cependant être appliqué directement à la GDH du foie de boeuf à partir des données obtenues jusqu'ici. Ce modèle demande une symétrie structurale entre les protomères où chacun des protomères doit avoir la même structure et la même activité. Les études de Jirgensons (67) et Apella (5) sur les résidus N-terminaux de la GDH ont révélé 17-23 moles d'alanine et 1-2 moles d'acide glutamique pour 10^6 g de GDH. Dans ces conditions, on peut difficilement obtenir une symétrie de structure et l'équivalence des protomères dans le polymère. De plus, on pourrait supposer la formation d'un polymère hélicoidal, mais cette forme n'a jamais été trouvée dans le cas

de la GDH. Si la présence d'acide glutamique comme résidu N-terminal de la GDH est due à une contamination, le polymère pourrait être formé de protomères identiques, et le modèle de Monod (82) serait applicable.

f) Considérations sur les méthodes d'analyse.

La méthode la plus couramment citée dans les études sur la GDH est la diffusion de la lumière. On a remarqué par expérience, et plusieurs auteurs le mentionnent (78) (46), que la GDH est instable à la température de la chambre. Magar (78) semble croire que les poids moléculaires plus élevés obtenus par diffusion de la lumière sont dus à cette instabilité de l'enzyme, qui augmente la diffusion. Aussi la GDH étant sensible aux changements de concentration, une méthode d'analyse insensible à ces changements semblait de beaucoup préférable. La filtration sur gel d'une macromolécule est indépendante de sa concentration de 0.1 à 50 mg/ml. Si les macromolécules dissoutes ont une forme sphérique, le volume d'élu-tion est fonction du rayon Stokes "a" (1) (131) (3).

Le Sepharose 4B, récemment offert par Phar-

macia Canada Ltd, présente les mêmes avantages que le Sephadex tout en ayant une limite d'exclusion beaucoup plus élevée.

On tentera, par une technique améliorée, de déterminer les dérivés N-terminaux de la GDH et de vérifier ainsi l'identité des sousunités. A l'aide des données obtenues par filtration sur gel, on tentera de calculer le nombre de sousunités composant chacune des formes de la GDH.

METHODES EXPERIMENTALES

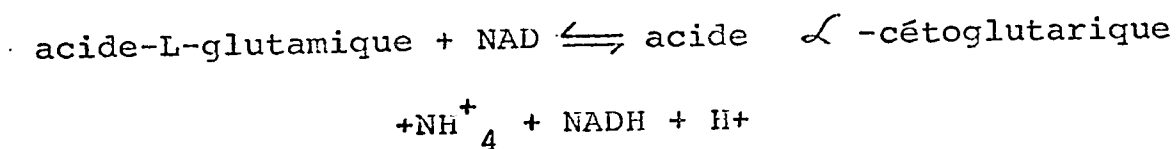
I- Propriétés de l'enzyme naturelle.

A. Détermination de l'activité enzymatique.

1- La L-glutamique déshydrogénase du foie de boeuf, recristallisée trois fois a été achetée chez Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, en quantité suffisante (lot. 94B-0831-1 Type II) pour ne pas avoir à répéter les processus de purification. Cette enzyme, pratiquement libre d'ions ammonium, est en solution dans le glycérol contenant 50% de tampon phosphate 0.01M à pH 7.3. Cette solution stabilise l'enzyme et celle-ci garde son activité jusqu'à son arrivée au laboratoire. La solution contient 10 mg de protéines par ml et est conservée à 5°C jusqu'à ce qu'on l'utilise.

2- Méthode de détermination de l'activité enzymatique.

La GDH catalyse la réaction suivante:



Le taux de formation du NADH est stœchiométrique à celui de l'oxydation de l'acide glutamique et on

le mesure à 340 m μ selon la méthode de Strecker (119). Le dosage enzymatique de Strecker modifié par Sigma Chemical Company est utilisé. Les cellules de quartz employées durant ces travaux ont un diamètre intérieur de 1 cm et proviennent de Beckman Instruments Co. Les lectures de densité optique sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU, équipé d'un photomultiplicateur. On dose l'enzyme en pipettant dans la cellule les solutions suivantes:

2.6 ml de phosphate de potassium 0.05 M à pH 7.6
0.1 ml d'une solution de NAD 0.01 M (8 mg NAD par ml H₂O).
0.1 ml d'une solution de GDH à une concentration d'environ 0.1 mg par ml de tampon phosphate à pH 7.6
0.2 ml d'une solution de L-glutamique dans 5 ml H₂O, on ajoute environ 1 ml d'une solution de KOH 5N pour neutraliser et on dilue à 10 ml avec de l'eau distillée. Le phosphate de potassium provient de Sigma Chemical Co., le NAD et l'acide L-glutamique de Nutritional Biochemicals.

Immédiatement après l'addition de l'acide gluta-

mique, on mélange en inversant deux ou trois fois la cellule. On place rapidement la cellule dans le spectrophotomètre à la température de la chambre et l'on mesure la densité optique à 340 m μ à intervalles de 30 secondes pour trois minutes en utilisant de l'eau comme référence dans l'autre cellule.

3- Unité enzymatique.

L'unité enzymatique telle que définie par Sund et Akesson (123) et modifiée par Sigma Chemical est la quantité d'enzyme qui cause l'oxidation de 1.0 μ mole d'acide glutamique par minute à 25°C et à pH 7.6.

4- Calculs de l'activité enzymatique.

Les calculs sont faits à partir du taux initial d'oxidation durant les trois premières minutes avec la formule suivante:

$$\text{Unités par mg de protéine} = \frac{\text{D.O. 340 par minute} \times 3.0}{6.22 \times \text{mg de protéine dans la cellule}}$$

La formule est valide pour un volume total de 3 ml de solution dans la cellule en acceptant une valeur E de 6220 (63) pour le coefficient d'extinction

molaire du NADH. La concentration de protéine est mesurée à 280 mu (123) ($E_{1\%}^{280 \text{ mu}} = 9.50$) ou à (279 mu $E_{1\%}^{279 \text{ mu}} = 9.73$) (88).

B. Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel.

1- A l'aide du Sephadex G-200.

Le Sephadex G-200 est un dextrane modifié à l'épichlorophydrine fabriqué par Pharmacia, Uppsala, Suède. Il se présente sous forme de microsphères. Les spécifications du manufacturier sont les suivantes: (Lot. No. 9405; Water regain $20 \pm 2\text{g/g}$, particle size 40-120 u).

a) Préparation de la colonne.

On laisse gonfler environ 20 g. de Sephadex G-200 dans un grand excès d'eau distillée pendant 3 heures à 85°C (92) et une nuit à la température de la chambre. On décante pour enlever les petites particules. On équilibre ensuite le gel avec un excès de tampon phosphate de sodium 0.01M à pH 7.6 dans la chambre froide pendant environ 2 heures. On répète le procédé après décantation. Après cette deuxième addition de solvant, on ajuste le volume de façon à obtenir une suspension assez légère et on la verse

dans une colonne de Pharmacia K²⁵/45 à moitié remplie du même solvant. Dès que le gel a commencé à sédimenter, on ouvre le robinet et on finit d'ajouter la suspension avant que tout le gel n'ait fini de sédimenter dans la colonne. Cette technique a pour but d'éviter la formation de strates qui déforment les bandes d'élution. Lorsque la colonne est prête, on l'équilibre à nouveau en laissant passer un volume égal au volume de la colonne de tampon phosphate sous une pression de 36 cm H₂O. Le volume total V_t du gel est de 190 cc. La colonne est reliée à un moniteur Uvicord LKB équipé d'une cellule à flot continu et le pourcentage de transmittance de l'éluant mesuré à 256 m μ est inscrit sur un enregistreur Bausch and Lomb modèle VO-5.

b) Standardisation.

Le volume d'exclusion de la colonne est mesuré à l'aide du Blue Dextran 2000 (Pharmacia Uppsala lot no. 4474). Le Blue Dextran 2000 est fabriqué à partir du Dextran 2000 ayant un poids moléculaire moyen de 2×10^6 ce qui l'exclut complètement des pores du Sephadex. La filtration de ce produit en solution à 0.1% dans un tampon approprié permet de déterminer

à la fois le volume d'exclusion, V_o , et l'homogénéité de la colonne (40). On applique sur la surface du gel deux cc d'une solution à 0.1% de Blue Dextran 2000 dans le tampon phosphate 0.01M à pH 7.6 à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille recourbée de façon à obtenir une bande bleue uniforme et horizontale. Quand l'échantillon est complètement appliqué, on recouvre la surface du gel d'environ 1 cm d'éluant et on continue l'élution avec le même tampon à une vitesse moyenne de 8 ml/cm²/h. On recueille l'éluant à la sortie de l'Uvicord dans un cylindre gradué. Le volume élué correspondant à un minimum de transmittance est mesuré directement. A l'aide de solutions de protéines de poids moléculaires connus, il est possible de déterminer le poids moléculaire d'une protéine. Il s'agit de porter en graphique le logarithme du poids moléculaire des protéines en fonction du rapport de leurs volumes d'élution, V_e , et d'exclusion, V_o , respectifs (4) (131) (115). On standardise la colonne en appliquant comme précédemment et dans les mêmes conditions 2 ml de solutions à 0.2% des protéines suivantes: la thyroglobuline de porc, la gamma-globuline humaine, l'hémoglobine humaine, l'albumine du sérum de boeuf et le

cytochrome C. Toutes ces protéines sauf l'albumine proviennent d'un ensemble de protéines étalon no. 8109 de Mann Research Laboratories. L'albumine de boeuf vient du lot. no. R-1431, de la même compagnie (cat. no. 751). On applique ensuite 2 ml d'une solution de GDH à 10 mg par ml et l'on mesure le volume d'élution.

2- A l'aide du Sepharose 4B.

Le Sepharose est un agarose sans forme de microsphères préparé par Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède. L'agar est un mélange d'agarose et d'agaropectine. L'agaropectine qui est un polysaccharide contenant des groupements sulfatés et carboxyles possède les propriétés d'un échangeur d'ions et cause des effets secondaires dans la filtration sur gel. Le sepharose est un agarose purifié par la méthode de Hjerten (60) (61). Le Sepharose 4B contient environ 4% d'agarose.

a) Préparation de la colonne.

On obtient le Sepharose 4B sous forme de suspension aqueuse contenant 0.02% de nitrate de sodium comme bactéricide, de sorte qu'il peut être utilisé directement sans gonflement. On ajoute

quatre ou cinq volumes de tampon phosphate 0.05M à pH 7.6 à 10°C au Sepharose (lot no. 2700) on mélange et on remplit une colonne de Pharmacia 25/45 de la façon habituelle. La colonne est équipée de Sephadex "Upflow Adapters" et le reste de l'équipement est le même que pour l'expérience avec le G-200. La colonne, d'une hauteur de 40 cm, est lavée avec deux volumes de tampon phosphate sous une pression de 25 cm H₂O à une vitesse de 2.8cc/cm²/h. Ces deux dernières conditions seront constantes pour toute la durée de l'expérience. Le volume (V_t) de la colonne a été déterminé à la fin de l'expérience en remplissant celle-ci à la même hauteur avec de l'eau (41).

b) Standardisation.

Le volume d'exclusion, V₀, de la colonne est mesuré à l'aide de 2 ml. d'une suspension à 1 mg/ml de cellules de Escherichia coli lyophilisées (Escherichia coli Strain 9001 NCTC, Batch no. 6 Seravac Laboratories Ltd, Maidenhead, England). On standardise la colonne en appliquant séparément les solutions suivantes:

1 ml de thyroglobuline de boeuf à 10 mg/ml (Sigma Chemical Co. lot P92-B-61), 2 ml de catalase de foie

de boeuf à 20 mg/ml (Sigma Chemical Co. lot 125B-8500). Un échantillon de 2 ml de la solution de GDH (Sigma Chemical Co. type II 10 mg/ml) est aussi appliqué sur la colonne. Toutes les déterminations du volume d'élution sont répétées une fois.

C. Ultracentrifugation

Ajoutée à d'autres critères de pureté, l'ultracentrifugation d'une solution de protéines permet de juger de son homogénéité.

1- Préparation de la solution:

On dialyse pendant 21 heures 40 mg de GDH (10 mg de protéines par ml, Sigma Chemical, type II lot 94B-0831-1 contre 4.25 litres de tampon phosphate de potassium 0.15M à pH 8.0.

2- Concentration de GDH:

On pipette un aliquot de 1.0 ml que l'on dilue à 10.0 ml avec le même tampon. On mesure ensuite la concentration de GDH à 279 m μ par la méthode de Olson et Anfinsen (88).

3- Ultracentrifugation:

On mesure la vitesse de sédimentation de la GDH à une concentration de 0.14 mg par ml, dans le tampon phosphate 0.15M à pH 8.0, à 20°C à l'aide de

l'ultracentrifuge analytique Beckman, modèle E, à une vitesse de 59780 RPM. L'appareil est équipé d'un système optique Schlieren et les photos sont prises toutes les quatre minutes. Cette analyse est faite dans une cellule de 12 mm contenant environ 0.6 ml de solution.

D. Chromatographie sur DEAE cellulose (diéthylaminoéthylcellulose)

Les celluloses modifiées en échangeurs d'ions sont particulièrement utiles pour le fractionnement des molécules ioniques d'un haut poids moléculaire telles que les acides nucléiques et les protéines. La structure et la propriété hydrophile de la cellulose ajoutées à un faible pourcentage d'ions échangeables permettent d'obtenir une élution très sélective dans des conditions conservant l'activité enzymatique.

1- Préparation de la cellulose.

On mélange 10 g. de DEAE cellulose, Mannex DEAE, (Mann Research Laboratories lot no. N-2431 0.86 meq/gm) à 200 ml d'eau distillée. On laisse sédimenter et on décante deux fois pour enlever les petites particules. On lave la cellulose pendant une heure

avec 150 ml de HCl 0.5 N et on lave à l'eau distillée sur un entonnoir de Buchner jusqu'à pH de 4 à 5. On laisse la cellulose dans 150 ml de NaOH 0.5 N pendant une heure et on lave comme précédemment à l'eau distillée jusqu'à pH 7. On équilibre la cellulose à 10°C avec du tampon phosphate de potassium 0.05 M à pH 7.6. Après avoir mélangé pour faire une suspension assez légère, on remplit une colonne 15/30 de Pharmacia jusqu'à une hauteur d'environ 28 cm. On lave la colonne jusqu'à ce que le pH de l'éluant soit égal à 7.6 et constant.

2- Filtration de la GDH sur Sephadex G-25.

La GDH étant en solution dans un tampon phosphate à pH 7.3 contenant 50% de glycérol, on doit d'abord remplacer ce milieu par le tampon initial de la colonne de DEAE cellulose. La purification de la GDH sur une colonne de Sephadex G-25 medium (Pharmacia Canada Ltd lot no. 259) 1.5 X 28 cm dans ce tampon est un moyen rapide et efficace de changer le milieu dans lequel la GDH est dissoute; l'enzyme est complètement exclue des pores tandis que le glycérol passe à un volume d'élution à peu près égal au volume de la colonne. On applique 1 ml de la GDH (Sigma

Chemical Type II) sur le Sephadex G-25 à 10°C, à l'aide d'une aiguille courbée, on laisse absorber l'échantillon et on élue avec le tampon phosphate 0.05M à pH 7.6. On recueille la fraction contenant l'enzyme, on détermine son activité enzymatique par la méthode décrite et la concentration en protéines par absorption à 280mu (123).

3- Chromatographie sur DEAE cellulose.

La méthode employée pour cette chromatographie est une modification de celle de Hooper, Hansen et Bell (62). On applique l'échantillon de GDH sur la colonne à 10°C comme pour la filtration sur gel. On laisse absorber l'échantillon complètement et on applique un gradient de tampon phosphate à l'aide de deux bouteilles de Mariotte de 500 ml placées l'une au-dessus de l'autre; la bouteille inférieure contient 150 ml de tampon phosphate 0.05M à pH 7.6, la bouteille supérieure contient du tampon phosphate 1M à pH 7.6. On recueille des fractions de 5.2 ml à l'aide d'un collecteur de fractions Buchler. On mesure chacun des tubes à 280 mu (123) et l'activité enzymatique par la méthode décrite plus haut.

L'homogénéité de la solution de GDH est aussi vérifiée sur DEAE cellulose dans les mêmes conditions sauf que la colonne est équilibrée initialement avec le tampon phosphate 0.01M; la concentration de phosphate est progressivement élevée à l'aide d'un gradient de 0.01M à 0.05M et de 0.05M à 1 M. Pour cette chromatographie, l'échantillon équilibrée avec le phosphate 0.05M est dilué jusqu'à 0.01M en phosphate avant d'être placé sur la colonne. La concentration de phosphate dans chacun des tubes est calculée par la méthode de Birhofer et Ritter (14). La linéarité du gradient est de plus vérifiée en mesurant la densité optique à 280 m μ à la sortie de la seconde bouteille d'un gradient de tyrosine.

E. Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Le matériel utilisé pour cette expérience (la chambre à électrophorèse, l'applicateur et la source de courant direct) provient de Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Michigan. Le polyacétate de cellulose porte le nom de fabrique Sepraphore III. Ces bandes (1" X 6 3/4") sont manufacturées de façon à offrir moins de résistance au courant. L'électrophorèse sur polyacétate de cellulose offre plusieurs avantages sur

le papier; entre autres avantages, l'acétate de cellulose diminue la période d'électrophorèse des protéines à environ une heure et cela avec une meilleure résolution.

On place dans la chambre à électrophorèse du tampon phosphate 0.05M à pH 7.6 et on y trempe les bandes d'acétate de cellulose. Après avoir épongé l'excès de tampon avec du papier, on applique l'échantillon de GDH, la solution à 10 mg par ml dans le tampon phosphate-glycérol 50:50. Sans laisser sécher les bandes, on les place dans la chambre où on applique un courant de 100 volts et de $.206 \frac{\text{mA}}{\text{cm}}$ pendant 230 min. à la température de la chambre. On révèle les protéines à l'aide d'une solution de Ponceau S à 0.01% dans l'acide trichloroacétique 5%. (Le Ponceau S provient de ESBE Laboratory Supplies à Touton et l'acide trichloroacétique de Fisher Scientific). On rince les bandes trois fois pour une minute à l'acide acétique 5%; après avoir enlevé l'excès de solvant, on rince pour une minute à l'éthanol 95%. On assèche légèrement et on rend les bandes transparentes en les plaçant pour une minute dans une solution d'acide acétique 10% dans le méthanol.

Un séchage d'environ 20 minutes à la température de la chambre suffit pour obtenir la transparence. Les bandes traitées de cette façon sont beaucoup moins friables et peuvent être conservées intactes très facilement.

II- Stabilité de l'enzyme.

Afin de déterminer si la force ionique, la nature du tampon et la filtration sur gel de Sephadex G-25 avait une influence sur la stabilité de l'enzyme à la température de la chambre, on a déterminé l'activité enzymatique de la GDH après différentes périodes d'incubation.

La GDH provient de la même source que précédemment, le phosphate de sodium primaire et secondaire, de Fisher Scientific (qualité Fisher Certified Reagent), le tampon Tris HCl est préparé à partir de Trizma de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri.

La méthode de dosage utilisé dans ces expériences est la même dans tous les cas c'est-à-dire que la cellule contient 2.6 ml de tampon phosphate 0.05M à pH 7.6 quel que soit le tampon utilisé au cours de l'incubation, 0.1 ml de solution de NAD, 0.1 ml de

solution de GDH dans le tampon employé pour l'incubation et la réaction est amorcée par l'addition de 0.2 ml de solution de glutamate de potassium.

Des solutions de GDH à 0.1 mg/ml sont préparées en diluant 0.1 ml de solution de GDH (Sigma, Type II) dans 10 ml des tampons suivants: phosphate de potassium 0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5M, 1M et Tris-HCl 0.05M. Les solutions sont conservées scellées et à la température de la chambre entre les déterminations. La stabilité de l'enzyme après passage sur colonne de Sephadex G-25 (1.5 X 28 cm) a été déterminée sur deux colonnes, l'une équilibrée avec le tampon phosphate 0.05M à pH 7.6, l'autre avec un tampon à 0.01M. Des fractions de 5 ml furent recueillies et les deux fractions contenant le plus de protéines furent conservées pour les dosages enzymatiques. Dans ces deux cas la concentration en protéine fut déterminée par absorption à 280 m μ (123).

III- Dissociation de la glutamique déshydrogénase en sousunités.

La modification de la conformation d'une protéine rend celle-ci plus susceptible à l'action des

enzymes et des agents chimiques. Le traitement de la GDH par différents agents dénaturants permet d'obtenir les chaînes polypeptidiques constituant l'enzyme (67). Celles-ci peuvent être ultérieurement ou simultanément modifiées en bloquant les groupements sulfhydryles.

1- Dénaturation.

On équilibre 100 mg de GDH (Sigma Type II lot no. 94B-0831-1) dans le tampon Tris-HCl sur une colonne (1.5 X 30 cm) de Sephadex G-25 médium équilibrée avec le tampon Tris-HCl 0.1M à pH 8.5. La fraction (10 ml) contenant la plus grande partie de l'enzyme est lyophilisée.

a) Solution d'urée

L'urée (Shawinigan Chemical Co. Ltd, Montréal, Reagent Grade lot G-107712 H B) est recristallisée avec de l'éthanol et séchée à l'air. On en prépare une solution 8M dans l'eau distillée et celle-ci est passée à travers un échangeur d'ions (Treat Water Demineralizer, A. McGillivray Chemicals Ltd, Paris, Ont) immédiatement avant utilisation. Ce traitement permet d'enlever les cyanates qui donneraient des dérivés carbamylés de la GDH (118). Aussi l'emploi du tampon Tris favorise la réaction des traces de cyanate

avec ce dernier plutôt qu'avec l'enzyme (59).

b) On ajoute 10 ml de cette solution au lyophilisat et on mesure la concentration de l'enzyme à 280 mu (123). Cette mesure est approximative et ne sert qu'à calculer la quantité de réactifs nécessaires pour les réactions qui suivent.

2- Réduction des liens sulfhydryles

La réduction de ces liens est effectuée en présence d'un excès de B-mercaptoéthanol. La solution de GDH dans l'urée et le Tris-HCl est placée dans un tube de Thunberg et l'oxygène est évacué en saturant avec de l'azote pendant 30 min. On ajoute ensuite 0.1 ml (excès de 100X) de B-mercaptoéthanol (Sigma Chemical Type I lot 106B-1730) à l'aide d'un microseringue et on garde le tube pendant 4 heures à 25°C sous atmosphère d'azote. L'addition de 0.1 ml de mercaptoéthanol à 10 ml de Tris HCl 0.1M à pH 8.5 fait descendre le pH jusqu'à 8.15; cette valeur est convenable pour la réaction suivante (59).

3- S-carboxyméthylation.

La carboxyméthylation de la GDH est effectuée selon la méthode de Hirs (59) sauf que l'acide iodoacétique (Sigma Chemical lot 67B-3180) en solution dans le NaOH 1N (270 mg/ml) est ajouté par

portions à 100 ul par minute.

Après acidification à pH 5, la solution est placée dans un sac et dialysée à la température de la chambre pendant 21 heures contre 4 litres d'eau distillée. Le contenu du sac est lyophilisé pendant deux jours. Le taux de carboxyméthylation de la GDH n'a pas été déterminé.

Le p-OH mercuribenzoate réagit avec les groupements sulfhydryles pour donner des dérivés mercuribenzoatés. Ce produit a été utilisé par Boyer (20) pour le titrage des groupements sulfhydryles par spectrophotométrie. La réaction est très rapide avec les groupements -SH libres. En dénaturant la GDH à l'aide du dodécyl sulfate de sodium en présence de p-OH mercuribenzoate le taux de formation des sous-unités est limité par la dénaturation à l'aide du détergent et non par la réaction du mercuribenzoate avec les liens sulfhydryles.

On ajoute à 1 ml de GDH (Sigma Chemical Type II, 10 mg/ml) 2 ml d'une solution de dodécylsulfate de sodium 0.075M (Sigma Chemical lot no. 126B-0860) contenant du p-OH-mercuribenzoate 1.5×10^{-4} M et ajusté à pH 8. On agite à 25°C dans un incubateur Dubnoff, à différents intervalles, on prélève des

échantillons que l'on applique sur une colonne de Sephadex G-200 équilibrée avec le même solvant. Le pourcentage de transmission à 256 m μ de l'éluant est mesuré à l'aide d'une cellule à flot contenu Uvicord de LKB. La réaction des groupements -SH avec le mercuribenzoate augmente la densité optique de la protéine à 250-255 m μ (20), et facilite sa détection. La vitesse d'élution est d'environ 3-4 cc/cm²/h. On a isolé le dérivé p-OH mercuribenzoaté préparé par cette méthode à partir de 131 mg de GDH. Après la réaction on dialyse la solution pendant 24 h. contre l'eau courante et on lyophilise. On extrait avec dix volumes de chloroforme une suspension acide de 143 mg de lyophilisat, on filtre le résidu et on le sèche à 110°C.

IV- Caractérisation des sousunités.

1- Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.

L'emploi du Sephadex G-200 pour cette expérience permet de séparer très facilement la portion de la GDH non dissociée des chaînes polypeptidiques; à l'aide de protéines de poids moléculaires connus, on peut déterminer le poids moléculaire de celles-ci.

Le Sephadex G-200 est gonglé comme précédemment (92) et équilibré avec une solution de lauryl sulfate de sodium (SDS) 0.05M contenant du p-OH-mercuribenzoate (PMB) de sodium 10^{-4} M; la solution est ajustée à pH 8.0 avec NaOH. Une colonne de Pharmacia K²⁵/45 équipée d'un "Sephadex flow adapter" est remplie jusqu'à une hauteur de 36 cm pour donner un volume total (V_t) de 176 cm. La colonne est équipée d'un robinet à trois positions qui permet d'injecter l'échantillon et de faire passer l'éluant sans altérer la surface du gel.

On applique séparément 0.9 cc des solutions à 1% des standards suivants: Blue Dextran 2000, Pharmacia Uppsala AB lot 4474, ovalbumine Fisher Scientific, albumine de sérum de boeuf Fraction V, Mann Research R1431, pepsine 2X recristallisée, Worthington lot 676, chymotrypsine cristallisée, Worthington Biochemicals CD-514-17. On laisse passer le solvant et on recueille l'éluant dans un cylindre gradué à la sortie du LKB Uvicord. Un volume semblable de glutamique déshydrogénase dénaturée 24 heures selon la méthode décrite à la section III, 4, est aussi appliqué sur la colonne.

2.- Electrophorèse des sousunités.

L'électrophorèse des protéines en présence d'urée 8M sur gel de polyacrylamide ou d'amidon permet une très bonne résolution d'un mélange de protéines en ses différents constituants. Ces tampons contenant de l'urée ont permis de séparer des sous-unités de différentes protéines comme l'aldolase du muscle de lapin (21) (30) et la ribulose diphosphate carboxylase (105).

La stabilité de l'acétate de cellulose dans de tels tampons permet de l'utiliser avec avantage pour l'électrophorèse des sousunités de la GDH. Les appareils utilisés sont les mêmes que ceux décrits à la section I (E). Tous les tampons utilisés contiennent de l'urée 8M (Reagent Grade Shawinigan Chemicals lot G10-7712-H8) et sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation. Le tampon phosphate à pH 8.2 est 0.025M par rapport au phosphate; le tampon Tris-EDTA-acide borique à pH 9.0 est une modification du tampon de Aronsson et Gronwald (6) le tampon glycine est une modification du tampon glycine décrit par Bailey (9). Des solutions de carboxyméthyl-GDH sont préparées dans ces tampons à

une concentration de 20 mg/ml. L'échantillon est appliqué comme précédemment et on fait une électrophorèse en 4 exemplaires dans le même tampon avec un courant de 160 volts, 0.125 mA/cm pour 3½ heures à la température de la chambre. Pour le tampon glycine, le courant est de .25 mA/cm: Les bandes sont traitées au Ponceau S et clarifiées tel que décrit précédemment.

3- Détermination de l'acide aminé N-terminal de la GDH.

On obtient le dérivé dinitrophenylé (DNP) de la GDH en traitant l'enzyme avec le FDNB d'après la méthode de Phillips (93). Cette méthode est préférable à la méthode originale de Sanger (108) puisqu'elle permet de dinitrophényler la protéine dissociée; un traitement au FDNB de la protéine intacte risque fort de n'être pas quantitatif.

On ajoute à 5 ml de GDH (Sigma Chemical Type II 10 mg/ml) 2.87 g de guanidine-HCl (Eastman Chemical lot 43A) et 15 mg de bicarbonate de potassium. Lorsque les réactifs sont dissous on ajoute un excès (0.1 ml) de FDNB (Eastman Organic Chemical) et agite violemment à la température de la chambre et à l'obscurité pendant 22 heures. A la fin de la période

d'incubation, on acidifie à pH 2 avec HCl et on lave la DNP-protéine insoluble une fois à l'eau, deux fois à l'acétone et à l'éther. Le produit est séché à la température de la chambre et pesé.

A) Analyse qualitative des dinitrophénylamino-acides

i) Hydrolyse.

On hydrolyse à 32 mm HG 12.8 mg de DNP-GDH en présence de 2 ml d'acide chlorhydrique 5.7N redistillée pendant 16 heures à 100°C.

ii) Extraction

Après l'hydrolyse, le tube est refroidi et le contenu est placé dans un entonnoir à décantation de 30 ml. Le tube est lavé avec 10 ml d'eau distillée et les lavages sont ajoutés à l'hydrolysate pour donner une concentration finale en HCl de 1N. On extrait 4 fois avec 5 ml d'éther anhydre (Mallinckrodt) ne contenant pas de peroxyde (15). Les extraits éthers sont lavés 3 fois avec 5 ml d'acide chlorhydrique 0.1N (93) et la phase aqueuse deux fois avec 5 ml d'éther. Les lavages sont groupés respectivement avec les phases aqueuse et étherée. La phase étherée est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 4.0 ml d'acétone.

iii) Chromatographie des dérivés éthérosolubles.

La chromatographie en couche mince sur cellulose (Eastman Chemical Co. Rochester, N.Y.) possède les mêmes avantages que le papier pour la séparation des DNP-amino acides tout en étant beaucoup plus rapide. Un couplage du système de Blackburn et Lowther (19) avec le tampon phosphate 0.75M de Davies et Harris (27) permet une séparation bidimensionnelle des DNP-amino acides en 6 heures comparativement à 2 ou 3 jours avec le papier. On arrose les couches de cellulose avec un tampon phthalate 0.05M à pH 6; après avoir enlevé l'excès de tampon on les laisse sécher environ 2 ou 3 heures. On applique sur des couches de cellulose différentes, à 2 cm de chacun des côtés, 15 μ l de solutions de DNP-alanine, dinitro-phénol, dinitroaniline dans l'acétone à 200 μ g/ml. On évapore 275 μ l de la solution cétonique du résidu éthérosoluble jusqu'à un volume de 40 μ l et on l'applique de la même façon.

La première chromatographie se fait dans le tampon alcool amylique tertiaire saturé avec le phthalate à pH 6 de Blackburn et Lowther (19) dans une chambre de type "sandwich" de Eastman Chemical Co. Rochester, N.Y. Les couches celluloses sont séchées pendant la nuit et une chromatographie dans la seconde dimension est faite dans le tampon de Davies

et Harris (27). On peut aussi sécher les couches à l'aide d'un courant d'air pendant deux heures avant la seconde chromatographie.

Le séchage et la chromatographie se font à l'obscurité pour prévenir la photodécarboxylation (95). Un mélange de 140 μ l de la solution cétonique du résidu éthérosoluble, de 7.5 μ l de DNP-ala, 7.5 μ l de DNP-OH et de 7.5 μ l de DNP-NH₂ est réduit par évaporation à un volume de 20 μ l et appliqué sur une couche cellulosique comme décrit précédemment; une chromatographie bidimensionnelle est effectuée dans les mêmes systèmes de solvants.

iv) Chromatographie des dérivés hydrosolubles.

On effectue la chromatographie unidimensionnelle des dérivés DNP-hydrosolubles sur une couche cellulosique à l'aide du système de Blackburn et Lowther (19) et du système de Partridge tel que suggéré par Sanger et Tuppy (107). On prépare des solutions de ξ -DNP-lysine, \mathcal{L} -mono-DNP-arginine, o-DNP-tyrosine, di DNP-histidine à une concentration de 200 μ g/ml dans l'acide chlorhydrique dilué. On tamponne une couche cellulosique avec le phthalate et on applique 5 μ l des solutions témoins et 10 μ l de la

fraction hydrosoluble réduite à 5 ml, on applique aussi 45µl des solutions de DNP-OH et DNP-NH₂. On fait ensuite migrer l'alcool amylique tertiaire tamponné au tampon phthalate (19) jusqu'à une hauteur d'environ 13 cm. On applique des échantillons identiques sur une autre couche de cellulose et on fait migrer dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) préparé au moins 24 heures à l'avance (107).

B) Analyse quantitative de la DNP-alanine.

La méthode pour la détermination quantitative du dérivé DNP-alanine en position N-terminale consiste à ajouter à la GDH avant l'hydrolyse, de la DNP-DL-alanine l-C¹⁴ dont le poids et la radioactivité spécifique sont connus. L'inclusion de la DNP-DL-ala-l-C¹⁴ permet en une seule correction de calculer le total des pertes dues à l'hydrolyse, la photodécarboxylation, l'application de l'échantillon et l'élu-tion des taches du chromatogramme.

1) DNP-DL-alanine-l-C¹⁴

i) Synthèse

Le dérivé est synthétisé par la méthode de

Levy et Chung (73). On dissout 4.96 mg (55.67 μ Mole) de DL-ala-l-C¹⁴ dans 250 μ l d'eau distillée à 40°C et on ajoute 11 mg de carbonate anhydre de sodium. On ajoute ensuite 56 μ Mole de FDNB (Eastman Chemical) et on agite vigoureusement à 40°C pendant 30 minutes. Les gouttelettes de FDNB disparaissent au bout de 10 à 15 minutes.

ii) Pureté

a) Electrophorèse

On applique un échantillon de la solution précédente sur du papier Whatman 3MM et on soumet à l'électrophorèse dans une solution d'acide formique 1.5M et d'acide acétique 2M (50:50 V/V) à pH 2.0 (7), 630 volts et 1.6 mA/cm pour 75 minutes. On fait aussi l'électrophorèse de la DNP-alanine et de l'alanine dans les mêmes conditions. Les bandes contenant la DNP-ala et l'alanine sont séchées et traitées à la ninhydrine; une des bandes contenant la DNP-DL-ala-l-C¹⁴ est aussi arrosée à la ninhydrine, l'autre est séchée et coupée en sections de 1 cm. Celles-ci sont placées dans 15 ml de mélange à scintillation liquide contenant 10 g de PPO, 0.2 g de POPOP (Packard Instrument Co. Scintillation Grade) dans un litre de méthyl-cellosolve

(Fisher Scientific Reagent), deux litres de toluène et 1.5 litres d'éthanol à 95%. Les bouteilles sont placées dans un compteur à scintillation liquide à double canal (Nuclear Chicago Modèle 8401, système 703), équilibrées à 0°C et à l'obscurité. Chaque échantillon est compté pendant 60 secondes.

b) Chromatographie sur cellulose.

La chromatographie sur couche mince de cellulose (Eastman Chemical) par la méthode de Blackburn et Lowther (19) décrite plus haut a révélé des traces de dinitrophénol. Puisque ces traces influenceraient l'activité spécifique de la DNP-DL-ala-1-C¹⁴, le dinitrophénol est sublimé après acidification en chauffant le contenant sous un vide très poussé. On met alors en solution dans environ 0.3 ml de bicarbonate à 1% et on refait une chromatographie sur cellulose du produit purifié en présence de solutions témoins; on découpe le chromatogramme en sections de 1 cm et on compte les sections comme précédemment pendant 5 minutes.

c) Concentration

On sèche une nuit à 110°C et à l'obscurité de la DNP-alanine trouvée pure par chromatographie

et l'on en pèse 11.26 mg par différence dans une fiole volumétrique de 110 ml. On met en solution dans le bicarbonate à 1% et on en prépare différentes dilutions. On mesure la densité optique à 360 m μ (74). On mesure 100 μ l de la DNP-ala-1- 14 C à 5.1 ml et on mesure sa concentration au moyen de la courbe étalon.

2) Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-GDH.

La DNP-GDH préparée selon la méthode décrite en 3 a) est séchée sous vide en présence de P₂O₅ et pesée par différence dans des tubes de Pyrex de 0.8 mm D.I.; on ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique et à certains de ces tubes on ajoute 10 μ l de la solution de DNP-ala-1-C 14 . Les tubes sont scellés sous vide et placés à 110°C pour 12, 16 et 24 heures. Le pourcentage de protéines dans l'échantillon de DNP-GDH est calculé à partir de 3 échantillons hydrolysés sous vide pour 16 heures à 110°C. L'hydrolysate est analysé sur un analyseur automatique d'acides aminés (Technicon Instrument Co.) par la méthode accélérée de Hamilton (57). Trois acides aminés (val, ile, leu) donnent des résultats constants et sont peu détruits par une hydrolyse dans

ces conditions (127). La quantité de protéine obtenue par cette analyse divisée par la valeur calculée à partir des données de Apella et Tomkins (5) donne le rapport de protéine dans la DNP-GDH.

3) Chromatographie de la DNP-alanine.

L'extraction de la DNP-ala se fait selon la méthode décrite en 3 c). La phase étherée est évaporée à sec sous un courant d'air chaud et le résidu est repris dans l'acétone et appliqué à l'aide d'une microsiringue Hamilton sur un papier Whatman # 1 traité au phthalate selon la méthode de Blackburn et Lowther (19). On rince le bécher de 10 ml plusieurs fois avec environ 10 ou 15 μ l d'acétone et les lavages sont aussi appliqués sur le papier. On applique 6 échantillons sur le même papier plus deux témoins de DNP-ala et DNP-OH. La chromatographie descendante avec le système alcool amylique tertiaire saturé au phthalate prend environ 36 heures.

4) Elution et dosage des taches.

Les taches contenant la DNP-ala sont soigneusement découpées et placées dans des bouteilles avec

3.00 ml de NaHCO_3 à 1%. Les vials bouchés sont incubés et agités lentement à 50°C pendant 20 min. pour compléter l'éluotion (74). Des surfaces égales de papier servant de témoins sont traitées de la même façon. L'éluat est placé dans des cellules de quartz de 1 cm et la densité optique est lue à 360 cm contre un témoin contenant de l'eau. La quantité de DNP-ala dans l'échantillon est calculée en prenant une valeur de 1.63×10^4 comme coefficient d'extinction de la DNP-ala à 2.21 μM par ml. (Tableau 19).

5) Détermination de la radioactivité.

On pipette 2.50 ml de solution de la cellule de quartz et on l'évapore à sec sous un courant d'air chaud dans une bouteille pour la scintillation liquide. On ajoute 15 ml du mélange à scintillation liquide et on agite fortement. Les échantillons sont laissés à 0°C et à l'obscurité pendant 4 heures et comptés jusqu'à concurrence de 40,000 CPM. On prépare aussi 3 témoins contenant 2.50 ml de bicarbonate de sodium à 1% évaporé à sec, 15 ml de mélange à scintillation et 10 μl de la solution de

DNP-ala-1-¹⁴C. Un témoin ne contenant que le bicarbonate évaporé à sec et le mélange à scintillation est aussi compté dans les mêmes conditions.

Le "quenching" des échantillons est corrigé à l'aide du rapport des deux canaux par la méthode de Herberg (58). On détermine la radioactivité d'une série d'échantillons de toluène-C¹⁴ étalonnés et scellés contenant des volumes différents d'acétone comme agent de "quenching". (Nuclear Chicago Liquid Scintillation Quenched Standards Set No. 180, 060 lot 110). La solution maitresse de toluène-C¹⁴ est calibrée par comparaison à l'étalon de C¹⁴ No. 4924 et à la solution étalon d'acide benzoïque-C¹⁴ No. 4925 du National Bureau of Standards of U.S. Chaque échantillon contient 254,000 DPM de toluène-C¹⁴. Le rapport de la radioactivité détectée dans les canaux 1 et 2 en fonction du pourcentage de la radioactivité totale détectée dans le canal 2 constitue la courbe étalon. On peut, par la suite, dans les mêmes conditions, déterminer l'efficacité du comptage d'autres échantillons.

V) Succinylation de la GDH.

1) Succinylation.

L'enzyme est succinylée selon la méthode de

Habeeb (55). On dialyse 110 mg de GDH (Sigma Chemical Co. type II 10 mg/ml) contre 2 litres de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.8 à 2°C pendant 20 heures. Le volume de la solution de GDH après la dialyse est d'environ 25 ml. On ajoute en mélangeant avec un agitateur magnétique 3.28 ml (164 μ Mole) d'une solution d'anhydride succinique dans le dioxane par portions de 0.2 ml sur une période de 30 minutes. Après chaque addition, le pH est maintenu à 7.7 - 7.8 en ajoutant une solution de NaOH 1N. L'anhydride succinique ajouté correspond à un excès de 24 fois le nombre de groupements aminés susceptibles à la succinylation (24) (123).

Après la succinylation, la solution est limpide et on la concentre en y laissant gonfler du BIO Gel P-4. (Le BIO Gel est un copolymère d'acrylamide et de méthylène bisacrylamide manufacturé par BIO-Rad Laboratories. Ce gel exclut les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 3600. Les spécifications du manufacturier sont les suivantes: (Contrôle 3026, eau d'imbibition 2.6 ml/gm gel sec, 50-150 Mesh).

Le Bio Gel P-4 est extrêmement hydrophyle

et en l'ajoutant à une solution d'enzyme, on peut concentrer la protéine (excluse des pores du gel) sans changer la force ionique et le pH de la solution. On ajoute le Bio Gel P-4 à une concentration de 2 gm par 30 ml de solution. On laisse gonfler 3 ou 4 minutes et on filtre à l'aide d'un adaptateur Millipore pour seringue. L'adaptateur contient un treillis métallique qui permet de filtrer le gel sous pression. Chaque processus de concentration permet de diminuer le volume du tiers. On répète l'expérience de façon à obtenir un volume d'environ 15 ml. On centrifuge à 2°C et 2000 RPM pour se débarrasser de quelques particules de Bio Gel n'ayant pas été enlevées. On dialyse l'enzyme pendant 24 heures à la température de la chambre contre 2 litres de phosphate de potassium 0.15M à pH 8.0 on mesure la densité optique de l'enzyme succinylée à 279 mu. Le coefficient d'extinction déterminé par Olson et Anfinsen (88) est utilisé pour la détermination de la concentration de la GDH.

2) Propriétés de l'enzyme succinylée

a) Activité enzymatique.

L'activité enzymatique de la GDH succinylée

est mesurée à deux concentrations par la méthode décrite dans la section I. On utilise 50 μ l de solutions contenant .341 mg et 4.87 mg de GDH succinylée par ml de tampon Tris-HCl 0.05M à pH 8.0. Ces concentrations d'enzyme sont respectivement 1.7 et 2.4 fois plus grandes que la concentration utilisée pour l'enzyme naturelle.

b) Ultracentrifugation

Afin de comparer la vitesse de sédimentation de la GDH succinylée à celle de l'enzyme active, on prépare des solutions de l'enzyme modifiée et de l'enzyme active à une concentration de 4.14 mg/ml dans le tampon phosphate 0.15M à pH 7.6. Les analyses sont faites dans une ultracentrifuge analytique Beckman à 20°C, à une vitesse de 59780 RPM. Les photos sont prises à toutes les quatre minutes.

c) Electrophorèse

On fait l'électrophorèse sur acétate de cellulose de la GDH succinylée (4.14 mg/ml) par la méthode mentionnée plus haut avec un courant de 100 volts, 0.275 mA/cm pendant 2 heures. Les bandes sont traitées comme précédemment.

d) Filtration sur gel Sepharose 4B.

La GDH succinylée est appliquée sur la colonne de Sepharose 4B décrite à la section B-2. On applique des échantillons de 2.0 ml et de 1.6 ml de l'enzyme modifiée à une concentration de 4.14 mg/ml. Le volume d'élution, V_e , est mesuré directement à la sortie du moniteur Uvicord.

RESULTATS .

I. Propriétés de la GDH.

A. Poids moléculaire.

1) Sur Sephadex G-200.

La filtration sur gel de Sephadex G-200 de la GDH obtenue de Sigma Chemical n'a révélé aucune trace d'impuretés absorbant à l'ultraviolet. Un seul pic d'absorption a été obtenu à un volume d'élu-
tion V_e légèrement supérieur au volume d'exclu-
sion V_o déterminé avec le Blue Dextran. Les volu-
mes d'élu-
tion obtenus pour ce dernier et les pro-
téines de poids moléculaire connu sont indiqués au
tableau 1. Le rapport V_e/V_o , volume d'élu-
tion ré-
duit, est, selon Whitaker (131) et Determann (28),
proportionnel au logarithme du poids moléculaire
(fig. 1). Cette valeur V_e/V_o est spécifique pour
certaines conditions de force ionique, de pH et de
température puisqu'elle ne tient pas compte du volu-
me intérieur, V_i , qui pour le même gel, peut varier
avec les facteurs mentionnés plus haut.
Le facteur K_d défini par Porath (97)

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \quad (1)$$

Tableau I

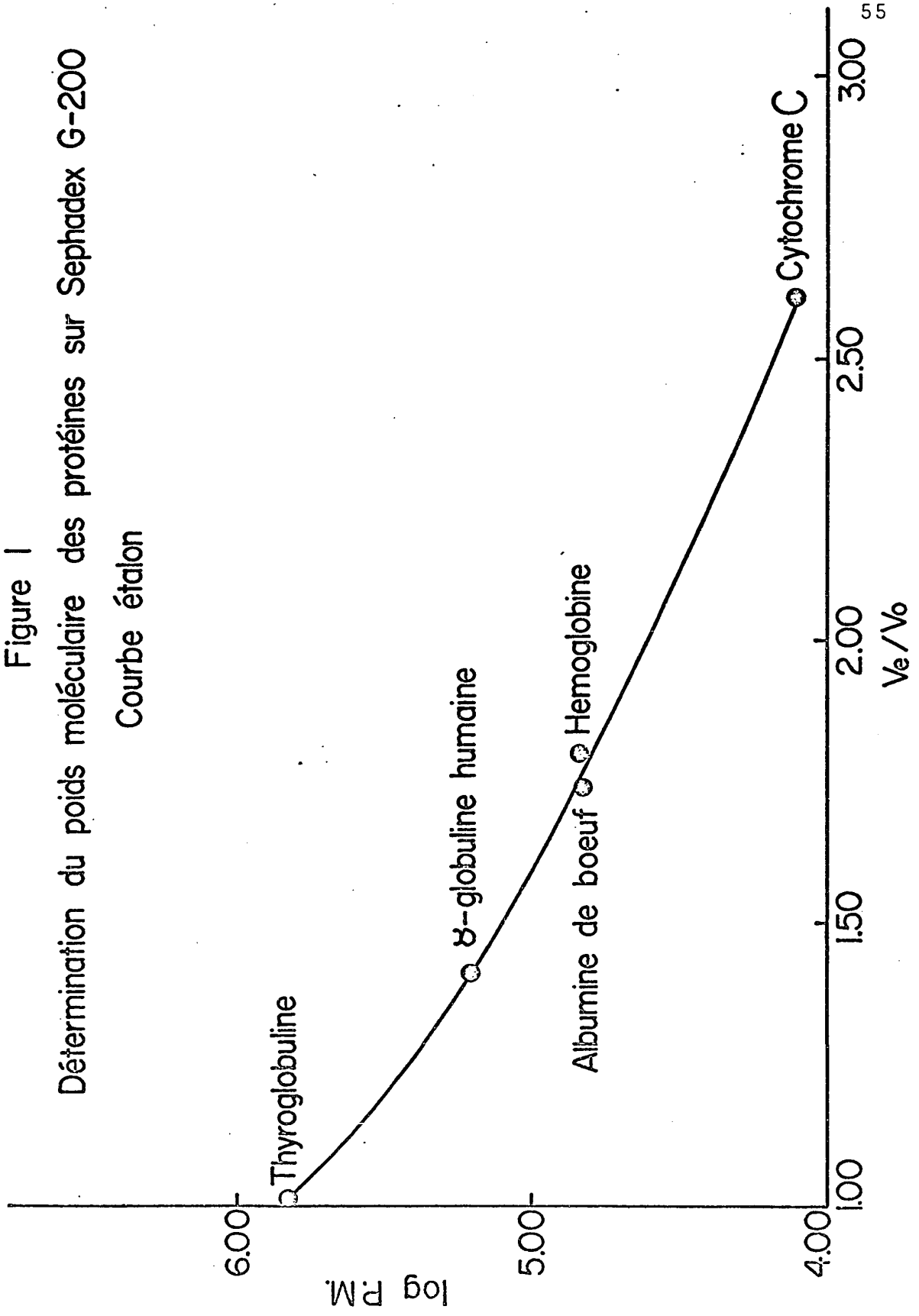
Volume d'élution des protéines sur Sephadex G-200

	Poids moléculaire	log P.M.	V_e	V_e moyen	V_e/V_0	$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_1}$	Rayon Stokes a (μ)
Blue Dextran 2000	-	-	67.4cc	67.4cc	1.00	0	-
Thyroglobuline (3)	660,000	5.820	68 cc 68 cc	68 cc	1.01	0.005	8.10(5)
γ -globuline (110) humaine	160,000	5.204	95 cc 95 cc	95 cc	1.41	0.238	5.22(4)
Albumine du sérum de boeuf (110)	66,500	4.823	114 cc 121 cc	118 cc	1.74	0.402 0.462	3.61(4)
Hémoglobine (110)	68,000	4.833	121 cc	121 cc	1.80	0.462	3.08(4)
Cytochrome C(1)	13,000	4.114	176 cc	176 cc	2.61	0.936	1.74(3)
Glutamique déshydro- génase	-	-	69 cc 68 cc	69 cc	1.02	0.014 0.005	

Figure 1

Détermination du poids moléculaire des protéines sur Sephadex G-200

Courbe étalon



dépend principalement de la nature du gel. Cette valeur représente le coefficient de distribution de la molécule. Le volume interne est exprimé par la formule suivante:

$$V_i = V_t - V_o - a W_R \quad (2)$$

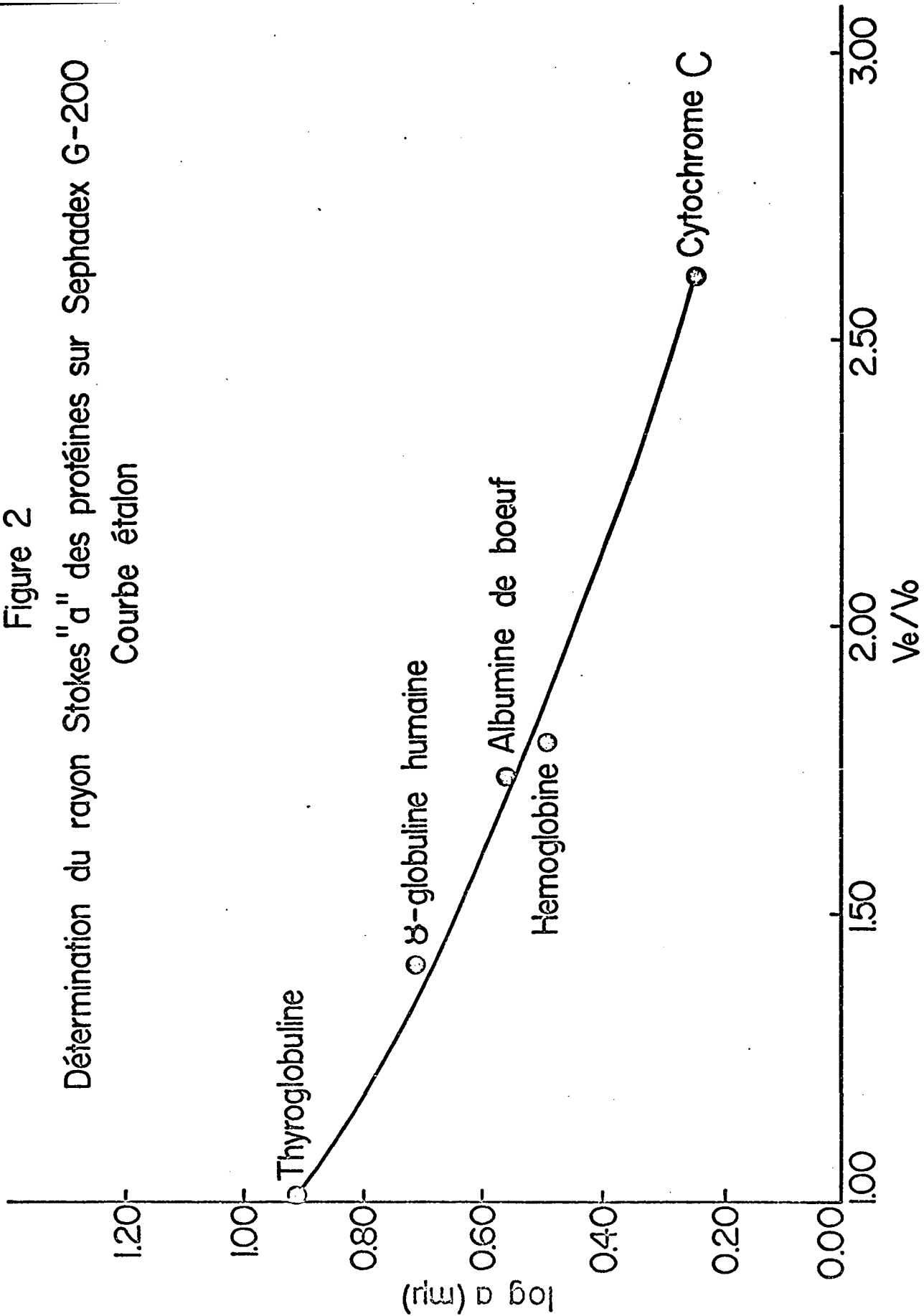
où " W_R " est la quantité d'eau absorbée par gramme de gel sec, " a " est la quantité de gel sec utilisé pour la colonne. Puisque pour le Sephadex G-200, W_R est 20 g., selon Rogers (103), $(V_t - V_o) \times 0.95$ est un estimé de V_i . Les valeurs K_d calculées par cette méthode sont données au Tableau 1.

Determann et Michel (28) ont trouvé une proportionalité linéaire entre le logarithme du rayon Stokes " a " des protéines et le rapport V_e/V_o pour les gels G-100 et G-75. On obtient une relation semblable avec le G-200 (fig. 2). La GDH ayant un volume d'éluion, V_e , très près de celui du volume d'exclusion V_o ; on peut attribuer une valeur approximative d'au moins 660,000 pour le poids moléculaire et de 8.1 mu pour le rayon Stokes de cette molécule. La limite de rétention du G-200 pour les protéines globulaires, dans ces conditions, est

Figure 2

Détermination du rayon Stokes "a" des protéines sur Sephadex G-200

Courbe étalon



d'environ 750,000 pour une molécule ayant un rayon Stokes d'environ 8.3 μ .

La concentration de GDH au maximum d'absorption est environ 0.8 mg par ml. La plupart des auteurs semblent d'accord sur le fait que, à cette concentration, on obtient pour la GDH un poids moléculaire d'au moins 750,000 (137) (49) (133).

En utilisant l'équation de Renkin (102) telle que modifiée par Ackers (1), on peut calculer à partir de la valeur K_d pour des protéines de rayon Stokes "a" connu, le rayon moyen "r" des pores du gel et de là le rayon Stokes d'une molécule de rayon inconnu. L'équation de Ackers est la suivante:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left(1 - 2.104 \frac{a}{r} + 2.09 \left(\frac{a}{r}\right)^2 - 0.95 \left(\frac{a}{r}\right)^5\right) \quad (3)$$

Même si Ackers ne le mentionne pas, le rayon moyen des pores ne peut être déterminé qu'à l'aide de molécules qui ne sont que partiellement retenues par les pores. Ces molécules ont des valeurs $1 < K_d > 0$.

Toutes les molécules qui sont totalement exclues ($K_d = 0$) donneraient le même rapport $\frac{a}{r}$ et de là des valeurs erronées pour le rayon moyen des pores.

Les molécules dont le $K_d = 1$ ne peuvent être utilisées pour la même raison.

L'albumine, l'hémoglobine et la γ -globuline utilisées dans cette expérience respectent ces normes tout en ayant un rayon Stokes connu. Ackers (1) a déterminé, à l'aide d'une calculatrice IBM-1401 et de l'équation 3, les rapports a/r correspondant à diverses valeurs K_d ; ce calcul est utilisé pour déterminer les valeurs a/r présentées au tableau 2.

2) Sur Sepharose 4B.

La filtration sur Sepharose confirme les résultats obtenus avec le G-200. On n'a trouvé aucune trace d'impuretés dans la solution de GDH originale. La standardisation de la colonne par des molécules de poids moléculaire connu donne les résultats indiqués au Tableau 3 et à la figure 3. Par extrapolation, on trouve un poids moléculaire variant de 912,000 à 934,000 pour la GDH, à une concentration maximum de 0.8 mg/ml. Cette valeur est en accord

Rayon moyen des pores du Sephadex G-200

Protéine	K _d	a(mu)	a/r	r(mu)
Albumine du sérum de boeuf	0.402	3.61 (25)	.1905	19.0
	0.462	3.61 (25)	.1649	21.9
Hémoglobine	0.462	3.08 (31)	.1649	18.7
γ-globuline	0.238	5.22 (86)	.2786	18.7
	0.238	5.22 (86)	.2786	18.7
Rayon moyen des pores				19.4
Déviation standard				1.40

Tableau 3

Volume d'élution des protéines sur Sepharose 4B

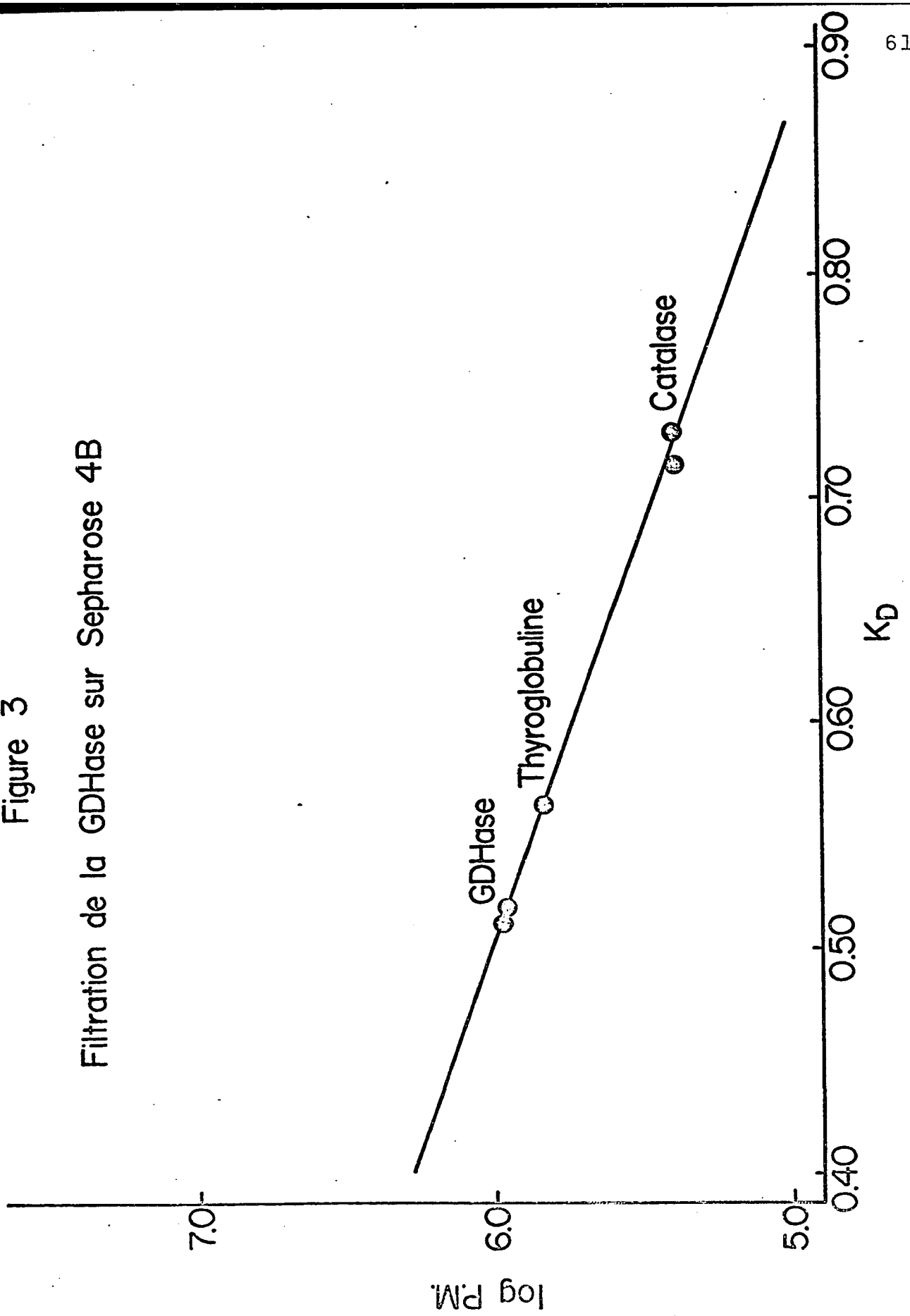
	P.M.	V _e	K _d (a)	log P.M.
E. coli	-	59.3cc	0	-
		57.3cc	0	
Catalase(106)	240,000	160 cc	.729	5.380
		158 cc	.714	
Thyroglobu- line (3)	660,000	137 cc	.564	5.826
	660,000	137 cc	.564	
Glutamique déshydrogé- nase	-	131 cc	.514	-
		130 cc	.521	

$$(a) \quad K_d = \frac{V_e/V_o}{(V_t - V_o) \times 0.96} = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

$$V_i = (204 - 58.3) \times 0.96$$

Figure 3

Filtration de la GDHase sur Sepharose 4B



avec la valeur minimale de 750,000 déterminée sur le Sephadex G-200. (section I.A.1). Un résumé des poids moléculaires de cette enzyme trouvés par d'autres auteurs est donné au Tableau 4. La valeur généralement acceptée pour l'oligomère de la GDH est 1×10^6 (88) (84) (114). Si l'on porte en graphique le rayon Stokes des molécules connues contre leur volume d'élution réduit (4) on trouve, par extrapolation, un rayon Stokes moyen de 9.37 μ pour la GDH (fig. 4). Le rayon moyen "r" des pores du Sepharose 4B, a été calculé par l'équation de Ackers (1) pour la catalase et pour la thyroglobuline. Afin de vérifier si l'équation pouvait être utilisée dans le cas présent, on a déterminé le rayon Stokes "a" de la thyroglobuline à partir du rayon "r" des pores trouvé avec la catalase; le rayon "a" de la catalase a par la suite été déterminé à partir du rayon "r" trouvé à partir de la thyroglobuline. Les résultats sont présentés aux tableaux 5 et 6. Les rayons Stokes calculés par cette méthode se comparent très bien aux valeurs acceptées pour ces deux protéines (F 8%). Le rayon Stokes "a" de la GDH calculé par

Tableau 4

Résumé des mesures du poids moléculaire de la GDH

Poids moléculaire	Méthode	Remarques	Référence
1×10^6	Sédimentation et diffusion	Extrapolation à une valeur >4 mg/ml	(88)
1.25×10^6	Diffusion de la lumière	conc. 4 mg/ml	(69)
1.37×10^6	Diffusion de la lumière	0.84 mg/ml pH 7.75 Tris	(137)
7×10^5	Diffusion de la lumière	0.8 mg/ml pH 7.8 phosphate	(49)
8.75×10^5	Diffusion de la lumière	0.8 mg/ml pH 7.8 phosphate présence 10^{-4} DPNH	(49)
2×10^6	Diffusion de la lumière	4 mg/ml	(37)
$> 2 \times 10^6$	Diffusion de la lumière	>8 mg/ml	(34)

Figure 4
 Détermination du rayon Stokes "a" des protéines sur Sepharose 4B
 Courbe étalon

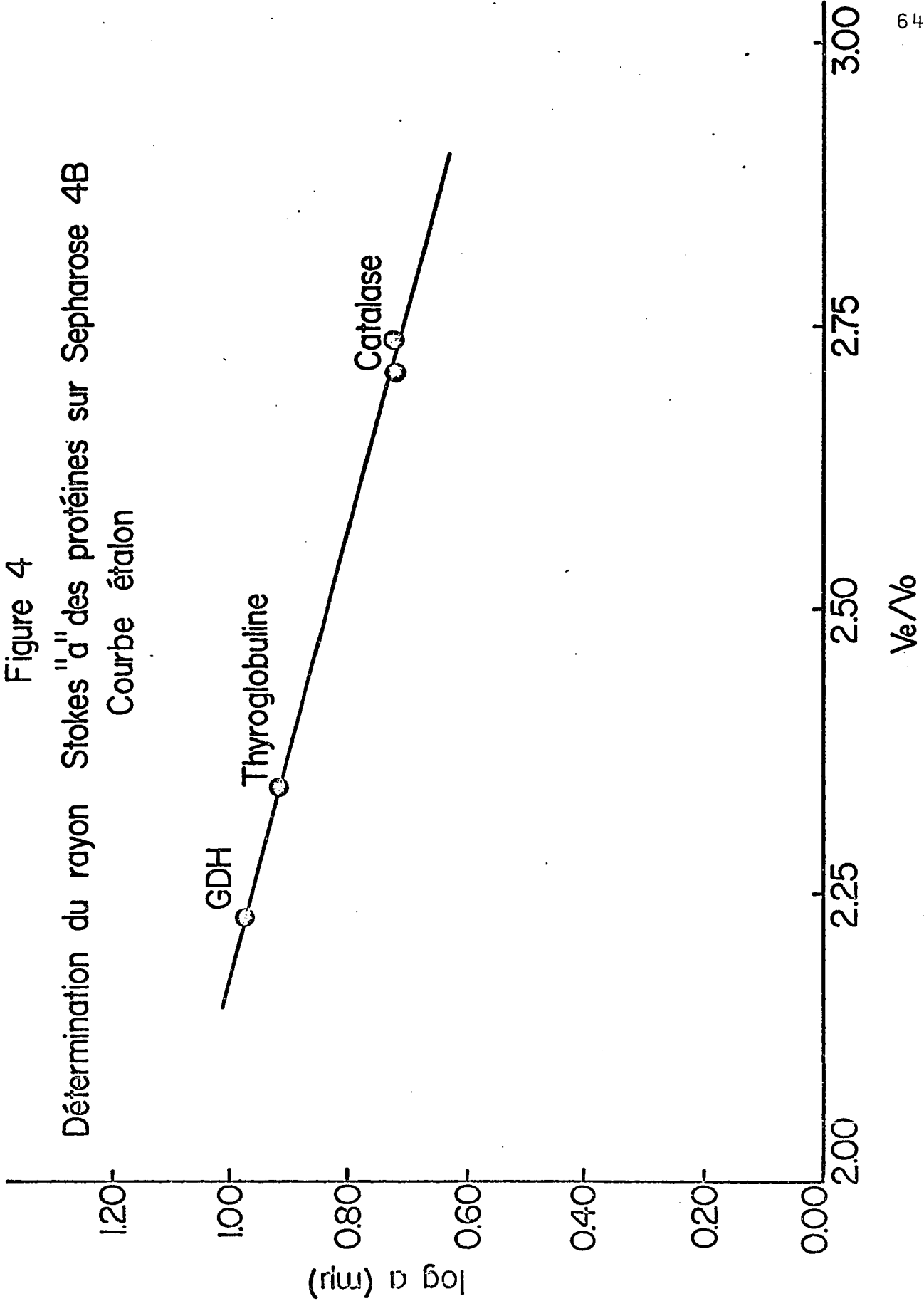


Tableau 5

Volume d'élution des protéines sur Sepharose 4B

Protéine	V_e	V_e/V_0	$a(\mu)$	$\log a$
Thyroglobuline (96)	137 cc	2.34	8.1	0.908
	137 cc	2.34	8.1	0.908
Catalase (31)	160 cc	2.74	5.23	0.719
	158 cc	2.71	5.23	0.719
Glutamique déshydrogénase	130 cc	2.22	-	-
	131 cc	2.24	-	-

Tableau 6

Rayon moyen des pores du Sepharose 4B

	$a(\mu)$	K_d	a/r	$r(\mu)$	$a(\text{calculé})$ (μ)
Catalase(31)	5.23	.729	.0727	71.9	4.82
		.714	.0772	67.7	
				69.8	
Thyroglobu- line (96)	8.1	.564	.1262	64.2	8.81
		.564	.1262	64.2	
				64.2	

Rayon moyen des pores
67.0

Déviatiion standard
3.7

cette méthode varie entre 9.68 et 9.51 μ (Tableau 7).

3) Ultracentrifugation.

a) Vitesse de sédimentation.

La figure 5 montre l'homogénéité de l'échantillon de GDH sédimenté à une concentration de 4.14 mg/ml à 59780 RPM. La vitesse de sédimentation de la GDH à cette concentration est 22.2 S (figure 6 et tableau 8) (un Svedberg vaut 10^{-13} sec.). La vitesse généralement donnée en unité Svedberg; $S_{20,w}$, est la valeur S qu'aurait une substance dans un solvant de même densité et viscosité que l'eau à 20°C . Les corrections sont faites selon la formule suggérée par Schachman (111).

$$S_{20,w} = S_{\text{obs}} \frac{(N_t)}{N_{20}} \frac{(N)}{N_0} \frac{(1 - \bar{V}_{P_{20,w}})}{1 - \bar{V}_{P_t}} \quad (1)$$

S_{obs} = vitesse de sédimentation mesurée

N_t = viscosité de l'eau à la température de l'expérience.

N_{20} = viscosité de l'eau à 20°C .

N/N_0 = viscosité relative du solvant.

$P_{20,w}$ = densité de l'eau à 20°C.

P_t = densité du solvant à la température de l'expérience.

\bar{V} = volume spécifique partiel de la GDH.

Dans cette expérience le premier facteur (N_t/N_{20}) est égal à l'unité; le second facteur (N/N_0) calculé par Svedberg et Pedersen (121) est égal à 1.045; la densité du solvant à 20°C mesurée directement à l'aide d'une balance Chainomatic Christian Becker N.Y. est de 1.0198g/cc; le volume spécifique partiel de la GDH est de 0.75 cc/g (34) (88).

$$S_{20,w} = 22.2 (1.000) (1.045) (1.069)$$

$$S_{20,w} = 24.8 \text{ S}$$

b) Coefficient de friction

A l'aide du rayon moyen de la GDH trouvé sur le Sepharose, on peut calculer le coefficient de friction de GDH.

$$f = 6 N_a$$

où

f = coefficient de friction

N = coefficient de viscosité

Tableau 7

Rayon moyen de la GDH

	a(m μ)	K _d	a/r	r(m μ)
Glutamique déshydrogé- nase	9.68 \pm 0.53	.514	.1445	67.0 \pm 3.7
	9.5 \pm 53	.521	.1419	67.0 \pm 3.7

Tableau 8

Vitesse de sédimentation de la GDH

Photo	Temps	ln X	Δt (sec.)
1	2.20	1.82554	180
2	2.24	1.84685	420
3	2.28	1.86767	660
4	2.32	1.89019	900
5	2.36	1.90908	1140

$$S = \frac{d \ln X}{\frac{dt}{60 w^2}} = \frac{8.70 \times 10^{-5}}{2\pi \left(\frac{59780}{60}\right)^2} = 22.2 \times 10^{-13} \text{sec} = 22.2S$$

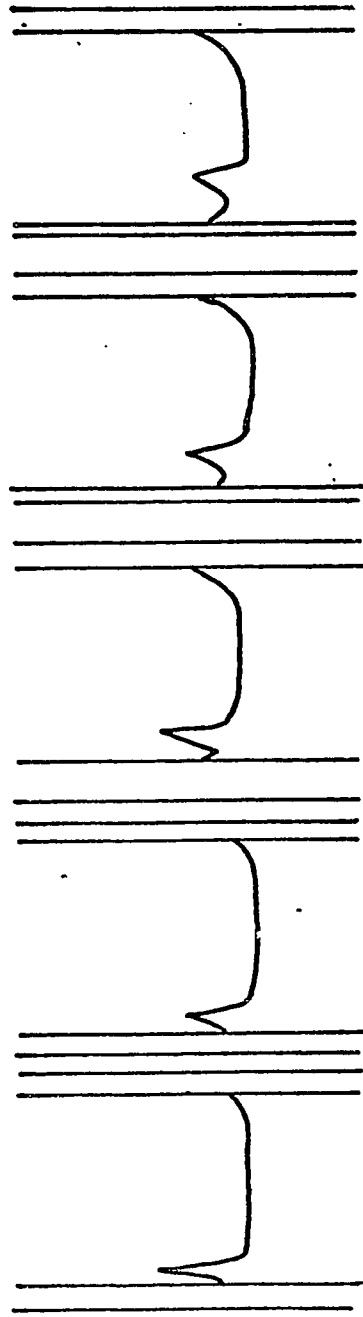
Tableau 9

Activité initiale de la GDH dans le phosphate

Molarité du phosphate dans solution	Activité initiale (V _i) (unités)	Molarité du phos- phate dans l'essai enzymatique
0.01	1.47	.044
0.05	1.50	.045
0.10	3.12	.047
0.50	1.96	.060
1.0	1.27	.077

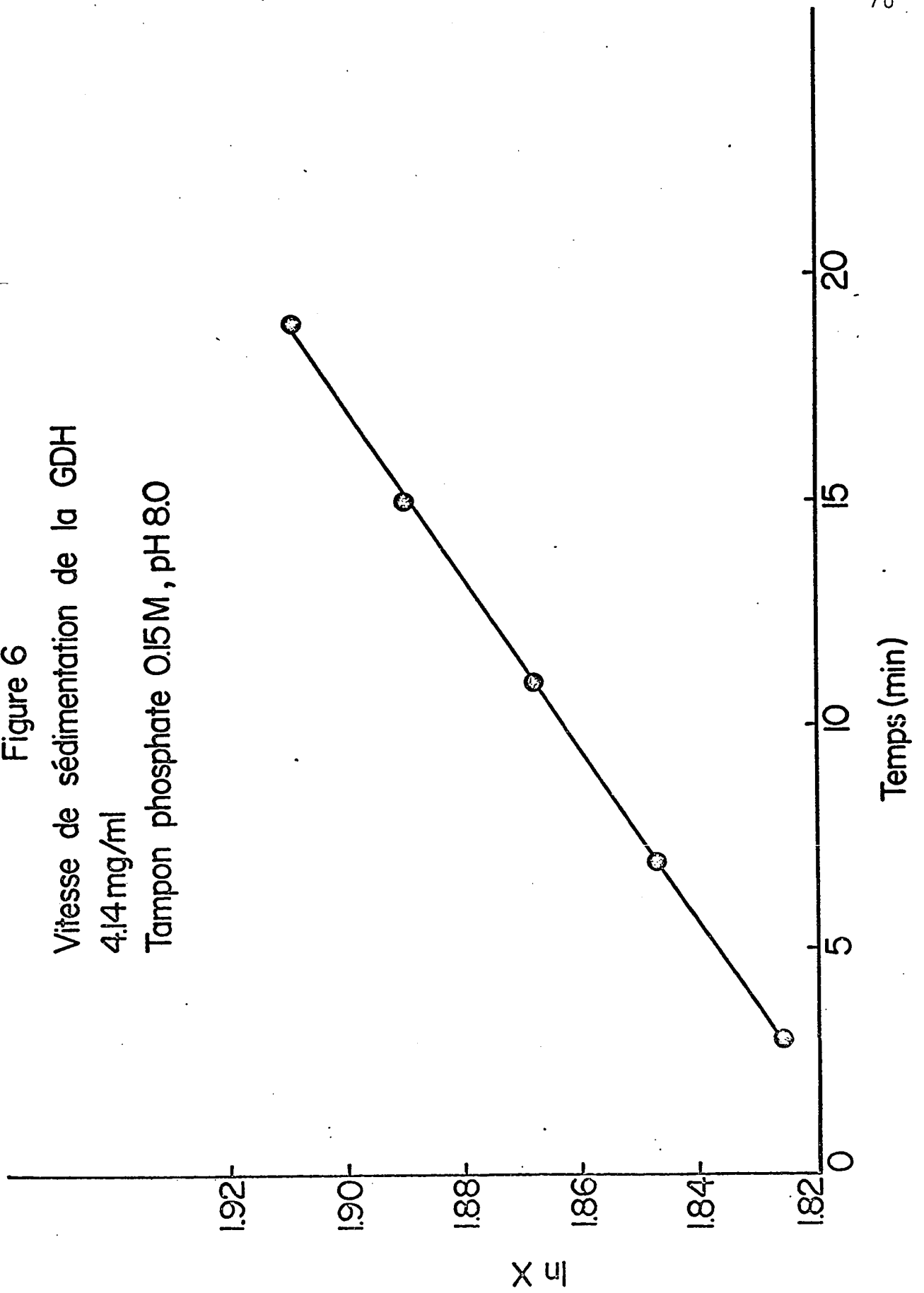
Figure 5

Ultracentrifugation de la GDH naturelle



Concentration : 4.14 mg/ml
Tampon : $K-PO_4$ 0.15M, pH8.0
Vitesse : 59,740 rpm
Température : 20°C

Figure 6
Vitesse de sédimentation de la GDH
4.14 mg/ml
Tampon phosphate 0.15M, pH 8.0



a = rayon Stokes

$$f = 6 \pi (1.047 \times 10^{-2}) (9.52 \times 10^{-7})$$

$$f = 1.8789 \times 10^{-7} \frac{\text{gm}}{\text{sec.}}$$

c) Coefficient de diffusion

L'équation de Einstein (32) (33)

$$D = \frac{k_T}{f}$$

où: $k =$ constante de Planck ($1.3805 \times 10^{-16} \frac{\text{erg.}}{\text{°K}}$)

permet de calculer la vitesse de diffusion, D , de la GDH.

$$D = \frac{1.3805 \times 10^{-16} \times 2.93 \times 10^2}{1.8789 \times 10^{-7}} = 2.1528 \times 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec.}}$$

d) Calcul du poids moléculaire.

L'équation de Svedberg permet de calculer le poids moléculaire de la GDH à partir des données précédentes.

$$M = \frac{RTS}{D(1-\nu)}$$

où $R =$ constante des gaz ($\frac{8.3143 \times 10^7 \text{ ergs}}{\text{°K. mole}}$)

$M =$ poids moléculaire anhydre

$$= \text{densité du solvant à } 20^{\circ}\text{C}$$

$$M = \frac{8.3143 \times 10^{-7} \times 2.93 \times 10^2 \times 24.8 \times 10^{-13}}{2.1528 \times 10^{-7} (1 - 0.75 (1.0198))}$$

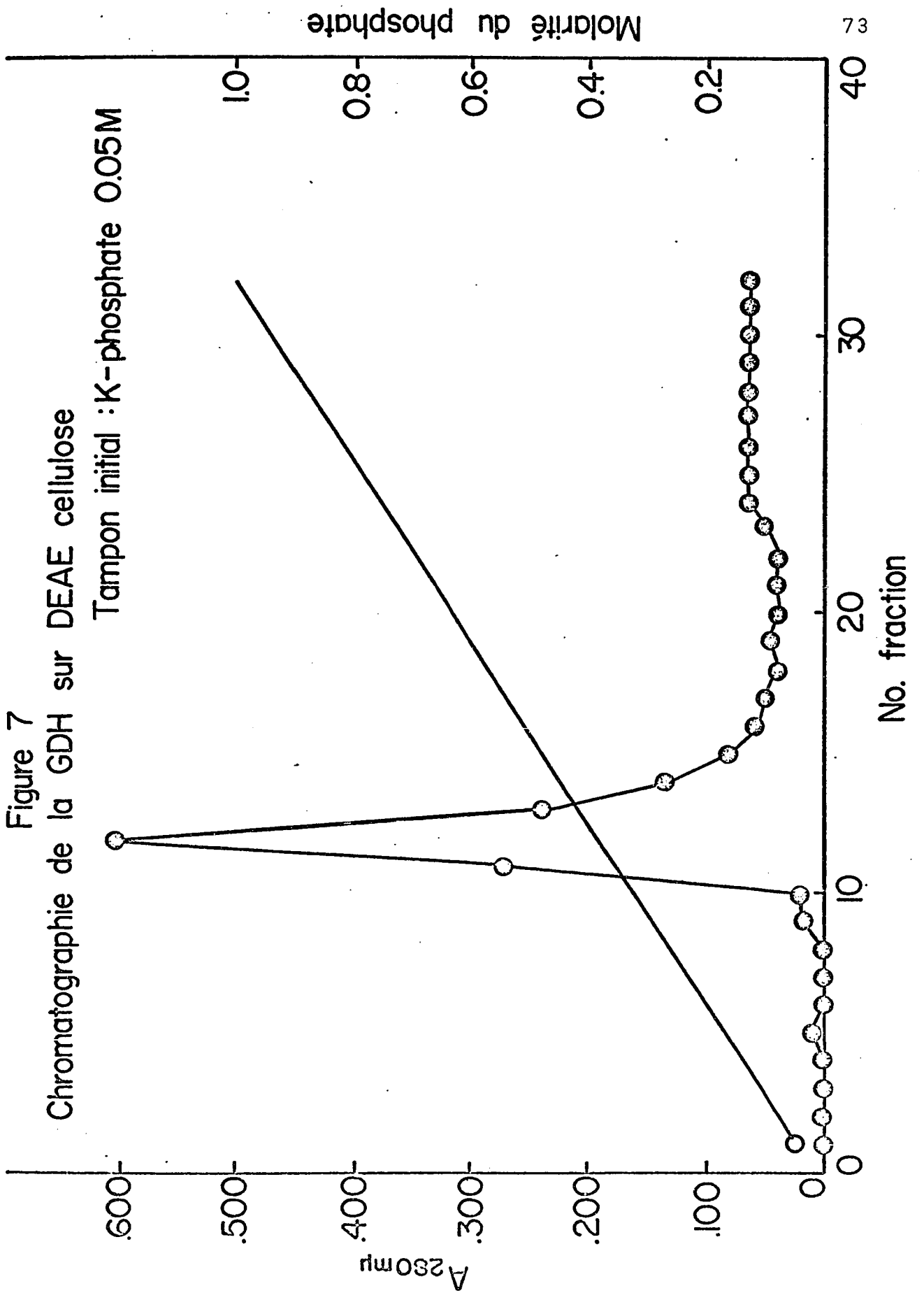
$$M = 1.19 \times 10^6$$

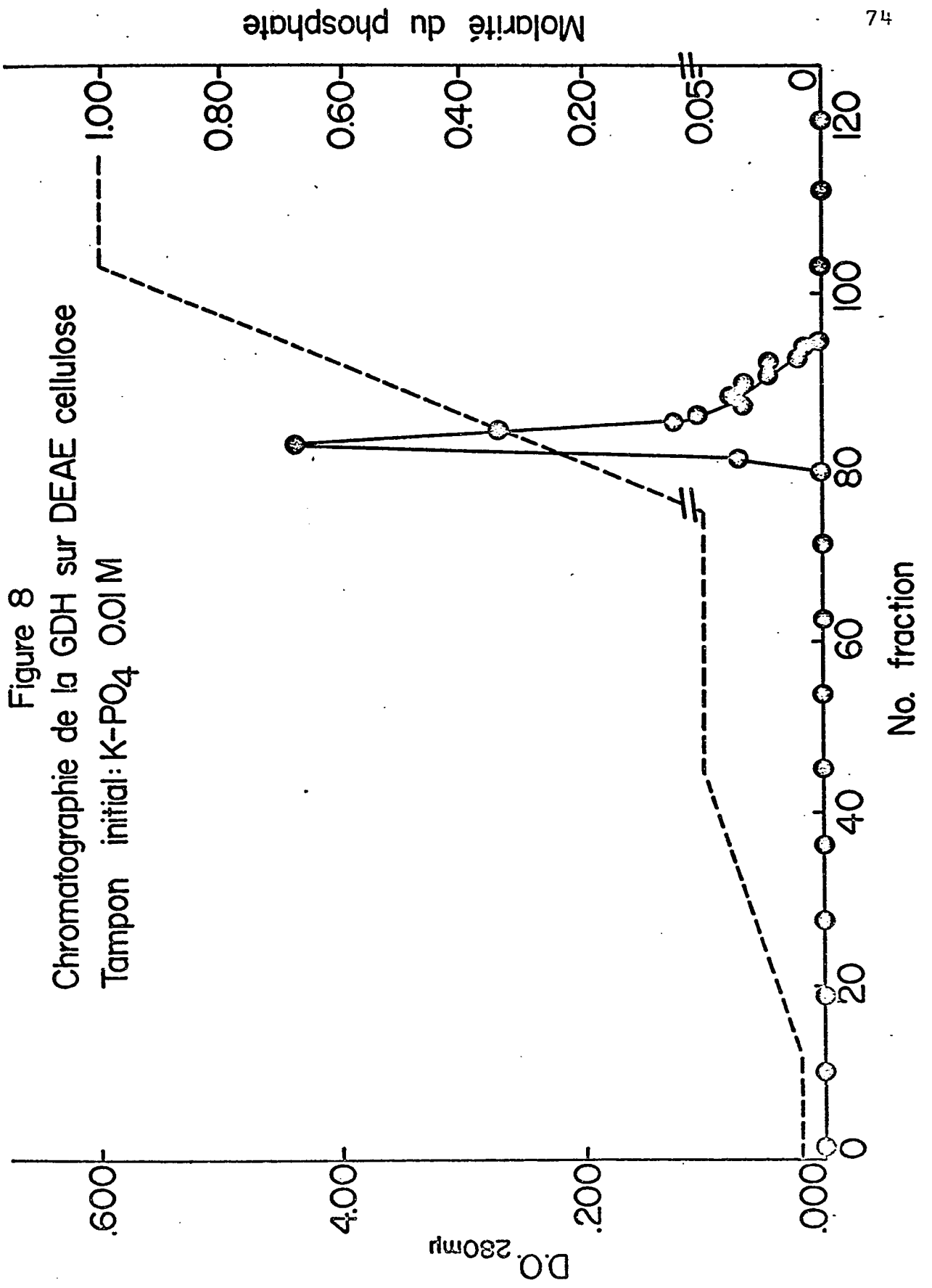
B. Chromatographie sur DEAE cellulose.

Après filtration de la GDH sur Sephadex G-25, on récupère environ 86% du produit initial ayant une activité spécifique de 1.18 unités/mg. La chromatographie sur DEAE cellulose donne le résultat présenté à la figure 7. Les fractions 11-17 contiennent 98.5% de protéine et 112% de l'activité appliquées sur la colonne. La chromatographie de la GDH sur DEAE cellulose équilibrée avec le tampon phosphate 0.01M donne le résultat présenté à la figure 8. On obtient un seul pic d'absorption qui contient 96.4% de la GDH appliquée sur la colonne. Ce chromatogramme confirme les expériences précédentes car on n'a pas décelé de traces d'impureté absorbant à 280 m μ par cette méthode. Pour certaines chromatographies sur DEAE cellulose, les fractions ont été analysées par le microbiuret (53); on n'a pas, à nouveau, décelé de traces d'impureté.

C. Electrophorèse sur acétate de cellulose

L'électrophorèse de la GDH sur acétate de cellu-





lose ne donne qu'une seule bande très nette à 5.3 cm de l'origine en direction de l'anode (fig. 9).

II- Stabilité de l'enzyme.

L'activité initiale, V_i , de la GDH varie avec la molarité du tampon phosphate utilisé comme solvant. (Tableau 9 et figure 10). On obtient un maximum d'activité enzymatique pour la GDH dans le tampon phosphate environ 0.1M. Dans ces conditions, la concentration effective de phosphate pour le dosage enzymatique est de 0.047M.

La période de préincubation à 25°C, nécessaire pour obtenir la moitié de l'activité initiale, $V_{i/2}$, dans le même tampon, peut être considérée comme un indice de stabilité de l'enzyme dans ce tampon. Plus ce temps est long, plus l'enzyme perd son activité lentement au cours de la période de préincubation. Les résultats obtenus sont indiqués au tableau 10 et à la figure 11. On obtient un maximum de stabilité dans le tampon phosphate 0.1M à pH 7.6.

L'activité initiale de la GDH dans le Tris-HCl 0.05M à pH 7.6 est deux fois plus élevée que celle que l'on obtient dans le tampon phosphate. Le tableau 11 montre aussi que cette augmentation de l'ac-

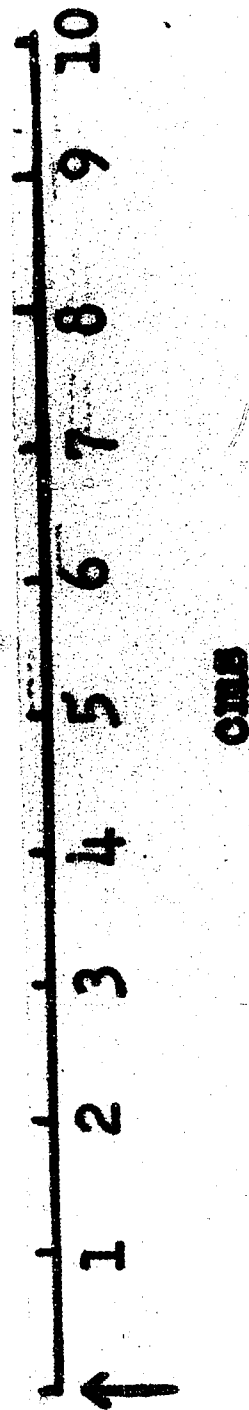


Figure 9

Electrophorèse de la GDH sur acétate de cellulose

Figure 10
Activité de la GDH dans le phosphate à pH 7.6

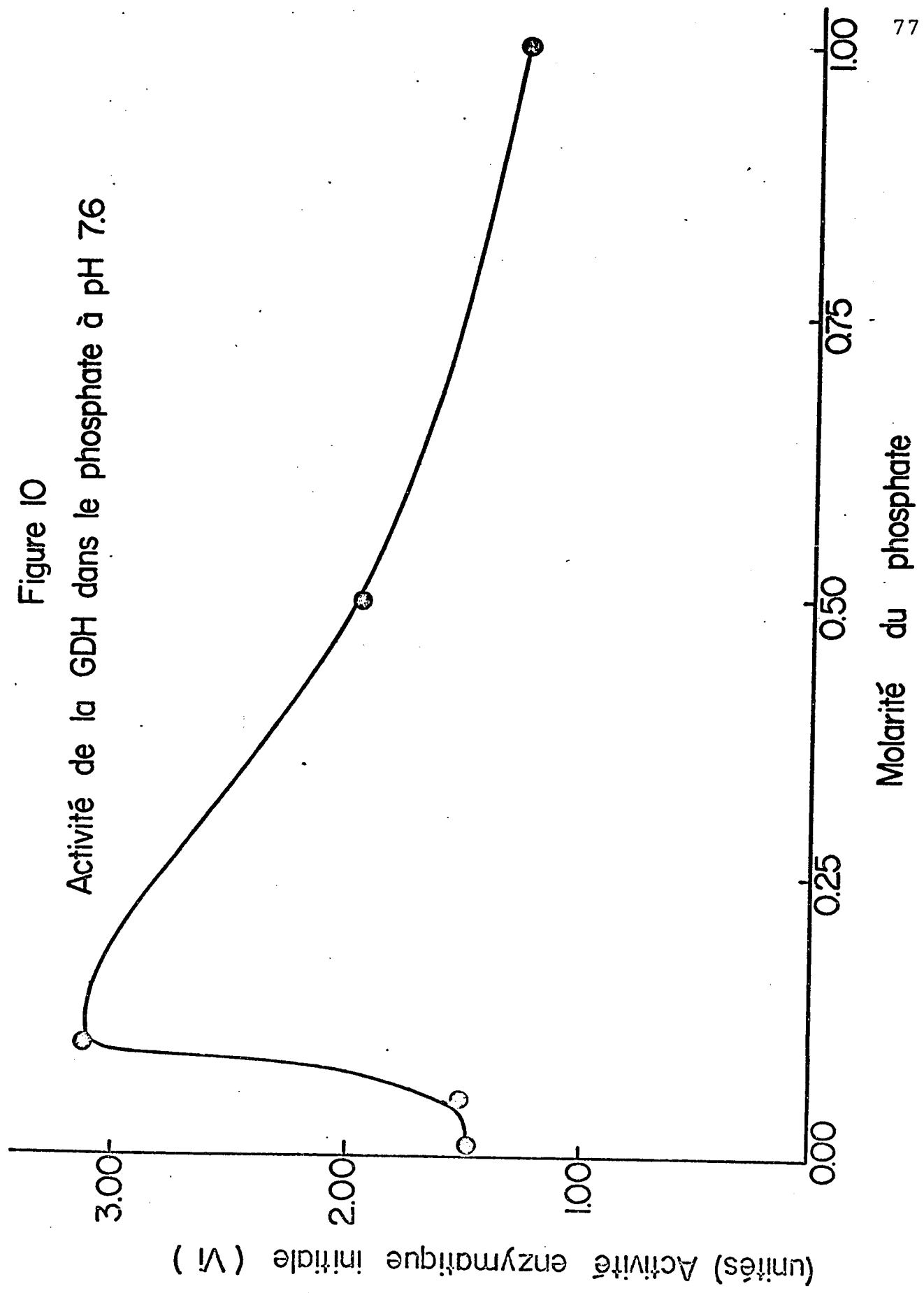


Tableau 10
Stabilité de la GDH dans le phosphate

Molarité du K-PO ₄	Temps (heures) pour obtenir V _i /2
0.005	1.5
0.01	4.5
0.05	235
0.1	425
1	300

Tableau 11
Activité et stabilité de la GDH

Tampon	V _i (unités)	Temps pour V _i /2 (heures)
0.05M K-PO ₄	1.50	235
0.05M Tris	3.11	200
0.01M K-PO ₄	1.47	4.5
0.05M K-PO ₄ + G-25	1.35	86
0.01M K-PO ₄ + G-25	0.50	0.5

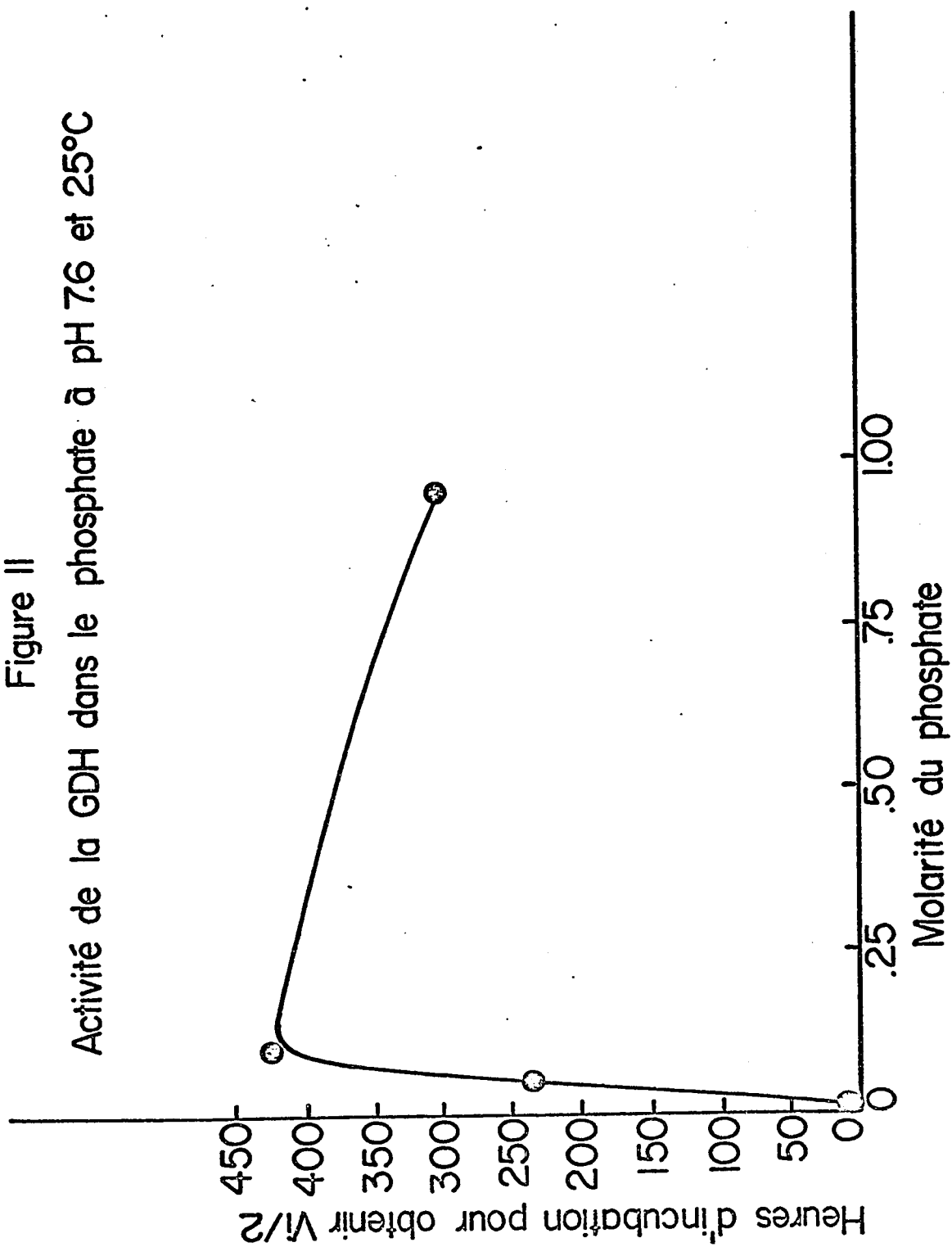
Tableau 12

Cinétique de la formation des subunités à l'aide du Sephadex G-200

Période de traitement de la GDH au PMB et SDS	Concentration relative de protéine	
	V _{e_i} = V ₀	V _{e₂} = 105-107 ml
4	++	+
12	+	++
24	0	+++

Figure II

Activité de la GDH dans le phosphate à pH 7.6 et 25°C



tivité se fait sans perte appréciable de la stabilité de l'enzyme. Magar (78) et Bayley (10) mentionnent, sans toutefois présenter les données, que l'enzyme est plus stable dans le phosphate que dans le Tris-HCl. Schoffeniels (112) rapporte en plus que l'activité initiale de l'enzyme dans le Tris est trois fois plus grande que dans le phosphate. Le tableau 10 présente aussi les résultats obtenus pour l'activité initiale et la stabilité de la GDH après passage sur une colonne de Sephadex G-25. Ces données sont comparées à celles que l'on obtient sans ce traitement dans les mêmes tampons. (figs 12 et 13).

III- Dissociation de la glutamique déshydrogénase en sousunités.

1) Carboxyméthylation.

Après la carboxyméthylation, le produit lyophilisé est flocculent et hygroscopique. On obtient un rendement de 143% en poids. Cette augmentation de poids ne peut être attribuée aux groupements carboxyméthyles seuls qui ne représentent que 0.05% du poids de la GDH (123). La vitesse de diffusion de l'urée à travers la membrane à dialyse dans ces conditions (77) est telle qu'après 24 heures le poids d'urée non

Figures 12

Activité de la GDH en fonctions de la période d'incubation à 25°C

○ 0.05M K-PO₄ à pH 7.6

● 0.05M K-PO₄ après filtration sur G-25

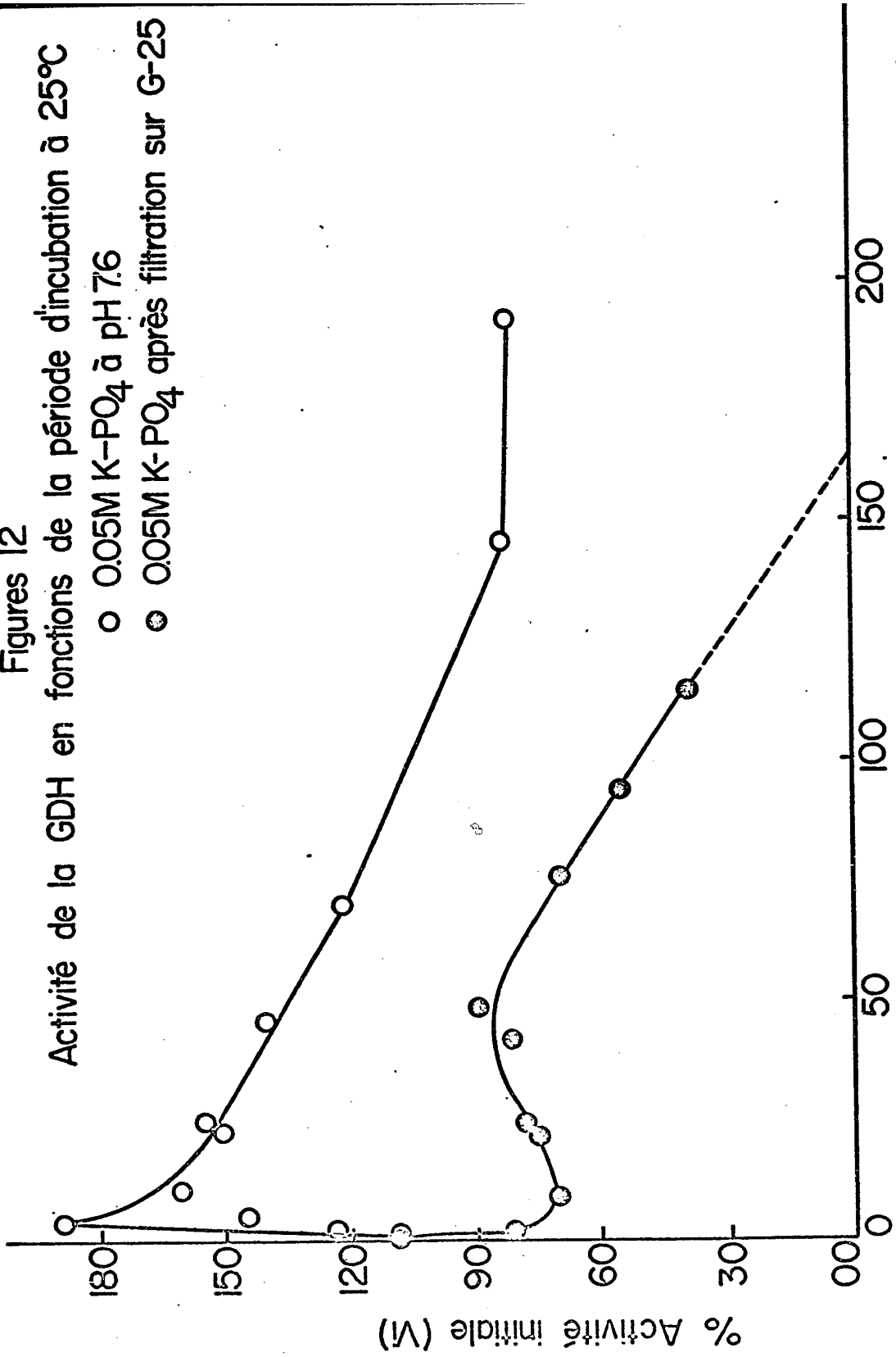
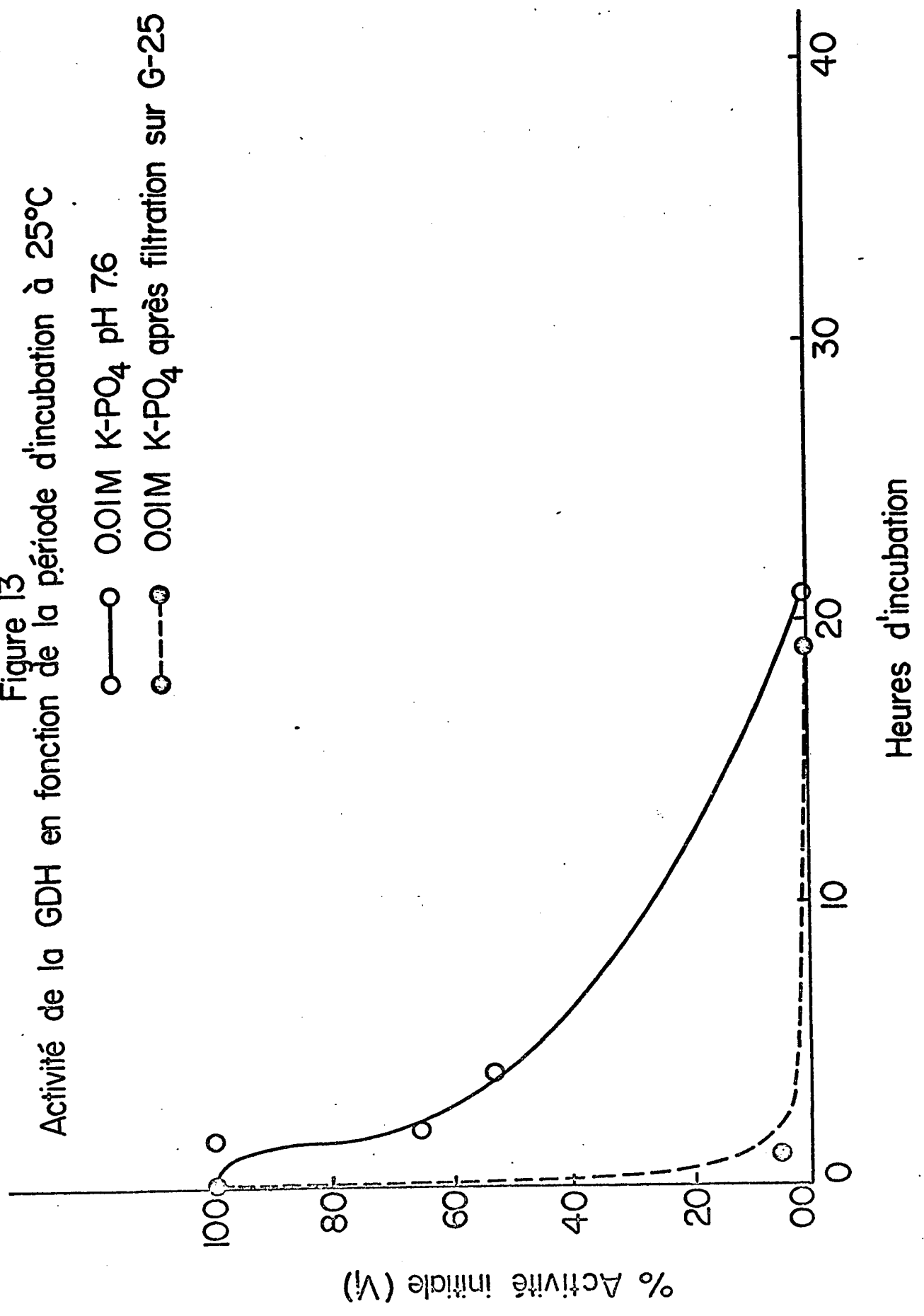


Figure 13
Activité de la GDH en fonction de la période d'incubation à 25°C

- 0.01M K-PO₄ pH 7.6
- - -○ 0.01M K-PO₄ après filtration sur G-25



Heures d'incubation

dialysée est inférieur à 0.1 mg. Cette augmentation de poids semble donc être due à une rétention d'eau qui ne peut être enlevée même après deux jours de lyophilisation.

2) Mercuribenzoylation.

Ce dérivé de la GDH a la même apparence physique que le précédent. On obtient cependant après 24 heures de dialyse et 72 heures de lyophilisation, un produit dont le poids est environ 17 fois celui de la GDH utilisée. Cette augmentation du poids de la GDH peut être attribuée ici à deux facteurs principaux: l'humidité et le détergent SDS non dialysé. Les lipides migrent très lentement au travers la membrane de dialyse; (79) après 24 heures on peut s'attendre à ce que la plus grande partie du détergent soit encore dans le sac à dialyse. Le traitement au chloroforme permet d'extraire 94% en poids du lyophilisat. Le rendement total en protéines est alors de 135 mg ou 103% du produit de départ. La filtration sur G-200 de la GDH traitée au PMB après différentes périodes d'incubation dans le détergent SDS permet de séparer deux formes de GDH de poids moléculaire différent. On obtient un

premier pic d'absorption à un volume d'élution, V_e , correspondant au volume d'exclusion V_0 , et un deuxième pic, à un volume d'élution, V_{e2} , de 105 - 107 ml. Ce volume d'élution, V_{e2} , est nettement supérieur au volume d'exclusion et correspond à un poids moléculaire semblable à celui des sousunités (voir section IV-I). Le tableau 12 donne la concentration approximative en protéines de chacun des pics après différentes périodes d'incubation.

IV- Caractérisation des sousunités.

1) Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.

Tel que mentionné à la section précédente (Tableau 12), la filtration de la GDH dénaturée pendant 24 heures dans le SDS ne révèle qu'un seul pic d'absorption à l'ultraviolet.

La filtration, dans les mêmes conditions, de protéines de poids moléculaire connu donne les résultats présentés au Tableau 13. A la figure 14, le volume d'élution réduit, V_e/V_0 (131) (28), est porté en graphique contre le logarithme du poids moléculaire. On trouve un rapport linéaire entre V_e/V_0 et le logarithme du poids moléculaire des protéines. A la figure 15, les

Tableau 13

Elution des protéines sur G-200 en présence de détergent SDS

	Poids moléculaire	Log P.M.	V_e	V_e moyen	V_e/V_0	K_d
Blue Dextran 2000	-	-	56.5-58.6	57.6	1	0
Albumine du sérum de boeuf (110)	66,500	4.823	97.7-97.0	97.4	1.70-1.68	0.35-0.36
Ovalbumine (28)	45,000	4.653	99.1-108	104	1.72-1.88	0.35-0.47
Pepsine (28)	35,500	4.550	111 -113	112	1.93-1.96	0.47-0.49
Chymotrypsine(110)	24,500	4.389	119	119	2.07	0.55
Glutamique Déshydrogénase	-	-	105-107-107	106	1.82-1.86	0.42-0.44

Figure 14

Détermination du poids moléculaire des protéines sur Sephadex G-200 en présence de détergent. (SDS)

Courbe étalon

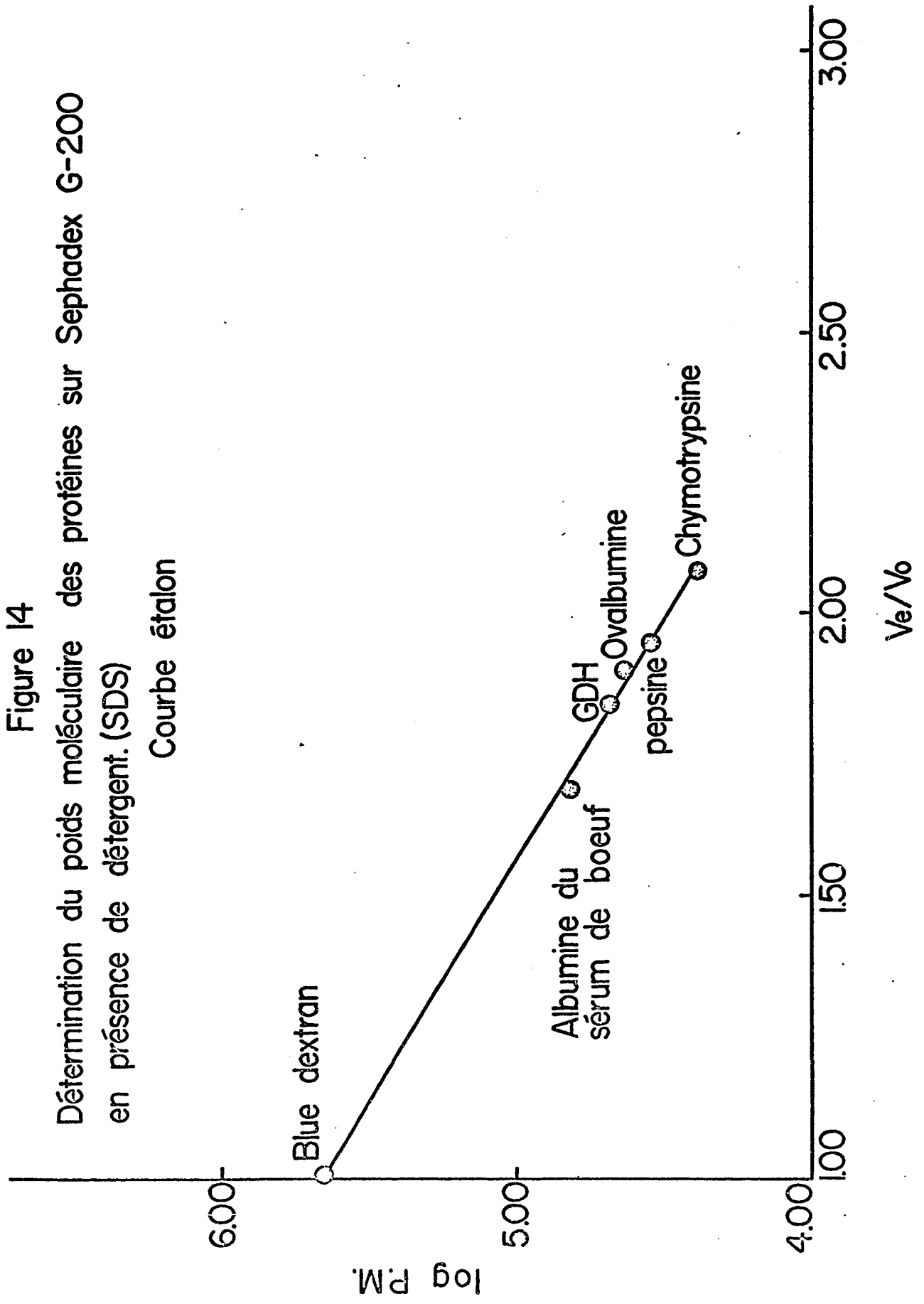
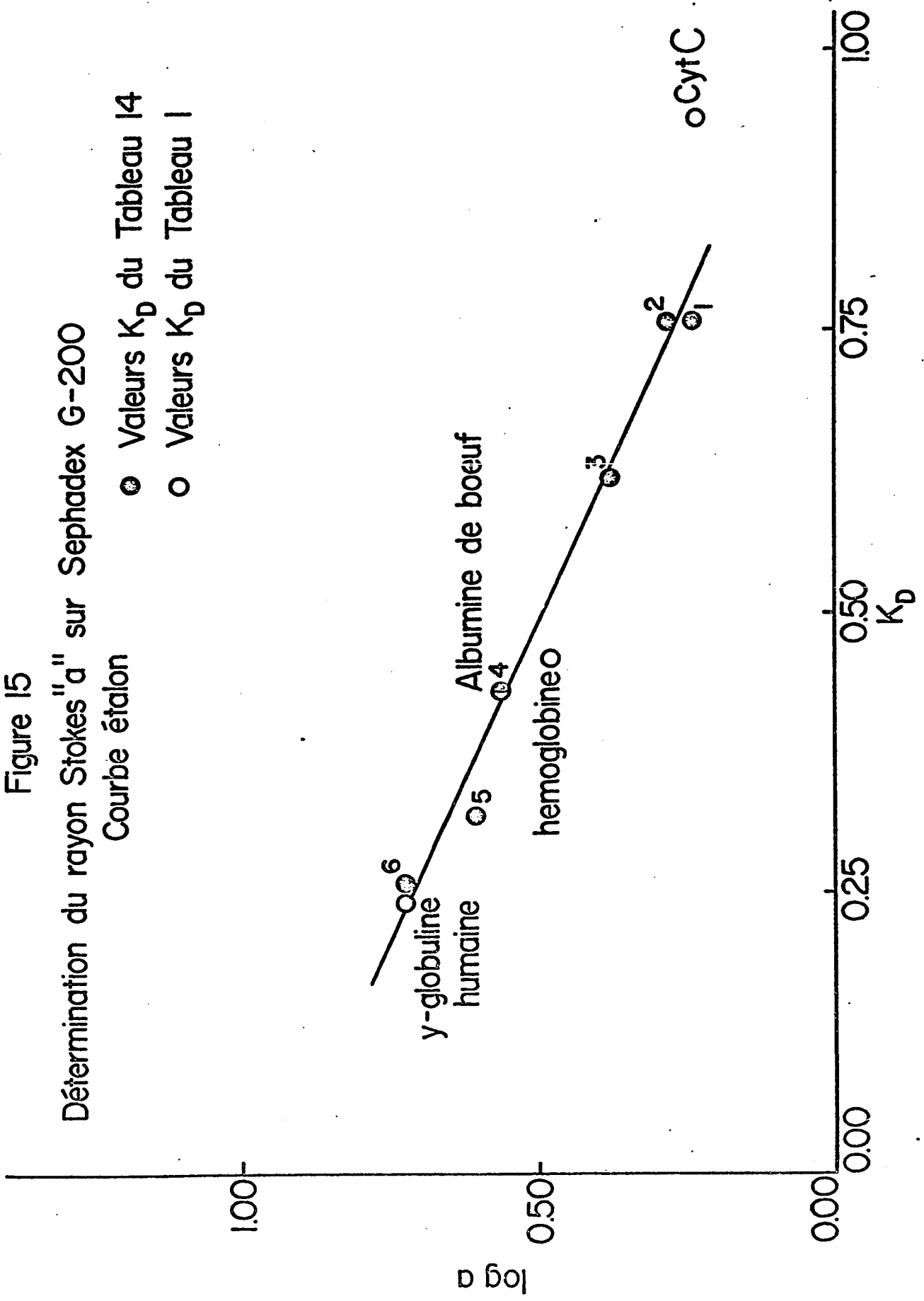


Figure 15

Détermination du rayon Stokes "a" sur Sephadex G-200

Courbe étalon

- Valeurs K_D du Tableau 14
- Valeurs K_D du Tableau 1



valeurs K_d présentées au tableau 1 sont portées en graphique contre le logarithme du rayon Stokes "a" des protéines. Les valeurs obtenues par Determann et Michel (28) sur Sephadex G-200 (Tableau 14) sont incluses dans le même graphique. Sauf, pour le cytochrome C, on remarque que ces résultats sont comparables. On obtient une régression linéaire entre le logarithme du rayon "a" des protéines et leur valeur K_d .

Si l'on compare les valeurs K_d obtenues pour ces protéines dans le détergent (Tableau 13) à celles que l'on obtient à la figure 14, on peut calculer le rayon effectif " a_e " de ces protéines dénaturées (Tableau 15). Les sousunités de la GDH ont un rayon " a_e " de 3.61 μ .

La différence ($a_e - a$) pour les molécules connues est égale à 0.23 a; en supposant que la différence ($a_e - a$) pour la sousunité est identique, on obtient un rayon Stokes "a" approximatif de 2.93 μ .

2) Electrophorèse des sousunités.

L'électrophorèse des sousunités carboxyméthylées de la GDH dans trois tampons contenant de l'urée 8M; de force ionique et de pH différents, ne donne qu'une seule bande après révélation au Ponceau S (fig. 16).

Tableau 14

Constante d'équilibre des protéines sur Sephadex G-200

No.	Protéine	K_d	$a(\mu)$
1	Cytochrome C	0.76	1.74
2	Ribonucléase	0.76	1.92
3	Trypsine	0.62	2.41
4	Albumine du sérum de boeuf	0.43	3.61
5	Transferrine	0.32	4.00
6	γ -globuline humaine	0.26	5.22

Tableau 15

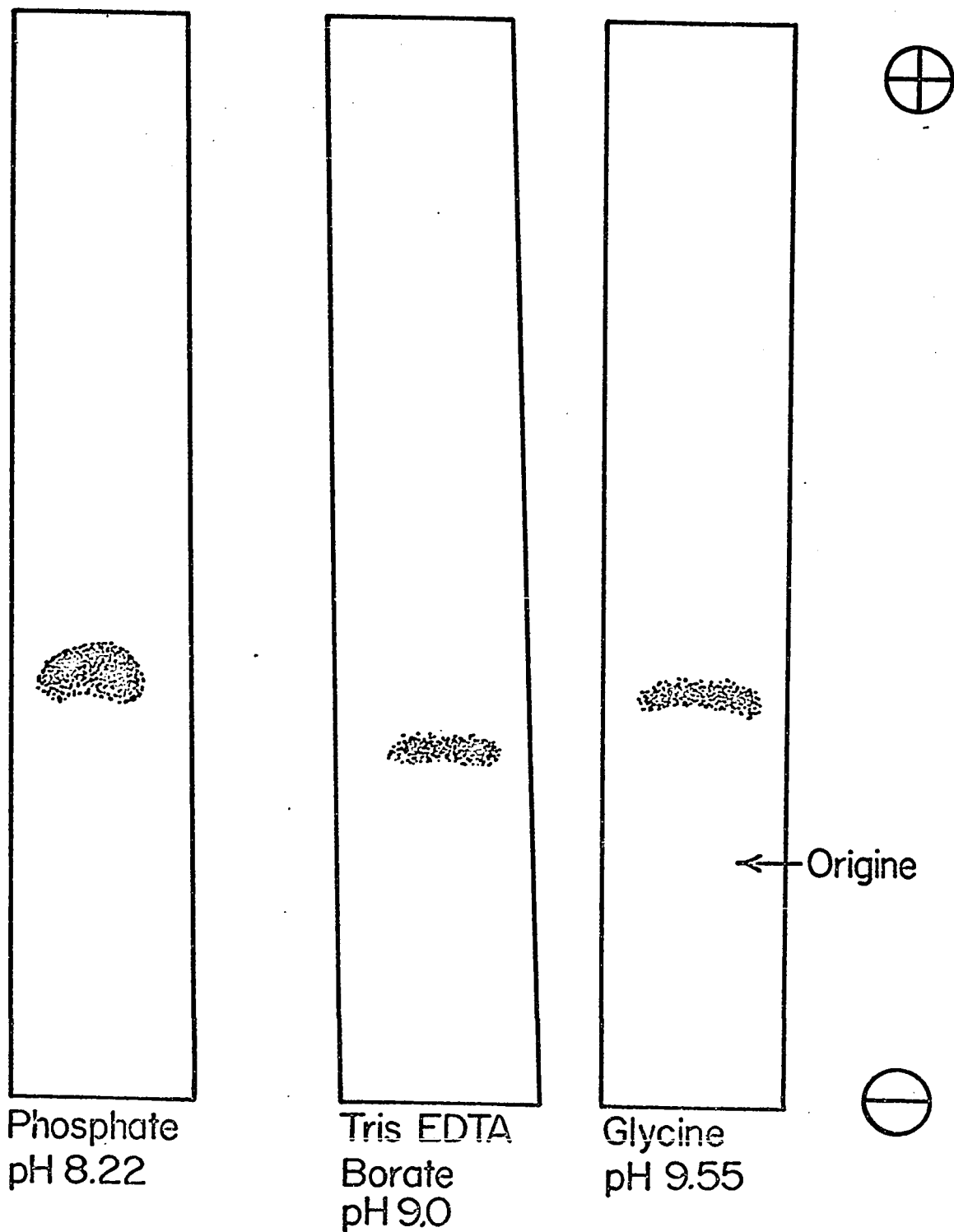
Rayon effectif des protéines sur Sephadex G-200

Protéine	a_{μ}	$a_e(\mu)$	$(a_e - a)_{\mu}$	$\frac{(a_e - a)}{a}$
Albumine du sérum de boeuf	3.61	4.06	0.45	0.12
Ovalbumine	2.80	3.72	0.92	0.33
Pepsine	-	3.24	-	-
Chymotrypsine	2.28	2.82	0.54	0.24
Glutamique déshydrogénase	-	3.61	-	-

 $(a_e - a)$ moyen = 0.23a

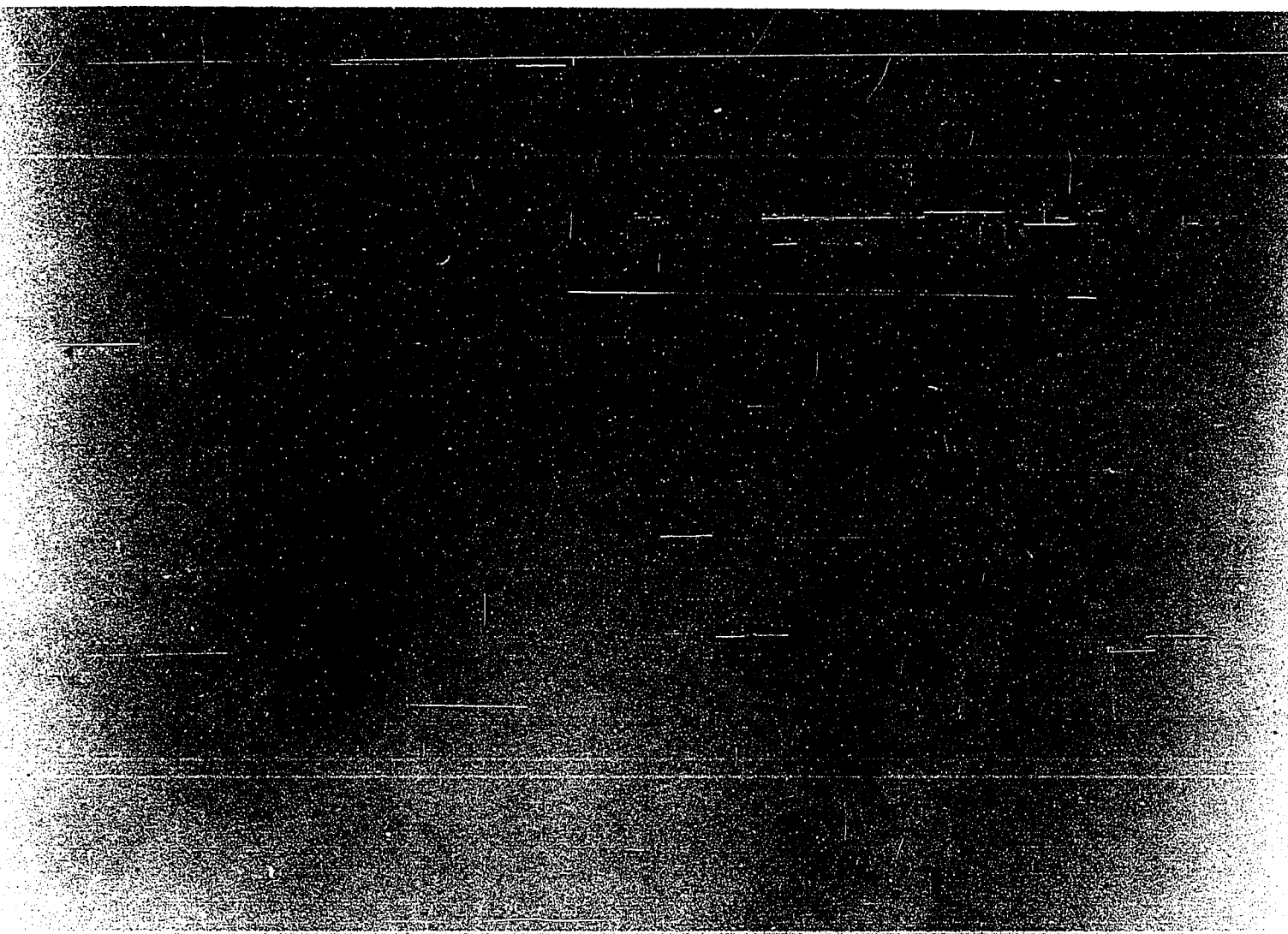
Figure 16

ELECTROPHORESE DE LA CM-GDH SUR
ACETATE DE CELLULOSE* CM-GDH SUR
160 V, 1.25mA / 10 cms



* Tous les tampons contiennent de l'urée 8M

Figure 17



Chromatographie bidimensionnelle de la fraction étherosoluble
de l'hydrolysate de DNP-GDH.

La netteté des bandes obtenues dans ces trois tampons permet de juger de l'homogénéité des sousunités de la GDH. L'électrophorèse sur papier dans des tampons contenant de l'urée a déjà permis de séparer les sousunités d'autres protéines (21) (105) (30). On trouve cependant un seul type de sousunité dans le cas de la GDH.

3) Détermination de l'acide aminé en position N-terminale de la GDH.

On obtient 62 mg de DNP-GDH à partir de 50-55 mg de GDH. Ce produit est insoluble dans l'acide acétique glacial, le détergent SDS ou la guanidine-HCl 6M à pH 8.5.

A. Analyse qualitative des dinitrophénylaminoacides.

i) Chromatographie des dérivés éthérosolubles.

La chromatographie bidimensionnelle de la DNP-OH, DNP-NH₂ et de la DNP-ala donne les valeurs R_f présentées au Tableau 16.

La chromatographie, dans les mêmes conditions, de 275 µl d'hydrolysate éthérosoluble de DNP-GDH, ne révèle que trois taches. Ces taches ont des valeurs R_f correspondant à la DNP-OH, DNP-NH₂ et DNP-ala. (Tableaux 16 et 17). Le dinitrophénol et la dinitroaniline sont

deux produits de dégradation que l'on obtient constamment après l'hydrolyse d'une DNP-protéine (101). La co-chromatographie de la fraction éthérosoluble et de dérivés connus confirme la présence de la DNP-ala, du DNP-OH et de la DNP-aniline (fig. 18).

ii) Chromatographie des dérivés hydrosolubles.

La chromatographie de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysate de DNP-GDH, dans les deux systèmes de solvants, n'a pas révélé de di-DNP-histidine ou d' \mathcal{L} -mono-DNP-arginine. La séparation des dérivés DNP dans le système butanol-acide acétique-eau (4: 1: 5) (107) est préférable à celle que l'on obtient dans le système de Blackburn et Lowther (19). Le tableau 18 montre les résultats obtenus dans ce système. La fraction hydrosoluble contient l'E-DNP-lysine et l'C-DNP-tyrosine; la lysine et la tyrosine réagissent avec le FDNB même lorsqu'elles sont placées à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique. L'absence d' \mathcal{L} -mono-arginine et de di-DNP-histidine confirme les résultats d'Apella et Tomkins (5). L'analyse qualitative de la GDH par dinitrophénylation a permis d'identifier la DNP-alanine comme seul dérivé DNP correspondant à la position N-terminale

Tableau 16

Valeurs, R_f , des DNP-aminoacides en chromatographie bidimensionnelle

Dérivé DNP	Tampon alcool amylique	Tampon phosphate
DNP-aniline	0.74	0.34
DNP-OH	0.33	0.46
DNP-alanine	0.34	0.57

Tableau 17

Valeurs, R_f , de la fraction éthérosoluble de l'hydrolysate de DNP-GDH

Dérivé DNP	Tampon alcool amylique	Tampon phosphate
1e tache	0.74	0.34
2e tache	0.33	0.49
3e tache	0.31	0.57

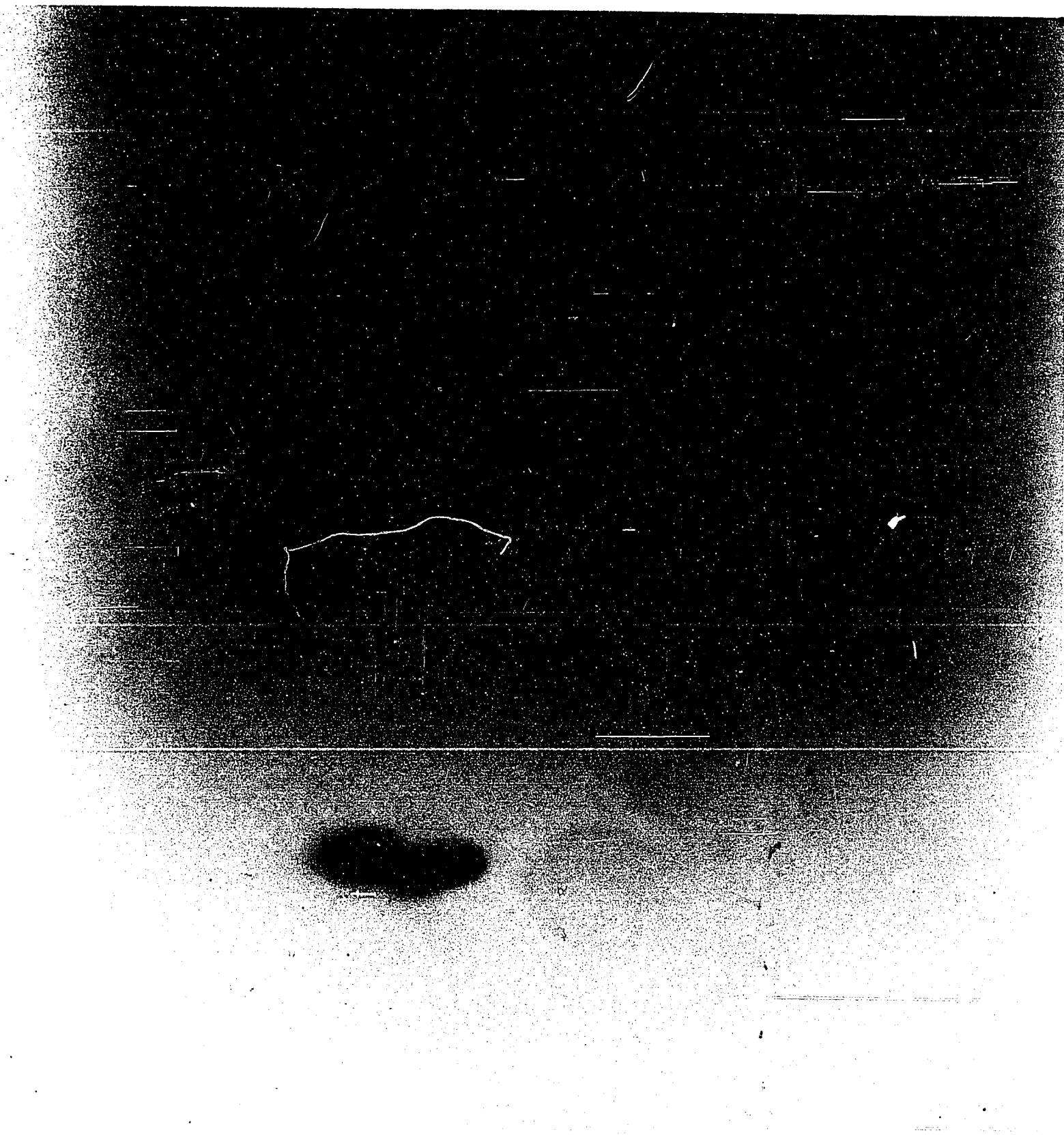
Tableau 18

Valeurs, R_f , de la fraction hydrosoluble de l'hydrolysate de DNP-GDH*

Dérivé DNP	R_f
E-DNP-lysine	0.39
di-DNP-histidine	0.95
\mathcal{L} -mono-DNP-arginine	0.45
O-DNP-tyrosine	0.66
Fraction hydrosoluble	0.38 0.63

* Système butanol-acide acétique-eau 4:1:5

Figure 18



Cochromatographie de la fraction éthersoluble de l'hydrolysate de DNP-GDH et d'échantillons connus.

de la GDH.

B. Analyse quantitative de la DNP-alanine.

a) DNP-DL-alanine-1-¹⁴C.

i) Electrophorèse.

La réaction à la ninhydrine n'a pu révéler de traces d'alanine libres dans la solution de DNP-ala radioactive. Dans ces conditions l'alanine migre à 5.4 cm de l'origine en direction de la cathode; la DNP-ala donne une bande jaune à l'origine. La détermination de la radioactivité après l'électrophorèse est présentée à la figure 19. On remarque une diffusion du dérivé DNP et un seul pic de radioactivité, correspond à la position de la DNP-alanine; aucune trace de ¹⁴C ne se trouve à la position de l'alanine.

ii) Chromatographie sur cellulose

La chromatographie unidimensionnelle de la DNP-ala radioactive ne révèle qu'une seule tache à 2.0 cm de l'origine dans le système de Blackburn et Lowther (19). Les valeurs R_f obtenues sont présentées au Tableau 19. On remarque que le R_f obtenu pour la DNP-ala-1-¹⁴C est inférieur à celui de la DNP-ala utilisée

Figure 19
Electrophorèse de la DNP-DL-ALA- $I-C^{14}$ à pH 2

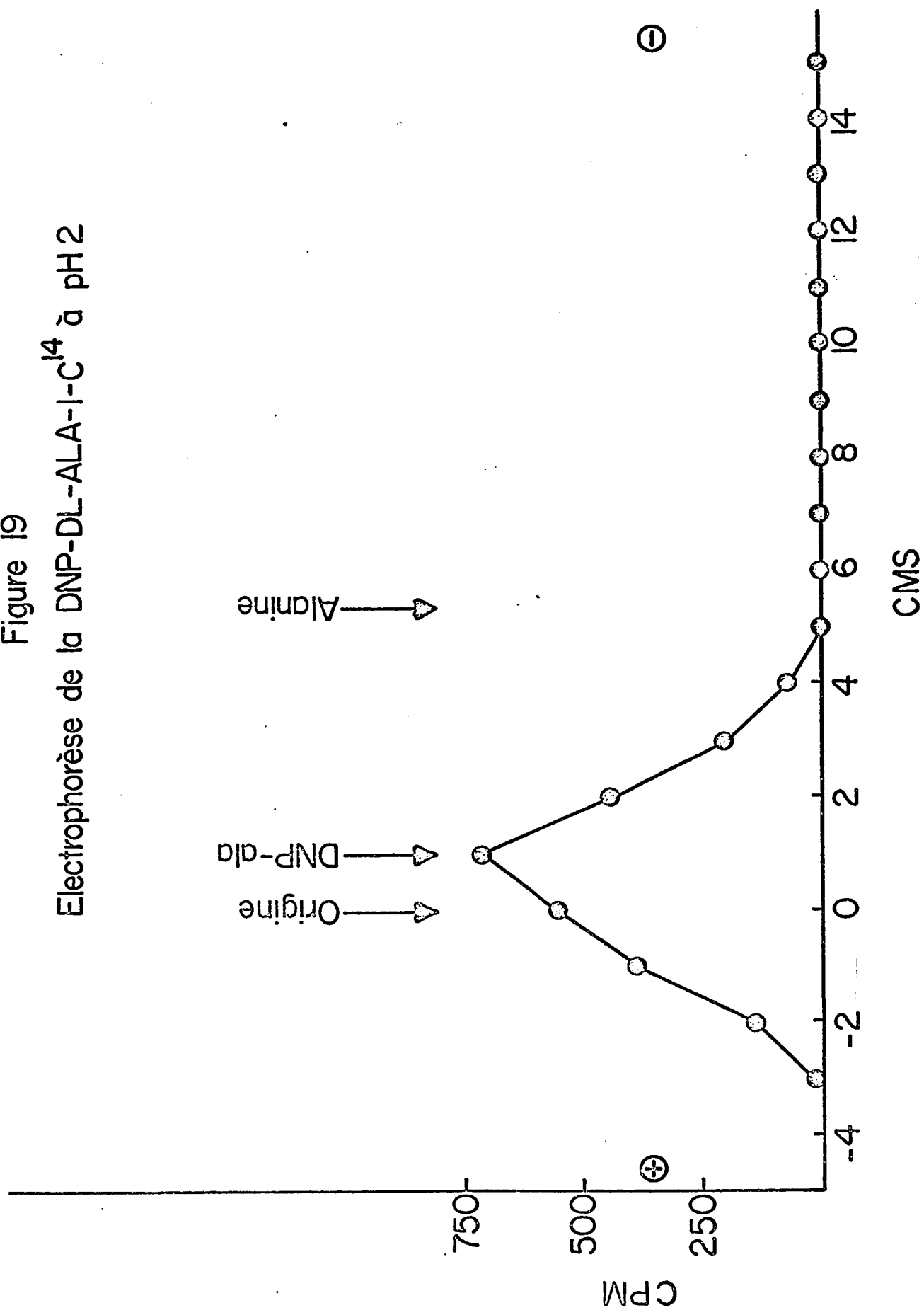


Tableau 19

Chromatographie unidimensionnelle de la DNP-ala-1-¹⁴C*

Dérivé DNP	R _f
DNP-OH	0.19 - 0.18
DNP-ala	0.29 - 0.30
DNP-ala-1- ¹⁴ C	0.25

* Système alcool amylique tertiaire-phthalate.

Tableau 20

Absorption de la DNP-ala à 360mu

MμMole DNP-ala/ml	D.O.	D.O. moyenne
17.66	.301 .305	.303
14.13	.237 .244	.241
8.83	.151 .148	.150
4.42	.072 .076	.074
2.21	.037 .035	.036

comme témoin; ceci est dû au fait que le dérivé radioactif a été appliqué sous la forme de sel de sodium, tandis que le témoin a été appliqué sous forme acide. On a remarqué ce phénomène à plusieurs reprises au cours de ces travaux. La figure 20 démontre l'absence d'impuretés radioactives dans la solution de DNP-ala-¹⁴C.

iii) Concentration

La courbe étalon de DNP-ala donne les résultats présentés au Tableau 20 et à la figure 21. La courbe obéit à la loi de Beer et on trouve un coefficient d'extinction molaire, E, de 1.70×10^4 pour la DNP-ala à une concentration de 8.83×10^{-6} M. La concentration de la solution de DNP-DL-ala-¹⁴C est de 872 millimicromole par ml.

b) Détermination du pourcentage d'humidité dans la DNP-GDH.

Les résultats de l'analyse de l'hydrolysat de la DNP-GDH sont présentés au Tableau 21. Partant des valeurs du tableau 21 et connaissant le contenu en acides aminés de la GDH pure, on peut calculer le poids de GDH correspondant et de là le poids de protéine dans l'échantillon de DNP-GDH avant l'hydrolyse. Ces résultats sont présentés au Tableau 22. On trouve un

Figure 20
Chromatographie de la DNP-DL-ALA-I-C¹⁴
sur cellulose.

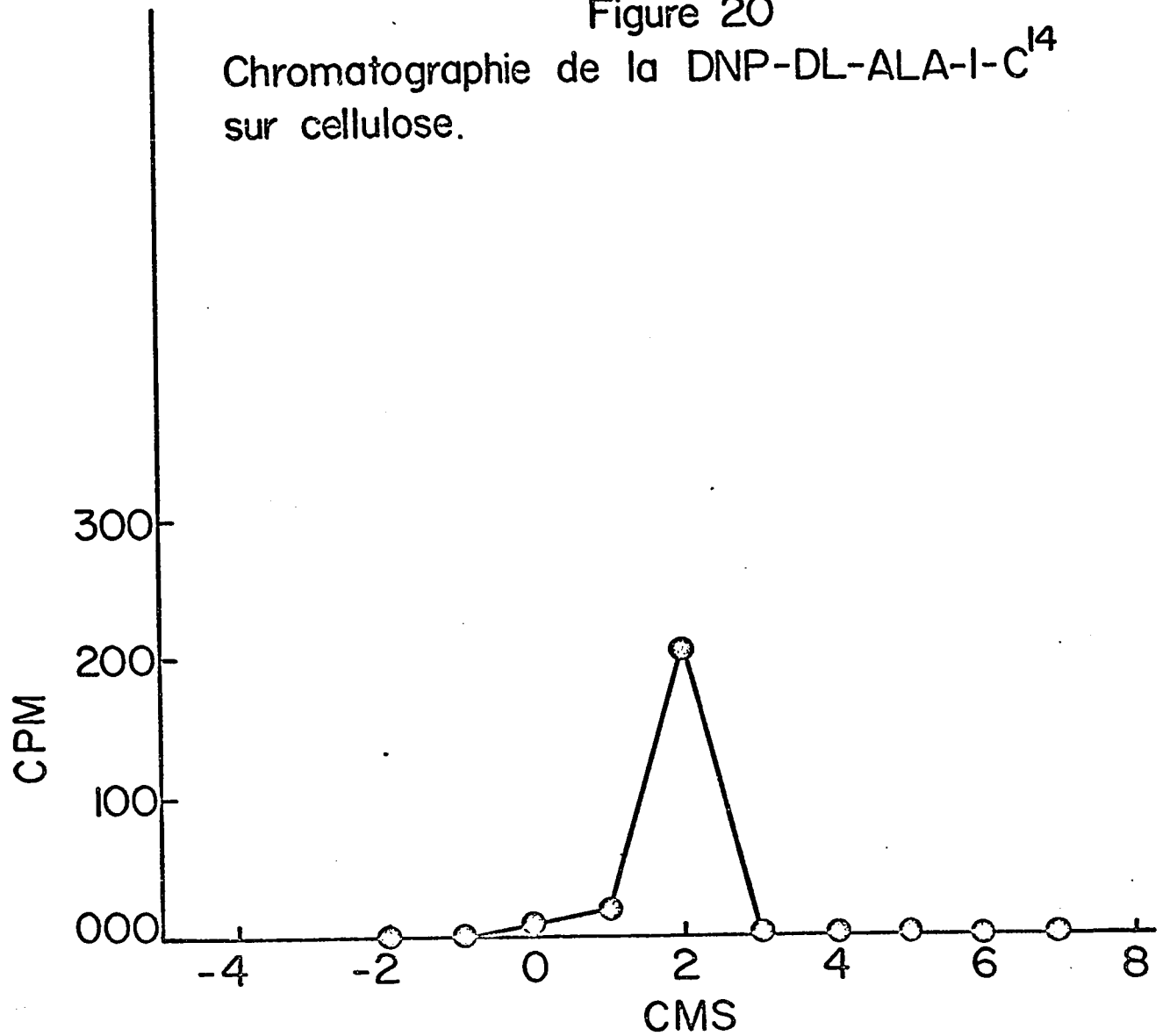


Figure 21
Courbe étalon de DNP-alanine

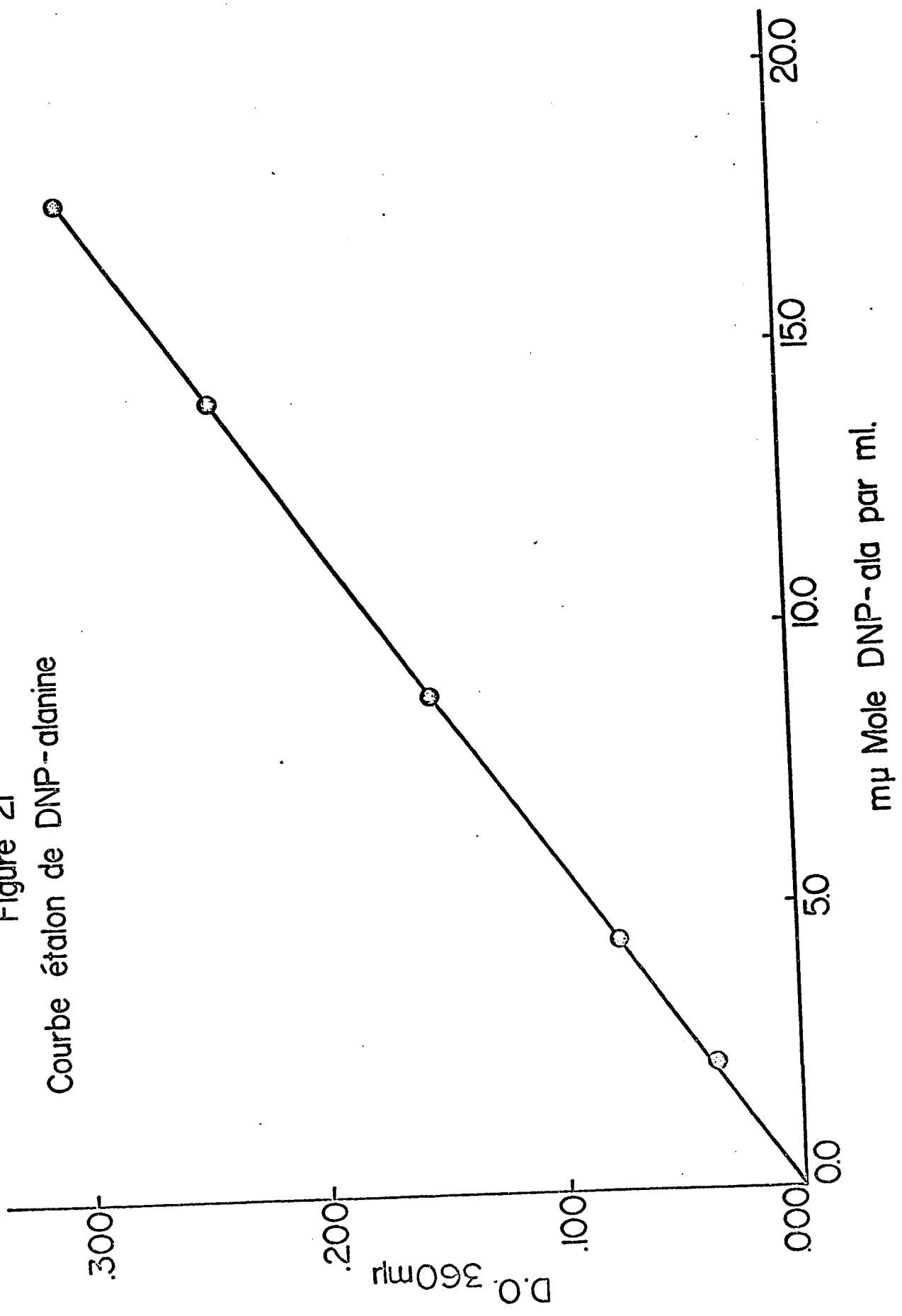


Tableau 21

Analyse quantitative des aminoacides de la DNP-GDH

Acide Aminé	Micromole d'acide par 10^{-5} g de GDH (5).	uMole d'acide		
		Echantil- lon 1	Echantil- lon 2	Echantil- lon 3
Valine	55.51	.684	.652	.880
Leucine	55.07	.720	.704	.880
Isoleucine	61.67	.776	.800	.988

Tableau 22

Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-GDH

Echantillon	mg de DNP-GDH	mg de GDH calculé			% de protéine
1	1.86	1.23	1.26	1.31	68.1
2	1.85	1.23	1.30	1.28	68.6
3	2.08	1.59	1.59	1.60	76.4

% moyen = $71.0 \pm 5\%$

un pourcentage moyen de protéine de 71.0% dans l'échantillon de DNP-GDH. Selon Biserte et coll. (15), une DNP-protéine contient approximativement 80% de protéine.

c) Elution et dosage des taches.

i) Courbe étalon de quenching.

La radioactivité est mesurée à 0°C aux conditions suivantes: Gate: 1200 volts, Data: 970 volts, canal 1 de la base à 5.0 volts et le canal 2 de la base à 9.9 volts. Les résultats sont présentés au tableau 23 et à la figure 22.

ii) Radioactivité spécifique de la DNP-DL-ala-1-¹⁴C.

La radioactivité de la solution de DNP-DL-ala-1-¹⁴C à 872 millimicromole par ml mesurée à l'aide de 3 échantillons de 10 µl donne le résultat présenté au tableau 24.

La DNP-ala-1-¹⁴C a une activité spécifique de $1.024 \pm 0.037 \times 10^5$ DPM par micromole ou 1024 ± 37 DPM par 10 µl de solution.

d) Calcul de la concentration de DNP-ala terminal.

La concentration de DNP-ala est déterminée par spectrophotométrie à 360 mµ. La radioactivité est

Tableau 23

Détermination du degré de "quenching" à l'aide d'échantillons étalonnés

Echantillon	CPM		% d'efficacité du canal 2	CPM#1/CPM#2
	Canal 1	Canal 2		
1	114620	177698	69.96	.645
2	133493	170871	67.27	.781
3	128932	144668	56.96	.891
4	107988	113535	44.70	.951
5	106089	110784	43.62	.958
6	74654	75851	29.86	.984

Figure 22
Courbe étalon de "Quenching"

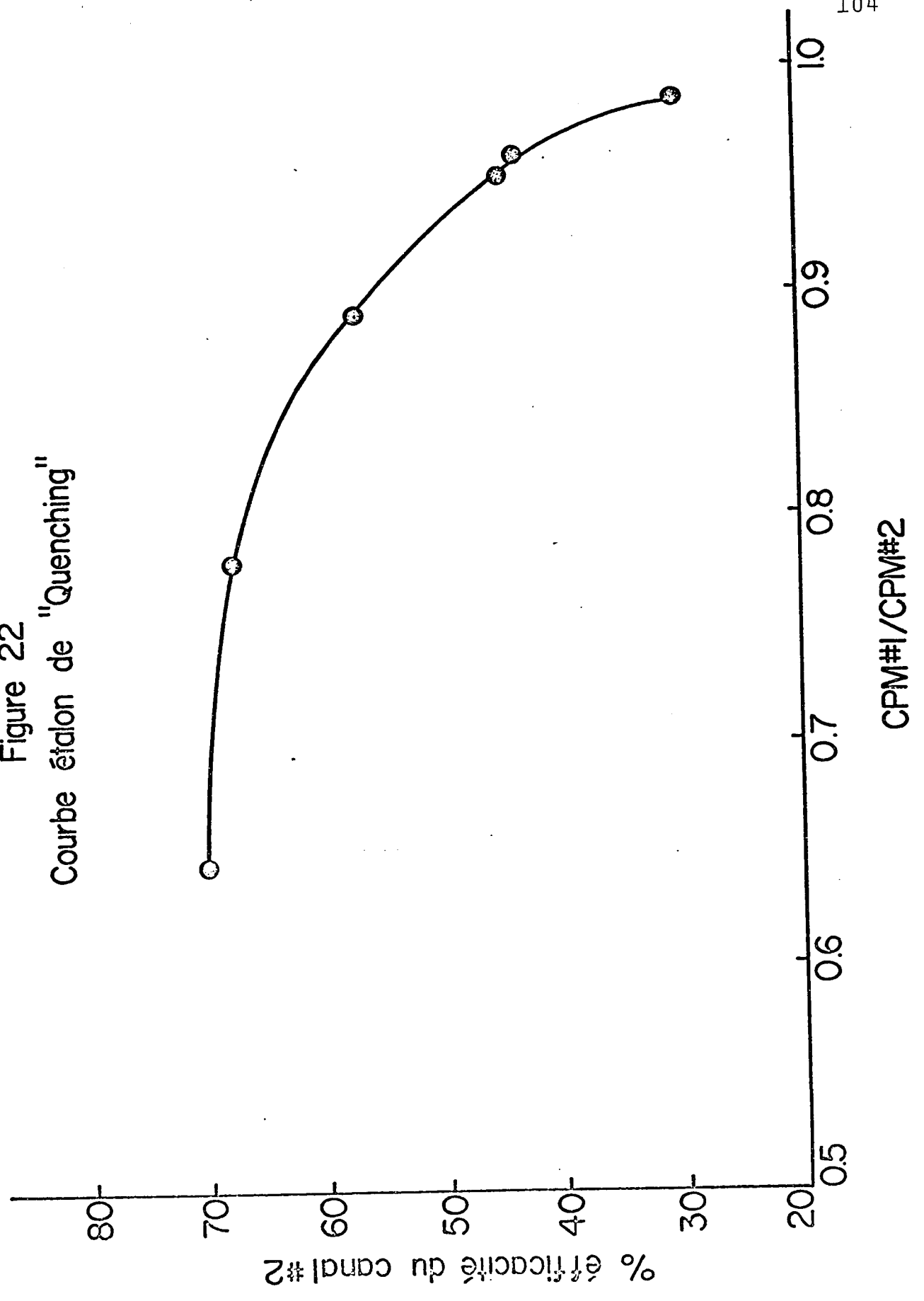


Tableau 24

Radioactivité spécifique de la DNP-ala-¹⁴C¹⁴

Echantillon	CPM canal 2	CPM#1 / CPM#2	% efficacité	DPM (CPM-Blanc) X $\frac{100}{\% \text{ efficacité}}$
Témoin	41.0	-	-	-
1	440.9	0.957	43.5	919.3
2	426.5	0.959	42.7	902.8
3	416.5	0.955	43.8	857.3
Moyenne: 893.1 ± 32.2 DPM				

Tableau 25

Radioactivité de la fraction éthérosoluble de l'hydrolysate de DNP-GDH

Echantillons	CPM canal 2	CPM#1 / CPM#2	% efficacité	DPM*
1	79.2	0.900	55.3	82.9
2	84.3	0.907	54.0	96.2
3	78.8	0.903	54.7	87.3
4	121.5	0.928	49.5	200.0

* DPM = (CPM-Blanc) X $\frac{100}{\% \text{ efficacité}}$ X 3.0 ml / 2.5 ml

déterminée dans les mêmes conditions que précédemment et les valeurs sont corrigées de la même façon. Le pourcentage de récupération correspond au pourcentage de la radioactivité mesurée après l'élution des taches. La quantité originale DNP-alanine N-terminale dans chacun des échantillons est calculée par la formule suivante:

$$(A - BC)E = D$$

où: A = nombre de millimicromoles de DNP-ala mesurée à 360 mu.

B = nombre de millimicromoles de DNP-ala-¹⁴C ajoutées à chaque échantillon ou 8.72 millimicromoles.

C = pourcentage de récupération.

D = quantité originale de DNP-alanine N-terminale

E = 100/C

Les résultats sont présentés aux tableaux 25 et 26. La dernière colonne du Tableau 26 donne la concentration de DNP-ala N-terminale dans quatre échantillons différents.

e) Calcul du poids moléculaire des sousunités.

Partant du poids de GDH dans l'échantillon de DNP-

Tableau 26

Détermination quantitative du dérivé N-terminal de la GDH

Echantillon	muMoles DNP-ala (A)	DPM	% récupération	muMoles DNP-ala N-terminale (D)
1	3.87	82.9	9.28	32.97
2	6.45	96.2	10.77	51.17
3	2.95	87.3	9.77	21.49
4	8.10	200.0	22.39	27.47

Tableau 27

Quantité d'alanine N-terminale par sous-unité de GDH

Echantillon	muMoles DNP-alanine terminale	mg GDH	Moles alanine terminale/47,500g GDH
1	32.97	1.57	1.00
2	51.17	2.93	0.83
3	21.49	1.15	0.89
4	27.47	1.42	0.92
moyenne			0.91 ± 0.07

GDH et de la quantité de DNP-ala-N-terminale obtenue, (tableau 26) on peut calculer le poids moléculaire des sousunités. On obtient 0.91 ± 0.07 moles de dérivé N-terminale par 47,500 g de GDH (tableau 27); cette valeur correspond à un poids moléculaire de 52,000 \pm 3,700 pour les sousunités.

Le poids moléculaire des sousunités trouvé par filtration sur gel (IV-1) est de 47,500.

V- Propriétés de l'enzyme succinylée.

La succinylation de la GDH s'accompagne d'une diminution de la turbidité de la solution qui est visible à l'oeil nu. L'enzyme succinylée est très soluble dans le tampon Tris-HCl 0.05M à pH 8. On peut conserver l'enzyme à 25°C pendant une semaine sans augmentation de la turbidité.

1) Densité optique.

Le coefficient d'extinction, $E_{279\text{mu}}^{1\%}$, de la GDH succinylée est de 9.48. Les valeurs trouvées par Sund et Akeson (122) et Olson et Anfinsen (88) pour la GDH naturelle sont respectivement $E_{280\text{mu}}^{1\%} = 9.50$ et $E_{279\text{mu}}^{1\%} = 9.73$. La différence de 3% entre les coefficients d'extinction de l'enzyme naturelle et succinylée

est de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale. Il n'y a donc pas de différence significative entre ces deux valeurs.

2) Activité enzymatique

L'enzyme succinylée ne possède aucune activité de déshydrogénase glutamique aux deux concentrations étudiées. Colman et Frieden (24) ont obtenu des résultats semblables par acétylation de la GDH avec un excès d'anhydride acétique.

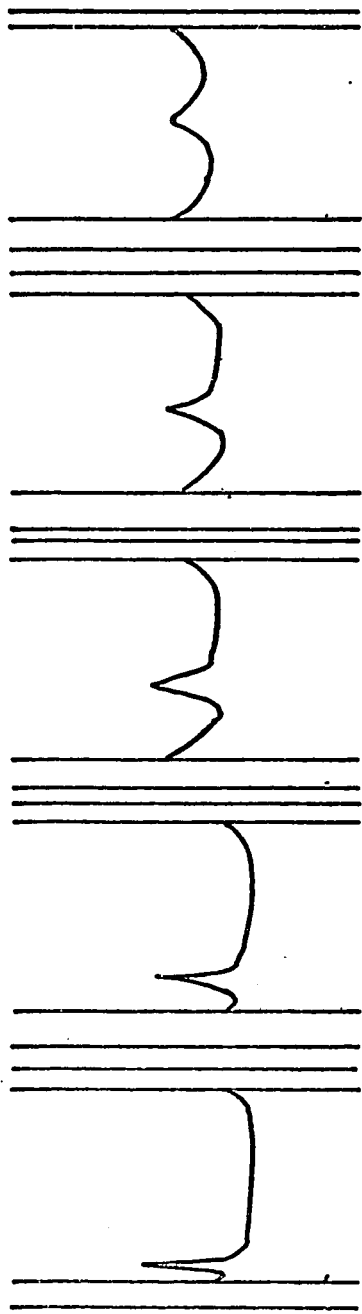
3) Vitesse de sédimentation.

La figure 23 montre l'homogénéité de la glutamate déshydrogénase succinylée sédimentée à une concentration de 4.14 mg/ml et à 59,780 RPM. La vitesse de sédimentation, à cette concentration, est de 21.0 S (fig. 24 et tableau 28).

4) Electrophorèse

L'électrophorèse de la GDH succinylée sur acétate de cellulose ne révèle qu'une seule bande qui demeure à l'origine après 2 heures sous un potentiel de 100 volts à 0.275 mA par cm. Dans les mêmes conditions, l'enzyme naturelle se déplace d'environ 2.8 cm en direction de l'anode.

Figure 23
Ultracentrifugation de la GDH succinylée



Concentration: 4.14 mg/ml
Tampon: K-PO₄ 0.15M, pH 8.0
Vitesse: 59,740 rpm
Temperature: 20°C

Figure 24

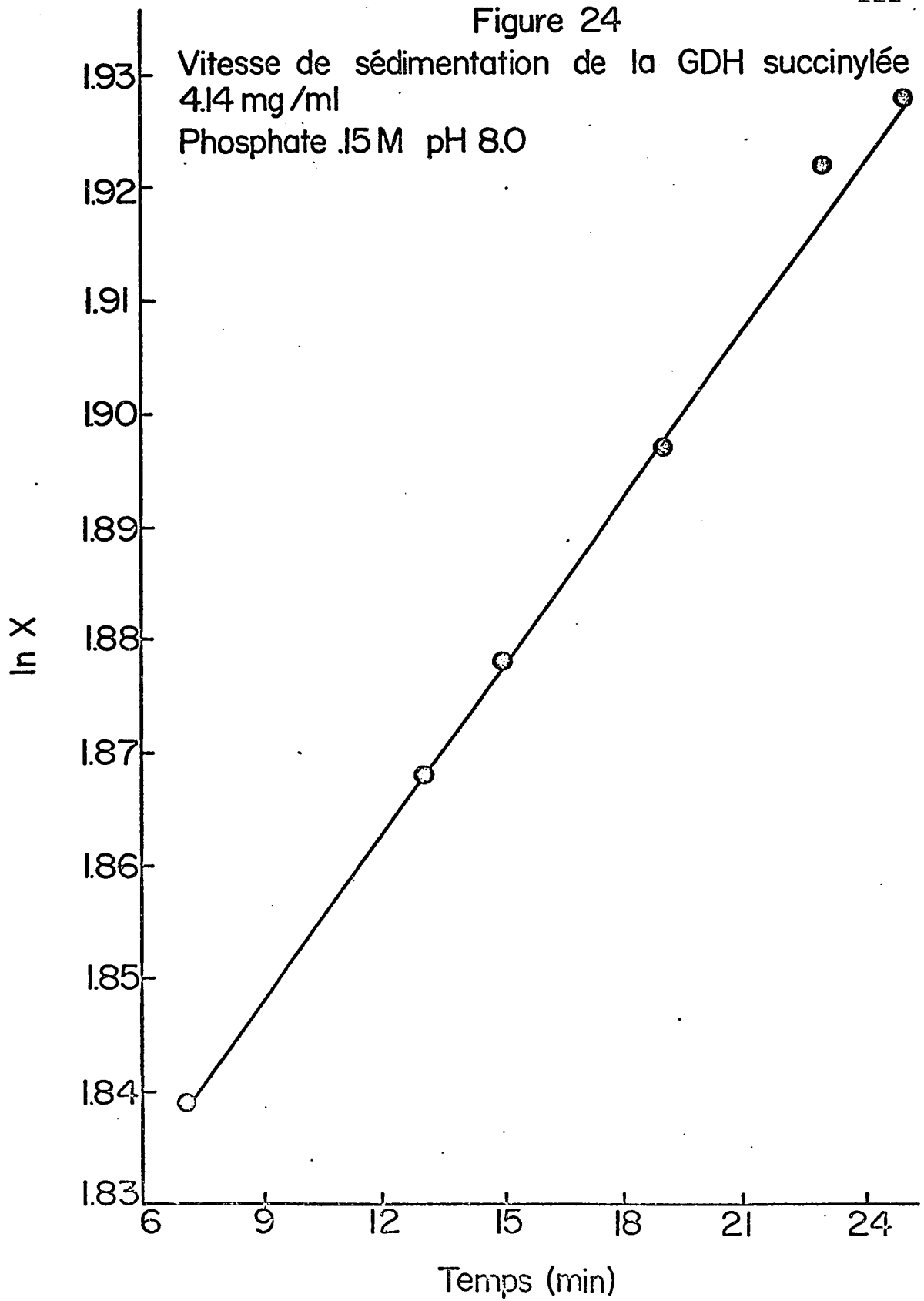


Tableau 28

Vitesse de sédimentation de la GDH succinylée

Photo	Temps	ln X	Δt (sec.)
1	2.02	1.83874	420
2	2.08	1.86781	780
3	2.10	1.87788	900
4	2.14	1.89726	1140
5	2.18	1.92193	1380
6	2.20	1.92765	1500

$$S = d \frac{\ln X}{dt} = \frac{8.232 \times 10^{-5}}{2\pi \frac{(59780)}{60}} = 21.0 \text{ S}$$

Tableau 29

Rayon moyen de la GDH succinylée

Echantillon	V _e (ml)	K _d	a/r*	a _{mμ}
2.0 ml	71.3	0.093	.4116	27.6
1.6 ml	61.4	0.022	.5805	38.9
moyenne	66.4	0.058	.4961	33.3

*r = 67.0 ± 3.7 μ (Tableau 6).

5) Filtration sur gel Sepharose 4B.

La filtration de la GDH succinylée donne les résultats présentés au Tableau 29. L'enzyme succinylée est éluée beaucoup plus rapidement que l'enzyme naturelle. En utilisant le rayon des pores "r" du Sepharose 4B trouvé au Tableau 6 et les rapports a/r calculés par Ackers (1) pour différentes valeurs K_d , on trouve 33.3 μ comme rayon Stokes "a" de la GDH succinylée.

Discussion

I. Propriétés de la glutamique déshydrogénase.

A. Poids moléculaire

1) Sur Sephadex G-200.

Le rayon et le poids moléculaire de la GDH n'ont pu être déterminés avec précision sur le Sephadex G-200, son volume d'élution étant trop rapproché du volume d'exclusion de la colonne.

On a trouvé une relation linéaire entre le rayon Stokes des protéines et leur volume d'élution réduit, V_e/V_0 , sur Sephadex G-200. Cette relation a été obtenue à la fois grâce aux résultats présentés ici et aux résultats publiés par d'autres auteurs. Determann et Michel (28) avaient trouvé une relation semblable sur le G-75 et le G-100.

Le rayon des pores du G-200 mesuré à 10°C est 19.4 ± 1.3 μ . Rogers et Thompson ont obtenu des valeurs de 18.6 ± 0.6 μ (103) et 18.7 ± 1.7 μ (104) pour ce même gel à 24°C et de 16.9 ± 0.5 μ à 4°C. Si les pores du G-200 ont un rayon moyen d'environ 19 μ , il devrait être possible de séparer des particules ayant un rayon inférieur à cette valeur, tels

que le coliphage f 12 et le SBMV (Southern Bean Mosaic Virus) (97). Il est cependant un fait expérimental reconnu et vérifié par plusieurs auteurs (28) (99) (4) (2); le Sephadex G-200 a une limite supérieure de séparation ($K_d = 0$) pour des molécules globulaires de poids moléculaire d'environ 800,000. Nos résultats confirment ce fait.

Comparant les valeurs K_d obtenues par filtration sur une colonne de G-200 aux coefficients de distribution obtenus après équilibre, Ackers (1) affirme que le mécanisme de filtration sur le G-200 et l'agarose est différent de celui des autres gels. Selon le mécanisme suggéré par Ackers, les macromolécules diffusent au travers du gel dans des canaux cylindriques. Il se peut que la diffusion des macromolécules soit limitée à ces canaux, mais le rayon moyen des pores obtenu à partir de l'équation d'Ackers (eq. 3) ne correspond certainement pas à la réalité en ce qui a trait à la limite d'exclusion du gel.

2) Sur Sepharose 4B

Sur le gel, nous avons déterminé un poids moléculaire de près de 920,000 pour la GDH à une concentration de 0.8 mg/ml. Cette valeur est encore éloignée de la valeur de 1.0 à 1.2×10^6 généralement

acceptée comme le poids moléculaire de l'oligomère (69, 84, 88 et 114).

Nous avons aussi trouvé un rayon Stokes moyen de 9.52 μ pour la GDH à 0.8 mg/ml. A cette concentration l'enzyme forme un oligomère (48).

Le volume d'une sphère de même rayon est de 3614 μ^3 . Rogers et coll. (103) ont trouvé un rayon Stokes de 6.1 μ pour la GDH à des concentrations variant entre 117 et 0.4 μ g/ml. A ces concentrations, l'enzyme est sous la forme d'un protomère. Une sphère d'un rayon de 6.1 μ a un volume de 951 μ^3 . Divisant le volume de l'oligomère par celui du protomère on trouve un rapport de 3.8. Ce rapport semble indiquer que l'oligomère est un tétramère. Olson et Anfinsen (88) sont arrivés à la même conclusion et récemment Willick (134) a aussi trouvé que la GDH s'associait d'une façon réversible pour former un tétramère.

L'équation de Renkin telle que modifiée par Ackers (1) semble s'appliquer à la détermination du rayon Stokes sur le Sepharose 4B. Ce dernier a trouvé que le mécanisme de filtration sur les gels d'agarose était différent de celui qui entre en jeu dans le cas des autres gels. Cette affirmation provenait du fait

que l'équation de Renkin ne s'appliquait pas aux filtrations sur l'agarose. Ce dernier produit contient de l'agaropectine qui, agissant comme échangeur d'ions, peut changer le volume d'élution d'une substance. Le Sepharose 4B, employé dans ces travaux ne contenait pas d'agaropectine.

3) Ultracentrifugation.

Nous avons trouvé une vitesse de sédimentation, $S_{20,w}$, de 24.8 S à une concentration de GDH de 4.14 mg/ml. Olson et Anfinsen (88) ont trouvé des valeurs, $S_{20,w}$, de 26.6 S par extrapolation à une dilution infinie et de 25 S à une concentration de 4 mg/ml.

4) Calcul du poids moléculaire.

Le rayon Stokes de la GDH mesuré sur le Sepharose 4B a permis de calculer les coefficients de friction et de diffusion de la molécule. La vitesse de diffusion, D , calculé par cette méthode est de $2.1528 \times 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$.

Olson et Anfinsen (88) ont obtenu une vitesse de diffusion de $2.54 \times 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$ par extrapolation à une dilution infinie et de $2.38 \times 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$ à une concentration de 4 mg/ml. La vitesse de diffusion calculée à

partir du rayon Stokes de la GDH est à 10% près de la valeur expérimentale obtenue par Olson et Anfinsen. Ce résultat semble valider l'hypothèse que le polymère est de forme sphérique.

Le poids moléculaire de la GDH calculé à l'aide des données précédentes et de l'équation de Svedberg est de 1.19×10^6 . Olson et Anfinsen (88) ont mesuré un poids moléculaire de 1.08×10^6 à une concentration de 4 mg/ml.

Des poids moléculaires variant entre un et deux millions ont été obtenus pour la GDH (69) (137) (37) (34) par diffusion de lumière. Cependant, nous avons remarqué et plusieurs auteurs le mentionnent (78) (46), que la GDH est instable à la température de la chambre. Magar (78) semble croire que les poids moléculaires plus élevés obtenus par diffusion de lumière sont dus à cette instabilité de l'enzyme qui augmente la diffusion de lumière.

B. Homogénéité de la GDH.

Les méthodes utilisées pour analyser la solution de glutamate déshydrogénase, soit la filtration sur gels G-200 et Sepharose 4B, l'ultracentrifugation, la chromatographie sur DEAE cellulose et l'électrophorèse,

ont constamment démontré l'homogénéité de l'enzyme. Aucun de ces critères n'est, par lui-même, suffisant pour juger de l'homogénéité d'une protéine, mais la similarité des résultats obtenus par ces différentes méthodes nous a permis de considérer que la GDH était d'une pureté suffisante pour être utilisée telle quelle dans les travaux subséquents.

II- Stabilité de la GDH.

L'activité de l'enzyme est maximale dans le phosphate 0.047M. alors que l'enzyme perd environ 50% de son activité dans le phosphate 0.077M. Plusieurs auteurs ont aussi remarqué une inhibition de la GDH à de fortes concentrations de sels. Olson et Anfinsen (87) ont trouvé une inhibition de 50% pour la GDH du foie de boeuf dans le tampon phosphate de force ionique, I, de 1.4. Snoke (113), travaillant sur la GDH du foie de poulet a aussi remarqué une inhibition non-compétitive de l'enzyme à de fortes concentrations de sels, sans que celle-ci soit liée à la force ionique de la solution. Cependant la plupart des auteurs (16) (113) (35) semblent d'accord sur le fait que l'activité enzymatique est reliée de quelque façon à la force ionique de la solution. Les résultats obtenus avec

le phosphate confirment ce fait.

En déterminant la période de préincubation à 25°C requise pour obtenir la moitié de l'activité initiale, $V_i/2$, nous avons pu déterminer la stabilité de l'enzyme sous différentes conditions. L'enzyme est le plus stable dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.6; cette force ionique de 0.26, est équivalente à la force ionique du sérum physiologique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sund et Akesson (123), et Bayley et Radda (10). Ces derniers ont trouvé une stabilité appréciable de l'enzyme dans le tampon phosphate 0.1M à pH 7.7. On ne trouve dans la littérature que des études qualitatives sur la stabilité de l'enzyme dans des tampons de forces ioniques différentes. Ces résultats contredisent cependant ceux de Schoffeniels (112) qui affirme que l'enzyme est le plus stable dans l'eau distillée.

Les résultats présentés au tableau 11 montrent qu'après passage du Sephadex G-25 l'enzyme est beaucoup moins stable que l'enzyme incubée dans un tampon à 25°C. Cette perte de stabilité de l'enzyme après passage sur G-25 n'est pas due à la période de filtration qui est d'environ deux heures car après deux

heures à 25°C dans le tampon phosphate 0.05M, la GDH possède encore 160% de son activité initiale (fig. 12). L'effet est encore plus marqué dans le tampon phosphate 0.01M (fig. 13) où l'enzyme ne possède que 5% de son activité initiale une heure après son élution du G-25.

On ne peut attribuer cette instabilité de la GDH à une dilution de l'enzyme par la filtration sur gel puisque les fractions de l'éluat étudiées ont des concentrations comparables aux solutions témoins dans le même tampon. Le peu de données que l'on possède à ce sujet ne permet pas, pour le moment, de trouver la cause de cette perte de stabilité. Les résultats permettent cependant de supposer que certains facteurs liés à l'enzyme active comme le substrat, les coenzymes ou des ions sont retenus par la colonne. La perte de ces substances pourrait être responsable d'une inactivation irréversible au cours de la purification.

III- Dissociation de la glutamique déshydrogénase en sousunités.

La filtration de la GDH sur Sephadex G-200 en présence d'un détergent, le lauryl sulfate de sodium, a

montré qu'on peut utiliser cette méthode pour étudier la cinétique de désaggrégation d'une protéine. On a trouvé que la dissociation en sousunités est complète après 24 heures d'incubation à la température de la chambre.

Jirgensons (67) et Frieden (50) ont employé le même détergent pour dénaturer la GDH. Ces deux auteurs ne mentionnent pas la nécessité d'une longue incubation de la GDH dans le détergent. Le premier obtient, après l'addition du détergent SDS, un seul pic sédimentant à une vitesse de 3.7 S tandis que Frieden, utilisant la même méthode, obtient deux pics sédimentant respectivement à 20.9 et 6.05 S. Nous avons d'abord obtenu deux pics sur Sephadex G-200, mais après 24 heures d'incubation dans le détergent l'enzyme semble totalement dissociée et il n'y a plus qu'un seul pic d'absorption.

La différence entre ces résultats montre l'importance du facteur temps dans la dissociation de la GDH; les molécules sédimentant à 20.9 S et 6.05 S obtenues par Frieden (50) correspondent probablement au protomère et au monomère.

IV - Caractérisation des sousunités de la GDH.

A. Détermination du poids moléculaire sur Sephadex G-200.

Le poids moléculaire moyen des sousunités calculé à l'aide d'une courbe étalon est de 47500 ± 2500 .

Les valeurs obtenues par sédimentation dans différents agents dénaturants (80) (67) (128) varient entre 43000 et 52500. Eisenberg et Tomkins (34) ont trouvé une valeur de 53500 ± 1500 pour le poids moléculaire des sousunités par diffusion de la lumière.

La limite de rétention du G-200 dans le détergent SDS est d'environ 4.5×10^5 . Cette valeur est de beaucoup inférieure à celle de 8.0×10^5 obtenue habituellement pour les protéines globulaires en absence de détergent. Ce résultat est explicable si l'on considère que les protéines dénaturées par le détergent ne sont plus sphériques comme on le suppose pour expliquer leur comportement sur le gel (97). On peut aussi supposer que les molécules de détergent absorbées sur la surface des protéines dénaturées augmentent leur rayon Stokes.

On peut calculer le rayon Stokes effectif " a_e "

des protéines dans le détergent SDS. Ce rayon " a_e " est celui qu'aurait une molécule sphérique ayant le même coefficient de distribution K_d sur la colonne. A l'aide du rayon stokes effectif " a_e " des sous-unités de la GDH, on a calculé un rayon Stokes approximatif, a , de 2.93 μ pour ces sousunités. Les dimensions des sousunités de la GDH n'ont pas été rapportées jusqu'à maintenant dans la littérature, mais ce nouveau paramètre, le rayon effectif " a_e ", pourrait être très utile pour l'étude des protéines dénaturées.

B. Détermination de l'acide aminé en position N-terminale de la GDH.

1) Analyse qualitative des dinitrophénylaminoacides.

L'analyse qualitative du dérivé DNP-N-terminal a révélé que l'alanine était le seul dérivé N-terminal de la GDH. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions où, l'acide glutamique, trouvé par d'autres auteurs (67) (5) comme second dérivé dinitrophénylé, aurait été facilement détecté s'il avait été présent. Jirgensons (67) et Apella (5) ont trouvé environ un résidu de DNP-glutamique pour 20 résidus de DNP-ala

comme dérivé N-terminal de la DNP-GDH. La figure 17 montre une photo prise à l'ultraviolet d'un chromatogramme en couche mince des dérivés éthérosolubles de la DNP-GDH. On ne peut déceler aucune trace importante de DNP-glu. La quantité de résidu éthérosoluble utilisée pour cette chromatographie aurait donné 0.9 millimicromole de DNP-glu; cette quantité aurait été détectée facilement puisque, dans les mêmes conditions, on pouvait déterminer le R_f d'échantillons connus ne contenant que 0.35 millimicromole de DNP-ala. De plus, le facteur de Levy (74) pour la DNP-glu (0.94) étant inférieur à celui de la DNP-ala (1.09), on ne peut attribuer ce fait à une différence de coloration entre ces deux dérivés. La différence de 5% dans la destruction de ces deux dérivés trouvée par Porter (98) ne peut aussi expliquer l'absence d'acide DNP-glutamique dans la fraction éthérosoluble de l'hydrolysat de la DNP-GDH.

2) Analyse quantitative de la DNP-alanine N-terminale.

L'analyse quantitative de la DNP-alanine terminale a révélé la présence de 0.91 ± 0.07 mole d'ala-

nine par 47,500 g de GDH; ceci correspond à un poids moléculaire de 52,200 pour les sousunités. Jirgensons (67) a trouvé entre 17 et 23 moles d'alanine en position N-terminale par 10^6 g de GDH; Apella et Tomkins (5) ont trouvé 0.90 mole de DNP-alanine terminale par 52,000g de GDH ce qui équivaut à 17.3 moles par 10^6 g.

Les résultats obtenus à l'aide de la DNP-ala-1- ^{14}C confirment les expériences précédentes; mais la précision est supérieure à celle obtenue par les auteurs mentionnés plus haut. L'emploi de la DNP-DL-alanine-1- ^{14}C comme standard interne permet en une seule opération de faire une correction correspondant à tous les facteurs de correction utilisés dans les autres méthodes. De plus, le ^{14}C étant sur le groupement carboxyle, on peut faire une correction pour les pertes dues à la photodécarboxylation du dérivé dinitro-phénylé. Les autres méthodes ne tenaient pas compte de ce facteur. Cette méthode peut être utilisée avec avantage pour des quantités de protéines de 2 ou 3 mg; on doit cependant connaître qualitativement le résidu N-terminal avant d'employer cette méthode.

Le fait que l'analyse qualitative du dérivé N-terminale n'a révélé qu'un seul acide aminé N-terminal

est d'une grande importance. Les différentes méthodes d'analyse utilisées par d'autres auteurs semblaient indiquer la présence d'un seul type de sous-unités, mais la présence de l'acide glutamique comme dérivé N-terminal laissait supposer l'existence de 1 ou 2 chaînes polypeptidiques différentes sur 20. Ce fait inusité aurait causé des difficultés sur le plan théorique (22) (110) (123) (122).

L'électrophorèse des sous-unités carboxyméthylées de la GDH n'a révélé qu'une seule espèce de sous-unités. De plus, les travaux de Tomkins (5) sur le résidu C-terminal (thréonine), les peptides obtenus par la trypsine et le bromure de cyanogène confirment les données physicochimiques obtenues par d'autres auteurs indiquant qu'il n'y a qu'un seul type de sous-unités (34) (128) (80). En supposant que des différences de séquences dans les acides aminés intrapeptidiques n'auraient pas été révélées ni par l'électrophorèse dans trois solvants différents ni par l'analyse peptidique faite par Apella et Tomkins (5); le fait qu'une seule ligne de précipitine a été obtenue par immunoélectrophorèse des sous-unités de la GDH (126) renforce la conclusion de ces travaux et indique clairement que

les sousunités de la glutamique déshydrogénase du foie de boeuf sont identiques. Selon la nomenclature de Monod (82), ces sousunités identiques sont des monomères.

Le poids moléculaire du protomère a été mesuré sans ambiguïté par Eisenberg et Tomkins (34) qui ont trouvé une valeur de $313,000 \pm 3,000$. On remarque aussi qu'un poids moléculaire de $330,000 \pm 20,000$ a été trouvé pour la GDH du foie de chien de mer (25). Si l'on divise le poids moléculaire du protomère par celui du monomère on trouve 6.26 monomères par protomère. Cette valeur est à 4% près celle que donnerait un hexamère.

Le rayon Stokes de cet hexamère a été mesuré par Rogers et ses collaborateurs qui ont obtenu une valeur de 6.1 μ (103). Les volumes étant additifs, on peut diviser le volume de la sphère de rayon 9.52 μ mesuré sur Sepharose pour l'oligomère par le volume du protomère. Le rapport de ces deux volumes est de 3.8; celui-ci est à 5% près de ce que donnerait un tétramère. L'oligomère serait donc un tétramère. On a d'ailleurs obtenu un poids moléculaire de 1.2×10^6 à l'aide de la vitesse de sédimentation et du rayon

Stokes mesuré sur Sepharose. L'additivité des volumes semble justifiée par le fait que l'entourage des résidus tyrosine, tryptophane et phénylalanine présents sur la surface du protomère n'est pas changé par la polymérisation (26). Un changement de volume amènerait aussi une différence dans l'entourage de ces résidus. De plus, des études de la GDH au microscope électronique (64) montrent que la molécule a une symétrie tridimensionnelle et l'apparence d'un tétraèdre de 10.4 μ de côté. Les réactifs employés peuvent avoir modifié la molécule, mais les dimensions n'en demeurent pas moins très près de ce que l'on a trouvé. Récemment, Willick (134) a aussi trouvé que la GDH s'associait d'une façon réversible pour former un tétramère. Des plus hauts degrés de polymérisation ont été trouvés pour la GDH (37) (38) (39). Einsenberg et Tomkins (34) ont même trouvé que le poids moléculaire du polymère augmentait indéfiniment avec la concentration de la GDH. Cette situation est improbable et des valeurs aussi hautes n'ont d'ailleurs été obtenues que par la méthode de diffusion de la lumière. Comme le suppose Magar (78), il est possible que cette anomalie soit due à une augmentation de la diffusion de lumière quand la solution de GDH séjourne à

la température de la pièce. Frieden (46) a d'ailleurs remarqué une augmentation de 4 fois de la diffusion après 30 min. à la température de la chambre.

La polymérisation selon Cross et Fisher (26) se fait sans masquer les résidus tyrosine, tryptophane et phénylalanine déjà présents à la surface du protomère. Aussi Iwatsubo et Pantaloni (66) ont trouvé respectivement 20 sites pour le NADH et le glutamate par poids moléculaire de 1.1×10^6 . Ces valeurs sont équivalentes à un site actif par monomère. La conclusion que l'oligomère est un tétramère s'accorde très bien avec la théorie de Changeux (22) (82) sur la structure quaternaire des molécules allostériques. Aussi, selon Schachman (110), à chaque monomère doit correspondre un site actif; selon Tomkins (126) l'enzyme n'a pas de tendance à s'aggréger indéfiniment à de fortes concentrations et possède une enveloppe de diffusion symétrique.

Il est intéressant de noter finalement l'hydrophobicité extrême de la molécule de GDH. On a calculé à l'aide de la composition en acides aminés (5) l'hydrophobicité moyenne de la molécule de la GDH par

la méthode de Bigelow (13). On obtient une hydrophobicité moyenne, φ ave, de 1755. Cette valeur indique la présence d'un excès de résidus non polaires qui favorise la formation de liens hydrophobes intermoléculaires. La molécule peut accomoder cet excès d'hydrophobicité en s'associant. Selon la nomenclature de Changeux (22), le domaine d'association, serait dans ce cas principalement hydrophobe. Très récemment, Pantaloni et collaborateurs (89) ont trouvé que l'association de la GDH ne change pas le pourcentage d'hélice \mathcal{L} de la molécule. Ils ont de plus trouvé que la GDH était constituée d'environ 30% d'hélice \mathcal{L} , le reste de la structure étant partagé entre la structure β et la structure en "pelote désordonnée" (89). Ces travaux unis à ceux d'autres auteurs permettent d'affirmer que la glutamique déshydrogénase du foie de boeuf est constituée de monomères identiques. Six de ces monomères s'unissent pour former un protomère qui polymérise réversiblement pour former un oligomère d'un poids moléculaire de 1.2 millions.

V- Propriétés de la GDH succinylée.

A. Coefficient d'extinction.

La succinylation de la GDH ne change pas son

coefficient d'extinction molaire à 280 m μ . La densité optique d'une protéine à 280 m μ étant due en grande partie à la présence de tyrosine, on peut conclure que celle-ci n'est probablement pas modifiée par la succinylation de la GDH. Colman et Frieden (24) sont arrivés à la même conclusion pour la GDH acétylée. Habeeb a aussi observé très peu d'esté-
rification de la tyrosine des protéines globulaires dans ces conditions.

B. Vitesse de sédimentation.

La vitesse de sédimentation, S, de la GDH succinylée est de 21.0 S à 4.14 mg/ml et 59780 RPM. Cette vitesse de sédimentation ne peut être corrigée par la formule de Schachman (111) puisque la valeur du volume spécifique partiel, \bar{V} , de la GDH succinylée n'est pas connu. Les conditions de sédimentation étant identiques, on peut cependant comparer les vitesses de sédimentation obtenues pour la GDH naturelle et l'enzyme succinylée. Cette valeur de 21 S est de beaucoup supérieure à celle qui a été obtenue par Colman et Frieden (24) avec l'enzyme acétylée; à une concentration de 2 mg/ml, l'enzyme acétylée et inactive sédimente à une vitesse de 12.4 S. En ad-

mettant que le volume spécifique partiel de la GDH acétylée, est le même que celui de la GDH naturelle, ces derniers ont calculé un poids moléculaire de 400,000 pour la GDH acétylée. Habeeb (55) a cependant remarqué une différence entre le volume spécifique de l'albumine de boeuf succinylée et naturelle.

C. Rayon Stokes de la GDH succinylée.

Le rayon Stokes, a , de la GDH succinylée est de 33.3 μ . Le rayon Stokes de la GDH naturelle que l'on a déterminé (tableau 7) est de 9.5 μ . Habeeb (55) a remarqué une diminution du volume d'élution de l'albumine de boeuf sur Sephadex G-200 après succinylation qui serait causée par une augmentation du rayon Stokes et du degré d'asymétrie de la protéine. Ce fait a aussi été remarqué avec la gamma globuline humaine (55). Le rayon Stokes de l'albumine de boeuf succinylée, tel que mesuré par Habeeb est de 12 μ ; celui de la protéine naturelle est de 3.61 μ (125). Le rayon Stokes de l'albumine a augmenté 3.3 fois par succinylation (55); celui de la GDH a augmenté 3.5 fois.

Dans une étude qualitative de la GDH succinylée, Frieden (45) a remarqué que la GDH devenait considéra-

blement allongée par suite de la succinylation. Les résultats obtenus dans cette expérience confirment ce fait. Ce changement de conformation de la GDH succinylée peut aussi expliquer son comportement électrophorétique sur l'acétate de cellulose. La succinylation cause un changement de charge de 2 électrons par groupement aminé succinylé. On peut donc s'attendre, si la protéine ne change pas de forme, à une augmentation de migration vers l'anode proportionnelle au degré succinylation. La mobilité électrophorétique, u , est directement proportionnelle à la charge de la molécule et inversement proportionnelle au carré du rayon.

$$u \propto Q/r^2 \quad (1)$$

Dans le cas de la GDH, la mobilité électrophorétique est nulle.

L'augmentation du rayon de la GDH succinylée a probablement neutralisé l'augmentation des charges sur la molécule. De plus la mobilité d'une molécule est inversement proportionnelle à son degré d'asymétrie (8). Cherry (23) a d'ailleurs obtenu un

plateau en portant en graphique la mobilité de l'albumine en fonction du degré de succinylation. Selon Habeeb (55), une augmentation du rayon Stokes d'une molécule, accompagnée d'une diminution de la vitesse de sédimentation, indique une diminution du coefficient de diffusion, due à une augmentation de la résistance offerte à la molécule en mouvement à cause de sa plus grande asymétrie. Les rayons Stokes trouvés à l'aide du G-200 par ce dernier confirment les mesures obtenues à partir du coefficient de diffusion.

Le comportement de la GDH succinylée sur le Sepharose 4B n'est donc pas dû à une augmentation du poids moléculaire par agglomération, ce qui causerait une augmentation importante de la vitesse de sédimentation, mais à une augmentation de son rayon.

Les répulsions électrostatiques, en plus de l'addition d'une chaîne de quatre carbones par groupement aminé semblent causer cette élongation de la molécule.

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'étudier la structure de la glutamique déshydrogénase du foie de boeuf et la stabilité de cette enzyme.

A l'aide du Sepharose 4B, on a déterminé que le rayon Stokes de l'enzyme était de 9.52 μ à une concentration de 0.8 mg/ml. En comparant les volumes qu'auraient l'oligomère et le protomère sphériques d'un rayon Stokes respectif de 9.52 μ et de 6.1 μ , nous avons déterminé que l'oligomère de la GDH est un tétramère. A l'aide de la vitesse de sédimentation et du rayon Stokes, on a calculé un poids moléculaire de 1.19×10^6 pour l'oligomère de la GDH.

Après 24 heures dans le détergent lauryl sulfate de sodium, l'enzyme est complètement dissociée en sousunités. Tel que déterminé sur le Sephadex G-200 en présence de détergent, ces sousunités ont un poids moléculaire moyen de 47500 et un rayon Stokes approximatif de 2.93 μ .

L'analyse qualitative du résidu N-terminal de la GDH a révélé que l'alanine est le seul acide aminé

en position N-terminale. On a trouvé 0.91 mole de DNP-alanine par 47500 g de GDH; ceci correspond à une mole d'alanine N-terminale pour un poids moléculaire des sousunités de 52500.

Toutes les analyses de la GDH dissociée en sousunités ont confirmé la présence d'un seul type de sousunités. Ces travaux et ceux d'autres auteurs permettent de conclure que six monomères de la GDH d'un poids moléculaire de 50,000 s'associent pour donner un protomère; aussi quatre de ces protomères s'associent à leur tour pour donner un oligomère d'un poids moléculaire de 1.2 millions.

La succinylation de la GDH ne change pas son coefficient d'extinction à 280 μ , mais augmente son rayon Stokes et sa solubilité. L'activité enzymatique de la GDH est détruite par la succinylation dans ces conditions.

On a trouvé que l'enzyme a une activité maximale dans un tampon phosphate 0.047M; la GDH n'a plus que cinquante pour cent de cette activité dans un tampon phosphate 0.077M.

La GDH est le plus stable dans le tampon phosphate 0.1M à pH 7.6; cette force ionique de 0.26 est équivalente à celle du sérum physiologique. L'enzyme

est cependant beaucoup moins stable après passage sur Sephadex G-25.

Il est intéressant de noter finalement l'hydrophobicité extrême de la molécule de GDH; à l'aide de la méthode de Bigelow, on a calculé une hydrophobicité moyenne de 1755 pour la GDH du foie de boeuf. Cette valeur indique la présence d'un excès de résidus non-polaires qui favorise la formation de liens hydrophobes. La molécule peut accomoder cet excès de groupements hydrophobes en s'associant. Les travaux discutés plus haut ainsi que ceux d'autres auteurs permettent d'affirmer que la glutamique déshydrogénase du foie de boeuf est constituée de monomères identiques ou indifférentiables par les méthodes d'analyse présentement disponibles.

Références

1. Ackers, G.K. 1964. Molecular Exclusion and restricted Diffusion Processes in Molecular Sieve Chromatography. *Biochemistry*. 3: 723-730.
2. Andrews P. 1966. Molecular Weights of Prolactins and Pituitary Growth Hormones Estimated by Gel Filtration. *Nature*. 209: 155-157.
3. _____. 1964. Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel Filtration. *Biochem. J.* 91: 222-223.
4. _____. 1962. Estimation of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration. *Nature*. 196: 36-39.
5. Apella E. et Tomkins G.M. 1966. The Subunits of Beef Liver Glutamate Dehydrogenase: Demonstration of a Single Peptide Chain. *J. Mol. Biol.* 18:77-89.
6. Aronsson T. et Gronwald A. 1957. Improved Separation of Serum Proteins in Paper Electrophoresis. A New Electrophoresis Buffer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 9:338-341.
7. Bailey, L. 1967. *Techniques in Protein Chemistry*, 2ième éd. Elsevier, New York. p. 49.
8. _____. *Ibid.* p. 308.
9. _____. *Ibid.* p. 312.
10. Bayley, P.M. et Radda G.K. 1966. Conformational Changes and the Regulation of Glutamate Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* 98: 105-111.

11. Benesch R. et Benesch R.E. 1963. Some Relations between Structure and Function in Hemoglobin. *J. Mol. Biol.* 6: 498-505.
12. Bernal J.D. 1958. Structure Arrangements of Macromolecules. *Discussions Faraday Soc.* 25: 7-18.
13. Bigelow C.C. 1967. On the Average Hydrophobicity of Proteins and the Relation between it and Protein Structure. *J. Theor. Biol.* 16: 187-211.
14. Birkofer, L. et Ritter A. 1960. Silyerung von Aminosauern. *Chem. Ber.* 93:424-427.
15. Biserte G., Holleman James W., Holleman J. Dehove et Santière Pierre. 1959. Chromatographie sur papier des dinitro-phénylaminoacides. *J. Chrom.* 2:225-271.
16. Bitensky M.W., Yielding K.L. et Tomkins G.M. 1965. The Effect of Allosteric Modifiers on the Rate of Denaturation of Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 240:1077-1082.
17. _____. 1965. Reciprocal Changes in Alanine and Glutamate Dehydrogenase Activities after Exposure of Crystalline Bovine L-Glutamate Dehydrogenase to Organic Mercury. *J. Biol. Chem.* 240: 663-668.
18. _____, 1965. The Reversal by Organic Mercurials of Allosteric Changes in Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 240:668-673.
19. Blackburn S. et Lowther A.G. 1951. The Separation of N-2:4-Dinitrophenyl Amino-Acids on Paper Chromatograms. *Biochem. J.* 48:126-128.

20. Boyer P.D. 1954. Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* 76:4331-4337.
21. Chan W., Morse D.E. et Horecker B.L. 1967. Nonidentity of Subunits of Rabbit Muscle Aldolase. *Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.* 57:1013-1020.
22. Changeux J.P. 1964. Allosteric Interactions Interpreted in Terms of Quaternary Structure. *Brookhaven Symp. Biol.* 17: 232-249.
23. Cherry M. 1964. Properties of Succinylated Bovine Serum Albumin. Thèse de doctorat, Yale University, New Haven, Conn.
24. Colman R.F. et Frieden C. 1966. On the Role of Amino Groups in the Structure and Function of Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 241: 3661-3670.
25. Corman L., Prescott L.M. et Kaplan N.O. 1967. Purification and Kinetic Characteristics of Dogfish Liver Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 242:1383-1390.
26. Cross, D.G. et Fisher H.F. 1966. The Spatial Location of Chromophoric Residues in L-Glutamate Dehydrogenase. *Biochemistry.* 5:880-885.
27. Davies, J.W. et Harris G. 1958. Hydrolytic Cleavage of Insulin on Ion Exchange Resins. *Arch. Biochem. Biophys.* 74:229-244.

28. Determann H. et Michel W. 1966. The Correlation between Molecular Weight and Elution Behaviour in the Gel Chromatography of Proteins. *J. Chrom.* 25: 303-313.
29. Dewan J.G. 1938. The L-Glutamic Dehydrogenase of Animal Tissues. *Biochem. J.* 32: 1378-1385.
30. Edelstein S.J. et Schachman H.K. 1966. Studies on the Polypeptide Chains of Rabbit Muscle Aldolase. *Federation Proc.* 25:412.
31. Edsall J.T. 1953. *The Proteins*, éd. Neurath H. et Bailey K. vol. 1, tome B, Academic Press Inc., New York, pp. 636-666.
32. Einstein A. 1906. Zur theorie der Brownschen Bewegung. *Ann. Physik.* 19:371-381.
33. Einstein A. 1905. Uber die von der moleculakinetischen Theorie der Warme geforderte Bewegung von in ruhenden Flussigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Physik.* 17:549-560.
34. Eisenberg H. et Tomkins G.M. 1968. Molecular Weight of the Subunits, Oligomeric and Associated Forms of Bovine Liver Glutamate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 31:37-50.
35. Engel P.C. et Dalziel K. 1967. The Equilibrium Constants of Glutamate Dehydrogenase. *Biochem. J.* 105:691-695.
36. Fisher, H.F. 1964. A Limiting Law Relating the Size and Shape of Protein Molecules to their Composition. *Abs. 6th Int. Congress Biochem.* New York II: 58.

37. _____, Cross D.G. et McGregor L.L. 1962. Catalytic Activity of Subunits of Glutamic Dehydrogenase. *Nature*. 196:895-896.
38. _____, McGregor L.L. et Cross D.G. 1962. The Role of Tyrosyl-Hydrogen Bonds in the Quaternary Structure of the Glutamate Dehydrogenase Molecule. *Biochim. et Biophys. Acta*. 65:175-177.
39. _____, McGregor L.L. et Power U. 1962. The Nature of the Alkaline Dissociation of the Glutamic Dehydrogenase Molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 8:402-406.
40. Flodin P. 1963. Dextran Gels and their Applications in Gel Filtration, 3ième éd., Neijils Bokindustri, Halmstad, Suède, p. 46.
41. _____, *ibid.* p. 48.
42. Florkin M. et Stotz E.H. 1964. *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, vol. 13, pp. 1-164.
43. Frieden C. et Colman R.F. 1967. Glutamate Dehydrogenase Concentration as a Determinant in the Effect of Purine Nucleotides on Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* 242: 1705-1715.
44. _____. 1965. Glutamate Dehydrogenase: Survey of Purine Nucleotide and Other Effects on the Enzyme from Various Sources. *J. Biol. Chem.* 240: 2028-2035.

45. _____ . 1964. Relationship between Subunit Structure and Activity for Beef Liver Glutamic Dehydrogenase. Brookhaven Symp. Biol. 17:98-111.
46. _____ . 1963. Glutamate Dehydrogenase: Enzyme Inactivation and Coenzyme Binding. J. Biol. Chem. 238: 146-154.
47. _____ . 1963. Protein Structure and Biological Regulation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Discussion: 28: 461-471.
48. _____ . 1963. Different Structural Forms of Reversibly Dissociated Glutamic Dehydrogenase: Relation between Enzymatic Activity and Molecular Weight. Biochem. Biophys. Res. Comm. 10:410-415.
49. _____ . 1963. Glutamate Dehydrogenase: The Relation of Enzyme Structure to the Catalytic Function. J. Biol. Chem. 238:3286-3299.
50. _____ . 1962. Effect of pH and other Variables on the Dissociation of Beef Liver Glutamic Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 237: 2396-2400.
51. _____ . 1958. Dissociation of Glutamic Dehydrogenase by Reduced Diphosphopyridine Nucleotide. Biochim. et Biophys. Acta. 27: 431-432.
52. Gerhart J.C. et Pardee A.B. 1964. Aspartate Transcarbamylase, an Enzyme designed for feedback inhibition. Federation Proc. 23: 727-735.

53. Goe J. 1953. A Microbiuret Method for Protein Determination. Determination of Total Protein in Cerebrospinal Fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5:218-222.
54. Green D.W. et Aschaffenburg R. 1959. Two fold Symmetry of B-lactoglobulin Molecule in Crystals. J. Mol. Biol. 1: 54-64.
55. Habeeb A.F.S.A. 1967. Quantitation of Conformational Changes on Chemical Modification of Proteins. Use of Succinylated Proteins as a Model. Arch. Biochem. Biophys. 121: 652-664.
56. _____, Cassidy H.G. et Singer S.J. 1958. Molecular Structural Effects Produced in Proteins by Reaction with Succinic Anhydride. Biochim. et Biophys. Acta. 29: 587-593.
57. Hamilton P.B. 1960. Ion Exchange Chromatography of Aminoacids. Study of Effects of High Pressure and Fast Flow Rates. Anal. Chem. 32: 1779-1781.
58. Herberg R.J. 1965. Channels Ratio Method of Quench Correction in Liquid Scintillation Counting. Packard Technical Bulletin No. 15, Packard Instrument Co. Inc., Downers Grove, Illinois.
59. Hirs C.H.W. 1967. Methods in Enzymology, eds Colowick et Kaplan N.O., Academic Press, New York, Vol. XI, p. 200.

60. Hjerten S. 1964. The preparation of Agarose spheres for Chromatography of Molecules and Particles. *Biochim. et Biophys. Acta.* 79:393-398.
61. _____. 1962. A new Method for the Preparation of Agarose for Gel Electrophoresis. *Biochim. et Biophys. Acta* 62:445-449.
62. Hooper A.B., Hansen J. et Bell R.J. 1967. Characterization of Glutamate Dehydrogenase from the Ammonia Oxidizing Chemoautotroph *Nitrosomonas Europaea*. *J. Biol. Chem.* 242: 288-296.
63. Horecker B.L. et Kornberg A. 1948. The Extinction Coefficients of the Reduced Band of Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175:385-390.
64. Horne R.W. et Greville G.D. 1963. Observations on Ox-liver L. Glutamate Dehydrogenase with the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* 6:506-509.
65. Ingram, V.M. 1963. *The Hemoglobins in Genetics and Evolution*, Columbia University Press, New York, pp. 1-165.
66. Iwatsubo M. et Pantaloni D. 1967. Régulation de l'activité de la glutamate déshydrogénase par les effecteurs GTP et ADP: étude par "stop flow". *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49:1563-1572.
67. Jirgensons B. 1961. Glutamic Acid Dehydrogenase-A Protein of Unusual Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* 83:3161-3162.

68. Klotz I.M. 1967. Protein Subunits: A Table. Science. 155:697-698.
69. Kubo H., Iwatsubo M., Watari H. et Soyama T. 1959. Sur la polymérisation et la forme moléculaire de la glutamico-déshydrogénase. J. Biochem. Tokyo. 46:1171-1185.
70. Kun E. et Achmatowicz B. 1965. Studies with Specific Enzyme Inhibitors. Selective Inhibitory Effects of Substrate Analogues on the Catalytic Activity of Crystalline Glutamate Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 240:2619-2627.
71. Laskowski M. Jr. 1964. Discussion on the Mechanism and Significance of Subunit Association. Brookhaven Symp. Biol. 17:175-183.
72. Léjohn H.B., Suzuki I. et Wright J.A. 1968. Glutamate Dehydrogenase of Thiobacillus Novellus; Kinetic Properties and a Possible Control Mechanism. J. Biol. Chem. 243:118-128.
73. Levy A.L. et Chung D. 1955. A Simplified Procedure for Synthesis of 2,4-Dinitrophenyl (DNP)-amino acids. J. Am. Chem. Soc. 77:2899-2900.
74. _____. 1954. A Paper Chromatographic Method for the Quantitative Estimation of Amino Acids. Nature. 174:126-127.
75. Linderstrøm-Lang K.V. 1952. Proteins and Enzymes, Lane Medical Lectures, Stanford University Press, Medical Series, Stanford, California, vol. 6, pp. 1-115.

76. Losada M. et Arnon D.I. 1964. Modern Methods in Plant Analysis, Spring Verlag, Berlin, vol. III, p. 569.
77. Lyman D.J., Lou B.H. et Crawford E.W. 1964. New Synthetic Membranes for Dialysis. A Copolyether-ester Membrane System. Biochemistry. 3: 985-990.
78. Magar M.E. 1965. A Viscosity and Sedimentation Study on Glutamate Dehydrogenase. Biochim. et Biophys. Acta. 99:275-285.
79. Marinetti G.V. 1962. Chromatographic separation, Identification, and Analysis of Phosphatides. J. Lipid Res. 3:1-20.
80. Marler E. et Tanford C. 1964. The Molecular Weight of Polypeptide Chains of L-glutamate Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 239:4217-4218.
81. Millard N.D., King B.G. et Showers M.J. 1956. Human Anatomy and Physiology, 4ième éd., W.B. Saunders, London, p.305.
82. Monod J., Wyman J. et Changeux J.P. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. J. Mol. Biol. 12:88-118.
83. _____, Changeux J.P. et Jacob F. 1963. Allosteric Proteins and Cellular Control Systems. J. Mol. Biol. 6: 306-329.
84. Naughton N.A. et Dintzis H.M. 1962. Sequential Biosynthesis of the Peptide Chains of Hemoglobin. Proc.Nat.Ac.Sc. U.S. 48:1822-1830.

85. Neurath H., Greenstein J.P., Putnam F.W. et Erickson J.O.
(1944. The Chemistry of Protein Denaturation. Chem.
Reviews. 34:157-265.
86. Nichol J.C. et Deutsch H.F. 1948. Biophysical Studies of
Blood Plasma Proteins. Separation of γ -globulin from
the Sera of Various Animals. J. Am. Chem. Soc. 70:80-
83.
87. Olson J.A. et Anfinsen C.B. 1953. Kinetic and Equilibrium
Studies on Crystalline L-Glutamic Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 202:841-855.
88. _____ .1952. The Crystallisation and Characterisation of
L-Glutamic Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 197:67-69.
89. Pantaloni D. et d'Albis A. Dessen. 1968. Structure and Con-
formational Changes in Globular Proteins by Optical
Rotatory Dispersion. J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.
65:196-205.
90. Pauling L., Corey R.B. et Bransen H.R. 1951. The Structure
of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configura-
tions of the Polypeptide Chain. Proc. Nat. Ac. Sc.
U.S. 37:205-211.
91. Perutz N.F., Rosman N.G., Cullis A.F., Muirhead H., Wiel G.
et North A.C.T. 1960. Structure of Hemoglobin. A
Three Dimensional Fourier Synthesis at 5.5 \AA Resolu-
tion obtained by X-Ray Analysis. Nature 185:416-422.

92. Pharmacia Technical Data Sheet No. 10.
93. Phillips B.M.P. 1958. The N-terminal Groups of Calf-thymus Histones. *Biochem. J.* 68:35-40.
94. Pickles B., Jefferey B.A. et Rossman M.G. 1964. Some Preliminary Results for the Crystal Structure of Lactic Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 9:598-600.
95. Pollara B. et von Korff R.W. 1960. The Photodecomposition of Dinitrophenylamino-acids. *Biochim. et Biophys. Acta.* 39: 364-367.
96. Polson A.G. 1937. Thèse, University of Stellenbosch.
97. Porath J. 1963. Recently Developed Fractionation Procedures and their Application to peptide and Protein Hormones. *Pure and Applied Chem.* 6:233-244.
98. Porter R.R. 1951. Use of 1:2:4-fluorodinitrobenzene in Studies of Protein Structure. *Methods in Med. Res.* 3: 256-
99. Pristoupil I.T. et Ulrych S. 1967. Gel Filtration of Modified and Denatured Serum Proteins on Sephadex G-200 and on Pearl Condensed Agar. *J. Chrom.* 28:49-54.
100. Quagliariello E., Papa S., Saccone C., Palmieri F. et Francavilla A. 1965. The Oxidation of Glutamate by Rat-Liver Mitochondria. *Biochem. J.* 95:742-748.

101. Redfield R.R. et Anfinsen C.B. 1956. The Structure of Ribonuclease. The Preparation, Separation and Relative Alignment of Large Enzymatically Produced Fragments. J. Biol. Chem. 221:385-404.
102. Renkin E.M. 1955. Filtration, Diffusion and Molecular Sieving through Porous Cellulose Membranes. J. Gen. Physiol. 38: 225-243.
103. Rogers K.S., Hellerman L. et Thompson T.E. 1965. Molecular Size of Bovine Glutamate Dehydrogenase and the Methylmercuric Bromide Activated Enzyme in the Concentration Range of Enzymatic Assay. J. Biol. Chem. 240:198-200.
104. _____ et Thompson T.E. 1963. Molecular Size of Bovine Glutamate Dehydrogenase and the CH_3HgBr -activated Enzyme in the Concentration Range of Enzymatic Assay. Federation Proc. 22:290.
105. Rutner A.C. et Lane D.M. 1967. Non Identical Subunits of Ribulose Diphosphate Carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28:531-537.
106. Samejima T. et Yang J.T. 1963. Reconstitution of Acid-denatured Catalase. J. Biol. Chem. 238:3256-3261.
107. Sanger F. et Tuppy H. 1951. The Amino Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. The Identification of Lower Peptides from Partial Hydrolysates. Biochem. J. 49:463-481.

108. _____. 1945. The Free Amino Groups of Insulin. *Biochem. J.* 39:507-515.
109. Sanwall B.D. et Lota M. 1964. *Modern Methods in Plant Analysis*, éds Paech K. et Tracey M.V., Spring Verlag, Berlin, vol. III, p. 290.
110. Schachman H.K. 1963. Considerations on the Tertiary Structure of Proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:409-430.
111. _____. 1957. *Methods in Enzymology*, éds Colowick et Kaplan N.O. Academic Press, New York, vol. IV, pp. 32-103.
112. Schoffeniels E. 1966. The Activity of the L-Glutamic Acid Dehydrogenase. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 74:665-676.
113. Snoke J.E. 1956. Chicken Liver Glutamic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 223:271-276.
114. Spackman D.H., Stein W.H. et Moore S. 1958. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.* 30:1190-1206.
115. Squire P.G. 1964. A Relation between the Molecular Weights of Macromolecules and their Elution Volumes Based on a Model for Sephadex Gel Filtration. *Arch. Biochem. Biophys.* 107:471-478.
116. Stachow C.S. et Sanwall B.D. 1964. Differential Effects of Purine Nucleotides on the Activity of Two Glutamic Dehydrogenases of *Neurospora*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17:368-372.

117. Stadtman E.R. 1966. *Advances in Enzymology*, éd. Nord F.F. Interscience Publishers, New York, vol. 28, p. 142.
118. Stark G.R. 1967. *Methods in Enzymology*, éd. C.H.W. Hirs, Academic Press, New York, vol. XI, p.590.
119. Strecker H.J. 1955. L-Glutamic Dehydrogenase from Liver. *Methods in Enzymology*, éds Colowick et Kaplan N.O., Academic Press, New York, vol. II, pp.220-225.
120. Strittmatter P. 1966. Dehydrogenases and Flavoproteins: Glutamate Dehydrogenase. *Ann. Reviews Biochem.* 35:134-156.
121. Svedberg T. et Pedersen K.D. 1940. "The Ultracentrifuge", The Clarendon Press, Oxford, England, Appendice.
122. Sund H. et Weber K. 1966. The Quaternary Structure of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 5:231-245.
123. _____ et Akeson A. 1964. Die Aminosäurezusammensetzung der Glutaminsäuredehydrogenase aus Rinderleber. *Bioch. Z.* 340:421-435.
124. Tanford C. 1964. Cohesive Forces and Disruptive Reagents. *Brookhaven Symp. Biol.* 17:154-174.
125. _____. 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley and Sons, New York, pp.359-380.
126. Tomkins G.M., Yielding K.L., Talal N. et Curran J.F. 1963. *Protein Structure and Biological Regulation*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:461-471.

127. Tristram G.R. 1966. *Techniques in Amino Acid Analysis*, éd. Technicon Instruments Co. Ltd., Chertsey, England, p. 67.
128. Ullman A., Goldberg M.E., Perrin D. et Monod J. 1968. On the Determination of Molecular Weight of Protein and Protein Subunits in the Presence of 6M Guanidine Hydrochloride. *Biochemistry*. 7:261-265.
129. Von Euler H., Adler E., Gunther G. et Das N.B. 1938. Components of Dehydrogenase Systems. Enzyme Decomposition and Synthesis of Glutamic Acid in Animal Tissues. *Z. Physiol. Chem.* 254:61-103.
130. Watson H.C. et Banaszak L.J. 1964. Structure of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. Structural Symmetry within the Molecule. *Nature* 204:918-920.
131. Whitaker J.R. 1963. Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. *Anal. Chem.* 35:1950-1953.
132. Whitehead E.P. 1965. A Theory of the Quaternary Structure of Dehydrogenases, Dehydrogenating Complexes and other Proteins. *J. Theor. Biol.* 8:276-306.
133. Wieland T., Duesberg P. et Determann H. 1963. Zum Molekulargewicht der lactat-dehydrogenasen. Studien des Verhaltens bei gelfiltration. *Bioch. Z.* 337:303-311.
134. Willick G.E. 1967. Physical Studies on Glutamic Dehydrogenase. *Diss. Abs. B.* 28:1460.

135. Wolff J. 1962. The Effect of Thyroxine on Isolated Dehydrogenases. The Site of Action of Thyroxine on Glutamic Dehydrogenase, the Function of Adenine and Guanine Nucleotides and the Relation of Kinetic to Sedimentation Changes. *J. Biol. Chem.* 237:236-242.
136. Wyman J. 1963. Allosteric Effects in Hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:483-489.
137. Yielding K.L., Tomkins G.M. et Trundle D.S. 1963. Metal ion Requirement for Pyridine Nucleotide-induced disaggregation of Glutamic Dehydrogenase. *Biochim. et Biophys. Acta.* 77:703-705.
138. Yielding K.L. Tomkins G.M. 1960. Structural Alterations in Crystalline Glutamic Dehydrogenase Induced by Steroid Hormones. *Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.* 46:1483-1488.