

SUR L'INACTIVATION
DE L'URÉASE PAR L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE

par

P. DESNUELLE ET M. ROVERY

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

Dans un récent travail, HELLERMAN¹ a montré qu'une subunité d'uréase (21 300 g) conserve intégralement son activité en présence d'une molécule de p-chloromercuri-benzoate; une deuxième molécule, par contre, provoque une inactivation presque totale. Mais, si l'uréase a été préalablement traitée par la porphyrindine diluée², l'inactivation se produit dès que l'on a ajouté la première molécule du dérivé mercurique. Dans les deux cas, la cystéine permet de revenir à l'enzyme actif.

L'auteur conclut de ces observations que, parmi les 4 à 5 groupes thiol possédés par la subunité d'uréase, il faut distinguer:

1. Un groupe (a) très "réactif" dont la présence n'est pas indispensable à l'activité enzymatique-c'est lui qui donne la coloration caractéristique avec le nitroprussiate³-est oxydé par la porphyrindine diluée et se combine à la première molécule de p-chloromercuri-benzoate.

2. Un groupe (b) de "réactivité" moindre dont le blocage provoque l'inactivation.

3. 2 à 3 autres groupes encore moins "réactifs" dont l'étude précise n'est pas poursuivie.

Le fait que l'activité de l'uréase n'est pas sous la dépendance de son groupe thiol le plus "réactif" est d'ailleurs présumé depuis longtemps. L'enzyme, en effet, n'est pas inactivé par une oxydation douce (ferricyanure⁴, porphyrindine et iodobenzoate dilués⁵) ni par des agents d'alkylation peu puissants (iodoacétate⁶) tandis qu'il l'est bien par une oxydation plus poussée (porphyrindine et iodobenzoate concentrés⁶) ou par des agents d'alkylation relativement énergiques (iodoacétamide⁶). HELLERMAN, en particulier, avait déjà signalé⁵ l'obtention d'une préparation uréasique qui, traitée par la porphyrindine diluée jusqu'à disparition du test au nitroprussiate, était encore pleinement active.

Le principal intérêt de ce travail est donc qu'il attribue un rôle déterminant, non à l'ensemble des groupes thiol "non-réactifs" de l'uréase, mais à l'un d'entre eux seulement (groupe (b)). Cette conclusion est basée essentiellement sur le fait que l'inactivation, à partir de l'instant où elle commence, devient totale par addition d'une molécule exactement de p-chloromercuri-benzoate.

Remarquons toutefois qu'une telle conclusion n'est valable que si le p-chloromercuri-benzoate se combine stoechiométriquement aux -SH (b). Or, les observations d'ANSON⁷, quoique de nature assez indirecte, suggèrent que le dérivé mercurique s'unit mal aux -SH "non-réactifs" des protéines. Il n'est donc pas certain qu'au moment où l'activité uréolytique devient nulle, les -SH (b) soient complètement bloqués. Si ce

doute s'avérait justifié, d'ailleurs, la notion même de -SH (b) perdrait beaucoup de son intérêt et les expériences d'HELLERMAN montreraient simplement que le p-chloromercuribenzoate inactive l'enzyme quand il commence à atteindre ses -SH "non-réactifs".

Au lieu de se fier simplement aux quantités d'inhibiteur mises en œuvre, il apparaît ainsi beaucoup plus sûr de doser directement les groupes thiol de la protéine fermentaire aux divers stades de son inactivation. C'est d'ailleurs ce qu'a fait BAILEY⁸ dans une étude similaire sur la myosine.

Nous avons donc repris le travail d'HELLERMAN et, au moment de choisir l'inhibiteur, nous nous sommes laissés guider par les considérations suivantes:

1. Il est désirable que la substance inhibitrice, tout en étant bien spécifique des -SH, possède une affinité nettement plus grande pour les -SH "réactifs" que pour les "non-réactifs". Les blocages des deux formes sont alors largement échelonnés dans le temps et leurs conséquences respectives sont aisément observables.

2. La présence de cette substance ne doit pas interdire la détermination quantitative des groupes restés libres.

Le cétène et l'isocyanate de phényle, dont nous avons récemment étudié l'action sur les groupes thiol protéiques⁹, semblent satisfaire à ces deux conditions. Le cétène, toutefois, s'est révélé d'un emploi difficile, car il risque d'entraîner des inactivations non-spécifiques par l'acidité qu'il développe et la nécessité où il met de dialyser les préparations. Nous verrons tout-à-l'heure, de plus, qu'il s'unit moins bien aux -SH "réactifs" que l'isocyanate. C'est donc cette dernière substance seulement qu'en fin de compte nous avons utilisée.

TECHNIQUES UTILISÉES

I. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ URÉOLYTIQUE

La conduite du test, la détermination colorimétrique de l'ammoniaque libérée et le dosage de l'azote protéique dans les solutions uréasiques ont été réalisés selon SUMNER¹⁰. Notons simplement que les préparations très impures d'uréase donnent naissance à un trouble au moment où l'on ajoute le réactif de NESSLER. Le milieu a donc été systématiquement défilé à l'acide trichloracétique avant dosage¹¹. D'autre part, une courbe de référence (photocolorimètre, cuve de 1 cm, filtre Wratten No 47) montre que, dans nos conditions expérimentales, la loi de BEER est parfaitement satisfaite entre 350 et 650 μg de N-NH₃.

Nous appelons, comme de coutume, unité d'uréase (U.) la quantité d'enzyme qui, à 20°, à pH = 7.0 et en présence d'un fort excès d'urée, met en liberté 1 mg de N-NH₃ pendant les 5 premières minutes. Ayant mesuré, d'autre part, la teneur des préparations en azote protéique (N.P.), nous pouvons déterminer leur pureté (U.g.) qui, par convention, est le nombre d'unités par g de protéine (ou 0.17 g de N.P.).

II. PRÉPARATION DE L'URÉASE

Deux techniques, d'ailleurs analogues, ont été indiquées jusqu'ici pour la préparation de l'uréase pure: D'une part, la technique initiale de SUMNER¹⁰ qui prévoit la cristallisation directe de l'enzyme à partir d'un extrait hydroacétone de farine de *Canavalia ensiformis*, suivie d'une recristallisation éventuelle selon DOUNCE¹². D'autre part, celle préconisée par HELLERMAN¹ qui consiste à précipiter tout d'abord, à l'état très impur, la quasi-totalité de l'uréase contenue dans l'extrait précédent, puis à purifier l'enzyme par dissolutions fractionnées et cristallisation.

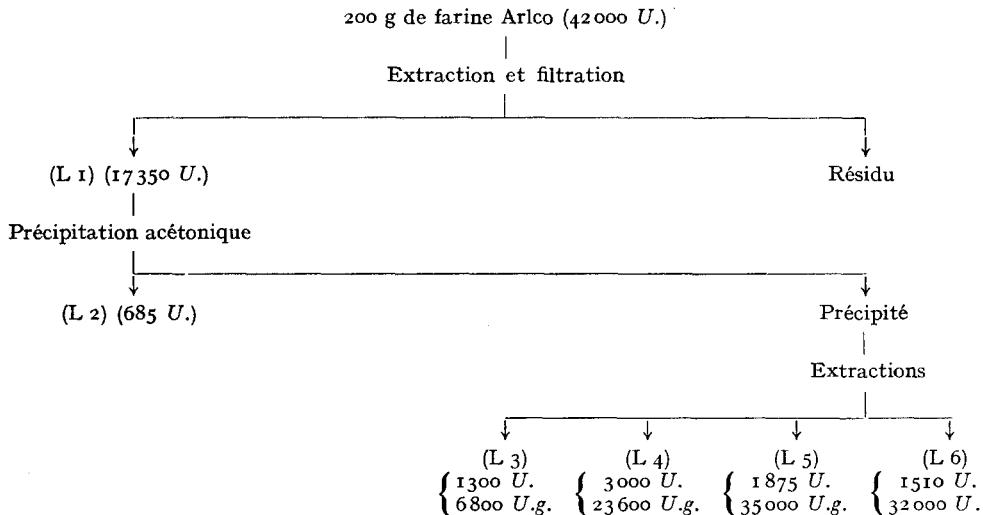
Après de nombreuses cristallisations, la pureté de l'uréase semble pouvoir être portée à 130000 U.g. et c'est ce chiffre qui servira de base à nos calculs ultérieurs. HELLERMAN signale être arrivé à une pureté de 105000 U.g., mais l'ensemble de son travail paraît avoir été effectué sur des préparations dont la pureté était de 75000 U.g. et au-dessous.

La méthode de cristallisation directe ne donnant pas de bons résultats avec notre échantillon de *Canavalia*^{*}, nous avons suivi la technique d'HELLERMAN qui semble d'ailleurs être mieux adaptée à la préparation de quantités importantes d'enzyme. Voici notre mode opératoire (Schéma I).

200 g de farine Arlco sont triturés au mortier avec 1 l d'acétone à 31.5 %^{**} (température 22° C). La suspension est essorée sur filtre à plis, puis le résidu est séché aussi bien que possible sur Büchner. Les liquides sont réunis et additionnés d'acétone pure jusqu'à ce que la concentration du solvant (vol/vol) atteigne 42 %. Après une nuit passée à la glacière, le mélange est centrifugé rapidement. Le liquide surnageant (L 2) ne contient presque plus d'uréase. Le précipité est lavé par 1.6 ml d'eau glacée que l'on sépare immédiatement par centrifugation. On obtient ainsi un liquide (L 3) actif, mais très impur. Il n'est donc pas utilisé. Le culot de centrifugation est ensuite traité par 2.5 ml d'eau et ce mélange est laissé 5 h à la glacière où il est fréquemment agité. Au bout de ce temps, il est centrifugé au froid jusqu'à obtention d'un liquide (L 4) clair (4 h environ). Le résidu solide est encore extrait 2 fois à l'eau dans les mêmes conditions (liquides (L 5) et (L 6)). Ce sont ces derniers liquides que nous avons acylés.

SCHEMA I

PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'URÉASE



Les chiffres du schéma I font apparaître que les liquides (L 4), (L 5) et (L 6) contiennent, outre de l'uréase, des quantités encore notables de protéines étrangères. Toutefois, comme nous le verrons par la suite, ces protéines ne sont pas gênantes car elles ne possèdent aucun groupe thiol "réactif" ou "non-réactif". Les liquides précédents ont donc pu être utilisés directement sans purification supplémentaire.

III. DOSAGE DES GROUPES THIOL PROTÉIQUES

Dans la plupart des cas, nous avons dosé les -SH totaux de la protéine fermentaire. L'oxydation au ferricyanure en présence de 1.75% de dodécylsulfate a alors été utilisée

* Nous sommes heureux de remercier ici très vivement le Prof. SUMNER de l'envoi généreux d'un échantillon de farine Arlco avec lequel une grande partie de ce travail a été effectuée.

** L'acétone est préalablement distillée sur chlorure de Ca, puis sur chaux.

(Pour plus de détails expérimentaux, voir⁹). Quant aux -SH "réactifs" de la protéine native, ils ont été déterminés également par le ferricyanure, mais en l'absence de détergent. Avant de procéder au dosage colorimétrique, nous avons alors déféréqué le milieu par l'acide tungstique⁹.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

I. CARACTÉRISTIQUES DES PRÉPARATIONS URÉASIQUES UTILISÉES

Les préparations d'uréase obtenues par la technique qui vient d'être décrite possèdent, nous l'avons vu, une pureté comprise entre 32 000 et 35 000 *U.g.* Leur teneur réelle en enzyme est calculée en admettant que 1 g d'uréase pure développe une activité de 130 000 *U.* Les -SH "réactifs" et totaux ont été trouvés correspondre, respectivement, à 0.58 et 2.75 g de cystéine pour 100 g d'enzyme.

Le chiffre de 0.58% semble en bon accord avec celui des autres auteurs, puisqu'il indique la présence de 1.02 groupe thiol dans 21 300 g d'enzyme. Il est cependant trop fort, car, par suite sans doute d'une mauvaise précipitation tungstique de l'uréase ou de l'une des protéines qui l'accompagnent, la liqueur soumise au dosage colorimétrique présente un trouble assez notable. Nous pensons donc que nos préparations enzymatiques ont subi une légère autoxydation qui, d'ailleurs, n'influe pas sur leur activité. Si cette hypothèse est exacte, il conviendrait alors de relever quelque peu le chiffre de 2.75% trouvé pour les -SH totaux. Une teneur initiale de 2.85%, correspondant à 5 -SH par subunité d'uréase, a donc été adoptée.

II. ACYLATIONS PAR DES QUANTITÉS CONNUES D'ISOCYANATE ET DE CÉTÈNE

Jusqu'ici, les protéines ont été généralement traitées par un très gros excès de cétène ou d'isocyanate de phényle et les progrès de l'acylation ont été suivis en fonction du temps. Cette manière de faire était d'ailleurs justifiée, puisque les groupes protéiques étudiés (-NH₂, -OH phénoliques) se combinent assez lentement à l'agent acylant pour que celui-ci soit en majeure partie hydrolysé. L'acylation des -SH "réactifs" se présente cependant sous un jour différent, puisqu'elle est presqu'instantanée. Il n'est donc pas interdit de chercher à la placer sur le plan stoechiométrique, c'est-à-dire à connaître le nombre de molécules de l'agent qu'il faut mettre en œuvre pour bloquer 1 -SH "réactif". Une telle étude nous a paru devoir faciliter considérablement l'approche expérimentale de notre principal objectif. Elle a été effectuée sur les -SH "réactifs" de l'albumine d'œuf dénaturée.

Un poids connu d'isocyanate est dissous dans l'acétone pure et parfaitement anhydre, puis cette solution est ajoutée, lentement et en agitant bien, à une dispersion d'albumine dans le dodécylsulfate à 1.75%. Quant au cétène, on le fait barboter dans l'éther anhydre et privé de peroxydes par le sulfate ferreux. La teneur en cétène est déterminée sur une partie aliquote que l'on fait réagir soit avec un excès de soude M/100, soit avec une solution éthérée d'aniline. Dans le premier cas, on titre en retour par SO₄H₂ M/100 en présence de phtaléine du phénol. Dans le second, on lave l'acétanilide par l'acide acétique dilué, on le sèche et on le pèse*. La solution de cétène qui, rappelons-le, doit-être

* On tient compte de la solubilité de l'acétanilide en partant d'un mélange connu de cette substance et d'aniline que l'on traite par les mêmes quantités d'éther et d'acide acétique que précédemment.

absolument dépourvue de peroxydes, est alors ajoutée à la dispersion protéique comme il est indiqué plus haut. Le blocage des -SH est suivi par la technique habituelle⁹. Un essai-témoin nous a montré qu'il n'était pas nécessaire de conduire l'acylation sous azote car les -SH, même "réactifs", ne s'autoxydent pas sensiblement pendant le traitement. Les résultats expérimentaux sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

ACYLATION, PAR DES QUANTITÉS CONNUES DE CÉTÈNE OU D'ISOCYANATE, DES -SH "RÉACTIFS"
DE L'ALBUMINE DÉNATURÉE

Albumine mise en jeu (mg) (1)	Milli-équiv. de -SH "réactifs" (2)	Agent acylant		Rapport (4)/(2) (5)	Acylation (%) (6)
		Nature (3)	Millimol utilisées (4)		
140	0.0116	Isocyanate	0.0116	1.00	76
140	0.0116	"	0.0134	1.16	100
140	0.0116	"	0.0232	2.00	100
71	0.0058	Cétène	0.0118	2.04	19
56	0.0046	"	0.0207	4.5	31
140	0.0116	"	0.132	11.4	52
89	0.0074	"	0.230	31.0	64

L'examen des chiffres du Tableau I montre clairement que les -SH "réactifs" de l'albumine sont totalement bloqués par l'addition de 1.16 fois la quantité théorique d'isocyanate. Par contre, plus de 30 fois la quantité théorique de cétène ne provoque que 64% d'acétylation seulement. Cette différence provient-elle d'une affinité plus grande du cétène pour les molécules d'eau ou trouve-t-elle son origine dans une affinité plus grande de l'isocyanate pour les -SH protéiques? La question mériterait d'être discutée. Nous nous contenterons simplement d'indiquer ici que le comportement très favorable de l'isocyanate nous a incités à utiliser exclusivement cet agent d'acylation dans nos expériences sur l'uréase.

III. ACTION DE L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE SUR L'URÉASE

Voici tout d'abord le protocole expérimental de l'un de nos essais les plus caractéristiques:

A 2.85 ml d'une liqueur contenant 15.8 mg d'uréase (pureté: 35 000 U.g.), on ajoute successivement des quantités connues d'isocyanate en solution acétonique. Aucune précipitation de diphenylurée ne se produit et le milieu reste parfaitement limpide. Des échantillons sont prélevés avant chaque nouvelle addition, sur lesquels on dose l'activité uréolytique et les groupes thiol totaux. L'acétone seule et l'agitation ne provoquent aucune inactivation.

Les résultats de cette étude sont donnés sous forme graphique par les Figs 1 et 2.

Ces figures suggèrent les quelques remarques suivantes:

1. Dès que l'on traite la solution d'uréase par l'isocyanate, certains -SH disparaissent rapidement (Fig. 1). C'est ainsi que 2.25 équivalents de l'agent acylant bloquent 1 -SH sur 5. Nous assistons, de toute évidence, à l'acylation des -SH (a) selon HELLER-MAN qui, étant "réactifs", se combinent presque stoechiométriquement à l'isocyanate.

Le blocage ainsi constaté n'exerce aucune influence notable sur l'activité enzymatique. Nous confirmons donc de façon tout-à-fait nette les résultats obtenus par HELLERMAN dans ce domaine et les suggestions de ses prédecesseurs.

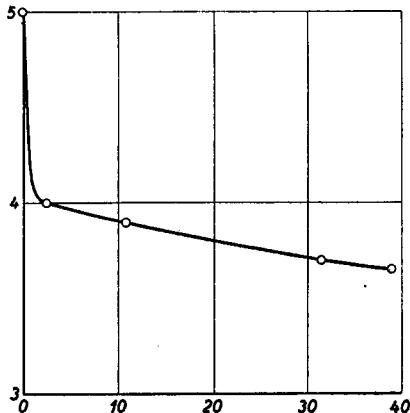


Fig. 1. Variation du nombre de groupes thiol de l'uréase pendant l'acylation.

En abscisses: Nombre d'équivalents isocyanate ajoutés (calculés par rapport aux-SH (a) de l'uréase).

En ordonnées: Nombre de groupes -SH totaux dans 21 300 g d'uréase.

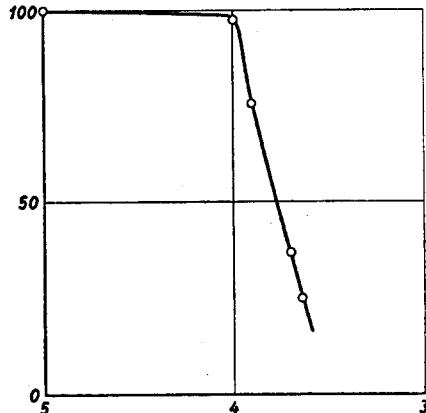


Fig. 2. Activité de l'uréase en fonction de sa teneur en -SH totaux.

En abscisses: Nombre de groupes -SH totaux dans 21 300 g d'uréase.

En ordonnées: Activité % (l'activité initiale est prise comme base 100).

2. Si l'on poursuit l'addition d'isocyanate, la teneur en -SH totaux baisse beaucoup moins vite (Fig. 1). Il faut en effet à ce moment 29 équivalents d'isocyanate pour faire disparaître 0.3 -SH, donc près de 50 fois plus qu'auparavant. Les groupes -SH qui sont alors bloqués sont ainsi nettement moins "réactifs" que les précédents.

3. Au cours de cette deuxième phase, le ferment s'inactive brusquement (Fig. 2). Il ne paraît pas probable que l'excès d'isocyanate agisse sur d'autres groupes que les -SH, car, en milieu non-tamponné et légèrement acide, les groupes -NH₂ et -OH phénoliques s'acylent très lentement, même quand ils se trouvent en présence de quantités considérables d'agent acylant⁹. Dans notre cas, ces phénomènes parasites sont donc certainement négligeables et l'action de l'isocyanate sur les groupes -SH "non-réactifs" semble bien être la cause déterminante de l'inactivation.

4. La courbe de la Fig. 2 met nettement en évidence cette chute d'activité uréolytique dès que les -SH "non-réactifs" commencent à s'acyler. Cette courbe, il ne nous a malheureusement pas été possible de la tracer jusqu'à disparition totale de l'activité enzymatique. Sa pente, toutefois, est tellement accusée qu'elle suggère que l'inactivation totale est atteinte bien avant que le deuxième -SH soit complètement bloqué. Nos essais conduisent donc, sur ce point, à des résultats un peu différents de ceux d'HELLERMAN, car ils ne font pas apparaître de façon aussi nette la nécessité de distinguer, parmi les -SH "non-réactifs" de l'uréase, des groupes (b) particuliers et de leur conférer une importance physiologique spéciale. Ce désaccord s'explique d'ailleurs aisément si l'on admet (voir l'introduction) que le p-chloromercuribenzoate ne se combine pas stoechiométriquement aux -SH non-réactifs.

Quoi qu'il en soit d'ailleurs, un fait fondamental semble bien acquis: L'uréase perd son activité au moment où l'on commence à bloquer ses -SH "non-réactifs". Il faut

alors noter que cette "non-réactivité" provient soit de l'existence, au sein de l'uréase native, de liaisons structurales labiles dans lesquelles les groupes se trouvent impliqués, soit d'un empêchement stérique quelconque. Dans les deux cas, il paraît difficile de croire que ces groupes "non-réactifs" puissent jouer par eux-mêmes un rôle précis dans l'activité enzymatique, en facilitant, par exemple, la formation du complexe enzyme-substrat.

Mais, dans les deux cas également, la protéine native subit certainement des modifications importantes de structure avant que ses groupes "non-réactifs" soient bloqués par la substance chimique mise en œuvre. Peut-être, ces modifications qui se produisent soit au moment de la rupture des liaisons labiles éventuelles, soit au moment où la substance chimique fraye son chemin jusqu'aux groupes difficilement accessibles, sont-elles de nature à entraîner la perte de l'activité. Si cette hypothèse est exacte, le blocage des groupes aurait un caractère secondaire et le phénomène réellement important consisterait en une série de dénaturations partielles intervenant à leur niveau. Rien n'empêche, d'ailleurs, de croire que les dénaturations soient suffisamment localisées, au début tout-au-moins, pour être réversibles.

Nous pensons que cette hypothèse devrait être envisagée *toutes les fois que l'activité physiologique d'une protéine semble dépendre de l'intégrité de l'un de ses groupes "non-réactifs"*. Sans en entamer ici la discussion générale, qui est sans doute encore impossible aujourd'hui, notons que le cas de la myosine, autre "sulphydryl enzyme", doit être provisoirement réservé tant que les contradictions existant entre les résultats de BAILEY⁸ et ceux de SINGER¹³ ne seront pas levées. Signalons aussi, qu'en dehors des groupes thiol, on attribue souvent à certains autres groupes protéiques (phénol, amine) un rôle précis dans l'activité physiologique des protéines. Il est alors curieux de constater que ces derniers groupes sont également susceptibles, grâce à leur hydrogène mobile, d'entrer dans des liaisons structurales labiles (phénol¹⁴, amine¹⁵). Les groupes phénol de la pepsine, par exemple, sont doués d'une très faible "réactivité"¹⁴ et il n'est probablement pas sans intérêt de rapprocher ce fait des résultats expérimentaux classiques d'HERRIOTT¹⁶ sur l'inactivation de l'enzyme par le cétène.

RÉSUMÉ

L'acylation, en milieu légèrement acide, de $-\text{SH}$ "réactif" de l'albumine d'œuf dénaturée nécessite l'emploi de 1.16 mol d'isocyanate de phényle (en solution acétonique) et plus de 50 mol de cétène (en solution éthérée). Un précédent travail a, d'autre part, montré que l'acylation des $-\text{SH}$ "réactifs" des protéines est presque instantanée, tandis que celle des $-\text{SH}$ "non-réactifs" est au contraire très lente.

Partant de ces observations, nous avons traité de l'uréase par des quantités connues d'isocyanate en solution acétonique et nous avons mesuré la perte progressive d'activité subie par l'enzyme ainsi que le blocage de ses groupes $-\text{SH}$. Nous confirmons que l'uréase est encore pleinement active quand ses $-\text{SH}$ "réactifs" sont bloqués. L'inactivation débute brusquement dès que les $-\text{SH}$ "non-réactifs" se trouvent atteints. Elle semble être totale avant que les $-\text{SH}$ (b) d'HELLERMAN soient complètement acylés.

Pour les protéines qui, comme l'uréase, s'inactivent quand on bloque certains de leurs groupes "non-réactifs", une hypothèse est présentée d'après laquelle l'inactivation résulterait, non du blocage lui-même, mais des changements structuraux réversibles survenant au niveau de ces groupes au moment où on les force à réagir.

SUMMARY

The acylation, in weakly acid medium, of one "reactive" $-\text{SH}$ of denatured egg albumin requires 1.1 mol phenyl isocyanate (in acetone solution) and more than 50 mol ketene (in ethereal solution).

A previous investigation has shown that the acylation of the "reactive" -SH of proteins is almost instantaneous, while that of "non-reactive" -SH is very slow.

Starting from these observations, we have treated urease with known quantities of isocyanate in acetone solution and have measured the progressive loss of activity at the same time as the blockage of its -SH groups. We confirm that urease is still fully active when its "reactive" -SH groups are blocked. Inactivation begins suddenly when the "non-reactive" -SH groups are attacked. It seems to be complete even before the -SH (b) groups of HELLERMAN are completely acylated.

For proteins such as urease, *which are inactivated when certain of their "non-reactive" groups are blocked*, a hypothesis is presented according to which inactivation results not from the blockage itself, but from reversible structural changes at the site of these groups when they are caused to react.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Azylierung von einer "aktiven" -SH-Gruppe des denaturierten Eialbumins in schwach saurem Milieu erfordert die Anwendung von 1.16 Mol Phenylisocyanat (in acetonischer Lösung) und mehr als 50 Mol Keten (in ätherischer Lösung). In einer vorgehenden Arbeit wurde andererseits gezeigt, dass die Acylierung "aktiver" -SH-Gruppen beinahe momentan erfolgt, während die der "inaktiven" -SH-Gruppen im Gegensatz dazu sehr langsam verläuft.

Auf Grund dieser Beobachtungen behandeln wir Urease mit bekannten Isocyanatmengen in acetonischer Lösung und messen den steigenden Aktivitätsverlust, den das Enzym bei der Blockierung seiner -SH-Gruppen erleidet. Wir bestätigen, dass die Urease noch vollkommen aktiv ist, wenn ihre "aktiven" -SH-Gruppen blockiert sind. Die Inaktivierung beginnt danach plötzlich, sobald die "inaktiven" -SH-Gruppen angegriffen werden. Sie scheint bereits vollständig zu sein, bevor die -SH (b)-Gruppen von HELLERMAN vollständig acyliert sind.

Für die Eiweisskörper, die — wie die Urease — *inaktiviert werden, wenn man gewisse ihrer "inaktiven" Gruppen blockiert*, wird eine Hypothese aufgestellt, nach welcher die Inaktivierung nicht von der Blockierung selbst, sondern von reversiblen Strukturveränderungen im Niveau dieser Gruppen herrührt, die auftreten, sobald man sie zur Reaktion bringt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. HELLERMAN, F. P. CHINARD ET V. R. DEITZ, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 443.
- ² R. KUHN ET P. DESNUELLE, *Z. Physiol. Chem.*, 251 (1937) 14.
- ³ J. B. SUMNER ET L. O. POLAND, *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 30 (1933) 553.
- ⁴ L. HELLERMAN ET M. E. PERKINS, *J. Biol. Chem.*, 107 (1934) 241.
- ⁵ L. HELLERMAN, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 7 (1939) 165.
- ⁶ C. V. SMYTHE, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 601.
- ⁷ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 399.
- ⁸ K. BAILEY ET S. V. PERRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 506.
- ⁹ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 497.
- ¹⁰ J. B. SUMNER, *J. Biol. Chem.*, 69 (1926) 436 et 70 (1926) 97.
- ¹¹ P. FISCHER, *Bull. Soc. Roy. Sciences (Liège)* 4 (1943) 235.
- ¹² A. L. DOUNCE, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 307.
- ¹³ T. P. SINGER ET E. S. G. BARRON, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 56 (1944) 120.
- ¹⁴ M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 514.
- ¹⁵ R. R. PORTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 105.
- ¹⁶ R. M. HERRIOTT ET J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1935) 35.

Reçu le 27 juillet 1948