

RELATIONS ENTRE DEGRÉ DE DÉNATURATION ET
SENSIBILITÉ À LA TRYPSINE DE LA SÉRUMALBUMINE.
INFLUENCE DE Ca^{++} ET DE Mn^{++} ET RÔLE DES PONTS DISULFURE

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

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

L'analyse des peptides résultant de l'hydrolyse par la trypsine de chaînes peptidiques naturelles (insuline¹; ACTH²; salmine³; vasopressine^{4,5}; lysozyme⁶), a montré dans tous les cas que les coupures de la chaîne ont lieu seulement aux endroits prévisibles d'après les lois de spécificité de la trypsine, établies dans le cas de peptides simples synthétiques⁷. D'autre part on sait que de nombreuses protéines sont d'autant moins attaquables par la trypsine, qu'elles ont été moins profondément dénaturées. Il est donc évident que la superstructure suivant laquelle s'organise la chaîne peptidique d'une protéine apporte aux possibilités d'attaque par la trypsine, des limitations nouvelles qui se superposent à celles déterminées par l'ordre d'enchaînement des acides aminés. Or nous pensons que l'étude des variations de sensibilité à la trypsine subies par une protéine au cours de sa dénaturation, peut fournir des informations sur la configuration des structures attaquables par la trypsine dans la protéine native.

Dans ce travail nous montrons en premier lieu l'existence d'une relation entre ponts disulfure et sensibilité à la trypsine de la sérumalbumine. Ensuite nous étudions le mode d'action des ions Ca^{++} et Mn^{++} dans les premiers stades de la dénaturation thermique. En effet, on a déjà observé^{8,9} que ces métaux protègent la protéine contre cette dénaturation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

La sérumalbumine utilisée est la Fraction V (Armour) selon COHN ET EDSALL, du plasma de bœuf. La trypsine est l'enzyme cristallisé (Worthington). Les sels de Ca et de Mn sont les chlorures. Toutes les solutions sont faites dans du tampon borate ($5 \cdot 10^{-2} M$) d'après CLARK ET LUBBS, à pH 7.9.

La sérumalbumine dénaturée standard (SADS) est préparée suivant la technique déjà décrite⁹ par chauffage à 127° de la solution de Fraction V à 2.4% dans la tampon borate pH 7.9.

Les essais de protéolyse sont faits à pH 7.9, tampon borate. A 5 ml de solution à 2.4% de sérumalbumine on ajoute 1 ml de solution de trypsine. La concentration de la solution d'enzyme (poids de la protéine) ainsi que la température de protéolyse, sont indiquées dans chaque expérience. L'action enzymatique est arrêtée par addition de 10 ml d'acide trichloracétique à 5%. Les produits d'hydrolyse sont dosés dans le surnageant trichloracétique en mesurant le coefficient d'extinction ϵ à 280 m μ (spectrophotomètre de Beckman). Tous les détails techniques ont été déjà décrits⁹. Les conditions (pH, température, contact de l'air) réalisées au cours de la protéolyse, favorisent l'oxydation de la cystéine éventuellement introduite. Ce fait rend nécessaire une correction de la valeur de l'extinction à 280 m μ du surnageant trichloracétique, car la cystine

a une absorption plus grande que la cystéine. On apporte donc aux vitesses de protéolyse et aux courbes relatives aux essais contenant la cystéine, la correction de la valeur de $4\epsilon \cdot 10^3/\text{min}^{-1}$ correspondant à la vitesse d'oxydation de la cystéine déterminée par des essais parallèles sans trypsine. Cette vitesse est de l'ordre de 1.0. La vitesse de protéolyse est exprimée par $4\epsilon \cdot 10^3/\text{min}^{-1}$; elle est calculée à partir de la pente de la courbe de protéolyse exprimant les valeurs de $\epsilon \cdot 10^3$ en fonction du temps de protéolyse. Dans le cas de la SADS on donne la valeur de la vitesse initiale constante. Dans le cas de la sérumalbumine non dénaturée (SAND) on donne ou la courbe de protéolyse, ou la vitesse moyenne pendant les 10 premières minutes de protéolyse, ou la vitesse constante mesurée pendant la deuxième phase de la protéolyse (voir Fig. 2).

Le dosage des groupements sulfhydryles est fait par le ferricyanure suivant la méthode classique¹⁰. La teneur en SH est exprimée en g de cystéine pour cent g de protéine.

Résultats

I – Groupements SH et sensibilité à la trypsine de la SADS

Nous avons remarqué que, au cours de quelques heures de conservation à la température ambiante, la SADS perd 20–25% de la sensibilité à la trypsine qu'elle possède aussitôt après le traitement de dénaturation. La Fig. 1 donne les vitesses de protéolyse (25° ; trypsine $200 \mu\text{g}/\text{ml}$; $\text{CaCl}_2 10^{-2} M$) de la SADS en fonction du temps de conservation à des températures différentes. On voit que cette vitesse tombe dans tous les cas à une même valeur limite (= 29), mais d'autant plus vite que la température de conservation est plus élevée (entre 0° et 50°).

Aussitôt après le traitement de dénaturation que nous utilisons, la SADS contient un pourcentage relativement élevé de groupements SH libres (15 fois plus grand que la SAND). Or nous avons constaté que, au cours de la conservation de la SADS (au contact de l'air), cette teneur en SH se réduit graduellement à la moitié, parallèlement à la diminution de sensibilité à la trypsine. Le Tableau I concerne ces observations

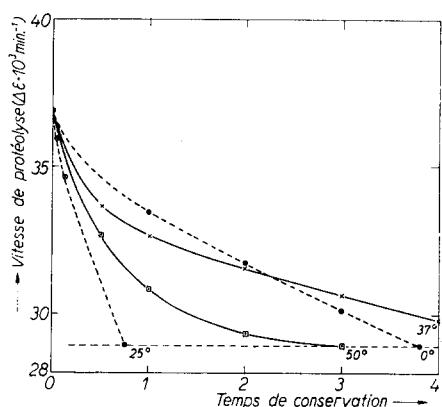


Fig. 1. Variations de sensibilité à la trypsine de la SADS conservée à des températures différentes. Temps de conservation: Courbes en traits pleins = heures; Courbes en pointillés = jours. Protéolyse à 25° par trypsine $200 \mu\text{g}/\text{ml}$; $\text{CaCl}_2 10^{-2} M$.

et montre aussi que par addition de $\text{H}_2\text{O}_2 (10^{-2} M)$ on réduit immédiatement à sa valeur minimum la sensibilité à la trypsine de la SADS. Par contre la présence de cystéine ($2 \cdot 10^{-2} M$) retarde indéfiniment cette diminution de sensibilité. La concentration moléculaire de H_2O_2 est 10 fois supérieure à celle des résidus cystéinyl qu'elle doit oxyder; celle de la cystéine rajoutée, 20 fois plus grande que celle des mêmes groupements qu'elle doit protéger. Le Tableau I montre également qu'à ces concentrations l'eau oxygénée et la cystéine n'ont pas ou guère d'action sur l'activité de la trypsine elle-même. Finalement, nous avons répété ces expériences en présence de $\text{CaCl}_2 10^{-2} M$ ajouté aussitôt après la dénaturation sans observer de différences significatives par rapport aux valeurs données dans le Tableau I.

Il est donc évident qu'une relation existe entre la présence des groupements SH et la sensibilité à la trypsine de la SADS et que Ca^{++} n'influence ni la vitesse d'oxydation des groupements SH, ni celle de la diminution de sensibilité à la trypsine.

TABLEAU I
INFLUENCE DES GROUPEMENTS SH SUR LA SENSIBILITÉ À LA TRYPSINE DE LA SADS

Heures à 26°	SH %	Vitesse de protéolyse		
		sans addition	+ cystéine	+ H ₂ O ₂
0.1	0.820	70.1	74.6	55.6
3	0.605	63.2	74.2	55.4
6	0.546	59.6	74.2	54.5
24	0.468	54.2	71.4	55.4
34	0.470	54.2	69.5	55.4
34	—	(+ H ₂ O ₂) 54.5	—	—

Heures à 26° = temps de conservation de la sérumalbumine après sa dénaturation.

SH % = les groupements SH sont donnés en g de cystéine p. 100 g de protéine.

Vitesse de protéolyse = $4\epsilon \cdot 10^3/\text{min}^{-1}$ (25°).

Les réactifs sont ajoutés à la sérumalbumine aussitôt après sa dénaturation.

II - Augmentation de la sensibilité à la trypsine de la SAND par action de la cystéine

(a) *Au cours de la protéolyse à 25°.* Une molécule de sérumalbumine (P.M. = 69.000) contient 18 résidus cystéyle et 1 cystéinylique¹¹. Les résultats que nous venons de décrire nous ont amené à supposer que la faiblesse de la sensibilité à la trypsine de la sérumalbumine avant dénaturation, est due, en partie, au nombre élevé des ponts S-S qu'elle contient. Nous avons donc étudié la protéolyse à 25° de la SAND, en présence de cystéine pouvant provoquer la rupture d'un certain nombre de ponts S-S de la protéine. La solution de sérumalbumine est préparée à 0°; on ajoute la cystéine ($2 \cdot 10^{-2} M$), on maintient 10 minutes à 25° puis, dans un premier cas on soumet à la protéolyse par 100 µg/ml de trypsine, en présence de CaCl₂ $10^{-2} M$; dans un deuxième cas, on ajoute H₂O₂ ($10^{-2} M$); dans ce dernier cas la protéolyse est faite 24 heures plus tard, et après avoir éloigné par centrifugation la cystine précipitée. Deux protéolyses de contrôle, sans cystéine, sont faites parallèlement à ces deux essais. Les courbes de la Fig. 2 donnant la quantité de sérumalbumine hydrolysée en fonction du temps de protéolyse, montrent que la cystéine augmente la sensibilité à la trypsine de la SAND et que cette action est presque totalement réversible. Cette réversibilité peut être obtenue même sans addition de H₂O₂, par simple conservation au contact de l'air pendant un temps suffisant (30 heures) de l'essai contenant la cystéine.

(b) *Après action de la cystéine à 40°.* Dans l'expérience suivante, on a fait agir tout d'abord la cystéine sur la SAND, en absence de trypsine, et ensuite on a fait la protéolyse.

Bibliographie p. 296.

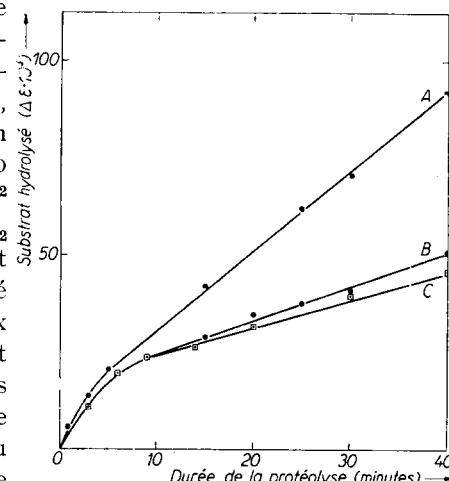


Fig. 2. Action réversible de la cystéine sur la protéolyse (25°) de la SAND. Courbe A : Protéolyse en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$. Courbe B : Protéolyse en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$ et addition ultérieure de H₂O₂ $10^{-2} M$. Courbe C : Protéolyse sans cystéine \pm H₂O₂ $10^{-2} M$. Trypsine 100 µg/ml; CaCl₂ $10^{-2} M$.

lyse. La solution de SAND est maintenue pendant 40 minutes à 40° en absence ou en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$. Un essai de contrôle n'est pas chauffé. La protéolyse est faite toujours en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$, à 25°, par 100 µg/ml de trypsine.

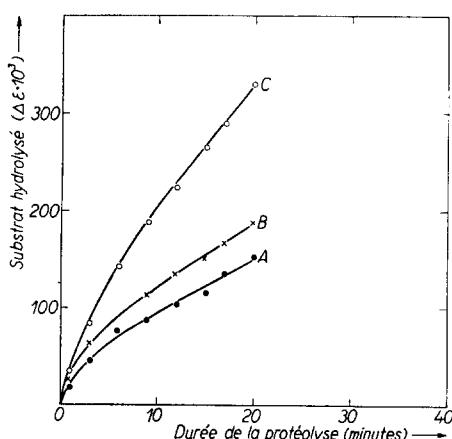


Fig. 3. Protéolyse (25°) de la SAND chauffée à 40° en présence ou en absence de cystéine. Courbe A: SAND non chauffée et en absence de cystéine. Courbe B: SAND chauffée 40 minutes à 40° en absence de cystéine. Courbe C: SAND chauffée 40 minutes à 40° en présence de cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$. Trypsine 100 µg/ml.

20 µg/ml). La réaction de protéolyse de la SAND a lieu en deux phases de vitesse différente (voir Fig. 2). Le Tableau II donne la vitesse de la deuxième de ces phases. En absence de cystéine, on retrouve les résultats déjà connus^{9,8}; c'est-à-dire que Ca⁺⁺ provoque une réduction de la vitesse d'hydrolyse de la SAND de 2,5 fois environ à 25°, et 5 fois à 40°. En présence de cystéine l'effet de Ca⁺⁺ est très petit. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans le cas de la SADS: Ca⁺⁺ n'a pas d'action sur la réaction S-S → 2SH et son effet inhibiteur sur la protéolyse de la SAND doit être attribué à un mécanisme différent.

TABLEAU II

INFLUENCE DE Ca⁺⁺ ET DE LA CYSTÉINE SUR LA PROTÉOLYSE DE LA SAND

T°	Trypsine µg/ml	Sans cystéine			Cystéine $2 \cdot 10^{-2} M$		
		Sans Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺ $10^{-2} M$	$\frac{-Ca^{++}}{+Ca^{++}}$	Sans Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺ $10^{-2} M$	$\frac{-Ca^{++}}{+Ca^{++}}$
25°	100	2.4	1.0	2.4	4.0	3.6	1.1
40°	20	7.2	1.5	4.8	11.0	8.6	1.3

Les chiffres sont les vitesses ($A\epsilon \cdot 10^3/min^{-1}$) pendant la deuxième phase de la protéolyse.

III - Premiers stades de la dénaturation thermique de la SAND. Protection par Ca⁺⁺ ou Mn⁺⁺

Nous avons étudié les variations de sensibilité à la trypsine de la SAND au cours d'un traitement thermique laissant intacts les ponts disulfure existant dans sa chaîne.

Bibliographie p. 296.

peptidique. Pour ce faire, nous avons suivi l'action de la chaleur à 50° et à 60° en contrôlant (a) la teneur en SH libre, décelable par le ferricyanure, et (b) la sensibilité à la trypsine de la SAND employée comme substrat, après le traitement thermique. On sait²² que la chaîne peptidique de la sérumalbumine contient un résidu cystéinylique par molécule, mais dans la SAND ce résidu se trouve masqué vis à vis du dosage utilisé. C'est pourquoi la teneur en SH trouvée avant tout chauffage est de 0.05 % environ au lieu de 0.18 %. Le dosage des SH fournit donc un moyen pour établir d'une part que notre traitement n'entraîne aucune coupure de ponts S-S et d'autre part qu'il provoque une dénaturation décelable autrement que par la détermination de la sensibilité à la trypsine.

Nous avons préalablement étudié le cours de la protéolyse, à 25°, par 200 µg/ml de trypsine, de la SAND préalablement chauffée à différentes températures (40°, 50°, 60°) pendant des temps variables. La Fig. 5 montre l'allure des courbes de protéolyse (substrat hydrolysé en fonction du temps) lorsque la SAND a été chauffée à 60°. On voit que la courbe 2 correspondant à un chauffage de 5 minutes devient après un certain temps sensiblement parallèle à la courbe 1 concernant la SAND non chauffée. D'autre part, nous avons constaté qu'un chauffage pendant un temps plus long que 8 heures (jusqu'à 30 heures) ne permet pas d'obtenir une courbe de protéolyse sensiblement différente de la courbe 3. Le chauffage à 40° et à 50° fournit des substrats donnant des courbes de protéolyse d'allure semblable aux courbes 1 et 2 de la Fig. 4. Dessinées sur cette figure, ces courbes se situeraient entre les courbes 1 et 2, d'autant plus éloignées de la 1 que le chauffage a été plus long et à température plus élevée. Après 40 heures à 40°, ou 2 heures à 50°, on obtient un état stable même si on double le temps de chauffage, et qui donne une courbe de protéolyse sensiblement superposable à la courbe 2. En présence de Ca⁺⁺ ou de Mn⁺⁺ ($10^{-2} M$) l'influence de la chaleur est nulle à 50° et elle est très petite même à 60° (voir Fig. 6). De l'allure de ces courbes on déduit que les échantillons de SAND chauffés aux différentes températures contiennent au moins deux substrats, et diffèrent essentiellement par la teneur de celui des deux qui est hydrolysé le premier. La phase initiale de protéolyse est donc représentative des variations survenues dans la SAND à la suite du chauffage.

Les Fig. 5 et 6 donnent la vitesse initiale de protéolyse et la teneur en SH, déterminées après chauffage de la SAND à 50° et à 60°, en fonction du temps de chauffage. La protéolyse est faite à 25°, trypsine 200 µg/ml, Ca⁺⁺ ($10^{-2} M$). On constate que ce traitement de dénaturation n'ouvre pas les ponts disulfure puisque la teneur maximum en SH ne dépasse pas celle requise par 1 résidu cystéinylique par molécule. On voit

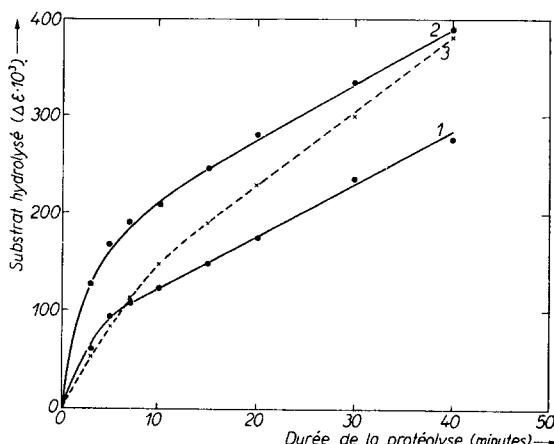


Fig. 4. Protéolyse (25°) de la SAND chauffée à 60°. Courbe 1: SAND non chauffée. Courbe 2: SAND chauffée 5 minutes à 60°. Courbe 3: SAND chauffée 8 heures à 60°. Trypsine 200 µg/ml.

également que la sensibilité à la trypsine évolue dans le même sens que la teneur en groupements SH décelables. Il est donc permis d'utiliser la mesure de sensibilité à la trypsine comme test de dénaturation. La parallélisme entre l'apparition des SH et la sensibilité initiale à la trypsine est remarquable surtout à 60° , puisque à cette température on observe l'existence d'un maximum. Il est évident que deux réactions aboutissant à des résultats opposés sont en œuvre dans les premiers stades de la dénaturation à 60° . Quant au chauffage à 50° , nous avons remarqué que la teneur en SH diminue graduellement après les 30 premières minutes de chauffage (Fig. 5). Cette diminution est sans doute consécutive à une oxydation provoquée par le chauffage prolongé au contact de l'air, mais ce phénomène n'est pas comparable à celui qui se passe à 60° .

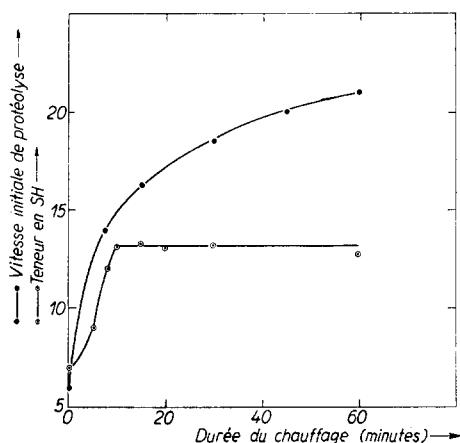


Fig. 5. Sensibilité à la trypsine et apparition des groupements SH, en fonction du temps de chauffage à 50° . Vitesse initiale de protéolyse = $\Delta \epsilon \cdot 10^3 / \text{min}^{-1}$ durant la première phase de la réaction (25°). Teneur en SH = g· 10^2 cystéine % g protéine.

= $\Delta \epsilon \cdot 10^3 / \text{min}^{-1}$ durant la première phase de la réaction (25°). Teneur en SH = g· 10^2 cystéine % g protéine. ● et × = chauffage à 60° en absence de Ca^{++} . ○ et ⊗ = chauffage à 60° en présence de $\text{Ca}^{++} 10^{-2} M$.

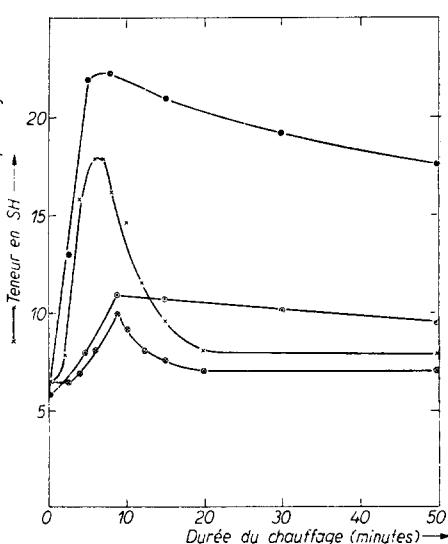


Fig. 6. Sensibilité à la trypsine et apparition des groupements SH, en fonction du temps de chauffage à 60° . Vitesse initiale de protéolyse

En effet la diminution des SH à 50° est très lente (elle est complète seulement après 8 heures de chauffage) et elle n'entraîne pas une diminution de sensibilité à la trypsine. En ce qui concerne les ions métalliques la Fig. 6 montre l'effet du chauffage à 60° de la SAND en présence de $\text{Ca}^{++} 10^{-2} M$. On voit que l'inhibition de la dénaturation mise en évidence par nos tests, est très marquée. On remarque aussi que toutes les courbes relatives à la SAND chauffée à 60° présentent un maximum et que le test de protéolyse concorde toujours avec celui du dosage des SH.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus par action de la cystéine et de H_2O_2 sur la SADS montrent que la présence de ponts disulfure constitue un empêchement à l'attaque de cette protéine par la trypsine. Il est possible que ces ponts s'établissent entre les résidus cysteinyle

de molécules différentes et que la diminution de sensibilité à la trypsine soit liée à une polymérisation de la sérumalbumine. D'autre part, nous avons étudié l'action de la cystéine sur la SAND (a) au cours de la protéolyse par la trypsine (26° et 40°), et (b) en absence de trypsine, par traitement à 40° . Dans tous les cas, la cystéine ($2 \cdot 10^{-2} M$) augmente la sensibilité de la SAND à la trypsine. Tout traitement (H_2O_2 ou contact prolongé avec l'air) pouvant réoxyder sous la forme de disulfure les groupements SH libérés par la cystéine, fait à nouveau diminuer la sensibilité à la trypsine de la SAND. Cette réversibilité est presque complète lorsque le traitement de la SAND par la cystéine a eu lieu à 25° , tandis qu'elle n'est que partielle à 40° . Il est donc vraisemblable que à 25° la cystéine a provoqué seulement la rupture d'un ou de quelques ponts disulfure, tandis que à 40° d'autres réactions plus complexes se sont produites également. La réversibilité à 25° de l'action de la cystéine sur la SAND permet de penser que les ponts disulfure se trouvant à l'intérieur d'une même molécule de sérumalbumine font directement obstacle à l'action hydrolytique de la trypsine. En ce qui concerne l'action exercée par certains cations, nos résultats montrent que Ca^{++} n'a aucune influence ni sur la vitesse de disparition des groupements SH libres de la SADS, ni sur celle de l'ouverture des ponts disulfure de la SAND. Il est donc exclu que l'action protectrice^{8,9} sur la sérumalbumine exercée par Ca^{++} (et vraisemblablement par Mn^{++}) contre la protéolyse par la trypsine soit due à un mécanisme de stabilisation de ponts disulfure.

D'autre part, nous avons étudié la variation de sensibilité à la trypsine de la SAND à la suite d'un traitement de dénaturation (chauffage à 50° et à 60°) n'atteignant que les liaisons faibles de la protéine. Nous avons ainsi établi qu'une dénaturation sans rupture de ponts S-S est suffisante pour faire varier la sensibilité à la trypsine de la SAND et que Ca^{++} et Mn^{++} "protègent" la SAND contre cette dénaturation. Le lieu d'action de ces métaux doit donc être les liaisons faibles qui sont responsables de l'enroulement de la chaîne peptidique et qui, de même que les ponts disulfure, influencent vraisemblablement l'accèsibilité à la trypsine des liaisons peptidiques hydrolysables. Il n'est pas possible d'étudier l'action de Ca^{++} et de Mn^{++} à une température plus élevée puisque leur présence provoque la coagulation de la protéine. Déjà à 60° , la coagulation a lieu si on prolonge le chauffage au delà de 15 heures. Par conséquent, on peut envisager l'action directe du métal comme une réduction de l'hydratation de la SAND. La diminution des propriétés hydrophiles de la protéine entraînerait une plus grande résistance à la dénaturation thermique.

En ce qui concerne le cours même de la dénaturation thermique, nos expériences à 40° - 60° nous permettent de conclure que la dénaturation se fait par palier. Aux températures étudiées elle commence par un phénomène analogue dans tous les cas. Ce phénomène se manifeste par une augmentation de la sensibilité à la trypsine et de l'aptitude à réagir du groupement SH libre de la molécule. Il atteint son maximum après 40 heures à 40° , 2 heures à 50° et 5 minutes à 60° . A cette dernière température, ce premier phénomène est suivi par d'autres, à la suite desquels la protéine retrouve apparemment certaines de ces propriétés initiales. Il est possible qu'il s'agisse de la formation de ponts disulfure à partir des groupements SH démasqués du fait de la rupture de liaisons faibles.

RÉSUMÉ

Les ponts disulfure constituent un des obstacles à l'attaque par la trypsine de la sérumalbumine non dénaturée. Les liaisons faibles de la forme native de cette protéine font également obstacle à son hydrolyse par la trypsine, puisqu'au cours d'une dénaturation thermique n'atteignant pas les ponts disulfure, la sensibilité à la trypsine de la sérumalbumine augmente. Ca^{++} et Mn^{++} ¹ sont sans effet sur la stabilité des ponts disulfure, mais ils protègent la sérumalbumine contre l'hydrolyse par la trypsine et contre les premiers effets de la dénaturation thermique, parce qu'ils stabilisent les liaisons faibles de la forme native de la protéine.

SUMMARY

Disulfide linkages constitute an obstacle to the attack of non-denatured serumalbumin by trypsin. There exist also weak linkages in the non-denatured form of this protein which inhibit its hydrolysis by trypsin because in the course of heat denaturation the sensitivity of serum-albumin to trypsin increases even before the disulfide linkages are affected. Furthermore Ca^{++} and Mn^{++} , although without effect on the stability of the disulfide linkages, do protect the serum-albumin against trypsin hydrolysis and against the initial effects of heat denaturation. Apparently Ca^{++} and Mn^{++} stabilise the weak linkages in the native form of the protein.

ZUSAMMENFASSUNG

Disulfidbindungen sind eines der Hindernisse, die dem Abbau des nicht denaturierten Serum-albumins durch Trypsin im Wege stehen. Die schwachen Bindungen der undenaturierten Form dieses Proteins hemmen seine Hydrolyse durch Trypsin ebenfalls, da im Laufe einer Hitzenaturierung, welche die Disulfidbindungen nicht angreift, die Empfindlichkeit des Serum-albumins gegenüber Trypsin zunimmt. Ca^{++} und Mn^{++} sind gegenüber der Beständigkeit der Disulfidbindungen wirkungslos, doch schützen sie das Serumalbumin gegen die Hydrolyse durch Trypsin und gegen die Anfangswirkung der Hitzedenaturierung, indem sie die schwachen Bindungen der nativen Form des Proteins stabilisieren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 481.
- ² B. H. BELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5505.
- ³ R. MONIER ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 62.
- ⁴ V. DU VIGNEAUD *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4880.
- ⁵ R. ACHER ET J. CHAUVET, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 487.
- ⁶ R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 151.
- ⁷ M. BERGMANN ET J. S. FRUTON, *Advances in Enzymol.*, 1 (1941) 63.
- ⁸ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- ⁹ L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 180.
- ¹⁰ E. S. GUZMAN BARRON, *Advances in Enzymol.*, 11 (1951) 224.
- ¹¹ W. L. HUGHES, H. A. SAROFF ET A. L. CARNEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 2476.

Reçu le 15 juin 1955