

PROTÉINES DE STRUCTURE DE SZENT-GYÖRGYI ET THYMONUCLÉO-HISTONE

par

J. BRACHET ET R. JEENER

Laboratoires de Morphologie animale et de Physiologie animale. Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles (Belgique)

I. INTRODUCTION

On sait que SZENT-GYÖRGYI et ses collaborateurs^{1,2} ont isolé, à partir de nombreux tissus animaux et végétaux, des protéines fibreuses dont les solutions se caractérisent par une intense biréfringence d'écoulement, une viscosité élevée et une thixotropie marquée. Ces protéines, qui interviendraient dans la structure même du cytoplasme cellulaire, s'obtiennent en broyant les organes dans la solution saline d'Edsall (KCl 0.3M ; CO_3Na_2 0.01M ; CO_3NaH 0.04M) additionnée de 30% d'urée : celle-ci servirait à rompre les liaisons hydrogène unissant les molécules protéiques les unes aux autres et faciliterait ainsi leur mise en solution. On peut purifier ces protéines de structure en les précipitant par dilution de l'extrait à l'Edsall-urée avec 5 volumes d'eau et neutralisation. En répétant cette purification et en traitant ensuite la protéine par l'acide trichloracétique, l'alcool chaud et le chloroforme, BANGA et SZENT-GYÖRGYI² ont obtenu des substances contenant de 0.53 à 2.28% de P et 11 à 16% de N, suivant les organes dont ils étaient partis. La richesse en P a conduit les auteurs hongrois à penser qu'il s'agit de nucléoprotéides à molécules fibreuses. Leur localisation dans la cellule serait cytoplasmique et non nucléaire : en effet, le noyau reste intact après traitement des cellules à l'Edsall-urée. Peut-être ces protéines de structure régleraient-elles le transport de l'eau dans la cellule (SZENT-GYÖRGYI¹).

La protéine de structure du rein (rénosine) constitue 30% environ des protéines totales ; elle ressemble à divers égards à la myosine du muscle, mais s'en distingue nettement en deux endroits : la présence de P dans la rénosine et le signe de la biréfringence d'écoulement : alors qu'elle est positive pour la myosine, comme dans toutes les protéines fibreuses connues d'ailleurs, elle est négative dans le cas de la rénosine (BANGA et SZENT-GYÖRGYI²).

Dans un travail antérieur³, nous avons montré que les préparations de rénosine contiennent en abondance des granules de nature ribonucléoprotéique à localisation cytoplasmique (microsomes de CLAUDE^{4,5}) ; sous l'influence de l'Edsall-urée, ces granules subissent d'ailleurs des altérations et perdent leur acide ribonucléique ; celui-ci se retrouve en partie dans la rénosine purifiée. Ces observations paraissent, à première vue, favorable à l'idée de la localisation cytoplasmique des protéines de structure ; mais il importe d'ajouter que les granules ne sont en rien responsables des propriétés caractéristiques des protéines de structure : on peut en effet les éliminer par ultracentrifugation

(BANGA et SZENT-GYÖRGYI², BRACHET et JEENER³) sans modifier la biréfringence d'écoulement de signe négatif, la viscosité et la thixotropie des solutions.

Par la suite, l'un de nous (R. JEENER⁶) a entrepris une étude des propriétés physiques et chimiques de la thymonucléohistone extraite des noyaux des globules rouges d'Oiseaux ; les résultats qu'il a obtenus et qui feront l'objet d'un travail à part se rapprochent fortement de ceux publiés aux Etats-Unis par CARTER et HALL⁷, HALL⁸, MIRSKY et POLLISTER^{9, 10, 11}, HOERR¹², LAZAROW¹³, CLAUDE⁵ et BENSLEY¹⁴. Les intéressantes publications des travailleurs américains ne nous étaient d'ailleurs pas connues au moment où nous avons effectué les recherches qui font l'objet du présent travail et c'est pourquoi nous n'y avons pas fait allusion dans une note préliminaire¹⁵.

La thymonucléohistone s'obtient en traitant des globules rouges d'oiseaux hémolysés et lavés par des solutions salines (NaCl, KCl) concentrées ; on peut la précipiter sous forme de fibres par dilution. Les extraits des noyaux d'érythrocytes sont fortement filants et ils présentent une viscosité de structure élevée ; en outre, ces solutions de thymonucléohistone montrent une intense biréfringence d'écoulement dans l'appareil de GERENDAS¹⁶, utilisé par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² ; cette biréfringence est de signe négatif et elle est due à l'acide thymonucléique sous forme hautement polymérisée (CASPERSSON, SIGNER et HAMMARSTEN¹⁷, ASTBURY et BELL¹⁸, GREENSTEIN et JENRETTE¹⁹, GREENSTEIN²⁰, JEENER⁶.)

On voit que le parallélisme entre les propriétés physiques et chimiques de la thymonucléohistone d'une part, des protéines de structure de l'autre est réellement impressionnant ; dans ces conditions, la localisation cytoplasmique de ces dernières se voyait sérieusement remise en question et c'est afin de savoir s'il y a oui ou non identité entre les deux types de substances que nous avons entrepris les expériences suivantes.

2. RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

a. *Observations cytologiques.* Nous avons tout d'abord essayé de suivre les effets de l'urée-Edsall sur des cellules placées sous le microscope ordinaire ou polarisant. L'épiderme de jeunes larves d'urodèles, formé d'une lame mince de cellules volumineuses, constitue un matériel très favorable pour de telles études.

Lorsqu'on ajoute un peu d'Edsall-urée à un tel lambeau d'épiderme, on n'observe, en 5 à 10 minutes, qu'un gonflement des noyaux ; mais si on écrase la préparation tout en déplaçant latéralement la lamelle, on constate que de nombreux noyaux s'étirent fortement au point de former de longues fibres ; celles-ci présentent une belle biréfringence négative et elles sont électivement colorables par un colorant basique tel que le vert de méthyle. De telles préparations ne présentent pas d'autres éléments fortement biréfringents que ces fibres d'origine nucléaire.

Des observations identiques peuvent être faites sur de petits caillots de sang de grenouille placés sur des lames porte-objets ; en écrasant les cellules et en les étirant, après avoir fait agir l'Edsall-urée pendant quelques minutes, on voit se former des fibres à biréfringence négative ; elles sont seules à se colorer par le bleu de toluidine ou par la réaction de Feulgen. On trouve aisément, sur une même préparation, tous les intermédiaires entre des noyaux intacts, de forme ovale, et de longs fils Feulgen positifs.

On voit donc que les noyaux soumis à l'Edsall-urée et écrasés se transforment en partie en fibres de nucléohistone, au lieu de rester intacts, comme le pensait SZENT-

GYÖRGYI¹ ; en outre, on ne voit pas apparaître de fibres à biréfringence négative dans le cytoplasme.

b. *Action de la thymonucléo-dépolymérase sur la rénosine.* On sait qu'il existe un enzyme capable de dépolymériser l'acide thymonucléique natif en scindant la macromolécule fibreuse en oligonucléotides (thymonucléodépolymérase ou des-ribonucléase). Lorsqu'on fait agir ce ferment sur de l'acide thymonucléique ou de la thymonucléohistone, on assiste à une disparition rapide de la biréfringence d'écoulement et à une chute de la viscosité de structure (GREENSTEIN et JENRETTE¹⁹, GREENSTEIN²⁰, JEENER⁶)

Il nous a paru dès lors opportun d'examiner les effets éventuels de cette dépolymérase sur une protéine de structure, telle que la rénosine. Celle-ci fut préparée en extrayant les reins d'un lapin avec 10 volumes d'Edsall-urée pendant un quart d'heure. Après centrifugation pendant 20 minutes à 3.000 tours, on obtint un liquide surnageant très filant, visqueux et pourvu d'une forte biréfringence d'écoulement dans l'appareil de GERENDAS¹⁶. Cette biréfringence s'accroissait encore par addition à l'extrait de taurocholate de Na à raison de 2%. En plaçant l'appareil de GERENDAS sur la platine d'un microscope polarisant, il fut aisé de reconnaître que la biréfringence d'écoulement était bien de signe négatif.

La thymonucléo-dépolymérase fut préparée à partir de pancréas frais par la méthode de FISCHER et al²¹ ; elle fut ajoutée à la solution de rénosine à raison de 10 mg/cc environ et activée par l'addition d'un cristal de $MgCl_2$. En quelques instants, la viscosité et le caractère filant de la solution de rénosine disparurent ; quant à la biréfringence d'écoulement, elle fut entièrement abolie, même après éclaircissement de l'extrait au moyen de taurocholate.

On voit donc que l'addition de thymonucléo-dépolymérase fait disparaître rapidement et complètement les propriétés physiques caractéristiques de la rénosine ; cette constatation vient naturellement renforcer l'idée que l'élément actif dans les protéines de structure est l'acide thymonucléique hautement polymérisé.

c. *Recherche de l'acide thymonucléique dans la rénosine.* L'action de la thymonucléo-dépolymérase ne s'explique que si la rénosine contient réellement de l'acide thymonucléique. Afin de tirer la chose au clair, une partie de la rénosine préparée pour l'expérience précédente fut purifiée par précipitation en diluant et redissolution répétées. Le précipité fut finalement lavé de façon prolongée à l'alcool et à l'éther, puis séché. La poudre ainsi obtenue fut analysée au point de vue de sa teneur en P (méthode de BERENBLUM et CHAIN²²) et en acide thymonucléique (technique de DISCHE²³ légèrement modifiée).

La teneur en P du précipité était de 0,47%, chiffre voisin des valeurs les plus basses trouvées par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² pour différentes protéines de structure. La réaction de DISCHE était fortement positive et son intensité correspondait à une teneur en acide thymonucléique de 2,2% pour la poudre sèche. On voit que près de la moitié du phosphore présent dans la préparation s'y trouvait sous forme d'acide thymonucléique. Il est à noter qu'au cours des précipitations successives, nous avons observé une diminution progressive de la viscosité et du caractère filant de la solution ; il se pourrait donc qu'il se produise des pertes ou une dépolymérisation de cet acide au cours de la purification.

Quoiqu'il en soit, la présence d'acide thymonucléique en quantités appréciables dans la rénosine suffit à démontrer que cette protéine de structure est en partie d'origine nucléaire : il est en effet bien établi que l'acide thymonucléique se rencontre exclusivement dans la chromatine.

d. *Protéines de structure des globules rouges, des levures et des œufs.* Si les propriétés physiques caractéristiques des protéines de structure sont dues à leur teneur en thymonucléohistone, il faut s'attendre à ce qu'elles fassent défaut dans les cellules anucléées ou très pauvres en chromatine.

Effectivement, en traitant des globules rouges de lapin, lavés dans du NaCl isotonique à plusieurs reprises, par de l'Edsall-urée, on n'obtient pas de solution filante et visqueuse ; il en va de même lorsqu'on cherche à extraire les protéines des stromas de ces globules rouges, préalablement hémolysés par congélation et décongélation brusques par de l'Edsall-urée. Dans ce dernier cas, nous nous sommes assurés que l'extrait est également dépourvu de biréfringence d'écoulement.

Au contraire, les hématies nucléées de l'oie se comportent de façon toute différente : après lavage, hémolyse et traitement par l'Edsall-urée, on obtient un extrait fortement visqueux et filant, présentant une intense biréfringence d'écoulement. Cet extrait se comporte en tous points comme la thymonucléohistone isolée des mêmes cellules.

Le contraste entre les hématies nucléées et anucléées est donc extraordinairement frappant. Des résultats comparables aux nôtres ont d'ailleurs été obtenus par LAZAROW¹³ : traitant des globules rouges nucléés et anucléés par du NaCl 10%, il a constaté que seuls les premiers fournissent un extrait riche en protéines fibreuses.

Les levures, dont le noyau est extrêmement petit, se comportent tout à fait comme les globules rouges des Mammifères : après broyage des cellules avec un volume égal de sable et extraction avec 5 à 10 volumes d'Edsall-urée, on obtient un liquide très trouble, fourmillant de microsomes, mais dépourvu de biréfringence d'écoulement (même après éclaircissement par le taurocholate) et de tout caractère filant.

Enfin, les résultats obtenus précédemment par BRACHET et CHANTRENNE²⁴ sur les œufs de grenouille en voie de développement sont aussi en parfait accord avec ces données : les œufs vierges ou fraîchement fécondés, qui n'ont qu'un petit noyau, donnent des extraits troubles, mais dépourvus de caractère filant et de biréfringence d'écoulement ; les jeunes têtards, au contraire, contiennent une protéine de structure typique. Or le développement embryonnaire s'accompagne précisément d'une multiplication intense des noyaux et d'une synthèse marquée d'acide thymonucléique ; la réalité de cette synthèse a du reste été démontrée chez la grenouille par l'un de nous²⁴. La néoformation de protéines de structure au cours du développement ne doit donc pas être attribuée, comme BRACHET et CHANTRENNE²⁵ l'avaient d'abord pensé, à une synthèse de cytoplasme aux dépens de deutoplasme : elle est en réalité la conséquence de la multiplication nucléaire. Ce même point de vue ressort aussi des observations de MIRSKY et POLLISTER^{10, 11} : l'œuf de carpe, qui n'a qu'un très petit noyau, ne contient presque pas de protéines fibreuses solubles dans NaCl concentré, alors que les spermatozoïdes en renferment en abondance.

Notons enfin, dans le même ordre d'idées, que les tissus dont les protéines de structure présentent la plus forte biréfringence d'écoulement sont, d'après BANGA et SZENT-GYÖRGYI², les embryons de souris, les ganglions lymphatiques et les sarcomes du rat : or ce sont précisément des organes particulièrement riches en noyaux.

e. *Comparaison entre les propriétés des protéines de structure et celles de la thymonucléohistone.*

Nous avons déjà vu qu'il existe un parallélisme étroit entre ces deux substances à de nombreux égards : viscosité, biréfringence d'écoulement de signe négatif, présence

d'acide thymonucléique, comportement vis-à-vis de la thymonucléo-dépolymérase.

Mais l'analogie peut être poussée encore plus loin : c'est ainsi que l'un de nous⁶ a montré que la thymonucléohistone forme des fils lorsqu'on l'étire dans l'eau distillée ; ces fils se rétractent fortement en présence de petites quantités d'ions Ca^{++} . Ces particularités se retrouvent intégralement lorsqu'on substitue la rénosine à la thymonucléohistone.

Le comportement de la rénosine vis-à-vis des acides, des alcalis de l'alcool et des sels biliaires a été étudié par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² ; nous avons retrouvé des réactions quasi-identiques pour la thymonucléohistone des hématies nucléées d'Oiseaux. C'est ainsi que, dans les deux cas, on obtient un précipité partiellement soluble à chaud, par HCl N ; le liquide obtenu après neutralisation a perdu sa biréfringence.

Le carbonate de $\text{Na } 0,5\text{M}$ et le taurocholate de $\text{Na } 2\%$ intensifient au contraire la biréfringence, dans le cas de la thymonucléohistone comme dans celui de la rénosine. L'alcool à 30% diminue fortement la biréfringence d'écoulement de la thymonucléohistone et abolit celle, d'ailleurs moins marquée, de la rénosine. La seule différence réelle que nous ayons pu observer entre ces deux substances concerne l'effet de la soude caustique : alors que la rénosine reste biréfringente dans $\text{NaOH } 2$ à 5% , la thymonucléohistone cesse déjà de l'être dans $\text{NaOH } 0,3$ à $0,4\%$. La raison d'être de cette divergence n'a pu être encore élucidée, mais il faut remarquer que la thymonucléohistone constituait un produit beaucoup plus pur que la rénosine.

3. DISCUSSION DES RÉSULTATS

Il résulte clairement de nos observations que les protéines de structure correspondent en réalité à un mélange complexe de constituants d'origine cytoplasmique (notamment microsomes ribonucléoprotéiques, en partie altérés du reste) et nucléaire (thymonucléohistone). La présence de composants nucléaires est bien établie par les dosages d'acide thymonucléique et les observations cytologiques sur la transformation des noyaux en fibres nucléoprotéiques dans l'Edsall-urée. La disparition rapide des propriétés physiques caractéristiques des protéines de structure lorsqu'on les traite par un enzyme dépolymérisant l'acide thymonucléique et le fait que les cellules pauvres en chromatine ne donnent pas d'extraits visqueux et biréfringents à l'écoulement démontrent que c'est à l'acide thymonucléique hautement polymérisé qu'il convient d'attribuer le rôle prépondérant. Pareille conclusion cadre d'ailleurs bien avec la disparition spontanée à la longue de la biréfringence d'écoulement de la rénosine (BANGA et SZENT-GYÖRGYI²) : la thymonucléo-dépolymérase est en effet un ferment très répandu, présent dans le sérum et la plupart des organes (GREENSTEIN et JENRETTE¹⁹). On comprend aussi que BANGA et SZENT-GYÖRGYI² n'aient pu obtenir de protéine de structure à partir du pancréas : cet organe est en effet extraordinairement riche en thymonucléo-dépolymérase et on conçoit que l'acide thymonucléique présent dans l'extrait à l'Edsall-urée du pancréas soit très rapidement dépolymérisé.

Il existe visiblement une analogie marquée entre les protéines de structure de SZENT-GYÖRGYI et la „plasmosine” de BENSLEY²⁶ : cet auteur a obtenu, en extrayant des tranches de foie congelé et desséché par du $\text{NaCl } 10\%$, des solutions visqueuses et fortement biréfringentes ; tout comme la rénosine et la thymonucléohistone, la plasmosine forme des précipités fibreux dans l'eau distillée. BENSLEY a constaté que les solutions salines qu'il utilisait dissolvent plus rapidement le cytoplasme que les noyaux

et c'est pourquoi il croit à la localisation cytoplasmique de la plasmosine. Mais cet avis n'est pas partagé par MIRSKY et POLLISTER^{9, 10, 11} qui ont pu extraire aisément par NaCl concentré la chromatine ; comme ils constatent que la plasmosine contient de l'acide thymonucléique et que le rendement en plasmosine est d'autant plus élevé qu'on s'adresse à un organe plus riche en noyaux, MIRSKY et POLLISTER^{9, 10, 11} aboutissent à la conclusion que la plasmosine n'est autre chose que de la thymonucléohistone.

Les conclusions de MIRSKY et POLLISTER^{9, 10, 11} ne sont toutefois pas acceptées sans discussion par l'école de BENSLEY : si LAZAROW¹³ admet que la plasmosine est un thymonucléoprotéide qu'on ne peut obtenir qu'aux dépens de cellules nucléées, HOERR¹² maintient qu'il s'agit d'une substance cytoplasmique : HOERR a en effet obtenu de très petites quantités de plasmosine à partir de débris cellulaires de foie légèrement malaxé, débris apparemment dépourvus de constituants nucléaires. HOERR¹³ reconnaît toutefois que le contenu des noyaux est partiellement soluble dans NaCl 10%.

Il serait intéressant de rechercher si la plasmosine isolée par HOERR est réellement dépourvue d'acide thymonucléique et si elle conserve ses propriétés physiques après un traitement par une préparation très active de thymonucléo-dépolymérase. Tant que de tels contrôles n'auront pas été effectués, les probabilités resteront que la plasmosine, comme les protéines de structure, est un mélange de constituants nucléaires et cytoplasmiques qui doit ses propriétés physiques spéciales à la présence de thymonucléohistone.

Terminons par quelques remarques au sujet des relations possibles entre les protéines de structure, la thymonucléohistone et les protéines allongées isolées par LAWRENCE, J. NEEDHAM et SHEN²⁷ à partir de neurulas d'Amphibiens. Les auteurs anglais ont trouvé à ce stade des protéines, appartenant aux fractions „globulines” et „myosine”, dont les molécules ont une forme allongée et qui pourraient jouer un rôle dans la formation de la gouttière neurale : l'étirement de certaines cellules ectodermiques à ce moment pourrait être dû à une augmentation du nombre ou à un allongement de ces molécules protéiques. On peut se demander si certaines des protéines fibreuses étudiées par LAWRENCE *et al*²⁷, en particulier celles de la fraction „myosine”, ne sont pas aussi contaminées par de la thymonucléohistone. Nous avons constaté en effet que les solutions salines utilisées couramment pour extraire la myosine du muscle dissolvent le vitellus des œufs à tous les stades ; elles dissolvent, en outre, de la thymonucléohistone au moment où les noyaux commencent à devenir nombreux (gastrulas, neurulas) ; les extraits, à ce moment, contiennent de l'acide thymonucléique et deviennent beaucoup plus visqueux. Il se pourrait donc qu'une partie importante des protéines auxquelles LAWRENCE *et al*²⁷ attribuent un rôle morphogénétique soient en réalité d'origine nucléaire, alors que c'est au revêtement superficiel des cellules que paraît bien être dévolue la fonction d'assurer les mouvements de gastrulation et de neurulation (HOLT-FRETER^{28, 29, 30}).

RÉSUMÉ

1. Les propriétés physiques et chimiques des protéines de structure de SZENT-GYÖRGYI et celles de la thymonucléohistone sont extrêmement semblables ; la rénosine contient plus de 2% d'acide thymonucléique.

2. Lorsque des cellules sont traitées par l'Edsall-urée et écrasées, les noyaux peuvent former des fibres biréfringentes de thymonucléohistone.

3. La viscosité et la biréfringence d'écoulement des protéines de structure disparaissent rapidement lorsqu'on les traite par la thymonucléodépolymérase.

4. Les cellules anucléées ou pourvues d'un très petit noyau ne contiennent pas de protéines de structure en quantités appréciables.

5. Il faut en conclure que les protéines de structure sont des mélanges de constituants nucléaires et cytoplasmiques, qui doivent leurs propriétés physiques spécifiques à un composé nucléaire, la thymonucléohistone.

6. Les rapports entre les protéines de structure, la thymonucléohistone, la plasmosine de Bensley et les protéines allongées de la neurula d'Amphibiens (LAWRENCE, NEEDHAM et SHEN) sont brièvement discutés.

SUMMARY

1. The physical and chemical properties of both SZENT-GYÖRGYI's structure proteins and thymonucleohistone are very much alike ; renosine contains more than 2% thymonucleic acid.

2. When cells are treated with Edsall-urea solution and crushed, the nuclei may elongate into birefringent fibers of thymonucleohistone.

3. The viscosity and flow birefringence of renosine show a swift and sharp decrease when thymonucleo-depolymerase is added to the protein.

4. Anucleated cells or cells provided with a very small nucleus fail to give any appreciable amount of structure proteins.

5. The conclusion is drawn that structure proteins are a mixture of cytoplasmic and nuclear components, their specific physical properties being due to a nuclear constituent, thymonucleohistone.

6. The relationship between structure proteins, thymonucleohistone, Bensley's plasmosine and the anisometric proteins of the Amphibian neurula (LAWRENCE, NEEDHAM and SHEN) is briefly discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der SZENT-GYÖRGYI'scher Strukturproteine und die des Thymonucleohistons zeigen eine ausserordentlich grosse Aehnlichkeit ; Renosin enthält mehr als 2% Thymonucleinsäure.

2. Wenn Zellen mit Edsall-Harnstofflösung behandelt und dann zermahlt werden, so können die Kerne doppelbrechende Thymonucleohistonfasern bilden.

3. Die Viskosität und die Doppelbrechung der Struktur-Proteine verschwinden schnell, wenn man sie mit Thymonucleodepolymerase behandelt.

4. Die kernlosen Zellen bzw. die Zellen mit einem sehr kleinen Kern enthalten keine bedeutenden Mengen von Struktur-Proteinen.

5. Hieraus folgt, dass Struktur-Proteine Mischungen von Kern- und Cytoplasmabestandteilen sind, welche ihre spezifischen physikalischen Eigenschaften einem Kernbestandteil, dem Thymonucleohiston, verdanken.

6. Die Beziehungen zwischen den Struktur-Proteinen, Thymonucleohiston, dem Plasmosin von Bensley und den anisometrischen Proteinen der Amphibien-Neurula (LAWRENCE, NEEDHAM und SHEN) werden kurz erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. SZENT-GYÖRGYI, *Enzymol.*, **9** (1942) 98.
- ² I. BANGA et A. SZENT-GYÖRGYI, *Enzymol.*, **9** (1940) 111.
- ³ J. BRACHET et R. JEENER, *Enzymol.*, **13** (1944) 196.
- ⁴ A. CLAUDE, *Science*, **91** (1940) 77.
- ⁵ A. CLAUDE, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 111.
- ⁶ R. JEENER, *C. R. Soc. Biol.*, **138** (1944) 1050.
- ⁷ R. O. CARTER et J. L. HALL, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63** (1941) 794.
- ⁸ J. L. HALL, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63** (1941) 1960.
- ⁹ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **28** (1942) 344.
- ¹⁰ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, **5** (1943) 190.
- ¹¹ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 247.
- ¹² N. L. HOERR, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 185.

- ¹³ A. LAZAROW, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 9.
¹⁴ R. R. BENSLEY, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 323.
¹⁵ J. BRACHET et R. JEENER, *C.R. Soc. Biol.*, sous presse.
¹⁶ M. GERENDAS, *Enzymol.*, **9** (1940) 123.
¹⁷ R. SIGNER, T. CASPERSSON et E. HAMMARSTEN, *Nature*, **141** (1938) 122.
¹⁸ W. T. ASTBURY et F. O. BELL, *Cold Spring Harbor Symp.*, **6** (1938) 109.
¹⁹ J. P. GREENSTEIN et W. W. JENRETTE, *Cold Spring Harbor Symp.*, **9** (1941) 236.
²⁰ J. P. GREENSTEIN, *Adv. Protein Chem.*, **1** (1944) 210.
²¹ F. G. FISCHER, I. BÜTTGER et H. LEHMANN-ECHTERNACHT, *Z. Physiol. Chem.*, **271** (1941) 246.
²² I. BERENBLUM et E. CHAIN, *Bioch. J.*, **32** (1938) 286.
²³ Z. DISCHE, *Mikrochemie*, **8** (1930) 4.
²⁴ J. BRACHET, *Arch. Biol.*, **48** (1937) 529.
²⁵ J. BRACHET et H. CHANTRENNE, *Acta Biol. belg.*, **2** (1942) 451.
²⁶ R. R. BENSLEY, *Anat. Rec.*, **72** (1938) 351.
²⁷ A. LAWRENCE, J. NEEDHAM et S. C. SHEN, *Nature*, **2** (1940) 104.
²⁸ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **93** (1943) 251.
²⁹ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **94** (1943) 261.
³⁰ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **95** (1944) 171.

Reçu le 26 mars 1946.