

MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

VIII. BIOSYNTHÈSE DE L'OCTOPINE ET RÉPARTITION DE L'ENZYME L'OPÉRANT CHEZ LES INVERTEBRÉS

NGUYEN VAN THOAI ET YVONNE ROBIN

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, et
Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, Concarneau, Finistère (France)*

(Reçu le 15 Janvier, 1959)

SUMMARY

*Metabolism of guanidylated derivatives**VIII. Biosynthesis of octopine and repartition of the enzyme operating it in invertebrates*

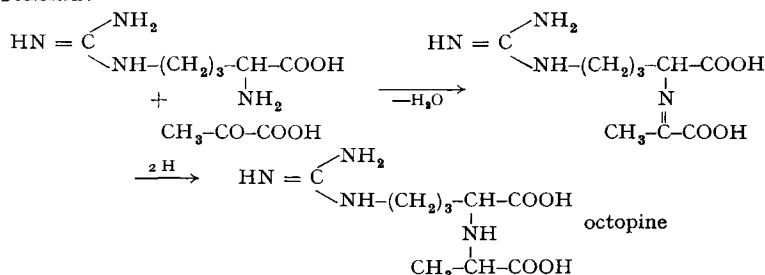
1. Octopine has been synthesized *in vitro* from arginine and pyruvic acid in presence of various enzyme preparations from marine invertebrates. This synthesis is a reductive condensation involving a dehydrogenase, the coenzyme of which is DPNH.

2. Studies of the repartition of the active enzyme system in various invertebrates showed that the synthetic faculty is limited to muscles of animals containing octopine. In the same animal different muscles possess variable activities, apparently without any connection with their nature or physiological function.

3. The formation of octopine constitutes a deviation from the classic cycle of muscular glycolysis, of which it appears to be the final term, and might be involved in a mechanism regulating arginine, thus reinforcing the relations between glycolysis and creatine phosphate concentration in muscle.

INTRODUCTION

L'octopine, isolée pour la première fois du muscle d'*Octopus* par MORIZAWA¹, a été identifiée par la suite chez différents Mollusques Céphalopodes²⁻⁵ et Lamellibranches⁵⁻⁷ et chez un Géphyrien⁸. Sa synthèse chimique a été réalisée par deux voies différentes: AKASI⁹ condense l'arginine avec l'acide α -bromopropionique, alors que KNOOP ET MARTIUS¹⁰ opèrent la condensation réductive de l'arginine avec l'acide pyruvique, selon le schéma:



que les auteurs proposent pour la synthèse biologique de l'octopine mais sans en apporter de preuves. Cette hypothèse a été reprise par CEDRANGOLO ET VILLANO¹¹, qui constatent l'analogie entre le schéma de KNOOP ET MARTIUS et celui généralement admis pour les réactions de transamination; ils essaient de condenser *in vitro* la L-arginine avec l'acide pyruvique en présence de diverses préparations enzymatiques (foie, rein et muscle de Rat, hépatopancréas et muscle d'Octopus), mais n'observent dans aucun cas de synthèse d'octopine. Par la suite, OBATA ET LIMORI¹² isolent de l'octopine d'un liquide de culture de levure en présence d'arginine et constatent qu'il n'y a pas formation d'octopine lorsque le milieu de culture ne contient pas d'arginine; ils suggèrent que l'acide pyruvique pourrait participer à cette synthèse. Les travaux de MOORE ET WILSON⁷ et d'IRVIN³ établissaient déjà, que, chez les Invertébrés, l'arginine est le précurseur naturel de l'octopine: ces auteurs notent en effet que, dans le muscle de *Pecten magellanicus*, l'arginine, présente à un taux élevé dans le tissu frais, disparaît presque totalement au cours de l'autolyse à 0°, alors que l'octopine augmente proportionnellement.

A la suite de ces travaux, il était vraisemblable d'envisager la biosynthèse de l'octopine chez les Invertébrés par condensation de l'arginine avec l'un des produits formés au cours de la glycolyse anaérobie du muscle. Mais il restait à déterminer la nature de ce produit et par quel mécanisme il se combine avec l'arginine pour donner naissance à l'octopine. Les expériences que nous rapportons ici nous ont permis de résoudre ce problème et de préciser la mode de formation biologique de l'octopine, ainsi que la répartition du système enzymatique responsable de cette synthèse chez divers Invertébrés marins.

MATÉRIEL ET MÉTHODES*

Matériel: L'octopine utilisée comme corps de référence pour les dosages et la chromatographie sur papier a été synthétisée par la méthode d'AKASI⁹. Le phospho-énolpyruvate (PEP) employé comme substrat au cours de nos expériences a été synthétisé selon la méthode d'OHLMEYER¹³. Le diphosphopyridine nucléotide réduit (DPNH) a été préparé par réduction du diphosphopyridine nucléotide (DPN) au moyen de l'hydrosulfite de sodium, selon la méthode de BEISENHERTZ et de ses collaborateurs¹⁴.

Dosage de l'octopine: L'octopine est séparée de l'arginine présente dans le milieu réactionnel par passage sur Amberlite IR 120 sodique tamponnée à pH = 7.0. Cette résine fixe l'arginine (qui peut en être éluée quantitativement par la soude 0.1 N) et laisse passer l'octopine qui est dosée dans l'effluent aqueux par la réaction de SAKAGUCHI¹⁵. La lecture est effectuée au spectrophotomètre Beckmann à 530 mμ.

Préparation de l'Amberlite IR sodique tamponnée à pH = 7.0: La résine, préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 2 N puis à l'eau distillée, est mise en contact pendant 15 h avec de la soude 2 N. On rince à l'eau jusqu'à neutralité des liquides de lavage, puis on met en contact pendant 2 h avec un tampon phosphate de sodium 0.5 M de pH = 7.0 (3 vol./vol. de résine). On rince à l'eau distillée et on conserve sous forme humide.

Séparation de l'octopine et de l'arginine: Chaque essai (vol. 1 ml, renfermant au maximum 10 μmoles d'arginine) est après déprotéinisation filtré à travers une colonne

* Les abréviations suivantes ont été employées: HDP, hexose diphosphate; PEP, phospho-énolpyruvate; DPN, diphosphopyridine nucléotide; DPNH, diphosphopyridine nucléotide réduit.

de 4 mm de diamètre intérieur contenant 1.5 ml d'Amberlite IR 120 sodique tamponnée à pH = 7.0, préparée comme il est indiqué ci-dessus. La colonne est rincée à l'eau distillée et on recueille l'effluent aqueux jusqu'à un volume total de 20 ml. On agite et on dose l'octopine sur une partie aliquote de l'effluent.

Vérification de la synthèse d'octopine par chromatographie sur papier: La chromatographie sur papier a permis de contrôler la synthèse d'octopine dans les milieux incubés: une partie de la solution sur laquelle est effectué le dosage est concentrée à un volume donné et chromatographiée sur papier Whatman No. 1, préalablement lavé à l'acide acétique 2 N, dans un mélange pyridine-alcool isoamylique-eau (80:40:70) (chromatographie ascendante avec octopine témoin). Les R_F de l'octopine et de l'arginine dans ce solvant sont respectivement 0.38 et 0.11. Les chromatogrammes sont révélés par la réaction de SAKAGUCHI¹⁵; les taches d'octopine présentent une coloration rose violacée caractéristique.

Préparations enzymatiques: Les tissus (hépatopancréas et muscle de Seiche, muscles de Pecten, de Siponcle, de Cardium, de Palourde, de Limnée, d'Holothurie, de Maia) sont homogénéisés avec 5 vol. de KCl 0.01 M; on centrifuge à froid et on utilise l'extrait acellulaire. Les préparations enzymatiques sont effectuées avant chaque série d'expériences car elles s'inactivent assez rapidement (la perte d'activité est supérieure à 50 % après 24 h à + 3°).

Conditions expérimentales: Les incubations sont effectuées à 30°; leur durée est d'une heure dans la plupart des essais. La composition des milieux réactionnels varie avec les expériences et sera indiquée ultérieurement. Après incubation, les essais (volume total = 1 ml) sont déprotéinisés par addition de 0.1 ml d'acide acétique M et chauffage de 5 min au bain-marie bouillant. Chaque essai est filtré et passé en totalité sur une petite colonne d'Amberlite IR 120 sodique tamponnée à pH = 7.0, selon la technique indiquée plus haut pour le dosage de l'octopine.

Les résultats sont évalués en μg d'octopine synthétisés/h/mg d'azote protéique (dosé par la méthode de KJELDAHL).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Biosynthèse de l'octopine dans le muscle de Seiche

Dans une première série d'essais, nous avons étudié la biosynthèse de l'octopine chez la Seiche, *Sepia officinalis* L. et précisé le rôle de la glycolyse dans cette synthèse. Pour cela, nous avons incubé de l'arginine avec un extrait acellulaire de muscle de Seiche en présence de différents substrats et effecteurs. La composition des essais et les résultats sont indiqués dans le Tableau I.

Les résultats obtenus montrent que la synthèse d'octopine est positive lorsque l'on incube l'arginine avec le glucose et l'hexose diphosphate (essai 1) et qu'elle est presque totalement inhibée par le fluorure de sodium (essai 2), mais que l'activité est restaurée par l'addition de PEP ou de pyruvate (essais 3 et 4); le PEP et le pyruvate sont sensiblement équivalents pour la synthèse de l'octopine. Les essais 5, 6 et 7 montrent que l'arginine incubée avec le PEP, le pyruvate ou le lactate en l'absence de glucose et d'HDP ne donnent pas, ou très faiblement, lieu à la formation d'octopine. Enfin nous voyons que l'iodoacétate inhibe totalement la synthèse de l'octopine à partir de l'arginine, du glucose et de l'HDP, même en présence de pyruvate (essai 8). Ces résultats seront discutés plus loin.

TABLEAU I

BIOSYNTHÈSE DE L'OCTOPINE À PARTIR DE L'ARGININE PAR UN EXTRAIT ACELLULAIRE DE SEICHE, *Sepia officinalis* L., EN PRÉSENCE DE DIVERS SUBSTRATS ET EFFECTEURS

μg d'octopine synthétisés/h/mg N protéique. Milieu réactionnel de base (utilisé comme témoin): chlorhydrate d'arginine 10 μmoles sulfate de magnésium 2 μmoles phosphate de sodium pH = 7,4 10 μmoles préparation enzymatique 0,5 ml. Volume total 1 ml. Durée des incubations 1 h à 30°.

Essais	<i>μmoles produits ajoutés</i>							<i>μg octopine synthétisés*</i>
	<i>Substrats</i>					<i>Effecteurs</i>		
	<i>Glucose</i>	<i>HDP</i>	<i>PEP</i>	<i>Pyruvate</i>	<i>Lactate</i>	<i>FNa</i>	<i>Iodoacétate</i>	
I	10	2	0	0	0	0	0	520-726
2	10	2	0	0	0	10	0	20-80
3	10	2	5	0	0	10	0	838
4	10	2	0	5	0	10	0	636-860
5	0	0	5	0	0	0	0	25-40
6	0	0	0	5	0	0	0	20-60
7	0	0	0	0	10	0	0	0-15
8	10	2	0	5	0	0	10	0

* Chiffres extrêmes observés.

Synthèse de l'octopine en fonction du temps

La courbe de synthèse de l'octopine en fonction du temps (Fig. 1) a été établie avec un extrait acellulaire de muscle de Seiche. Le milieu réactionnel (vol. total 1 ml) était constitué par: chlorhydrate d'arginine 10 μmoles , pyruvate de sodium 5 μmoles , glucose 10 μmoles , HDP 2 μmoles , fluorure de sodium 10 μmoles , sulfate de magnésium 10 μmoles , phosphate de sodium, pH = 7,4, 10 μmoles , préparation enzymatique 0,5 ml. La chaîne glycolytique était ajoutée pour assurer la régénération du DPNH nécessaire à la condensation réductive de l'arginine et de l'acide pyruvique et le fluorure pour bloquer la formation de l'acide pyruvique à partir du glycogène ou du glucose et permettre ainsi de travailler à une concn. connue en pyruvate. L'octopine formée était dosée au temps 0 et après 15, 30, 45, 75 et 120 min d'incubation.

La courbe obtenue montre que 75 % de l'octopine totale synthétisée sont formés pendant les 15 premières minutes et que la synthèse est maxima au bout de 30 min dans les conditions réalisées.

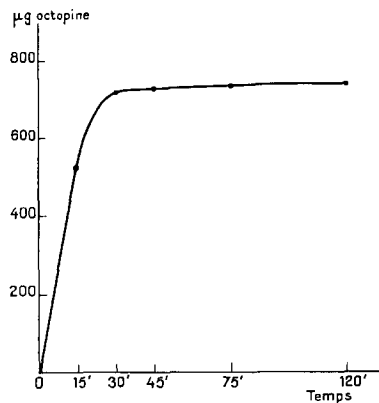


Fig. 1. Synthèse de l'octopine par un extrait acellulaire de muscle de Seiche, *Sepia officinalis* L. Abscisses: temps d'incubation à 30° (min); ordonnées: μg d'octopine synthétisés/mg N protéique.

Répartition et activité de l'enzyme chez quelques Invertébrés

Nous avons étudié la synthèse de l'octopine en présence de diverses préparations enzymatiques d'Invertébrés. Les milieux réactionnels avaient la composition décrite pour l'essai précédent. Les témoins avaient la même composition que les essais moins le pyruvate. Les résultats sont rapportés dans le Tableau II.

TABLEAU II

BIOSYNTHESE DE L'OCTOPINE: ACTIVITE COMPAREE DE DIVERSES PREPARATIONS
ENZYMATIQUES D'INVERTEBRÉS

μg d'octopine synthétisés/h/mg N protéique. Milieu réactionnel (vol. total 1 ml): chlorhydrate d'arginine 10 μmoles , pyruvate de sodium 5 μmoles , glucose 10 μmoles , HDP 2 μmoles , NaF 10 μmoles , sulfate de magnésium 10 μmoles , phosphate de sodium pH = 7,4 10 μmoles , préparation enzymatique 0,5 ml. Témoins sans pyruvate. Incubations: 1 h à 30°.

Animal étudié	Tissu	μg octopine synthétisés
MOLLUSQUES	<i>Sepia officinalis</i> L.	Muscle du manteau 748
		Hépatopancréas 0
	<i>Cardium edule</i> L.	Muscles adducteurs 464
	<i>Pecten maximus</i> L.	Muscle du pied 13-47
		Muscle adducteur strié 320
		Muscle adducteur lisse 70
	<i>Limnaea stagnalis</i> L.	Muscle du manteau 0
		Muscle du pied 0
GEPHYRIEN	<i>Sipunculus nudus</i> L.	Muscle de la paroi 573
CRUSTACÉ	<i>Maia squinado</i> Risso	Muscle des pattes 0
		Muscle de l'abdomen 0
ÉCHINODERME	<i>Holothuria tubulosa</i> L.	Muscle de la paroi 0

Comme le montre ce tableau, le système enzymatique responsable de la synthèse biologique de l'octopine à partir de l'arginine et de l'acide pyruvique n'est pas universellement réparti chez les Invertébrés: parmi les animaux étudiés, nous ne l'avons rencontré que chez des Mollusques (*Seiche*, *Cardium*, *Pecten*) et chez un Géphyrrien (*Siponcle*), chez lesquels l'activité synthétisante semble limitée au tissu musculaire. Entre les différents muscles, on note même des différences d'activité considérables: c'est ainsi que, chez le *Cardium*, le muscle adducteur est environ 10 fois plus actif que le muscle du pied, et que chez le *Pecten* la partie striée du muscle adducteur est 4 à 5 plus active que la partie lisse du même muscle, alors que le muscle du manteau semble totalement inactif.

Rôle du DPNH dans la condensation réductive de l'arginine et de l'acide pyruvique

Les essais précédents nous ayant conduit à penser que le DPNH jouait le rôle de cofacteur dans la condensation réductive de l'arginine et de l'acide pyruvique, nous avons entrepris de vérifier cette hypothèse. L'essai a été réalisé avec un extrait acellulaire de muscle adducteur strié de *Pecten maximus* L., obtenu par homogénéisation du tissu en présence de 2 vols. de KCl 0,1 M glacé et centrifugation à 0°. La composition des essais et les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau III.

Comme le montre ce tableau, la synthèse d'octopine, faible lorsque l'arginine et le pyruvate sont seuls ajoutés au milieu réactionnel (essai 1), devient très importante lorsque le DPNH est ajouté en même temps que ces substrats (essai 2). Le taux de synthèse dépasse alors nettement celui qui est obtenu lorsque la régénération du DPNH est assurée par une chaîne glycolytique ajoutée au milieu réactionnel (Tableau II). Lorsque le DPNH est ajouté sans arginine ni pyruvate, la synthèse observée est plus faible, probablement par épuisement de l'un des substrats, mais demeure cependant très supérieure à celle qui est mesurée lorsque l'enzyme est incubé seul.

TABLEAU III

RÔLE DU DPNH DANS LA BIOSYNTHÈSE DE L'OCTOPINE À PARTIR DE L'ARGININE ET DU PYRUVATE DE SODIUM EN PRÉSENCE D'UN EXTRAIT ACELLULAIRE DE MUSCLE DE *Pecten maximus* L. (μg d'octopine synthétisés/h/mg N protéique). Milieu réactionnel de base (utilisé comme témoin): sulfate de magnésium 2 μmoles , phosphate de sodium pH = 7.4 20 μmoles . préparation enzymatique 0.2 ml. Vol. total 1 ml. Durée des incubations: 1 h à 30°.

Essais	Substrats ajoutés		DPNH	μg octopine synthétisés
	Arginine	Pyruvate		
1	5 μmoles	5 μmoles	0	26
2	5 μmoles	5 μmoles	5 μmoles	583
3	0	0	5 μmoles	145

Vérification de la synthèse d'octopine par chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier des milieux incubés, après déprotéinisation et passage sur résine, nous a permis de contrôler et parfois même de compléter les résultats fournis par les dosages. En effet, l'Amberlite IR 120 sodique tamponnée à pH = 7.0, que nous employons pour séparer l'arginine de l'octopine, laisse passer non seulement cette dernière mais aussi certaines autres guanidines monosubstituées moins basiques que l'arginine (en particulier les produits de désamination oxydative de l'arginine: acide α -céto- δ -guanidovalériannique et γ -guanidobutyrique). Ces dérivés étant assez répandus chez les Invertébrés marins et d'eau douce¹⁶ et donnant comme l'octopine la réaction de SAKAGUCHI, il était nécessaire de contrôler par chromatographie sur papier que l'octopine était la seule guanidine monosubstituée présente dans les liquides sur lesquels étaient effectués les dosages. Les résultats obtenus nous ont montré que, dans tous les cas où une synthèse nette d'octopine a été observée (Seiche, Pecten, Cardium, Siponcle), seule l'octopine était présente dans les extraits dosés, et que la tache révélée par la réaction de SAKAGUCHI était beaucoup plus forte dans les essais que dans les témoins.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Mécanisme de la synthèse

La synthèse de l'octopine par incubation *in vitro* de l'arginine avec une chaîne glycolytique en présence d'extraits enzymatiques de muscle de Seiche montre que, conformément aux observations de MOORE ET WILSON⁷ et d'IRVIN³, ce dérivé guanidique peut se former par condensation de l'arginine avec un des produits de la glycolyse anaérobie du muscle. L'inhibition de la synthèse par le fluorure de sodium, qui bloque la formation de l'acide phosphoenolpyruvique et, partant, celle de l'acide pyruvique et de l'acide lactique, permettait d'envisager soit une condensation simple avec ce dernier, soit une condensation réductive avec l'un des deux premiers. L'absence de synthèse avec l'acide lactique, et les résultats positifs obtenus avec le PEP ou l'acide pyruvique en présence d'un système d'hydrogénation (chaîne glycolytique bloquée ou non par le fluorure, ou DPNH ajouté au milieu réactionnel) montrent que cette seconde hypothèse est valable pour la biosynthèse de l'octopine. Le PEP n'étant pas ici plus actif que le pyruvate, il n'est pas possible de décider s'il agit sous cette forme ou après transformation en ce dernier; la réaction peut s'écrire globalement:



Il est probable que la réaction s'effectue selon le schéma utilisé par KNOOP ET MARTIUS¹⁰ pour la synthèse chimique (*cf.* p. 446) avec formation d'un intermédiaire iminé, ultérieurement réduit en octopine; le fait que, pas plus que CEDRANGOLO ET VILLANO¹¹, nous n'ayions pu mettre en évidence ce dérivé iminé, peut être dû au fait que ce corps est essentiellement instable et qu'en l'absence d'un donateur d'hydrogène il est immédiatement hydrolysé en redonnant les produits de départ.

Le rôle de la glycolyse dans la biosynthèse de l'octopine est donc double: (1) assurer la formation de l'acide pyruvique susceptible de se condenser avec l'arginine (provenant elle-même vraisemblablement de l'hydrolyse de l'argininephosphate du muscle); (2) assurer la régénération du DPNH nécessaire à la condensation réductive de l'arginine et de l'acide pyruvique.

Nous avons vu en effet chez la Seiche que, si l'on bloque la chaîne glycolytique par le fluorure, l'inhibition de la synthèse d'octopine qui en résulte peut être levée par l'addition de pyruvate au milieu réactionnel; mais que, par contre, si l'on opère en présence d'iodoacétate, qui inhibe la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase ainsi empêchant la réduction de DPN, il ne se produit plus aucune synthèse d'octopine.

Répartition de l'enzyme et signification biologique de l'octopine

Parmi les Invertébrés étudiés, seuls les animaux renfermant de l'octopine à l'état naturel dans leurs tissus (*Sepia*, *Pecten*, *Cardium*, *Siponcle*), se sont montrés capables de synthétiser ce dérivé. Le pouvoir de synthèse semble limité au muscle, ce qui peut s'expliquer par le fait que la formation biologique de l'octopine est liée d'une part au métabolisme de l'arginine, dont ce tissu renferme des quantités importantes à l'état libre ou combiné (argininephosphate), d'autre part au métabolisme de l'acide pyruvique, qui est l'un des produits de la glycolyse musculaire. Il est plus difficile, par contre, d'interpréter les différences considérables qui sont observées, dans les mêmes conditions expérimentales et sur un même animal, entre les diverses catégories de muscles (*Pecten*, *Cardium*). Si le muscle adducteur strié de *Pecten* et le muscle du manteau de *Sepia*, qui servent à la propulsion de l'animal, possèdent une activité synthétisante élevée, le muscle du pied de *Cardium*, qui joue un rôle analogue, ne possède qu'une très faible activité. De même, les muscles adducteurs de *Cardium*, qui sont des muscles lisses, ont une activité environ 6 fois supérieure à celle de la partie lisse du muscle adducteur de *Pecten*. Il ne semble donc pas y avoir de rapport apparent entre le rôle physiologique ou la nature des muscles étudiés et leur pouvoir synthétisant vis-à-vis de l'octopine.

Cependant, il est intéressant de noter que, chez la Seiche où la synthèse est très active, il ne semble pas y avoir de lacticodéshydrogénase: en effet, si l'on incube un extrait de muscle de seiche en présence d'arginine et de lactate de sodium, la synthèse de l'octopine est sensiblement nulle (voir Tableau I), ce qui ne devrait pas se produire en présence d'une lacticodéshydrogénase active, qui transformerait l'acide lactique en acide pyruvique apte à se condenser avec l'arginine, en même temps qu'il y aurait formation du DPNH nécessaire à cette réaction. La synthèse d'octopine pourrait donc être envisagée comme une déviation du cycle classique de la glycolyse: l'acide pyruvique formé au cours de la dégradation anaérobie du glucose, ne pouvant être réduit en acide lactique, se combinerait avec l'arginine provenant de la déphosphorylation de la phosphoarginine. L'octopine pourrait d'ailleurs, par un processus réversible, régénérer, également en anaérobiose, l'acide pyruvique et l'arginine, qui seraient

réutilisés pour la resynthèse du glycogène et de la phosphoarginine respectivement. L'octopine se présente ainsi non seulement comme un produit particulier du métabolisme azoté, mais comme un élément de liaison, et peut-être de régulation, entre la dégradation anaérobie du glucose et l'utilisation du phosphagène au cours du travail musculaire. Des travaux sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

RÉSUMÉ

1. La synthèse de l'octopine a été réalisée *in vitro* à partir de l'arginine et de l'acide pyruvique en présence de diverses préparations enzymatiques d'Invertébrés marins. La réaction de synthèse est une condensation réductive qui nécessite la participation d'une déshydrogénase dont le coenzyme est le DPNH.

2. L'étude de la répartition du système enzymatique actif chez divers Invertébrés montre que le pouvoir de synthèse est limité aux muscles des animaux renfermant de l'octopine dans leurs tissus. Chez un même animal, différents muscles possèdent des activités variables, apparemment sans liaison avec leur nature ou rôle physiologique.

3. La formation de l'octopine constitue une déviation du cycle classique de la glycolyse musculaire, dont elle paraît être le terme ultime. Elle ne semble pas, par ailleurs, étrangère à un certain mécanisme de régulation de l'arginine, renforçant ainsi les relations entre la glycolyse et la concn. en phosphagène musculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ K. MORIZAWA, *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, 10 (1927) 281.
- ² Y. OKUDA, *J. Coll. Agr. Tokyo Imp. Univ.*, 7 (1929) 1.
- ³ J. L. IRVIN, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) lxii Proc.
- ⁴ D. ACKERMANN ET M. MOHR, *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's*, 250 (1937) 249.
- ⁵ J. ROCHE, N. V. THOAI, Y. ROBIN, I. GARCIA ET J. L. HATT, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1899.
- ⁶ M. MAYEDA, *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, 18 (1936) 218.
- ⁷ E. MOORE ET D. W. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 119 (1937) 573.
- ⁸ Y. ROBIN, Travaux non publiés.
- ⁹ S. AKASI, *J. Biochem.*, 25 (1937) 261, 281 et 291.
- ¹⁰ F. KNOOP ET C. MARTIUS, *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's*, 254 (1938) 1 et 258 (1939) 238.
- ¹¹ F. CEDRANGOLO ET F. VILLANO, *Arch. Sci. Biol.*, 28 (1942) 228.
- ¹² Y. OBATA ET M. IIMORI, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 73 (1952) 832.
- ¹³ P. OHLMEYER, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1957, III, p. 226.
- ¹⁴ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZÖK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDET ET G. PFLEIDERER, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1955, vol. I, p. 392.
- ¹⁵ C. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 500 et 1381.
- ¹⁶ N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Compt. rend.*, 235 (1952) 832.