

NOUVELLE CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES CONDITIONS DE PRÉCIPITATION ET DE CRISTALLISATION DES PROTÉINES MUSCULAIRES DU GROUPE DU MYOGÈNE

par

A. DISTÈCHE*

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Liège (Belgique)

INTRODUCTION

Nous avons montré, en 1948¹, qu'un diagramme de courbes de solubilité à pH variable et force ionique constante permet d'obtenir une image très complète de la précipitation d'une fraction des albumines musculaires du Lapin en fonction de la concentration en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ du milieu. Chaque protéine du mélange est définie par son minimum de solubilité au point isoélectrique et l'apparition et la disparition du minimum en fonction de la force ionique permet de définir les limites de "salting-out" au p.i. La connaissance précise des conditions expérimentales requises pour amener une protéine du mélange à son minimum de solubilité permet en outre de se placer dans les conditions les plus favorables pour obtenir la cristallisation sélective de ce constituant.

Ces courbes de solubilité (Fig. 1) qui couvrent une étendue de concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ allant de 50.0 à 65.6% de saturation, nous ont permis de déceler 8 constituants dans une fraction des protéines musculaires du Lapin, extractibles à l'eau, et thermostables à 52° C. Cinq de ces constituants ont été obtenus à l'état cristallisé.

Le travail que voici a pour but de décrire les procédés de préparation de chacune de ces fractions cristallines et de

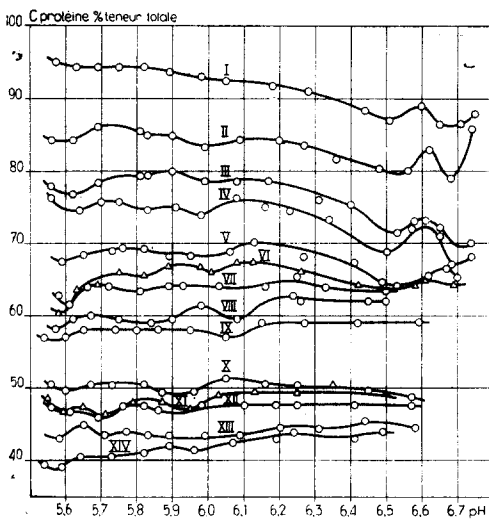


Fig. 1. Courbes de précipitation à pH variable et force ionique constante d'une fraction des albumines musculaires du Lapin, extractibles par l'eau, précipitant entre 50 et 70 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et thermostables à 52° C. Les concentrations molaires en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sont, pour chaque courbe, I: 2.192; II: 2.225; III: 2.258; IV: 2.275; V: 2.308; VI: 2.325; VII: 2.341; VIII: 2.375; IX: 2.401; X: 2.441; XI: 2.475; XII: 2.508; XIII: 2.575; XIV: 2.641 (d'après DISTÈCHE¹).

* Chercheur qualifié du F.N.R.S.

donner, dans la mesure où il a été possible de les déterminer, les propriétés enzymatiques de certaines d'entre elles.

La fraction des albumines musculaires, précipitant entre 50 et 70% de saturation, constituant l'extrait de départ, est préparée selon la méthode décrite précédemment. Indiquons que l'extrait final est rigoureusement amené à 50% de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 22° C.

I. FRACTION RECUEILLIE ENTRE 50.0 ET 58.3% DE SATURATION EN $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 22° C
(2.008 M—2.341 M — Courbes I à VII, Fig. 1)

I. *Fraction cristallisée correspondant au minimum à pH 5.59*

Préparation. A 25 ml d'extrait de départ (50% de saturation) on ajoute lentement 25 ml d'une solution préparée, en complétant à 25 ml avec de l'eau distillée 8.835 gr $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 6.66 ml Na_2HPO_4 0.1 M, 10.00 ml KH_2PO_4 0.1 M.

Après 30 minutes d'agitation en thermostat à 22° C, on recueille le précipité par centrifugation (5 minutes — 12,000 t/m.). Les précipités résultant de 4 ou 6 opérations semblables sont redissous lentement dans le minimum d'eau. Le pH de la solution est ajusté si nécessaire à pH 5.59 au moyen de quelques gouttes de NH_4OH ou H_2SO_4 dilué.

Pour obtenir des cristaux, la solution enrichie en la protéine responsable du minimum 5.59 dans nos courbes de solubilité (Fig. 1) est amenée à saturation en phase amorphe par addition de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ solide. Dès l'apparition d'un trouble, on porte en glacière. La turbidité est éventuellement corrigée après équilibrage des températures. Le tube est bouché au caoutchouc et on s'arrange, si nécessaire, pour éviter tout risque de contamination par des germes cristallins provenant de préparations contenant des cristaux différents de ceux obtenus à pH 5.59, mais préparés à partir du même milieu.

Après quelques jours, des cristaux en plaquettes très fines précipitent (Fig. 2) et sont recueillis par centrifugation pour être soumis à une série de recristallisations successives. Une purification considérable est atteinte en ensemençant le milieu lors de la seconde cristallisation, avec des bipyramides de myogène A (voir page 533). Le précipité ainsi obtenu est mixte; il est recueilli et lavé rapidement à l'eau distillée froide. Les bipyramides plus solubles s'éliminent rapidement, le résidu est centrifugé et recristallisé.

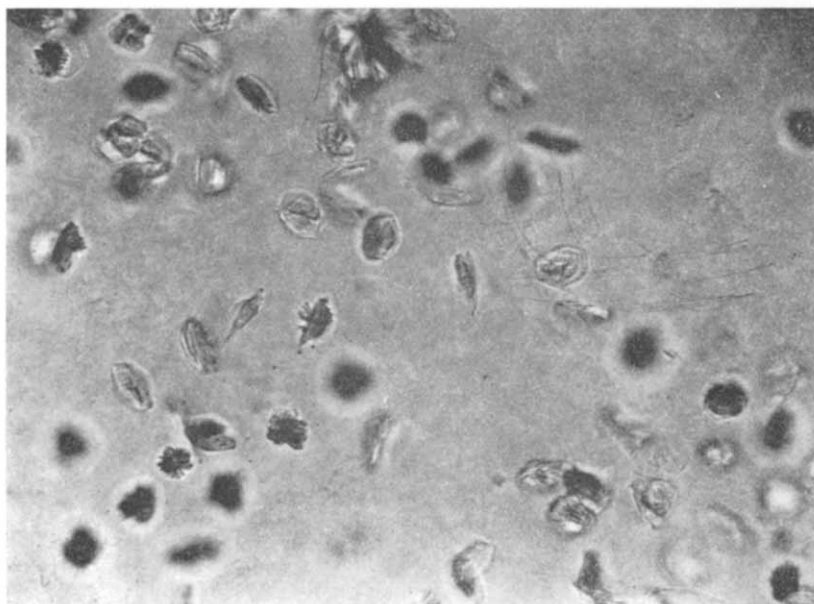


Fig. 2. Fraction cristallisée à pH 5.59, enrichie en glycérophosphate déshydrogénase, préparée à partir d'une fraction amorphe recueillie entre 50 et 58.3% de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

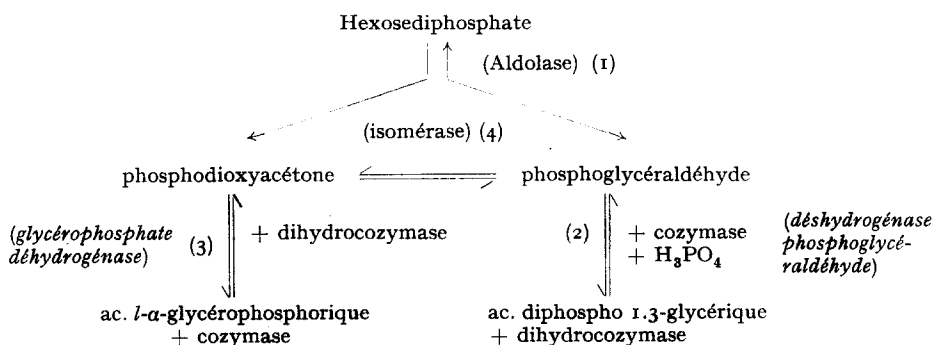
Propriétés enzymatiques. Nous avons trouvé que les cristaux recueillis à pH 5.50 sont riches en glycérophosphate déshydrogénase. On sait que cet enzyme catalyse la réaction:

phosphodioxyacétone + dihydrocozymase \rightleftharpoons ac. *l*- α -glycérophosphorique + cozymase.

BARANOWSKI² a isolé cet enzyme du muscle de Lapin par cristallisation fractionnée à pH 5.45 en tant qu'impureté du myogène A. 100,000 g de la fraction la plus active préparée par cet auteur transforment 26,500 moles de phosphodioxyacétone en 1 minute à 20° C. Les cristaux sont des plaquettes très minces en forme de losanges, alors que nos cristaux sont de fines lamelles formant des hexagones irréguliers.

Nous avons mis l'activité de nos cristaux en évidence au moyen de deux tests enzymatiques décrits par BARANOWSKI. Le premier, analogue au test de WARBURG ET CHRISTIAN pour l'aldolase³, a une valeur qualitative; il exige de l'hexose diphosphate et de la cozymase comme substrat et la préparation de deux enzymes auxiliaires: la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase et l'aldolase. Le second est quantitatif, ne fait intervenir que la réaction catalysée par la glycérophosphate déshydrogénase, mais demande la préparation de phosphodioxyacétone et de cozymase réduite.

Mesures qualitatives sur le système aldolase — glyceraldéhyde déshydrogénase — glycérophosphate déshydrogénase. Rappelons que les réactions enzymatiques mises en jeu dans ce test sont:



Le test de WARBURG ET CHRISTIAN³ pour l'aldolase fait intervenir les réactions 1 et 2. Si on bloque l'activité de la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase par l'acide monoiodoacétique (BARANOWSKI²), dès la fin des réactions 1 et 2, l'addition de glycérophosphate déshydrogénase au milieu provoque la réoxydation de la cozymase réduite résultant de l'activité de la première déshydrogénase. Si on ne bloque pas l'action de la glyceraldéhyde déshydrogénase par l'acide monoiodoacétique, l'addition de glycérophosphate déshydrogénase provoque une transformation partielle de la dihydrocozymase en cozymase, les teneurs finales en cozymase réduite et oxydée dépendant de l'activité respective des deux déshydrogénases. Les réactions se suivent au spectrophotomètre par des mesures de densité optique à 340 m μ , région du spectre où la cozymase réduite présente une forte bande d'absorption caractéristique.

a. *Substrats.* L'hexosediphosphate commercial* a été purifié d'après NEUBERG, LUSTIG ET ROTHENBERG⁴. L'échantillon de cozymase commerciale** utilisé contenait 47 % de cozymase anhydre (dosage d'après LEPAGE⁵).

* de la firme Schwartz.

** de la firme Nutritional Biochemical Corp.

b. *Enzymes auxiliaires.* La phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase du muscle a été préparée d'après CORI, SLEIN ET CORI⁶. L'aldolase a été préparée selon notre méthode décrite page 529.

c. *Composition du test-dosages.* La composition du test est identique à celle décrite par WARBURG ET CHRISTIAN³ pour l'aldolase. La phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase est introduite sous forme de suspension cristalline (0.05 ml). Après 5 minutes, on ajoute l'aldolase (0.02 ml) et on fait démarrer la réaction par l'addition rapide de l'hexosediphosphate. L'activité de la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase est bloquée par addition de 0.1 ml d'acide monoiodoacétique à 13.95 mg/ml (pH 7.4). La glycérophosphate déshydrogénase est ajoutée sous forme de suspension cristalline, l'enzyme s'inactivant rapidement lors de sa dissolution (BARANOWSKI²). Les mesures de densité optique se font au spectrophotomètre de Beckman. La méthode de GORNAL, BARDAWILL ET DAVID⁷ a été utilisée pour évaluer la concentration en protéine.

L'expérience de la Fig. 3 a été réalisée sans emploi de monoiodoacétate. La quantité de glycérophosphate déshydrogénase introduite dans le milieu est suffisante pour provoquer la réoxydation du DPN réduit par la glyceraldéhyde déshydrogénase. L'accroissement de densité optique du temps 0 à 4 m 30 est dû à la présence d'aldolase dans la déshydrogénase auxiliaire.

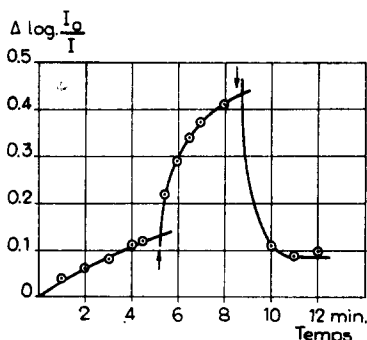


Fig. 3. Variation en fonction du temps de la densité optique à 340 mμ d'un milieu réactionnel contenant, au temps 0, de l'hexosediphosphate, de l'arséniate de Na, du glycolle, de la cystéine et de la glyceraldéhyde déshydrogénase (~ 400 γ). Aux temps 4 min 30" et 8 min ont été ajoutés respectivement 50 γ d'aldolase peu active et 0.02 ml d'une solution concentrée de cristaux enrichis en glycérophosphate déshydrogénase.

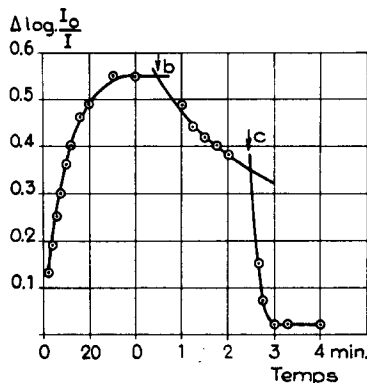


Fig. 4. Variation en fonction du temps de la densité optique à 340 mμ d'un milieu réactionnel identique à celui de la Fig. 3, mais contenant, au temps 0, 700 γ de glyceraldéhyde déshydrogénase. En b et c, respectivement 0.1 ml de monoiodoacétate 0.075 M et 0.002 ml (15 γ) d'une solution de cristaux enrichis en glycérophosphate déshydrogénase ont été ajoutés.

La Fig. 4 illustre une expérience faite avec emploi de monoiodoacétate. Les variations de densité optique entre les points o et b, b et c, sont dues à la présence d'aldolase et de glycérophosphate déshydrogénase dans la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase, cependant cristallisée 5 fois.

Mesures quantitatives d'activité sur le système glycérophosphate déshydrogénase isolé

a. *Substrats: Phosphodioxyacétone:* nous avons préparé, à partir d'hexosediphosphate, par voie enzymatique, un mélange très enrichi en phosphodioxyacétone et phosphoglyceraldéhyde (MEYERHOF ET LOHMAN⁸), contenant environ 70 % de sel anhydre de Ba des 2 trioses avec une teneur en phosphodioxyacétone de 70 %, déterminée par voie enzymatique d'après la méthode de BARANOWSKI².

Cozymase réduite: l'échantillon commercial de cozymase à 47 % utilisé précédemment a été transformé en cozymase réduite par la méthode de VON EULER ET HELLSTRÖM⁹, les concentrations en hydrosulfite, bicarbonate et carbonate ayant été modifiées pour correspondre à celles indiquées par LEPAGE⁵ pour le dosage de la cozymase.

b. *Composition du test-dosages:* le substrat le plus favorable, avec le mélange de trioses que nous avons utilisé, a la composition suivante:

Bibliographie p. 539.

	Test ml	Blanc ml
H ₂ O bidistillée	0.9	1.3
Glycocolle (20 mg/ml)	0.3	0.3
Cystéine-HCl M/10	0.6 ml	
NaOH M/10	0.6 ml	
DPN réduit (pH 7.0)		
($4.9 \cdot 10^{-7}$ moles dans le test)	0.4	0.4
Phosphodioxyacétone		
(sel sodique pH 6.9-7.0)		
($1.3 \cdot 10^{-5}$ moles dans le test)	0.2	0.2

La réaction est déclanchée par addition de l'enzyme (0.002 ou 0.005 ml) et se suit au spectrophotomètre de Beckman par des mesures de densité optique à 340 m μ . Les concentrations en protéines sont déterminées par la méthode de GORNAL, BARDAWILL ET DAVID⁷.

Nous avons rencontré de sérieuses difficultés dans la réalisation du test quantitatif de la glycérophosphate déshydrogénase. Tout d'abord, nous avons constaté (Fig. 5) une forte inhibition par le substrat aux concentrations préconisées par BARANOWSKI ($8.4 \cdot 10^{-4}$ moles dans le test) et nous avons dû choisir, en nous basant sur les résultats reproduits dans la Fig. 5, une concentration en phosphodioxyacétone beaucoup plus faible: $1.3 \cdot 10^{-5}$ moles dans le test. Ensuite, la proportionnalité entre la concentration en protéines et substrat n'a été trouvée correcte que pour des échantillons de faible activité. Les échantillons de forte activité se comportent anormalement, leur activité augmentant avec la dilution dans les limites de concentration étudiées:

	log I ₀ /I après 30 sec	Turnover number
1. a. liquide surnageant après lavage des cristaux en plaquettes avec H ₂ O (90 γ)	0.234	280
b. idem dilué 4 fois (22.5 γ)	0.064	300
2. a. myogène A cristallisé après élimination des plaquettes de forte activité en dés- hydrogénase (625 γ)	0.88	150
b. idem dilué 100 fois (6.25 γ)	0.01	160
3. a. cristaux en plaquettes recristallisés 3 fois (5 γ)	0.23	4800
b. idem dilués 10 fois (0.5 γ)	0.08	16600
4. a. cristaux en plaquettes recristallisés 4 fois (1.15 γ)	0.06	5600
b. idem dilué 10 fois (0.12 γ)	0.03	26000

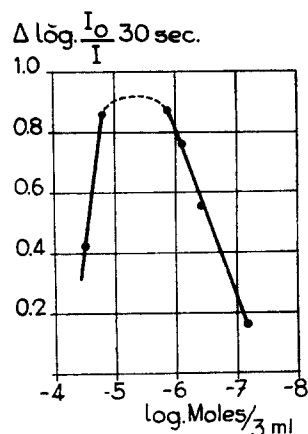


Fig. 5. Inhibition de l'activité de cristaux enrichis en glycérophosphate déshydrogénase en fonction de la concentration du substrat (phosphodioxyacétone). En ordonnée, la variation de densité optique à 340 m μ du milieu réactionnel contenant du glycocolle, de la cystéine, du DPN réduit, de la phosphodioxyacétone, pendant les 30 premières secondes de la réaction. En abscisse, le log₁₀ du nombre de moles de phosphodioxyacétone dans le test (3 ml).

Le nombre d'expériences que nous avons pu faire est insuffisant pour élucider ce problème. La principale difficulté pour entreprendre une étude systématique, en faisant varier très largement la concentration en protéine, consiste à préparer une quantité d'enzyme purifié suffisante et à réaliser les expériences suffisamment vite, l'enzyme s'inactivant quelques minutes après dissolution des cristaux.

Les résultats que nous avons obtenus au moyen des deux tests décrits indiquent toutefois que les cristaux que nous avons isolés à pH 5.59 sont très enrichis en glycéro-

phosphate déshydrogénase et il semble bien que nous puissions attribuer le minimum de solubilité à pH 5.59 dans nos courbes de solubilité (Fig. 1) à cet enzyme. Le fait que ce minimum se reproduit dans toutes les courbes, mais est plus important au niveau des courbes VI et VII, montre que l'on a vraisemblablement affaire à la précipitation de plusieurs protéines de p.i. identiques et de solubilités très voisines. Rappelons que BARANOWSKI² signale l'apparition de plaquettes hexagonales et d'aiguilles lors de cristallisation fractionnée du myogène A à pH 5.5.

Mesure de la constante d'équilibre de la réaction catalysée par la glycérphosphate déshydrogénase. La constante de la réaction a été déterminée en suivant les indications de BARANOWSKI² et en faisant agir l'enzyme sur un échantillon commercial de α et β glycérphosphate sodique contenant 42.5% de *l*- α (dosages faits par la méthode de CARRARA¹⁰).

Nous avons trouvé la valeur $1.48 \cdot 10^4$ en bon accord avec celle publiée par BARANOWSKI: $1.4 \cdot 10^4$.

2. Fraction cristallisée correspondant au minimum à pH 5.83.

Préparation. La précipitation se fait de la même façon que pour la fraction à pH 5.59. La composition de la solution précipitante est pour 25 ml: 8.835 g $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 7.66 ml Na_2HPO_4 0.1 M, 7.00 ml KH_2PO_4 0.1 M.

Pour obtenir les cristaux, on opère comme pour la fraction à pH 5.59. Après quelques jours de glacière, on obtient des cristaux en aiguilles (Fig. 6). A la recristallisation, la forme cristalline ne se modifie pas. L'ensemencement avec des bipyramides de myogène A donne des préparations mixtes comme le montre la Fig. 7, et il convient de prendre toutes les précautions possibles pour éviter l'ensemencement accidentel des préparations d'aiguilles par des bipyramides, le pH 5.83 étant très voisin de la zone de pH où les bipyramides cristallisent les premières (pH 6.00). Nous n'avons pas tenté la redissolution sélective des bipyramides des préparations mixtes comme pour la glycérphosphate déshydrogénase.

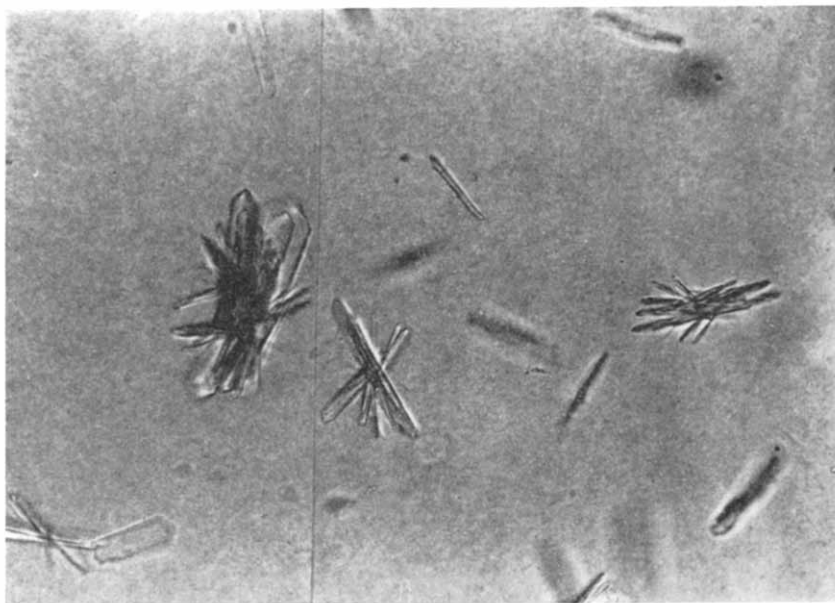


Fig. 6. Fraction cristallisée à pH 5.83, enrichie en aldolase, préparée à partir d'une fraction amorphe des albumines musculaires recueillie entre 50 et 58.3% de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

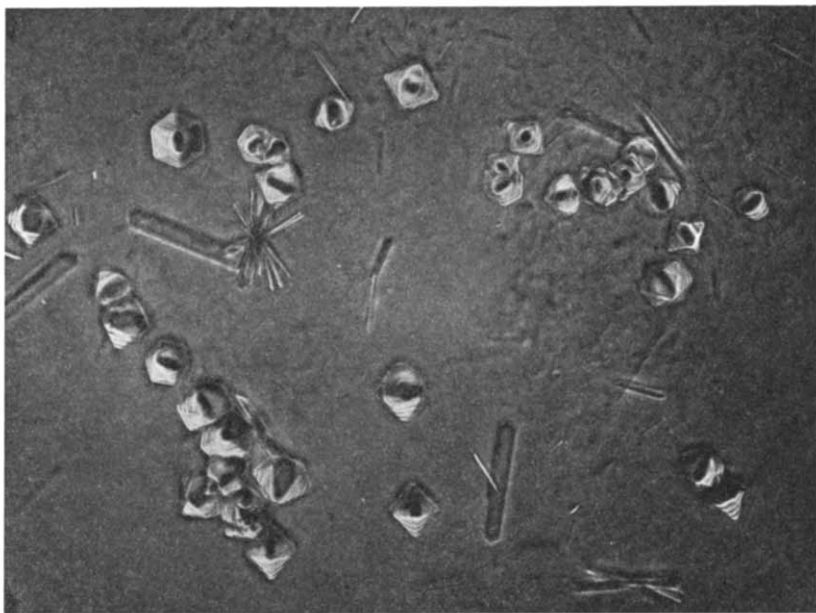


Fig. 7. Préparation mixte de cristaux bipyramidaux (myogène A de BARANOWSKI) et d'aiguilles analogues aux cristaux d'aldolase de la Fig. 6. (Photographie en contraste de phase).

Nous avons montré, en 1948¹, en utilisant le test au cyanure de HERBERT, GORDON, SUBRAHMANYAN ET GREEN¹¹ pour l'aldolase, qu'un échantillon de cristaux de première cristallisation à pH 5.83, possédait une activité égale à 38% de celle trouvée par WARBURG ET CHRISTIAN³ pour l'aldolase cristallisée de muscles de rats. TAYLOR, GREEN ET CORI¹² ont obtenu des cristaux à 40% d'activité semblables à ceux de WARBURG ET CHRISTIAN à partir d'un extrait aqueux de muscles de rat ou de lapin en recueillant la fraction amorphe précipitant à pH 7.5, entre 50 et 52% de saturation. Ces auteurs utilisent à la fois le test au cyanure et le test complexe de WARBURG ET CHRISTIAN (voir page 526). D'après ces auteurs, les fines aiguilles recueillies à pH 7.5 recristallisent sous forme de bipyramides à pH 5.7-6.0 sans modification d'activité. Les bipyramides redissoutes recristallisent en aiguilles à pH 7.5.

DOUNCE ET BEYER¹³, utilisant une méthode colorimétrique pour le dosage des triosephosphates ont confirmé le turnover number de TAYLOR, GREEN ET CORI. Plus récemment cependant, BARANOWSKI ET NIEDERLAND¹⁴ ont montré que les cristaux obtenus par la méthode de TAYLOR, GREEN ET CORI sont aussi actifs que ceux isolés par WARBURG ET CHRISTIAN et semblent admettre que les échecs précédents étaient dus à l'interférence de la glycérphosphate déshydrogénase dans le test de WARBURG ET CHRISTIAN (voir pages 526 et 527). BARANOWSKI ET NIEDERLAND préparent également l'aldolase en aiguilles aux pH alcalins et en bipyramides aux pH acides.

Cette possibilité d'obtenir des formes cristallines différentes à différents pH apparemment pour une même protéine remettait en question l'interprétation de nos courbes de solubilité et il était indispensable de préciser, dans nos courbes, le minimum de solubilité et les limites de précipitation de l'aldolase. Pour arriver à ce résultat, nous avons refait des courbes de solubilité, à pH variable et force ionique constante, mais

au lieu de mesurer la concentration en protéines des liquides surnageants par réfractométrie (DISTÈCHE¹), nous avons mesuré l'activité enzymatique des précipités.

Nous avons de même établi une courbe de salting-out à force ionique variable à pH 5.83, afin de voir si l'évolution du minimum correspondant et faiblement marqué dans nos courbes (Fig. 1) correspondait bien aux limites de relargage de l'aldolase. Le test enzymatique que nous avons utilisé est celui de HERBERT, GORDON, SUBRAHMANYAN ET GREEN, qui consiste à capter les triosephosphates résultant de la scission de l'hexose-diphosphate par HCN, pour ensuite doser le P libéré par hydrolyse alcaline.

Précipitations

a. *Courbes à pH variable*: on opère exactement comme décrit précédemment (DISTÈCHE¹) pour les précipitations et mesures de pH. Les précipités sont redissous dans un peu d'H₂O et chaque solution est amenée à 5 ou 10 ml en ballon jaugé.

b. *Courbes à pH constant—force ionique variable*: on opère comme pour les courbes à pH variable. Les solutions précipitantes contiennent des quantités variables de SO₄(NH₄)₂ et les mêmes quantités de KH₂PO₄ et Na₂HPO₄, de façon à obtenir les forces ioniques des courbes I à VII de la Fig. 1, au pH 5.83.

Test enzymatique, substrat, dosages: nous avons suivi les indications de HERBERT, GORDON, SUBRAHMANYAN ET GREEN¹¹ et nous avons vérifié la proportionnalité activité-concentration en protéine. L'hydrolyse des trioses se fait en présence de NaOH 1 N, pendant 20 minutes à 20° C. Les dosages de P ont été faits sur des parties aliquotes par le procédé d'ALLEN¹⁵. La concentration en protéine a été mesurée par la méthode du biuret de GORNAL, BARDAWILL ET DAVID⁷. L'hexose-diphosphate commercial (Schwartz) a été purifié selon NEUBERG, LUSTIG ET ROTHENBERG⁴.

Les résultats obtenus sont les suivants:

Courbes à pH variable et force ionique constante: la courbe de la Fig. 8 a été obtenue en portant en ordonnée l'activité des précipités exprimée en γ de P libérés dans les conditions expérimentales décrites, divisés par le pourcentage de protéines précipitées mesuré sur les courbes de solubilité de la Fig. 1. On voit que l'activité aldolasique des précipités est un peu plus forte aux pH acides et que le maximum tombe au niveau de 5.7–5.8. D'autres courbes réalisées en mesurant l'activité des liquides surnageants confirment ces expériences en montrant cette fois une activité plus faible du côté acide.

La précision des mesures enzymatiques est insuffisante pour déceler avec précision des minima aussi peu importants que celui à pH 5.83, mais nos mesures montrent que certainement les minima plus importants, à pH 5.52 et 6.70, ne sont pas dus à l'aldolase.

Courbes à pH constant et force ionique variable.

La courbe de la Fig. 9 a été construite en portant en ordonnée le nombre de γ de P libéré dans les conditions décrites et en abscisse la concentration

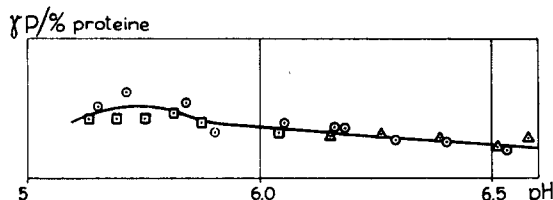


Fig. 8. Activité aldolasique des précipités obtenus à force ionique constante (2.258 M SO₄(NH₄)₂) et pH variable à partir d'un extrait musculaire contenant la fraction des albumines musculaires recueillie entre 50 et 70 % de saturation, thermostable à 52° C (voir Fig. 1).

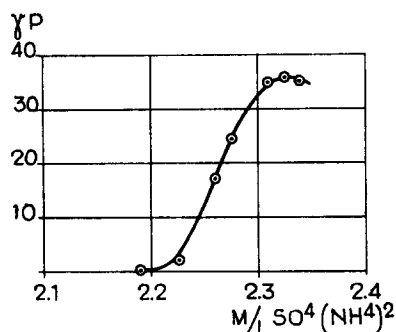


Fig. 9. Activité aldolasique des précipités obtenus à pH constant (5.83) et force ionique variable (2.192 M à 2.341 M SO₄(NH₄)₂) à partir d'un extrait identique à celui décrit Fig. 8 (voir aussi Fig. 1).

finale du milieu en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. La courbe a la forme caractéristique d'une courbe de salting-out. En comparant l'évolution du minimum de solubilité au pH 5.83 du diagramme Fig. 1 à la courbe Fig. 9, on observe un parallélisme excellent. En effet, le minimum à pH 5.83 cesse d'être apparent à la courbe V (2.308 M) à pH variable, et la courbe de salting-out montre que l'aldolase est complètement précipitée à cette même concentration. Le minimum réapparaissant au pH 5.80 depuis la courbe VI à la courbe IX (Fig. 1), doit donc être dû à une protéine différente de l'aldolase, mais de propriétés très voisines.

Préparation d'aldolase cristallisée d'activité maximum. D'après les résultats qui précèdent, le précipité le plus riche en aldolase est obtenu à pH 5.83, en recueillant la fraction précipitant entre 2.008 et 2.308 M en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. La cristallisation donne des aiguilles semblables à celles de la Fig. 6 et après deux recristallisations, l'activité déterminée par le test de HERBERT, après redissolution des cristaux dans H_2O , est telle que 150,000 g d'enzyme décomposent, à 38° C, 9.200 moles d'hexosediphosphate en 1 minute. On sait que les cristaux d'activité maximum de WARBURG ET CHRISTIAN décomposent 10.430 moles par minute, dans les mêmes conditions.

Les différentes formes cristallines de l'aldolase: nous n'avons pas fait d'étude systématique de cette propriété signalée par TAYLOR, GREEN ET CORI¹², BARANOWSKI ET NIEDERLAND¹⁴, ne possédant pas de données de solubilité à pH 7.5, valeur utilisée par ces auteurs pour séparer l'aldolase cristallisée. Rien ne peut faire prévoir ce que la recristallisation d'une telle fraction peut donner à des pH plus acides (5.7-6.0) pour lesquels on tombe dans la région des minima de nos courbes de solubilité.

Signalons qu'au moyen de notre méthode, on peut obtenir des préparations contenant à la fois des aiguilles et des bipyramides à des pH allant de 5.8 à 6.1. Vers 5.8, les aiguilles apparaissent les premières, vers 6.1, les bipyramides se séparent d'abord. La recristallisation des aiguilles à pH 5.83 donne toujours des aiguilles. Des bipyramides n'apparaissent que si on ensemence avec du myogène A.

3. Fraction cristallisée correspondant au minimum à pH 6.00

Préparation. La précipitation se fait de la même façon que pour les fractions à pH 5.59 et 5.83. La composition de la solution précipitante est, pour 25 ml: 8.835 g $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 8.33 ml Na_2HPO_4 0.1 M, 5 ml KH_2PO_4 0.1 M.

Pour obtenir les cristaux, l'opération est conduite de la même façon que pour la fraction à pH 5.83. La Fig. 10 représente les cristaux obtenus, photographiés en contraste de phase.

Les cristaux que nous séparons à pH 6.00 ont une forme identique à ceux décrits par BARANOWSKI^{16, 17}, sous le nom de myogène A.

Le myogène A, préparé selon BARANOWSKI, se cristallise à pH 5.95 à partir de la totalité de l'extrait de départ que nous utilisons pour nos mesures de solubilité. Le myogène A ne possède pas d'activité enzymatique spécifique connue mais entraîne aisément divers enzymes lors de sa cristallisation: l'aldolase (de 15 à 35%), l'isomérase, la glycérophosphate déshydrogénase (ENGELHARDT¹⁸, MEYERHOF ET BECK¹⁹, TAYLOR, GREEN ET CORI¹², BARANOWSKI ET NIEDERLAND¹⁴).

Nous n'avons pas fait de mesures systématiques d'activité sur les fractions obtenues par notre méthode. Signalons toutefois que nous avons pu préparer, à partir du liquide surnageant obtenu après cristallisation de la glycérophosphate déshydrogénase (voir page 525), des cristaux bipyramidaux ne possédant que 3% de l'activité maximum de WARBURG ET CHRISTIAN pour l'aldolase et 0.3% de l'activité maximum de BARANOWSKI pour la glycérophosphate déshydrogénase.

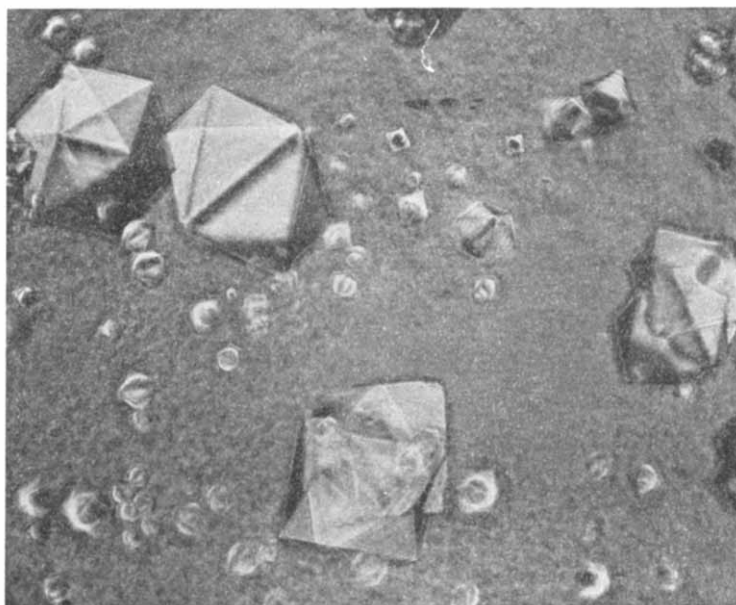


Fig. 10. Fraction cristallisée à pH 6.00, analogue au myogène A de BARANOWSKI, préparée à partir d'une fraction amorphe des albumines musculaires recueillie entre 50.0 et 58.3 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. (Photographie en contraste de phase).

D'après BARANOWSKI ET NIEDERLAND¹⁴, le myogène A est homogène à l'électrophorèse, mais sa mobilité décroît avec l'accroissement de la teneur en aldolase.

Nous avons effectué un certain nombre d'électrophorèses de myogène A préparé selon la méthode initiale de BARANOWSKI^{16,17}. Après une migration prolongée, nous avons observé l'existence d'au moins deux gradients de mobilité voisine. L'appareillage utilisé est du type Longworth, décrit par DUBUISSON, DISTÈCHE ET DEBOT²⁰.

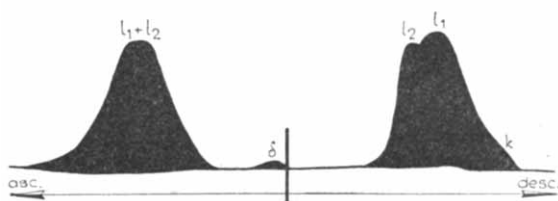


Fig. 11. Diagramme électrophorétique d'une solution de myogène A, préparé suivant la méthode de BARANOWSKI (16-17), lavé 3 fois avec du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.35 saturation. Conditions expérimentales: $I/2 = 0.15$, pH 7.52; tampon phosphatique; temps: ascendant 25440 sec, descendant 25020 sec; champs: ascendant 4.7 V/cm, descendant 4.6 V/cm.

a. pH 7.52 $I/2$ 0.15 (tampon phosphatique). Le myogène A est cristallisé une fois, lavé avec du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 35% de saturation. On distingue deux gradients du côté ascendant (Fig. 11). Les mobilités sont:

gradients (nomenclature du JACOB ²¹)		Mobilités ascendantes descendantes
l_2	—	1.4
l_1	1.6	1.6

b. pH 6.62 $I/2$ 0.15 (tampon phosphatique). La même préparation que ci-dessus a été utilisée. Du côté ascendant (Fig. 12), il y a deux gradients distincts et si on compare avec le cliché à pH 7.52, on voit que la proportion des deux bandes l_1 et l_2 est modifiée. Les mobilités sont:

Bibliographie p. 539.

	Mobilités ascendantes	descendantes
l_2	0.8	0.9
l_1	—	1.2

On remarque qu'à pH 7.52, la bande unique ascendante migre à la vitesse de la bande descendante la plus rapide et qu'à pH 6.62, la bande ascendante migre avec la vitesse de la bande descendante la plus lente.

Ces mesures montrent que le myogène A, préparé selon BARANOWSKI, est inhomogène à l'électrophorèse si l'on prolonge suffisamment l'expérience. La diminution de mobilité décrite de façon sommaire par BARANOWSKI ET NIEDERLAND, au fur et à mesure de l'enrichissement en aldolase des cristaux de myogène A, correspondant à une élévation de p.i. de 5.9 à 6.2, doit être acceptée avec prudence si l'on tient compte de nos observations. Les courbes de mobilité en fonction du pH devraient être tracées pour l_1 et l_2 , pour des préparations contenant des teneurs différentes d'aldolase. Le meilleur contrôle consisterait à ajouter de l'aldolase pure au myogène A, afin de voir sur quelle composante se porte l'augmentation de concentration.

4. Fraction cristallisée correspondant au minimum à pH 6.70

Préparation: on opère comme pour les fractions précédentes. La composition de la solution précipitante est, pour 25 ml: 8.835 g $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 14 ml Na_2HPO_4 0.1 M, 3 ml K_2SO_4 0.2 M.

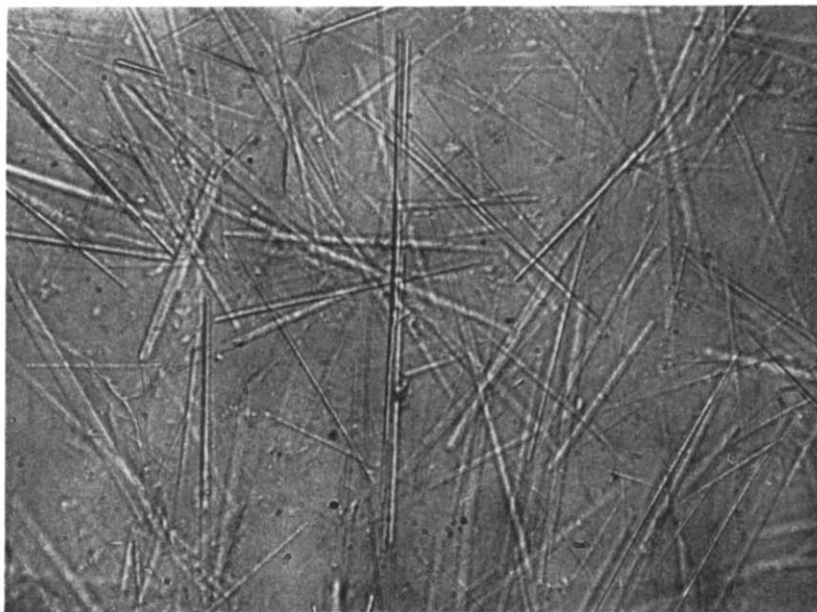


Fig. 13. Fraction cristallisée à pH 6.70, préparée à partir d'une fraction amorphe des albumines musculaires, recueillie entre 50.0 et 58.3 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Bibliographie p. 539.

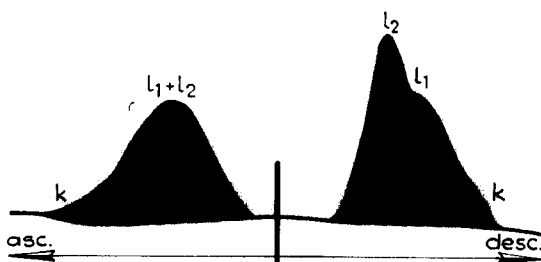


Fig. 12. Diagramme électrophorétique de la même solution de myogène A décrite Fig. 11. Conditions expérimentales: $I/2 = 0.15$; pH: 6.62; tampon phosphatique; temps: ascendant 21.120 sec, descendant 21.540 sec; champs: ascendant 4.76 V/cm; descendant 4.65 V/cm.

La cristallisation de cette fraction est difficile à réaliser, le milieu devenant très thixotrope. Il faut diluer jusqu'à ce que la solution ne se gélifie plus après repos; ensuite, après saturation en phase amorphe, réajuster le pH, vérifier à nouveau la turbidité et mettre en glacière. On obtient, après quelques jours, des cristaux très longs et fins (Fig. 13).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de description correspondant à cette fraction des albumines musculaires. HERBERT, GORDON, SUBRAHMANYAN ET GREEN¹¹ signalent l'apparition de longues aiguilles sans activité lors de la préparation d'aldolase amorphe. Le myogène B de BARANOWSKI¹⁷, que l'on prépare difficilement dans les eaux mères de cristallisation du myogène A, ressemble à nos cristaux. BAILEY²² a isolé des cristaux analogues à ceux de BARANOWSKI mais à partir d'une fraction recueillie entre 65 et 75 % de saturation.

Nous n'avons pas recherché l'activité enzymatique de cette fraction.

II. FRACTION RECUEILLIE ENTRE 58.3 ET 60.7 % DE SATURATION EN $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 22° C (2.341 M—2.441 M — courbes VII à X, Fig. 1)

Fraction cristallisée correspondant au minimum à pH 6.07

Nous avons préparé ces cristaux (DISTÈCHE²³) non seulement à partir de notre extrait type, mais également à partir d'extraits obtenus selon la méthode de COLOWICK ET KALCKAR²⁴ pour la myokinase et d'extraits de poudre de pulpe de muscles, séchée après traitement à l'acétone (DUBUISSON²⁵).

Préparation à partir d'un extrait préparé d'après COLOWICK ET KALCKAR²⁴. L'extrait aqueux de muscles de Lapin est chauffé à 90° après addition de 0.05 volume de HCl N. Après élimination du précipité, les protéines restantes sont concentrées par précipitation à 80 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et redissolution dans H_2O . Après dialyse contre de l' H_2O distillée jusqu'à élimination du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, on amène la solution exactement à 50 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 22°, en opérant comme pour l'extrait type (DISTÈCHE¹) utilisé pour nos mesures de solubilité.

Une série de fractions ont été précipitées par notre méthode habituelle aux pH des divers minima dans la fraction 2.008–2.441 M (courbes I à X). La majeure partie du précipité amorphe est recueillie aux environs de 2.341 M en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Dans tous les échantillons, nous avons recueilli des cristaux globulaires (Fig. 14). La précipitation était le plus abondante au niveau du pH 6.00. Aux pH plus acides, les cristaux sont plus petits.

Préparation à partir d'un extrait de poudre séchée de pulpe musculaire lavée à l'acétone (DUBUISSON²⁵). La pulpe musculaire est lavée avec 5 fois 1 volume d'acétone, ensuite séchée à température ordinaire et broyée finement. La poudre est ensuite extraite par 10 volumes d' H_2O ou 10 volumes de tampon phosphatique $I/2$ 0.15, pH 7.1. Les protéines sont concentrées comme décrit plus haut et, en opérant de même pour les cristallisations, on obtient les mêmes cristaux globulaires. La cristallisation est possible à d'autres pH, mais plus abondante au pH 6.00.

Préparation à partir de l'extrait type. La fraction amorphe précipitant entre 58.3 et 60.7 % de saturation a été recueillie aux pH 5.60 et 6.07. On précipite d'abord la fraction 50.0–58.3 % de saturation aux pH 5.60, 6.07, en opérant comme déjà décrit (solutions précipitantes identiques à celles utilisées pour la glycérophosphate déshydrogénase et le myogène A). Après centrifugation, on ajoute au liquide surnageant la quantité de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ nécessaire pour atteindre 60.7 % de saturation. Après centrifugation des précipités ténus, la cristallisation se fait selon la méthode habituelle.

A pH 6.07, on obtient les mêmes cristaux globulaires qu'à partir des deux extraits précédents.

Aux pH plus acides, 5.60 et 5.70, des cristaux très ténus ont été observés en amas irréguliers. On ne peut leur attribuer une forme bien définie.

Nous n'avons pas trouvé de description de cristaux analogues dans la littérature relative aux protéines musculaires. Signalons toutefois que CHROBAK ET BARANOWSKI²⁶ ont obtenu des préparations vieilles de myogène A qui ressemblent aux cristaux obtenus à pH 6.07. Comme, d'autre part, ces cristaux peuvent s'isoler à partir de l'extrait utilisé par COLOWICK ET KALCKAR²⁴ pour préparer la myokinase, nous avons tenté de rechercher cette activité dans nos préparations. Nous avons dû abandonner ce projet, n'ayant

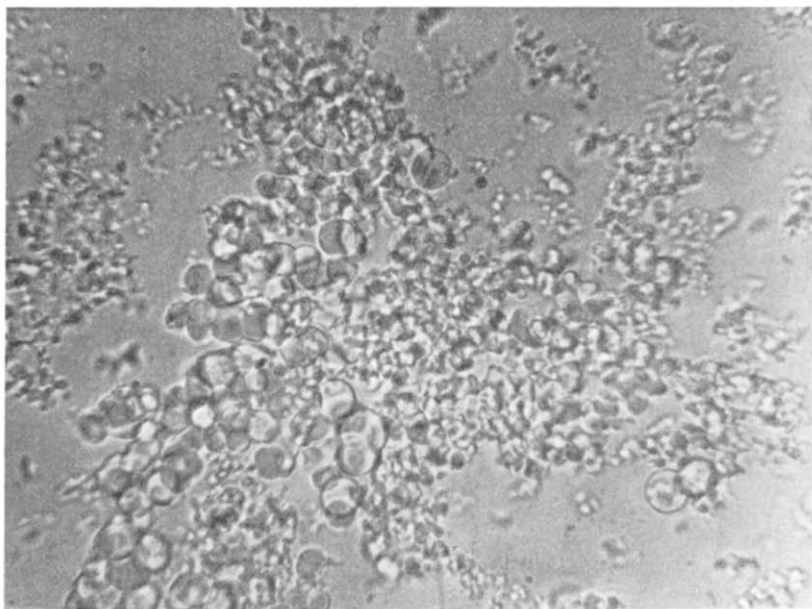


Fig. 14. Fraction cristallisée à pH 6.07, obtenue à partir des albumines musculaires résistant à une température de 90°, en présence d'HCl 0.05 *N* (conditions utilisées par COLOWICK ET KALCKAR²⁴ pour préparer la myokinase).

malheureusement pas réussi à préparer de l'hexokinase suffisamment active, faute de levure convenable. Les résultats qualitatifs obtenus ne nous permettent que de conclure à la présence d'une quantité importante de myokinase dans le précipité amorphe recueilli entre 58.3 et 60.7% de saturation, à partir de l'extrait type. L'extrait de pulpe séchée est également actif.

DISCUSSION

Ces résultats sont très encourageants quant à l'efficacité de la méthode de fractionnement que nous avons basée sur les données fournies par notre diagramme de courbes de solubilité.

Bien que le pouvoir analytique de la méthode des courbes de solubilité à pH variable et force ionique constante soit élevé, les variations de solubilité relevées au niveau du p.i. sont trop peu importantes pour envisager avec succès l'enrichissement d'un précipité amorphe en une protéine donnée. Cet enrichissement, et le fait que chaque constituant est en même temps amené exactement à son p.i., sont cependant des facteurs suffisants pour déclencher, dans les cas favorables, la précipitation sélective d'espèces cristallines morphologiquement bien définies et distinctes. A priori, le fait que ces cristaux sont obtenus dans des milieux très complexes, que l'on peut encore considérer comme des extraits bruts, peut paraître défavorable à cause de l'entraînement presque certain d'une quantité importante d'impuretés lors de la cristallisation d'un des constituants du mélange, entraînement qui devient minime quand la cristallisation est utilisée comme moyen ultime de purification après toute une série de fractionnements préliminaires. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus pour l'aldolase et la

glycérophosphate déshydrogénase montrent que l'enrichissement provoqué par la cristallisation sélective est très important: l'aldolase a été obtenue avec une activité pratiquement égale à la plus haute réalisée par d'autres méthodes plus compliquées: les cristaux à forte activité en glycérophosphate déshydrogénase que nous avons préparés se sont révélés 70 fois plus actifs que les bipyramides de myogène A isolées, à partir du même milieu, après élimination de la déshydrogénase.

Il semble que, du moins dans les cas favorables comme celui que nous avons rencontré en étudiant les albumines musculaires, on ait avantage à utiliser la cristallisation sélective dès les premières étapes de fractionnement.

Cet avantage est très marqué dans le cas qui est le nôtre, où le fractionnement est entrepris sans aucune idée directive quant à la nature et les propriétés spécifiques des substances à isoler. Le repérage des constituants dans les précipités amorphes devient dans ce cas très laborieux et le travail est grandement facilité si l'on peut obtenir rapidement des fractions cristallines distinctes, de façon reproductible.

Dans les fractionnements qui consistent à rechercher une substance donnée à propriété spécifique connue et facilement mesurable, la méthode empirique habituelle est par contre certainement la plus efficace et surtout plus rapide. La méthode des courbes de solubilité à pH variable et force ionique constante n'aurait de raison d'être dans ce cas que pour donner des indications précises dans les étapes de purification ultimes consistant en des précipitations répétées au p.i. et la recherche des conditions favorables à la cristallisation.

Nous examinerons, dans un prochain article, quelques aspects théoriques concernant ces diagrammes de solubilité qui peuvent servir non seulement à des fins préparatives, mais aussi à obtenir des renseignements importants sur le comportement des protéines en solution.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Monsieur le Professeur M. DUBUISSON pour ses conseils, ses encouragements et la constante attention avec laquelle il a suivi ce travail, que nous avons pu entreprendre grâce aux subsides du Fonds National de la Recherche Scientifique.

Nous remercions très vivement le personnel du Laboratoire de Biologie générale pour son aide technique importante.

RÉSUMÉ

A. Les cristaux en plaquettes isolés à pH 5.59, entre 50 et 58.3 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ont une forte activité glycérophosphate déshydrogénasique démontrée à la fois par le test modifié de WARBURG ET CHRISTIAN pour l'aldolase et le test spécifique de l'enzyme.

Les mesures d'activité révèlent un comportement anormal à la dilution; le turnover number obtenu par BARANOWSKI n'a pu être retrouvé.

La constante d'équilibre de la réaction est $1.48 \cdot 10^4$ en bon accord avec la valeur trouvée par BARANOWSKI.

La possibilité que la fraction cristallisée, séparée à pH 5.59 de l'extrait de départ, soit constituée d'une protéine inconnue entraînant de fortes proportions de glycérophosphate déshydrogénase n'est pas exclue.

B. Les cristaux en aiguilles isolés à pH 5.83, entre 50 et 58.3 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, ont une activité aldolasique importante.

L'analyse de la précipitation de l'enzyme par des courbes de solubilité nous a permis de préciser les conditions les meilleures pour obtenir le précipité amorphe le plus riche en aldolase. Les cristaux préparés à partir de ce précipité ont une activité sensiblement égale à celle des préparations les plus

actives signalées jusqu'à présent (WARBURG ET CHRISTIAN, BARANOWSKI ET NIEDERLAND). Ces mesures de solubilité ont facilité l'interprétation de notre diagramme de solubilité à pH 5.83.

C. Les cristaux bipyramidaux que nous isolons à pH 6.00 sont morphologiquement semblables au myogène A de BARANOWSKI.

Des cristaux de myogène A possédant seulement 3 % de l'activité maximum de l'aldolase et 0.3 % de l'activité maximum de la glycérophosphate déshydrogénase, ont été obtenus.

L'électrophorèse prolongée de myogène A préparé selon BARANOWSKI révèle la présence de deux composantes et un comportement anormal en fonction du pH.

D. Les cristaux en aiguilles très longues, isolés à pH 6.70, ne paraissent pas avoir été décrits dans la littérature relative aux protéines musculaires. Nous n'en avons pas recherché les propriétés.

E. Les cristaux globulaires isolés à pH 6.07 entre 58.3 et 60.7 % de saturation à partir de notre extrait de départ, ont été obtenus également à partir de deux autres extraits: un extrait identique à celui utilisé par COLOWICK ET KALCKAR pour préparer de la myokinase et un extrait de poudre de pulpe musculaire lavée à l'acétone et séchée. La fraction amorphe recueillie entre 58.3 et 60.7 % de saturation à partir de l'extrait de départ, possède une activité myokinase. Aucune mesure n'a été faite sur les cristaux.

SUMMARY

A. Plate-shaped crystals, isolated at pH 5.59 between 50 and 58.3 % saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ have a strong glycerophosphate dehydrogenase activity demonstrated by the modified test of WARBURG AND CHRISTIAN for aldolase and the specific enzymic test.

The activity measurements reveal an abnormal behaviour on dilution; the turnover number obtained by BARANOWSKI has not been confirmed.

The equilibrium constant of the reaction is $1.48 \cdot 10^4$ in good accordance with the value found by BARANOWSKI.

The possibility that the crystallised fraction, separated at pH 5.59 from the initial extract, be composed of an unknown protein retaining large proportions of glycerophosphate dehydrogenase is not excluded.

B. Needle-shaped crystals, isolated at pH 5.83, between 50 and 58.5 % saturation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, have an important aldolase activity.

The analysis of precipitation of the enzyme by solubility curves gives the best conditions for obtaining the amorphous precipitate richest in aldolase. The crystals prepared from this precipitate have an activity approximately equal to that of the most active preparations so far reported (WARBURG AND CHRISTIAN, BARANOWSKI AND NIEDERLAND). These solubility measurements have facilitated the interpretation of our solubility diagram at pH 5.83.

C. Bipyramid crystals isolated at pH 6.00 are morphologically similar to the myogen A of BARANOWSKI.

Crystals of myogen A possessing only 3 % maximum activity of aldolase and 0.3 % maximum activity of glycerophosphate dehydrogenase have been obtained.

Prolonged electrophoresis of myogen A prepared according to BARANOWSKI reveals the presence of two components and an abnormal behaviour depending on pH.

D. Very long needle-shaped crystals, isolated at pH 6.70, have not been described in the literature in relation with muscular proteins. We have not studied their properties.

E. Globular crystals, isolated at pH 6.07 between 58.3 and 60.7 % saturation from our initial extract, have been obtained equally from two other extracts: an extract identical with that used by COLOWICK AND KALCKAR to prepare myokinase and an extract of powdered muscular pulp washed with acetone and dried. The amorphous fraction collected between 58.3 and 60.7 % saturation from the initial extract, possesses a myokinase activity. No determinations have been carried out on the crystals.

ZUSAMMENFASSUNG

A. Die bei pH 5.59 und einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung zwischen 50 und 58.3 % als Plättchen isolierten Kristalle haben eine starke Glycerophosphatdehydrogenaseaktivität, wie mit dem modifizierten Test von WARBURG UND CHRISTIAN für Aldolase und dem für dieses Enzym spezifischen Test nachgewiesen wurde.

Die Aktivitätsmessungen ergaben ein abnormales Verhalten bei der Verdünnung. Die von BARANOWSKI erhaltene Aktivität konnte nicht wieder gefunden werden.

Die Reaktionsgleichgewichtskonstante ist $1.48 \cdot 10^4$; in guter Übereinstimmung mit dem von BARANOWSKI gefundenen Wert.

Bibliographie p. 539.

Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass die bei pH 5.59 aus dem Ausgangsextrakt abgetrennte Kristallfraktion aus einem unbekannten Protein besteht, das grosse Mengen Glycerophosphatdehydrogenase mit sich reisst.

B. Die bei pH 5.83 und einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung zwischen 50 und 58.3 % als Nadeln isolierten Kristalle zeigen eine hohe Aldolaseaktivität.

Die Analyse des Enzymniederschlags mittels der Lösungskurven erlaubte uns die besten Bedingungen zu präzisieren, bei denen der amorphe Niederschlag am meisten Aldolase enthält. Die Aktivität der aus diesem Niederschlag dargestellten Kristalle ist nahezu gleich der, der bisher als meist aktiv beschriebenen Präparate (WARBURG UND CHRISTIAN, BARANOWSKI UND NIEDERLAND).

Die Löslichkeitsmessungen haben die Auslegung des Löslichkeitsdiagrammes bei pH 5.83 erleichtert.

C. Die bipyramydalen Kristalle, die wir bei einem pH von 6.00 isolierten sind morphologisch dem Myogen A von BARANOWSKI ähnlich.

Es wurden Myogen-A-Kristalle erhalten, die nur 3 % der maximalen Aldolaseaktivität und 0.3 % der maximalen Glycerophosphatdehydrogenaseaktivität besitzen.

Die verlängerte Elektrophorese des nach BARANOWSKI dargestellten Myogens A zeigte die Anwesenheit von zwei Bestandteilen und ein abnormales Verhalten in Abhängigkeit vom pH.

D. Die bei pH 6.70 als sehr lange Nadeln isolierten Kristalle scheinen in der Literatur über Muskelproteine noch nicht beschrieben worden zu sein. Wir haben ihre Eigenschaften nicht untersucht.

E. Die bei einem pH 6.07 und einer Sättigung zwischen 58.3 und 60.7 % aus unserem Ausgangsextrakt isolierten kugeligen Kristalle wurden ebenfalls aus zwei anderen Extrakten gewonnen; nämlich aus einem Extrakt welcher dem von COLOWICK UND KALCKAR zur Darstellung der Myokinase benutzten gleicht und aus einem Extrakt von mit Aceton gewaschenem und getrockneten Muskelbreipulver. Die zwischen 58.3 und 60.7 % Sättigung aus dem Ausgangsextrakt gesammelte amorphe Fraktion besitzt Myokinaseaktivität. Mit diesen Kristallen wurden keine Messungen durchgeführt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. DISTÈCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 265.
- ² T. BARANOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 535.
- ³ O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 314 (1939) 149.
- ⁴ C. NEUBERG, H. LUSTIG ET M. A. ROTHENBERG, *Arch. Biochem.*, 3 (1944) 33.
- ⁵ G. A. LEPAGE, *Manometric techniques and tissue metabolism*. Umbreit, W. W. Burris, R. H. et Stauffer, J. F. Burgess Publ. Co. Minneapolis, 1949, p. 215.
- ⁶ G. T. CORI, M. W. SLEIN ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 565.
- ⁷ A. G. GORNAL, C. J. BARDAWILL ET M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- ⁸ O. MEYERHOF ET K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 271 (1934) 89.
- ⁹ H. VON EULER ET H. HELLSTRÖM, *Z. Physiol. Chem.*, 33 (1938) 252.
- ¹⁰ G. CARRARA, *Gi. Chim. ind. Applicato*, 14 (1932) 236.
- ¹¹ D. HERBERT, H. GORDON, V. SUBRAHMANYAN ET D. E. GREEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1108.
- ¹² J. F. TAYLOR, A. A. GREEN ET G. T. CORI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 591.
- ¹³ A. L. DOUNCE ET G. T. BEYER, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 161.
- ¹⁴ T. BARANOWSKI ET T. R. NIEDERLAND, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 543.
- ¹⁵ R. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- ¹⁶ T. BARANOWSKI, *Compt. rend. soc. biol.*, 130 (1939) 1182.
- ¹⁷ T. BARANOWSKI, *Biochimia*, 5 (1940) 174.
- ¹⁸ V. A. ENGELHARDT, *Yale J. Biol. Med.*, 15 (1942) 21.
- ¹⁹ O. MEYERHOF ET L. V. BECK, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 109.
- ²⁰ M. DUBUISSON, A. DISTÈCHE ET A. DEBOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 97.
- ²¹ J. JACOB, *Biochem. J.*, 41 (1946) 83.
- ²² K. BAILEY, *Nature*, 145 (1940) 934.
- ²³ A. DISTÈCHE, *Nature*, 164 (1949) 70.
- ²⁴ S. P. COLOWICK ET H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 117.
- ²⁵ M. DUBUISSON, *Experientia*, 7 (1950) 269.
- ²⁶ L. K. CHROBAK ET T. BARANOWSKI, *Compt. rend. acad. sci. U.R.S.S.*, 28 (1940) 724.

Reçu le 31 octobre 1952