

## SUR LA SPÉCIFICITÉ DE CERTAINES DÉGUANIDASES BACTÉRIENNES GÉNÉRATRICES D'URÉE ET SUR L'ARGININEDIHYDROLASE

par

JEAN ROCHE ET GABRIELLE LACOMBE

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)*

et

HENRI GIRARD

*Service des Fermentations, Institut Pasteur, Paris (France)*

La formation d'urée par hydrolyse de dérivés guanidiques n'est réalisée qu'aux dépens de l'arginine et de corps très voisins chez les animaux et les végétaux supérieurs tandis que des microorganismes l'opèrent en outre par dédoublement de la créatine, de la créatinine et de la glycoxyamine. DUBOS ET MILLER<sup>1</sup> ont isolé du sol des bactéries dont un enzyme adaptatif décompose la créatinine, mais non la créatine. Cette dernière seule est, par contre, hydrolysée par *Pseudomonas eisenbergii*<sup>2</sup>, inactif sur la glycoxyamine, laquelle est dégradée par *Pseudomonas ovalis*<sup>3</sup>, et un microorganisme du même genre isolé de l'urine putréfiée<sup>4</sup> libère de l'urée à partir de divers dérivés guanidiques. Quant à l'hydrolyse de l'arginine, elle est réalisée chez certaines bactéries par une arginase<sup>5</sup> et chez d'autres par une argininedihydrolase<sup>6, 7</sup>, la première donnant naissance à une molécule d'urée et une d'ornithine par molécule de substrat, la seconde à deux molécules d'ammoniac, une d'acide carbonique et une d'ornithine.

Il y a lieu de préciser dans quelle mesure les actions guanidolytiques uréogènes relèvent de l'existence de déguanidases diverses, afin d'étudier éventuellement les facteurs réagissant leur spécificité et la formation de ces enzymes, pour la plupart adaptatifs. Nous avons établi<sup>8</sup> que la glycoxyaminase de *Pseudomonas ovalis* présente des caractères d'activation et d'inhibition permettant de la considérer comme un enzyme à constituant métallique dissociable voisin de l'arginase. Le but du travail actuel est d'étendre nos recherches à d'autres actions guanidolytiques bactériennes, en particulier aux actions créatinasique, créatininasique et argininedihydrolasique.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

a. *Matériel d'étude et techniques.* Deux bactéries en culture pure, *Ps. eisenbergii* et *Ps. ovalis*, ont été utilisées. La première a été isolée du sol par M. NIMMO-SMITH\*, que nous remercions vivement de nous avoir adressé une souche de ce microorganisme; elle nous a servi à étudier l'hydrolyse de la créatine. La seconde, dont l'isolement a été décrit dans notre travail antérieur<sup>8</sup>, a été mise en œuvre

\* Department of Biochemistry, University, Oxford, England.

pour étudier les actions créatininase et argininedihydrolase. Les cultures de ces deux micro-organismes ont été entretenues par repiquage sur bouillon de haricot et ensemencées sur des milieux minéraux additionnés, après stérilisation, du dérivé guanidique soumis à leur action. Ces milieux renfermaient:  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ : 0.6 g,  $\text{ClNa}$ : 6.0 g, dérivé guanidique: 0.3–1.0 g, solution  $M/30$  de phosphates tampon de  $\text{pH} = 6.7$ : 1.000 ml\*. Ils ont été, en cas de besoin, ajustés à divers  $\text{pH}$  par addition d' $\text{HCl}$  ou de  $\text{NaOH}$   $N/10$  et placés à  $37^\circ$  après ensemencement. Le dosage du constituant organique initial a été opéré au début de l'essai et à des temps successifs, avec celui de l'urée et de l'ammoniac. La créatine et la créatinine ont été dosées par la méthode de FOLIN ET DENIS, l'arginine par colorimétrie (technique de WEBER modifiée par DUMAZERT ET POGGI), l'urée par la microméthode au xanthidrol (technique de THIVOLLE ET SONNTAG), l'ammoniac par distillation en présence de  $\text{CO}_2\text{Li}$  et titrimétrie.

Les résultats obtenus ont été groupés dans les paragraphes suivants où nous n'avons fait figurer que le plus petit nombre de données numériques qu'il y avait intérêt à citer à titre d'exemples.

b) *Créatinase (Pseudomonas eisenbergii)*. Des essais préliminaires ont montré à NIMMO-SMITH, comme à nous, que la bactérie dégrade la créatine en libérant par molécule de substrat une molécule d'urée; celle-ci n'est pas décomposée dans les milieux de culture, car le microorganisme ne renferme pas d'uréase. De l'ammoniac se forme simultanément, toujours en quantité inférieure à une molécule; il provient de la dégradation lente de la sarcosine libérée par hydrolyse, ce corps étant générateur d'ammoniac quand on l'ajoute aux cultures. Le  $\text{pH}$  optimum de l'action guanidolytique, déterminé dans de nombreux essais, est  $6.7 (\pm 0.2)$ . Nos résultats en ce qui concerne la spécificité de la bactérie sont en accord avec ceux de NIMMO-SMITH. La créatine est décomposée en aérobiose, où la multiplication du micro-organisme est intense; ni la créatinine, ni la glycocyamine ne le sont alors. A  $\text{pH} = 6.7$ , la dégradation de l'arginine conduit à la formation directe d'ammoniac par l'argininedihydrolase. Celle-ci, comme la créatinase, est un enzyme endocellulaire ne diffusant pas dans les milieux de culture. Les bactéries à l'état non proliférant ("resting bacteria") n'hydrolysent pas la créatine, mais leur activité vis à vis de l'arginine est importante. Contrairement aux microorganismes décrits par DUBOS ET MILLER<sup>1</sup> elles ne peuvent réaliser l'anhydridisation de la créatine en créatinine en milieu aérobic.

Nous avons étudié l'influence de divers effecteurs métalliques et de formateurs de complexes sur la créatinase afin de la caractériser et de la comparer à la glycocyaminase. On trouvera dans la Tableau I quelques exemples des résultats obtenus, limités à des concentrations en effecteurs auxquelles l'activité ou l'inefficacité de ceux-ci est manifeste\*\*.

L'action créatininase de la bactérie est inhibée par les trois formateurs de complexe (azide de sodium, cyanure de potassium et diéthylthiocarbamate de sodium) et activée par  $\text{Fe}^{++}$ , mais non par  $\text{Mn}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ . L'inhibition par  $\text{Cu}^{++}$  se manifeste à concentration relativement élevée, elle est moins forte que dans le cas de la glycocyaminase de *Ps. ovalis*, où elle est encore nette à  $1 \cdot 10^{-5} M$ . Comme nous le verrons plus bas, certains de ces corps n'exercent aucune influence sur l'activité argininedihydrolase de la bactérie; aussi, est-il légitime de considérer que leurs effets traduisent l'activation ou l'inhibition de la créatinase et non leur influence sur la multiplication cellulaire.

c. *Créatininase (Pseudomonas ovalis)*. Cette bactérie, isolée du sol sur milieu à la

\* Ces milieux contiennent, en dehors du dérivé guanidique qui y est introduit comme substrat et des sels indiqués ci-dessus, des traces indosables d'impuretés minérales diverses apportées par les réactifs employés pour leur préparation.

\*\* Ces concentrations, relativement élevées dans la plupart des cas, sont celles des milieux de culture étudiés et non celles réellement actives sur les déguanidases, car la perméabilité des cellules bactériennes aux effecteurs a joué dans le déterminisme de celle-ci un rôle important, mais non défini.

TABLEAU I  
ACTION DE DIVERS EFFECTEURS SUR LA CRÉATINASE DE *Pseudomonas eisenbergii*  
(pH = 6.7, 37°)

Nature et concentration moléculaire de l'effecteur	mg de créatine par ml présents après		
	0 heure	20 heures	44 heures
Néant (témoin)	1.06	0.41	0
Azide de sodium $1 \cdot 10^{-3}$ M	1.06	0.80	0
Azide de sodium $2 \cdot 10^{-3}$ M	1.06	1.06	0.86
Néant (témoin)	0.98	0.77	0
KCN $1 \cdot 10^{-3}$ M à $2 \cdot 10^{-3}$ M	0.98	0.98	0.98
Néant (témoin)	0.96	0.35	0
Diéthylthiocarbamate de sodium $1 \cdot 10^{-3}$ M à $2 \cdot 10^{-3}$ M	0.96	0.96	0.96
Néant (témoin)	0.98	0.66	0
SO <sub>4</sub> Fe $2 \cdot 10^{-2}$ M	0.98	0 (traces)	0
SO <sub>4</sub> Mn $2 \cdot 10^{-2}$ M	0.98	0.58	0
SO <sub>4</sub> Mg $2 \cdot 10^{-2}$ M	0.98	0.63	0
SO <sub>4</sub> Cu $1 \cdot 10^{-3}$ M	0.98	0.96	0.45

glycocyamine, hydrolyse à la fois celle-ci et, plus lentement, la créatine, mais non la créatinine. Après une série de repiquages successifs sur milieu minéral renfermant de la créatine comme unique constituant organique, elle dédouble activement ces trois dérivés avec formation d'urée en milieu aérobie. La bactérie est à cet égard très peu efficace à l'état non proliférant, en sorte que nous avons dû étudier l'action créatinasique du microorganisme en cours de multiplication. Le pH optimum est 6.8 ( $\pm 0.2$ ) et, comme dans le cas de la créatinase, la quantité d'urée apparaissant dans le milieu correspond, molécule à molécule, à celle du substrat décomposé. De l'ammoniac se forme lentement, sans doute aux dépens de la sarcosine, dont le microorganisme, par ailleurs dépourvu d'uréase, opère le dédoublement. Le mécanisme de la réaction génératrice d'urée demeure mal défini, car il ne nous a pas été possible de mettre en évidence la formation de créatine comme terme intermédiaire. Il n'est pas certain que la formation d'urée et d'ammoniac soient simultanées, car le second est toujours présent en quantité stoechiométriquement moindre que le premier dans les vingt-quatre premières heures de culture; mais une partie de l'ammoniac peut alors avoir été assimilée par la bactérie en croissance. L'étude de divers cations divalents et de formateurs de complexe sur la créatininase a donné des résultats dont quelques exemples ont été réunis dans le Tableau II.

La dégradation enzymatique de la créatinine n'est pas inhibée par le diéthylthiocarbamate de sodium, mais l'est par le cyanure alcalin et l'azide de sodium. Les cations métalliques étudiés sont peu actifs ou inactifs vis à vis d'elle dans les conditions où nous sommes placés, Fe<sup>++</sup> étant inefficace et Cu<sup>++</sup> très faiblement inhibiteur, même à concentration  $1 \cdot 10^{-3}$  M. La créatininase est donc à cet égard très différente de la créatinase.

d. *Argininedihydrolase* (*Pseudomonas ovalis*). Les deux *Pseudomonas* renferment une argininedihydrolase paraissant identique à celle des staphylocoques<sup>7</sup>. L'existence de cet enzyme dans les bactéries à l'état non proliférant, dépourvues d'uréase, a été établie par des dosages simultanées d'arginine et d'ammoniac traduisant la formation

TABLEAU II  
ACTION DE DIVERS EFFECTEURS SUR LA CRÉATININASE DE *Pseudomonas ovalis*  
(PH = 6.8, 37°)

Nature et concentration moléculaire de l'effecteur	mg de créatine par ml présents après		
	0 heure	20 heures	44 heures
Néant (témoin)	0.40	0	0
Azide de sodium $1 \cdot 10^{-3} M$	0.40	0	0
$2 \cdot 10^{-3} M$	0.40	0.40	0.29
Néant (témoin)	0.41	0	0
KCN $1 \cdot 10^{-3} M$	0.41	0.41	0.41
Néant (témoin)	0.61	0.21	0
Diéthylthiocarbamate de sodium $1 \cdot 10^{-3} M$	0.61	0.21	0
$2 \cdot 10^{-3} M$	0.61	0.10	0
Néant (témoin)	0.41	0	0
SO <sub>4</sub> Cu $1 \cdot 10^{-3} M$	0.41	0.05	—
Néant (témoin)	0 heure	15 heures	44 heures
SO <sub>4</sub> Fe $2 \cdot 10^{-3} M$	0.34	0.08	—
SO <sub>4</sub> Mn $2 \cdot 10^{-3} M$	0.34	0.11	—
SO <sub>4</sub> Mg $2 \cdot 10^{-3} M$	0.34	0.12	—
	0.34	0.13	—
Néant (témoin)	0 heure	13 heures	15 heures
SO <sub>4</sub> Fe $2 \cdot 10^{-3} M$	0.68	0.26	0.15
SO <sub>4</sub> Mn $2 \cdot 10^{-3} M$	0.68	0.19	0.07
SO <sub>4</sub> Mg $2 \cdot 10^{-3} M$	0.68	0.20	0.08
	0.68	0.23	0.13

du second à partir de la première. La dégradation de l'arginine donne naissance à trois molécules d'ammoniac en raison de la dégradation partielle de l'ornithine, dans le cas de *Ps. eisenbergii*, alors qu'il ne se forme que deux molécules d'ammoniac à partir d'une molécule d'arginine, d'acide arginique ou d'agmatine dans le cas de *Ps. ovalis*. L'activité de ce dernier étant donc plus strictement argininedihydrolasique, nous avons opéré de préférence avec lui. Le pH optimum de l'enzyme est 6.4 ( $\pm 0.2$ ). Sa spécificité s'exerce sur l'arginine, l'agmatine et l'acide arginique, les autres dérivés guanidiques (créatine, créatinine, glycoxyamine) étant dédoublés avec formation d'urée ou non métabolisés au même pH. L'action de divers effecteurs s'est manifestée selon des modalités dont rend compte l'examen des données réunies à titre d'exemples dans le Tableau III.

L'argininedihydrolase n'est pas inhibée par le diéthylthiocarbamate de sodium, mais l'est par le cyanure alcalin et l'azide de sodium, comme la créatininase que contient la même bactérie. L'enzyme est activé par Fe<sup>++</sup>, mais non par Mn<sup>++</sup> et par Mg<sup>++</sup>, même en présence de cystéine. Cu<sup>++</sup> et Hg<sup>++</sup> sont très fortement inhibiteurs, le premier à des doses où il ne modifie pas l'action créatininasique de la bactérie.

TABLEAU III  
ACTION DE DIVERS EFFECTEURS SUR L'ARGININEDIHYDROLASE DE *Pseudomonas ovalis*  
(PH = 6.4, 37°)

Nature et concentration moléculaire de l'effecteur	mg de L-arginine par ml présents après		
	0 heure	9-15 heures	12 h 30-22 h
Néant (témoin)		13 heures	22 heures
Azide de sodium $2 \cdot 10^{-4} M$	0.28	traces	0
$2 \cdot 10^{-3} M$	0.28	0.206	traces
	0.28	0.28	0.28
Néant (témoin)		14 heures	20 heures
KCN $1 \cdot 10^{-4} M$	0.32	0.12	traces
KCN $2 \cdot 10^{-3} M$	0.31	0.18	traces
KCN $1 \cdot 10^{-3} M$	0.31	0.30	0.14
	0.31	0.30	0.31
Néant (témoin)		10 heures	
Diéthylthiocarbamate de sodium $2 \cdot 10^{-4} M$ à $1 \cdot 10^{-3} M$	0.50	0.04	—
	0.46	0.02	—
Néant (témoin)		9 heures	
SO <sub>4</sub> Fe $2 \cdot 10^{-3} M$	0.52	0.11	—
	0.52	traces	—
Néant (témoin)		10 h 30	12 h 30
SO <sub>4</sub> Mn $2 \cdot 10^{-3} M$	0.26	0.13	0.05
Cystéine $2 \cdot 10^{-3} M$	0.26	0.13	0.06
Cystéine $2 \cdot 10^{-3} M$ + SO <sub>4</sub> Mn $2 \cdot 10^{-3} M$	0.26	0.13	0.05
	0.26	0.13	0.06
Néant (témoin)		15 heures	
SO <sub>4</sub> Mg $1 \cdot 10^{-3} M$	0.34	0.12	—
	0.35	0.14	—
Néant (témoin)		10 heures	14 heures
SO <sub>4</sub> Cu $1 \cdot 10^{-4} M$	0.52	0.22	0
SO <sub>4</sub> Cu $1 \cdot 10^{-3} M$	0.52	0.43	0.38
SO <sub>4</sub> Hg $1 \cdot 10^{-3} M$	0.52	0.53	0.39
	0.59	0.59	0.59

## DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les activités déguanidasiques donnant naissance à de l'urée et l'argininedihydrolase présentent une spécificité qui se dégage des données acquises à fois sur leur répartition dans diverses bactéries et sur leurs effecteurs. Si l'argininedihydrolase est un enzyme constitutif des deux *Pseudomonas* étudiés, de nombreuses autres bactéries en sont dépourvues et renferment, par contre, une arginase<sup>5</sup>. La créatinase est présente dans les deux premiers, mais la glycoyaminase et la créatinase n'ont été mises en évidence que chez l'un d'eux. Aussi peut-on penser que les diverses activités enzymatiques étudi-

ées sont dues à différents enzymes dont l'activation et l'inhibition est à certains égards caractéristique de chacun, comme le montre l'examen du Tableau IV.

TABLEAU IV

PH OPTIMUM ET SENSIBILITÉ AUX EFFECTEURS (ACTIVATION +, INHIBITION —) DE DIVERSES DÉGUANIDASES GÉNÉRATRICES D'URÉE (CRÉATINASE, CRÉATININASE, GLYCOCYAMINASE, ARGINASE) ET DE L'ARGININEDIHYDROLASE BACTÉRIENNES

PH optimum et effecteur	Créatinase ( <i>Ps. eisenbergii</i> )	Créatininase ( <i>Ps. ovalis</i> )	Glycocy- aminase ( <i>Ps. ovalis</i> )	Arginase ( <i>B. subtilis</i> )	Arginine- dihydrolase ( <i>Ps. ovalis</i> )
PH optimum	6.7	6.8	7.8	9.0	6.4
Diéthylthiocar- bamate de Na	— —	o	—		o
N <sub>2</sub> Na	— —	—	—		—
CNK	— —	—	—		—
SO <sub>4</sub> Fe	+ +	o	—		+ +
SO <sub>4</sub> Mn	o	o	+ +	+ +	o
SO <sub>4</sub> Mg	o	o	o		o
SO <sub>4</sub> Cu	— —	inhibition très faible	— —		— —

Il n'a pas été possible d'extraire ces enzymes des cellules et certains d'entre eux ne manifestent leur activité que dans des cultures où les bactéries se multiplient; il est dès lors prématuré de discuter longuement au sujet de leurs caractères, car ceux-ci peuvent être modifiés par des effecteurs naturels dont ils n'ont pas été séparés. Néanmoins, il est légitime d'admettre qu'il existe chez les bactéries divers types bien définis de déguanidases, en dehors de la déguanidodésimidase donnant naissance à un uréide et à de l'ammoniac<sup>8, 9</sup>.

La créatininase a déjà été identifiée par DUBOS ET MILLER<sup>1</sup> comme un enzyme spécifique, en raison de la nature de son substrat. Son défaut de sensibilité aux effecteurs métalliques étudiés et au diéthylthiocarbamate de sodium la distinguent des autres déguanidases génératrices d'urée par un mécanisme nécessairement plus simple, puisqu'il ne comporte pas la rupture d'un cycle. La créatinase, la glycocyaminase, l'arginase sont des hydrolases dont le mode d'action est sans doute identique, mais dont les caractères et la répartition diffèrent, en sorte que leur spécificité ne doit pas être mise en doute. De même l'argininedihydrolase, enzyme non uréogène, se distingue de l'arginase par son mécanisme d'action et par ses effecteurs. Les déguanidases actives sur des dérivés dans lesquels le groupement guanidique n'est pas compris dans un cycle, comme dans la créatinine, sont toutes fortement activées par des métaux (fer ou manganèse). Aussi peut-on se demander si, comme l'arginase, elles ne renferment pas un constituant métallique dont le rôle est de participer à la combinaison de l'enzyme au substrat<sup>10, 11</sup>.

Ces recherches sur les déguanidases des bactéries, en quelque sorte analytiques, apportent des résultats utiles en ce qui concerne l'identification de ces enzymes. Elles permettent, de ce fait, d'envisager la possibilité d'étudier, d'une part les facteurs déterminant la spécificité d'enzymes dont le mode d'action est sans doute très voisin et, d'autre part, la production de ceux-ci dans des cellules et leur participation à des processus métaboliques particuliers à divers types bactériens.

## RÉSUMÉ

1. La créatinase, la créatininase et la glycocycaminase ont été caractérisées en tant qu'enzymes spécifiques dans deux bactéries du genre *Pseudomonas* (*Ps. eisenbergii* et *ovalis*) et leur sensibilité à divers effecteurs (cations divalents et formateurs de complexes) a été étudiée. Il est possible que la créatinase et la glycocycaminase soient des enzymes à constituant métallique dissociable, tandis que tel n'est pas le cas de la créatininase. Ces trois enzymes libèrent de l'urée à partir du groupement guanidique de leur substrat. La créatinase et la glycocycaminase sont des hydrolases analogues à l'arginase, tandis que le mécanisme d'action de la créatininase, plus complexe, demeure mal défini.

2. L'argininedihydrolase de mêmes bactéries hydrolyse l'arginine, l'acide arginique et l'agmatine en donnant directement naissance à de l'ammoniac. Activée par  $\text{Fe}^{++}$  et inhibée par KCN et  $\text{NaN}_3$ , elle dégrade ces substrats dans les bactéries à l'état non proliférant, alors que les autres déguanidases étudiées sont inactives dans les mêmes conditions. Aucun de ces enzymes n'a pu être extrait des cellules.

3. La diversité de l'équipement des bactéries en déguanidases spécifiques (créatinase, créatininase, glycocycaminase, arginase, argininedihydrolase) et en guanidodésimidasés mérite d'être retenue et étudiée à divers égards.

## SUMMARY

1. Creatinase, creatininase, and glycocycaminase have been characterized as specific enzymes in two species of *Pseudomonas* (*Ps. eisenbergii* and *ovalis*) and their sensitivity to various factors (divalent cations and complex forming compounds) have been investigated. It is possible that creatinase and glycocycaminase are enzymes with a dissociable metal constituent, but this is not the case for creatininase. These two enzymes liberate urea from the guanidin groups of their substrate. Creatinase and glycocycaminase are hydrolases analogous to arginase; the mechanism of the action of creatinase, on the other hand, appears to be more complicated and is still not clear.

2. The argininedihydrolase of the same bacteria hydrolyses arginine, arginic acid, and agmatine, giving rise directly to ammonia. It is activated by  $\text{Fe}^{++}$  and inhibited by KCN and  $\text{NaN}_3$  and degrades these substrates in the "resting" bacteria, while other deguanidases investigated under the same conditions are inactive. None of these enzymes could be extracted from the cells.

3. The diversity of the specific deguanidases of the bacteria (creatinase, creatininase, glycocycaminase, arginase, argininedihydrolase) and guanidodessamidases in the bacteria is worthy of further study.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Kreatinase, die Kreatininase und die Glycocycaminase wurden als spezifische Enzyme in zwei Bakterien der Art *Pseudomonas* (*Ps. eisenbergii* und *ovalis*) charakterisiert und ihre Empfindlichkeit gegen verschiedene Effektoren (zweiwertige Kationen und Komplexbildner) wurde untersucht. Kreatinase und Glycocycaminase sind möglicherweise als Enzyme mit einem dissoziierbaren Metall zu betrachten, während dies für Kreatininase nicht der Fall ist. Diese drei Enzyme setzen aus der Guanidgruppe ihres Substrates Harnstoff in Freiheit. Die Kreatinase und Glycocycaminase sind Hydrolasen wie die Arginase; der Wirkungsmechanismus der Kreatininase scheint dagegen komplizierter zu sein und bleibt unklar.

2. Die Argininedihydrolase der gleichen Bakterien hydrolysiert Arginin, Argininsäure und Agmatin, wobei direkt Ammoniak entsteht. Sie wird durch  $\text{Fe}^{++}$  aktiviert und durch KCN und  $\text{NaN}_3$  gehemmt, sie baut diese Substrate in den nicht proliferierenden Bakterien ab, während andere untersuchte Deguanidasen unter den gleichen Bedingungen inaktiv sind. Keines dieser Enzyme konnte aus den Zellen extrahiert werden.

3. Die Verschiedenheit der spezifischen Deguanidasen der Bakterien (Kreatinase, Kreatininase, Glycocycaminase, Arginase, Argininedihydrolase) sollte im Auge behalten und in verschiedener Hinsicht untersucht werden.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. DUBOS ET B. F. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 121 (1937) 429.
- <sup>2</sup> R. NIMMO-SMITH, Abstract no. II, 412, Congrès internat. Biochimie, Cambridge 1949.
- <sup>3</sup> J. ROCHE, H. GIRARD, G. LACOMBE ET M. MOURGUE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 414.
- <sup>4</sup> P. H. KEPPER ET H. H. BEARD, *Arch. Biochem.*, 15 (1947) 195.
- <sup>5</sup> S. TOMOKA, *J. Biochem. (Japan)*, 32 (1940) 307, 401; 33 (1941) 205.
- <sup>6</sup> G. M. HILLS, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1057.
- <sup>7</sup> C. F. NIVEN, K. L. SMILEY ET J. M. SHERMANN, *J. Bact.*, 43 (1941) 561.
- <sup>8</sup> D. ACKERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 203 (1931) 66.
- <sup>9</sup> F. LINNEWEH, *Z. physiol. Chem.*, 200 (1930) 115; 205 (1932) 126; 207 (1932) 152.
- <sup>10</sup> M. M. RICHARDS ET L. HELLERMANN, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 237.
- <sup>11</sup> J. ROCHE ET M. MOURGUE, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 889.

Reçu le 11 mai 1950