

OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE PEPTIDES  
OU PROTÉINES LA CONTENANT, PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE  
DE CHAMPIGNON

II. MÉCANISME DE L'OXYDATION DES RESTES DE  
TYROSINE DES PROTÉINES

SERGE LISSITZKY ET MARCEL ROLLAND

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Marseille (France)*

(Reçu le 30 mai, 1961)

SUMMARY

*Oxidation of tyrosine and tyrosine-containing peptides or  
proteins by mushroom polyphenoloxidase*

*II. Mechanism of the oxidation of tyrosyl residues of proteins*

1. Examination of the action of mushroom polyphenoloxidase on several native proteins has permitted to confirm that some of them (RNAase R 574-5 and  $\alpha$ -lactalbumin lot II) are oxidized by this enzyme whilst others (different lots of RNAase, lysozyme, insulin) are not modified.

2. The chemical evidence that tyrosyl residues of proteins are implicated in the oxidation is given.

3. The characterization and quantitative determination of DOPA after hydrolysis of proteins oxidized in the presence of ascorbic acid lead to the conclusion that, as in the case of free tyrosine, the oxidation of tyrosyl residues of a peptidic chain leads to the formation of DOPA-quinone residues.

4. The action on the oxidability of some proteins of denaturating agents, modifying secondary and tertiary structures, has led to specify some of the factors governing the accessibility by the enzyme of the tyrosyl residues of proteins.

5. The accessibility (or the non-accessibility) of the tyrosyl residues of a protein to the oxidation by polyphenoloxidase constitutes a very sensitive test, the interest of which is discussed in relation to the studies concerning protein structure.

Abréviations: PPO, polyphénoloxydase; PPO-KZ, PPO KERTESZ ET ZITO; PPO-W, PPO Worthington; PPO-L, PPO Light; Tyr, L-tyrosine; RNAase performique, ribonucléase oxydée par l'acide performique; DOPA-RNAase performique, DOPA- $\alpha$ -lactalbumine RNAase performique ou  $\alpha$ -lactalbumine dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été transformés en restes de DOPA par oxydation polyphénoloxydasique, en présence d'un excès d'acide ascorbique; AH<sub>2</sub>, acide ascorbique; PM, poids moléculaire; US, unité spectrophotométrique.

## INTRODUCTION

Des travaux antérieurs<sup>1-12</sup> ont permis de mettre en évidence, grâce à la spectrophotométrie et à la mesure de la consommation d'oxygène, une oxydation de certaines protéines par la PPO de champignon.

Différents arguments ont par ailleurs conduit à penser que les restes de tyrosine des protéines sont impliqués dans cette oxydation, entre autres la spécificité de l'enzyme, la disparition d'une partie de la tyrosine dans les protéines oxydées<sup>11,13</sup> et enfin l'analogie entre l'évolution des spectres ultraviolets des protéines étudiées et de ceux de divers peptides ou esters de tyrosine (*N*-formyl-tyrosine-éthylester en particulier) soumis à l'action de la PPO. Ces modifications spectrophotométriques, caractérisées par l'augmentation du maximum d'absorption en ultraviolet et le pincement de la différence entre le maximum et le minimum, ont été retrouvées pour toutes les protéines soumises à l'action de la PPO<sup>1,11-13,16</sup>.

Toutefois, certaines critiques tenant à la pureté des substrats utilisés ont été formulées. Notamment, EDMAN<sup>2</sup> a fait remarquer que, dans les premiers travaux de SIZER<sup>1</sup> une grande partie de la consommation d'oxygène semblait liée, d'une part à une autolyse partielle de certains substrats au cours de l'oxydation, et d'autre part à la présence d'impuretés de faible PM telles que la tyrosine libre ou de petits peptides de tyrosine.

Ces sources d'erreurs ont été éliminées dans des travaux récents, réalisés avec des substrats convenablement purifiés<sup>13-18</sup>.

Les résultats obtenus par YASUNOBU *et al.*<sup>13</sup>, FRIEDEN *et al.*<sup>15</sup> apportent des arguments positifs de la réalité de l'oxydation par la PPO des protéines étudiées. Cependant, l'oxydation des restes de tyrosine n'est démontrée qu'indirectement (manométrie, modification des spectres d'absorption ultraviolet, disparition de ces restes après oxydation) après des temps d'incubation prolongés (12-18 h) nécessités par la faible activité spécifique de l'enzyme utilisé.

L'objet de ce travail est d'apporter des preuves chimiques directes de l'oxydation des restes de tyrosine de certaines protéines pures par une préparation hautement purifiée de polyphénoloxydase et d'analyser le mécanisme de cette oxydation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Substrat*

La ribonucléase (3 fois recristallisée à partir de l'éthanol) a été achetée aux laboratoires Worthington.  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  2775 Å = 6.8; homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, directement et après 24 h d'incubation de la solution à 37°. On n'a pas observé de modification de ces propriétés après une dialyse de 16 h à +2° contre de l'eau bidistillée. Le dosage de l'activité, réalisé selon DICKMAN ET TRUPIN<sup>19</sup> a montré que celle-ci ne variait que de  $\pm 10\%$  pour les différents lots utilisés.

Les recherches par chromatographie sur papier en *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) d'acides aminés libres ou de peptides dans les solutions de RNAase fraîchement préparées ou après 24 h d'incubation à 37° ont été négatives.

La ribonucléase performique a été obtenue par oxydation de la RNAase par l'acide performique à -10°, selon HIRS<sup>20</sup>. On a vérifié l'homogénéité de ses solutions ainsi que l'absence de tyrosine libre ou de peptides de tyrosine dans celles-ci par

ultracentrifugation, électrophorèse et chromatographie sur papier. De plus, l'absence de chlorotyrosine dans la molécule a été démontrée par le recouvrement de 95 à 100% de la quantité de tyrosine théorique, après fractionnement sur colonne de résine échangeuse d'ions<sup>21</sup> d'un hydrolysat de RNAase performique.

La ribonucléase dénaturée par l'urée en milieu alcalin a été obtenue en traitant la RNAase native par l'urée 8 M à pH = 10.6 (tampon carbonate-bicarbonate) selon BARNARD ET STEIN<sup>22</sup> pendant 15 h. L'urée a été éliminée par une dialyse prolongée de 72 h contre de l'eau pure fréquemment renouvelée. L'absence d'urée en fin de dialyse a été vérifiée par la négativité de la réaction au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde dans la solution. La RNAase ainsi dénaturée précipite abondamment au cours de la dialyse. Sa solubilité dans l'eau pure est de l'ordre de 0.75 mg/ml.

L' $\alpha$ -lactalbumine (3 fois recristallisée) (2 lots) nous a été donnée par le Professeur OTTESEN. L'une des préparations était soluble dans l'eau pure à une concentration de 2.5%. L'autre nécessitait une concentration de 3% en NaCl pour sa solubilisation à 1%. Son PM était de 16000 et  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  2800 Å = 20.9. Elle était homogène à l'électrophorèse et ses solutions ne contenaient ni tyrosine libre ni peptides.

Le lysozyme d'oeuf de poule a été obtenu des laboratoires Worthington. Les tests d'homogénéité et d'absence de tyrosine libre décrits précédemment ont été satisfaits. Le lysozyme dénaturé a été obtenu par traitement à l'urée 8 M à pH 10.6 pendant 7 h à 37°, suivi de 48 h de dialyse.

Le lysozyme réduit par l'acide thioglycolique et traité par l'acide monoiodoacétique<sup>23</sup> nous a été fourni par le Dr. JOLLES.

Les échantillons d'insuline amorphe provenaient des laboratoires LILLY (lots W3255 et W1282) et ont été mis à notre disposition par le Professeur FRIEDEN.

### Enzymes

Les caractéristiques de la PPO-KERTESZ ET ZITO ont été données précédemment<sup>31</sup>. Elle avait une activité de 6750 US/mg.

Des préparations commerciales (lyophilisées) de PPO de champignon ont été

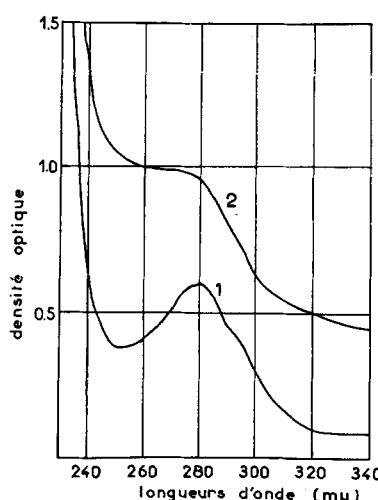


Fig. 1. Enregistrement des spectres d'absorption en ultraviolet de deux préparations de PPO de champignon: 1, PPO-KZ; 2, PPO-L. 0.25 mg d'enzyme/ml dans l'eau.

obtenues des laboratoires Light et Worthington. Leur activité était respectivement de 100 et 170 US/mg. Leurs solutions étaient très colorées (brunâtres) alors que la préparation de KERTESZ était légèrement ambrée. Les spectres en ultraviolet de deux de ces préparations sont indiqués dans la Fig. 1.

Les méthodes de mesure de l'activité enzymatique ont été décrites dans un article antérieur<sup>31</sup>.

Tous les produits chimiques utilisés étaient de la meilleure qualité analytique Tyr, DOPA et AH<sub>2</sub> (Hoffmann-La Roche) étaient chromatographiquement purs, le 1,2-dichloroéthane, l' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol, le nitrite de sodium, le molybdate de sodium et l'urée étaient des produits Prolabo RP. L'acide acétique et l'ammoniaque étaient les produits purissimes Merck, de même que HCl, utilisé pour les hydrolyses après une double distillation.

Toutes les solutions ont été réalisées avec de l'eau bidistillée dans un appareil entièrement en verre Pyrex. La verrerie a toujours été lavée avec le mélange sulfo-chromique, suivi de rinçage à l'eau ordinaire, puis à l'eau désionisée et enfin à l'eau bidistillée.

### Méthodes

Incubations et mesures de la consommation d'oxygène ont été réalisées dans l'appareil de Warburg conventionnel avec une agitation de 100 rotations/min et à 37°. Le milieu d'incubation contenait en général 6 à 12 mg de protéine, dissous dans un tampon phosphate 0.1 M de pH 6.8, et 0.020 à 0.040 ml de solution d'enzyme pour un volume total de 3 ml. Dans le puits central de la fiole était ajouté 0.1 ml de KOH 20%. Chaque série d'incubation comprenait, outre les essais et le thermobaromètre, une fiole témoin contenant les mêmes éléments à l'exception de l'enzyme qui était inactivé par la chaleur (30 sec à 70° pour l'enzyme de KERTESZ ET ZITO ou 10 min à 100° pour les préparations commerciales).

Les résultats présentés sont la moyenne des données obtenues au cours de plusieurs séries d'expériences.

*Dialyse:* Après incubation, les milieux ont été transvasés quantitativement dans un sac à dialyse (29/32", Visking Corp.) qui a été ensuite fixé sur un tube de verre et plongé dans un bêcher de 3 l contenant de l'eau bidistillée brassée par agitation magnétique. Une très légère pression a été appliquée à l'extrémité libre du tube de verre de

TABLEAU I

#### PERTES EN PROTÉINES AU COURS DE LA DIALYSE

Les dialyses ont été réalisées selon la technique décrite dans le texte. La détermination de la concentration en protéines des solutions avant et après dialyse a été effectuée par spectrophotométrie (à la longueur d'onde d'absorption maximum de chaque protéine), par réfractométrie et par dosage de la tyrosine après hydrolyse chlorhydrique (en tenant compte de la dilution du milieu en fin de dialyse<sup>1</sup>).

Protéine étudiée	Poids moléculaire	Forme de la molécule	Perdes après 36 h de dialyse (%)
RNAase native	14 000	Globulaire	20 à 25
Lysozyme	15 000	Globulaire	10 à 15
$\alpha$ -Lactalbumine	16 000	Globulaire	0
RNAase performique	14 000	Fibrillaire	30 à 35

manière à maintenir le sac gonflé. 12 à 72 h (en changeant l'eau toutes les 3 ou 4 h) ont été nécessaires suivant les cas pour éliminer complètement les ions du tampon.

Des pertes en substrats ont été constatées au cours de la dialyse. L'importance de ces pertes est, pour les sacs utilisés, en relation avec le PM et la forme des molécules protéiques soumises à la dialyse, ainsi qu'en témoignent les résultats exposés dans le Tableau I.

La spectrophotométrie a été réalisée avec les appareils Beckman DU et DK<sub>2</sub>, en cuves de 1 cm, après inactivation de l'enzyme par la chaleur et dialyse. Dans les cas où il a été nécessaire de suivre l'évolution de spectres en cours d'oxydation, à des intervalles de temps rapprochés, l'oxydation a été réalisée directement dans les cuves de lecture, dans l'eau ou en tampon phosphate dilué, sous un barbottage d'oxygène pur.

#### *Hydrolyse et dosage de la tyrosine et de la DOPA*

Les techniques utilisées ont été décrites récemment<sup>21</sup>. Pour tenir compte des pertes en protéines consécutives à la dialyse, les dosages ont été réalisés en prenant comme référence la quantité de tyrosine dosée dans le témoin chauffé, soumis aux mêmes conditions d'incubation, de dialyse et d'hydrolyse.

### RÉSULTATS

#### *Inactivation des enzymes par agitation mécanique*

La préparation très purifiée d'enzyme utilisée dans ce travail est plus sensible aux agents physiques dénaturants que les préparations moins purifiées<sup>24</sup>. La PPO-KZ est inactivée lorsqu'elle est placée pendant 20 à 30 sec dans un bain d'eau à 70° alors que 3 à 4 min à 100° sont nécessaires pour inactiver les préparations commerciales (Worthington et Light). En outre, les solutions de ces préparations restent limpides malgré un chauffage prolongé tandis que la PPO-KZ floccule rapidement au-dessus de 70-80°.

L'agitation mécanique d'une solution diluée de PPO-KZ dans les conditions des incubations (0.060 ml de solution d'enzyme dans 3 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH = 6.8 et 100 rotations/min) provoque une diminution de l'activité atteignant 37% après 3 h d'incubation (Fig. 2).

Par ailleurs, la RNAase incubée dans les mêmes conditions perd 30 à 40% de son activité après 3 ou 4 h d'agitation à 37°. Il a été tenu compte de cette inactivation partielle dans le calcul des activités après oxydation.

L'oxydation des protéines soumises à l'action de la PPO a été suivie grâce aux critères suivants: (a) modifications de la coloration du milieu (b) modifications de l'absorption en lumière ultraviolette et visible (c) consommation d'oxygène (d) dosage de la tyrosine après oxydation (e) dosage ou recherche de la DOPA apparue après oxydation en présence ou en l'absence d'un excès d'acide ascorbique (f) mesure de l'activité de la RNAase.

#### *Action de la PPO sur certaines protéines natives*

Les conditions expérimentales et les modifications observées sont résumées dans le Tableau II.

La plupart des lots de ribonucléase étudiés\* ne sont oxydés, même après des temps d'incubation prolongés, par aucune des trois préparations d'enzyme. Toutefois, au cours d'incubations de longue durée (entre 6 et 18 h) en tampon de faible molarité (0.01 à 0.05 M) on observe un augmentation globale de l'absorption en ultraviolet sans déplacement des longueurs d'onde caractéristiques. Cette modification paraît être due à une dénaturation partielle et est en général accompagnée ou suivie d'une légère opalescence de la solution.

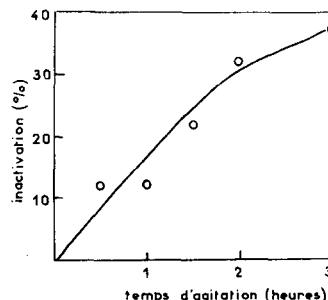


Fig. 2. Inactivation de la PPO-KZ par agitation mécanique. La solution (0.060 ml de PPO-KZ dans 3 ml de tampon phosphate 0.1 M de pH 6.8) a été agitée dans l'appareil de Warburg conventionnel à 100 rotations/min et à 37°. Aux temps portés en abscisse, prélèvement de 0.1 ml de la dilution et mesure de l'activité enzymatique par la méthode de HOGEBOOM ET ADAMS<sup>31</sup>.

TABLEAU II  
ACTION DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE SUR DIVERSES PROTÉINES NATIVES

Protéine étudiée	Conditions expérimentales*	Temps d'incubation (min)	Phénomènes observés				
			Changement de coloration**	Consommation d'oxygène (moles O <sub>2</sub> /mole de protéine)	Disparition de Tyr (en restes par mole de protéine)	Temps de latence*** (min)	Activité de la RNAase‡
Ribonucléase §§		60 à 360 ou plus	Incolore	0	0	—	100
Ribonucléase (lot R 574-5)	120 à 180	r puis J. O.	1	1	—	2	100
Ribonucléase §§*	180 à 450	Incolore §§§	0	0	—	—	Non dosé
α-lactalbumine (lot I)	120 à 360	Incolore	0	0	—	—	—
α-lactalbumine (lot I) *	180 à 450	RB puis JB	0.85 à 1.2	0.9 à 1.1	60	—	—
α-lactalbumine (lot II)	120 à 300	r, puis R, O et JB	3	2.8 à 3	2	—	—
Lysozyme	180 à 300	Incolore	0	0	—	—	—
Lysozyme*	180 à 300	Incolore §§§	0	0	—	—	—
Insuline	180	Incolore	0	0	—	—	—
Insuline*	180	Incolore §§§	0	0	—	—	—

\* Voir méthodes. Les milieux d'incubation étaient constitués de 6 à 15 mg de protéine et de 0.005 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume total de 3 ml sauf ceux des séries d'expériences marquées d'un astérisque (\*) qui contenaient 1 mg de PPO-W ou PPO-L pour respectivement 8 mg de RNAase, 10 mg d'α-lactalbumine ou de lysozyme et 6 mg d'insuline.

\*\* r, rose; R, rouge; J, jaune; O, orangé; JO, jaune orangé; JB, jaune brun; RB, rouge brun.

\*\*\* Laps de temps précédent la coloration du milieu et le début de la consommation d'oxygène.

‡ En pourcentage de l'activité par rapport au témoin.

§§ Nombreux lots (Worthington) utilisés (voir texte).

§§§ En réalité, teinte jaune brun due à l'enzyme.

\* Lots Worthington R 16, R 536 B, R 561, R 566, R 568-9, R 570-1, R 578 et R 580.

Cependant, pour une préparation de RNAase (lot Worthington R 574-5) l'action de la PPO s'est traduite par l'apparition d'une coloration rose, puis successivement orangée et jaune, la consommation d'une mole d'oxygène et la disparition d'un reste de Tyr par mole de protéine, sans perte d'activité enzymatique (celle-ci étant intégralement conservée par rapport au témoin incubé dans les mêmes conditions mais sans PPO ou avec PPO inactivée par la chaleur).

Deux lots d' $\alpha$ -lactalbumine ont été soumis à l'action de la PPO. Tous deux avaient les mêmes caractères d'homogénéité, mais l'un (lot I) était soluble dans l'eau pure à une concentration de 2.5% alors que l'autre (lot II) nécessitait pour sa solubilisation à 1% une concentration en NaCl de 3%.

Le lot I n'est pas oxydé par la PPO-KZ (Tableau II) alors que les PPO-W et PPO-L déterminent, après des temps assez longs d'incubation (3 à 7 h), l'oxydation d'un reste de Tyr avec apparition d'une coloration jaune-brun de la protéine.

L'oxydation du lot II d' $\alpha$ -lactalbumine par la PPO-KZ se traduit, après un temps de latence de 2 min environ, par l'apparition d'une coloration jaune fugace, virant assez rapidement au rose puis au rouge. Ultérieurement, après 1.5 h à 2 h d'incubation, cette coloration passe progressivement à l'orangé puis, au bout de 2 h à 2.5 h au jaune-brun.

L'étude cinétique de la consommation d'oxygène (Fig. 3) montre une consommation rapide dans les premières min, s'amortissant en un plateau correspondant à 3 moles d'oxygène/mole d' $\alpha$ -lactalbumine (entre 1.5 h et 3 h). On note à ce moment la disparition de 2.8 à 3 restes de Tyr/mole de protéine. Ultérieurement, on observe

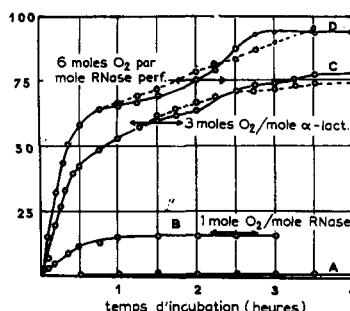


Fig. 3. Cinétique de la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de diverses protéines par la PPO-KZ. A, RNAase native (différents lots); B, 10 mg de RNAase lot R574-5; C, 14 mg  $\alpha$ -lactalbumine (lot II); D, 8 mg de RNAase performique. Composition des milieux, voir Tableaux II et III. En ordonnées, consommation d'oxygène en  $\mu$ l.

soit une reprise de la consommation amenant à un deuxième plateau pour lequel cette consommation correspond à 3.8-3.9 moles O<sub>2</sub>/mole d' $\alpha$ -lactalbumine (entre 2 et 3 h) avec disparition de 3 à 3.3 restes de Tyr sur 5 que contient la protéine, soit à une montée lente et progressive du plateau conduisant à un résultat final identique.

Il y a donc en fin d'incubation, consommation de plus d'une mole d'O<sub>2</sub> par reste de Tyr disparu. Cette observation est à rapprocher de celle de YASUNOBU *et al.*<sup>13</sup> qui constatent la consommation de 5 moles d'O<sub>2</sub>/mole d' $\alpha$ -lactalbumine et ne notent la disparition que de 3.6 restes de Tyr.

Le lysozyme et l'insuline (Tableau II) ne sont oxydés, même après des temps prolongés d'incubation, par aucun des enzymes étudiés.

*Action de la PPO sur des protéines à structure modifiée par oxydation ou réduction des ponts disulfures, ou par dénaturation*

L'oxydation de la RNAase performique par la PPO-KZ (Tableau III et Fig. 3) s'accompagne de l'apparition d'une coloration jaune fugace puis rose-rouge virant à l'orangé et enfin au jaune-brun.

La consommation d'oxygène, rapide au départ, se stabilise à peu près entre une et 2 h à 6 moles O<sub>2</sub>/mole de protéine, pour environ 6 restes de tyrosine disparus, puis une nouvelle consommation se produit, pouvant être, selon les expériences, relativement brutale ou au contraire étalée dans le temps, et se stabilise aux environs de 7.4-7.7 moles O<sub>2</sub>/mole de protéine en même temps que la coloration du milieu vire au jaune brun.

La recherche de DOPA en fin d'incubation, après hydrolyse, est négative même lorsque le milieu d'incubation a été préalablement réduit par AH<sub>2</sub>.

Les PPO-W et PPO-L n'aboutissent, après 7-9 h d'incubation qu'à la consommation de 3 moles d'O<sub>2</sub> et à la disparition de 3 restes de Tyr.

La RNAase traitée par HCl 5·10<sup>-3</sup> M ou par l'urée 8 M pendant 16 à 20 h à 37° (dénaturation réversible) puis dialysée contre l'eau jusqu'à élimination complète des réactifs n'est pas oxydée par l'enzyme. Elle ne l'est pas non plus après avoir été maintenue pendant 17 h à pH 13 (NaOH) et à 37°, dans des conditions où se produit une dénaturation partielle irréversible (ionisation normale des 6 groupements phénoliques des restes de Tyr, perte d'activité enzymatique et modifications spectrales<sup>27-29</sup>).

Par contre, si l'on effectue une dénaturation irréversible de la RNAase par l'urée 8 M à pH 10.6 (voir réf. 22), on observe une oxydation par la PPO-KZ se traduisant par une consommation de 6 moles d'O<sub>2</sub> et la disparition de 5 restes de Tyr/mole de protéine (Tableau III).

Le lysozyme réduit<sup>23</sup> ou dénaturé dans les conditions précédentes<sup>22</sup> est également oxydé (coloration rose, puis orangée et jaune). Aucune mesure quantitative précise n'a pu être réalisée étant donné la faible solubilité de ces produits à pH 6.8, mais une consommation d'O<sub>2</sub> a été observée, en rapport avec la quantité minime de protéine dissoute.

*Action de la PPO en présence de catéchol*

(Voir le Tableau IV). En présence de faibles quantités de catéchol (0.05-0.5 mole/mole de protéine) la RNAase n'est pas oxydée, que l'on opère en l'absence ou en présence de 5-30 moles d'acide ascorbique par reste de Tyr.

Avec 3 moles de catéchol/mole de RNAase, on n'observe aucune oxydation (pas de consommation d'O<sub>2</sub> par rapport au témoin catéchol, pas de disparition de Tyr) mais une perte d'activité de la RNAase de 88%. Par addition d'acide ascorbique après l'incubation (4 moles/mole de catéchol initialement présente dans le milieu) on peut retrouver 30% de l'activité perdue en même temps que le milieu passe du rouge brun au jaune. Ces observations sont à rapprocher de celles de KERTESZ<sup>5</sup> pour le lysozyme.

La RNAase performique en présence de catéchol et de PPO-KZ consomme 6 moles d'O<sub>2</sub> (par rapport au témoin catéchol seul), en même temps que les 6 restes de Tyr disparaissent.

L'α-lactalbumine (lot I) qui n'est pas oxydée directement par la PPO-KZ consomme d'autant plus d'O<sub>2</sub> que la quantité de catéchol ajoutée au milieu est plus

TABLEAU III  
ACTION DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE SUR CERTAINES PROTÉINES À STRUCTURE MODIFIÉE

Protéine étudiée	Conditions expérimentales*		Temps d'incubation (min)	Changement de coloration**	Phénomènes observés	
	Quantité de protéine (mg)	Consommation d'oxygène (moles O <sub>2</sub> /mole de protéine)			Disparition de Tyr (en restes par mole de protéine)	Temps de latence*** (min)
RNAase performique	6 à 10	180 à 360	J fugace, r, R et JB	6 puis 7.3 à 7.7	6	—
RNAase performique	6	300 à 570	RB puis JB	2.8 à 3.2	2.9 à 3.2	30 à 45
RNAase dénaturée à pH 13	8	180	Incolore	0	0	—
RNAase traitée par l'urée 8 M à pH 10.6	3	120	r, O puis JO	# 6	4 à 5	0.5 à 1
Lysozyme réduit ou dénaturé	1.5 à 2	120	r, O puis JO	Observée	Non dosée	0.5 à 1

\* Les meilleurs milieux d'incubation contenaient, suivant la quantité de protéine utilisée, de 0.020 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume final de 3 ml sauf ceux de la série d'expériences marquée d'un astérisque \* qui contenait 0.7 mg de PPO-L.

\*\*, \*\*\*, Voir légendes du Tableau II.

TABLEAU IV  
ACTION DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE SUR DIVERSES PROTÉINES EN PRÉSENCE DE CATÉCHOL OU D'ACIDE ASCORBIQUE

Protéine étudiée	Conditions expérimentales*		Substances ajoutées au milieu d'incubation	Consommation d'O <sub>2</sub> (moles par mole de protéine)	Disparition de Tyr (restes par mole de protéine)	Phénomènes observés	
	Temps d'incubation (min)	Catéchol (en moles par mole de protéine)				DOPA apparu (restes par mole de protéine)	Temps de latence (min)
Ribonuclease	30 à 360	0.05 à 0.5 ou (et) 5 à 30	0	0	0	0	—
Ribonuclease	210	3	—	0	0	0	—
RNAase-lot R574-5	14	—	40	—	1	Identifiée	—
RNAase-lot R574-5	450	12	—	6	6	0	12***
RNAase performique	20 à 30	—	20 à 40	—	6	6	100
RNAase performique	180 à 300	0.1 à 0.5	—	0	0	0	—
$\alpha$ -Lactalbumine I	180	1.5	—	1.4	0	—	—
$\alpha$ -Lactalbumine I	240	12.5	—	2.6	2.7	0	—
$\alpha$ -Lactalbumine I	40	—	20 à 40	—	2.9	3	—
$\alpha$ -Lactalbumine II	—	—	—	—	—	—	—

\* Les meilleurs milieux d'incubation étaient constitués de 5 à 12 mg de protéine et de 0.010 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume de 3 ml.

\*\* En pour cent de l'activité par rapport au témoin.

\*\*\* Voir texte.

grande (Tableau IV) en même temps qu'une quantité équivalente de restes de Tyr disparaît.

Le lysozyme, en présence de 7 moles de catéchol/mole de protéine n'est pas oxydé (mêmes critères que pour la RNAase).

Dans tous les cas, la recherche de DOPA après hydrolyse des protéines oxydées a été négative, le milieu ayant été réduit ou non par  $AH_2$  en fin d'incubation.

Si l'addition de catéchol n'a pas d'influence sur l'oxydabilité de certaines protéines par la PPO (RNAase, lysozyme), il convient de remarquer, par contre, que lorsque l'on envisage l'oxydation du catéchol par l'enzyme, l'addition de ces protéines non oxydables, augmente la vitesse initiale de la consommation d'oxygène sans modifier la valeur finale de cette consommation (1.2 à 1.3 mole  $O_2$ /mole de catéchol). Le mécanisme de cette activation est vraisemblablement dû à l'élimination de l'*o*-quinone du milieu au fur et à mesure de sa formation du fait de sa condensation à certaines fonctions de la protéine (les fonctions  $-NH_2$  paraissant jouer un rôle prédominant<sup>30</sup>).

#### Action de la PPO en présence d'acide ascorbique

L'action de la PPO sur les monophénols en présence d'un excès de  $AH_2$  conduisant à l'obtention quantitative du dérivé *o*-diphénolique correspondant<sup>31</sup> par réduction de l'*o*-quinone au fur et à mesure de sa formation, il était important de vérifier si, dans le cas de protéines oxydables ou de leurs dérivés, l'oxydation des restes de tyrosine suivait une voie identique à celle parcourue par la tyrosine libre, c'est à dire: Tyrosine → DOPA-quinone.

Ceci pouvait être démontré par la mise en évidence de la DOPA dans les protéines oxydées par l'enzyme en présence de  $AH_2$  selon le mécanisme décrit précédemment<sup>31</sup>.

La recherche de DOPA peptidique posait le problème de la stabilité de cet acide aminé au cours de l'hydrolyse acide et de son recouvrement. Il a été résolu récemment<sup>21</sup> ce qui a rendu possible la réalisation des expériences suivantes.

La cinétique de l'oxydation de la RNAase performique par la PPO-KZ (Fig. 4), lorsqu'on étudie la consommation d'oxygène met en évidence trois phases dont la première (durant les 10 premières minutes) traduit l'oxydation des restes de Tyr en restes de DOPA-quinone et la réduction de ceux-ci en restes de DOPA par  $AH_2$ ; la seconde, qui va de pair avec la disparition complète des restes de Tyr dans la protéine, correspond au "turn-over" de la réaction DOPA-quinone-DOPA, celle-ci

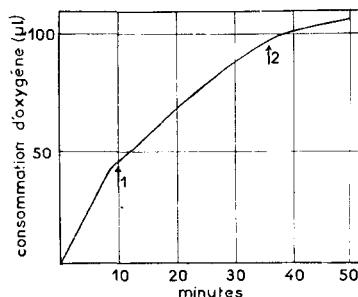


Fig. 4. Cinétique de la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de la RNAase performique par la PPO-KZ en présence d'acide ascorbique. Conditions expérimentales décrites dans le texte et dans le Tableau IV. (1) Temps à partir duquel la tyrosine du substrat a été complètement oxydée. (2) Début d'apparition de la coloration jaune.

étant réoxydée d'une manière continue par l'enzyme en excès; et la troisième, qui s'accompagne de l'apparition d'une coloration jaune est le témoin d'une déviation de la réaction par suite d'une insuffisance d' $AH_2$  dans le milieu.

Le dosage de la tyrosine après 20 min d'incubation montre la disparition des 6 restes que contient la molécule et celui de la DOPA, après hydrolyse par HCl 6 N ou HCOOH 5 N en présence de Dowex<sup>21</sup> permet la mise en évidence de 4.2 restes ce qui, compte tenu des pertes inhérentes à l'hydrolyse, indique une transformation totale des 6 restes de Tyr en restes de DOPA. D'autres arguments, qui seront étudiés par la suite<sup>32</sup> plaident également en faveur de cette transformation.

L'étude de l'oxydation de la RNAase native (lot R-574-5) en présence de  $AH_2$  montre la transformation du reste de Tyr oxydable en reste de DOPA. L'activité RNAasique est totalement conservée pour la protéine oxydée.

Pour l' $\alpha$ -lactalbumine (lot II) on constate la disparition de 3 restes de Tyr sur 5 et leur transformation en restes de DOPA.

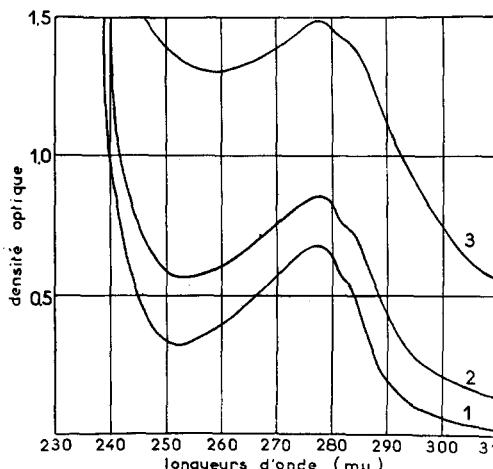


Fig. 5. Evolution du spectre d'absorption de la RNAase native au cours d'une incubation en présence de PPO-KZ. Le milieu d'incubation contenait 15 mg de RNAase dans un volume de 3 ml de tampon phosphate 0.033 M de pH 6.8 et 0.040 ml de PPO-K. Agitation dans l'appareil de Warburg conventionnel à 37° et 120 rotations/min. Spectres enregistrés avec le spectrophotomètre Beckman DK 2 en cuves de 1 cm en diluant 5 fois le milieu d'incubation. Pas d'oxydation de la protéine constatée en fin d'incubation. (1) Spectre réalisé au début de l'expérience; (2) après 3 h d'incubation; (3) après 14 h d'incubation.

#### *Modifications du spectre ultraviolet des protéines étudiées au cours de l'oxydation par la PPO*

La Fig. 5 montre l'évolution du spectre de la RNAase native après 3 et 14 h d'incubation en présence de PPO-KZ. On notera l'augmentation globale de l'absorption sans modifications de la valeur des longueurs d'onde caractéristiques. Il n'y a, au cours de cette incubation ni coloration du milieu, ni consommation d'oxygène, ni disparition de Tyr dans la protéine.

Le spectre de la RNAase performique (Fig. 6) traduit une augmentation progressive de l'absorption du maximum à 275 mμ ainsi que de l'épaulement à 280 mμ avant qu'aucun changement de coloration ne se manifeste.

Puis ce phénomène s'accentue et l'apparition d'une coloration rose coïncide

avec celle d'une inflexion de  $\lambda = 310-312 \text{ m}\mu$ . Avec la coloration rouge, le rapport  $\lambda_{\max} 275 : \lambda_{\min} 250$  diminue en même temps que  $\lambda_{\max}$  se déplace progressivement de 275-280  $\text{m}\mu$  et que l'inflexion à 310-312  $\text{m}\mu$  s'accentue. Ce stade est suivi d'un virage du milieu à l'orangé puis au jaune: il y a alors un maximum unique à 280  $\text{m}\mu$ , l'inflexion à 310-312  $\text{m}\mu$  a disparu et l'on voit apparaître une bande très marquée de  $\lambda_{\max} = 350 \text{ m}\mu$ .

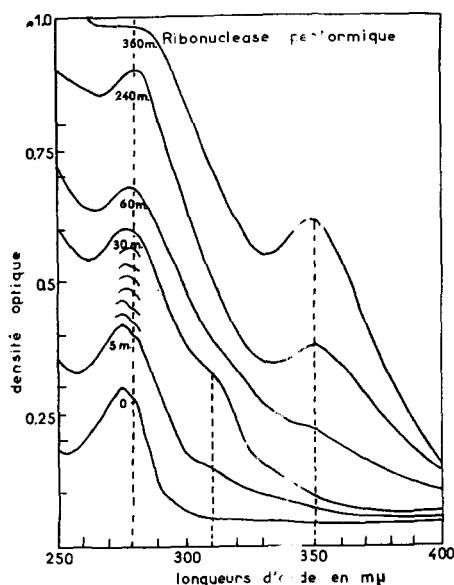


Fig. 6. Modifications du spectre d'absorption au cours de l'oxydation de la RNAase performique par la PPO-KZ. Le milieu d'incubation contenait 1.5 mg de RNAase performique dissous dans 3 ml d'eau et 0.005 ml de PPO-KZ. Incubation réalisée dans la cuve (1 cm) du spectrophotomètre Beckman DK 2 avec barbottage continu d'oxygène; température 20°.

Quand on oxyde une quantité plus grande de protéine en présence d'une quantité suboptimale d'enzyme, on prolonge la durée de la phase jaune initiale signalée précédemment et difficile à saisir dans les conditions normales d'incubation. On note alors l'apparition puis le développement d'une bande dont le sommet est situé vers 390  $\text{m}\mu$ . Quand le milieu vire au rose, cette dernière s'efface pour faire place à la bande de  $\lambda_{\max} = 310-312 \text{ m}\mu$ .

Le spectre de la RNAase oxydable (lot R-574-5) présente une évolution analogue, notamment en ce qui concerne la bande de  $\lambda_{\max} = 350 \text{ m}\mu$ .

Enfin, l'étude des modifications du spectre ultraviolet de l' $\alpha$ -lactalbumine lot II a permis de faire des constatations identiques à celles décrites par YASUNOBU *et al.*<sup>13-16</sup>.

#### DISCUSSION

Outre son intérêt biologique (participation de protéines oxydées à la mélanogénèse) l'étude de l'oxydation de certaines protéines par la PPO tirait son intérêt du fait que l'on connaît très peu d'enzymes capables d'une action sur les groupements

réactifs des protéines et que l'on ne connaît pas les conditions structurales nécessaires à cette action.

Les expériences décrites apportent la preuve chimique que le résidu d'acide aminé oxydé est bien la tyrosine (disparition d'un résidu de tyrosine associé à la consommation d'une mole d'oxygène dans la première phase de l'incubation) et que celle-ci est oxydée en DOPA-quinone ainsi qu'en témoigne la présence de DOPA dans les molécules protéiques après oxydation en présence d'acide ascorbique. Celle-ci a été identifiée et dosée après hydrolyse par HCl 6 N ou le système HCOOH-Dowex-50, et fractionnement sur Dowex-50 dans les conditions décrites précédemment, grâce à la réaction colorée d'ARNOW, à son spectre et à sa migration chromatographique en 2 dimensions (*n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) et méthyléthylcétone-acide acétique-eau (75:25:30) identique à celle de la [<sup>14</sup>C]DOPA utilisée comme marqueur.

Cette caractérisation permet d'interpréter la bande de  $\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ m}\mu$  comme correspondant aux restes de DOPA-quinone apparus dans la molécule. Le blocage de la fonction aminée de la tyrosine dans une liaison peptidique détermine une stabilisation de cette forme quinonique, signalée par YASUNOBU *et al.*<sup>18</sup> pour les peptides à tyrosine C-terminale.

La bande d'absorption à 350 m $\mu$ , caractéristique des protéines oxydées par la PPO et déjà décrite par ce même auteur<sup>18, 19</sup> dans le cas de  $\alpha$ -lactalbumine, hypertensine I et ACTH, a été retrouvée dans ce travail pour l' $\alpha$ -lactalbumine, RNAase native (lot R 574-5) et RNAase performique. Cette bande apparaît lorsque le milieu d'incubation passe du rouge orangé au jaune brun et son importance relative par rapport aux autres bandes d'absorption des protéines oxydées est, en fin d'incubation, d'autant plus grande qu'un plus grand nombre de restes de tyrosine est impliqué dans l'oxydation.

Le caractère de non oxydabilité de certaines protéines (RNAase, lysozyme, insuline) peut être du à la fois à un facteur stérique et au blocage des fonctions phénols de la tyrosine par des liaisons hydrogènes.

Les différents lots de RNAase utilisés présentaient les mêmes caractères d'homogénéité et d'activité. Cependant, l'oxydabilité d'un des lots est probablement liée à une faible différence structurale rendant accessible à l'enzyme une fonction phénol d'un reste de tyrosine. Sa position dans la molécule n'a pas été déterminée mais il n'est vraisemblablement pas inclus dans le site actif puisqu'une modification de la structure tertiaire à son niveau, son oxydation ou sa transformation en reste de DOPA ne modifient pas les propriétés enzymatiques de la RNAase.

La destruction complète des structures secondaire et tertiaire (RNAase performique) rend accessibles à l'oxydation les 6 restes de tyrosine de la molécule. La dénaturation plus limitée par l'urée 8 M à pH = 10.6, qui porte uniquement et irréversiblement sur la structure tertiaire<sup>22</sup> conduit, en dehors d'une perte importante de la solubilité dans l'eau, à l'oxydabilité par la PPO d'un certain nombre de restes de tyrosine masqués dans la protéine native (RNAase, lysozyme). Cette dénaturation est due: (a) à la libération des -OH phénoliques impliqués dans des liaisons hydrogène<sup>27-29, 33-35</sup> à un facteur stérique: dans le cas de la RNAase, on sait que les liaisons hydrogène jouent un rôle important dans le maintien de la rigidité et de la configuration spatiale de la molécule. On sait également<sup>33, 36, 37</sup> qu'une rupture de ces liaisons produit un déplissement partiel de la chaîne dont la structure devient beaucoup

plus lâche puisque seuls les 4 ponts disulfures interviennent alors; d'où l'accessibilité de la plupart des restes de tyrosine à l'oxydation par la PPO. Ce phénomène n'est pas observé lorsque la destruction de la structure tertiaire est plus limitée (dénaturation en milieu alcalin, à pH 13, conditions dans lesquelles les six groupements phénoliques des restes de tyrosine de la RNAase sont libres mais sans déplissement de la chaîne, le facteur stérique étant maintenu) ou lorsque la dénaturation est réversible (urée 8 M à pH neutre). Dans ce cas, on doit admettre que la molécule de RNAase qui a subi un déplissement en présence de l'urée 8 M, se retrouve, après élimination de ce réactif, sous sa forme initiale, les liaisons hydrogène se reformant entre les mêmes points de la chaîne, maintenant ainsi le facteur stérique empêchant l'oxydation par la PPO des 3 restes de Tyr dont les groupements phénoliques sont libres.

TABLEAU V

Protéine étudiée	Poids moléculaire	No. de résidus de tyrosine	$O_2$ consommé par mole de protéine		
			YASUNOBU et al.	FRIEDEN et al.	Ce travail
Ribonucléase	14 000	6	1.1	0.33	0 ou 1
$\alpha$ -lactalbumine	16 000	5	4.7	5	0 ou 3
RNAase performique	14 000	6	—	6	6
Insuline	6 000	4	—	4	0
Lysozyme	15 000	3	0	0	0

Ces faits sont à rapprocher de ceux qui ont permis récemment à HABER ET ANFINSEN<sup>38</sup> de supposer que l'"information" déterminant les structures secondaire et tertiaire de la RNAase est contenue dans la séquence même des acides aminés.

Des expériences visant à réaliser l'oxydation de la RNAase et du lysozyme en solution dans l'urée 8 M ont également été négatives. Il a été constaté à cette occasion que les différentes préparations de PPO utilisées sont capables d'oxyder la tyrosine, la DOPA et le catéchol en solution dans l'urée 8 M mais, par contre, sont sans effet dans ces conditions sur des substrats protéiques oxydables comme la RNAase-performique ou l' $\alpha$ -lactalbumine lot II, même lorsqu'elles sont utilisées en grand excès.

La différence d'oxydabilité des deux lots d' $\alpha$ -lactalbumine étudiés en fonction de l'origine de l'enzyme utilisé provient probablement des propriétés dénaturantes des PPO-L et W. En effet, la PPO-KZ, bien que 40 à 70 fois plus active, ne catalyse pas l'oxydation du lot I. Le temps de latence important (1 h) observé avec les préparations commerciales peut être interprété comme une période pendant laquelle les impuretés de l'enzyme dénaturent la protéine et rendent un reste de Tyr accessible à son action (Tableau II). L'apparition de 1 et 2 restes de Tyr oxydables lorsque l'oxydation par la PPO-KZ est opérée en présence de quantités croissantes de catéchol (Tableau IV) plaide en faveur de cette interprétation et met l'accent sur les propriétés dénaturantes du (ou des) produit(s) d'oxydation du catéchol dans ce système.

L'oxydabilité directe du lot II d' $\alpha$ -lactalbumine doit alors être interprétée en fonction d'un certain degré de dénaturation de la molécule au cours de sa préparation ou durant sa conservation (dans  $(NH_4)_2SO_4$  à 0.5 saturation).

L'oxydabilité par la PPO constitue donc un test très sensible et très spécifique du caractère accessible des résidus de tyrosine d'une protéine. En dehors du facteur stérique évident, le blocage des fonctions phénols par des liaisons hydrogène exclut

la possibilité d'oxydation par l'enzyme. L'application de cette propriété à l'étude du degré de liberté des groupements phénoliques en fonction de l'activité, au niveau des sites actifs des enzymes auxquels participe la tyrosine, peut être envisagée.

Les résultats décrits pour la RNAase et l' $\alpha$ -lactalbumine permettent de constater que certaines protéines pures et homogènes vis-à-vis d'un grand nombre de critères (y compris l'activité biologique) peuvent cependant présenter des différences dans leur structure tertiaire, différences que l'on peut mettre en évidence par le caractère oxydable ou non des résidus de tyrosine.

#### CONCLUSION

On a confirmé que certaines protéines peuvent être oxydées par diverses préparations de PPO de champignon et constaté que les premiers stades de cette oxydation consistent en la transformation de tout ou partie des restes de tyrosine des protéines en restes de DOPA-quinone. Toutefois, l'impossibilité de la mise en évidence de DOPA en fin d'incubation, après réduction de la protéine oxydée par AH<sub>2</sub> et l'examen des courbes de consommation d'oxygène (consommation de plus d'une mole O<sub>2</sub> par reste de Tyr oxydé) conduisent à penser que les restes de DOPA-quinone, bien que stabilisés par les liaisons peptidiques, subissent une évolution ultérieure. L'étude du devenir de ces restes fera l'objet d'un prochain article<sup>32</sup>.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé partiellement grâce à une subvention du Comité d'Action Scientifique de Défense Nationale. Nous remercions la collaboration technique de Mme S. LASRY (C.N.R.S.).

#### RÉSUMÉ

1. L'étude de l'action de la polyphénoloxydase de champignon sur diverses protéines natives et homogènes a permis de confirmer que certaines d'entre elles (RNAase R574-5 et  $\alpha$ -lactalbumine lot II) sont oxydées par cet enzyme alors que d'autres (différents lots de RNAase, lysozyme, insuline) ne subissent aucune modification.

2. La preuve chimique que les restes de tyrosine des protéines sont impliqués dans cette oxydation est apportée.

3. La caractérisation et le dosage de la DOPA après hydrolyse des protéines oxydées en présence d'acide ascorbique permettent de conclure que, comme dans le cas de la tyrosine libre, l'oxydation des restes de tyrosine à l'intérieur d'une molécule protéique conduit à la formation de restes de DOPA-quinone.

4. L'action sur l'oxydabilité de certaines protéines, de divers agents dénaturants ou de traitements visant à dénaturer les structures secondaire et tertiaire, a permis de préciser quelques uns des facteurs gouvernant le caractère accessible ou non par l'enzyme des résidus de tyrosine de la protéine.

5. Le caractère accessible ou non à l'oxydation par la polyphénoloxydase des restes de tyrosine d'une protéine constitue un test très sensible dont l'intérêt est discuté en liaison avec l'étude de la structure des protéines.

## RÉFÉRENCES

- <sup>1</sup> I. W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 145.
- <sup>2</sup> P. EDMAN, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 167.
- <sup>3</sup> I. W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 303.
- <sup>4</sup> I. W. SIZER, *Science*, 108 (1948) 335.
- <sup>5</sup> D. KERTESZ ET P. CASELLI, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 583.
- <sup>6</sup> D. KERTESZ, *Nature*, 165 (1950) 523.
- <sup>7</sup> I. W. SIZER ET C. O. BRINDLEY, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 323.
- <sup>8</sup> I. W. SIZER ET J. F. FENNESSEY, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 351.
- <sup>9</sup> W. J. HAAS, I. W. SIZER ET J. R. LOOFBOUROW, *Biophys. Biochim. Acta*, 6 (1951) 589.
- <sup>10</sup> I. W. SIZER ET P. F. WAGLEY, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 213.
- <sup>11</sup> I. W. SIZER, *Adv. in Enzymol.*, Interscience Publishers Inc., New York, Vol. 14, 1953, p. 129.
- <sup>12</sup> S. LISSITZKY, M. T. BENEVENT ET S. BOUCHILLOUX, *Compt. rend., Biol.*, 151 (1957) 2144.
- <sup>13</sup> K. T. YASUNOBU ET W. B. DANDLIKER, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 1065.
- <sup>14</sup> K. T. YASUNOBU ET P. E. WILCOX, *J. Biol. Chem.*, 231 (1958) 309.
- <sup>15</sup> E. FRIESEN, C. BIGELOW ET M. OTTESEN, *Federation Proc.*, 18 (1959) No. 907.
- <sup>16</sup> K. T. YASUNOBU, E. W. PETERSON ET H. S. MASON, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 3291.
- <sup>17</sup> K. T. YASUNOBU, *Pigment Cell Biology*, Academic Press, Inc., New York, 1959, p. 583.
- <sup>18</sup> S. LISSITZKY, M. ROLLAND ET S. LASRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 379.
- <sup>19</sup> S. R. DICKMAN ET K. TRUPIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 355.
- <sup>20</sup> C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 611.
- <sup>21</sup> M. ROLLAND, S. LASRY ET S. LISSITZKY, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 1065.
- <sup>22</sup> E. A. BARNARD ET W. D. STEIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 37 (1960) 371.
- <sup>23</sup> P. JOLLES ET J. JOLLES, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1933.
- <sup>24</sup> D. KERTESZ ET R. ZITO, *Nature*, 179 (1957) 1017.
- <sup>25</sup> G. H. HOGEBOOM ET M. H. ADAMS, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 273.
- <sup>26</sup> J. ENSELME, J. M. PETAT ET J. MONESTIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 872.
- <sup>27</sup> D. SHUGAR, *Biochem. J.*, 52 (1952) 142.
- <sup>28</sup> C. TANFORD, J. D. HAUENSTEIN ET D. G. RANDS, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 6409.
- <sup>29</sup> M. SELA ET C. B. ANFINSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 229.
- <sup>30</sup> H. S. MASON, in *Pigment Cell Biology*, 1 Vol., Academic Press, Inc., New York, 1959, p. 563.
- <sup>31</sup> M. ROLLAND ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 83.
- <sup>32</sup> S. LISSITZKY, M. ROLLAND ET J. REYNAUD, *Biochim. Biophys. Acta*, à paraître.
- <sup>33</sup> W. F. HARRINGTON ET J. A. SCHELLMAN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 30 (1956) 21.
- <sup>34</sup> H. A. SCHERAGA, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 196.
- <sup>35</sup> O. BLUMENFELD ET M. LEVY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 76 (1958) 97.
- <sup>36</sup> C. B. ANFINSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 30 (1956) 13.
- <sup>37</sup> M. SELA, C. B. ANFINSEN ET W. F. HARRINGTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 502.
- <sup>38</sup> E. HABER ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 422.

*Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 95-110