

ÉTUDE PHOTOCHIMIQUE DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLÉIQUE

I. MESURES ÉNERGÉTIQUES

par

MAURICE ERRERA

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Il nous a semblé utile, dans le but de préciser le mécanisme de certains phénomènes radiobiologiques, d'étudier les effets du rayonnement ultraviolet sur l'acide désoxyribonucléique libre et sous forme de complexe nucléoprotéique.

En effet, toute une série de phénomènes biologiques induits par ces radiations (mutations, anomalies morphologiques des chromosomes, variation de l'extinction du noyau cellulaire observée au microspectrophotomètre¹) sont localisés au sein de structures cellulaires riches en ce constituant.

La comparaison des énergies requises pour obtenir tel effet biologique ou tel effet photochimique peut nous guider dans la découverte des constituants cellulaires atteints au cours de l'action de ces radiations. Nous avons donc déterminé les intensités de lumière nécessaires pour produire dans des solutions d'acide désoxyribonucléique des effets photochimiques mesurables (diminution de viscosité, modification du spectre d'absorption). Certaines modifications du spectre, après irradiation, ont été décrites par LOOFBOUROW², alors qu'elles n'ont pas été notées par HOLLAENDER³. Nous avons confirmé l'observation de ces derniers auteurs en ce qui concerne la constance de l'extinction à 260 m μ au cours de la chute de viscosité; cependant, on peut montrer un accroissement appréciable de l'extinction aux courtes longueurs d'ondes et aux longueurs d'ondes supérieures à 300 m μ . Cet ensemble de phénomènes s'explique par une destruction appréciable des bases pyrimidiques au cours de l'irradiation; celle-ci compense une augmentation générale de l'extinction de la préparation à 260 m μ ce qui explique l'apparente stabilité spectrale des bases azotées.

En comparant l'acide désoxyribonucléique libre au complexe nucléoprotéique, on peut espérer déceler un effet protecteur de la protéine ou, réciproquement, mettre en évidence une photosensibilisation de la protéine en présence d'acide désoxyribonucléique. Des essais dans ce sens ne nous ont pas permis de formuler des conclusions définitives.

A. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

a. Matériel utilisé

Nous avons utilisé de l'acide désoxyribonucléique de thymus de veau purifié par la méthode de HAMMARSTEN modifiée selon TAYLOR *et al.*¹⁴. La déprotéinisation de l'acide ainsi obtenu a été

Bibliographie p. 37.

poursuivie par la méthode de SEVAG, décrite par GULLAND⁵. Le produit sec obtenu (105° C sous P_2O_5 à basse pression pendant 10 heures) contient N = 15.7%; P = 8.97%. La densité optique d'une solution contenant 1.00 mg/ml (pH 6.8) est de 20.8. Par rapport à la préparation de GULLAND, il y a environ 5% d'impuretés probablement de nature protéique; celui-ci trouve, en effet, une extinction de 22.0 pour une solution de même concentration. Nous nous sommes basé sur ce dernier chiffre au cours de tous les dosages spectrophotométriques effectués.

Les bases puriques et pyrimidiques ont été déterminées par chromatographie sur papier. Nous remercions vivement R. THOMAS qui a bien voulu faire pour nous ces mesures, d'après la technique qu'il a décrite précédemment¹⁵. La quantité relative de chaque base azotée est, exprimée en moles pour cent: adénine: 29, guanine: 23, cytosine: 22, thymine: 26.

La désoxyribonucléoprotéine utilisée a été préparée par la méthode de PETERMAN¹³ (extraction répétée de thymus de veau par NaCl 1.0 M en présence d'un inhibiteur de la désoxyribonucléase, dans ce cas-ci le NaF, et précipitations répétées de l'extrait en diluant à 0.14 M NaCl). Le produit est ensuite séché sous vide à basse température (-10° C). Un échantillon séché sous vide à 105° C. Contient: N = 16.6%; P = 4.43%; la densité optique d'une solution à 1 mg par ml à 260 m μ (pH 6.8) est de 9.710. D'après CASPERSSON², l'extinction due à la protéine n'intervient pas pour plus de 5% de l'extinction totale. Nous avons adopté ce chiffre pour déterminer la teneur en acide désoxyribonucléique des préparations de nucléoprotéine.

La préparation est insoluble dans NaCl 0.14 M et est soluble dans NaCl 0.02 M et 1.0 M. Cette dernière solution précipite sous forme fibreuse dans l'éthanol. La constitution en bases azotées de cet échantillon est identique à celle de l'acide désoxyribonucléique¹⁶.

b. Mesures de viscosité

Ces mesures sont effectuées dans un viscosimètre d'OSTWALD à 30° C (temps d'écoulement de l'eau = 72 sec) et sont exprimées en viscosités spécifiques. La viscosité de l'acide désoxyribonucléique baisse très faiblement (1-3%) en 24 heures à 30° C. Par contre, la viscosité d'une solution fraîche de nucléoprotéine dans NaCl 1.0 M augmente considérablement dans les mêmes conditions. La viscosité relative peut augmenter par exemple de 0.73 à 2.05 en 20 heures à 30°, au bout desquelles elle tend vers une valeur constante. Nous avons, en général, laissé les solution à 20° pendant 36 heures avant l'emploi.

Si on porte les valeurs des viscosités relatives en ordonnées d'un graphique dont les abscisses représentent la concentration en acide désoxyribonucléique (Fig. 1), on voit que les points concernant l'acide nucléique et la nucléoprotéine se placent sur une même courbe. Ceci indique, semble-t-il, qu'en concentration saline molaire, la fraction protéique de la nucléoprotéine n'intervient que d'une manière négligeable dans le phénomène de viscosité.

c. Irradiations

Deux sources d'U.V. ont été utilisées. La première, émettant environ 90% de son énergie à 253.7 m μ (lampe à vapeur de mercure à basse pression du British Thermal Syndicate (B.T.S.) et utilisée sans filtre, a servi principalement aux mesures des rendements énergétiques. Cette source émet environ $5 \cdot 10^{-7}$ einsteins par cm 2 et par minute à 25 mm. Les mesures actinométriques sont effectuées dans la cuvette servant aux expériences, au moyen du système acide oxalique-oxalate d'uranyl décrit par FORBES ET HEIDT³. L'intensité émise ne varie pas de plus de 5% de part et d'autre d'une valeur moyenne au cours d'une même expérience. Il en sera toutefois tenu compte dans les expériences ayant pour but de déterminer les rendements quantiques.

D'autre part, pour le travail chimique, nous avons employé une lampe à vapeur de mercure à haute pression, débarrassée de son enveloppe de verre (Philora HP 125 W) avec un filtre de 5 mm d'acide acétique à 10% (élimination des raies de longueurs d'ondes inférieures à 2300 Å). Une mesure actinométrique faite avec et sans un filtre d'acide désoxyribonucléique (10 mm d'acide à 0.5 mg/ml) permet de déterminer que, dans ces conditions, environ 65% de l'énergie passant à travers le premier filtre est absorbée par l'acide nucléique. Cette lampe a, dans les conditions où elle a été employée, une émission environ 3.5 à 4 fois supérieure à la lampe à basse pression. Les irradiations sont effectuées dans une cuvette à fenêtres en quartz (10 mm de profondeur et 29 × 24 mm de surface). Celle-ci est immergée dans un thermostat maintenu à 13° C par un courant d'eau de la ville. Les irradiations sont effectuées à 25 ou 22 mm de la source dans le cas de la lampe à basse pression et à 45 mm dans le cas de la lampe à haute pression. La solution est agitée électromagnétiquement durant toute l'irradiation.

d. Méthodes analytiques

Le phosphore total a été dosé suivant KUTTNER ET LIECHTENSTEIN⁷. Les bases puriques et pyrimidiques ont été déterminées à pH 7.0 au spectrophotomètre BECKMAN. Leur séparation a été effectuée par la méthode chromatographique décrite par R. THOMAS¹⁵, que nous devons vivement remercier pour cette partie du travail. Après hydrolyse de l'acide desoxyribonucléique pendant

30 minutes à 100° C dans HCl 1.0 N: les bases puriques sont libérées et l'acide thymique résiduel contient les bases pyrimidiques. Ces constituants sont séparés sur papier WHATMAN no 4 au moyen de butanol saturé d'eau. L'atmosphère de la chambre chromatographique est maintenue en équilibre avec une solution identique contenant en outre 5% d'ammoniaque. Les taches, localisées en lumière ultraviolette, sont découpées, extraites et étudiées quantitativement au spectrophotomètre.

L'azote a été déterminé, après microincinération, suivant WHITE *et al.*¹⁶ en dosant l'ammoniaque par distillation à la vapeur.

B. RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Rendements énergétiques

Comme critère de la photolyse de l'acide désoxyribonucléique, nous avons choisi la diminution de viscosité.

a. Effet d'une solution d'acide désoxyribonucléique photolysé sur la viscosité d'une solution native

L'expérience a simplement consisté à comparer la viscosité d'une solution de 830 μg d'acide désoxyribonucléique par ml dans NaCl 0.2 M avec la même solution contenant en outre 210 γ d'acide désoxyribonucléique dont la viscosité avait préalablement été réduite à environ 5% de la viscosité initiale. La viscosité de cette dernière solution est moins de 5% supérieure à la viscosité de la solution témoin. L'acide nucléique irradié est donc sans effet sur la viscosité de l'acide désoxyribonucléique natif.

b. Photolyse de l'acide désoxyribonucléique en fonction de l'intensité de l'irradiation

On peut interpréter la photolyse de l'acide désoxyribonucléique en supposant que seules les molécules dans leur état d'asymétrie initiale sont responsables de la viscosité de la solution.

Cette hypothèse permet de déterminer, d'après la courbe Fig. 1, le % de molécules restant à l'état natif. Ce mode d'envisager les phénomènes permet de tenir compte de la forme non linéaire de la courbe en fonction de la concentration et ne présume en rien du mécanisme fondamental de la photolyse.

Les résultats expérimentaux concernant la photolyse de l'acide désoxyribonucléique (330 mg par ml) en solution saline (NaCl 0.2 M) font l'objet du graphique 2. Le p_{H} est constant durant toute l'expérience; le milieu n'a pas dû être tamponné ici, comme dans les expériences suivantes. Le graphique montre qu'en coordonnées semilogarithmiques, la courbe d'inactivation n'est pas linéaire (courbe A). La raison probable en est que les abscisses représentent l'intensité incidente sur la cuvette, alors qu'il faudrait défalquer de ces valeurs la fraction de l'énergie absorbée par les molécules photolysées, dont l'absorption à 2537 ne varie pas durant cette phase de la photolyse (courbe B).

Toutefois, il est possible de se faire une idée du

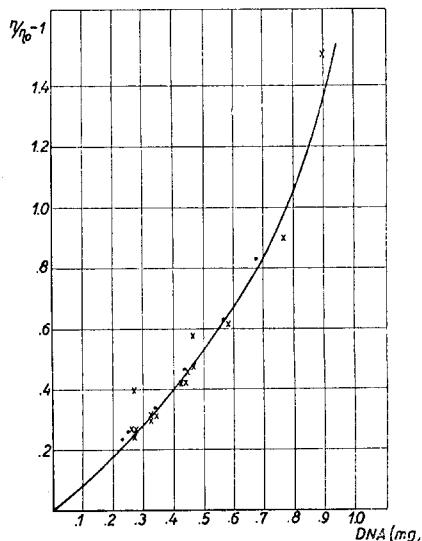


Fig. 1. Viscosité de l'acide désoxyribonucléique (●) et de la déoxyribonucléoprotéine (X) en fonction de la concentration en DNA (Les points expérimentaux se rapportent pour la plupart à des préparations différentes) (NaCl 1.0 M)

rendement quantique de la photolyse en se basant sur l'équation¹²

$$\Phi = \frac{\text{moles inactivées}}{\text{énergie absorbée}} = \frac{c.f.}{M.E.F.} = 0.2 \cdot 10^{-5}$$

(en einstein)

c = concentration g/ml = $0.33 \cdot 10^{-3}$ g/ml

f = fraction des molécules photolysées: on a pris arbitrairement 30%.

M = poids moléculaire: on a admis 10^6 (KAHLER)

E = intensité nécessaire pour une photolyse de 30% = $5.0 \cdot 10^{-5}$ einsteins par cm^2 .

F = fraction de la lumière absorbée; le % de lumière absorbée par les molécules photolysées (environ 10%) est décompté.

c. *Photolyse de l'acide désoxyribonucléique et de la désoxyribonucléoprotéine en fonction de la concentration*

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites précédemment, mais l'irradiation a été effectuée en présence de NaCl 1.0 M, à pH 6.8 (non tamponné). La viscosité de solutions de concentrations croissantes d'acide désoxyribonucléique et de nucléoprotéine a été déterminée au cours de l'irradiation; les résultats sont consignés dans les graphiques 3 et 4. Dans le cas de la nucléoprotéine, l'intensité incidente calculée se rapporte uniquement à celle absorbée par la

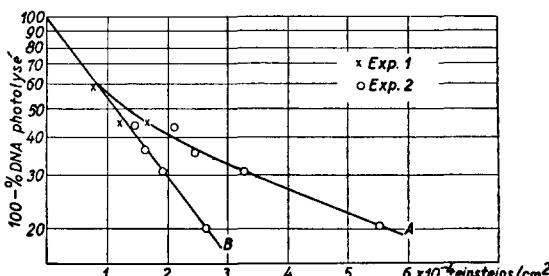


Fig. 2. Photolyse de l'acide désoxyribonucléique. La courbe A est la courbe expérimentale; les intensités ont été corrigées (courbe B) en tenant compte du % de lumière absorbée par l'acide désoxyribonucléique déjà photolysé

Photolyse de l'acide désoxyribonucléique (DNA) et de la désoxyribonucléoprotéine (DNP) en fonction des énergies U.V. incidentes

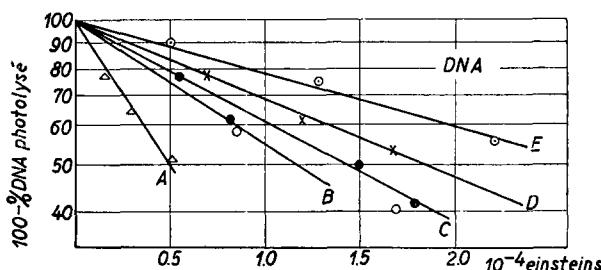


Fig. 3. DNA
 A 230 µg DNA/ml
 B 342 µg DNA/ml
 C 433 µg DNA/ml
 D 555 µg DNA/ml
 E 670 µg DNA/ml

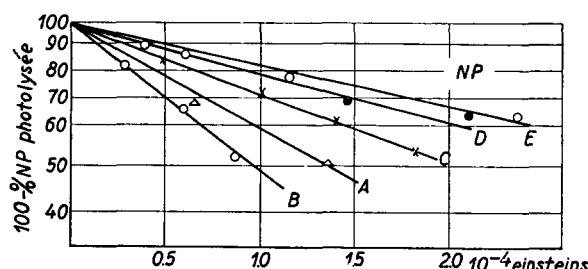


Fig. 4. DNP
 A 280 µg DNP/ml
 B 294 µg DNP/ml
 C 438 µg DNP/ml
 D 555 µg DNP/ml
 E 761 µg DNP/ml

Solvant: NaCl 1.0 M

fraction nucléotidique de la macromolécule (95 % de l'intensité totale incidente).

La photolyse, dans cette série d'expériences, n'a pas été poussée aussi loin que dans la première expérience (Fig. 2); c'est pourquoi nous avons schématisé la courbe expérimentale par une droite.

Le graphique 5 résume les données des graphiques 3 et 4 et donne les intensités incidentes nécessaires pour déterminer une photolyse de 30 %. On constate, d'après ces données, que le "rendement quantique" est pratiquement indépendant de la concentration dans les limites étudiées et qu'il est de même ordre de grandeur pour l'acide désoxyribonucléique et la nucléoprotéine.

II. Propriétés chimiques

a. Altération des bases pyrimidiques

Modification du spectre d'absorption. Nous avons observé les variations du spectre d'absorption au cours de la photolyse de l'acide désoxyribonucléique. Les variations de l'extinction à diverses longueurs d'ondes sont résumées dans la Fig. 6. Comme il s'agit

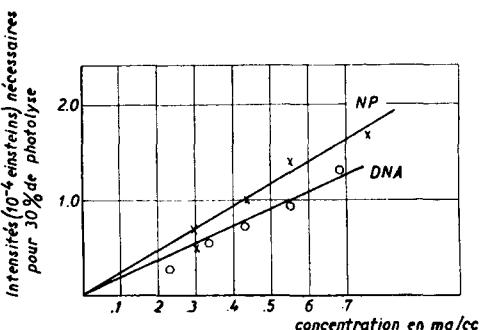


Fig. 5. Intensités d'U.V. nécessaires pour photolyser 30% d'acide désoxyribonucléique (DNA) et la désoxyribonucléoprotéine (DNP)

de solutions de concentrations différentes et irradiées dans des conditions différentes, nous avons superposé les courbes de viscosités et ramené par cet artifice les énergies (ou temps d'irradiation) à une échelle de valeur unique.

L'extinction à 260 m μ ne varie pas tant que la viscosité diminue; quand cette dernière est réduite à environ 20 % de sa valeur initiale, l'extinction à 260 m μ commence à baisser. A 300 m μ par contre, il y a une augmentation relativement considérable (100 %) de l'extinction; celle-ci est immédiate dès le début de l'irradiation.

A 220 m μ , il y a également une augmentation d'environ 20 % de l'extinction avec, comme résultat, de déplacer d'environ 10 m μ le minimum du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde. Nous avons observé que, pour des solutions diluées, les variations spectrales

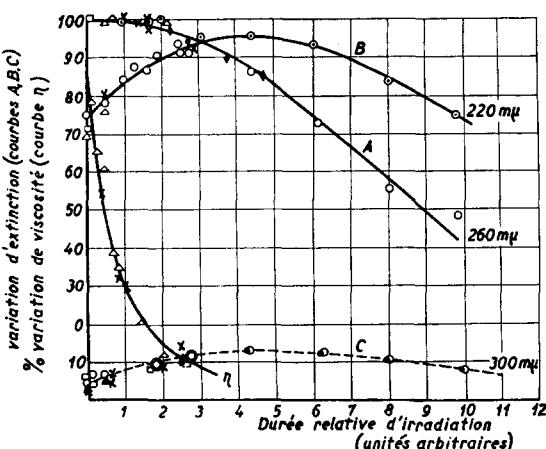


Fig. 6. Variations de l'extinction à 220, 260, 300 m μ des solutions d'acide désoxyribonucléique au cours de la photolyse. La courbe η résulte de la superposition des différentes courbes exprimant la diminution de la viscosité spécifique au cours de l'irradiation. Cet artifice permet de comparer les variations d'extinction de solutions de concentrations différentes

- ◎ : 160 μ g DNA/ml (Lampe Philora)
- ▲ : 336 μ g DNA/ml (Lampe Philora)
- △ : 620 μ g DNA/ml (Lampe Philora)
- × : 337 μ g DNA/ml (Lampe B.T.S.)
- : 037 μ g DNA/ml (Lampe B.T.S.)

se présentent de manière semblable, bien que l'augmentation de l'extinction à 230 m μ et à 300 m μ soit plus considérable et qu'elle ait pour effet de rendre moins apparente la diminution de l'extinction à 260 m μ . A ces dilutions, il est difficile de mesurer la viscosité et les variations du spectre sont notées sur le graphique, selon les intensités que l'on peut calculer d'après les mesures énergétiques à diverses dilutions.

En ce qui concerne la nucléoprotéine, les variations spectrales sont très semblables à celles décrites pour l'acide désoxyribonucléique. Il n'a pas été possible de démontrer des différences significatives de la vitesse de photolyse tant en solution saline diluée (NaCl 0.02 M) qu'en solution molaire.

Toutefois, l'interprétation de ces variations d'extinction reste difficile; il nous a donc paru utile de rechercher chromatographiquement des variations éventuelles dans la constitution en bases azotées de l'acide désoxyribonucléique irradié.

b. Bases azotées de l'acide désoxyribonucléique irradié

Comme il est nécessaire d'obtenir, pour la chromatographie, une quantité d'acide désoxyribonucléique assez considérable dans un volume réduit et dépourvu de sels, nous avons irradié (Philora filtrée par 5 mm d'acide acétique à 10% pendant 30 heures à 43 mm) une solution d'acide désoxyribonucléique contenant environ 70 mg par ml dans NaCl 0.02 M dans une cuvette de 5 mm de profondeur.

On peut calculer que l'énergie incidente est suffisante pour effectuer une photolyse d'environ 65%. Ce chiffre est calculé d'après le graphique 6 en se basant sur les variations de l'extinction des solutions à 220 m μ et à 300 m μ (Tableau I).

TABLEAU I

	DNA témoin	DNA irradié
Extinction 220 m μ	92.7	114.0
260 m μ	148.0	149.0
300 m μ	4.0	12.0

Des volumes égaux des hydrolysats des solutions d'acide désoxyribonucléique témoin et irradié sont disposés alternativement sur un même chromatogramme: les résultats qualitatifs (R_F) sont identiques. L'extraction des bases azotées montre que l'on retrouve seulement 70% des bases pyrimidiques totales dans l'échantillon irradié, alors qu'il est possible de récupérer la presque totalité des purines; il manque environ 8-10% d'adénine (ce qui est proche des limites expérimentales) et la guanine est complètement retrouvée.

DISCUSSION

La nature de la photolyse de l'acide désoxyribonucléique est encore mal connue, ce qui rend difficile l'interprétation des rendements énergétiques dont nous avons déterminé la valeur approximative, en nous basant sur des mesures viscosimétriques. Comparées à la valeur calculée d'après les mesures de HOLLANDER⁸ (basée sur une méthode actinométrique différente), les deux mesures donnent des résultats comparables; les auteurs américains trouvent une valeur semble-t-il, 5 à 10 fois supérieure, ce qui

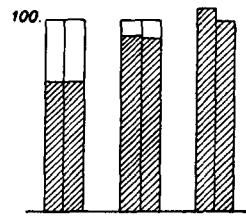


Fig. 7. Proportion des bases retrouvées après irradiation. Rectangles noirs = p.c. base retrouvée A thymine + cytosine; B adenine; C guanine

s'explique peut-être par la variabilité des substrats utilisés. Toutefois, ce rendement est extrêmement faible, plutôt inférieur à celui trouvé par OSTER ET McLAREN¹², pour l'inactivation du virus de la mosaïque du tabac ($\Phi \sim 4 \cdot 10^{-5}$).

On ne connaît pas la nature des liaisons photolysées, mais on peut cependant spéculer qu'une chute de la viscosité de l'ordre de 30% résulte d'une diminution de l'asymétrie des particules d'approximativement 50% (SIMHA)¹⁰ pour une solution de molécules aussi allongées que l'acide désoxyribonucléique, c'est-à-dire qu'il suffirait théoriquement de la photolyse de quelques liaisons internucléotidiques, pour avoir un effet assez considérable sur la viscosité; le rendement quantique de la photolyse de telles liaisons est donc très petit, si on le compare à celui déterminé pour les liaisons peptides ($\Phi \sim 10^{-8}$).

On peut expliquer ceci en supposant la recombinaison des radicaux provenant de la photolyse; ce qui serait favorisé par l'asymétrie de la molécule qui la rend extrêmement peu diffusible. Il peut en outre y avoir une part non négligeable de l'énergie incidente qui intervient dans la recombinaison des fragments (réarrangements) et dans la photolyse des radicaux qui n'ont pas d'influence sur la viscosité.

Quant aux bases pyrimidiques, il serait intéressant de comparer leur photolyse à l'état libre et à l'état combiné, au sein du polynucléotide. La photolyse du radical pyrimidique de la thiamine se fait avec un rendement quantique de 0.0184¹⁶; la photolyse de l'ensemble des pyrimidines dans le désoxyribonucléate peut être calculé approximativement: il est de l'ordre de 0.0025. Des expériences plus spécifiques permettront d'interpréter ce résultat, mais il est remarquable que l'énergie qu'il faut dépenser pour photolyser une base libre et combinée au sein d'une macromolécule est du même ordre de grandeur; de plus, ici comme pour les bases libres⁸, les pyrimidines semblent plus radiosensibles que les purines.

Enfin, la photolyse de la désoxyribonucléoprotéine en solution saline molaire s'effectue sensiblement à la même vitesse (Fig. 5) que celle de l'acide désoxyribonucléique libre. Ce résultat ne doit pas étonner, car on sait que, dans ces conditions de salinité, la nucléoprotéine est fortement dissociée^{11, 4} et hétérogène. Il est, d'autre part, difficile de spéculer sur la photolyse relativement plus lente de la nucléoprotéine: il pourrait y avoir une plus grande perte de lumière par diffusion. Nous avons cependant vérifié qu'à 400 m μ , l'extinction de solutions 2.5 fois plus concentrées que les solutions irradiées les plus concentrées, est, à peu de chose près, identique pour l'acide désoxyribonucléique et pour la nucléoprotéine. Il n'est donc pas exclu que la présence de protéine apporte un certain facteur de stabilité au polynucléotide. Nous avons essayé de trouver un effet plus marqué en irradiant la nucléoprotéine en solution saline diluée, où l'on sait que le complexe nucléoprotéique est moins dissocié. La critère de viscosité étant alors peu sensible, nous avons étudié les variations spectrophotométriques de l'acide désoxyribonucléique libre et combiné: les expériences se sont révélées difficiles à interpréter, car la diminution de l'extinction à 260 m μ est peu marquée en solution diluée — et les solutions plus concentrées de nucléoprotéine diffusent une fraction appréciable de la lumière incidente. Toutefois, nous avons pu nous assurer que ces variations ne sont pas d'un ordre de grandeur très différent pour l'acide désoxyribonucléique libre ou combiné.

RÉSUMÉ

La photolyse à $253.7 \text{ m}\mu$ de l'acide désoxyribonucléique de thymus de veau déterminée par viscosimétrie se fait avec un rendement quantique très bas (de l'ordre de 10^{-6}). Cette photolyse est accompagnée d'une destruction de bases pyrimidiques. Une étude parallèle montre que la photolyse d'une nucléoprotéine de même origine se fait sensiblement à la même vitesse et les variations du spectre d'absorption que l'on peut observer sont qualitativement identiques à ce que l'on observe pour le polynucléotide isolé.

SUMMARY

Photolysis at $253.7 \text{ m}\mu$ of calf thymus desoxyribonucleic acid studied by viscosimetric measurements occurs with a very low quantum yield (of the order of 10^{-6}). A destruction of pyrimidine bases accompanies this photolysis. In a parallel study, the photolysis of nucleoproteins of the same origin takes place at a comparable speed and changes in absorption spectra which can be demonstrated are qualitatively identical for nucleoprotein and desoxyribonucleic acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Die viskosimetrisch bestimmte Photolyse der Desoxyribonukleinsäure von Kalbsthymus geht bei $253.7 \text{ m}\mu$ mit einer sehr niedrigen Quantenausbeute (von der Größenordnung 10^{-6}) vor sich. Diese Photolyse ist von der Zerstörung der Pyrimidinbasen begleitet. Eine Paralleluntersuchung zeigt, dass die Photolyse eines Nukleoproteins gleichen Ursprungs ungefähr mit derselben Geschwindigkeit vor sich geht und dass die Variationen, welche man im Absorptionsspektrum beobachten kann, beim Nukleoprotein qualitativ dieselben sind wie bei der Desoxyribonukleinsäure.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRADFIELD ET M. ERRERA, *Nature*, 164 (1949) 532.
- ² T. CASPERSSON, *Skand. Arch. Physiol.*, 73, suppl. 8, p. 33.
- ³ G. S. FORBES ET L. J. HEIDT, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 2363.
- ⁴ D. C. GAJDUSEK, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 397.
- ⁵ J. M. GULLAND, D. O. JORDAN ET C. J. THRELLFALL, *J. Chem. Soc.*, 56 (1947) 1133.
- ⁶ A. HOLLOWAY, J. P. GREENSTEIN ET W. V. JENRETTE, *J. Nat. Cancer Inst.*, 2 (1941) 23.
- ⁷ K. KUTTNER ET L. LIECHTENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 86 (1930) 671.
- ⁸ J. R. LOOFBOUROW, *Growth*, suppl. vol. XII (1948) 77.
- ⁹ I. MANDL, B. LEVY ET A. D. McLAREN, *J. Am. Chem. Soc.*, 92 (1950) 1790.
- ¹⁰ J. W. MEHL, J. L. ONCLEY ET R. SIMHA, *Science*, 92 (1940) 132.
- ¹¹ A. MIRSKY ET A. W. POLLISTER, *J. gen. Physiol.*, 30 (1946) 101.
- ¹² G. OSTER ET A. D. McLAREN, *J. gen. Physiol.*, 33 (1950) 25.
- ¹³ M. L. PETERMAN ET C. M. LAMB, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 685.
- ¹⁴ B. TAYLOR, J. P. GREENSTEIN ET A. HOLLOWAY, *Arch. Biochem.*, 16 (1948) 19.
- ¹⁵ R. THOMAS, *Congrès nat. des Sciences*, Bruxelles, Mai 1950.
- ¹⁶ F. M. UBER ET F. VERBRUGGE, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 273.
- ¹⁷ L. WHITE ET G. SECOR, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 457.

Reçu le 9 février 1951