

## RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE PRODUCTION D'UNE PROTÉINASE BACTÉRIENNE

### I. NOUVELLE TECHNIQUE DE DÉTERMINATION D'UNE PROTÉINASE PAR LA COAGULATION DU LAIT

par

LUIGI GORINI ET GIULIO LANZAVECCHIA

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

Aux débuts d'une étude comportant des déterminations fréquentes et systématiques d'activité protéolytique, nous nous sommes efforcés de mettre au point une méthode de dosage simple et rapide, en utilisant la coagulation du lait provoquée par l'action de la préparation enzymatique que nous étudions. La coagulation du lait, couramment employée pour la détermination de la présure<sup>1, 2</sup>, a été aussi utilisée comme moyen rapide d'évaluation quantitative d'un certain nombre d'autres enzymes protéolytiques, tels que la chymotrypsine<sup>3</sup>, la pepsine<sup>4</sup>, la papaïne<sup>5</sup>, la protéinase de *Streptocoques A*<sup>6</sup>. A vrai dire, tous les enzymes protéolytiques, sur lesquels on a fait l'expérience, provoquent, dans des conditions plus ou moins particulières, la coagulation du lait et inversement, tous les enzymes provoquant cette coagulation, possèdent aussi une activité protéolytique<sup>7</sup>. Cependant la propriété coagulante n'a jamais été largement utilisée comme moyen de dosage des enzymes protéolytiques. L'hétérogénéité du lait en tant que substrat de la réaction enzymatique et l'incertitude sur le mécanisme et sur la nature même de la réaction provoquant la coagulation, sont évidemment les causes de cette méfiance. Mais il est clair que ces considérations ne constituent pas une difficulté pour l'application de cette méthode, à condition que :

1. Il soit montré que dans les conditions expérimentales choisies, et dans de larges limites de concentration d'enzyme, la variable qu'on mesure et les quantités d'enzyme qu'on dose sont reliées par une fonction simple et continue.

2. Il soit démontré dans chaque cas particulier que coagulation du lait et hydrolyse de liaisons peptidiques directement observée sur un substrat protéique homogène, sont deux manifestations parallèles et indissolubles de l'activité d'un même enzyme.

La première de ces conditions n'a jamais été strictement observée dans les méthodes citées. Faute d'une relation linéaire entre la quantité d'enzyme et le temps de coagulation, on est toujours réduit en définitive par ces techniques à évaluer l'enzyme par le degré de dilution auquel on doit porter l'échantillon pour provoquer la coagulation dans un temps préalablement choisi. Ceci rend le dosage peu précis et limite sa sensibilité à la quantité minimum d'enzyme qui provoque la coagulation dans un temps assez court pour que la méthode reste utilisable.

Par la technique que nous décrivons dans ce travail et dans le cas particulier de la

protéinase bactérienne que nous étudions, il nous a été possible de mettre au point une méthode de détermination par la coagulation du lait, laquelle, comparée à celle classique, basée sur l'évaluation des produits d'hydrolyse d'une protéine, solubles dans l'acide trichloracétique, est beaucoup plus rapide, également précise, et sensible à des quantités d'enzyme au moins 200 fois plus petites. Après avoir démontré que notre méthode répond aux conditions précitées, nous étudions l'influence sur le résultat des analyses, d'un certain nombre de facteurs pouvant varier au cours de nos recherches. En fait, la technique que nous décrivons a été élaborée pour servir à notre cas particulier, mais nous pensons qu'un certain nombre de nos observations peut être utile aussi à l'application de la méthode à d'autres enzymes et à d'autres conditions d'expérience.

### MATÉRIEL ET TECHNIQUE

**Enzyme.** La solution enzymatique utilisée est le bouillon de culture de *Coccus P*<sup>8</sup> après croissance de 24 heures à 26°. Les propriétés générales de la protéinase produite par cet organisme ont été décrites ailleurs<sup>8,9</sup>. La composition exacte du bouillon de culture et les précisions sur la souche bactérienne, ainsi que sur les conditions de culture, sont données dans le deuxième travail de cette série<sup>10</sup>. Le bouillon de culture est débarrassé des corps bactériens par centrifugation à 0° et additionné de merthiolate (100 µg/ml) pour éviter tout développement microbien. Le pH est ajusté à la valeur désirée par addition éventuelle de HCl et les dilutions, lorsqu'elles sont nécessaires, sont faites par une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-3} M$  dans de l'eau distillée.

**Lait.** Ce que nous appelons "lait" est une dispersion de poudre de lait dans une solution tampon. La poudre de lait est un produit commercial obtenu en séchant à basse température du lait écrémé (procédé SPRAY). Nous avons utilisé un échantillon de produit "Gallia" et deux de "Lactasol"\*\*. Le tampon est un mélange dans des proportions variables selon le pH qu'on veut obtenir, de solutions  $6.6 \cdot 10^{-2} M$  d'acide cacodylique et de triéthanolamine. La solution tampon contient  $\text{CaCl}_2 \cdot 3 \cdot 10^{-2} M$ . La dispersion de la poudre de lait est réalisée à l'aide d'un mélangeur électrique. Le pH donné est celui du "lait". Nous donnons ici la composition du "lait" standard à 1 % couramment utilisé:

	pH 7.7	pH 5.8
Acide cacodylique $6.6 \cdot 10^{-2} M$	40 ml	70 ml
Triéthanolamine $6.6 \cdot 10^{-2} M$	60 ml	30 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 3 M$	1 ml	1 ml
Poudre de lait	1 g	1 g

Conservé à 37° pendant 24 heures, ce "lait" ne permet pas de prolifération bactérienne et ne coagule pas. Son comportement à la coagulation enzymatique ne subit pas de changement après 8 heures de conservation à la glacière.

**Test de coagulation.** Le test de coagulation est fait à 37° ( $\pm 0.1$ ). 5 ml de "lait" sont préchauffés à 37° pendant 10 minutes. On ajoute 0.5 ml de solution enzymatique et on observe la coagulation suivant la méthode de BERRIDGE<sup>2</sup> qui consiste à réaliser à l'aide d'un agitateur un film de liquide sur la paroi du tube à essais et à déterminer visuellement l'instant où apparaissent des particules hétérogènes.

**Dosage de l'activité protéolytique.** L'activité protéolytique est testée sur la caséine par une des méthodes habituelles<sup>11</sup>. Cette méthode est basée sur le dosage de la tyrosine contenue dans la portion de protéine rendue soluble dans l'acide trichloracétique, après action hydrolytique de l'enzyme. Le substrat est une solution de caséine 2.4 % à pH 8 dans du tampon borate  $5 \cdot 10^{-2} M$ , contenant  $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-2} M$ . La protéolyse est faite à 25° sur un mélange de 12.5 ml de substrat et de 2.5 ml de solution enzymatique. Dans des limites de temps telles que la cinétique de la réaction reste d'ordre zéro, on prélève des prises de 3 ml dont on précipite la portion de protéine non hydrolysée, par 2 ml d'acide trichloracétique à 12.5 %. On filtre après 2 heures et sur 0.5 ml du filtrat on détermine la tyrosine par la réaction de Folin et Ciocalteu suivant la technique de SUTHERLAND *et coll.*<sup>12\*\*\*</sup>.

\* Société Laitière "Gallia", Longueville sur Scie.

\*\* Compagnie Laitière Industrielle de Normandie — Chef du Pont.

\*\*\* Nous avons apporté à cette méthode la modification suivante: 30 minutes après l'addition du réactif de Folin, on stabilise la coloration par addition de 5 ml d'une solution de sulfite de sodium 2.5 %. Nous remercions L. Colobert pour nous avoir conseillé cette modification.

Les unités arbitraires de protéinase sont données par la quantité de tyrosine libérée par action de l'enzyme dans les conditions décrites, à savoir:

1 unité protéolytique = 1 millimicromole tyrosine/minute. Dix unités correspondent à peu près à la plus petite quantité d'enzyme dont le dosage par cette méthode soit significatif.

## EXPÉRIENCES ET DISCUSSION

### a. Analyse de la méthode de dosage du pouvoir coagulant

Puisque le mécanisme de la coagulation enzymatique du lait<sup>7</sup> n'est pas encore suffisamment éclairci, la signification théorique des mesures est incertaine et les formules proposées<sup>1</sup> pour calculer le pouvoir coagulant sont toutes plus ou moins empiriques. Ici nous limitons la discussion générale au minimum indispensable pour étudier les résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

Il apparaît comme établi<sup>7</sup> que la coagulation du lait est la résultante d'au moins deux réactions successives. La première enzymatique, qui ne change pas l'état apparent de dispersion de la caséine; la deuxième non enzymatique, qui est la vraie réaction de coagulation. Etant donné que la coagulation n'est pas progressive, mais soudaine et totale, il semble qu'elle soit due au fait que l'enzyme, ayant agi sur un certain pourcentage du substrat, provoque un état critique du système: à ce moment, si certaines conditions sont remplies, la réaction de coagulation a lieu. Lorsqu'on détermine le pouvoir coagulant, on mesure le temps  $T$  qui s'écoule entre l'addition de l'enzyme et l'apparition de la coagulation. On n'évalue donc pas la progression d'une réaction, mais le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de réaction effectuée. Et encore, ce temps se décompose en deux parties: une première, la vraie variable, qui est inversement proportionnelle à la concentration  $[E]$  de l'enzyme provoquant la coagulation; et une deuxième,  $a$ , qui est constante quelle que soit la valeur de  $[E]$ , pourvu que certaines conditions déterminées restent constantes. Ceci est exprimé par la relation suivante:

$$T = K \frac{1}{[E]} + a \quad (1)$$

La Fig. 1 donne les valeurs de  $T$ , mesurées sur des "laits" de concentrations  $[L]$  différentes, en fonction de dilutions  $1/[E]$  progressives d'une certaine solution enzymatique. On voit que dans certaines limites, l'équation (1) est vérifiée pour toutes les concentrations de "lait". Par  $E$ , on désigne l'enzyme responsable de l'activité coagulante. La valeur absolue de sa concentration dans la solution utilisée est pour l'instant inconnue, mais si l'on évalue les différentes dilutions en mesurant leurs activités protéolytiques, il devient possible d'exprimer directement par les courbes de la Fig. 1, la relation liant activité protéolytique et activité coagulante.

En ce qui concerne la concentration du "lait", on constate qu'avec du "lait" à 10% (courbe a), l'équation (1) se vérifie seulement pour de grandes concentrations de  $E$  comme les auteurs précédents l'ont signalé. Par contre, avec du "lait" à 1% (courbe f), l'équation (1) reste valable pour des concentrations pratiquement très faibles, puisque nous avons mesuré des  $T$  égaux aux valeurs théoriques, même avec  $[E] = 0.5$  U/ml qui provoque la coagulation en 12 heures environ. Ceci est un premier avantage conseillant l'emploi de "lait" à 1%. Tout se passe en effet comme si l'enzyme se trouvait inhibé par le substrat lorsque la concentration relative de ce dernier est trop grande. La Fig. 1 montre également que la valeur de  $K$  diminue avec la concentration du "lait" et ceci (Fig. 1a) d'une façon sensiblement proportionnelle. On constate en effet que pour une

même quantité d'enzyme, le "lait" à 1% coagule dans un temps pratiquement 7 fois plus court que le "lait" à 10%. Ce comportement est prévisible étant donné la façon particulière de déterminer l'activité de l'enzyme et constitue un deuxième avantage en faveur de l'emploi du "lait" à 1%. En effet le dosage est beaucoup plus rapide.

Finalement la Fig. 1 montre qu'en extrapolant les droites pour  $1/[E] = 0$ , on trouve pour toutes la même ordonnée à l'origine. Elle représente graphiquement la partie constante  $a$  de  $T$  lorsque le temps de la réaction enzymatique tend vers zéro, du fait que

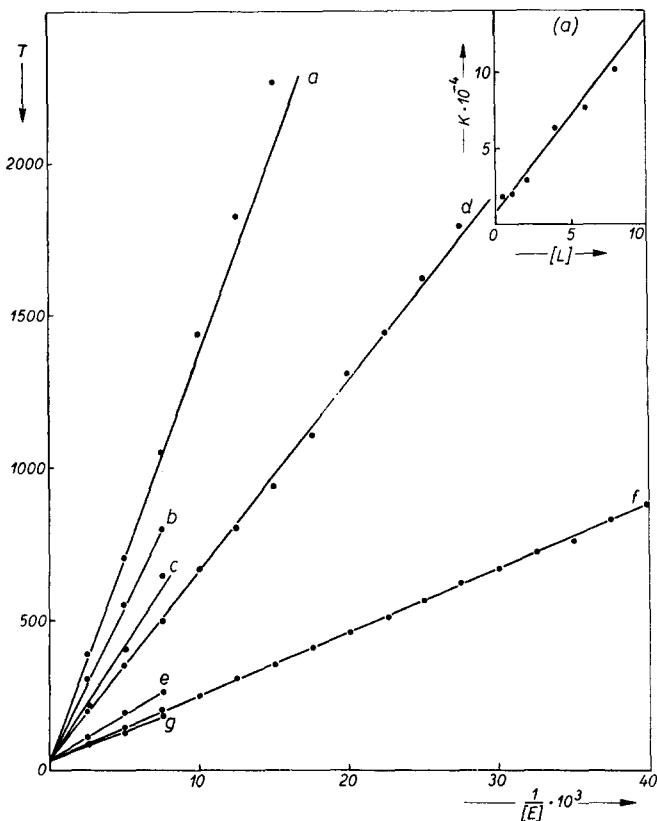


Fig. 1. Relation entre la quantité d'enzyme et le temps de coagulation déterminé sur du "lait" à concentrations différentes.  $T$  = temps de coagulation (en secondes);  $[E]$  = concentration de l'enzyme (en unités protéolytiques/ml);  $[L]$  = concentration de la poudre de lait dans le tampon standard à pH 7.7 (en %);  $K$  = pente des courbes a, b, c, d, e, f, g. Solution enzymatique = bouillon de culture donnant une activité protéolytique de 400 unités/ml. Dilutions effectuées par  $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-3} M$ . Courbe a = "lait" à 10%; b = "lait" à 8%; c = "lait" à 6%; d = "lait" à 4%; e = "lait" à 2%; f = "lait" à 1%; g = "lait" à 0.5%.

$[E]$  tend vers l'infini. On voit que  $a$  n'est pratiquement pas influencé par la concentration du "lait". La valeur de  $a$  ainsi déterminée par voie graphique, a pu être également obtenue par expérience. On profite de la grande différence des coefficients de température de la réaction enzymatique et de celle de coagulation, cette dernière étant comparable à celle d'une réaction de dénaturation<sup>13</sup> et on mesure  $T$  à 37° comme d'habitude, mais après avoir permis à la réaction enzymatique de se poursuivre à 0° pendant des temps de plus en plus longs. La Fig. 2 montre que la limite vers laquelle tend  $T$  dans ces condi-

tions est 45 secondes: ceci coïncide assez bien avec la valeur de 40 trouvée à l'aide de la Fig. 1.

Parmi les facteurs pouvant influencer le dosage, étant donné notre but essentiellement pratique, nous avons étudié seulement ceux qu'on pouvait supposer variables au cours de nos recherches: pH, concentration en  $\text{Ca}^{++}$ , composition du milieu de culture, origine de la poudre de lait. En ce qui concerne le pH, des expériences analogues à celles des figures 1 et 2 mais faites avec du lait à pH 5.8 donnent pour  $T$  des valeurs supérieures à celles obtenues à pH 7.7 et pour  $a$  des valeurs plus faibles (13 par voie graphique et 15 par voie expérimentale). Ceci signifie que la réaction enzymatique et celle de coagulation ont été influencées en sens inverse par le changement de pH. La Fig. 3 montre l'influence du pH sur le temps de coagulation du "lait" à 1%. La courbe concerne essentiellement la seule réaction enzymatique puisque la concentration d'enzyme employée est petite et les valeurs de  $T$  mesurées sont alors assez grandes (de l'ordre de 400 secondes) pour que  $a$  en soit une partie négligeable. On constate que

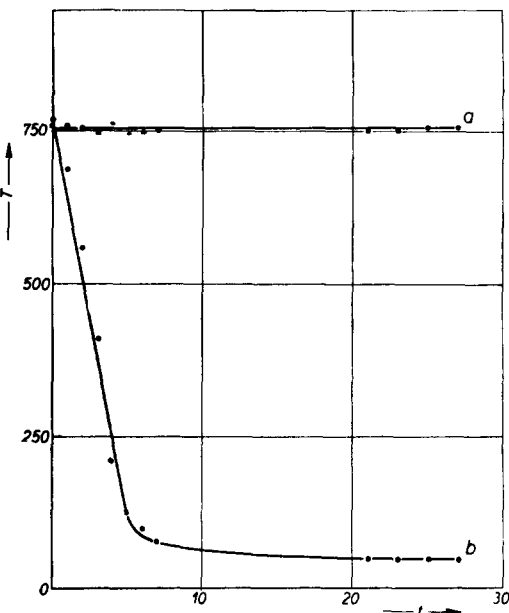


Fig. 2. Détermination expérimentale de la valeur de  $a$  à pH 7.7.  $T$  = temps de coagulation à  $37^\circ$  (en secondes);  $t$  = temps de conservation à  $0^\circ$  du "lait", de l'enzyme ou de leur mélange (en heures). "lait" à 1%. Courbe  $a$  = mélange "lait"-enzyme fait au temps  $t$ ; courbe  $b$  = mélange "lait"-enzyme fait au temps zéro.

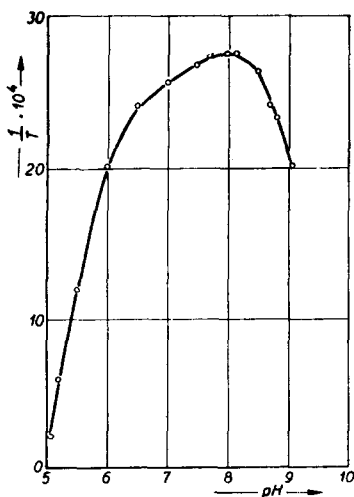


Fig. 3. Influence du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique.  $T$  = temps de coagulation (en secondes). "Lait" à 1%. Enzyme à 95 unités/ml.

Bibliographie p. 414.

le pH optimum de l'activité coagulante sur le lait est de 8 à 8.2. Le même optimum a été trouvé<sup>9</sup> pour l'activité protéolytique de la même solution enzymatique sur la gélatine. La détermination de l'activité coagulante par la méthode standard que nous avons adoptée a lieu à pH 7.7 un peu plus bas que l'optimum, mais au point où le pouvoir tampon du "lait" que nous utilisons est maximum: ceci permet le dosage de solutions enzymatiques de pH assez différents (entre 7.5 et 8.4).

Quant à  $\text{Ca}^{++}$ , nous avons établi qu'une concentration de  $3 \cdot 10^{-2} M$  dans le "lait" permet la plus grande vitesse de dosage compatible avec une stabilité du "lait" à  $37^\circ$  et en absence d'enzyme, de 24 heures au moins. Des variations de  $\pm 15\%$  de cette concentration apportent des changements de la valeur de  $T$  de l'ordre de 3%. Ceci permet pratiquement le dosage de solutions enzymatiques de n'importe quelle teneur en  $\text{Ca}^{++}$  entre 0 et  $10^{-1} M$ . Parmi les autres composants minéraux habituels du milieu de culture, nous avons établi que le dosage n'est pas possible si la concentration de  $\text{PO}_4^-$  dans le

liquide enzymatique-atteint  $10^{-2}$  M puisque dans ce cas le "lait" coagule spontanément.

Enfin l'essai de trois échantillons de poudre de lait du même type commercial mais de provenances différentes, montre la nécessité d'établir un étalonnage nouveau (nouvelle détermination de  $K$  et de  $a$ ) mais n'enlève rien à la validité du dosage.

#### b. Relation existant entre activité coagulante et activité protéolytique

Nous avons déterminé l'activité protéolytique et l'activité coagulante sur des prises du bouillon de culture de *Coccus P* prélevées après des temps de croissance différents et centrifugées. Dans nos conditions de travail, ces temps sont compris entre 10 heures et 3 jours d'incubation et l'activité protéolytique trouvée dans les prises varie entre 20 et 400 unités par ml. Dans tous les cas, nous avons constaté qu'on mesure un même temps de coagulation lorsqu'on dilue les prises de façon à réaliser une même concentration d'unités protéolytiques par ml ( $\pm 2\%$ ). Ceci signifie qu'à n'importe quel moment de la croissance, les deux activités se trouvent toujours associées dans le même rapport. On a obtenu le même résultat en examinant des solutions enzymatiques provenant de bouillons de culture de composition différente par rapport aux sources d'azote et de carbone organiques habituellement utilisées.

TABLEAU I

CONSTANTES ( $K$ ) DE VITESSE D'INACTIVATION, DÉTERMINÉES PAR PROTÉOLYSE ET PAR COAGULATION  
La solution enzymatique utilisée est à pH 7.5 et contient  $\text{Ca}^{++} \cdot 10^{-3}$  M. La cinétique de l'inactivation satisfait dans les trois cas à l'équation d'une réaction d'ordre 1 ( $K = 2,3/t \cdot \log C_0/C$ ). E 600 = diéthyl (*paranitrophényl*)phosphate; DFP = diisopropylfluorophosphate.

Activité dosée	$K/\text{sec}^{-1} \cdot 10^4$ d'inactivation:		
	Thermique à $58^\circ$	Par E 600 $10^{-3}$ M à $25^\circ$	Par DFP $10^{-3}$ M à $25^\circ$
Protéolytique	10.0	1.7	très grand*
Coagulante	10.0	1.5	très grand*

\* L'inactivation est immédiate et la valeur de  $K$  est trop grande pour être mesurable.

Nous avons ensuite étudié la cinétique suivant laquelle les deux activités disparaissent lorsqu'on soumet le bouillon de culture centrifugé soit à l'action de la chaleur, soit à celle d'inhibiteurs tels que les esters alkylphosphorylés<sup>14</sup>. Le Tableau I montre que dans chaque type d'inactivation on trouve les mêmes résultats, qu'il s'agisse de l'activité protéolytique ou de l'activité coagulante.

Ainsi qu'il sera dit dans le deuxième travail de cette série<sup>10</sup>, la protéase de *Coccus P* est libérée dans le milieu extérieur à l'état de zymogène inactif. On verra que dans des conditions particulières, il est possible de suivre la réaction de formation de l'enzyme

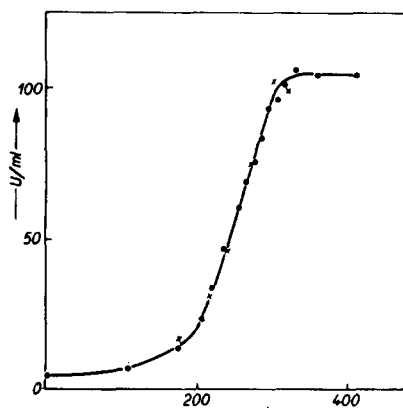


Fig. 4. Formation autocatalytique de l'enzyme actif.  $t$  = temps d'activation (en minutes).  $U/\text{ml}$  = Unités protéolytiques formées:  $\bullet$  = Mesurées par coagulation du lait;  $\times$  = Mesurées par protéolyse de la caséine. Activation à  $25^\circ$  et à pH 7.5 du bouillon, centrifugé et additionné de merthiolate, d'une culture à  $26^\circ$  et à la fin de la croissance exponentielle.

actif. La Fig. 4 montre que l'activité protéolytique et l'activité coagulante apparaissent parallèlement, suivant la même cinétique qui est celle de la même réaction autocatalytique.

L'identité des résultats obtenus à la fois en étudiant l'activation et l'inactivation nous paraît suffisante pour prouver que par l'activité protéolytique et par l'activité coagulante, on dose la même protéine. Puisqu'enfin les deux activités ont le même pH optimum, et sont sensibles aux mêmes inhibiteurs, dont la spécificité pour les centres actifs de certaines protéinases est bien connue, on peut penser avec assez de probabilité, que hydrolyse des liaisons peptidiques et coagulation du lait sont deux manifestations de l'activité d'un même centre spécifique de la protéinase de *Coccus P*.

#### CONCLUSIONS

On détermine l'activité coagulante dans la solution enzymatique qu'on étudie en mesurant le temps de coagulation ( $T$ ) sur une dispersion de "lait" à 1% dans les conditions standard décrites. D'après cette donnée expérimentale et puisque maintenant on a le droit de dire que  $[E]$  (concentration de l'enzyme coagulant) est identique à  $[U]$  (concentration de l'enzyme protéolytique), on calcule  $U$  par la formule suivante:

$$U = \frac{K}{T - a}$$

déduite de l'équation (I) après substitution de  $E$  par  $U$ . Pour déterminer une fois pour toutes les valeurs de  $K$  et de  $a$ , valables pour un même lot de poudre de lait et dans les conditions standard choisies, on établit une courbe étalon comme il a été décrit pour les courbes de la Fig. 1.  $K$  est la pente de cette courbe et  $a$  l'ordonnée à l'origine.

#### RÉSUMÉ

On décrit une nouvelle technique de détermination de l'activité coagulante sur le lait d'une préparation enzymatique et on démontre que le dosage reste précis dans de très larges limites de concentrations de l'enzyme.

Cette technique est caractérisée par l'emploi d'une dispersion de poudre de lait écrémé à faible concentration (1%) dans du milieu tamponné. Elle peut servir pour le dosage de la protéinase de *Coccus P* puisqu'on démontre que l'activité protéolytique et l'activité coagulante sont dues dans ce cas au même centre actif d'une seule protéine.

La méthode est particulièrement utile pour suivre la cinétique de formation d'un enzyme protéolytique par une population bactérienne se développant en milieu complexe (bouillons peptonés divers).

#### SUMMARY

A new technique is described for the determination of the milk coagulating activity of an enzymic preparation, and it is shown that the method is precise between wide limits of enzyme concentration.

This technique is characterized by the use of a dispersion of skimmed, powdered milk at low concentration (1%) dissolved in a buffered medium. It can be used for the assay of the proteinase of *Coccus P* since it has been shown that both the proteolytic and coagulating activities are caused by the same active center of a single protein.

The method is especially applicable in following the kinetics of proteolytic enzyme formation by a bacterial culture growing in complex media (various peptone broths).

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Methode beschrieben, welche erlaubt, quantitativ den Verlauf der Koagulation einer Milchlösung zu verfolgen, welche von Enzympräparaten verursacht wird. Diese Bestimmung bleibt in weiten Konzentrationsgrenzen des Enzyms genau.

Diese Methode ist dadurch charakterisiert, dass in einer Pufferlösung eine Dispersion von entrahmtem Milchpulver in sehr niedriger Konzentration (1 %) verwendet wird. Auf diese Weise kann die Aktivität der Proteinase des *Coccus P* bestimmt werden, da für die proteolytische und koagulierende Wirkung dasselbe aktive Zentrum des Enzyms verantwortlich ist.

Dieselbe Methode hat sich als besonders günstig bei kinetischen Studien von proteolytischen Enzymen erwiesen, die von Bakterienstämmen erzeugt werden, welche sich in komplexen Nährlösungen (verschiedenen Peptonlösungen) entwickeln.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. HOLTER, *Die Methoden der Fermentforschung*, Ed. BAMANN UND MYRBÄCK, Band 2, Seite 2081, Thieme Verlag, Leipzig 1941.
- <sup>2</sup> N. J. BERRIDGE, *The Analyst*, 77 (1952) 57.
- <sup>3</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1935) 459.
- <sup>4</sup> R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 21 (1938) 501.
- <sup>5</sup> A. K. BALLS ET S. R. HOOVER, *J. Biol. Chem.*, 121 (1937) 737.
- <sup>6</sup> S. D. ELLIOTT ET V. P. DOLE, *J. Exp. Med.*, 85 (1947) 305.
- <sup>7</sup> N. J. BERRIDGE, *The Enzymes*, Ed. SUMMER AND MYRBÄCK, vol. 1, Part 2, page 1079, Academic Press, New York 1950.
- <sup>8</sup> J. BEUMER, *Acta Biol. belg.*, 2 (1941) 273.
- <sup>9</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- <sup>10</sup> L. GORINI ET G. LANZAVECCHIA, *Biochim. Biophys. Acta*, (1954) sous presse.
- <sup>11</sup> M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
- <sup>12</sup> E. W. SUTHERLAND, C. F. CORI, R. HAYNES ET N. S. OLSEN, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 825.
- <sup>13</sup> N. J. BERRIDGE, *Nature*, 149 (1942) 194.
- <sup>14</sup> A. K. BALLS ET E. F. JANSEN, *Adv. in Enzymol.*, 13 (1952) 332.

Reçu le 22 mars 1954