

BBA 66378

GLUTAMATE DESHYDROGENASE DE LEVURE SPECIFIQUE DU NADP⁺: ROLE DU PHOSPHATE SUR LA REACTION DE DESAMINATION OXYDATIVE DU GLUTAMATE

ANNE FOURCADE ET RENÉE VENARD

Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, Orsay (France)

(Reçu le 19 mars, 1971)

SUMMARY

NADP⁺-specific yeast glutamate dehydrogenase: effect of phosphate on the oxidative deamination of glutamate

Steady-state kinetic studies have shown that phosphate displays a specific role in the reaction of oxidative deamination of glutamate catalysed by the NADP⁺-specific yeast glutamate dehydrogenase (L-glutamate:NADP⁺ oxidoreductase (deaminating), EC 1.4.1.4): (1) it increases the rate of the forward reaction and lowers the affinity of the enzyme for NADP⁺. Yet phosphate exhibits no effect on the backward reaction. (2) In the absence of phosphate Lineweaver and Burk plots suggest two different binding sites for NADP⁺. (3) It has been shown that this double role of phosphate is not related to a variation of the ionic strength of the medium. However, electrostatic interactions seem to be involved in the binding of glutamate on the enzyme-NADP⁺ complex. These results are discussed and seem to bring evidence for regulatory properties in this enzyme.

INTRODUCTION

La glutamate déshydrogénase (L-glutamate:NADP⁺ oxydoréductase, EC 1.4.1.4.) en catalysant réversiblement la désamination oxydative du glutamate en α -cétoglutarate, joue un rôle essentiel de charnière entre le métabolisme des acides aminés et celui des acides tricarboxyliques. Cet enzyme qui accepte soit le NAD⁺, soit le NADP⁺ comme coenzyme, a des propriétés très différentes suivant son origine biologique. Ainsi FRIEDEN¹ a classé les glutamate déshydrogénases de sources différentes en deux groupes suivant trois critères: spécificité pour les coenzymes NAD⁺ ou NADP⁺, régulation de l'activité enzymatique par les pyridines nucléotides et réactions d'association-dissociation suivant différentes conditions expérimentales. En règle générale, contrairement aux glutamate déshydrogénases d'origine animale, les glutamate déshydrogénases d'origine végétale ou de micro-organismes entrent dans le deuxième groupe et sont caractérisées par une spécificité pour un seul coenzyme, par l'absence de régulation par les pyridines nucléotides et

par l'absence de réactions de polymérisation. Cependant des exceptions à cette règle ont déjà été montrées (glutamate déshydrogénase de *Thiobacillus*, *Blastocladiella*, *Chlorella*)²⁻⁴.

Par ailleurs HOLZER ET SCHNEIDER⁵ avaient mis en évidence en 1957 l'existence de deux glutamate déshydrogénases dans la levure, l'une spécifique du NAD⁺, l'autre du NADP⁺ et avaient déterminé les paramètres cinétiques sur des préparations partiellement purifiées. Ultérieurement la glutamate déshydrogénase de levure spécifique du NADP⁺ a été isolée et étudiée par GRISOLIA⁶ et ensuite par l'un de nous⁷. Du fait de son étroite spécificité et de l'absence de polymérisation, cet enzyme semble correspondre à un modèle intéressant pour préciser le mécanisme de la réaction enzymatique.

Cependant, pour étudier ce mécanisme, on se place souvent dans des conditions assez arbitraires de pH et de force ionique. Or FRIEDEN⁸, dès 1963, avait insisté d'une part sur l'intérêt d'une étude systématique de l'influence du pH sur la vitesse de la réaction, et d'autre part sur les difficultés présentées par cette étude, du fait du nombre de substrats et de coenzymes et du nombre de groupements ionisables mis en jeu⁸.

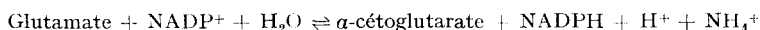
Ainsi certains auteurs ont montré que le pH et la force ionique influençaient la vitesse de la réaction enzymatique et l'équilibre entre les différentes formes stables et instables de la protéine^{9,3,2,10}.

Il nous a donc paru particulièrement intéressant d'étudier l'influence du pH sur l'activité de la glutamate déshydrogénase de levure spécifique du NADP⁺ que nous avons obtenue à l'état pur¹¹.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les premières étapes de la purification ont déjà été décrites². Depuis cette date, nous avons obtenu l'enzyme à l'état pur, d'après les critères de l'ultracentrifugation analytique¹¹ et de l'électrophorèse¹².

L'activité enzymatique lors de la réaction



est suivie par mesure spectrophotométrique: variation de l'absorbance à 340 nm caractéristique du noyau pyridinique réduit du NADP⁺, à 30°.

Dans la suite de cet exposé, nous emploierons le terme de "réaction directe" lorsque la réaction enzymatique étudiée est la désamination oxydative du glutamate, celui de "réaction inverse", pour l'amination réductive de l' α -cétoglutarate.

Le milieu réactionnel constitué par différents tampons contient pour (a) la réaction directe: NADP⁺ 1 mM, glutamate 100 mM; (b) la réaction inverse: NADPH 0.1 mM; α -cétoglutarate 30 mM; NH₄Cl 100 mM.

Les concentrations des solutions de NADPH et de NADP⁺ sont déterminées par spectrophotométrie sur la base des coefficients d'extinction moléculaire¹³: $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220$ pour NADPH; et $\epsilon_{250 \text{ nm}} = 18\,000$ pour NADP⁺.

Tous les réactifs sont préparés dans le tampon utilisé pour suivre la réaction (phosphate de sodium et potassium, acétate de sodium, Tris-HCl) et amenés soigneusement au pH désiré. En particulier dans les expériences où le NADP⁺ était utilisé à forte concentration, les valeurs du pH ont été mesurées avec le pHmètre Tacussel

muni d'électrodes spéciales permettant d'utiliser de faibles volumes de solution. Les concentrations en substrats et en coenzymes ont été choisies en fonction des différentes valeurs de K_m déjà obtenues⁷. Les vitesses des réactions correspondent donc à la vitesse maximale V . Une unité d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme qui provoque une variation d'absorbance de 0.1 par min à 340 nm.

RÉSULTATS

L'enzyme concentré (environ 15 mg/ml) est conservé à 4° dans une solution tampon phosphate 0.1 M, pH 7.6. Dans toutes les expériences il est dilué dans cette même solution. Nous avons vérifié que, dans ces conditions, l'enzyme restait stable pendant 12 h. L'influence protectrice du phosphate a déjà été montrée par DI PRISCO ET STRECKER¹⁴.

(I) Influence du pH et de la force ionique sur la vitesse de la réaction enzymatique

Dans les deux sens de la réaction enzymatique les variations de vitesse de la réaction ont été étudiées pour des valeurs de pH comprises entre pH 3 et pH 10.6 en utilisant soit le tampon acétate 0.1 M, soit le tampon phosphate 0.1 M, soit enfin le tampon Tris-HCl 0.1 M. On constate que l'activité maximale est différente, d'une part suivant le sens de la réaction, d'autre part suivant les tampons utilisés. En tampon phosphate le pH d'activité optimale dans le sens de la désamination oxydative du glutamate est 7.7, dans le sens inverse: 6.9.

TABEAU I

pH D'ACTIVITÉ OPTIMALE POUR DIFFÉRENTS TAMPONS

Nature du tampon (0.1 M)	pH d'activité maximale	
	Réaction directe	Réaction inverse
Acétate	—	5.9
Phosphate	7.7	6.9
Tris-HCl	8.6	—

Nous avons alors étudié la vitesse de la réaction en faisant varier I entre 0.01 et 1, en maintenant le pH constant et égal à la valeur où l'activité apparente est maximale: pH 7.7 pour la réaction directe et pH 6.9 pour la réaction inverse en tampon phosphate. Les valeurs numériques de I ont été déterminées à partir des abaques de GREEN¹⁵.

De l'examen des courbes de la Fig. 1, il ressort que la vitesse de la réaction directe varie de façon continue et croissante pour les valeurs de I comprises entre 0.01 et 0.5, puis décroît légèrement pour une valeur de I supérieure à 0.5 (Fig. 1a).

La vitesse de la réaction inverse, par contre, reste constante pour les valeurs de I comprises entre 0.01 et 0.3, puis diminue légèrement entre $I = 0.3$ et $I = 1$ (Fig. 1b).

Puisque, en tampon phosphate, la variation de I est obtenue en faisant varier

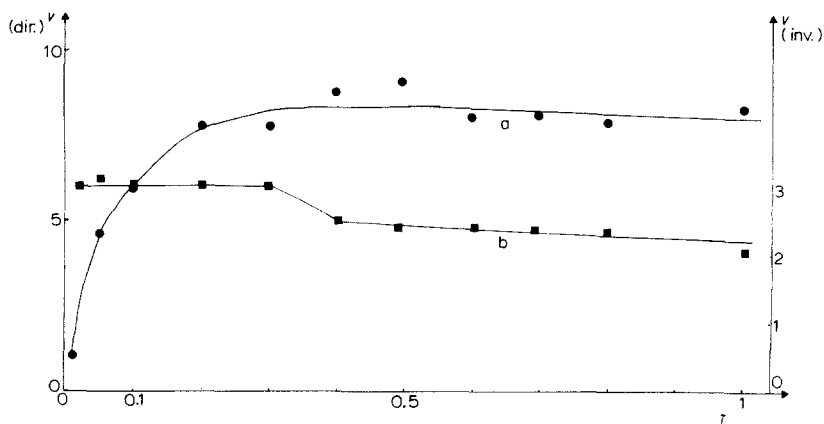


Fig. 1. Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la force ionique du milieu réactionnel. a, réaction directe. (Tampon phosphate, pH 7.7. Concentration en enzyme 5.1 $\mu\text{g/ml}$); b, réaction inverse. (Tampon phosphate, pH 6.9. Concentration en enzyme 0.1 $\mu\text{g/ml}$).

la concentration en phosphate, on peut penser que l'effet observé est dû à une activation par l'ion phosphate*.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors étudié la vitesse de la réaction dans deux tampons de force ionique identique mais dont la teneur en phosphate était différente. Les résultats sont résumés dans le Tableau II.

Ces résultats étaient en faveur de l'hypothèse précédente, c'est-à-dire que l'ion phosphate était activateur. Cependant, comme dans le deuxième cas (Tableau II, ligne 2) le milieu contient NaCl 0.3 M, nous nous sommes assurés que la diminution d'activité n'était pas due au Cl^- , ou à des interactions de type électrostatique.

Nous avons pour cela déterminé la vitesse de la réaction dans deux tampons dont la teneur en Cl^- était différente.

L'effet observé sur la Fig. 1a semble donc bien résulter d'une activation de la réaction par l'ion phosphate et non être dû à la force ionique. D'autre part la courbe a de la Fig. 1 a l'allure d'une courbe de fixation d'un ligand sur une protéine. Nous avons alors utilisé la représentation $1/v = f(1/[S])$ en fonction, non plus de la force

TABLEAU II

INFLUENCE DU PHOSPHATE SUR LA VITESSE DE LA RÉACTION DIRECTE; LE MILIEU RÉACTIONNEL CONTIENT 3.5 μg PROTÉINE

Composition du tampon	Force ionique	pH	Activité (unités/ml)
Phosphate 0.18 M	0.5	7.7	178
Phosphate 0.073 M + NaCl 0.3 M	+ 0.5	7.7	72

* L'influence spécifique des cations monovalents et divalents sur la vitesse de la réaction enzymatique fait l'objet d'une étude séparée. Des premiers résultats ont montré que Na^+ et K^+ n'ont pas d'effet activateur sur la réaction directe.

TABLEAU III

EFFET DE LA CONCENTRATION EN Cl^- SUR LA VITESSE DE LA RÉACTION DIRECTE; LE MILIEU RÉACTIONNEL CONTIENT $3.2 \mu\text{g}$ D'ENZYME

Nature du tampon	Force ionique	pH	Activité (unités/ml)
Tris-HCl 0.5 M	0.23	7.7	140
Tris-HCl 0.1 M	0.05	7.7	120

ionique, mais de la concentration en phosphate. La représentation est linéaire et la droite extrapolée coupe l'axe des abscisses en un point tel que " K " = 0.01 M (Fig. 2).

Il est intéressant de remarquer que DI PRISCO ET STRECKER⁹ ont trouvé, en utilisant la même représentation, une valeur identique pour l'abscisse de ce point d'intersection (" K " = 0.01 M), en étudiant l'influence du phosphate sur la réaction directe catalysée par la glutamate déshydrogénase de boeuf. Cependant ces auteurs précisent que cette valeur correspond simplement à l'intersection de la droite $1/v = f(1/[S])$ avec l'axe des abscisses et à la concentration en phosphate nécessaire pour obtenir une vitesse égale à $V/2$. Ils insistent sur le fait qu'il n'est pas encore possible de considérer " K " comme la constante de dissociation d'un complexe $E\text{-}P$.

Pour élucider le mécanisme de cette activation par l'ion phosphate il était intéressant de rechercher si le phosphate a une influence sur l'affinité de la protéine pour le NADP^+ , ce coenzyme possédant précisément un groupe phosphate latéral sur l'adénosine en position 2'.

(II) Influence du phosphate sur l'affinité de la glutamate déshydrogénase de levure pour le NADP^+

On a cherché à déterminer cette affinité en faisant varier la concentration en

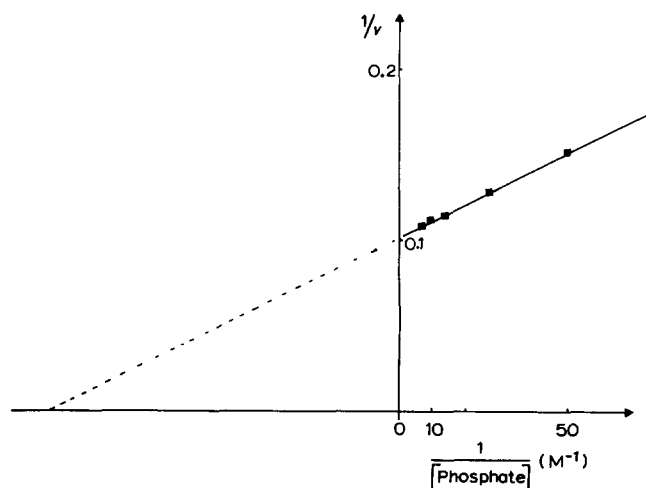


Fig. 2. Influence de la concentration en phosphate sur la vitesse de la réaction directe. (Tampon phosphate, pH 7.7. Concentration en enzyme $5.1 \mu\text{g/ml}$).

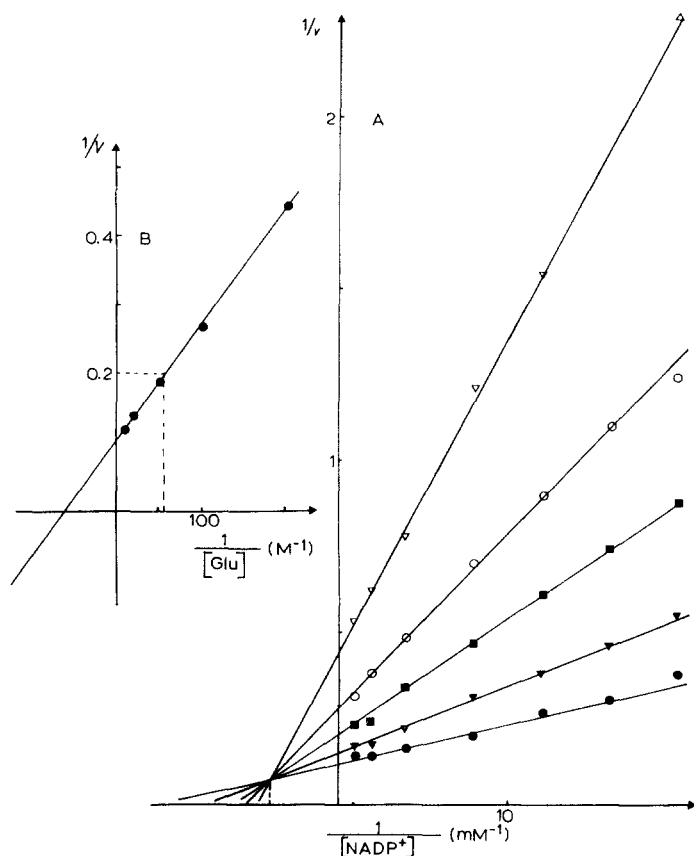


Fig. 3. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en NADP^+ pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. Tampon phosphate 0.18 M, pH 7.7. Concentration en enzyme: 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Concentrations en glutamate: \bullet — \bullet , 100 mM; \blacktriangle — \blacktriangle , 50 mM; \blacksquare — \blacksquare , 20 mM; \circ — \circ , 10 mM; \triangle — \triangle , 5 mM. (B) Graphique secondaire: on porte en ordonnées les valeurs de $1/v$ obtenues en (A).

phosphate dans le milieu réactionnel: la réaction a été étudiée dans des conditions de milieu différentes, soit en milieu tampon phosphate, concentré et dilué, soit en absence de phosphate, dans le tampon Tris-HCl.

(a) *Concentration élevée en phosphate*

La vitesse de la réaction est mesurée en milieu tampon phosphate (de sodium et potassium) 0.18 M, $I = 0.5$, le substrat variable étant le NADP^+ , pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. Les résultats sont interprétés à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk. On obtient une série de droites qui convergent en un même point. L'abscisse donne la valeur de $-1/K_D$, K_D étant la constante de dissociation du complexe $E\text{--}\text{NADP}^+$ (réfs. 16, 17) (Fig. 3).

Ces résultats expérimentaux repris dans la même représentation, le substrat variable étant le glutamate pour plusieurs concentrations fixes en NADP^+ , donnent à nouveau une série de droites convergeant en un même point (Fig. 4). La signification

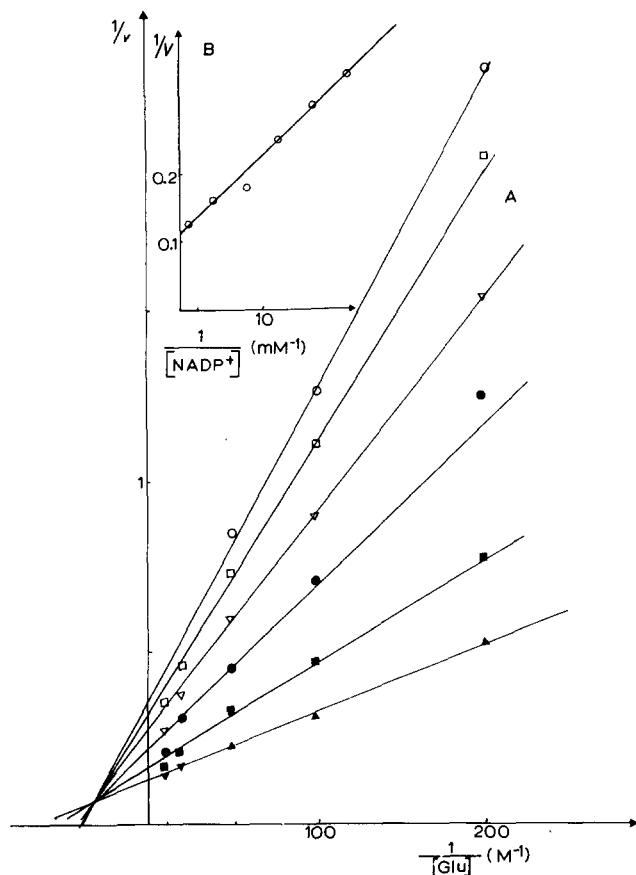


Fig. 4. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en glutamate, pour plusieurs concentrations fixes en $NADP^+$. Tampon phosphate: 0.18 M, pH 7.7. Concentration en enzyme: 2.6 $\mu g/ml$. Concentrations en $NADP^+$: \blacktriangle — \blacktriangle , 1 mM; \blacksquare — \blacksquare , 0.25 mM; \bullet — \bullet , 0.125 mM; \triangle — \triangle , 0.083 mM; \square — \square , 0.062 mM; \circ — \circ , 0.05 mM. (B) Graphique secondaire: on porte en ordonnées les valeurs de $1/V$ obtenues en (A).

de ce point reste cependant à préciser par des mesures de cinétique rapide si l'on admet que le $NADP^+$ est le premier substrat fixé sur l'enzyme¹⁶.

Enfin, à partir des courbes des Figs. 3 et 4, les graphiques secondaires représentant $1/V = f(1/[Glu])$ ou $f(1/[NADP^+])$ nous donnent les valeurs de K_m pour le glutamate et le $NADP^+$ dans les conditions indiquées: tampon phosphate 0.18 M, $I = 0.5$, temp. = 30°.

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau IV.

(b) Concentration faible en phosphate

Nous avons fait la même série d'expériences, mais le milieu réactionnel est constitué par le tampon phosphate (de sodium et potassium) 0.003 M, $I = 0.01$. Nous avons vu que, dans ces conditions (Fig. 1) la vitesse de la réaction directe est faible. Le même modèle de représentation $1/v = f(1/[NADP^+])$ pour plusieurs concentrations fixes en glutamate donne des familles de droites de deux pentes différentes. Ces résultats mettent en évidence, d'une part l'activation par le $NADP^+$ et d'autre

TABLEAU IV

VALEURS DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES POUR NADP⁺ ET GLUTAMATE DÉTERMINÉS DANS DIFFÉRENTS MILIEUX TAMPONS

Nature du tampon	Milieu réactionnel			NADP ⁺		Glutamate	
	Molarité (M)	Force ionique	pH	K_D (M)		K_m (M)	K_m (M)
				I	II		
Phosphate	0.18	0.5	7.7	$2.5 \cdot 10^{-4}$		$1.4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$
Phosphate	0.003	0.01	7.7	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$0.5 \cdot 10^{-4}$	$0.6 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-1}$
Tris-HCl	0.5	0.23	7.7	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$0.8 \cdot 10^{-4}$	$0.3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$

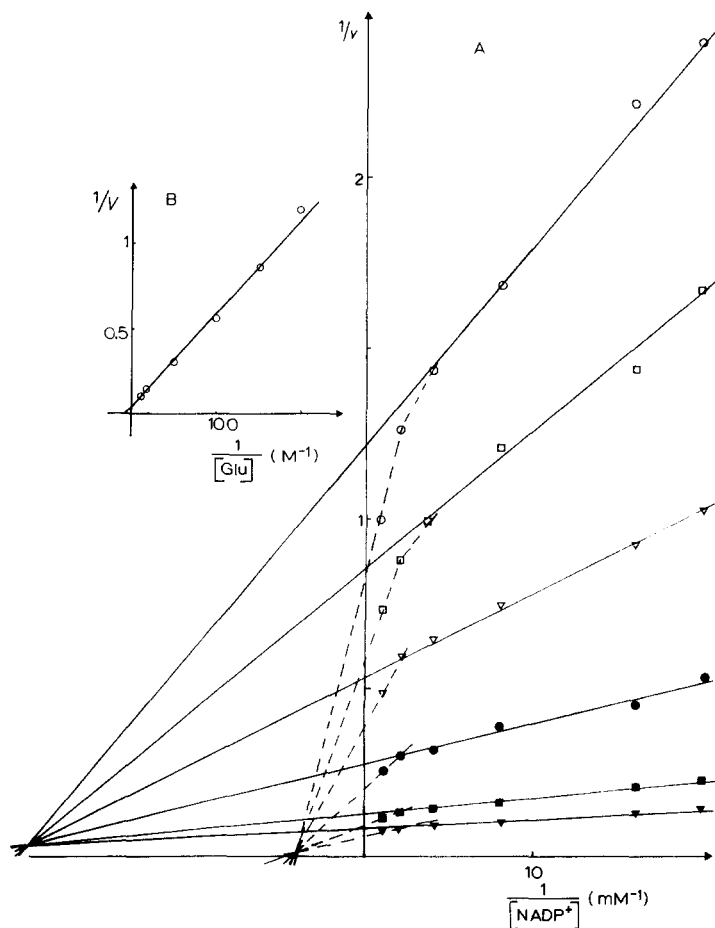


Fig. 5. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en NADP⁺ pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. Tampon phosphate 0.003 M, pH 7.7. Concentration en enzyme: 5 $\mu\text{g/ml}$. Concentrations en glutamate: \blacktriangle — \blacktriangle , 100 mM; \blacksquare — \blacksquare , 50 mM; \bullet — \bullet , 20 mM; \triangle — \triangle , 10 mM; \square — \square , 6.6 mM; \circ — \circ , 5 mM. (B) Graphique secondaire: on porte en ordonnées les valeurs de $1/v$ obtenues en (A).

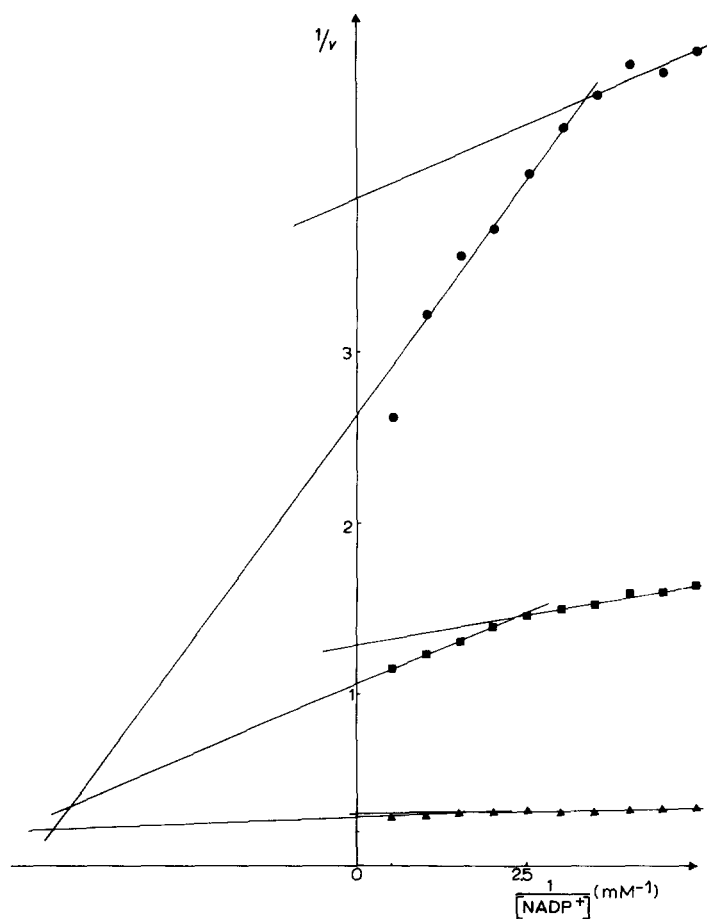


Fig. 6. Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en NADP^+ pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. Mêmes conditions que pour la Fig. 5, mais les concentrations en NADP^+ sont comprises entre 0.2 et 2 mM. Concentration en glutamate: \blacktriangle — \blacktriangle , 100 mM; \blacksquare — \blacksquare , 10 mM; \bullet — \bullet , 5 mM.

part la possibilité d'un deuxième site de fixation du coenzyme sur la protéine (Fig. 5.)

La Fig. 6 représente les résultats d'une expérience identique, effectuée dans un intervalle de concentrations en NADP^+ compris entre 0.2 et 2 mM: on retrouve une activation par le NADP^+ pour des concentrations en coenzyme comprises entre 0.4 et 2 mM.

Enfin la représentation des droites $1/v = f(1/[\text{Glu}])$ pour plusieurs concentrations fixes en NADP^+ et les graphiques secondaires $1/V = f(1/[\text{Glu}])$ ou $f(1/[\text{NADP}^+])$ nous donnent les valeurs de K_m pour le glutamate et le NADP^+ (Figs. 5 et 7).

(c) *En absence de phosphate*

Le milieu réactionnel est constitué par le tampon Tris-HCl 0.5 M. Le calcul montre que, dans ce tampon, la force ionique (I) est égale à la concentration molaire en HCl, soit 0.23 (réf. 18). Le même modèle de représentation $1/v = f(1/[\text{NADP}^+])$

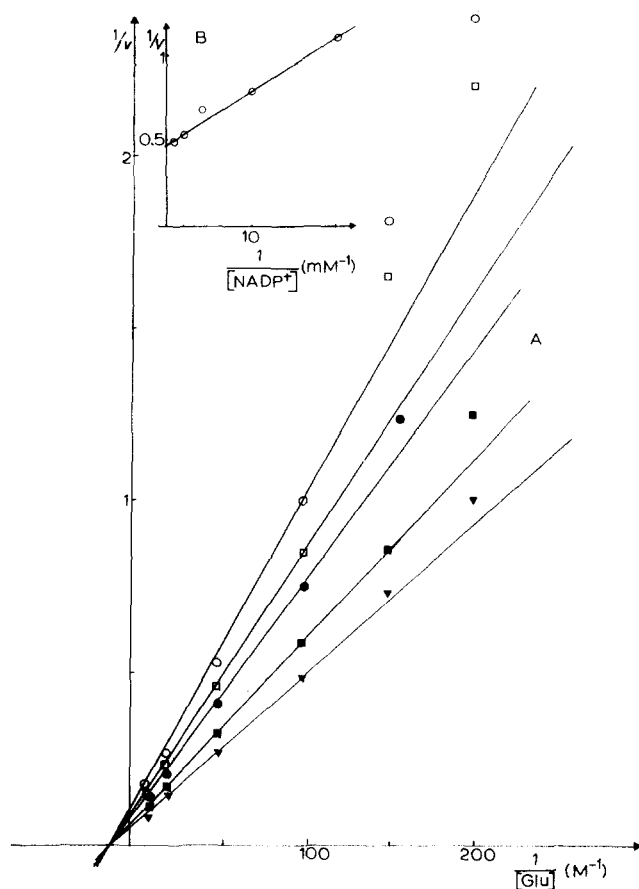


Fig. 7. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en glutamate pour plusieurs concentrations fixes en $NADP^+$. Tampon phosphate 0.003 M, pH 7.7. Concentration en enzyme: 5 $\mu g/ml$. Concentrations en $NADP^+$: \blacktriangle — \blacktriangle , 1 mM; \blacksquare — \blacksquare , 0.5 mM; \bullet — \bullet , 0.25 mM; \square — \square , 0.1 mM; \circ — \circ , 0.05 mM. (B) Graphique secondaire: on porte en ordonnées les valeurs de $1/v$ obtenues en (A).

pour plusieurs concentrations fixes en glutamate nous donne de nouveau des familles de droites ayant deux pentes différentes (Fig. 8a).

La Fig. 8b représente les résultats d'une expérience identique pour une concentration en glutamate de 5 mM dans un intervalle de concentrations en $NADP^+$ compris entre 0.5 et 3 mM: on retrouve une activation identique à celle observée sur la Fig. 8a.

De ces valeurs expérimentales représentées d'une façon différente on détermine les valeurs de K_m pour le glutamate et le $NADP^+$ (Figs. 8a, 9b et 9c).

L'ensemble des résultats est consigné sur le Tableau IV.

La comparaison des Figs. 3 et 5 montre que, dans le premier cas (phosphate concentré, force ionique élevée) la représentation de Lineweaver et Burk donne une relation linéaire. Dans le deuxième cas, par contre, phosphate très dilué, force ionique très faible, la représentation indique une activation par le $NADP^+$ et la possibilité

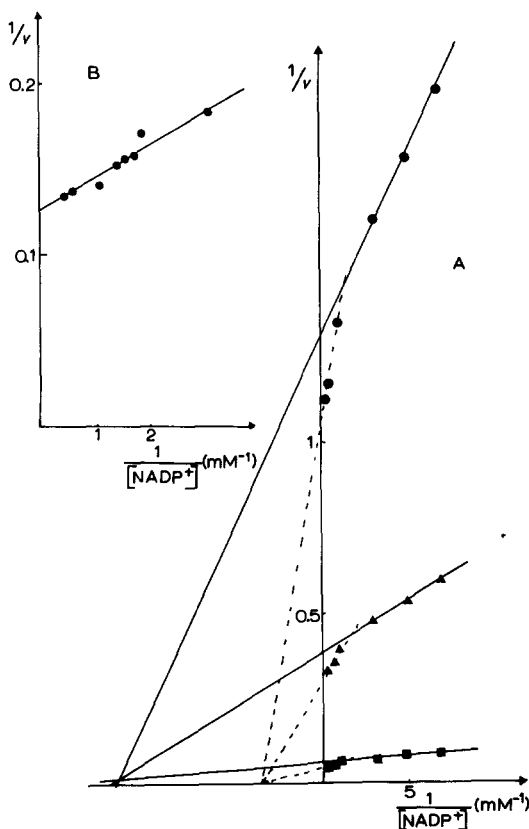


Fig. 8. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en NADP⁺, pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. Tampon Tris-HCl 0.5 M, pH 7.7. Concentration en enzyme: 2.6 $\mu\text{g/ml}$. Concentrations en glutamate: ■—■, 100 mM; ▲—▲, 20 mM; ●—●, 5 mM. (B) Môme expérience. Concentration en glutamate: 5 mM. Concentration en NADP⁺: 0.5 à 3 mM.

d'un site supplémentaire de fixation pour le coenzyme. A forte force ionique et en absence de phosphate (Fig. 8) nous retrouvons de nouveau une activation par le NADP⁺ et la possibilité de deux sites de fixation pour le coenzyme.

Les valeurs des constantes de dissociation du complexe $E\text{-NADP}^+$ correspondant à ou aux sites de la protéine pour le NADP⁺ sont groupées sur le Tableau IV.

D'après le Tableau IV, nous voyons que:

(1) A force ionique élevée et en tampon phosphate concentré (1ère ligne) la valeur de K_D est: $2.5 \cdot 10^{-4}$ M.

(2) Pour une concentration en phosphate faible ou nulle (2ème et 3ème lignes) ces valeurs sont respectivement $0.5 \cdot 10^{-4}$ et $0.8 \cdot 10^{-4}$ M, ce qui traduit une affinité plus grande de la protéine pour le NADP⁺. Cependant les valeurs de K_D obtenues à partir de la deuxième partie des courbes (Figs. 5, 6 et 8) sont identiques à la première valeur $2.5 \cdot 10^{-4}$ M. Ces résultats semblent montrer que, lorsqu'il y a un excès de phosphate dans le milieu, celui-ci masquerait un des sites de fixation du NADP⁺. Cet effet paraît indépendant de la force ionique.

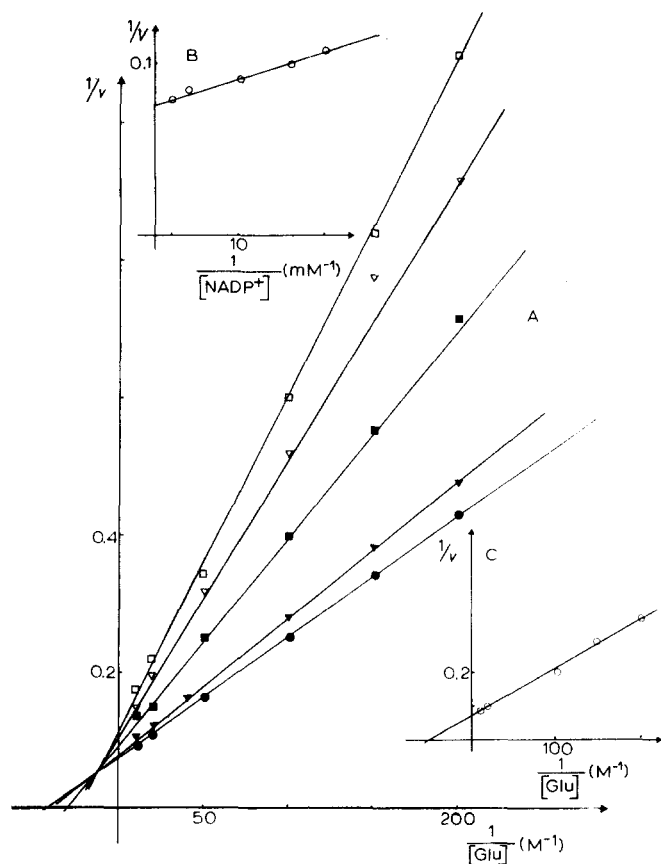


Fig. 9. (A) Variation de la vitesse de la réaction directe en fonction de la concentration en glutamate pour plusieurs concentrations fixes en $NADP^+$. Tampon Tris-HCl 0.5 M, pH 7.7. Concentrations en $NADP^+$: \bullet — \bullet , 0.5 mM; \blacktriangle — \blacktriangle , 0.25 mM; \blacksquare — \blacksquare , 0.1 mM; \triangle — \triangle , 0.062 mM; \square — \square , 0.050 mM. (B) Graphique secondaire: on porte en ordonnées les valeurs de $1/V$ obtenues en (A). (C) Les mêmes résultats ont été repris de manière à représenter $1/V = f(1/[NADP^+])$ pour plusieurs concentrations fixes en glutamate. On a représenté le graphique secondaire représentant $1/V$ en fonction de l'inverse de la concentration en glutamate.

Pour la fixation du glutamate, nous obtenons des résultats différents à forte force ionique, en présence ou en absence de phosphate (lignes 1 et 3), les valeurs de K_m sont identiques: $2 \cdot 10^{-2}$ M. Cependant, à faible force ionique, la valeur de K_m est d'un autre ordre de grandeur: $1 \cdot 10^{-1}$ M. L'affinité apparente de la protéine pour le glutamate augmente avec la force ionique. La liaison du glutamate sur le complexe $E-NADP^+$ fait intervenir de façon plus évidente des forces de nature électrostatique.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats, obtenus par des mesures de cinétique à l'état stationnaire, fait apparaître le rôle important et multiple joué par le phosphate sur la réaction de désamination oxydative du glutamate catalysée par la glutamate dés-hydrogénase de levure spécifique du $NADP^+$: le phosphate se fixe sur la protéine, il

est activateur de la réaction directe, il diminue l'affinité de la protéine pour le NADP^+ , enfin l'activation de la réaction directe pour le NADP^+ qui se produit pour des concentrations élevées en coenzyme n'apparaît pas en présence de phosphate.

On pouvait penser que cet effet phosphate se ramène à une influence de la force ionique: en effet une élévation de celle-ci modifie les propriétés cinétiques de la glutamate déshydrogénase de mammifère et sa réactivité vis-à-vis de certains effecteurs^{19,20}. Nos études cinétiques effectuées en présence de sels autres que le phosphate et à différentes forces ioniques nous ont permis de vérifier que cet effet activateur semble dû au phosphate plutôt qu'à la force ionique.

D'autre part, nous avons observé cet effet phosphate à pH 7.7, pH auquel l'enzyme possède une activité optimale dans le sens de la réaction directe. Or DI PRISCO ET STRECKER⁹ ont déjà observé par des méthodes cinétiques sur la glutamate déshydrogénase de boeuf que les électrolytes et plus particulièrement le phosphate avaient un effet activateur sur la réaction directe et masquaient l'activation par le NAD^+ et le NADP^+ , mais ceci seulement à pH 9, pH où la molécule se trouve sous une forme instable. Par contre à pH 7.6 ils n'observaient aucun effet. Ils interprétaient ces résultats comme une action des électrolytes sur la conformation de la molécule qui, dans ces conditions, c'est-à-dire à pH 9, aurait un site inaccessible aux coenzymes⁹. Ces auteurs ont retrouvé le même effet des sels sur la glutamate déshydrogénase de foie de rat à pH 7.6²¹ et très récemment, dans le cas d'une glutamate déshydrogénase d'origine nucléaire, à pH 9 seulement²². Cet "effet phosphate" est donc important et leur permet de caractériser les différentes glutamate déshydrogénases. Il semble que le comportement de la glutamate déshydrogénase de levure puisse être rapproché de celui de ces deux enzymes récemment isolés.

Ayant donc établi que l'effet du phosphate était spécifique, nous avons étudié son influence sur la fixation du NADP^+ sur la protéine. Ainsi, en absence de phosphate, ou à très faible concentration en phosphate, les résultats obtenus par des mesures cinétiques et traduits par la représentation de Lineweaver et Burk mettent en évidence une activation de la réaction directe par NADP^+ aux fortes concentrations en coenzyme, ce qui permet de proposer l'existence de deux sites de fixation pour le coenzyme. Par ces mêmes méthodes, FRIEDEN^{23,24} avait établi l'existence de deux sites de fixation pour NAD^+ et NADH et cette hypothèse a été vérifiée directement, par la suite, par PANTALONI ET IWATSUBO²⁵ et PANTALONI ET DESSEN²⁰ par spectrophotométrie de différence et par dispersion optique rotatoire.

Si l'existence de deux sites de fixation pour NAD^+ et NADH est actuellement admise pour les glutamate déshydrogénases de mammifères et de microorganismes, on a considéré jusqu'à présent que NADP^+ et NADPH ne pouvaient se fixer qu'en un seul site, le deuxième n'étant pas accessible au groupement phosphate supplémentaire du coenzyme. Or nos résultats se rapportant à la glutamate déshydrogénase de levure monteraient que, dans certains cas, et notamment en absence de phosphate, le NADP^+ pourrait se fixer sur deux sites distincts de la protéine. Nous avons vérifié par ultracentrifugation et par électrophorèse¹¹ que l'activation observée ne pouvait être due à la présence d'un autre enzyme sous forme d'impureté. DI PRISCO *et al*²⁰ avaient déjà montré en 1965 que NADP^+ pouvait activer la réaction directe catalysée par la glutamate déshydrogénase de boeuf, dans des conditions particulières de pH. Or les travaux récents de ENGEL ET DALZIEL²⁶ sur la glutamate déshydrogénase de boeuf remettent en question le problème de la fixation des coenzymes; en utilisant

le NADP⁺ dans une gamme très large de concentration, ils obtiennent, à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk, plusieurs droites de pentes différentes, aussi bien en tampon phosphate 0.1 M, pH 7.6, qu'en tampon Tris-acétate 0.01 M, pH 8, c'est-à-dire dans les conditions utilisées par FRIEDEN^{23,24}. L'écart à la linéarité observée traduirait des interactions négatives entre les différents centres actifs de l'enzyme.

Dans un travail antérieur⁷, nous avons déjà montré qu'il se manifestait une inhibition de la réaction inverse par NADPH, ce qui serait un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de deux sites de fixation pour le coenzyme^{23,24}.

Le rôle complexe du phosphate sur la réactivité de la glutamate déshydrogénase de levure spécifique du NADP⁺ vis-à-vis de ce coenzyme nous permet donc de penser que cet enzyme possède des propriétés régulatrices, à l'encontre de ce qui a été montré jusqu'à présent pour les glutamate déshydrogénases de même spécificité².

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur J. Tonnelat pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail, Mademoiselle S. Guinand et Monsieur D. Pantaloni pour les fructueuses discussions qui nous ont aidés à le réaliser.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 2028.
- 2 H. B. LE JOHN ET B. E. MCCREA, *J. Bacteriol.*, 95 (1968) 87.
- 3 H. B. LE JOHN ET S. JACKSON, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3447.
- 4 V. R. SHATILOV, Z. G. EVSTIGNEEVA ET V. L. KRETOVITCH, *Biokhimiya*, 34 (1969) 409.
- 5 H. HOLZER ET S. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 361.
- 6 S. GRISOLIA, C. L. QUIJADA ET M. FERNANDEZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 61.
- 7 A. FOURCADE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1671.
- 8 C. FRIEDEN, dans D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New-York, 2nd edn., 1963, p. 3.
- 9 G. DI PRISCO ET H. J. STRECKER, *Eur. J. Biochem.*, 9 (1969) 507.
- 10 M. W. BITENSKY, K. L. YIELDING ET G. M. TOMKINS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 663.
- 11 A. FOURCADE ET R. VENARD, résultats non publiés.
- 12 M. SZYLIT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 799.
- 13 A. KORNBERG, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New-York, 1st edn., 1957, p. 878.
- 14 G. DI PRISCO ET H. J. STRECKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 413.
- 15 A. A. GREEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 2331.
- 16 C. FRIEDEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 1894.
- 17 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2891.
- 18 S. P. DATTA ET A. K. GRZYBOWSKI, dans *Biochemists' Handbook*, Lond and Spon, London, 1961, p. 27-33.
- 19 K. L. YIELDING ET B. B. HOLT, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 1079.
- 20 D. PANTALONI ET P. DESSEN, *Eur. J. Biochem.*, 11 (1969) 510.
- 21 G. DI PRISCO, S. M. ARFIN ET H. J. STRECKER, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1611.
- 22 G. DI PRISCO ET H. J. STRECKER, *Eur. J. Biochem.*, 12 (1970) 483.
- 23 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 809.
- 24 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 815.
- 25 D. PANTALONI ET M. IWATSUBO, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 217.
- 26 P. C. ENGEL ET K. DALZIEL, *Biochem. J.*, 115 (1969) 621.

Biochim. Biophys. Acta, 242 (1971) 331-344