

EFFETS D'UN INHIBITEUR DE LA CATALASE SUR LA FORMATION INDUITE DE CET ENZYME CHEZ LA LEVURE

par

H. CHANTRENNE

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Université libre de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Dans une étude remarquable de l'induction de la β -galactosidase chez *E. coli*, MONOD, COHEN-BAZIRE ET COHN¹ ont montré, entre autres choses, que le phényl- β -thiogalactoside, inhibiteur compétitif de l'enzyme inhibe quelque peu sa formation induite, mais que cette inhibition n'est pas compétitive et qu'elle n'est donc pas liée à son action sur l'enzyme.

Les résultats que nous rapportons ci-dessous et qui concernent la formation induite de catalase chez la levure montrent qu'un inhibiteur de l'enzyme peut *favoriser* sa formation, bien qu'il soit dépourvu de toute propriété inductrice.

Les inhibiteurs les plus caractéristiques de la catalase sont sans doute l'hydroxylamine et l'azoture. Il est vrai que ces substances affectent plusieurs autres systèmes; mais la catalase est tellement plus sensible à ces toxiques qu'il doit être possible de l'inhiber presque complètement en n'affectant que peu l'activité des autres enzymes.

Le présent travail a d'ailleurs porté sur le mutant "petites colonies" d'EPHRUSI² qui forme la catalase³, le cytochrome *c*^{4,5} et la cytochromeperoxydase⁶ sous l'action de l'oxygène, mais qui est incapable de constituer un système respiratoire complet^{4,5}. En choisissant ce mutant, nous évitons donc la formation simultanée de plusieurs enzymes sensibles à l'azoture, ainsi que l'apparition d'un nouveau système fournisseur d'énergie. L'interprétation des résultats s'en trouve simplifiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Levure: Mutant "petites colonies"¹ isolé d'une souche diploïde de *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Foam) à la suite d'un traitement à l'acriflavine*.

Culture, aération et préparation des extraits: cf. publication antérieure³.

Dosage de la catalase dans les extraits: Selon VON EULER ET JOSEPHSON⁷.

Mesure de l'activité catalasique des suspensions de levure

La titration de l'eau oxygénée par le permanganate est rendue très peu précise par la présence de substances réductrices dans les suspensions de levure. Elle est remplacée avantageusement par un dosage colorimétrique basé sur la réaction classique de l'eau oxygénée avec les sels de titane.

Réactif au titane: Solution saturée de sulfate de titane dans l'acide sulfurique 2 N, diluée au 1/5 avec une solution d'acide sulfurique 2 N.

Mode opératoire: 10 ml d'une suspension de levure (3 à 5 mg poids sec par ml) sont additionnés de 0.4 ml d'une solution 0.15 M d'eau oxygénée. Après des durées d'incubation bien déterminées

* Ce mutant nous a été donné très aimablement par Mr. EPHRUSI. Nous l'en remercions vivement.

(0, 1, 2, 4 et 6 minutes) à 28°, des prises de 1 ml sont mélangées à 2 ml de réactif au titane contenus dans de petits tubes à centrifuger. Une coloration jaune se développe immédiatement. Après centrifugation, l'intensité de cette coloration est mesurée à l'aide d'un colorimètre. L'extinction à 410 m μ est proportionnelle, dans de larges limites, à la concentration de l'eau oxygénée.

Une méthode presque identique à d'ailleurs été décrite par PATTI ET BONET-MAURY⁸.

Détermination de la radioactivité des protéines

5 ml de la suspension de levure qui a été incubée avec le glycolle radioactif sont mélangés à un volume égal d'une solution d'acide trichloracétique à 20 % contenant 1 mg de glycolle non-radioactif par ml. Après centrifugation, le précipité est lavé trois fois avec une solution à 5 % d'acide trichloracétique contenant également du glycolle non-radioactif. Le culot est alors traité à 100° pendant 30 minutes par 5 ml d'une solution normale d'acide perchlorique; cette opération est destinée à extraire les bases puriques des acides nucléiques. Le précipité est ensuite lavé à l'acide perchlorique froid, puis à l'alcool, et transféré quantitativement sur un petit carré de papier filtre, lavé encore à l'alcool puis à l'acétone et séché. La radioactivité de ce précipité est déterminée à l'aide d'un compteur de Geiger à fenêtre mince. Toutes les prises d'une même expérience contenant la même quantité de protéines, aucune correction n'a dû être faite pour l'absorption propre.

PETERSON ET GREENBERG⁹ recommandent de laver les précipités de protéines avec une solution de thioglycolate pour éliminer certains dérivés contenant du glycolle radioactif et qui sont liés de façon labile au précipité de protéines. Des essais effectués dans ce laboratoire ont montré que pour la levure et dans les conditions où nous opérons, le thioglycolate ne détache aucune substance radioactive en quantité notable des précipités de protéines. Le traitement au thioglycolate a donc été omis.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Action de l'azoture et de l'hydroxylamine sur l'activité de la catalase *in vivo*

La catalase, telle qu'elle se présente dans un extrait de levure à pH 7 en tampon de phosphate 0.02 M voit son activité réduite de moitié par l'hydroxylamine $2.8 \cdot 10^{-7}$ M ou par l'azoture $1.1 \cdot 10^{-6}$ M. Mais il ne s'ensuit pas qu'aux mêmes concentrations ces agents inhibent au même degré la catalase contenue dans les cellules intactes. Il est donc essentiel de déterminer le degré d'inhibition de la catalase *in vivo* en fonction de la concentration d'inhibiteur dans les conditions habituelles d'induction de l'enzyme.

Dans ce but, de la levure préalablement enrichie en catalase par une aération de 5

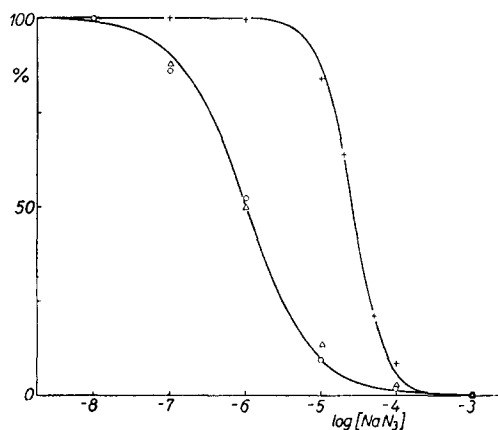


Fig. 1. Action de diverses concentrations d'azoture sur : ○ : l'activité catalasique d'un extrait de levure. △ : l'activité catalasique d'une suspension de levure intacte. + : la vitesse d'incorporation du glycolle-1-¹⁴C dans les protéines de la levure.

heures a été remise en suspension dans du milieu frais, et l'activité catalasique de cette suspension a été déterminée à 28°, en présence de diverses concentrations d'hydroxylamine et d'azoture. Les résultats de cette expérience, qui sont rassemblés dans la Figure 1, indiquent que l'activité catalasique de la levure intacte est inhibée par l'azoture au même degré que la catalase des extraits. Il n'en va pas de même pour l'hydroxylamine : alors qu'une concentration de $2.8 \cdot 10^{-7}$ M suffit à inhiber à 50 % la catalase des extraits, il faut une concentration au moins 2000 fois plus élevée pour obtenir le même effet sur la catalase des cellules intactes (Fig. 2). Ceci nous permet de conclure que l'activité catalasique des suspensions de levure n'est pas due à de la catalase extracellulaire, car

celle-ci serait accessible à l'hydroxylamine aussi bien qu'à l'azoture; la catalase dont nous mesurons l'activité sur les suspensions est donc contenue dans les cellules et le degré d'inhibition de cette activité par l'azoture est bien celui de la catalase intracellulaire *in vivo*.

Réversibilité de l'inhibition par l'azoture

L'inhibition de la catalase par l'azoture varie avec la concentration du toxique conformément à une loi de saturation réversible typique (Fig. 1). L'expérience suivante a pour but de déterminer si on peut retrouver intégralement l'enzyme dans un extrait de levure après que la catalase ait été inhibée totalement *in vivo* par l'azoture.

Expérience: Une suspension de levure préalablement aérée pendant 5 heures a été partagée en deux parties égales; à l'une d'elles, de l'azoture de sodium a été ajouté jusqu'à une concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Après 20 minutes, la levure des deux suspensions a été partagée en plusieurs portions, centrifugée et lavée 3 fois avec de l'eau distillée. Des extraits ont été préparés à partir de chacune de ces portions et leur activité catalasique déterminée.

L'activité des extraits obtenus à partir des échantillons de levure traitée à l'azoture a été exprimée en % de l'activité moyenne des extraits de la levure témoin. Les résultats furent les suivants:

1 ^{re} expérience: 3 lavages	83, 85, 84%
2 ^e expérience: 4 lavages	95, 97, 92%

On retrouve dans ces conditions de 85 à 95% de la catalase réellement présente dans les extraits. Il est donc possible de déterminer d'une façon satisfaisante la quantité de catalase présente dans des cellules préalablement intoxiquées par l'azoture. Les résultats de tels dosages, qui sont rapportés dans les expériences qui suivent, n'ont pas été corrigés pour cette faible perte d'activité; ils sont sans doute entachés d'une erreur systématique de 5 à 15% par défaut.

Action de l'azoture de sodium sur la formation induite de catalase

De la levure cultivée en anaérobiose a été aérée pendant 5 heures en présence de diverses concentrations d'azoture, et la catalase a été dosée dans les extraits.

Expérience: La levure cultivée à l'abri de l'air pendant 24 heures a été remise en suspension (4 mg poids sec par ml) dans un milieu contenant 40 g de glucose, 450 mg KH_2PO_4 et 20 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ par litre. Des portions de 30 ml de cette suspension ont été introduites dans sept boîtes de Roux. A chacune d'elles a été ajouté ce qu'il fallait d'azoture de sodium pour obtenir des concentrations finales de 0, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} et 10^{-3} M respectivement. Les suspensions ont été agitées pendant 5 heures à 28° , et la teneur en catalase des extraits préparés à partir des différents échantillons a été déterminée.

Bibliographie p. 417.

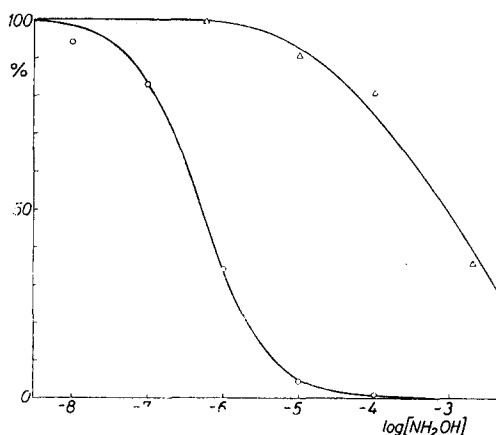


Fig. 2. Action de diverses concentrations d'hydroxylamine sur l'activité catalasique de O: un extrait de levure. Δ: une suspension de levure intacte.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans la Table I:

TABLE I

Echantillon	Concentration initiale de l'azoture	Activité Kat.F.
Non aéré	0	0.6
Aéré 5 h	0	6.4
Aéré 5 h	$10^{-8} M$	6.1
Aéré 5 h	$10^{-7} M$	6.0
Aéré 5 h	$10^{-6} M$	5.6
Aéré 5 h	$10^{-5} M$	6.7
Aéré 5 h	$10^{-4} M$	7.6
Aéré 5 h	$10^{-3} M$	0.6

L'azoture, à diverses concentrations qui inhibent la catalase *in vivo* de 0 à 99% (cf. Fig. 1) n'a nullement empêché la formation induite de l'enzyme. Il faut atteindre une concentration de $10^{-3} M$ pour supprimer la formation de l'enzyme; or à cette concentration l'azoture empêche toute synthèse d'enzymes¹², et il arrête complètement l'incorporation d'acides aminés dans les protéines de la levure ainsi que le montre l'expérience suivante:

Action de diverses concentrations d'azoture sur l'incorporation de glycolle radioactif dans les protéines de la levure

Des travaux de ce laboratoire, qui seront publiés prochainement, montrent que le glycolle radioactif s'incorpore rapidement dans les protéines de la levure en milieu glucosé. Dans des conditions bien choisies, la quantité de glycolle- ^{14}C incorporé dans les protéines est proportionnelle au temps d'incubation pendant les 20 premières minutes au moins.

L'influence de diverses concentrations d'azoture sur l'incorporation du glycolle a été déterminée de la façon suivante: 10 ml de la suspension de levure étaient additionnés de 0.1 ml d'une solution de glycolle- ^{14}C contenant 10 μ moles de glycolle par ml et donnant environ 40,000 coups par ml. Après 10 minutes d'incubation à 28°, la réaction était bloquée par addition de 10 ml d'une solution à 20% d'acide trichloracétique et la radioactivité des protéines contenues dans l'échantillon était déterminée selon la technique indiquée plus haut.

Les résultats ont été réunis dans la Table II et la Fig. 1.

TABLE II

Concentration de l'azoture	Coups minute	Radioactivité en % du témoin
0	215	(100)
$10^{-6} M$	211	98
$10^{-5} M$	177	84
$2 \cdot 10^{-5} M$	136	64
$5 \cdot 10^{-5} M$	46	22
$10^{-4} M$	19	9

L'azoture inhibe donc fortement l'incorporation des acides aminés dans les protéines de

la levure; cet effet résulte sans doute de l'action de l'azoture sur le système des phosphorylations¹²; il a d'ailleurs été signalé pour le foie^{13,14} et pour *E. coli*¹⁵.

Les chiffres de la Table II montrent aussi que la vitesse d'incorporation dépend fortement de la concentration en azoture, surtout entre 10^{-5} et 10^{-4} M. Nous en avons tiré parti pour estimer la concentration de l'azoture dans la suspension de levure au cours d'expériences de longue durée pendant lesquelles on peut craindre que la concentration d'inhibiteur ne change. Ainsi en déterminant le degré d'inhibition de l'incorporation du glyocolle au cours de l'expérience dont les résultats sont consignés dans la Table I, nous avons pu constater qu'après 5 heures d'aération la concentration d'azoture était passée de 10^{-4} M à 2.10^{-5} M. Il importe donc de contrôler la concentration de l'azoture tout au long de l'expérience et de compenser par de nouvelles additions d'inhibiteur les pertes d'azoture dues sans doute à la volatilité de l'acide azothydrique et à son oxydation.

Dans l'expérience suivante, la catalase a été dosée sur les suspensions de levure et dans les extraits, et la vitesse d'incorporation de glyocolle radioactif dans les protéines a été déterminée à divers moments au cours de l'aération. La concentration en azoture a été maintenue par des additions fréquentes de petites quantités d'inhibiteur.

Etude de la formation de catalase en fonction du temps, en présence d'azoture

De la levure cultivée à l'abri de l'air a été aérée pendant 3 heures soit en l'absence d'azoture, soit en présence d'azoture dont la concentration était maintenue entre 2.10^{-5} et 5.10^{-5} M, concentrations qui inhibent la catalase à 97–98%. Après 0, 1 h, 2 h et 3 h d'aération, trois échantillons ont été prélevés de chacune des suspensions; l'un a servi à la détermination directe de l'activité catalasique des suspensions telles quelles, le second à la détermination de la vitesse d'incorporation de glyocolle radioactif dans les protéines, et le troisième à la préparation d'extraits pour le dosage de la catalase réellement présente dans les cellules. Les résultats de cette expérience sont consignés dans la Table III et la Fig. 2.

TABLE III

	Activité catalasique de la suspension	Catalase dans l'extrait	Vitesse d'incorporation
Levure aérée sans azoture			
0	0.11	0.54	100
1 h	0.20	1.10	100
2 h	0.31	1.9	100
3 h	0.36	2.1	100
Levure aérée en présence d'azoture			
0 h	0.01	—	39
1 h	0.01	0.44	49
2 h	0.02	1.1	37
3 h	0.01	1.6	21

Pendant toute la durée de l'expérience, la catalase était donc inhibée presque complètement par l'azoture et la vitesse d'incorporation des acides aminés dans les protéines était considérablement réduite. La Fig. 3 indique que la synthèse de l'enzyme a été

retardée au début, mais qu'elle s'est ensuite déroulée à une vitesse comparable à celle du témoin.

Dans l'expérience suivante, la concentration en azoture était un peu plus faible ($2.10^{-5} M$) et la synthèse a été étudiée pendant 7 heures. L'activité de la catalase était inhibée à 95 % environ et l'incorporation du glycolie à 35 %. Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans la Table IV et la Fig. 4.

TABLE IV

	Activité catalasique de la suspension	Catalase dans l'extrait
Levure aérée sans azoture		
0 h	0.11	0.66
1 h	0.19	1.9
3 h	0.38	3.5
5 h	0.48	4.8
7 h	—	5.2
Levure aérée en présence d'azoture		
0 h	0.01	—
1 h	0.01	0.85
3 h	0.03	3.4
5 h	0.04	5.9
7 h	0.04	8.0

Ces résultats, semblables à ceux de l'expérience précédente, sont encore plus frappants : en présence d'azoture qui inhibe l'activité catalasique de 95 % environ, la synthèse de cet enzyme, après avoir été quelque peu retardée, se produit plus rapidement que dans le témoin ; les cellules dans lesquelles la catalase était inhibée ont produit plus de catalase que les témoins.

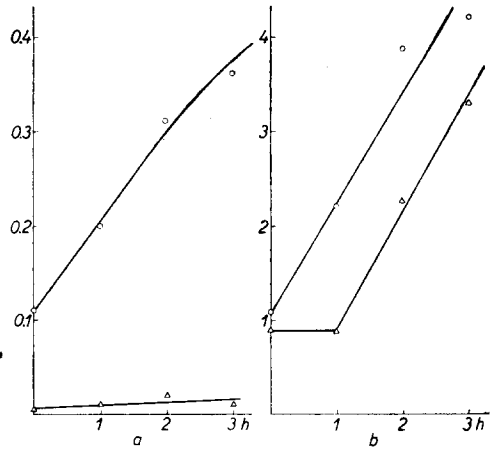


Fig. 3

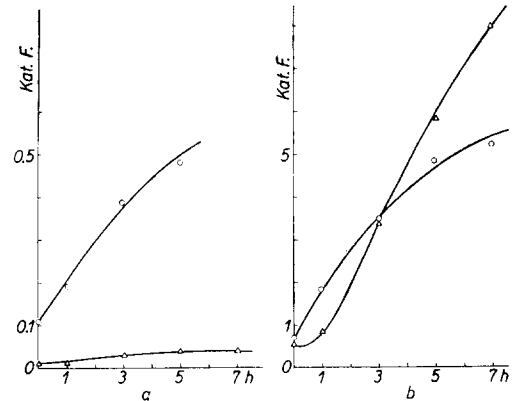


Fig. 4

Figs. 3 et 4. Action de l'azoture sur la formation induite de la catalase et sur l'activité de l'enzyme. a. Activité catalasique des suspensions de levure intacte; b. Activité catalasique des extraits des mêmes cellules. O : Levure aérée en l'absence d'azoture. Δ : Levure aérée en présence d'azoture.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les courbes d'inhibition par l'azoture de l'activité catalasique des suspensions et de la catalase des extraits se superposent parfaitement ; ceci permet de penser que c'est le même enzyme que nous dosons dans les deux cas, et que l'azoture atteint librement la catalase des cellules intactes. La faible sensibilité de l'activité catalasique des suspensions à l'hydroxylamine s'explique dès lors le plus simplement en supposant que l'enzyme est difficilement accessible à l'hydroxylamine. L'activité mesurée sur les suspensions n'est donc pas due à un enzyme extérieur aux cellules ; elle doit correspondre à l'activité de la catalase contenue à l'intérieur des cellules ; on peut d'ailleurs constater qu'au cours

de la formation induite de l'enzyme, l'activité de la suspension augmente parallèlement à celle des extraits. Nous avons montré d'autre part qu'après élimination de l'azoture on retrouve dans les extraits de 85 à 95 % de la catalase réellement présente. Cela nous a permis de déterminer, d'une part l'activité de la catalase *in vivo*, et d'autre part la quantité d'enzyme présent.

Nos expériences montrent que l'azoture 2.10^{-5} M inhibe de 95 % l'activité de la catalase dans la cellule de levure sans inhiber la formation de cet enzyme.

Le fonctionnement de l'enzyme n'est donc pas une condition de sa formation. Cette conclusion rejoint celle à laquelle MONOD et ses collaborateurs¹ sont parvenus dans le cas de la β -galactosidase d'*E. coli*.

Tout permet de penser que la formation induite de catalase repose sur la synthèse d'une protéine nouvelle³. Aussi peut-il sembler paradoxal qu'elle ne soit pas inhibée et qu'elle puisse même être favorisée par l'azoture dans des conditions où ce toxique réduit de 35 % la vitesse d'incorporation d'un acide aminé dans les protéines. Cette contradiction n'est cependant qu'apparente; il est parfaitement concevable, en effet, que la synthèse nette d'une protéine particulière soit accrue bien que l'incorporation d'un acide aminé dans l'ensemble des protéines de la cellule soit ralentie, même si cette incorporation pouvait être considérée sans plus comme reflétant une synthèse nette de protéines. On doit sans doute en conclure que la vitesse de formation de la catalase chez la levure n'est pas limitée par l'activité des systèmes qui assurent l'incorporation des acides aminés dans les protéines; dès lors il est raisonnable de supposer qu'elle est limitée par ce qu'il y a de spécifique dans la synthèse de la catalase, c'est-à-dire par le processus d'induction.

Or nous voyons qu'il s'est formé plus de catalase dans les cellules dans lesquelles l'enzyme était fortement inhibé que dans celles où son activité pouvait s'exprimer librement. D'autre part, nous n'avons jamais pu mettre en évidence d'induction de la catalase par l'azoture; c'est donc bien comme inhibiteur de l'enzyme que l'azoture agit. Tout ceci nous conduit à conclure que *l'activité réelle de l'enzyme in vivo pourrait être l'un des facteurs qui limitent la synthèse nette de l'enzyme induit*.

Cet effet pourrait résulter d'une limitation par l'enzyme de la concentration de l'inducteur dans la cellule. Supposons en effet que l'inducteur de la catalase soit l'eau oxygénée qui se forme lorsque les systèmes réducteurs de la levure sont au contact de l'oxygène¹¹, et que la synthèse nette se produise lorsque la concentration de l'eau oxygénée dépasse un certain seuil. Il est évident que la catalase active apparaissant dans la cellule abaisserait la concentration de l'inducteur et tendrait à limiter l'induction; en présence d'un inhibiteur de l'enzyme, au contraire, la concentration de l'inducteur se maintiendrait plus longtemps à un niveau suffisamment élevé pour assurer l'induction. Un mécanisme de ce type pourrait participer à l'ajustement des systèmes enzymatiques complexes qui se forment par inductions successives. Nous croyons que la formation accrue de catalase en présence d'azoture pourrait être la manifestation d'un tel mécanisme d'autorégulation et ouvrir la voie de son étude expérimentale.

Remarquons enfin qu'en présence d'azoture la formation de catalase commence plus tard qu'en l'absence du toxique. Nous ignorons la signification de cette phase de latence. Nous ne croyons pas qu'il s'agisse d'un artefact dû à une récupération incomplète de la catalase réellement présente dans les cellules: des expériences systématiques nous ont en effet montré que nous en retrouvons toujours de 85 à 95 %. Cette phase de latence révèle peut-être une inhibition par l'azoture d'une étape du "métabolisme

d'induction". L'action d'inhibiteurs dépourvus de toxicité générale permettra sans doute d'éclaircir ce point particulier.

Cette recherche a été effectuée dans le cadre du Centre national de Recherches enzymologiques, avec l'appui de la Fondation Rockefeller et du Fonds national de la Recherche scientifique.

RÉSUMÉ

A des concentrations bien choisies, l'azoture inhibe presque complètement l'activité de la catalase *in vivo* sans empêcher la formation induite de cet enzyme; l'azoture peut même favoriser la synthèse de la catalase.

Ces résultats montrent que la formation induite de la catalase n'est pas conditionnée par son fonctionnement. Ils indiquent d'autre part que l'activité réelle de l'enzyme *in vivo* peut être l'un des facteurs qui limitent la synthèse de l'enzyme et qui contribuent à l'ajustement de sa concentration finale dans la cellule.

SUMMARY

At proper concentrations, azide inhibits catalase activity almost completely but does not prevent the oxygen-induced formation of catalase; it can in effect enhance the synthesis of this enzyme.

These observations mean that induced catalase formation does not require the enzyme to be active. They suggest that the actual activity of the enzyme within the cell may be one of the factors which limit its synthesis and control the final level of the enzyme in the cell.

ZUSAMMENFASSUNG

In geeigneten Konzentrationen hemmt Stickstoffwasserstoffsäure die Katalasaktivität fast vollständig, ohne die durch Sauerstoff induzierte Bildung des Enzyms zu verhindern; sie kann sogar die Synthese der Katalase begünstigen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die induzierte Bildung der Katalase nicht von ihrer Wirksamkeit abhängt. Sie lassen andererseits vermuten, dass die wirkliche Aktivität *in vivo* eine der Faktoren ist, die die Synthese des Enzyms begrenzt und die zur Einstellung der Endkonzentration in der Zelle beiträgt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. MONOD, G. COHEN-BAZIRE ET M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 585.
- ² B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER ET A.-M. CHIMÈNES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- ³ H. CHANTRENNE ET C. COURTOIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 397.
- ⁴ B. EPHRUSSI ET P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- ⁵ P. SLONIMSKI, *La Formation des Enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, Paris, 1953.
- ⁶ H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 157.
- ⁷ H. VON EULER ET K. JOSEPHSON, *Liebigs Ann. Chem.*, 455 (1927) 1.
- ⁸ F. PATTI ET P. BONET-MAURY, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 1177.
- ⁹ E. A. PETERSON ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 359.
- ¹⁰ M. POLLOCK, in *Symposium on Adaptation in Micro-organisms* (1953) Cambridge University Press.
- ¹¹ B. CHANCE, *Science*, 116 (1952) 202.
- ¹² S. SPIEGELMAN, *J. Cellular. Comp. Physiol.*, 30 (1947) 315.
- ¹³ H. BORSOOK, C. L. DEASY, A. J. HAAGEN-SMIT, G. KEIGHLEY, P. H. LOWY, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 689.
- ¹⁴ T. WINNICK, F. FRIEDBERG ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 117.
- ¹⁵ J. B. MELCHIOR, M. MELLODY, I. M. KLOTZ, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 81.

Reçu le 27 septembre 1954