



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Comparaison des propriétés de l'acetaldehyde deshydrogenase en solution et insolubilisé

Schraverus, Oscar

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

COMPARAISON DES PROPRIÉTÉS DE
L'ACÉTALDEHYDE DESHYDROGENASE
EN SOLUTION ET INSOLUBILISÉ.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

SCHRAVERUS OSCAR

Je tiens en fin de ce travail à remercier

Monsieur Remacle pour m'avoir guidé de ses conseils.

Mes remerciements vont également à tous les membres du personnel technique et scientifique des laboratoires

de Biochimie Cellulaire et de Chimie Physiologique qui

m'ont familiarisé avec les techniques de laboratoire,

ainsi qu'à Monsieur Eric Titeca pour assistance technique.

Juin 1984.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	4
- Position du travail	4
- Les aldéhyde déshydrogénases	6
- Mécanisme de réaction	8
- L'immobilisation d'enzymes	12
PREMIERE PARTIE: L'acétaldéhyde déshydrogénase en solution	15
CHAPITRE 1: Optimisation du dosage de l'enzyme en solution	15
1. Introduction	15
2. Matériels et Méthodes	15
3. Résultats et discussions	18
A. Effet du pH	18
B. Cinétique	20
C. Effet du mercaptoéthanol	26
D. Effet du potassium	29
E. Température	31
Conclusion	33
CHAPITRE 2: Conditions de stockage et étude de la stabilité de l'enzyme en solution	34
1. Introduction	34
2. Méthode	34
3. Résultats et discussion	34
A. pH de stockage	34
B. Potassium	37

	<u>Page</u>
C. Mercaptoéthanol	39
D. Autres réducteurs	41
E. EDTA	44
F. Albumine	46
G. Substrat et cofacteur	47
Conclusion	49
DEUXIEME PARTIE : La fixation de l'acétaldéhyde déshydrogénase sur support	51
1. Choix du support et de la méthode d'activation	51
2. Expériences préliminaires	53
3. Méthode de couplage	56
4. Mise au point du dosage de l'enzyme couplé	58
5. Résultats et discussion	59
A. pH de dosage	59
B. Effet du KCl	59
C. Effet du mercaptoéthanol	60
D. Quantité de trésylate	61
E. Quantité d'enzyme	63
F. Durée du couplage	65
G. Couplage en présence de NAD^+	67
Conclusion	69
5. Cinétique de l'enzyme couplé	70
6. Stabilité de l'enzyme couplé	73

	Page
Conclusion sur le Couplage	77
CONCLUSION GENERALE	78
Bibliographie	79

INTRODUCTION

- Position du travail

Dans les systèmes vivants se déroulent un grand nombre de réactions d'oxydo-réduction catalysées par des enzymes. Parmi ceux-ci se trouvent les déshydrogénases qui catalysent certaines réactions d'oxydation par retrait de deux atomes d'hydrogène du substrat. Ceux-ci sont donnés à une molécule appelée le cofacteur au cosubstrat qui passe ainsi de la forme oxydée à la forme réduite.

Les réactions d'oxydation servent souvent à retirer de l'énergie de composés riches en énergie, réduits, par exemple les glucides, les acides gras ... pour la stocker finalement dans la liaison phosphate riche en énergie de l'adénosine tri-phosphate ou ATP.

Les synthèses vont souvent faire intervenir des réactions de réduction, également catalysées par des déshydrogénases, mais qui vont utiliser les atomes d'hydrogène présents sur la forme réduite du cofacteur.

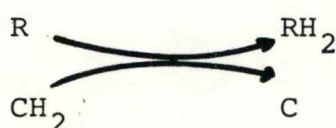
Les transferts d'hydrogène sont en réalité des transferts d'électrons dans lesquels les protons accompagnent le transfert d'électrons en neutralisant les charges.

Schéma des réactions d'oxydo-réduction catalysées par les déshydrogénases

Oxydation



Réduction



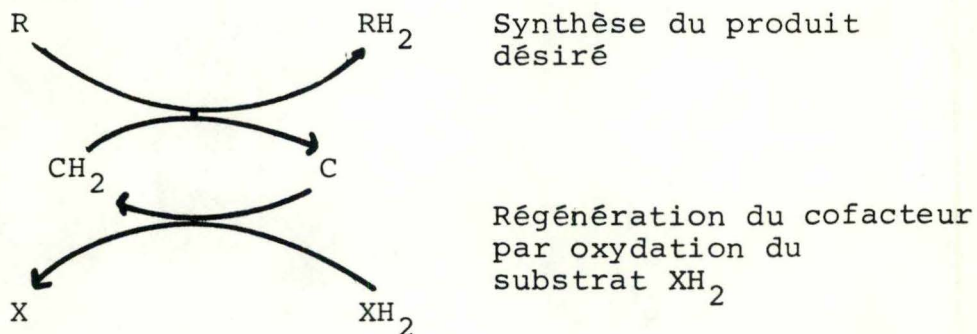
R = substrat

C = cofacteur

Le but de ce travail est d'apporter une contribution à la mise au point d'un réacteur enzymatique capable de régénérer un cofacteur, qui sera la NAD^+ , c'est-à-dire le restituer sous sa forme réduite afin qu'il puisse être réutilisé dans une réaction de réduction pour une synthèse donnée.

Le procédé de régénération doit être valable économiquement. On va donc utiliser un substrat qui, une fois oxydé, aura une valeur économique supérieure si possible ou au moins égale au substrat de départ.

Le schéma global du système sera donc:



Pour ce travail, l'enzyme choisi est l'acétaldéhyde déshydrogénase, qui oxyde l'acétaldéhyde en acide acétique, réaction qui s'accompagne de la réduction ou régénération sous forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide ou NADH.

Notons qu'il est possible de mettre au point une chaîne de réactions d'oxydation, où un substrat est complètement oxydé en plusieurs étapes, chaque étape permettant la régénération d'une molécule de cofacteur. L'acétaldéhyde est un produit d'oxydation partielle de l'éthanol.

Les enzymes devront bien entendu être fixés sur un support insoluble afin de bénéficier de tous les avantages donnés par l'insolubilisation (voir plus loin).

- Les aldéhydes déshydrogénases

Les aldéhydes déshydrogénases interviennent pour éliminer de l'organisme les aldéhydes toxiques, en les transformant en acides carboxyliques.

Ces enzymes interviennent également dans le métabolisme des alcools. Une voie métabolique bien connue est l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde, réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase NAD^+ dépendante, suivie de l'oxydation de l'acétaldéhyde produit en acide acétique. L'enzyme qui catalyse cette seconde étape, l'acétaldéhyde déshydrogénase NAD^+ dépendante a été beaucoup moins étudié que l'alcool déshydrogénase, en raison surtout des difficultés rencontrées lors de sa purification (Sorger-Evans 1966,

Clark-Jacoby 1980).

Il existe de nombreux types d'aldéhyde déshydrogénases spécifiques ou non pour les divers types de substrats aldéhydiques ou semi-aldéhydiques. Ces enzymes comprennent tous quatre sous-unités, d'un poids moléculaire d'environ 62.500 (Bostian-Betts 1977).

L'enzyme intact a un poids moléculaire de 240.000 environ (Clark-Jacoby 1970).

Leurs propriétés cinétiques et moléculaires, ainsi que leur sensibilité aux agents externes varient d'un type à l'autre.

Le tableau ci-dessous montre quelques exemples:

<u>Déshydrogénase</u>	<u>Source</u>	<u>Spécificité</u>	<u>Cofacteur au Cosubstrat</u>
Aldéhyde	Foie de bovin	-	Stéroïdes
Aldéhyde	Levure	Aliphatique	K^+ , Rb^+ , Mg^{++}
Aldéhyde	Pseudomonas	-	Phosphate
Formaldéhyde	Foie de bovin	Stricte	Glutathion
Aldéhyde	Clostridium	Aliphatique	Coenzyme A
Semi aldéhyde succinique	Levure	Stricte	Phosphate

d'après Clark et Jacoby 1970

- Mécanisme de la réaction

La réaction d'oxydation d'aldéhydes en acides carboxyliques est fortement exergonique et l'équilibre de la réaction est fortement déplacé vers le sens de la formation des produits (Ting-Kai Li 1973).

La participation de groupements sulfhydriles et de ponts disulfure paraît établie (Bostiau et al 1977, Steinman & Jacoby 1967, Bradbury & Jacoby 1972).

Les aldéhydes, en présence de mercaptane, forment spontanément des thiohémiacétals qui seraient les substrats effectifs, réagissant avec un sulfhydryle libre du site actif de l'enzyme.

Les observations en faveur de cette hypothèse sont que les réactifs bloquant les groupements sulfhydryles, tel le paramercuribenzoate inactivent ces enzymes, mais les substrats et cosubstrats, c'est-à-dire aldéhydes et NAD^+ les protègent contre une telle inactivation (Jacoby 1970). L'arsenite, connu pour lier deux groupements sulfhydryles proches inhibe les aldéhyde déshydrogénases et cette inhibition est compétitive avec le substrat (Nirenberg, 1960).

En général, la neutralisation d'un groupe sulfhydryle ou la rupture d'un pont disulfure pourrait entraîner des changements de conformation de l'enzyme qui seraient la cause de l'inactivation, plutôt que l'effet direct des réactifs bloqueurs de sulfhydryle sur le site actif (Bayer, 1959; Lindenstrøm et al, 1960).

Il est généralement admis que les groupements sulfhydryles affectés par les inhibiteurs ne sont pas ceux qui sont impliqués dans la liaison avec la NAD^+ .

Ceci nous amène à formuler des hypothèses sur le mécanisme de la réaction. Différentes questions se posent en effet: quel est le rôle des mercaptanes exogènes? N'agissent-ils que sur le substrat? Dans quel ordre substrat et cofacteur se fixent-ils à l'enzyme?

Le substrat aldéhydique

La théorie de la formation de thiohémiacétal semble largement admise, soit qu'un sulfhydryle de l'enzyme réagisse directement avec le substrat pour former le thiohémiacétal d'enzyme qui sera oxydé en thioester, lui-même hydrolysé en donnant le complexe enzyme-NADH et l'acide carboxylique. Soit alors qu'un mercaptane exogène forme d'abord le thiohémiacétal substrat. A noter également que l'acétaldéhyde en solution aqueuse existe sous la forme hydratée inactive et la forme carbonyle libre, substrat actif (Ting-Kai Li, 1973).

Une étude signale une inhibition par le substrat: lorsque le rapport molaire acétaldéhyde-enzyme est égal à 1, on observe une activité maximale. Par contre, quand il y a deux moles d'acétaldéhyde par mole d'enzyme, on voit apparaître des complexes enzyme-substrat inactifs (Stoppani-Milstein 1957).

Cette inhibition ne s'observe pas si on préincube l'enzyme avec la NAD^+ .

A la lumière d'autres travaux, on observe qu'à concentrations élevées en acétaldéhyde, ce dernier se fixe à l'enzyme libre, c'est-à-dire non encore lié à la NAD^+ (Takir et al 1974, Dalziel 1975).

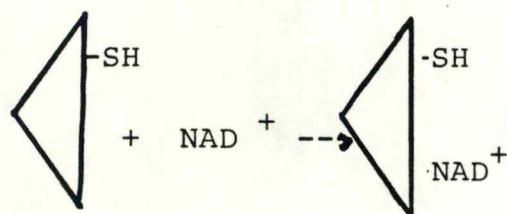
La NAD^+ agirait comme premier substrat dans cette réaction à deux substrats à simple déplacement ordonnée (voir "cinétique"). Comme il s'agit d'une réaction enzymatique à deux substrats, plusieurs types de complexes enzyme-substrat peuvent se former. Ce peuvent être des complexes binaires enzyme-aldéhyde, ou enzyme NAD^+ ou bien des complexes ternaires enzyme-aldéhyde- NAD^+ .

Dans les réactions dites à double déplacement, un des substrats se fixe d'abord, puis le produit correspondant est libéré avant la fixation du second substrat. Dans le cas de la réaction à simple déplacement, les deux substrats doivent se trouver sur leur site actif et former avec l'enzyme un complexe ternaire nécessaire à la réaction.

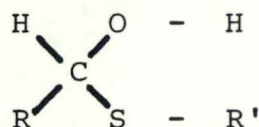
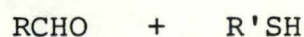
La fixation du substrat peut se faire au hasard ou être ordonnée. Les aldéhyde déshydrogénases fixent préférentiellement la NAD^+ (Lefringa 1979) bien que la fixation de la NAD^+ sur l'enzyme ne se fasse parfois pas, pour des raisons non encore élucidées (Bostian-Betts 1977). L'inhibition observée aux fortes concentrations en aldéhyde s'explique parce que l'aldéhyde se fixerait sur l'enzyme libre qui soit n'a pas encore fixé la NAD^+ , soit l'a relâché (voir "le substrat aldéhydique").

Schéma spéculatif pour expliquer le mécanisme de la
réaction enzymatique d'oxydation d'aldéhydes.

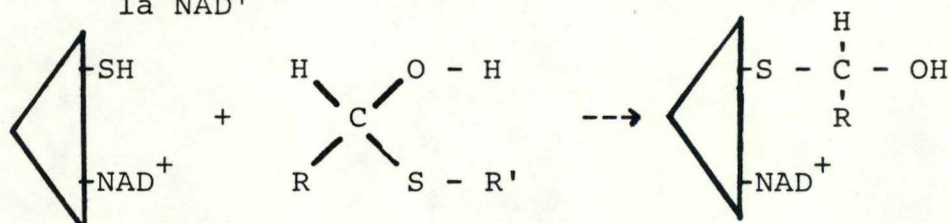
d'après Jacoby 1963



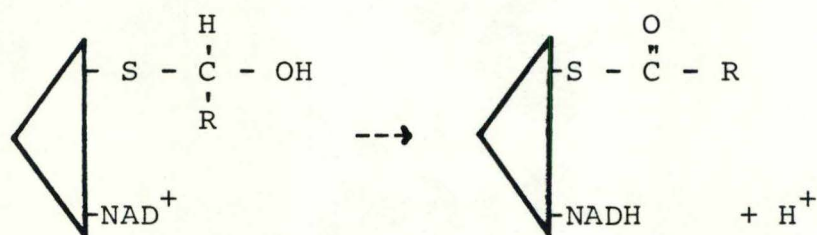
1. L'enzyme libre fixe
 préférentiellement
 la NAD⁺



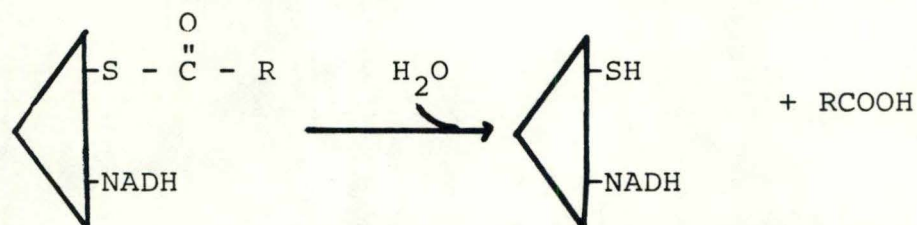
2. aldéhyde et mercaptane
 forment un thiohémiacétal



3. Formation du thiohémiacétal d'enzyme = complexe
 ternaire



4. Transfert d'électrons = oxydation en thioester



5. Hydrolyse libérant le produit (acide carboxylique).

L'enzyme sera réoxydé par la NAD⁺ du milieu

- L'immobilisation d'enzymes

L'immobilisation d'enzymes, ou plus exactement la rétention d'enzymes dans une phase insoluble présente un intérêt tant théorique que pratique.

Dans la nature, la plupart des enzymes agissent non pas à l'état libre, mais souvent fixés soit au niveau des structures membranaires des cellules et leurs organites, soit aux composés argileux et humiques des sols. La compréhension des propriétés de certains enzymes est donc grandement facilitée par l'étude des enzymes fixés sur une phase insoluble.

Dans le domaine pratique et industriel, la fixation des enzymes offre la possibilité d'une mise en oeuvre continue ou de l'utilisation répétée de biocatalyseurs très spécifiques et efficaces, sans contamination du milieu.

Il existe trois grands groupes de méthodes de fixation d'enzymes, qui peuvent se résumer comme suit: l'inclusion dans le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère; l'immobilisation par adsorption non spécifique mettant en jeu des interactions chimiques de type secondaire entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et le support, à savoir interactions de Van der Waals, hydrophobes, liaison hydrogène, attraction ionique ou transferts de charge; enfin le type de méthode le plus couramment utilisé, la fixation par liaisons covalentes. Ici, il faut distinguer la réticulation, qui est la liaison des molécules d'enzyme entre elles, de la liaison sur support.

Nous allons nous intéresser à la fixation d'enzymes par liaisons covalentes sur support.

Le tableau ci-dessous montre les principaux groupes fonctionnels présents dans la molécule d'enzyme et les supports ainsi que les principales méthodes d'activation des supports.

L'activation des enzymes par fixation de groupes réactionnels sur la protéine n'a jusqu'à présent pas donné de résultats probants.

<u>Support</u>	<u>Enzyme</u>	<u>Méthode d'activation</u>
-NH ₂	COOH	Carbodiimide
	NH ₂	Glutaraldéhyde
-COOH	-NH ₂	Carbodiimide
-OH	-NH ₂	Bromure de cyanogène, triazines Tosyl, Tresyl
O NH ₂	O OH	Sel de diazonium
-SH	-SH	Pont disulfure

L'avantage de ce type de fixation est la solidité de la liaison covalente, peu sensible aux variations de condition du milieu tels le pH ou la force ionique.

D'autre part, il existe une grande variété de supports et de méthodes d'activation, permettant l'adaptation au type d'enzyme que l'on veut utiliser.

La structure tridimensionnelle de l'enzyme étant rendue plus rigide, il devrait se montrer moins sensible aux agents de dénaturation comme le pH extrême ou les températures élevées, mais cette rigidification, accompagnée de modifications éventuelles de la structure tertiaire et/ou quaternaire (pour les enzymes comportant des sous unités) dues à la fixation peut aussi leur faire perdre ses propriétés catalytiques.

Parmi les autres inconvénients, citons la relative complexité de ces méthodes, et l'impossibilité de prévoir quel sera le rendement d'un couplage, celui-ci différant fortement d'un enzyme à l'autre (P. Monsan).

Les supports comprenant des groupements hydroxyles tels l'agarose, la cellulose, l'hydroxyméthyl méthacrylate peuvent être activés par des composés sulfonyles réactionnels, tels le paranitrobenzène sulfonate, le trifluorométhane sulfonyle, le paratoluène sulfonate, le 2.2.2 trifluoroéthane sulfonyle ou trésyl. Cette réaction se fait

par attaque nucléophile de l'oxygène du support sur le soufre électrophile du groupement sulfonyle (voir plus loin "mécanisme d'activation au trétyl" deuxième partie).

Le support activé au trétyl permet un couplage dans des conditions douces et est de ce fait indiqué pour la fixation d'enzymes sensibles aux conditions du milieu, aux variations de pH notamment.

Le couplage se fait par attaque nucléophile d'un azote ($-NH_2$) ou d'un soufre ($-SH$) de la protéine sur le carbone porteur du support (voir plus loin "couplage", deuxième partie).

La méthode au trétylate est relativement rapide; l'activation proprement dite dure quelque dix minutes.

Le gel activé est très stable, même en milieu aqueux, pour autant que le pH de stockage soit assez bas.

Le couplage est efficace pour la plupart des enzymes qui ont été testés tant du point de vue du rendement que du point de vue de la liaison support-enzyme (Nilsson - Mosbach, 1981).

PREMIERE PARTIE

L'ACETALDEHYDE DEHYDROGENASE EN SOLUTION

CHAPITRE 1Optimisation du dosage de l'enzyme en solution1. Introduction

L'activité d'un enzyme dépend d'un grand nombre de paramètres; nous en avons étudié plusieurs afin d'optimiser les conditions de dosage. Les variables les plus courantes sont le pH, qui a pour effet d'agir sur les charges des substrats et de l'enzyme, la concentration en substrat et en cofacteur (voir plus loin "cinétique").

L'activité de l'acétaldéhyde déhydrogénase dépend également de la présence de thiols à cause de l'intervention de groupements sulfhydryles dans le site actif, et de l'action des thiols avec le substrat aldéhydique (voir introduction générale "mécanisme de la réaction").

Nous examinerons donc un par un l'effet de ces divers facteurs sur l'activité de l'enzyme.

2. Matériels et méthodes- Réactifs utilisés

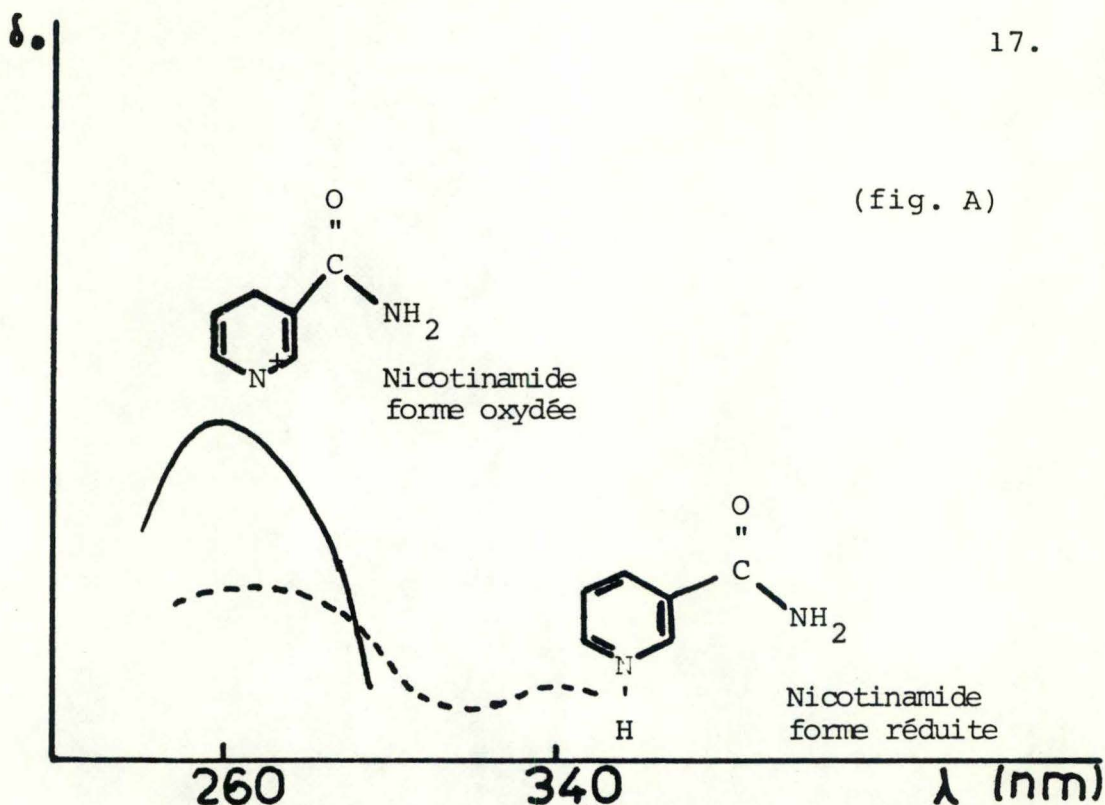
A. L'enzyme

Il s'agit de l'aldéhyde déhydrogénase ou
aldéhyde - NAD (P)⁺ oxydoréductase
de levure *Saccharomyis Cerevisae*
(Baker Yeast)

sous forme de poudre lyophilisée contenant 86% de protéine.

La préparation a une activité de 13 unités par mg de solide ou 15 unités par mg de protéine,

une unité étant définie par la firme comme étant la quantité d'enzyme qui oxyde 1.0 micromôle d'acétaldéhyde en acide acétique par minute, à pH 8.0 et à



L'augmentation de concentration en NADH entraîne une augmentation de l'absorbance à 340 nm, ce qui permet de mesurer la vitesse de disparition du substrat, donc l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique est donc mesurée par spectrophotométrie. L'augmentation de concentration en NADH est linéaire si la réaction est d'ordre zéro par rapport au NAD^+ .

Densité optique et concentration sont liés par la formule

$$\delta_o = \text{Log} \frac{I_o}{I} = \alpha \cdot c \cdot d \quad \text{où } \delta_o \text{ est la densité optique}$$

I_o l'intensité lumineuse à l'entrée de la solution

I l'intensité lumineuse à la sortie

d la distance parcourue au travers de la solution

α le coefficient d'extinction micromolaire.

La NADH a un coefficient d'extinction micromolaire de 6.22 pour $d = 1$ cm.

La réaction a toujours lieu dans une cuvette où $d = 1$ cm; en tenant compte de la dilution totale de l'enzyme, on utilise donc la formule suivante pour

25°C en présence de NAD^+ et de thiols (SIGMA
CHEMICALS COMPANY, St. LOUIS,
MO 63178 U.S.A.)
produit N° A-1654

B. La NAD^+

Nicotinamide adénine dinucléotide, poudre lyophilisée grade IV, fourni par SIGMA

- Solutions du travail

L'enzyme est dissous dans du tampon TRIS-HCl pH 8.0, 10 mM contenant du KCl 10 mM et du mercaptoéthanol 5 mM, pour obtenir une solution contenant 1 mg d'enzyme par ml. Cette solution stock est conservée à - 15°C.

L'acétaldéhyde est dissous à raison de 20 mg/ml dans l'eau distillée. La solution est stockée à 4°C.

La NAD^+ est également dissoute dans l'eau distillée, 66.3 mg/ml ou 0,1 M et conservée ainsi à 4°C.

- Méthode de dosage de l'enzyme

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui modifie une micromole de substrat en une minute dans les conditions de dosage déterminées.

L'acétaldéhyde déshydrogénase oxyde l'acétaldéhyde en acide acétique, et corrélativement réduit la NAD^+ en NADH.

La NAD^+ absorbe intensément la "lumière" à 260 nm, tandis que la forme réduite présente un second pic d'absorption à 340 nm.

obtenir l'activité à partir de l'augmentation d'absorbance mesurée au spectrophotomètre:

$$\frac{\text{Absorbance/min} \times \text{dilution totale de l'enzyme}}{6.22} = \text{activité en } \mu\text{M/min pour 1 ml}$$

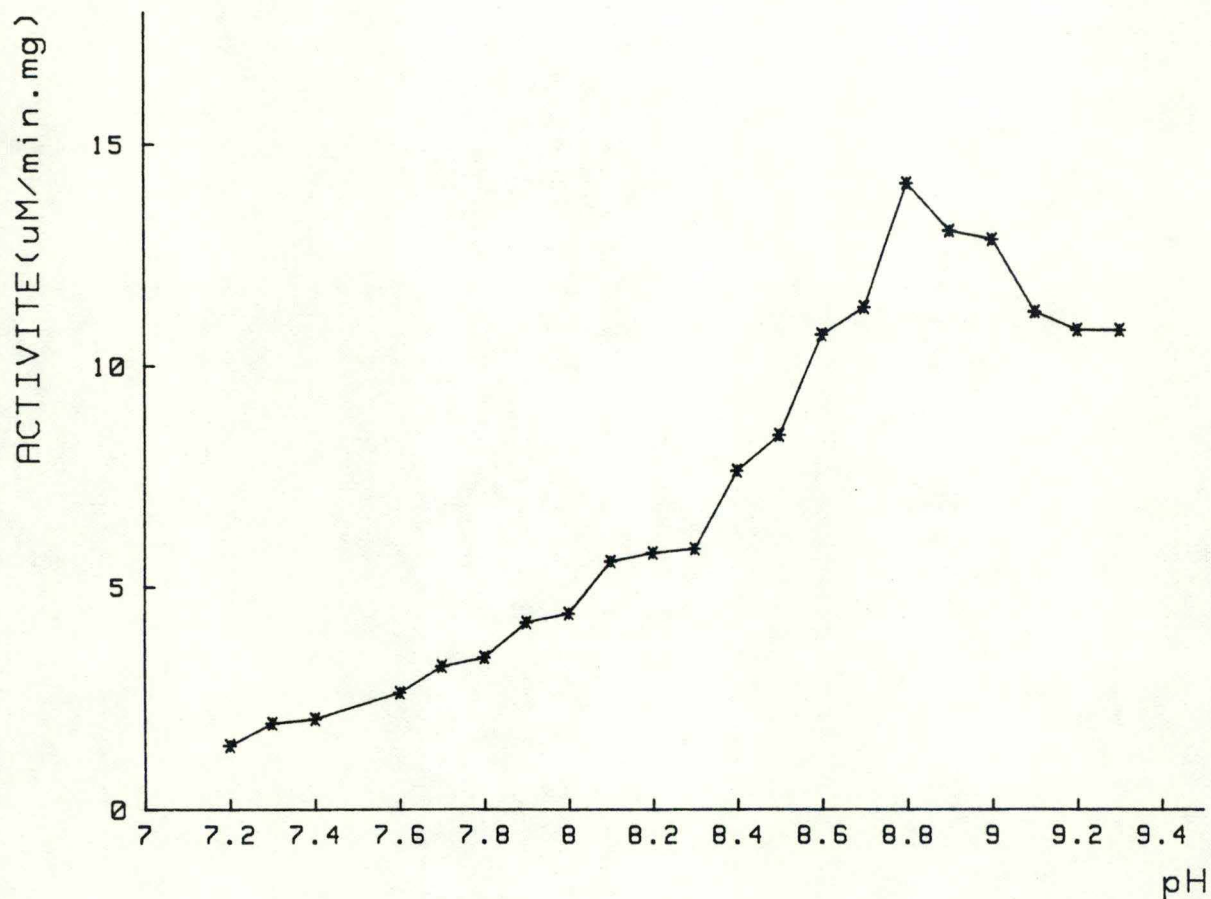
3. Résultats et discussion

A. Effet du pH

Le pH est un facteur primordial qui influence l'activité d'un enzyme en solution. En milieu acide, une protéine aura tendance à se protoner, c'est-à-dire à se charger positivement, à tel point que la répulsion entre ces charges peut déplier la structure tertiaire de l'enzyme qui alors s'inactive. En milieu alcalin, ce sont des charges négatives qui déforment l'enzyme par répulsions mutuelles. Entre ces deux extrêmes, l'enzyme peut adopter une configuration stable. Cependant, l'effet du pH sur l'activité dépasse son effet sur la stabilité de la conformation. Le pH peut en effet jouer un rôle dans l'ionisation de groupements situés dans ou près du site actif. Il peut aussi modifier le ou les substrats, ainsi que d'autres molécules exogènes nécessaires au déroulement de la réaction. Il est donc toujours difficile de prédire l'effet du pH sur l'activité de l'enzyme.

Nous avons donc mesuré l'activité de l'aldéhyde dés-hydrogénase à différentes valeurs de pH, tous les autres facteurs étant maintenus constants. Les résultats sont présentés sur le graphique I 1.

fig. I 1 - Courbe de pH de l'acétaldéhyde déshydrogénase en solution



On mesure la différence de vitesse d'apparition de NADH entre la solution test et la solution ne contenant pas d'enzyme (blanc).

La solution test contient dans un volume final de 1 ml: 01 M final de tampon TRIS/HCl (0,80 ml) 10 mM final de mercaptoéthanol 10 mM final de KCl, 2 mM d'acétaldéhyde, 0,008 mM d'enzyme (0,0125 unités standard, référence SIGMA et 4 mM de NAD^+ .

Dans le blanc, la solution d'enzyme (40 μl) est remplacée par de l'eau.

On constate que l'activité augmente régulièrement pour atteindre un maximum à pH 8.80. Cet optimum d'activité à des valeurs de pH relativement élevées est caractéristique de nombreuses aldéhydes déshydrogénases qui ont été étudiées. Souvent, le pH optimal est supérieur à 9.00 (Ting-Kai Li, 1962; Jacoby et al, 1962).

B. Cinétique

L'expérience qui suit a été faite pour voir à quelle loi de cinétique la réaction obéit. Les renseignements trouvés dans la littérature laissaient présumer que la cinétique obéissait à l'équation de Michaelis-Menten, qui dit que $v = \frac{V_{max} S}{K_M + S}$, ce qui donne la vitesse de la réaction (v) en fonction de la concentration en substrat (S); V_{max} est la vitesse maximale, K_M est la concentration en substrat qui donne une vitesse qui est la moitié de la vitesse maximale V_{max} . Il s'agit ici d'une réaction enzymatique à deux substrats, l'acétaldéhyde et la NAD^+ (Lehninger, 1981).

La réaction est à simple déplacement ordonnée, où la NAD^+ est le premier substrat. L'enzyme se combine d'abord à son premier substrat, qui est la NAD^+ , pour former un complexe binaire. Ensuite le second substrat, qui est l'acétaldéhyde, se fixe formant le complexe binaire (Jacoby, 1970).

L'équation générale de la vitesse en fonction des concentrations en NAD^+ et en acétaldéhyde est en double inverse vis à vis de NAD^+

$$1/v = 1/V_{max} \left[\frac{K_M^{NAD^+}}{NAD^+} + \frac{K_S^{acet} K_M^{acet}}{acet} \right] + \frac{1}{V_{max} NAD^+} + \frac{K_M^{acet}}{V_{max} acet}$$

Si on représente $1/v$ en fonction de $1/NAD^+$, on obtient une droite dont la pente est donnée par

$$\text{l'expression } 1/V_{\max} \frac{K_M^{\text{NAD}^+}}{K_M^{\text{NAD}^+}} + \frac{K_M^{\text{acet}}}{\text{acet}}$$

Cette pente diminue lorsqu'on augmente la concentration en acétaldéhyde jusqu'à atteindre un minimum à concentration saturante en acétaldéhyde (Lehninger, 1979). A ce moment, la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en NAD^+ répondra à l'équation de Michaelis-Mentem $v = \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$, exactement comme dans un système à un substrat.

Ceci est également le cas pour ce qui est de la vitesse en fonction de la concentration en acétaldéhyde; si la concentration en NAD^+ est saturante, on aura également une cinétique de Michaelis-Mentem.

D'abord, nous avons mesuré l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase en fonction des concentrations croissantes en NAD^+ , à forte concentration constante en acétaldéhyde.

Les résultats sont reportés sur le graphique de la figure I 2 a.

On obtient une courbe semblable à celle décrite par l'équation de Michaelis-Mentem. Afin de faciliter son interprétation et la détermination de $K_M^{\text{NAD}^+}$ et $V_{\max}^{\text{NAD}^+}$, nous avons représenté les résultats en double inverse, c'est-à-dire $1/v$ en fonction de $1/s$, et tracé la droite de régression, car la représentation d'une courbe de Michaelis-Mentem en double inverse est une droite d'équation

$$1/v = \frac{K_M}{V_{\max} s} + 1/V_{\max}$$

et la transformation correspondante est dite "de Lineweaver-Burk". La figure I 2 b montre le résultat de cette transformation et la droite de régression. Ensuite, nous avons mesuré l'activité de l'enzyme en fonction de concentrations croissantes en acétaldéhyde, la NAD^+ étant maintenue à concentration saturante. La figure I 3 a montre les résultats obtenus, et la

figure I 3 b est la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk et la droite de régression correspondante K_n est donnée indirectement par l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, qui vaut $-1/K_M$.

L'intersection de cette droite avec l'axe des ordonnées donne $1/K_M$.

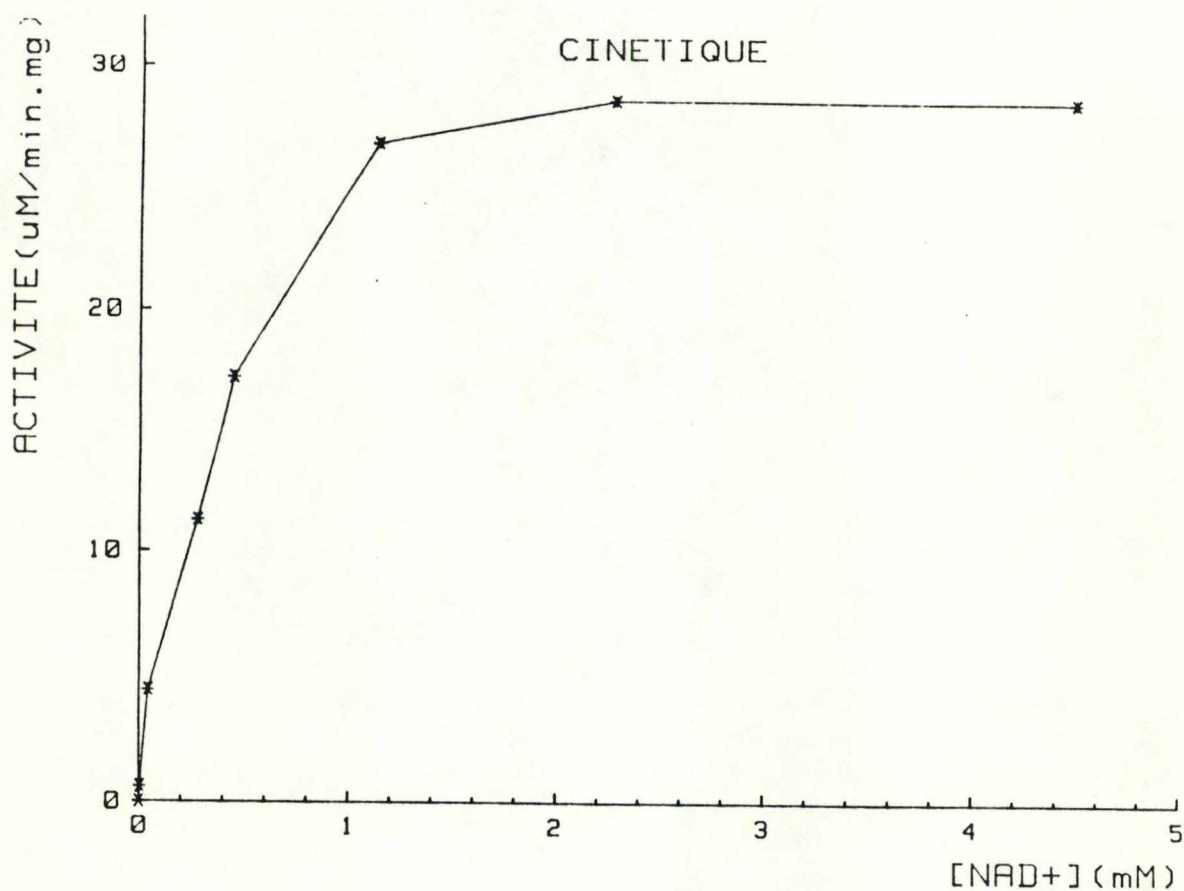
Les courbes obtenues expérimentalement paraissent suivre toutes deux une cinétique de Michaelis-Mentem, et les points de la représentation en double inverse s'alignent sensiblement sur une droite.

On peut donc conclure à une cinétique classique de Michaelis-Mentem tant pour la NAD^+ que pour l'acétaldéhyde.

On trouve pour l'acétaldéhyde un K_M^{acet} de 0,2 mM et une V_{max} de 27,9 mM/min.

Pour la NAD^+ , on trouve respectivement un $K_M^{NAD^+}$ de 0,17 mM et une V_{max} de 21,9 mM/min.

fig. I 2 a



Courbe de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en NAD^+ . Test comprenant dans 1 ml, volume final, en concentrations finales:

Tampon TRIS/HCl pH 8.00 01 M

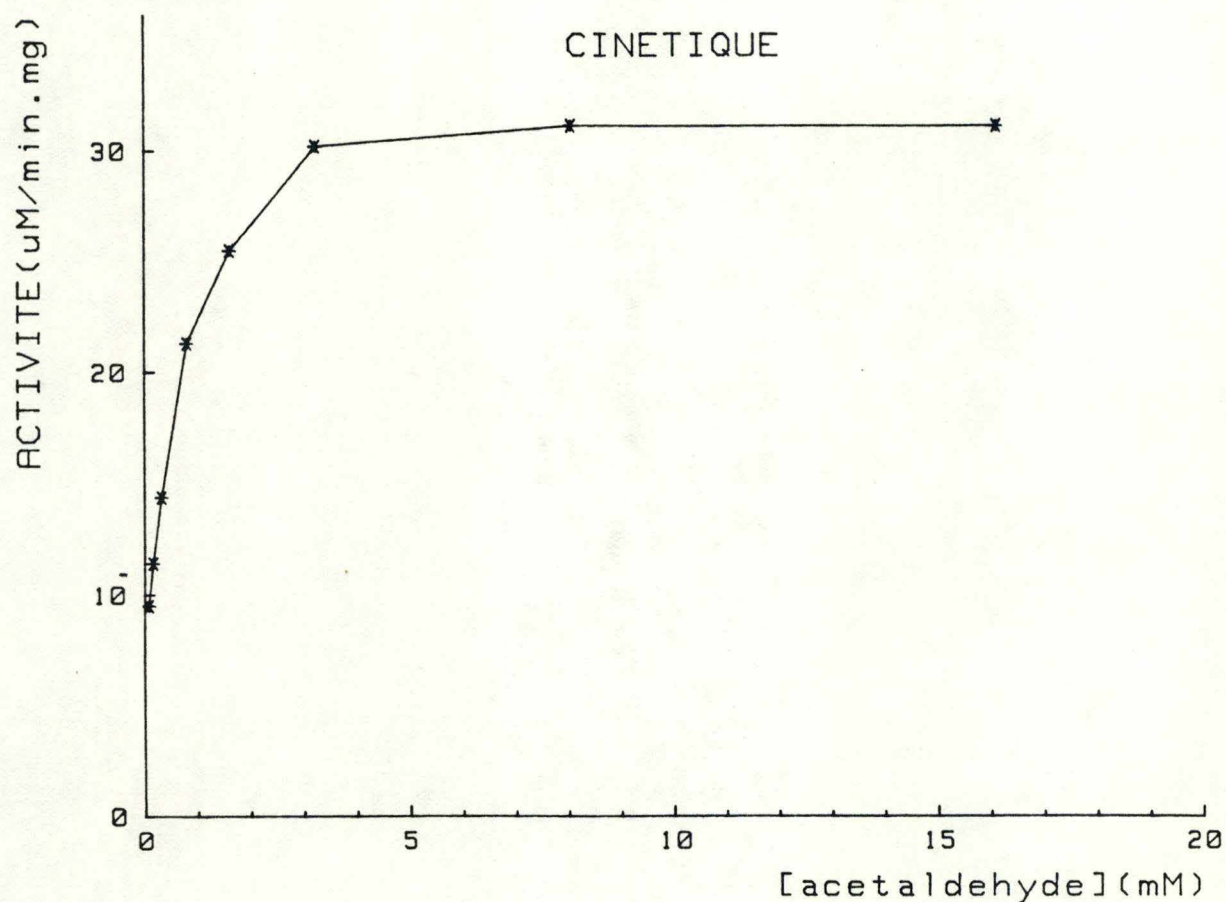
Mercaptoéthanol 10 mM

Chlorure de potassium 10 mM

Acétaldéhyde 1 mM

La réaction se déroule à 20°C .

Fig I 3

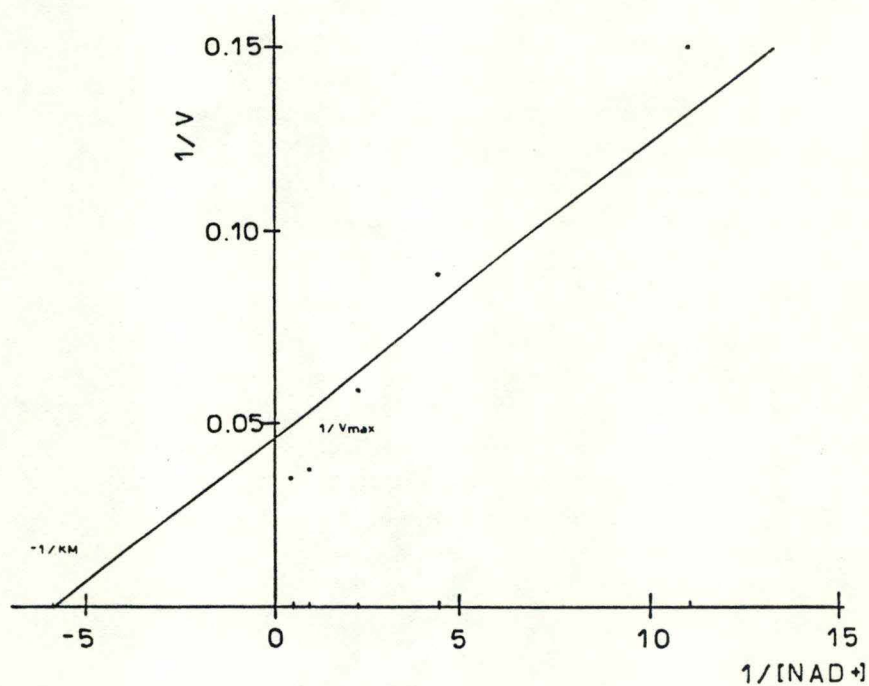


Courbe de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en acétaldéhyde. Test comprenant dans un volume final de 1 ml, en concentrations finales:

Tampon TRIS/HCl pH 8.00 0.1 M
 Mercaptoéthanol 10 mM
 Chlorure de potassium 10 mM
 NAD⁺ 10 mM

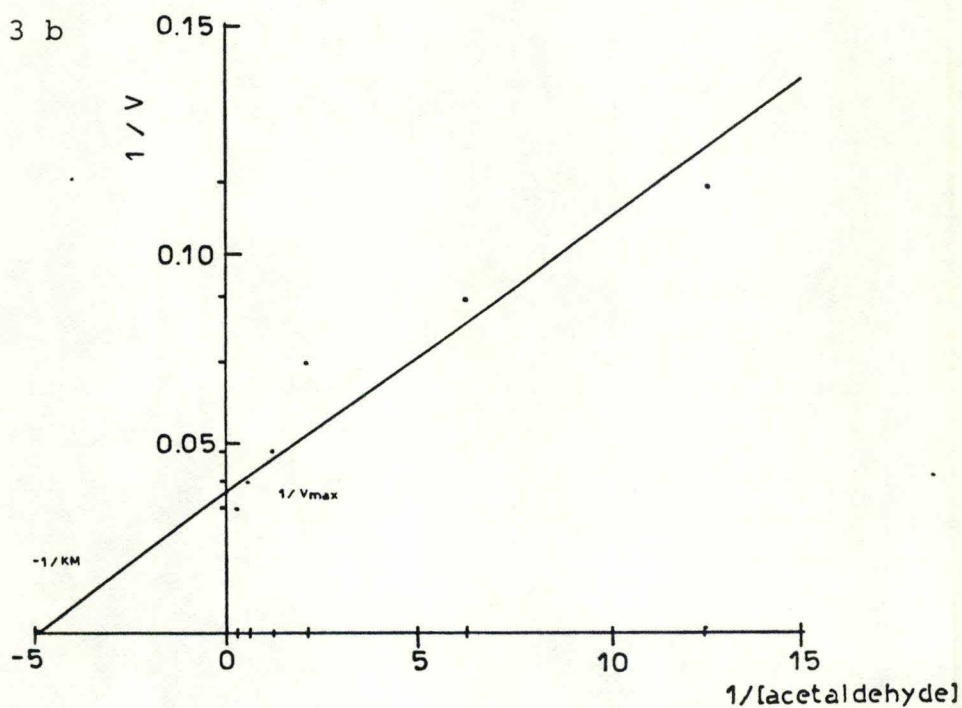
La réaction se déroule à 20°C.

fig I 2 b



Représentation en double inverse de la figure I 2 et droite de régression.

fig. I 3 b



Représentation de la figure I 3 en double inverse et droite de régression

Les valeurs de K_M trouvées dans la littérature sont très variées. Chez les mammifères, on distingue divers aldéhydes déshydrogénases pouvant être localisées dans les métachondries, le cytoplasme et les microsomes.

Parmi les métachondries on trouve des aldéhydes déshydrogénases à K_M^{acet} faible, de l'ordre de la micromôle, et des aldéhydes déshydrogénases à K_M^{acet} élevé, de l'ordre de la millimôle (Ting-Kai Li, 1970. Les enzymes du cytosol et de la fraction microsomiale ont des K_M^{acet} de l'ordre de 1 mM.

D'après Jacoby (1970), l'acétaldéhyde déshydrogénase aurait un K_M^{acet} de 0,6 mM et un $K_M^{\text{NAD}^+}$ de 0,15 mM (acétaldéhyde déshydrogénase de levure).

Une inhibition par le substrat n'a pu être mise en évidence ici; il faut noter qu'à fortes concentrations, l'acétaldéhyde atteint sa limite de solubilité dans l'eau, rendant les mesures d'activité aléatoires.

C. Effet du mercaptoéthanol

L'acétaldéhyde déshydrogénase requiert pour son activité du mercaptoéthanol, probablement pour former un thiohémiacétal avec le substrat, mais également pour maintenir la protéine sous sa forme réduite, parce qu'un groupement sulfhydryle est nécessaire à l'action de l'enzyme (voir Introduction).

C'est pour cette raison que l'effet de concentration croissante en mercaptoéthanol a été étudiée. Le graphique I 4 montre les résultats. On constate que de fortes concentrations en mercaptoéthanol sont nécessaires à l'activité maximale de l'enzyme. Il faut des concentrations supérieures à 01 Molaire.

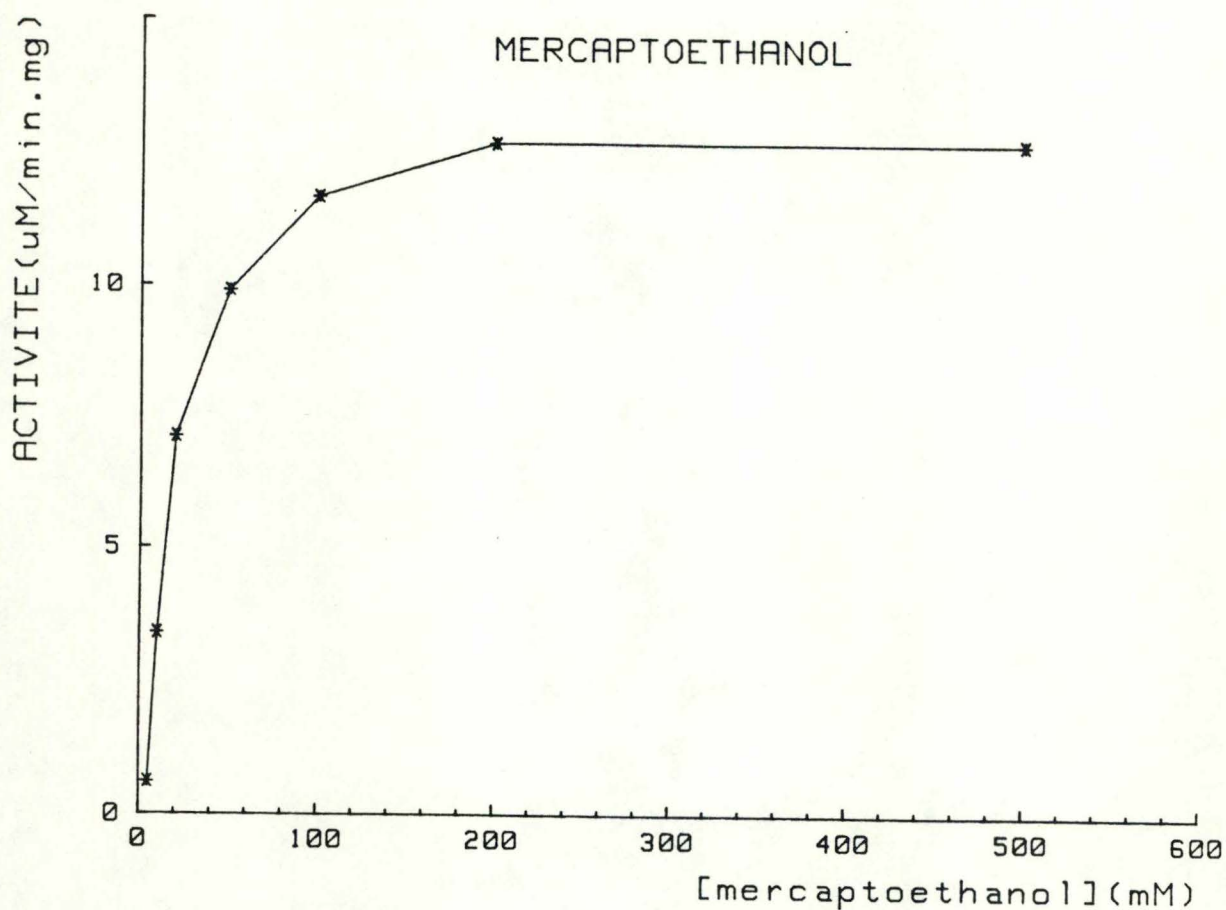
Ceci peut paraître étonnant car le mercaptoéthanol est un très puissant réducteur qui peut aux fortes

concentrations rompre les ponts disulfure intracaté-
naires et ainsi déstabiliser l'enzyme.

Les divers auteurs qui ont étudié les aldéhyde dés-
hydrogénases citent des concentrations finales allant
de 10 mM (Bostian - Betts, 1972) à 0,3 Molaire
(Jacoby, 1961, Ting-Mai Li, 1967).

Le mercaptoéthanol est également nécessaire à la sta-
bilité de l'enzyme (voir après: "conditions de
stockage").

fig. I 4



Effet du mercaptoéthanol sur l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase

Test contenant dans 1 ml final, concentrations finales
TRIS/H1 0.1 M pH 8.80

Chlorure de potassium 10 mM

Acétaldéhyde 1 mM

NAD⁺ 1 mM

0,01 unité standard (ref. Sigma) d'enzyme = 0,0065 mM

La réaction se déroule à 20°C.

D. Effet du chlorure de potassium

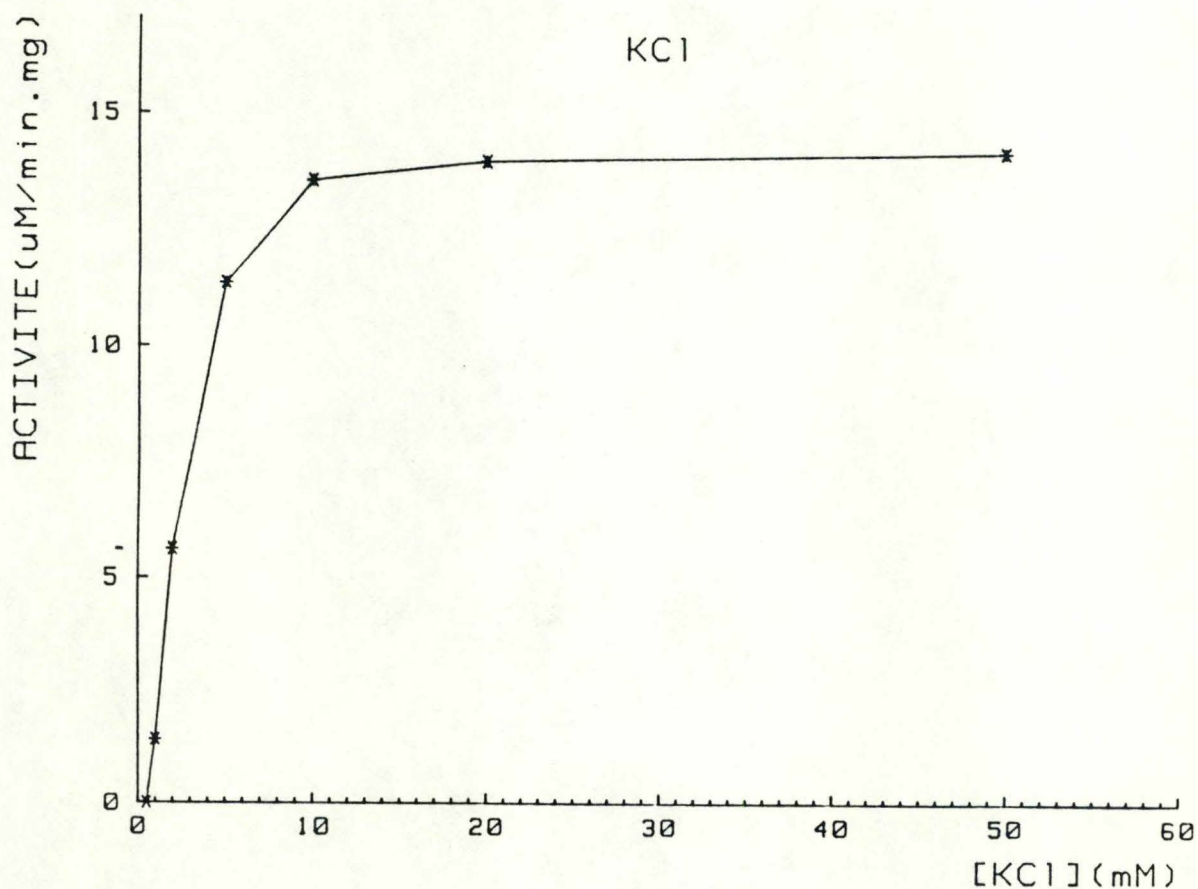
Le potassium active l'acétaldéhyde déshydrogénase de saccharomyces.

Ce n'est pas le cas pour toutes les aldéhyde déshydrogénases (cfr. introduction).

La raison pour laquelle le potassium est nécessaire n'est pas claire.

Nous avons mesuré l'activité de l'enzyme en présence de concentrations croissantes en potassium; le graphique I 5 montre les résultats. On voit que pour des concentrations en chlorure de potassium inférieures à 0,5 mM, l'activité de l'enzyme est nulle, puis elle monte rapidement pour plafonner au dessus de 10 mM. Le potassium est également, tout comme le mercapto-éthanol, nécessaire pour la stabilité de l'enzyme (cfr. "condition de stockage").

fig I 5



Effet du potassium sur l'activité de l'acétaldéhyde
déshydrogénase

Milieu de réaction contenant dans un volume final de
1 ml, concentrations finales.

Tampon TRIS/HCl 01 M pH 8.80

Mercaptoéthanol 01 M

Acétaldéhyde et NAD^+ 1 mM

0,01 unités standard (référence Sigma) d'enzyme

Les réactions se déroulent à 20°C.

E. Température

La température est un facteur qui joue un rôle important dans toute réaction chimique et enzymatique. D'une part, elle favorise la cinétique des réactions par accroissement de l'énergie cinétique des molécules; d'autre part, aux températures élevées les enzymes sont généralement inactivés par dénaturation, phénomène qui apparaît pour de nombreux enzymes vers 60 °C.

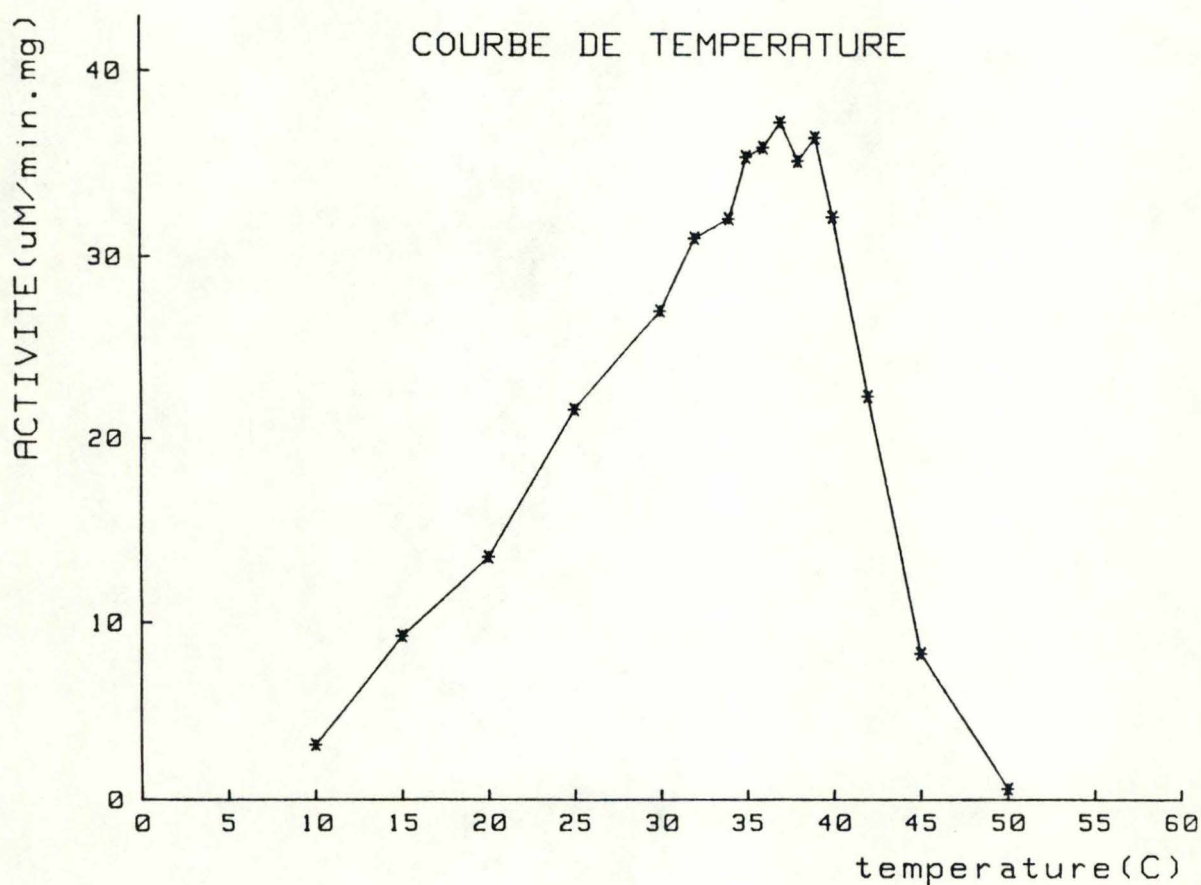
Il existe cependant des exceptions, comme l'alcoolaldéhyde/cetone oxydoréductase de la bactérie *Thermoanaerobium brockii*, qui se montre stable jusqu'à des températures de 86°C.

Nous avons donc testé l'influence de la température sur l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

La figure I 6 montre les résultats. Un maximum d'activité est observé à 38°C; à 30°C, la température habituelle de dosage, l'activité est relativement faible par rapport à ce maximum, et une faible variation de température entraîne une grande variation d'activité.

Au delà de 39°C, l'activité diminue rapidement, suite sans doute à l'inactivation thermique.

fig. I 6



Effet de la température sur l'activité de l'acétaldéhyde
déshydrogénase

Milieu de réaction contenant:

01 M TRIS/HCl

01 M Mercaptoéthanol

10 mM KCl

1 mM NAD⁺

1 mM Acétaldéhyde

0,0125 unités standard (réf. Sigma) d'enzyme = 0,008 mg

Conclusion

Ces diverses expériences permettent donc de proposer des conditions optimales de dosage de l'enzyme.

Le milieu de réaction est fixé comme suit:

TRIS/HCl	0,1 M	pH 8.80)	
	KCl	20 mM)	0,880 ml
	Mercaptoéthanol	0,1 M)	
	NAD ⁺	1mM		40 nl
	Acétaldéhyde	1 mM		40 nl
	Enzyme	0,0125 unités		
	Standard (réf. Sigma)			40 nl

L'activité spécifique mesurée est supérieure à celle que donne le fabricant, qui prend un milieu de référence de pH 8.0.

CHAPITRE II

Recherche des conditions optimales de stockage de l'enzyme en solution

1. Introduction

Nous avons étudié l'influence dans la solution de stockage de divers paramètres qui nous paraissaient les plus intéressants, pour les raisons qui seront expliquées au fur et à mesure. Ces paramètres concernent le pH, le mercaptoéthanol et d'autres réducteurs, le KCl, la NAD^+ , l'acétaldéhyde, l'albumine et l'EDTA.

2. Méthode

La méthode utilisée est la suivante: l'enzyme est incubé dans une série de tubes contenant chacun une solution de stockage dont un seul paramètre varie d'un tube à l'autre. La variation d'activité est mesurée au cours du temps. La mesure de l'activité se fait encore comme déterminé au chapitre précédent.

L'incubation se fait toujours à 4°C , pour ne pas risquer une dénaturation trop rapide.

3. Résultats et discussion

A. pH de stockage

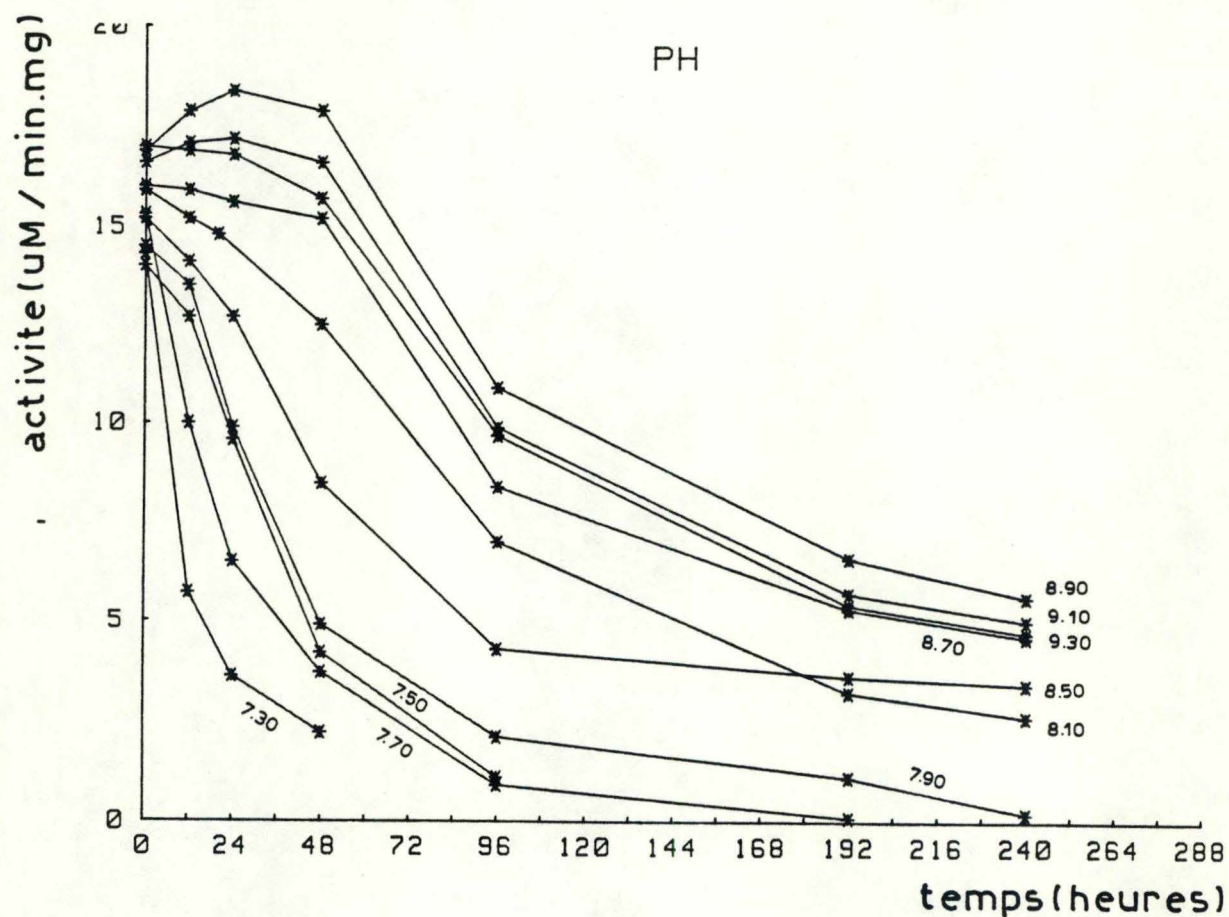
Le pH a d'abord été testé, vu son importance. Le pH optimal d'activité ne sera pas nécessairement le même que le pH optimal de stockage. Lors de la réaction enzymatique, le site actif peut se trouver sous une forme qui ne correspond pas à la stabilité maximale de l'enzyme; le pH optimal de dosage peut faciliter la mise sous tension de l'enzyme. Rappelons également que le pH peut influencer le comportement du substrat et des cofacteurs.

L'évolution de l'activité de l'enzyme au cours du temps pour différentes valeurs de pH de la solution de stockage est montrée sur la figure II 1.

De ces résultats il ressort que les valeurs de pH qui donnent la meilleure stabilisation sont comprises autour de 8,9. Aux pH supérieurs et inférieurs, la perte d'activité est plus importante.

Le pH optimal de stockage est donc proche du pH optimal d'activité.

Figure II 1



Evolution au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase à différentes valeurs de pH de stockage
 La solution de stockage contenait 5 mM de mercaptoéthanol, 10 mM de KCl, 10 mM de tampon TRIS/HCl et 0,125 unités standard (référence SIGMA) : 80 μ g d'enzyme.
 Le stockage se fait à 4°C.
 Pour le dosage, se rapporter au Chapitre I.

B. Le potassium

On sait que le potassium s'avère indispensable à la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase (Bostian-Betts, 1977; W.B. Jacoby, 1970); nous avons testé l'effet du KCl sur la stabilité de l'enzyme.

Le stockage, dans un tampon de stockage dont le pH a été fixé à 8.90, se fait maintenant dans différentes concentrations de KCl.

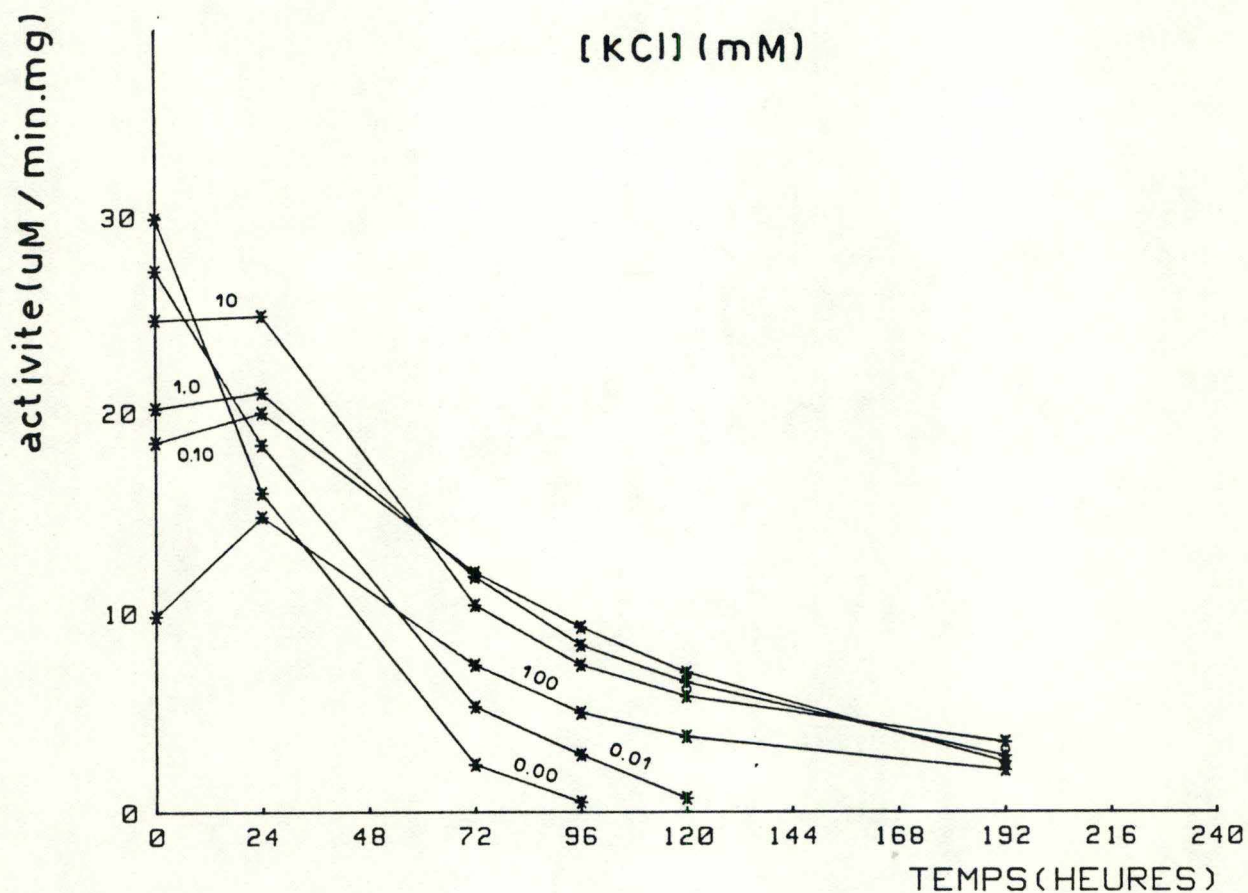
La figure II 2 montre l'évolution au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase pour les différentes concentrations en KCl.

On constate que le KCl est nécessaire à la stabilité, mais à des concentrations beaucoup plus faibles que les concentrations nécessaires à l'activité optimale de l'enzyme. Ces valeurs sont également plus faibles que celles citées dans la littérature.

A concentrations élevées, l'activité initiale est d'abord un peu plus faible, mais elle diminue ensuite plus lentement.

Le potassium joue certainement un rôle au niveau de l'activité et de la stabilité de l'enzyme car en son absence la diminution d'activité est très rapide, ce qui est en accord avec la littérature (Bostian & Betts, 1977).

fig. II 2



Evolution au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase stocké en présence de diverses concentrations en KCl.

Solution de stockage contenant du tampon TRIS/HCl 10 mM, pH 8.90, du Mercaptoéthanol 5 mM, et 0,125 unités standard (référence Sigma) d'enzyme.

Le stockage se fait à 4°C.

Le dosage se fait dans les conditions optimales décrites au chapitre 1.

C. Le mercaptoéthanol

Le mercaptoéthanol, également indispensable pour le dosage, a été testé du point de vue de son effet stabilisant.

L'enzyme est incubé dans des solutions de stockage où seule varie la concentration en mercaptoéthanol.

Sur la figure II 3 reprenant les résultats, on voit qu'en l'absence de mercaptoéthanol l'activité de l'enzyme diminue rapidement et est pratiquement nulle après vingt-quatre heures. Une concentration de 2 mM de mercaptoéthanol semble être idéale. Ceci est en accord avec les résultats trouvés dans la littérature (W. B. Jacoby, 1970; Bostian-Betts, 1972).

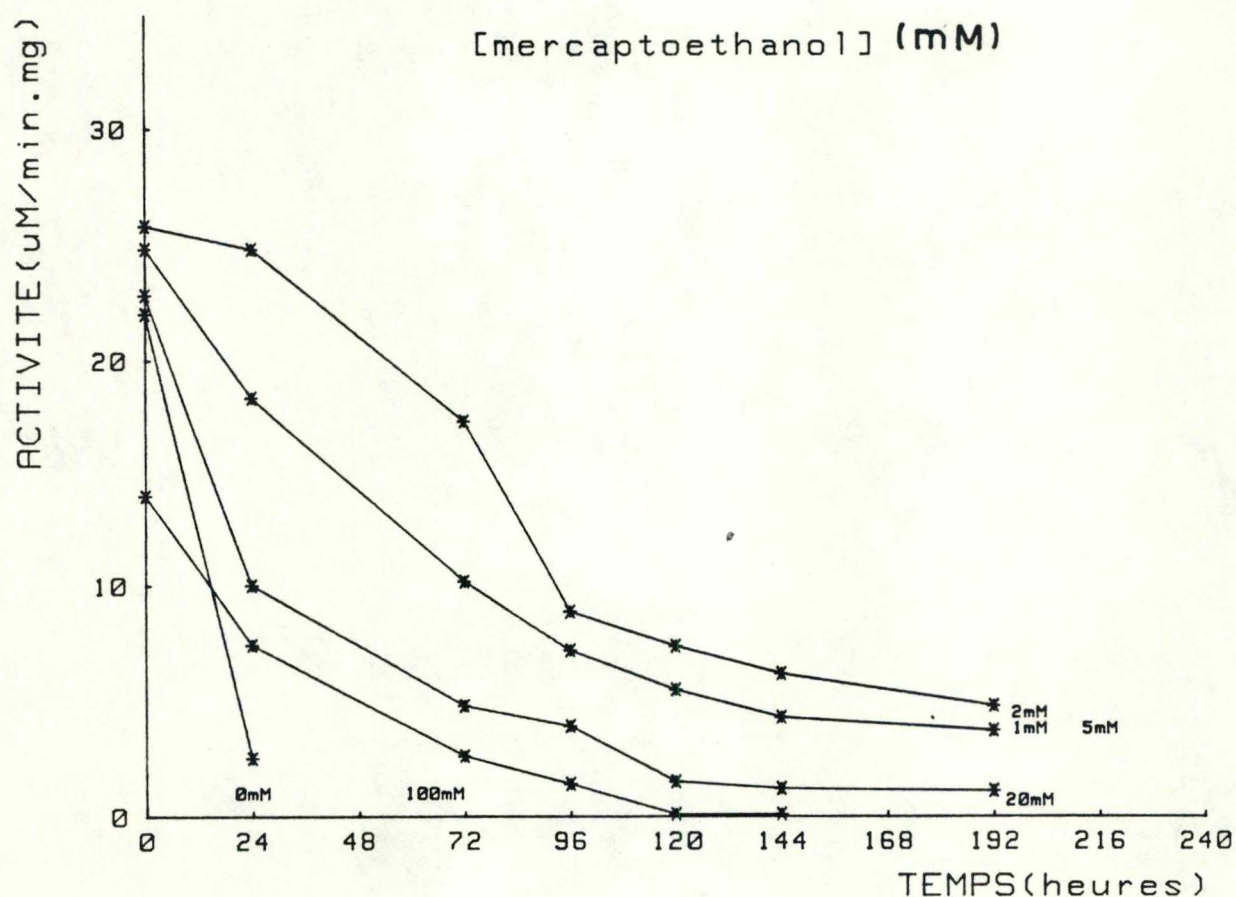
Aux fortes concentrations, on observe également une perte d'activité plus importante.

Nous avons montré précédemment qu'au moins un groupe-sulfhydryle intervient dans le mécanisme de la réaction (voir Introduction). Ceci explique la nécessité de la présence du mercaptoéthanol, qui est un réducteur puissant.

Aux trop fortes concentrations, le mercaptoéthanol pourrait par exemple réduire certains ponts disulfures qui maintiennent la structure tertiaire de l'enzyme, ce qui favoriserait sa dénaturation.

Le fait qu'il y ait une concentration optimale en mercaptoéthanol pourrait s'expliquer comme étant le résultat d'un compromis entre deux effets contradictoires: dénaturation par réduction de ponts disulfures d'une part, mais protection par maintien d'un groupement sulfhydryle libre au site actif d'autre part.

fig II 3



Variation au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase en présence de différentes concentrations en mercaptoéthanol.

La solution de stockage contient du tampon TRIS/HCl 10 mM, pH 8.90, du KCl 5 mM, et 0,1 unité standard (référence SIGMA) d'enzyme. Elle est stockée à 4°C.

Le dosage se fait comme indiqué au Chapitre 1 (Conclusion).

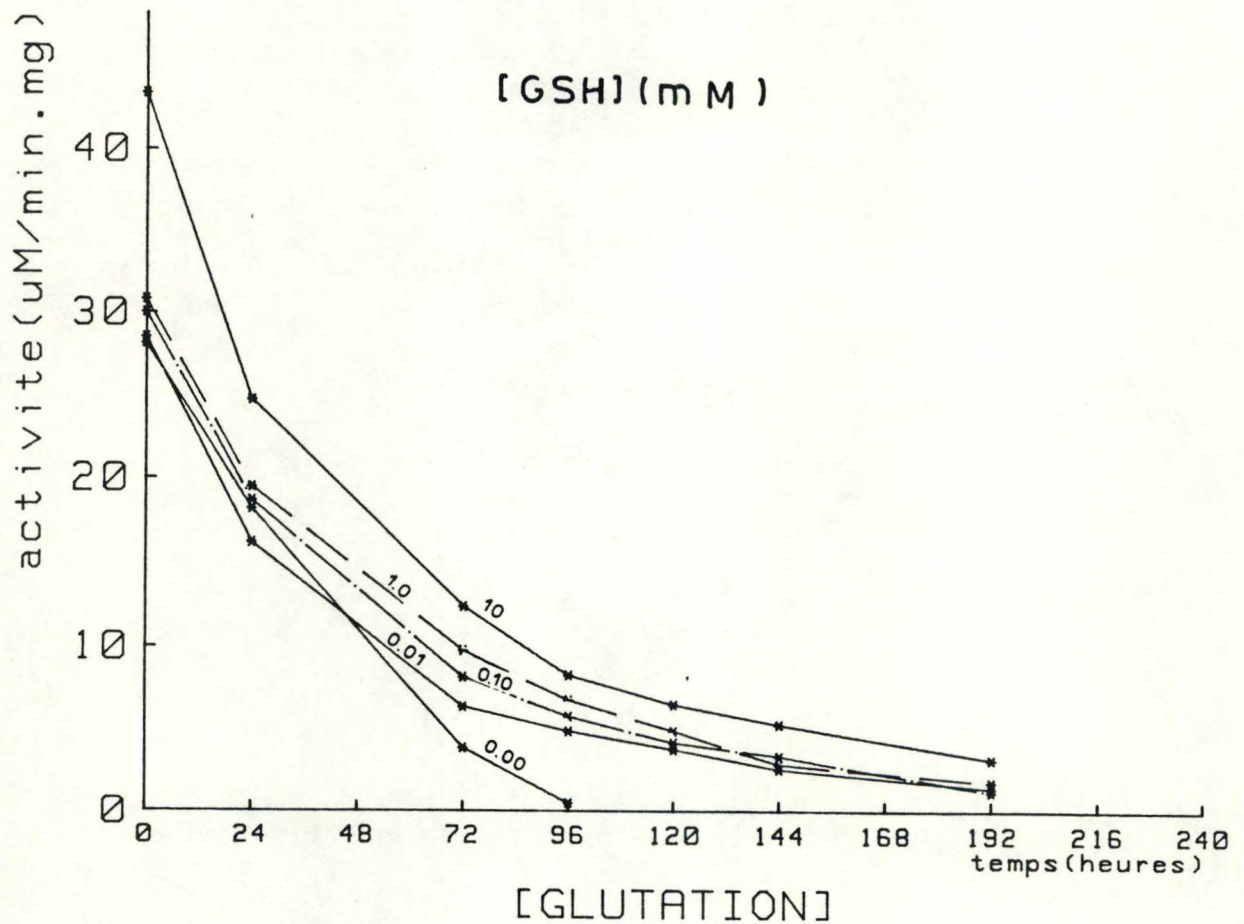
D. Autres réducteurs

Certaines aldéhyde déshydrogénases nécessitent la présence de glutathion réduit (GSH), notamment les formaldéhyde déshydrogénases alors que le mercaptoéthanol n'a aucun effet activateur sur ces enzymes, et peut même les inhiber.

Le glutathion a donc été testé, en suivant le mode expérimental utilisé pour le mercaptoéthanol. A la vue des résultats, on constate (figure II 4) qu'il y a peu ou pas d'effet sur la stabilité de l'enzyme. L'utilisation du glutathion au lieu du mercaptoéthanol pour le dosage ne donne pas d'activation de l'enzyme.

Le dithionite de sodium, également réducteur a aussi été testé comme substitut du mercaptoéthanol, et il stabilise fortement l'enzyme, comme le montrent les résultats (figure III 2).

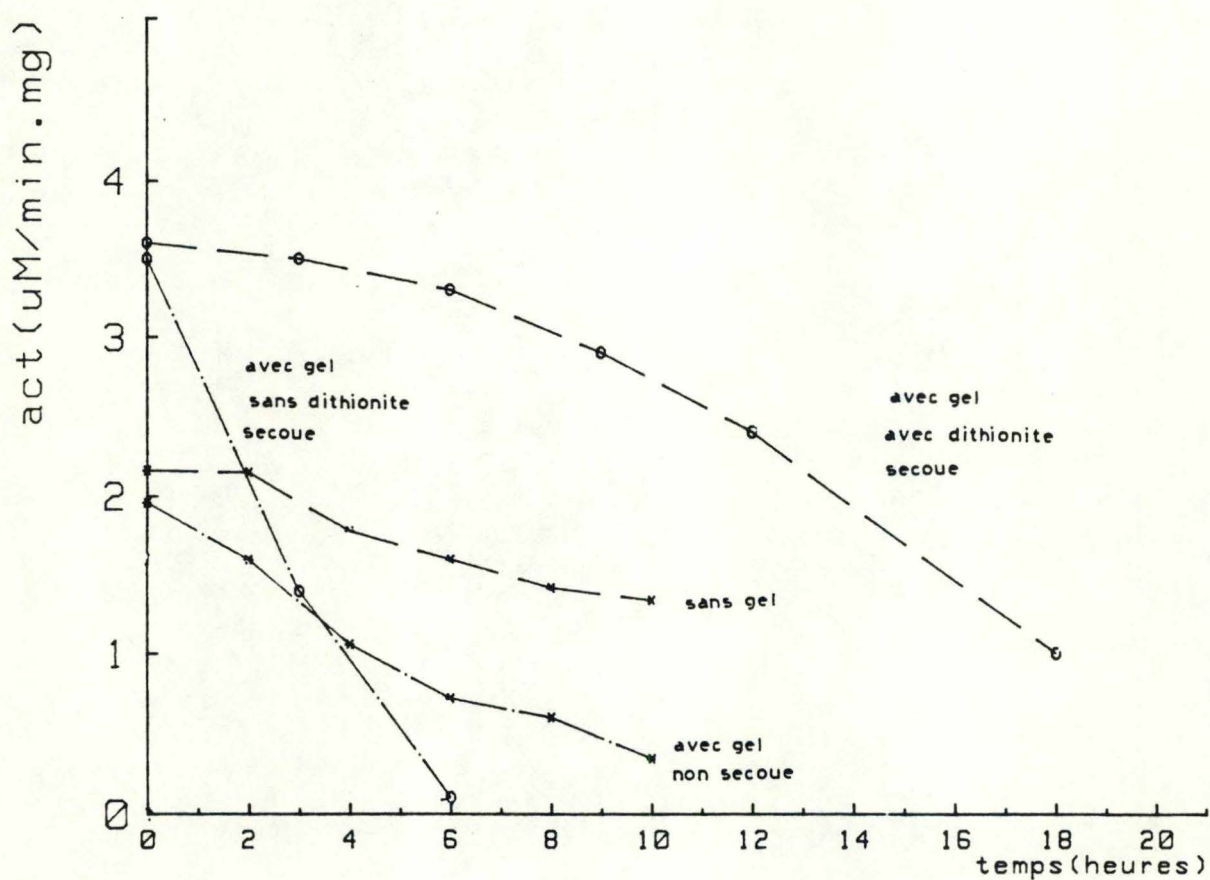
fig. II 4



Evolution de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase au cours du temps en présence de différentes concentrations de GSH.

Conditions de stockage et de dosage: voir expériences précédentes, sauf pour le stockage mercaptoéthanol remplacé par le glutathion.

figure III 2



Effet du dithionite de sodium sur la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase.
Conditions de l'expérience: voir deuxième partie, expériences préliminaires.

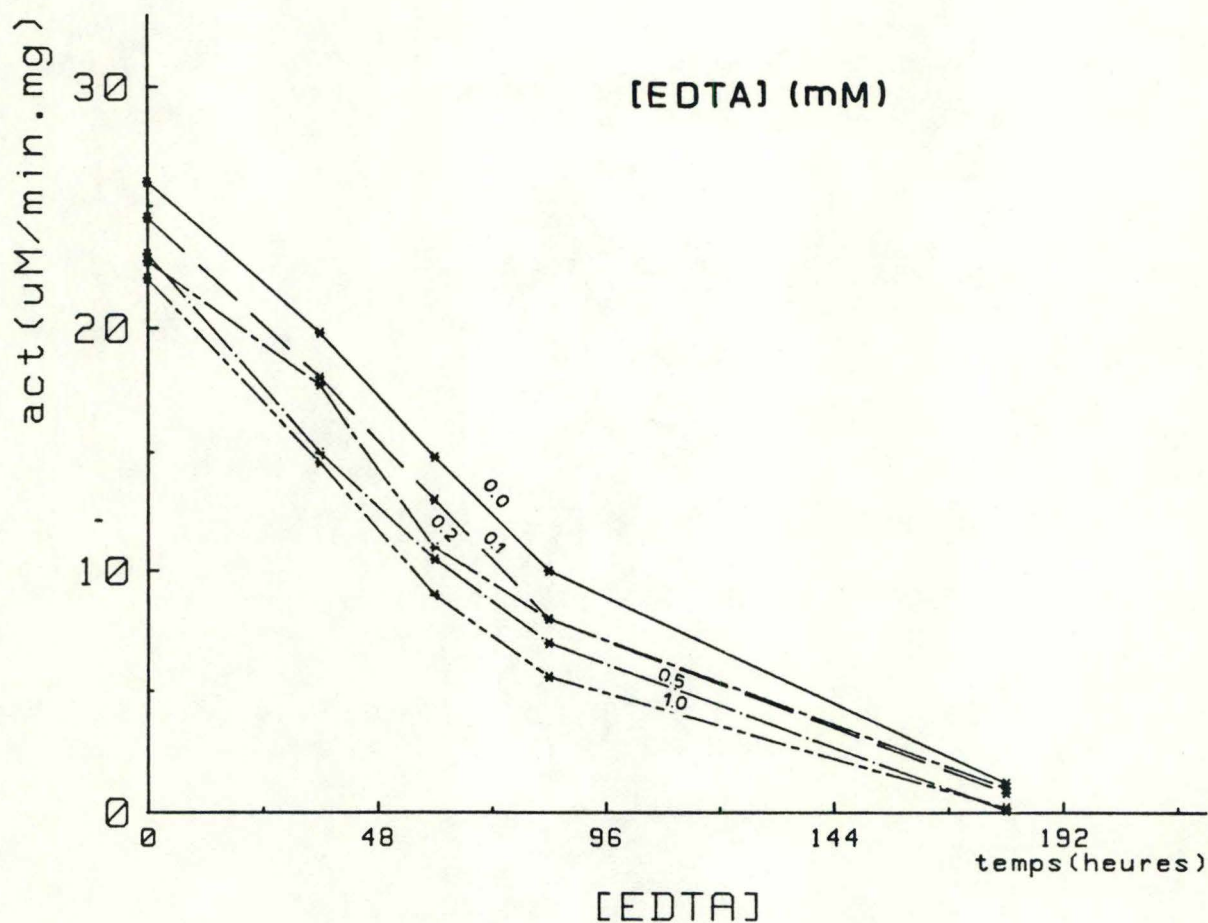
E. EDTA

De nombreux enzymes sont sensibles aux métaux lourds, qui réagissent avec les groupes sulfhydryles. Le fait que les métaux lourds inactivent un enzyme indique souvent l'intervention de groupes sulfhydryles dans l'activité de l'enzyme.

Ce sont surtout les ions divalents tels le mercure qui sont les principaux inactivateurs. Ce mécanisme est bien connu chez les enzymes de la glycolyse (les dés-hydrogénases).

Les aldéhyde-dés-hydrogénases sont-ils sensibles aux métaux lourds ? La présence de groupements sulfhydryles permet de le supposer, bien que certains de ces enzymes soient activés par le magnésium qui est un ion divalent. C'est pour cette raison que l'action de l'éthylène diamine tétra acétate ou EDTA, un complexant de métaux lourds a été testée. Les résultats sont montrés à la figure II 5. L'EDTA semble avoir un effet plutôt défavorable, ce qui indique que l'acétaldéhyde dés-hydrogénase serait peu ou pas sensible aux ions métalliques lourds, contrairement à l'alcool dés-hydrogénase (cfr. Vincent Bille, 1983).

fig. II 5



Evolution de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase au cours du temps en présence d'EDTA.

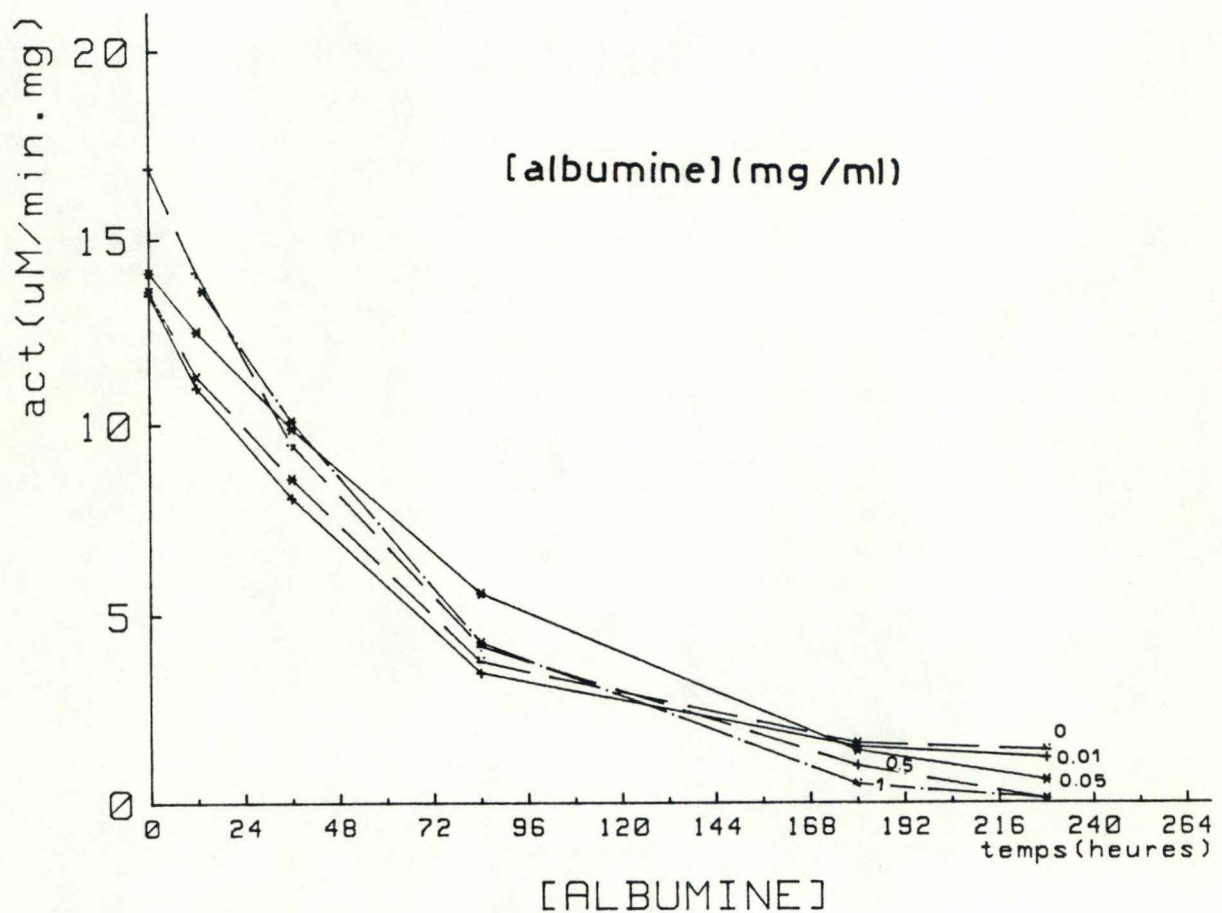
La solution de stockage contient du tampon TRIS/HCl, pH 8.90, 10 mM, du HCl 5 mM, du mercaptoéthanol 2 mM, et 0.1 unité standard (ref. SIGMA) d'enzyme et est stockée à 4°C. Le dosage se fait comme indiqué au chapitre 1 (Conclusion).

F. Albumine

L'effet de la présence d'albumine dans la solution de stockage a été testée, en raison de la protection mécanique que celle-ci pourrait avoir.

Cependant, les résultats expérimentaux notés à la figure II 6 montrent que l'albumine n'a pratiquement pas d'effet favorable.

fig. II 6



Effet de l'albumine sur la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

La solution de stockage contient du tampon TRIS/HCl, pH 8.0, 10 mM, 20 mM mercaptoéthanol, 5 mM KCl, 01 unité standard (réf. SIGMA) d'enzyme et est stockée à 4°C. Le dosage se fait comme indiqué à la fin du Chapitre 1.

G. Substrat et Cofacteur

La présence de substrat a normalement un effet stabilisant sur tout enzyme.

Ceci a aussi été observé pour certaines aldéhyde déshydrogénases, mais n'est jamais très significatif.

(Stoppani - Milstein, 1954).

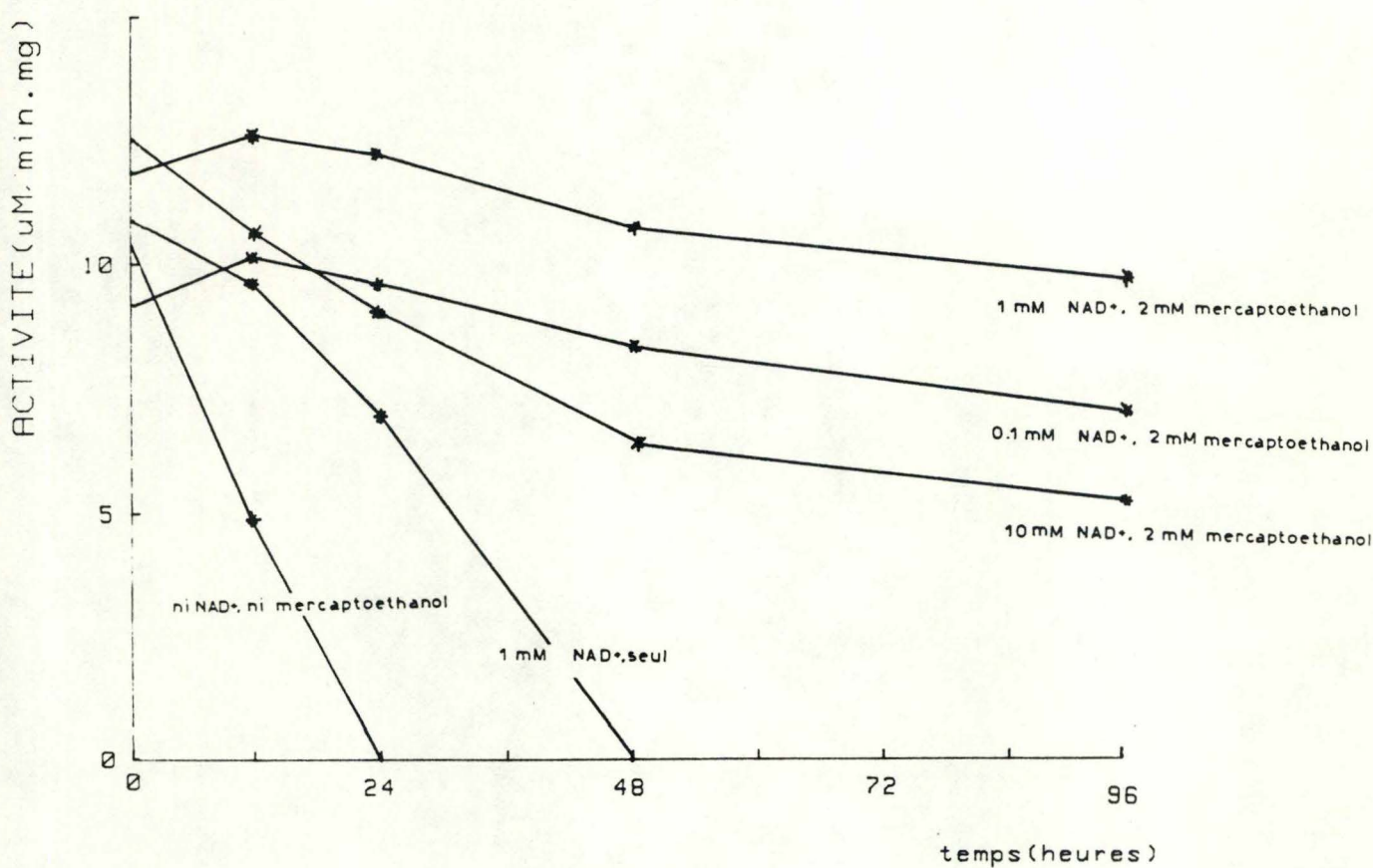
La NAD^+ protégerait l'enzyme contre les inhibiteurs de groupes sulfhydryles, et cette protection serait très efficace (Jacoby, 1970).

Le rôle protecteur de la NAD^+ a donc été vérifié.

Cette expérience est d'autant plus intéressante que dans la perspective de l'insolubilisation future de l'enzyme, il est préférable de réaliser le couplage en présence de cofacteur et de substrat afin d'empêcher au maximum la fixation de l'enzyme sur les groupements sulfhydryles intervenant dans la fixation de la NAD^+ , dans le site actif. Il faut signaler cependant que les groupements sulfhydryles situés dans le site actif semblent moins accessibles que ceux n'intervenant pas dans le mécanisme enzymatique, qui ont une grande affinité pour la NAD^+ (W.B. Jacoby, 1970).

La figure II 8 montre l'effet de la NAD^+ sur la stabilité de l'enzyme. On remarque qu'en présence de mercaptoéthanol, la NAD^+ a un effet stabilisant marqué, alors qu'il a peu d'effet en l'absence de réducteur.

fig II 8



Effet de NAD^+ sur la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase en présence et en absence de mercaptoéthanol.

Tampon de stockage Na_2HPO_4 0.2 M contenant 0.05 M de KCl et 0,05 unité standard (réf. Sigma) d'enzyme. Le stockage se fait à 4°C , et le dosage comme décrit précédemment.

Conclusions

De nombreux travaux ont été menés en vue d'élucider le rôle des groupements sulfhydryles dans la réaction enzymatique, ainsi que l'action des mercaptanes. Ceux-ci agissent sur le substrat, le transformant en thiohémiacétal (Schubert, 1936). Les produits de réaction de divers aldéhydes avec des mercaptanes ont été cristallisés (Ratner & Clark, 1937). Ceci explique une partie de l'effet activateur du mercaptoéthanol. L'intervention de groupements sulfhydryles a de plus été montrée par les expériences d'inactivation par les agents connus pour bloquer des groupements sulfhydryles, tel le paramercuribenzoate. Cette dernière observation ne prouve pas, du reste que ce soient les sulfhydryles intervenant dans la réaction qui aient réagi; il se pourrait que d'autres sulfhydryles en étant bloqués provoquent un changement de conformation qui inactive l'enzyme (Bayer, 1959; Nirenberg, 1960; Lindenstrøm, 1960).

La NAD^+ protège certains aldéhyde déshydrogénases contre l'inactivation par des réactifs des sulfhydryles tels le paramercuribenzoate et le 3-amino-4-hydroxyphényl arsenoxyde (Stoppani - Milstein, 1960), ceci étant dû au fait que la NAD^+ a une plus grande affinité pour les sulfhydryles situés hors du site actif et également à l'effet de protection de NAD^+ fixé dans le site actif.

Un effet similaire, mais moins prononcé est observé pour les aldéhydes (Jacoby, 1960; Nirenberg, 1960; Jacoby & Scott, 1959).

Les aldéhydes déshydrogénases sont également sensibles à l'arsenite (Jacoby, 1958) mais uniquement en présence de thiols; cette inhibition peut être levée par les dimercaptanes (Jacoby, 1957) et est compétitive avec le substrat aldéhydique.

L'inactivation par l'arsenite s'explique par la formation d'un pont entre deux groupes sulfhydryles proches; cette réaction a été mise en évidence avec l'acide 6, 8 dimercapto-octanaïque ou acide lipoïque (Reed et al, 1953) et la kératine (Stocker & Thomas, 1946), expériences dans lesquelles

on montre la disparition de deux moles de -SH par môle d'arsenite ajoutée.

La formation de ce pont entre groupes sulfhydryles proches par l'arsenite peut inactiver l'enzyme même si ceci se passe loin du site catalytique de l'enzyme, par changement de conformation (Kenchew et al, 1956).

Certains composés, tels l'urée, certains stéroïls et même la NAD^+ entraînent des changements de conformation qui peuvent augmenter ou diminuer l'activité enzymatique (Maxwell, 1962, Yelding, 1960).

Si nous rassemblons toutes les données sur les diverses variables étudiées, nous pouvons donc mettre au point une solution optimale pour le stockage de l'enzyme.

On choisira donc un tampon de pH 8,80 contenant 2 mM de mercaptoéthanol et 1 mM de KCl, la présence d'albumine, d'EDTA et de GSH n'apparaissent pas nécessaires. La NAD^+ 1 mM pourra être ajoutée si elle n'interfère pas avec les essais ultérieurs.

DEUXIEME PARTIE

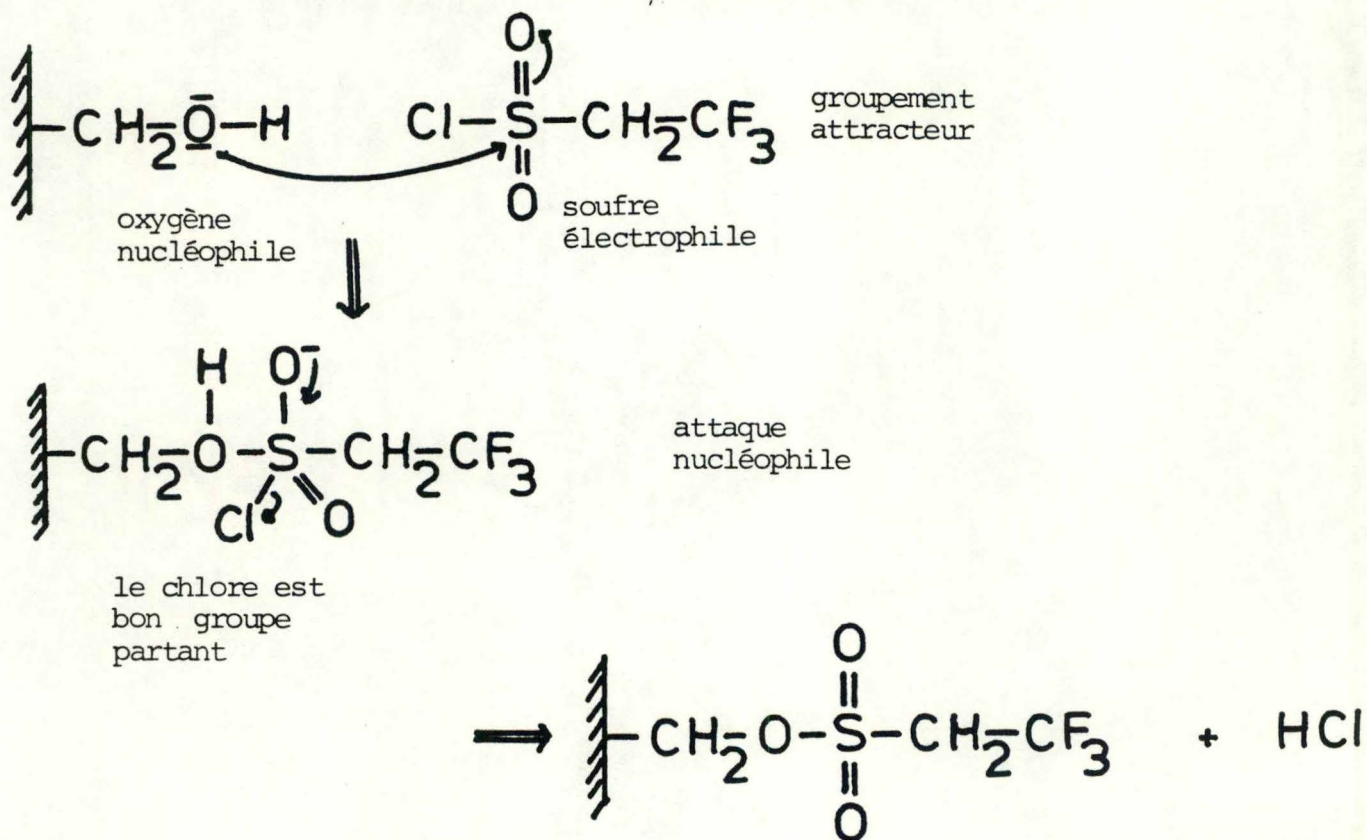
LA FIXATION DE L'ACETALDEHYDE DESHYDROGENASE SUR SUPPORT

1. Choix du support et de la méthode de fixation

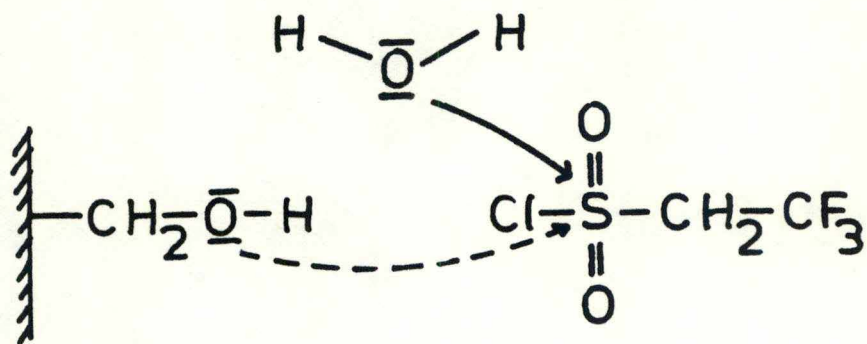
Les supports comprenant des groupements hydroxyles tels l'agarose, la cellulose, le sépharose peuvent être activés par diverses méthodes, parmi lesquelles le bromure de cyanogène, les triazines, les esters sulfoniques tels le para-nitrobenzoate, le paratoluène sulfonyle, ou le 2,2,2 trifluoroéthane sulfonyle (bisulfate).

C'est cette dernière méthode qui a été retenue, parce qu'elle permet un couplage dans des conditions particulièrement douces (cfr. Introduction Générale).

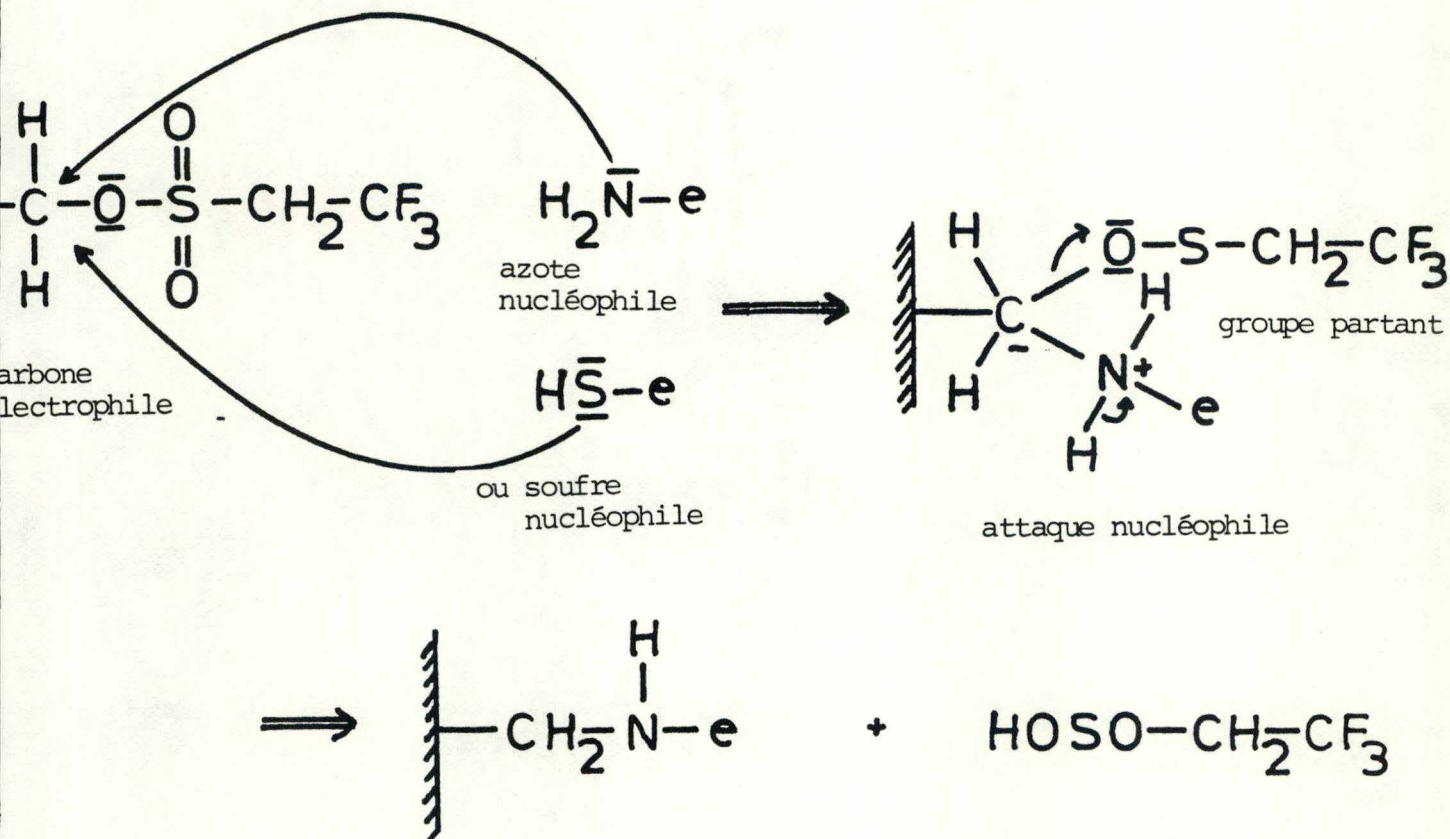
Le mécanisme de l'activation est le suivant:



L'activation se fait en milieu strictement anhydre à cause de la compétition de l'oxygène des molécules d'eau avec l'oxygène du gel pour le soufre électrophile du trétyl.



Le couplage se fait par groupements aminés et sulfhydryles; le mécanisme de la réaction est identique dans les deux cas.



Une fois l'activation terminée, le gel peut être réhydraté en milieu acide. Le gel activé conservé à 4°C dans HCl 1 mM est encore réactionnel après plusieurs mois.

Pour l'acétaldéhyde déshydrogénase, quelques restrictions apparaissent cependant. Pendant le couplage, on ne peut utiliser le mercaptoéthanol nécessaire à la stabilité; il interfère avec le couplage. Il en est de même pour le dithionite et le glutathion, qui ont été testés pour la stabilisation de l'enzyme durant le couplage. Le tampon TRIS est également à proscrire, car il contient des groupements aminés qui se lient également au gel activé.

On utilisera donc un tampon bicarbonate ou phosphate, n'interférant pas avec le couplage de l'enzyme.

2. Expériences préliminaires

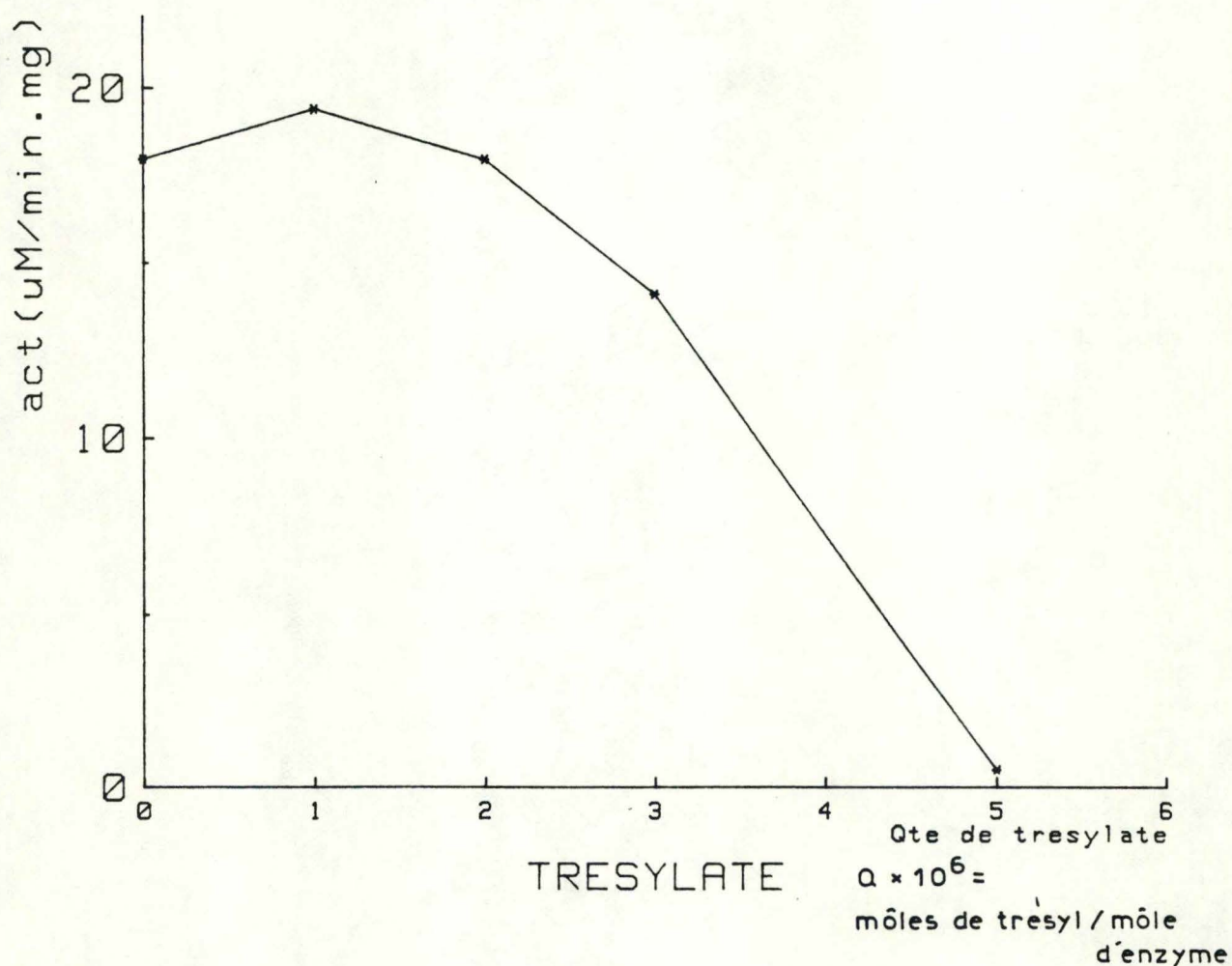
Le comportement de l'enzyme a été étudié en présence des divers facteurs nécessaires à la procédure de couplage, à savoir le tampon phosphate, le trésyl, l'agitation mécanique, la présence de gel. L'enzyme a d'abord été incubé durant vingt-quatre heures dans un tampon phosphate pour vérifier si sa stabilité n'est pas modifiée par rapport à sa stabilité dans du tampon TRIS/HCl utilisé précédemment. On ne note pas de différences significatives.

Dans une seconde expérience, l'enzyme est mis en présence de diverses concentrations en chlorure de trésyl, les autres conditions étant celles déterminées plus haut (première partie, chapitre II).

L'activité a été mesurée après vingt-quatre heures: la figure III 1 montre les résultats.

On remarque que l'enzyme est stable dans une large zone de concentrations en trésyl; il faut aller au delà de 2×10^6 molécules de trésyl par molécule d'enzyme pour observer une inactivation.

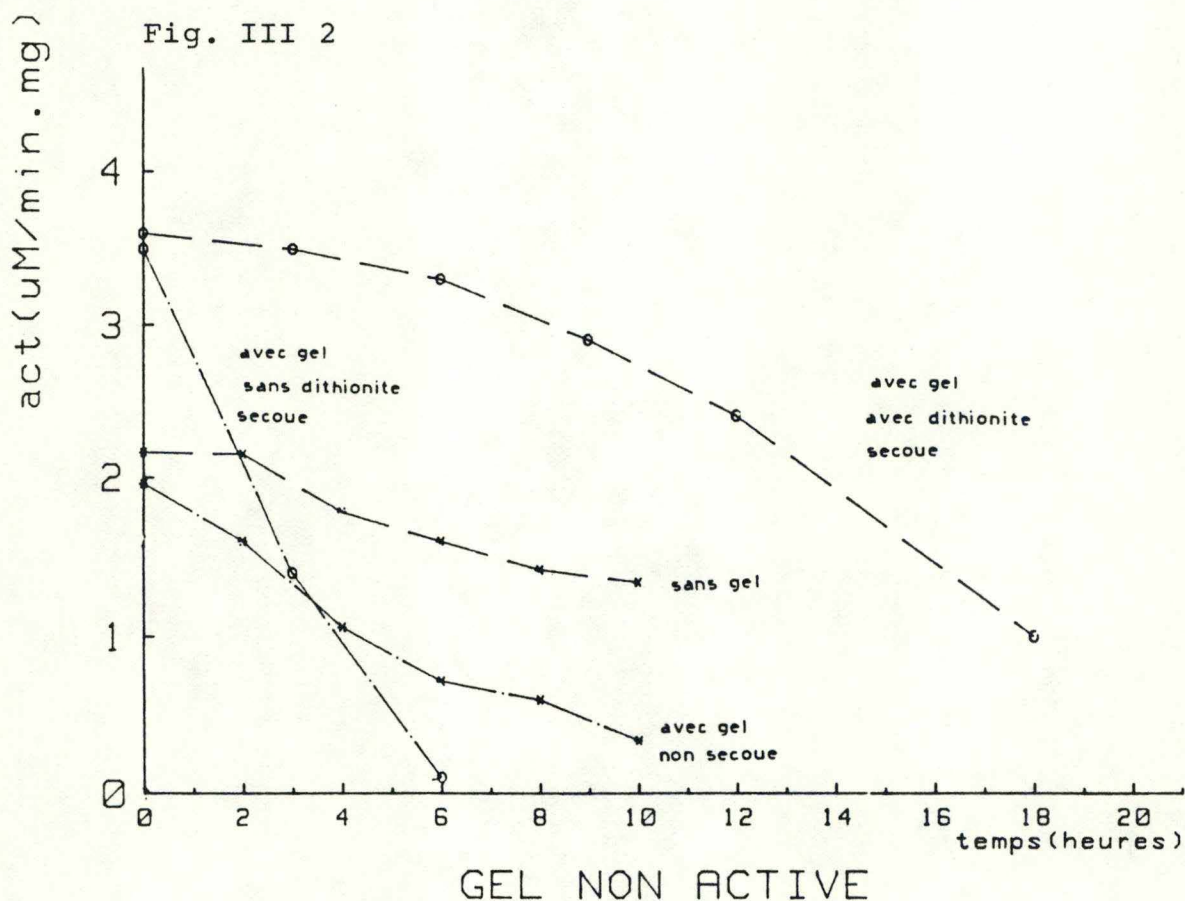
fig. III 1



Effet du chlorure de trésyl sur la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase: activité mesurée après 24 h de stockage à 4°C dans du tampon Na_2HPO_4 0.2 M contenant 10 mM KCl, 2 mM mercapto-éthanol.

La figure III 2 montre l'effet du gel sur l'activité de l'enzyme. La diminution d'activité en présence de gel est nette. Elle montre également de l'agitation mécanique sur la stabilité de l'enzyme en présence de gel. On voit que l'agitation mécanique inactive rapidement l'acétaldéhyde déshydrogénase. On remarque également l'effet protecteur puissant du dithionite.

Malheureusement, ce dernier interfère avec le couplage et ne peut donc être utilisé comme protecteur durant le couplage.



Effet du gel non activé, de l'agitation mécanique et du dithionite sur la stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

On voit donc que l'instabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase risque de poser quelques problèmes lors de son couplage sur sépharose 4-B activé au trétyl.

3. Couplage: Méthode

La méthode d'activation du sépharose par le chlorure de trétyl, ainsi que la méthode de couplage de l'acétaldéhyde déshydrogénase sur le gel ainsi activé sont présentés ici. Elles sont basées sur l'article de Nilsson et Mosbach, 1981.

A. Activation du gel

L'activation devant se faire en l'absence d'eau, le gel est d'abord déshydraté par transfert progressif dans de l'acétone préalablement déshydraté par passage sur chlorure de calcium calciné, puis distillé.

Ceci se fait par rinçages successifs dans des solutions eau/acétone composées respectivement de 20%, 40%, 60% puis 80% d'acétone en volume. Ces rinçages se font avec deux fois le volume du gel. Ensuite on rince deux fois à l'acétone commercial et finalement trois fois à l'acétone pur distillé.

Le gel est alors resuspendu dans un volume d'acétone équivalent à un dixième de son volume pour faciliter l'agitation lors de l'addition de la pyridine et du trétyl. Ce dernier est ajouté goutte à goutte.

La réaction d'activation est arrêtée au bout de trente minutes par rinçages à l'acétone déshydraté.

Le gel activé est ensuite transféré dans l'acide chlorhydrique 1 mM par étapes successives. On rince dans des solutions acétone/HCl contenant de plus en plus d'HCl, successivement 20%, 40%, 60%, 85% et 95%. On termine avec deux rinçages à l'HCl 1 mM et le gel est

gardé dans deux fois son volume d'HCl 1 mM.

Le gel ainsi activé peut être conservé plusieurs mois, d'après les auteurs précités.

Pratiquement, les différentes activations ont toujours été faites avec 2 ml de gel, ce qui permet de procéder aux rinçages dans une seringue munie d'un filtre. On évite ainsi les problèmes dus aux transferts d'un récipient à l'autre.

B. Couplage de l'enzyme

L'enzyme est dissous dans un tampon de couplage Na_2HPO_4 0,15 Molaire pH 8,70 contenant 50 mM de KCl. Le pH choisi est un compromis entre le pH optimal de stabilité de l'enzyme, qui est 8,90 et le pH optimal de couplage, qui couvre une large plage (7 à 8,5). Le gel est rincé rapidement avec le tampon de couplage sans enzyme. Ceci doit se faire rapidement parce que le gel activé est instable en milieu aqueux aux valeurs élevées de pH. Ensuite la solution d'enzyme est ajoutée. Le couplage se fait à 4°C sous agitation la plus douce possible.

Après l'arrêt de l'incubation, le gel est rincé chaque fois deux fois avec le double de son volume de tampon de couplage, puis d'une solution saline KCl et NaCl 0,05 M, puis à l'eau distillée. Ensuite on laisse reposer le gel une heure dans du tampon TRIS, ceci pour saturer les groupements réactionnels qui n'auraient pas réagi, après quoi le gel est dilué 5 fois dans le tampon de dosage contenant du TRIS/HCl 50 mM pH 8,80, 10 mM de mercaptoéthanol et 10 mM de KCl.

Ceci est le schéma général, différents facteurs vont maintenant être étudiés afin d'obtenir un rendement de couplage optimal.

4. Mise au point du dosage de l'enzyme couplé

La mesure de l'activité de l'enzyme couplé est réalisée de la manière suivante:

Une quantité connue de gel est transférée dans quatre tubes, deux blancs et deux tests. Cette quantité est rigoureusement la même d'un tube à l'autre.

Dans un des tubes test, le gel sera incubé onze minutes en présence de NAD^+ et d'acétaldéhyde; dans l'autre, l'incubation durera une minute. Après sédimentation du gel par centrifugation, le surnageant qui contient une certaine quantité de NADH, réduit par l'enzyme couplé sur le gel est filtré et l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 340 nm. La différence d'absorbance entre les deux test (1 minute et 11 minutes) permet de déterminer la vitesse de variation d'absorbance, ce qui permet de déterminer l'activité du "gel" ou plus précisément de l'enzyme couplé au gel.

La filtration du surnageant avant lecture au spectrophotomètre est indispensable afin d'éviter que le gel n'interfère avec la lecture de l'absorbance. En procédant de la sorte, de la NADH risque de s'adsorber sur le filtre, entraînant une sous-estimation de l'absorbance réelle. Un facteur correctif doit donc être introduit, que l'on a mesuré égal à 1,73.

Lors d'un couplage l'enzyme peut se fixer plus ou moins complètement, et s'inactiver plus ou moins selon les conditions du couplage.

La quantité d'enzyme fixée peut se mesurer en dosant les protéines des premières solutions des lavages qui suivent l'arrêt du couplage. Cela permet de déterminer le rendement de fixation. Ayant ainsi la quantité des protéines fixées sur le gel ainsi que l'activité sur le gel, on peut donc déterminer l'activité spécifique et donc le degré de dénaturation de l'enzyme couplé.

Le rendement utile est le rapport entre l'activité retrouvée sur le gel et l'activité totale mise à coupler.

5. Résultats et discussion

Comme pour l'enzyme en solution, nous avons tenté d'optimiser le dosage de l'enzyme couplé en testant l'effet des paramètres qui paraissaient les plus importants. Priorité a été donnée au pH; ensuite l'effet du KCl et du mercaptoéthanol ont été testés. Avant d'étudier la cinétique de l'enzyme fixé et sa stabilité, nous avons d'abord recherché les conditions optimales de couplage.

A. pH de dosage

Nous avons donc d'abord mesuré l'effet du pH de dosage. La figure IV 1 montre les résultats obtenus.

Le pH optimal se trouve aux alentours de 9, ce qui n'est pas très différent du pH optimal de dosage de l'enzyme en solution.

Le couplage bloque certains groupements aminés de l'enzyme et induit donc une charge globale plus négative. Ceci devrait déplacer le pH optimum d'activité vers des valeurs plus élevées. Cet effet n'est pas très marqué ici, contrairement à ce qui se passe pour l'alcool déshydrogénase.

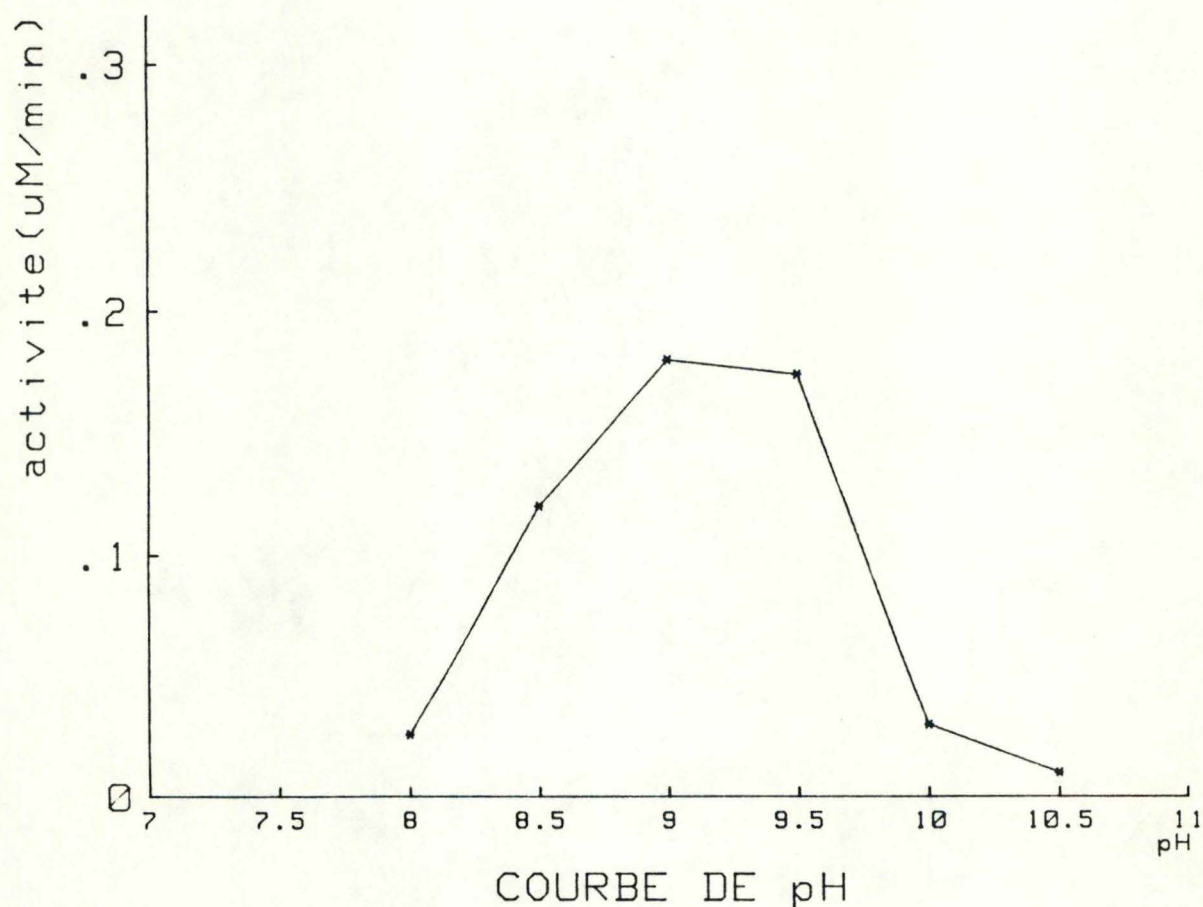
B. Effet du KCl

Le dosage a été fait à trois concentrations de KCl: 1 mM, 10 mM et 100 mM. Ces deux dernières concentrations donnent des résultats identiques, la concentration 1 mM est trop faible.

C. Effet du mercaptoéthanol

Trois concentrations ont été testées: 1 mM, 10 mM et 100 mM. La concentration de 10 mM en mercaptoéthanol donne l'activité la plus grande.

figure IV 1



Courbe de pH de l'acétaldéhyde déshydrogénase couplé sur sépharose 4-B activé avec 20 ml de trésyl par ml de gel.

Le couplage s'est fait sur 2 ml de gel activé, dans 2 ml de tampon Na_2HPO_4 0,15 M contenant 50 mM de KCl et 0,3 ug d'acétaldéhyde déshydrogénase.

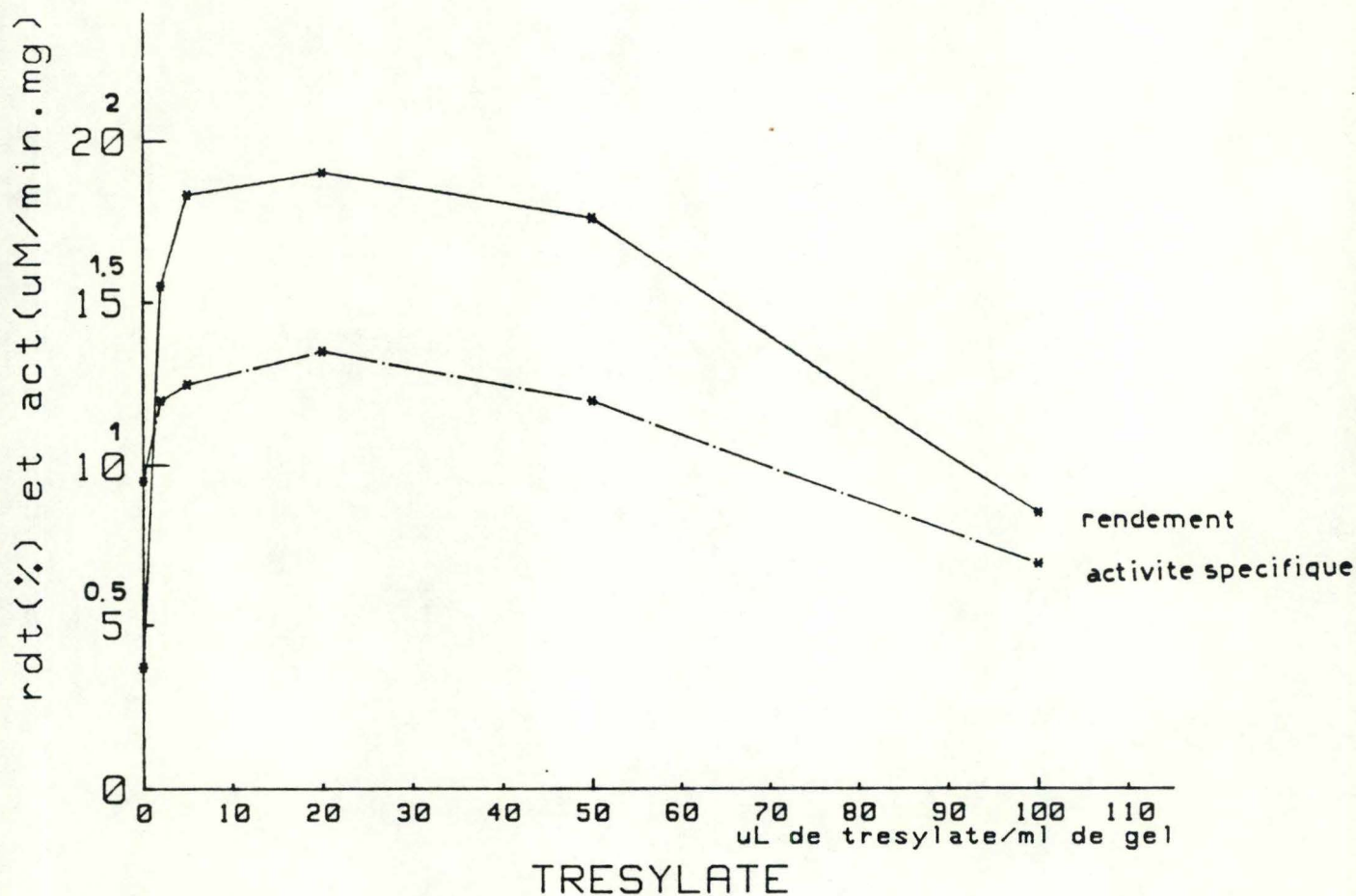
D. Effet de la quantité de trésyl

La quantité de trésyl ajouté au gel détermine le nombre de sites activés sur ce gel. Plus cette quantité est importante, plus le nombre de sites activés est important, jusqu'à une limite qui est la saturation des groupements activés sur le gel. Cependant, des quantités trop importantes de trésylate modifient aussi les propriétés physiques du gel. Lors du couplage de l'enzyme, le trésyl se libère dans le milieu sous forme de sulfonate (cfr. mécanisme) qui est susceptible d'inactiver l'enzyme.

Le rendement du couplage a donc été mesuré en fonction des diverses quantités de trésyl utilisées pour l'activation du gel. La figure IV 2 montre les résultats. La courbe continue donne le rendement utile, la courbe en trait discontinu montre l'évolution de l'activité spécifique de l'enzyme fixé au gel.

La quantité optimale de trésyl est de 20 μ l/ml de gel. Pour des quantités plus importantes, on remarque une diminution du rendement de couplage due à une inactivation de l'enzyme. Pour des valeurs dépassant 50 μ l de trésyl/ml de gel, on constate une tendance du gel à former des agrégats et à se fixer aux parois des récipients.

Fig. IV 2



Effet de la quantité de trésyl utilisé pour l'activation de gel sur le rendement utile (courbe continue) et l'activité spécifique de l'acétaldéhyde déshydrogénase (courbe discontinue).

Les autres conditions d'activation et de couplage sont les mêmes que pour l'expérience précédente.

L'échelle de l'activité spécifique^(*) est dix fois plus grande que l'échelle du rendement^(**)

(*) chiffres gras supérieurs

(**) chiffres inférieurs

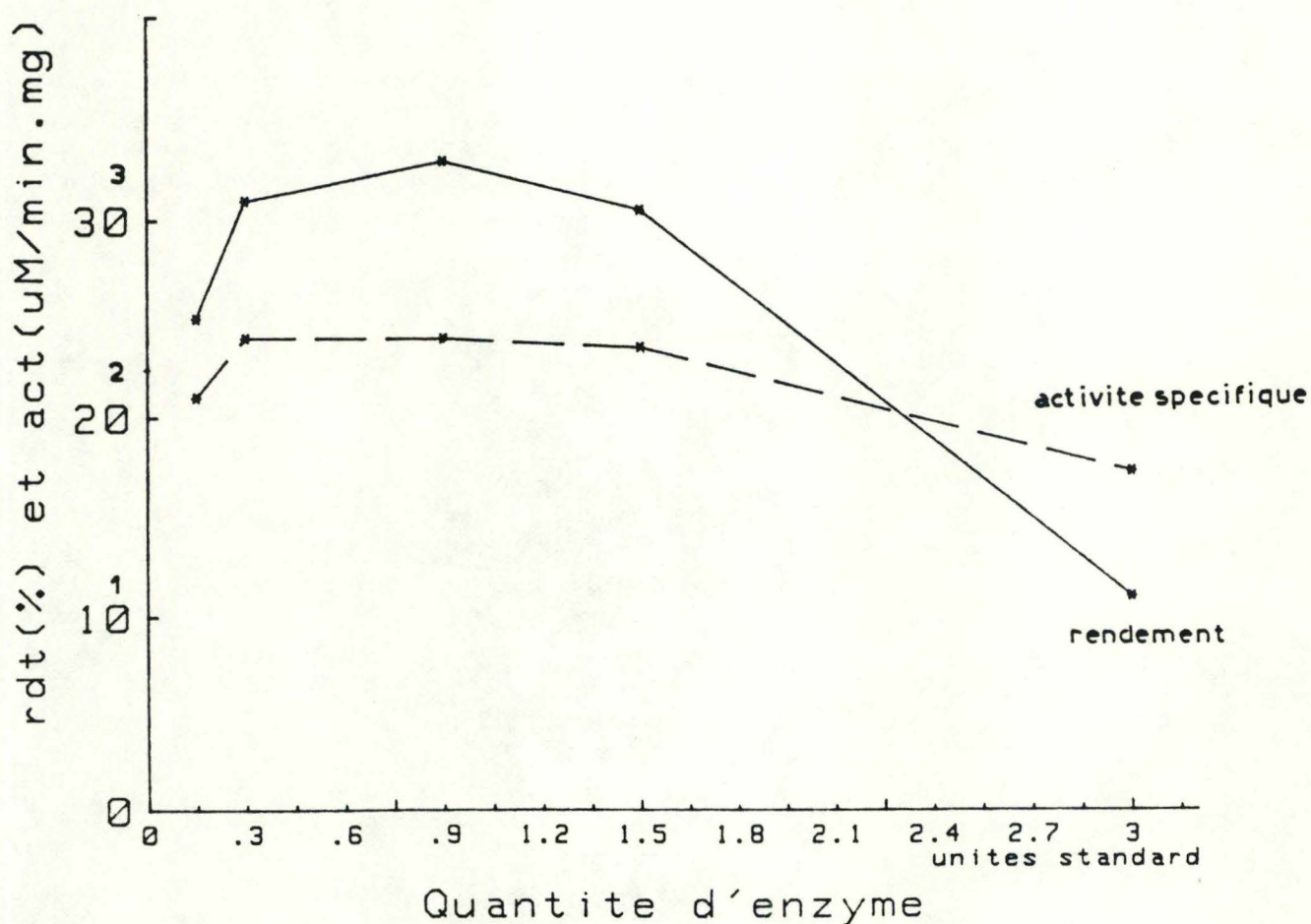
E. Effet de la quantité d'enzyme

L'influence de la quantité d'enzyme présent lors du couplage a été testée afin de permettre de déterminer la quantité d'enzyme qui donne une fixation optimale. La figure IV 3 montre l'effet de la quantité d'enzyme utilisée lors du couplage sur le rendement et sur l'activité spécifique. Le rendement, indiqué par la courbe en trait continu, est optimal lorsqu'on incube 0,9 unités standard (référence SIGMA) lors du couplage ce qui correspond à 75 ug d'enzyme.

L'activité spécifique reste à peu près constante, ce qui indique que la concentration de l'enzyme n'influence pas de manière notable sa stabilité.

Normalement, un doublement de la quantité d'enzyme doit produire un doublement de l'activité couplée; si tel n'est pas le cas, nous devons conclure à une saturation du nombre de sites de fixation du gel; c'est ce qui se passe au delà de 75 ug d'enzyme (le rendement diminue parce que l'activité retrouvée sur le gel ne suit plus de manière linéaire l'activité que l'on met en présence du gel pour le couplage).

Fig. IV 3



Effet de la quantité d'enzyme utilisée lors du couplage sur le rendement utile (courbe en trait continu) et sur l'activité spécifique (courbe en trait discontinu).

Activation avec 20 ul de trésyl/sel de gel.

Les autres conditions de couplage et d'activation sont identiques à l'expérience précédente.

L'échelle de l'activité spécifique (chiffres gras supérieurs) est dix fois plus grande que l'échelle du rendement (chiffres inférieurs).

F. Durée du couplage

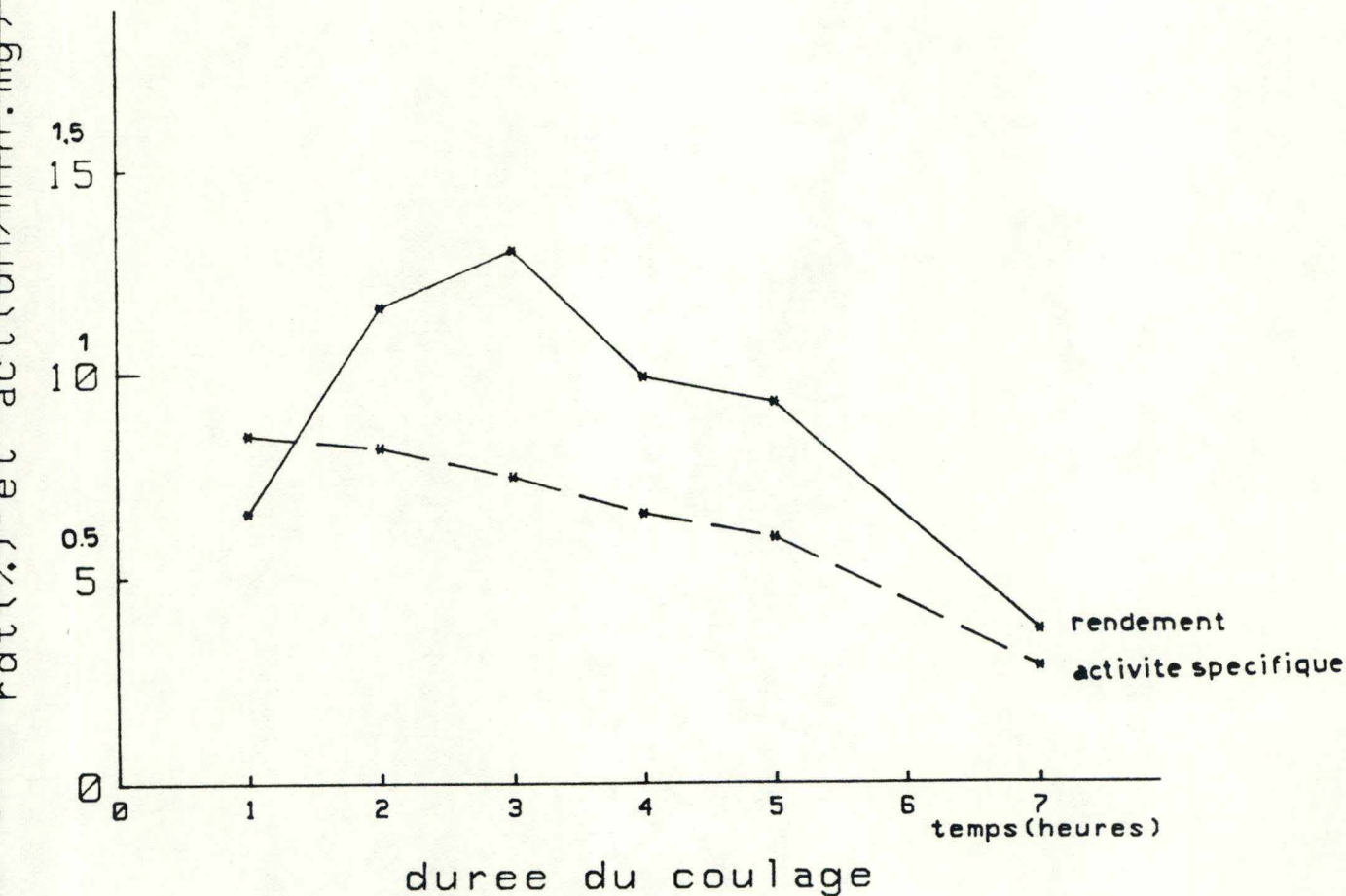
Devant la faible activité de l'enzyme récupérée sur le gel, nous avons tenté de déterminer une durée optimale pour le couplage, compromis entre la meilleure fixation possible et l'inactivation inévitable au cours du temps.

Le graphique IV 4 montre l'évolution du rendement utile et de l'activité spécifique en fonction de la durée du couplage. On voit que le rendement augmente jusqu'à 3 heures de durée du couplage; au delà, il diminue rapidement.

L'activité spécifique diminue sensiblement au cours du temps, ce qui indique que l'enzyme se dénature.

La durée du couplage devra donc être comprise entre trois et quatre heures. Après cette durée, la fixation est pratiquement à son niveau maximal (Nilsson - Morbach, 1981, Bille 1984).

Fig. IV 4



Effet de la durée du couplage sur le rendement (courbe en trait continu, échelle inférieure) et l'activité spécifique (coube en trait discontinu, échelle supérieure). L'activation est faite avec 10 μ l de trésyl/ml de gel. 0,9 unité d'enzyme a été couplée.

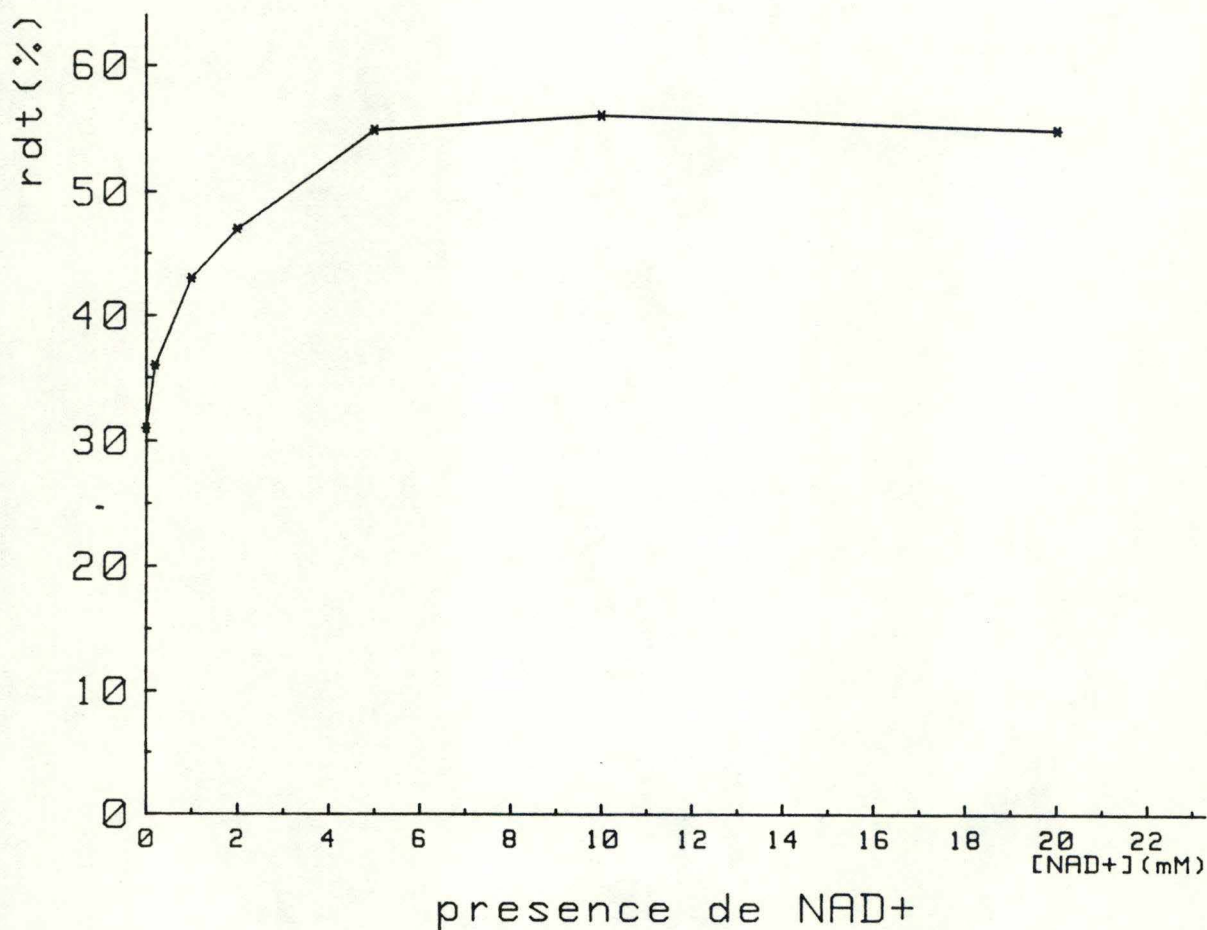
G. Couplage en présence de substrat et de cofacteur

La NAD^+ a été testée quant à son effet sur le rendement du couplage, car il stabilise l'acétaldéhyde déshydrogénase (Jacoby, 1970; Bostian et Betts, 1977). Des couplages ont été réalisés en présence de concentrations croissantes en NAD^+ . La figure IV 5 montre les résultats obtenus. La NAD^+ améliore le rendement de la réaction: une concentration en NAD^+ de 10 mM paraît optimale.

L'effet de l'acétaldéhyde n'a pas été testé parce que son action stabilisante sur l'enzyme en solution est peu marquée, et le site actif est peu accessible à d'autres molécules que le substrat (voir Mécanisme de la réaction enzymatique - Introduction).

L'acétaldéhyde ne peut être transformé en thiohémiacétal vu l'absence de mercaptoéthanol, et le site actif peut aussi ne pas avoir la possibilité de fixer l'acétaldéhyde en l'absence de réducteur.

Fig IV 5



Action de la NAD⁺ sur le rendement du couplage de l'acétaldéhyde déshydrogénase sur Sépharose 4 B. Pour l'activation, on a utilisé 10 μ l de trésyl/ml de gel. 1 unité standard a été couplée. Pour les autres conditions expérimentales, voir expériences précédentes.

Conclusion

A la lumière des expériences décrites précédemment, on peut donc conclure que le couplage par le trésylate se fera dans les conditions suivantes:

Pour l'activation, on utilisera entre 10 et 20 μ l de trésyl par sel de gel.

Pour le couplage, on travaillera à pH 8.5 - 8.7, en incubant environ 50 ug d'enzyme par ml de gel et la durée du couplage qui se fera en présence de NAD^+ 10 mM à 4°C sera comprise entre trois et quatre heures.

C'est l'instabilité de l'enzyme, incubé dans des conditions de milieu défavorables à sa stabilité qui limite le rendement utile du couplage.

5. Cinétique de l'acétaldéhyde déshydrogénase couplé

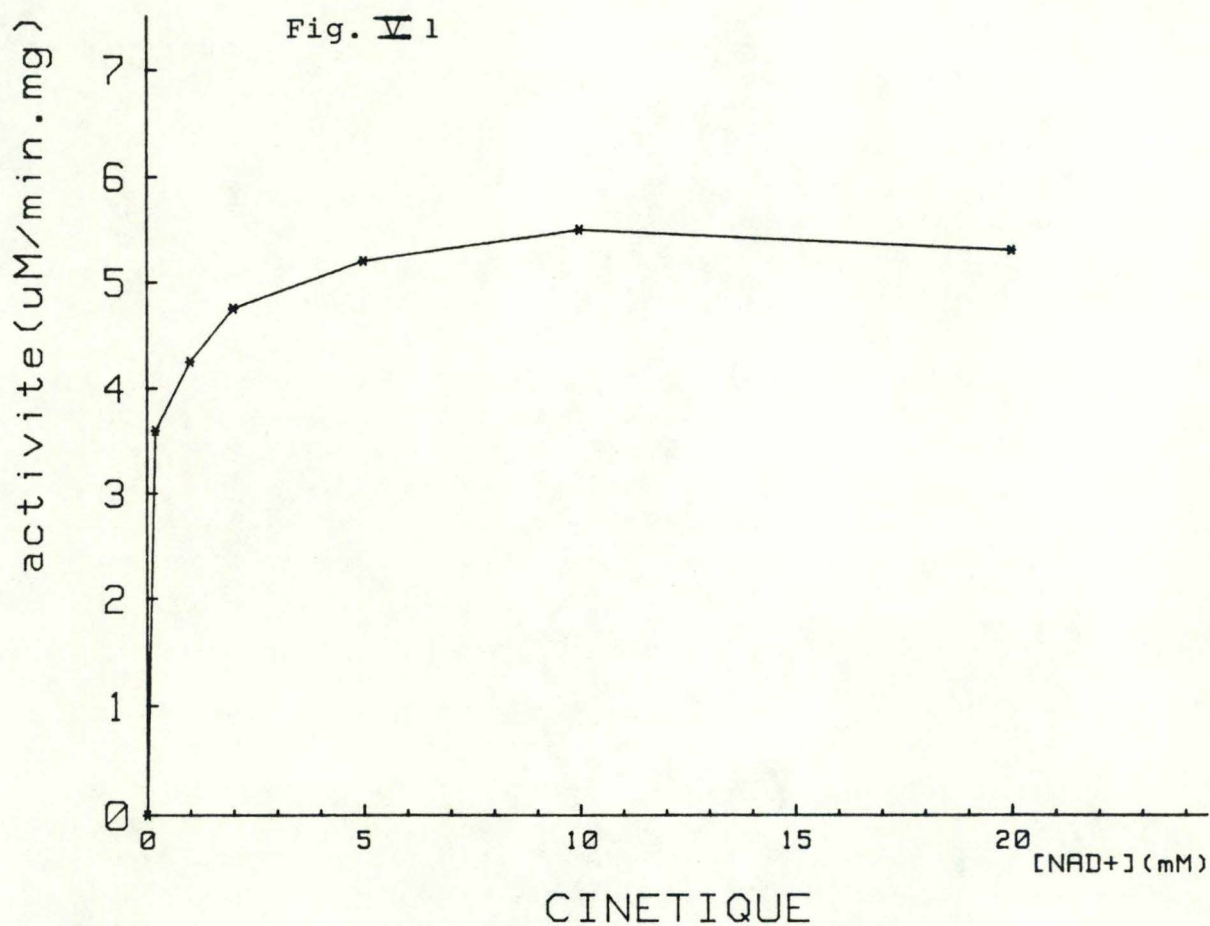
Pour déterminer si les affinités de l'enzyme pour la NAD^+ et pour l'acétaldéhyde sont modifiées par le couplage, nous avons déterminé l'effet de la concentration en NAD^+ et en acétaldéhyde sur la vitesse de réaction de l'enzyme fixé.

Nous nous sommes basés sur les mêmes principes que pour l'enzyme en solution.

Les figures V1 et V2 montrent les résultats, et les figures V1' et V2' montrent les résultats après la transformation de Lineweaver-Burk, ainsi que la droite de régression.

La valeur de $K_M^{\text{NAD}^+}$ trouvée expérimentalement est de 0,1 mM; pour l'enzyme en solution, cette valeur était de 0,17 mM. L'affinité de l'enzyme immobilisé vis à vis de la NAD^+ n'est pas sensiblement modifiée.

Par contre, pour l'acétaldéhyde, on remarque une nette diminution de l'affinité suite au couplage: la valeur de K_M^{acet} de l'enzyme insolubilisé est de 2,3 mM, contre 0,2 mM pour l'enzyme en solution.



Effet de la concentration en NAD^+ sur la vitesse de réaction enzymatique (cinétique)

Fig. V 1'
Représentation en double inverse

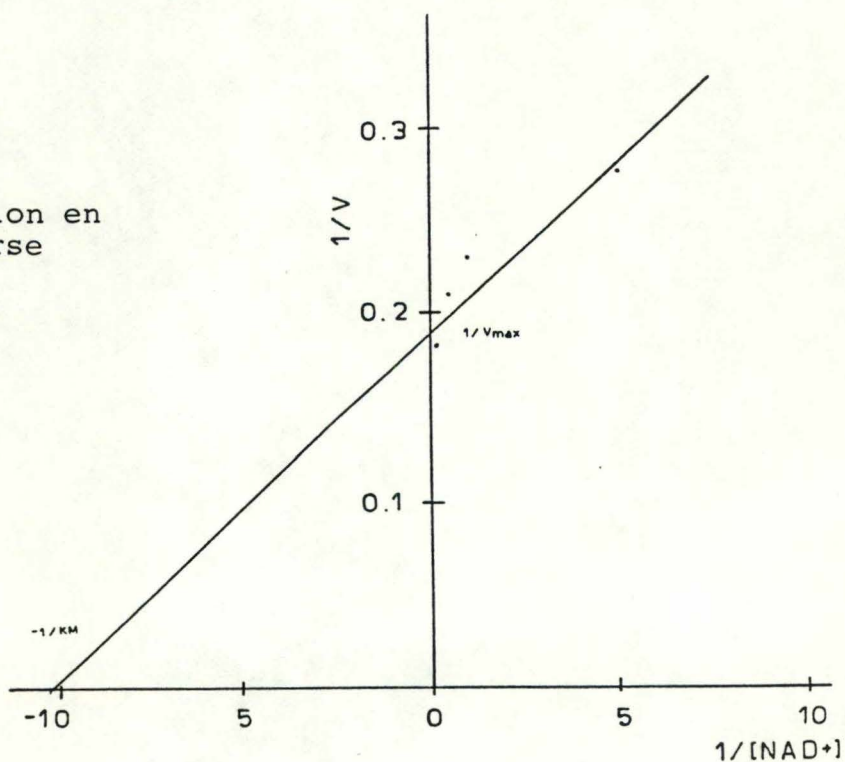
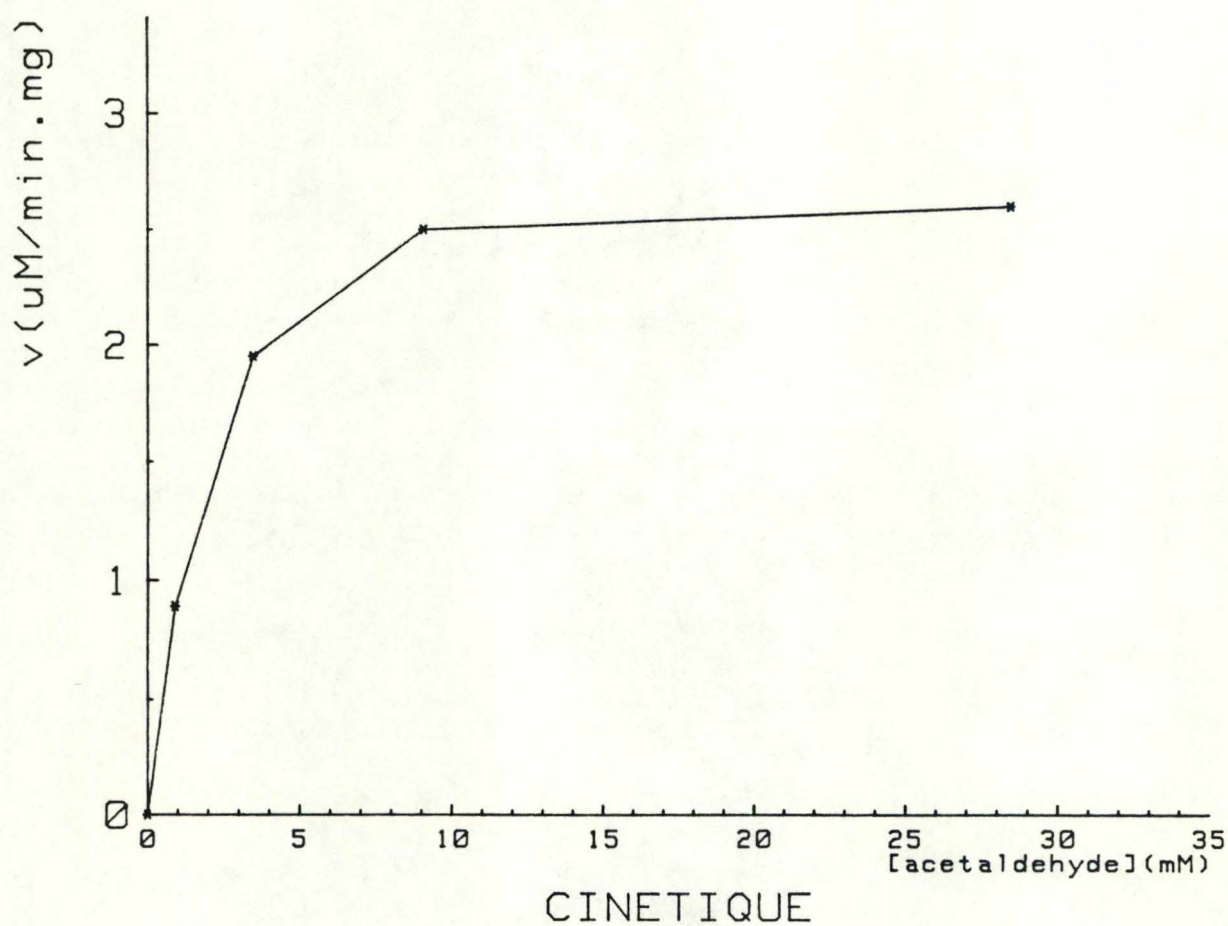
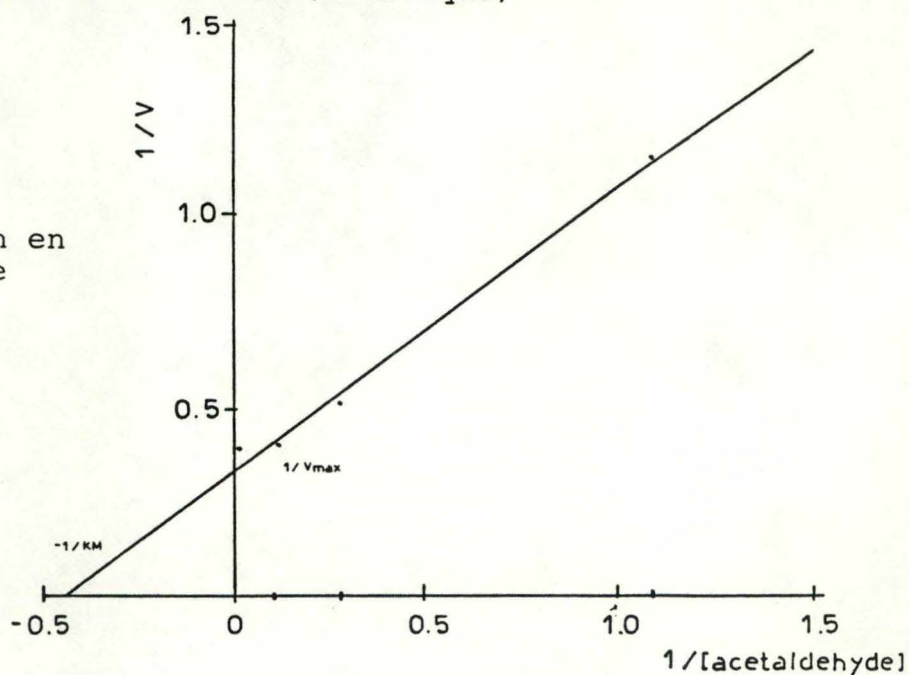


Fig. V 2

Effet de la concentration en acétaldéhyde sur la vitesse de réaction (cinétique)

Fig. V 2'

Représentation en double inverse



6. Stabilité de l'acétaldéhyde déshydrogénase couplé

On a vu que l'instabilité de l'enzyme couplé sur le gel était le facteur limitant le rendement du couplage. Nous avons testé les deux paramètres qui sont présumés avoir la plus grande influence sur la stabilité de l'enzyme. Il s'agit du pH et de la concentration en mercaptoéthanol.

L'effet du pH est indiqué à la figure VI 1.

On remarque que pour des valeurs de pH comprises entre 7 et 8, l'activité se conserve le plus longtemps. Par contre, à pH 9, c'est-à-dire proche du pH optimal de stockage de l'enzyme en solution, le gel perd rapidement son activité.

L'effet du mercaptoéthanol a ensuite été testé, dans une solution à pH 8 (figure VI 2). Pour maintenir sa stabilité, l'enzyme couplé nécessite de grandes concentrations en mercaptoéthanol, de 10 à 50 mM. Pour la stabilité de l'enzyme en solution, il fallait des concentrations de 2 mM. Pour le dosage de l'enzyme couplé, il faut des concentrations en mercaptoéthanol de 10 mM.

Il existe donc une nette différence entre l'enzyme en solution et l'enzyme insolubilisé du point de vue des concentrations en mercaptoéthanol nécessaires.

L'enzyme en solution nécessite une concentration 01 Molaire en mercaptoéthanol pour son dosage et 2 mM pour son stockage. L'enzyme insolubilisé nécessite une concentration 10 mM pour son dosage et 10 mM ou plus pour sa stabilité.

Ceci peut s'expliquer si on tient compte de la théorie de l'effet du mercaptoéthanol sur la conformation de l'enzyme (Jacoby, 1970).

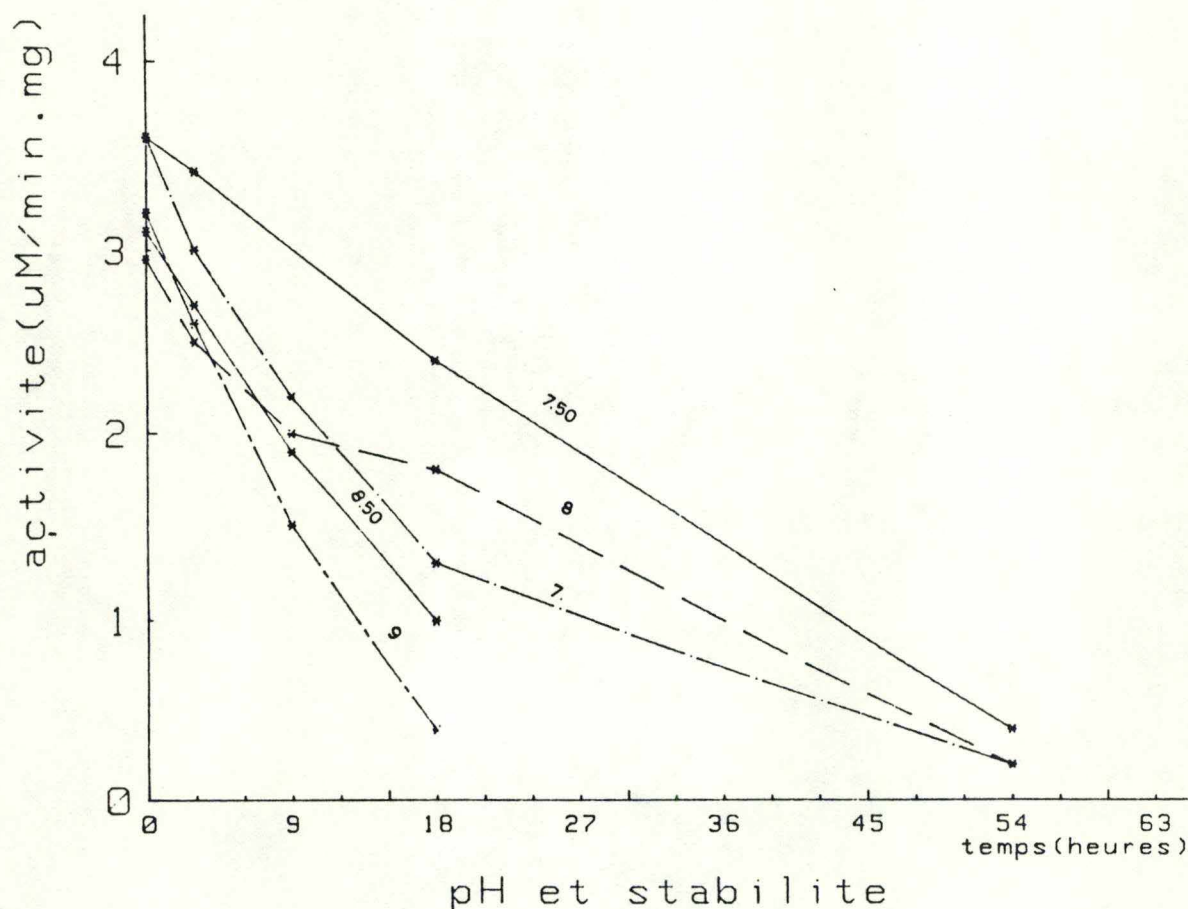
La fixation sur un support rend l'enzyme moins sensible à la dénaturation par rupture de ponts disulfure entraî-

nant un changement de conformation fatal. Il est probable que c'est la raison pour laquelle le stockage peut se faire à des concentrations plus fortes de mercaptoéthanol.

Pour l'activation, on peut supposer que l'enzyme fixé qui est actif possède une conformation proche de la conformation idéale. Ceci expliquerait la concentration plus faible en mercaptoéthanol nécessaire pour son activation.

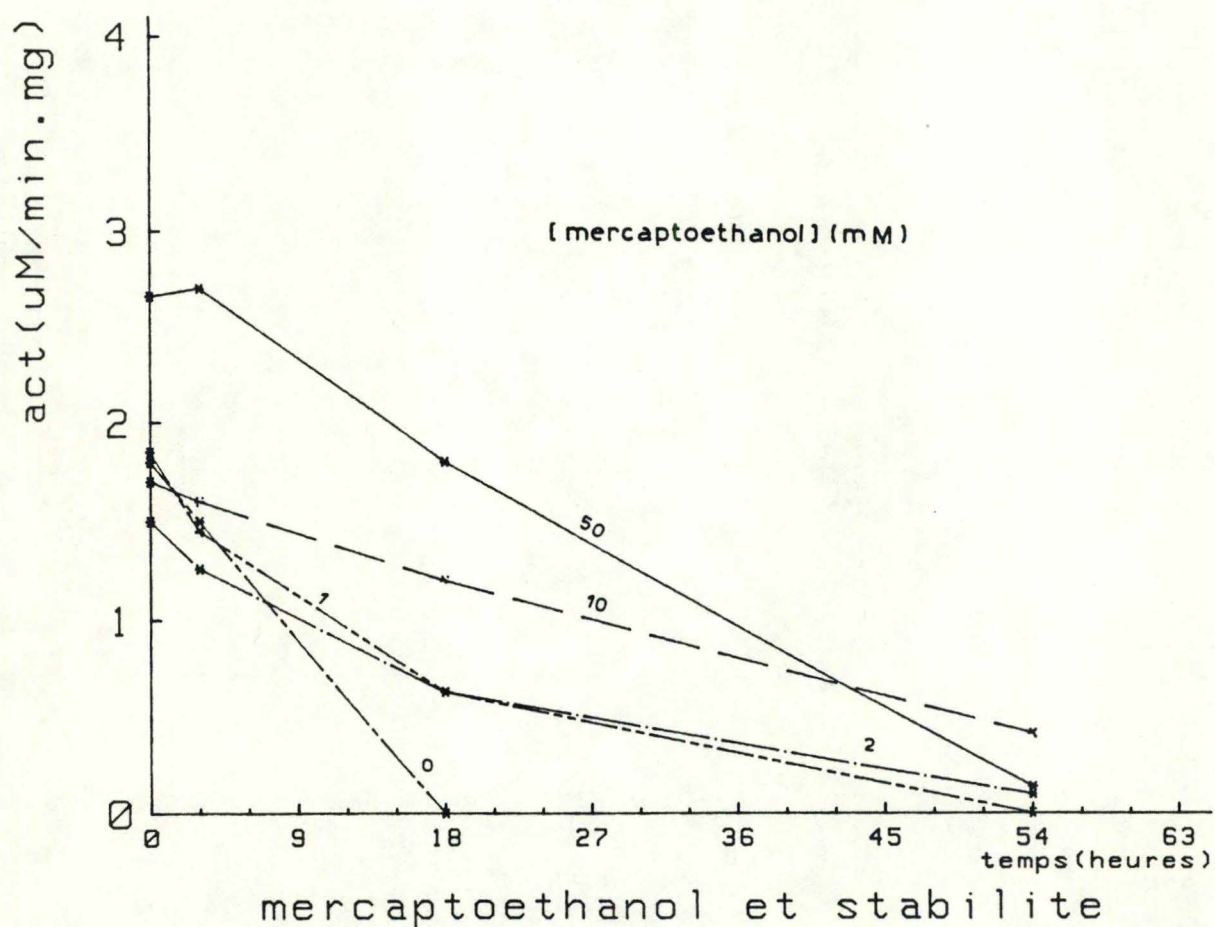
Des concentrations très élevées risquent de rompre la liaison enzyme - support.

Fig. VI 1



Evolution au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase fixé sur sépharose 4-B, à différentes valeurs de pH. Le gel a été activé avec 10 μ l de trésyl par ml de gel, et 05 unités standard (référence SIGMA) d'enzyme ont été couplées (voir expériences précédentes). Le stockage se fait à 4°C et le dosage se fait à pH 9.0 dans du tampon TRIS/HCl 10 mM contenant 10 mM KCl, 10 mM mercaptoéthanol, 2 mM NAD^+ et 2 mM acétaldéhyde.

Fig. VI 2



Evolution au cours du temps de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase fixé sur sépharose 4-B, à pH 8.0 et à différentes valeurs de concentration en mercaptoéthanol.

Les autres conditions expérimentales sont décrites dans l'expérience précédente.

Conclusion sur le couplage

Le couplage au trésylate donne des rendements de fixation élevés, mais en contrepartie, la stabilité de l'enzyme ne peut être assurée pendant le couplage, ce qui entraîne des pertes substantielles d'activité, qui ont une répercussion négative sur le rendement utile.

L'enzyme se montre également moins stable à l'état fixé qu'à l'état soluble; à première vue, ce résultat semble contradictoire puisque les fixations covalentes une fois réalisées, la structure devrait s'en trouver confortée. Il ne faut cependant pas oublier que l'acétaldéhyde déshydrogénase est un tétramère et que toutes les quatre sous-unités ne sont pas nécessairement fixées au support. Ainsi, l'instabilité de l'enzyme sur le gel pourrait provenir d'une dissociation des sous-unités. Un procédé de stabilisation des liaisons entre les quatre sous-unités devrait être envisagée. De même, une recherche pour des réducteurs utilisables pendant la période de fixation de l'enzyme devrait être entreprise.

La relative simplicité de l'activation au chlorure de tré-syl en fait une méthode qui peut être retenue. L'acétaldéhyde déshydrogénase a posé quelques problèmes à cause de la nécessité de mercaptoéthanol pour son activité et sa stabilité. C'est pourquoi la mise au point de la technique ne s'est pas faite sans difficultés.

CONCLUSION GENERALE

A l'heure actuelle, un grand nombre de méthodes d'immobilisation d'enzymes ont été mises au point. Le choix de la méthode est fonction de l'enzyme que l'on veut fixer et du type d'application envisagé.

Si on envisage la fixation dans un but de production industrielle, le paramètre important est le coût du procédé, c'est-à-dire qu'il faut évaluer les gains et les coûts de l'utilisation de l'enzyme insolubilisé, et les comparer avec ceux rencontrés lors de l'utilisation de l'enzyme en solution. La performance du biocatalyseur est donc un des éléments essentiels dans ce calcul.

Jusqu'à présent, l'application industrielle de ces procédés concerne principalement la transformation alimentaire, faisant appel surtout à des hydrolases ou des isomérases.

L'intérêt des biocatalyseurs réside surtout dans les réactions de synthèse. Celles-ci consomment des cofacteurs; il faut donc mettre au point des procédés économiques de régénération des cofacteurs.

Parmi ces systèmes de régénération, l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase sont à priori une solution économiquement valable, au niveau du bilan de la transformation puisque en couplant ces deux systèmes, on transforme l'éthanol en acide acétique en régénérant deux moles de NAD^+ par mole de substrat.

Il reste beaucoup de travail à réaliser dans cette optique en améliorant principalement les conditions de stabilisation des enzymes insolubilisés et en développant un procédé de couplage d'enzymes complémentaires l'un de l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- KEITH A. BOSTIAN and GRAHAM F. BETTS,
Biochem. J. (1978), 173, 773-786
- P.D. BOYER,
"The Enzymes", 2nd Ed. Vol. 1, P. 511, 1959
- BRADBURY, S.L. and JACOBY, W.B.,
(1971 a) J. Biol. Chem. 246, 1834-1840
- BRADBURY, S.L. and JACOBY, W.B.,
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2373-2376
- CLARK, J.F. and JACOBY, W.B.,
(1970 b), J. Biol. Chem. 245, 6012-6077
- DURAND G. et MONSAN P.,
1974 - Les enzymes immobilisées, APRIA, Paris
- W.B. JACOBY, JBC, 232, 89 (1958)
- W.B. JACOBY, ABB, 70, 625 (1957)
- W.B. JACOBY and E.M. SCOTT, JBC, 234, 937 (1959)
- R.J. LANED, E. KEINAN and J.G. ZEIKUS
Enzyme Technol., 1981, Vol. 3
- K.U. LINDERSTRØM - LANG and J.A. SCHELLMAN,
"The Enzymes" 2nd Ed., Vol. 1, P 443, 1960, D.E. KOSHLAND Jr.
IBID. P 332
- J.C. MENDREW, G. BODO, H.M. DINTERS, R.G. PARRISH, H. WYCKHOFF
and D.C. PHILIP,
Nature 191, 662 (1958)
- E.S. MAXWELL and Y. TROPPER,
JBC, 236, 1032 (1961)
- E.S. MAXWELL,
JBC 239, 1699 (1962)
- KENT NILSSON and KLAUS MOSBACH,
K. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 397-402
- KENT NILSSON and KLAUS MOSBACH,
Biochemical and Biophysical research communication,
449 - 457 (1981)
- M. NIRENBERG and W.B. JACOBY,
JBC, 235, 954 (1960)

STEINMAN C.R. & JACOBY W.B. (1967)
J. Biol. Chem. 243, 730-734

TING-KAI Li,
"Enzymology of human alcohol metabolism", NIAAA

K.L. YIELDING and G.M. TOMKINS,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 46, 1483 (1960).
