

SUR LE MÉCANISME DE PROTECTION DE LA TRYPSINE PAR Ca^{++} OU Mn^{++}

par

LUIGI GORINI ET FRANÇOISE FELIX

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

On sait que la trypsine, en solution dans des conditions de pH et de température permettant l'action protéolytique, s'autolyse: cette autolyse se manifeste à la fois par une diminution progressive de l'activité enzymatique et par une formation graduelle de produits d'hydrolyse¹. Dans le but d'étudier le mécanisme de la protection de la trypsine par Ca^{++} et par Mn^{++} ^{2,3}, nous avons commencé par étudier l'influence de ces métaux sur l'autolyse de l'enzyme en question. *A priori*, deux mécanismes se présentent à l'esprit, qui pourraient expliquer l'action protectrice de l'un ou de l'autre de ces métaux vis à vis de cette autolyse. Il a été établi sur des substrats complexes^{2,3} ou simples⁴ que Ca^{++} et Mn^{++} augmentent l'action protéolytique de la trypsine en favorisant l'action d'une plus grande quantité d'enzyme. On peut alors penser^{2,3} que le métal agit en déplaçant un équilibre entre trypsine inactive et trypsine active, en faveur de cette dernière; le substrat, constitué par la trypsine inactive, diminue donc, et, comme sa concentration est le facteur limitant de l'hydrolyse, la vitesse de celle-ci diminue. On peut supposer d'autre part que le métal agit en diminuant la sensibilité de la trypsine à sa propre attaque protéolytique de façon comparable à ce qui se passe dans le cas d'autres protéines, telles que la sérumbumine⁵ ou le lysozyme⁶, soumises à l'action de la trypsine. Cette diminution de sensibilité pouvant elle-même être due soit à ce que l'affinité entre l'enzyme et son substrat se trouve réduite, soit à ce que le complexe enzyme-substrat se décompose plus lentement.

L'étude de l'autolyse elle-même d'une part, l'étude de l'influence de Ca^{++} et de Mn^{++} sur la sensibilité à la trypsine libre de dérivés de la trypsine enzymatiquement inactifs mais "non dénaturés" d'autre part, et d'autre part enfin l'étude de l'influence de ces métaux vis à vis de l'action de la trypsine sur un substrat tel que chaque molécule d'enzyme en jeu ne puisse exercer qu'une seule fois son action, ces trois études confirment l'hypothèse que Ca^{++} et Mn^{++} diminuent la sensibilité de la trypsine à sa propre attaque.

Influence de Ca^{++} et de Mn^{++} sur l'autolyse de la trypsine

L'autolyse est effectuée en maintenant à 36° de la trypsine* (cristallisée, Worthington; débarrassée du MgSO_4 par dialyse) en solution dans du tampon borate ($5 \cdot 10^{-2} M$) à pH 7.9, contenant ou non le chlorure de l'un des métaux ($10^{-2} M$). La détermination de l'activité protéolytique résiduelle est faite par la technique habituelle² sur la sérumbumine dénaturée. La détermination des produits d'hydrolyse solubles dans l'acide

* Le poids moléculaire de la trypsine est considéré ici comme étant de 17,700.

trichloracétique à 3 % est faite par la mesure de l'extinction à $280\text{ m}\mu$ du surnageant trichloracétique.

Les résultats indiqués dans le Tableau I (colonnes d et h) montrent que dans les conditions expérimentales réalisées, la perte d'activité et la solubilisation dans l'acide trichloracétique sont bien toujours parallèles. Les Tableaux I et II montrent également que le temps nécessaire pour obtenir un pourcentage déterminé d'autolyse, au maximum de 60 %, est inversement proportionnel à la concentration initiale de la trypsine, soit en l'absence (Tableau I) soit en présence de Ca^{++} ou de Mn^{++} (Tableau II), quoique, dans ce dernier cas, la vitesse d'autolyse soit réduite d'environ 70 fois (Tableau III).

TABLEAU I

AUTOLYSE DE LA TRYPSINE À 36° , EN ABSENCE DE CATIONS BIVALENTS a = Trypsine initiale (micromol/litre) E_t = Extinction ($\cdot 10^3$) due à la trypsine totale t = Temps en minutes E = Extinction ($\cdot 10^3$) due à la fraction de trypsine solubilisée au temps t = trypsine transformée au temps t . V = Vitesse/minute (Δ extinction $\cdot 10^3$ /minute) de protéolyse, à 25° , sur la sérumalbumine dénaturée = trypsine encore intacte au temps t . f = Fraction de la réaction effectuée au temps t exprimée en % de la réaction totale:I = calculée d'après E II = calculée d'après V

Expérience 1; $a = 10$; $E_t = 85$					Expérience 2; $a = 5$; $E_t = 43$				
t (a)	E (b)	V (c)	f (d)		t (e)	E (f)	V (g)	f (h)	
			I	II				I	II
0	2	31.1	—	—	0	1	15.25	—	—
10	26	20	31	35.5	20	14	10.25	32.5	33
15	35	18	41	42	30	18	8.8	42	42.5
30	49	12.5	58	60	60	26	6	60.5	60.5
45	58	10	68	68	90	30	4.4	70	71

TABLEAU II

AUTOLYSE DE LA TRYPSINE À 36° EN PRÉSENCE DE Ca^{++} OU DE Mn^{++} a = Trypsine initiale (micromol/litre) t = Temps en heures V = Vitesse/minute (Δ extinction $\cdot 10^3$ /minute) de protéolyse, à 25° , sur la sérumalbumine dénaturée = trypsine encore intacte au temps t . f = Fraction de la réaction effectuée au temps t exprimée en % de la réaction totale.

Métal 10^{-2} M	Expérience 1; $a = 10$			Expérience 2; $a = 5$		
	t	V	f	t	V	f
Ca^{++}	0	30	—	0	14.5	—
	10	20.5	31.5	20	9.7	33
	23	14.8	50.5	46	7.3	50
Mn^{++}	0	30	—	0	14.5	—
	10	20.5	31.5	20	10	31
	23	15.5	48	46	7.7	47

TABLEAU III

INFLUENCE DE Ca^{++} ET DE Mn^{++} SUR LA VITESSE D'AUTOLYSE DE LA TRYPSINE À 36° K (= constante de vitesse d'autolyse) calculé à partir des valeurs des Tableaux I et II, d'après la formule:

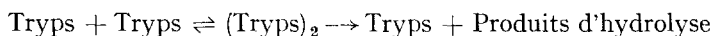
$$t = \frac{I}{K(a-x)} - \frac{I}{Ka}$$

pour deux molécules de trypsine réagissant entre elles.

 a = trypsine initiale x = trypsine transformée au temps t . t = temps

Métal	K [litre/mol]/sec
Néant	90
Ca^{++}	1.3
Mn^{++}	1.3

Ainsi, avec ou sans métal, la cinétique observée est celle d'une réaction d'ordre 2; elle correspond au schéma suivant:



Dans ce schéma, les deux molécules de trypsine réagissant entre elles sont représentées comme étant les mêmes. Mais on peut aussi bien admettre qu'elles sont différentes, pourvu qu'il existe entre elles une relation d'équilibre dynamique telle que la vitesse avec laquelle cet équilibre se rétablit soit loin d'être le facteur limitant de l'autolyse. L'existence d'un tel équilibre entre une forme active et une forme inactive de la trypsine a été observée depuis longtemps dans les solutions de cet enzyme⁷. Dans le cas où on laisse l'autolyse se poursuivre jusqu'à 97% du maximum possible, cette autolyse paraît correspondre à une réaction d'ordre supérieur à 2⁸; cette autolyse serait alors ralentie par les produits d'hydrolyse de la trypsine. Mais dans les conditions d'expérience du présent travail, et au moins tant que l'autolyse ne dépasse pas 60% de son maximum, on trouve toujours que l'ordre de la réaction est de 2. Il est donc permis d'affirmer que dans ces limites, les produits d'hydrolyse n'interfèrent pas sensiblement avec le cours de l'autolyse, et que l'effet du métal sur la vitesse de cette autolyse est indépendant de l'action éventuelle que pourraient exercer les produits d'hydrolyse.

*Influence de Ca^{++} et de Mn^{++} sur la sensibilité
vis à vis de la trypsine de dérivés alkylphosphorylés de la trypsine*

On sait^{9,10} que la trypsine hydrolyse certains esters alkylphosphoriques en se transformant elle-même en un dérivé phosphorylé. Les produits de l'hydrolyse par la trypsine du diisopropylfluorophosphate (DFP) ou du diéthyl-(*p*-nitrophényl) phosphate (E 600) sont ainsi respectivement l'acide fluorhydrique et la trypsine-diisopropylphosphorylée (TryDIP) ou le *p*-nitrophénol et la trypsine-diéthylphosphorylée (TryDEP). Chaque molécule de trypsine hydrolyse une seule molécule de DFP ou de E 600, la TryDIP et la TryDEP étant dépourvues d'activité enzymatique, et n'étant plus susceptibles d'être phosphorylées davantage.

Nous avons obtenu la TryDIP et la TryDEP en traitant, pendant six jours à 0° – 2° de la trypsine $7 \cdot 10^{-5}$ M, par une quantité de DFP ou de E 600 trente fois supérieure

en milieu tampon borate à pH 7.9. Les préparations ont été débarrassées de tout excès d'inhibiteur par dialyse pendant six jours à 0°-2° contre du tampon borate au même pH. Les solutions de TryDIP et de TryDEP ainsi obtenues ont une teneur en protéine (valeur de l'extinction à 280 m μ) légèrement inférieure à celle du départ (10% environ) et ne provoquent aucune inhibition d'une solution de trypsine ($2 \cdot 10^{-5}$ M) après un contact de 20 heures à 25° alors que dans les mêmes conditions, une solution de DFP ou de E 600 10^{-6} M provoquerait une inhibition de l'ordre de 10%. La quantité d'inhibiteur libre éventuellement encore présente dans nos préparations est donc sûrement inférieure à celle qui pourrait provoquer une action mesurable au cours de nos expériences.

D'autre part, les solutions de TryDIP et TryDEP ne sont pas complètement dépourvues d'activité protéolytique. Testées sur la sérulalbumine par la méthode habituelle, elles présentent respectivement une activité protéolytique de l'ordre de 0.05 et de 0.5% de celle qu'elles manifesteraient si toute la protéine présente était sous la forme de trypsine active. Lorsque ces solutions sont maintenues à 36°, les dérivés de la trypsine qu'elles contiennent subissent une lyse progressive (augmentation avec le temps de la valeur de l'extinction à 280 m μ du surnageant trichloracétique). On constate que l'activité protéolytique sur la sérulalbumine des solutions en question reste constante, alors que la lyse du dérivé protéique qu'elles contiennent progresse; d'autre part, cette lyse est arrêtée par addition d'un excès d'inhibiteur (DFP) (Tableau IV). On doit donc conclure que les solutions de TryDIP et de TryDEP contiennent respectivement 0.05 et 0.5% (par rapport à la protéine totale) de trypsine libre dont l'existence est vraisemblablement due à une légère dissociation de la trypsine phosphorylée. C'est cette fraction de trypsine active qui provoque l'hydrolyse de la trypsine phosphorylée inactive. La cinétique de cette hydrolyse est celle d'une réaction d'ordre zéro tant que la quantité de protéine rendue soluble dans l'acide trichloracétique ne dépasse pas 14% de la protéine totale. Le Tableau V montre que la présence de Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺ 10^{-2} M (chlorures) dans les solutions de TryDIP et de TryDEP, pendant l'incubation à 36°, diminue la vitesse de la lyse; Ca⁺⁺ et Mn⁺⁺ réduisent cette vitesse à peu près de vingt fois, et Mg⁺⁺ de quatre fois. D'autre part, on constate (Tableau IV) que ces mêmes métaux n'influencent sensiblement ni l'activité protéolytique des solutions de TryDIP et de TryDEP vis à vis de la sérulalbumine, ni la stabilité de cette activité pendant l'incubation à 36°. Il est ainsi évident que la présence de Ca⁺⁺ ne provoque pas une diminution (qui devrait être ici de 20 fois) de la quantité de trypsine libre présente; il apparait au contraire que la protéolyse de la sérulalbumine dénaturée est augmentée en présence de Ca⁺⁺, en accord avec l'effet connu² de Ca⁺⁺ sur cette protéolyse.

TABLEAU IV
INFLUENCE DE Ca⁺⁺ SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA SOLUTION
DE TryDIP ET DU DFP SUR LA LYSE DE LA MÊME SOLUTION

Activité sur la sérulalbumine dénaturée*		Lyse de la solution** %	
Absence de Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺ 10^{-3} M	Absence de DFP	DFP 10^{-3} M
49	60	42	3

* Δ extinction ($\cdot 10^3$) à 280 m μ du surnageant trichloracétique après 3 heures de protéolyse à 36°.

** Δ extinction ($\cdot 10^3$) à 280 m μ du surnageant trichloracétique après 27 heures à 36°.

TABLEAU V
INFLUENCE DE CERTAINS CATIONS SUR LA PROTÉOLYSE DE TryDEP ET TryDIP

Métal $10^{-2} M$	Vitesse initiale de lyse/heure*		Lyse après 23 heures**	
	TryDEP seule	TryDIP + Trypsine $10 \mu\text{g/ml}$	TryDEP seule	TryDIP + Trypsine*** $10 \mu\text{g/ml}$
Néant	21	50	53	61
Mg ⁺⁺	5	—	24	—
Ca ⁺⁺	0.9	2.8	5	16
Mn ⁺⁺	0.9	—	5	—

* Pente des droites obtenues en exprimant en fonction du temps l'extinction ($\cdot 10^3$) à 280 m μ du surnageant trichloracétique.

** Extinction ($\cdot 10^3$) à 280 m μ du surnageant trichloracétique exprimé en % de l'extinction totale.

*** L'extinction due à la trypsine rajoutée, si elle était complètement autolysée à la fin de l'expérience, serait de l'ordre de 1 % de l'extinction totale.

Du point de vue purement cinétique, le système contenu dans les solutions de TryDIP et de TryDEP diffère de celui d'une solution de trypsine libre, du fait que les deux fonctions d'enzyme et de substrat se trouvent séparées dans deux molécules différentes, et qu'un passage réversible entre elles est pratiquement inexistant. Or, dans le cas de l'autolyse de la trypsine, on a vu que deux hypothèses peuvent expliquer l'effet de Ca⁺⁺: un déplacement d'équilibre, ou une diminution de la sensibilité du substrat. Il est évident que dans le cas de TryDIP et de TryDEP, la première hypothèse se trouve éliminée. La seule interprétation possible est celle qui attribue à Ca⁺⁺ et à Mn⁺⁺ (et à un moindre degré à Mg⁺⁺), le rôle de diminuer la sensibilité du substrat (TryDIP et TryDEP) à l'action enzymatique de la trypsine. Du point de vue chimique, rien encore ne permet d'affirmer que TryDIP, TryDEP et trypsine libre sont analogues quant à leur fonction de substrat; une telle analogie permettrait de donner à coup sûr la même interprétation au rôle de Ca⁺⁺ dans le cas de l'autolyse de la trypsine. Toutefois,

TABLEAU VI

DÉTERMINATION DE LA CONSTANCE DE MICHAELIS POUR TryDIP ET TryDEP (LINEWEAVER¹¹)

K_S (= Constante de MICHAELIS) calculée d'après la formule:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_M} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M}$$

$\frac{1}{(S)} \cdot 10^3$ *	$\frac{1}{v} \cdot 10^2$ **	
	TryDIP	TryDEP
1.3	4.0	3.9
1.6	4.6	4.6
2.0	5.9	5.7
2.7	7.7	7.7
4.0	11.1	11.1
$\frac{V_M}{K_S}$	$5915 \mu\text{g/ml} \approx 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/litre}$ ²²²	

* (S) = $\mu\text{g/ml}$ de TryDIP ou TryDEP

** v = protéolyse à 36° en 15 minutes par $10 \mu\text{g/ml}$ de trypsine.

les considérations suivantes rendent cette analogie probable: a) les conditions de préparation de TryDIP et de TryDEP ne doivent pas, à elles seules, provoquer de dénaturation; b) après dialyse de TryDIP et de TryDEP une petite quantité de trypsine active est régénérée par dissociation; c) la constante de MICHAELIS de la trypsine est la même dans le cas de TryDIP et dans celui de TryDEP (de l'ordre de $3 \cdot 10^{-4}$ mol/litre) (Tableau VI).

*Influence de Ca^{++} sur l'hydrolyse
par la trypsine du diéthyl-(*paranitrophényl*)phosphate (E 600)*

Du fait que la trypsine s'hydrolyse elle-même, toute action de cet enzyme sur un substrat S est la résultante d'une compétition entre S et la trypsine considérée comme substrat. Cette compétition dépend des affinités respectives de la trypsine pour S et pour elle-même, et suivant la valeur du rapport $(S)/(T)$ entre la concentration (S) de S et la concentration (T) de la trypsine, l'autolyse peut être plus ou moins grande; pour des valeurs de $(S)/(T)$ suffisamment grandes, cette autolyse doit même être pratiquement inexistante. Considérons maintenant l'augmentation de l'action protéolytique de la trypsine en présence de Ca^{++} ou de Mn^{++} . Si cette augmentation est due à un déplacement vers la forme active d'un équilibre entre trypsine active et trypsine inactive, l'effet de ces métaux se manifesterait quelle que soit la valeur de $(S)/(T)$ et ce d'autant plus que cette valeur sera plus grande, la trypsine devenant alors le facteur limitant de la protéolyse. Si, par contre, l'action de Ca^{++} et de Mn^{++} correspond à une diminution de la sensibilité de la trypsine à l'autolyse, l'effet de ces métaux sera nul lorsque la valeur de $(S)/(T)$ sera suffisamment grande pour que l'autolyse devienne négligeable. Pour décider entre ces deux hypothèses, on pourrait donc penser à étudier l'influence des métaux en question sur la protéolyse, lorsque $(S)/(T)$ est grand. Mais il convient de remarquer que $(S)/(T)$ diminue progressivement au cours de la protéolyse; il en résulte que l'autolyse qui peut être négligeable au début d'une protéolyse, devient inévitablement importante après un certain temps de réaction. Etant donné que de toute façon la protéolyse est ici trop faible à ses débuts pour que les différences éventuelles dues à la présence des métaux soient significatives, l'étude de l'influence de Ca^{++} ou de Mn^{++} lorsque $(S)/(T)$ est grand, ne fournit guère de renseignements utiles. Plus tard, lorsque la protéolyse est plus avancée, la valeur de $(S)/(T)$ s'est abaissée et les mesures deviennent alors sans intérêt.

Mais il est possible de choisir entre les deux hypothèses en question par la méthode suivante: Si on emploie comme substrat S, E 600 sur lequel la trypsine exerce une action hydrolysante de façon telle que chaque molécule de trypsine ayant exercé cette action s'en trouve inactivée, la valeur de $(S)/(T)^*$ augmente au lieu de diminuer au cours de l'hydrolyse. Dans ces conditions, si la valeur initiale de $(S)/(T)$ est suffisamment grande pour que l'autolyse soit négligeable, cette situation ne changera pas au cours de l'hydrolyse; cette dernière pourra donc être suivie aussi longtemps que cela sera nécessaire pour obtenir des résultats significatifs.

L'action de la trypsine a été ainsi suivie sur E 600 à 25° dans du tampon véronal-Na-HCl ($2 \cdot 10^{-2}$ M) pH 7.5. L'hydrolyse a été mesurée par détermination colorimétrique à $400 \mu\mu$, du *paranitrophénol* libéré¹⁰. Dans les conditions réalisées, la vitesse d'hydrolyse spontanée de E 600 se trouve suffisamment réduite pour pouvoir être négligée;

* Il est bien évident que (S) est initialement toujours supérieur à (T).

en fait, cette hydrolyse spontanée ne dépasse pas, après 48 heures, 10 % de l'hydrolyse due à la trypsine, et cela soit en absence soit en présence de Ca^{++} 10^{-2} M*. L'étude de l'action de la trypsine sur E 600 (Tableau VII) montre que lorsque la valeur de $(S)/(T)$ est de 4.5 (E 600 $7.5 \cdot 10^{-4}$ M; trypsine $1.7 \cdot 10^{-4}$ M), l'augmentation de l'hydrolyse de E 600 en présence de Ca^{++} ($5 \cdot 10^{-3}$ M) est considérable*. Mais si la valeur de $(S)/(T)$ est de 500 (E 600 $100 \cdot 10^{-4}$ M; trypsine $0.2 \cdot 10^{-4}$ M), on ne constate aucune différence entre les hydrolyses en présence et en absence de Ca^{++} , même après 48 heures, alors que les valeurs de l'extinction sont de dix fois supérieures aux limites des erreurs expérimentales. Ces résultats apportent ainsi une nouvelle preuve du fait que Ca^{++} diminue la sensibilité de la trypsine en tant que substrat de l'autolyse.

TABLEAU VII

INFLUENCE DE Ca^{++} SUR L'HYDROLYSE DE E 600 PAR LA TRYPSINE $(S)/(T)$ = Rapport des concentrations de E 600 et de trypsine.

Ca^{++} $5 \cdot 10^{-3}$ M	Δ Extinction ($\cdot 10^3$) à 400 m μ après 31 h. à 25°	
	$(S)/(T) = 4.5$	$(S)/(T) = 500$
Absent	57	72
Présent	169	70

Nous remercions G. YOUATT, University of Leeds, England, auquel nous devons le DFP et le E 600.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié l'influence de Ca^{++} et de Mn^{++} vis à vis de l'autolyse de la trypsine, vis à vis de la sensibilité à la trypsine libre de dérivés de la trypsine enzymatiquement inactifs mais "non dénaturés", et vis à vis de l'action de la trypsine sur un substrat tel que chaque molécule d'enzyme en jeu ne puisse exercer qu'une seule fois son action. Les résultats obtenus permettent d'expliquer l'action favorisante de Ca^{++} et de Mn^{++} sur l'action enzymatique de la trypsine de la façon suivante: lorsque la trypsine agit sur un substrat, la concentration de l'enzyme tend à diminuer du fait de l'autolyse, réaction parasite qui concurrence l'hydrolyse du substrat; certains cations bivalents et plus particulièrement Ca^{++} et Mn^{++} font obstacle à l'autolyse, permettant ainsi à une plus grande quantité d'enzyme d'agir sur le substrat, leur action consistant à diminuer la sensibilité de la trypsine à sa propre action protéolytique.

SUMMARY

The authors have studied the influence of Ca^{++} and of Mn^{++} on the autolysis of trypsin; on the sensitivity to free trypsin of its enzymically inactive but "not denatured" derivatives, and finally on the action of trypsin on a substrate such that each enzyme molecule in play can only act once. The results obtained permit an explanation of the favouring action of Ca^{++} and of Mn^{++} on the enzymic activity of trypsin: when trypsin acts on a substrate, the concentration of the enzyme tends to decrease due to autolysis, a side reaction competing with hydrolysis of the substrate. Certain bivalent cations, especially Ca^{++} and Mn^{++} , have an inhibiting action on autolysis, thus permitting a larger amount of enzyme to act on the substrate, these ions decreasing the susceptibility of trypsin to its own proteolytic action.

* Mn^{++} accélère l'hydrolyse spontanée de E 600; pour cette raison, nous n'avons pas étudié l'action de la trypsine en présence de ce métal.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser haben den Einfluss von Ca^{++} und von Mn^{++} auf die Autolysis von Trypsin, auf die Empfindlichkeit von enzymatisch inaktiven jedoch "nicht denaturierten" Derivaten von Trypsin gegenüber freien Trypsin, und auf die Einwirkung von Trypsin auf solch einen Substrat, dass jeder einwirkender enzymatischer Molekül nur ein einziges Mal seine Wirkung ausüben kann, untersucht. Die erhaltenen Resultate erlauben den begünstigenden Einfluss von Ca^{++} und von Mn^{++} auf die enzymatische Wirkung von Trypsin auf folgende Weise zu erklären: wenn Trypsin auf seinen Substrat einwirkt, fällt die Konzentration des Enzyms wegen des Autolysis, Nebenreaction die mit der Hydrolysis des Substrats zusammenwirkt. Bestimmte bivalente Kationen und besonders Ca^{++} und Mn^{++} verhindern die Autolysis und erlauben so einer grösseren Menge Enzym auf den Substrat einzuwirken; ihr Einfluss besteht darin dass sie die Empfindlichkeit des Trypsins gegenüber seiner eigenen proteolytischen Wirkung herabsetzen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, New York (1948).
- ² L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- ³ M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochem.*, 33 (1951) 320.
- ⁴ M. M. GREEN, J. A. GLADNER, L. W. CUNNINGHAM, Jr., ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2122.
- ⁵ L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 180.
- ⁶ L. GORINI ET F. FELIX, *IIème Congrès International Biochimie*, Paris 1952, Résumé des Communications, p. 232.
- ⁷ M. L. ANSON ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 17 (1934) 393.
- ⁸ D. FRASER ET R. E. POWELL, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 803.
- ⁹ A. K. BALLS ET E. F. JANSEN, *Advances in Enzymol.*, 13 (1952) 332.
- ¹⁰ B. A. KILBY ET G. YOUATT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 112.
- ¹¹ H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.

Reçu le 10 avril 1953