

## INTERACTION ENTRE tARN-LIGASES ET LIPIDES

L. DIMITRIJEVIC et Th. GODEFROY-COLBURN

*Institut de Biologie Physico-chimique, rue P. et M. Curie, 75005 Paris, France*

Received 10 April 1974

Yeast lysyl-tRNA-synthetase can be obtained under two different forms: a native form (mol. wt. 140 000) bound to lipids which are responsible for its low density; this form has a tendency to aggregate; the other form is partially proteolyzed (mol. wt. 110 000) and is not bound to lipids. When the lipid fraction is removed from the native enzyme it loses its activity which can be restored by adding back an amount of lipids equivalent to that which had been removed. The proteolyzed enzyme is also activated, but to a lesser extent, by the addition of the lipid fraction extracted from the native enzyme. At low concentration every preparation of lysyl-tRNA-synthetase seems to dissociate into inactive subunits, but this is especially true for the delipidized native enzyme. Synthetases for several other amino acids have a similar behavior.

### 1. Introduction

Nous avons démontré [1] que la lysyl-tARN-ligase de levure (EC 6.1.1.6) peut être obtenue sous différentes formes actives, selon les conditions de culture des cellules et le mode de préparation de l'enzyme. Lorsque la préparation est effectuée à partir de cellules en phase logarithmique de croissance, en présence de fluorure de phényl méthyl sulfonium, on obtient une enzyme homogène, dite native, qui a tendance à s'agréger. Par contre, lorsque la lysyl-tARN-ligase est préparée à partir de cellules en phase stationnaire, on obtient des formes multiples d'enzyme pouvant provenir de la forme native, à la suite d'une protéolyse partielle.

De toutes les méthodes essayées pour empêcher l'agréation de l'enzyme native, seules la présence de tARN et l'addition de détergent (dodécyl sulfate de sodium) ont donné des résultats positifs. Les agrégats résistent à l'addition de  $\beta$ -mercaptoéthanol, de sel (NaCl, 1 M), d'urée 2 M. Ces résultats nous ont amenés à penser que la préparation d'enzyme contenait une fraction de nature non protéique déterminant l'agréation. Effectivement, la densité de flottaison en gradient de chlorure de césium de la lysyl-tARN-ligase native est nettement inférieure à celle généralement admise pour les protéines, ce qui suggère que la

protéine active est associée à une fraction lipidique. Une telle association entre tARN-ligases et lipides a été rapportée par Hradeč et Dušek pour l'enzyme de foie de rat [2]. Ils ont montré que dans ce cas la partie lipidique était nécessaire à l'activité enzymatique et que l'on peut reconstituer l'enzyme active à partir des fractions protéique et lipidique. Nous rapportons ici des expériences suggérant qu'il en est de même avec les tARN-ligases de levure et que les différences de comportement entre les lysyl-tARN-ligases native et dégradée proviennent en partie de leur différence de contenu en lipides.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Préparation du mélange des tARN-ligases

Les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont cultivées dans 10 l de milieu contenant 30 g/l de glucose et 5 g/l d'extrait de levure. La culture est arrêtée au milieu de la phase logarithmique de croissance. Après lavage avec: Tris (pH 8), 0,01 M;  $MgCl_2$ , 0,01 M et EDTA, 0,001 M, les levures (78 g) sont broyées trois fois à la presse hydraulique, avec 1120 kg/cm<sup>2</sup> de pression dans la cellule, dans 78 ml du même tampon contenant 2 mM de fluorure de phényl méthyl sulfonium (inhibiteur des protéases à sérine). L'extrait

est centrifugé à 30 000 g pendant 30 min, puis à 200 000 g pendant 2 hr et purifié par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose Whatman DE 52 (36 X 2 cm). L'adsorption est faite dans un tampon phosphate de potassium 0,02 M (pH 7,5);  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,02 M;  $MgCl_2$ , 0,001 M et glycérol 10%. Après lavage par 370 ml du même tampon, les tARN-ligases sont éluées avec un tampon phosphate de potassium (pH 6,5) 0,25 M;  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,02 M;  $MgCl_2$ , 0,02 M et glycérol 10%, puis concentrées jusqu'à 3,3 mg/ml par ultrafiltration. L'enzyme est gardée à  $-20^\circ C$  dans le même tampon contenant 50% de glycérol.

Le mélange des tARN-ligases ainsi obtenus est actif pour les acides aminés suivants: sérine, alanine, asparagine, acide aspartique, leucine, isoleucine, histidine, lysine, phénylalanine et valine.

## 2.2. Purification de la lysyl-tARN-ligase de levure

La ligase native a été purifiée à partir d'un lysat de sphéropastes: les levures, cultivées et lavées comme ci-dessus (48 g) sont traitées à  $32^\circ C$  pendant 2 hr 30 min par 7 ml de suc digestif d'*Helix pomatia* stabilisé (L'Industrie Biologique Française) dans 150 ml du tampon suivant: Sorbitol, 1,4 M; EDTA, 50 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol, 7 mM; phosphate disodique, 0,1 M; citrate trisodique, 0,05 M (pH 5,8). Les sphéropastes sont lavés deux fois dans 150 ml de sorbitol 1,4 M, puis lysés dans 80 ml de sorbitol 0,4 M contenant 2 mM de fluorure de phényl méthyl sulfonium (PMSF). Après centrifugation de 30 min à 30 000 g, puis de 3 hr à 100 000 g, le surnageant est purifié par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, colonnes de DEAE-cellulose et de Bio Rex 70 [1,3]. L'enzyme obtenue possède toutes les propriétés de la ligase native; en particulier son analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) montre une seule bande protéique, ayant un poids moléculaire de 70 000. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée est 245 nmoles de lysyl-tARN formé/min/mg de protéine dans nos conditions\*. La ligase dégradée a été obtenue à partir d'un broyat à la presse hydrau-

lique de levures en phase stationnaire, sans addition de PMSF. Son activité spécifique au moment de l'emploi était de 17 nmoles/min/mg de protéine.

## 2.3. Essais enzymatiques

La charge du tARN est effectuée à  $30^\circ C$  pendant les temps indiqués, dans le milieu suivant: Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM;  $MgCl_2$ , 10 mM; ATP, 2 mM; tARN total de levure (Boehringer) 0,7 mg/ml; acide aminé ( $^{14}C$ ) (C.E.N., Saclay) 1  $\mu Ci/ml$ , soit pour la lysine, 8,5  $\mu M$  (activité spécifique 117 Ci/mole), sauf indication contraire. La détermination du tARN chargé est faite sur 50  $\mu l$ , selon la méthode décrite [4].

## 2.4. Centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium

La centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium est effectuée afin de déterminer les densités de flottaison de l'enzyme native et de l'enzyme dégradée. L'échantillon est dilué dans 4 ml de tampon N-morpholino-3-propane/ $H_2SO_4$  (pH 6,3) 0,01 M, contenant 40% de chlorure de césium (poids par volume), et centrifugé à 45 000 tours/min dans le rotor Spinco SW 56 pendant 72 hr, à  $4^\circ C$ . La  $\beta$ -galactosidase est utilisée comme marqueur.

## 2.5. Extraction des lipides à partir des tARN ligases partiellement purifiées

Le mélange des tARN-ligases est traité à l'éther (Merck, pur) selon la méthode de Hradeč et Dušek (2): L'enzyme (2 à 8 mg) est dialysée contre du tampon Tris-HCl (pH 7,5) 0,01 M, et adsorbée sur 300 mg de DEAE-cellulose (Whatman DE 52) qui est ensuite lyophilisée. L'extraction des lipides est effectuée par 200 ml d'éther pendant 4 à 7 hr dans l'appareil de Soxhlet. Après extraction, la protéine est éluee de la DEAE-cellulose avec 2 ml de Tris (pH 7,5) 0,5 M. Le témoin, non extrait à l'éther, a subi par ailleurs le même traitement que l'échantillon.

Pour les essais de réactivation de la protéine enzymatique, on ajoute à la solution des lipides dans l'éther: 1 ml de polyéthylène glycol 600 (Merck). L'éther est évaporé et la suspension de lipides dans le polyéthylène glycol est ajoutée en quantités variables à la protéine dans le milieu réactionnel habituel. Le polyéthylène glycol seul n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme.

L'enzyme délipidée s'inactive beaucoup plus vite,

\* Une erreur dans le tableau 1 de la réf. [1] a fait écrire 'pmoles' à la place de 'nmoles'.

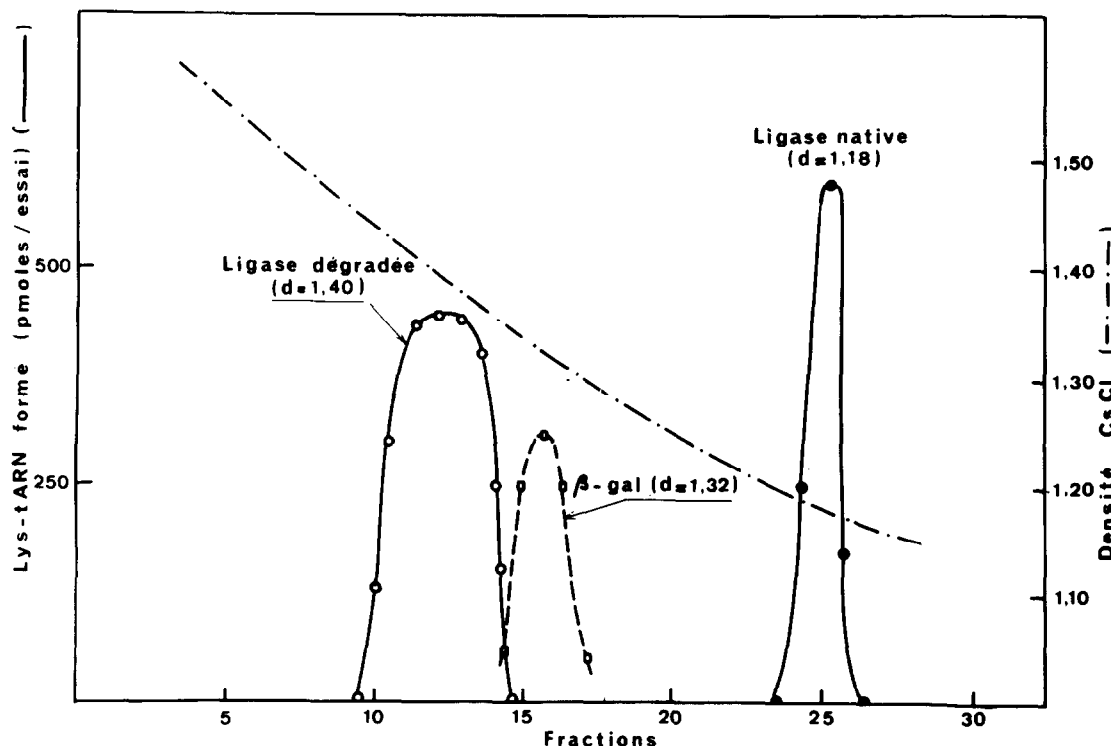


Fig. 1. Densité de lysyl-tARN-ligases native et dégradée en gradient de chlorure de césium. La centrifugation est faite comme dans 'Méthodes', avec des échantillons de 150  $\mu$ g d'enzyme purifiée, soit native, soit dégradée. On collecte des fractions de 120  $\mu$ l, et 25  $\mu$ l de chaque fraction sont utilisés pour l'essai de charge (10 min à 30°C), comme indiqué dans 'Méthodes'. La  $\beta$ -galactosidase est dosée selon la méthode décrite [5]. La densité de chaque fraction à 20°C est mesurée par pesée.

à 0°C, que l'enzyme non traitée à l'éther; dans nos conditions, son inactivation est complète au bout de deux jours, alors que l'enzyme native ne perd pas d'activité.

### 3. Résultats

Nous avons mis en évidence l'interaction entre la lysyl-tARN-ligase et les lipides de deux façons:

#### 3.1. Centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium

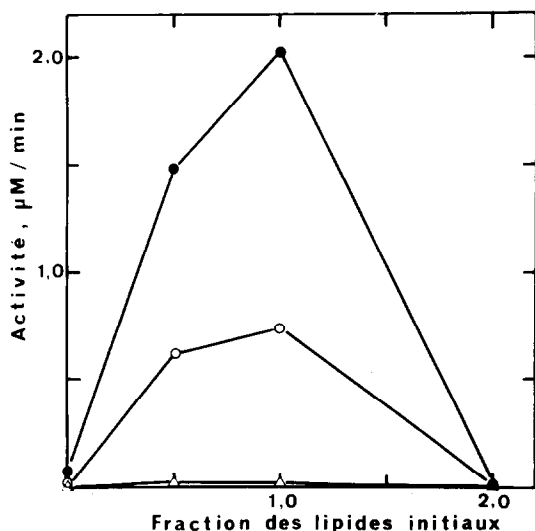
La centrifugation en gradient de chlorure de césium donne, pour l'enzyme native purifiée, une densité de flottaison de 1,18 en comparaison avec 1,32 pour la  $\beta$ -galactosidase. Par contre, l'enzyme dégradée a une densité moyenne de 1,40 (fig. 1) et paraît beaucoup

plus hétérogène que l'enzyme native. On constate donc une corrélation entre l'état natif de l'enzyme et son association avec un composant moins dense que les protéines, de nature probablement lipidique. La présence effective de lipides dans l'enzyme native est d'ailleurs observée directement par sa coloration au rouge Sudan III, sur papier.

La densité assez forte de l'enzyme dégradée peut faire penser à un complexe tARN<sup>Lys</sup>-ligase. Cependant, un tel complexe devrait normalement se dissocier dans le milieu de force ionique très élevée du gradient, et d'autre part nous n'avons pas détecté de charge sans addition de tARN (moins de 0,2 pmoles pour 60  $\mu$ g de protéine).

#### 3.2. Effet sur l'activité de l'enzyme de l'extraction et de la ré-addition de lipides

##### 3.2.1. Enzyme brute



La préparation fraîche de ligases, adsorbée sur DEAE-cellulose, perd son activité pour la charge du tARN par la lysine lors de l'extraction par l'éther.

Fig. 2. Stimulation de la lysyl-tARN-ligase brute par les lipides. L'extraction à l'éther est effectuée à partir de 6 mg d'une préparation fraîche de ligases (voir 'Méthodes'). La suspension de lipides dans le polyéthylène glycol 600 (0 à 15 µl) est ajoutée, selon les proportions indiquées sur la figure, à 100 µl du milieu de charge du tARN contenant 58 µM de (<sup>14</sup>C)-lysine (activité spécifique, 17 Ci/mole) avec les concentrations suivantes de l'enzyme extraite: △, 220 µg/ml; ○, 440 µg/ml; ●, 660 µg/ml. L'activité est mesurée sur 10 min.

L'enzyme peut être réactivée en ajoutant la fraction lipidique à la protéine. L'activité ainsi restaurée augmente avec la quantité de lipides ajoutée jusqu'à un optimum qui correspond à une quantité de lipides équivalente à celle que l'enzyme a perdu lors de l'extraction (fig. 2). Les activités des autres ligases de la même préparation diminuent par suite de l'extraction à l'éther dans des proportions variables et sont en général partiellement restaurées par une quantité de lipides équivalente à celle qui a été extraite (tableau 1, exp. 1). Les ligases activées par les lipides

Tableau 1  
Effet des lipides sur l'activité des tARN-ligases de levure

tARN-ligase	Activité (pmoles/min/mg protéine)				
	1ère expérience		2ème expérience		
	Après extraction à l'éther	Après extraction et addition de lipides	Témoin non-traité à l'éther	Après extraction à l'éther	Après extraction et addition de lipides
Alanyl	8,3	21,5 (2,61)*	13,2	11,5	18,6 (1,62)
Asparagyl	12,0	25,1 (2,10)	11,0	10,6	10,8 (1,0)
Valyl	217	406 (1,88)	144	96	49,3 (0,53)
Lysyl	207	370 (1,80)	10,0	12,0	10,6 (0,88)
Histidyl	156	220 (1,41)	236	89	41,0 (0,46)
Isoleucyl	5,1	6,9 (1,36)	7,4	5,5	5,2 (0,89)
Aspartyl	108	118 (1,10)	5,8	7,9	7,9 (1,0)
Leucyl	64,5	64 (0,99)	27,6	11,3	9,8 (0,87)
Phénylalanyl	140	119 (0,84)	44	58	107

\* Le rapport des activités de l'enzyme extraite en présence et en absence de lipides est indiqué entre parenthèses. La première expérience a été faite avec une préparation enzymatique fraîche (voir Méthodes). La deuxième expérience utilise une préparation ayant séjourné à 4° pendant plusieurs jours. Les essais sont effectués pendant 10 min avec 0,4 mg/ml (exp. 1) ou 1 mg/ml (exp. 2) de protéine. La quantité de lipides ajoutée est équivalente à celle qui a été extraite. Les activités spécifiques (en Ci/mole) des acides aminés (<sup>14</sup>C) sont les suivantes: Alanine, 58; asparagine, 102; valine, 105; lysine, 117; histidine, 120; isoleucine, 124; acide aspartique, 115; leucine, 151; phénylalanine, 260.

sont: l'alanyl-, l'asparaginy-, la valyl-, et la lysyl-tARN ligases; l'histidyl- et l'isoleucyl-tARN-ligases le sont moins, tandis que l'aspartyl-, la leucyl- et la phényl-alanyl-tARN-ligases sont peu affectées par la présence de lipides, dans les conditions essayées. Ces observations sont similaires à celles de Hradeč et coll. [2] sur les ligases de foie de rat.

Par contre, une préparation vieillie à 4°C ne montre pas cette activation par la fraction à l'éther, au contraire; en particulier l'activité de la lysyl-tARN-ligase (qui est d'ailleurs très faible) est insensible à l'extraction (tableau 1, exp. 2).

### 3.2.2. Lysyl-tARN-ligase purifiée

Avec l'enzyme purifiée, on retrouve des résultats analogues aux précédents, ce qui prouve que l'action des lipides sur l'activité de la préparation brute n'est pas un artefact dû à la présence d'autres protéines. La *ligase native* est fortement inactivée à la suite de l'extraction par l'éther et retrouve une partie de son

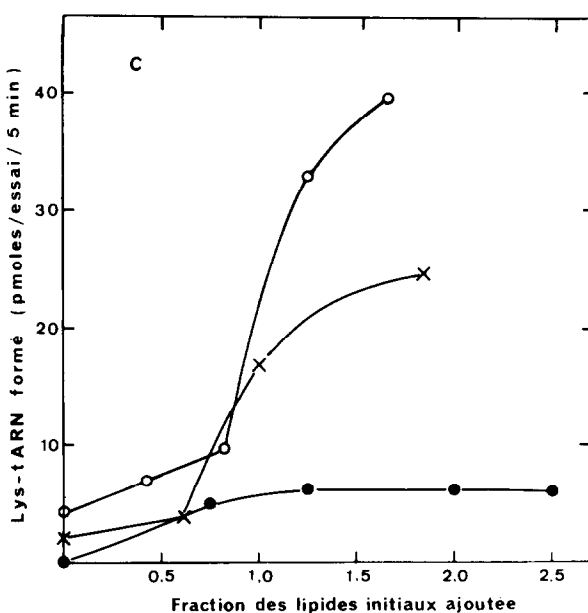
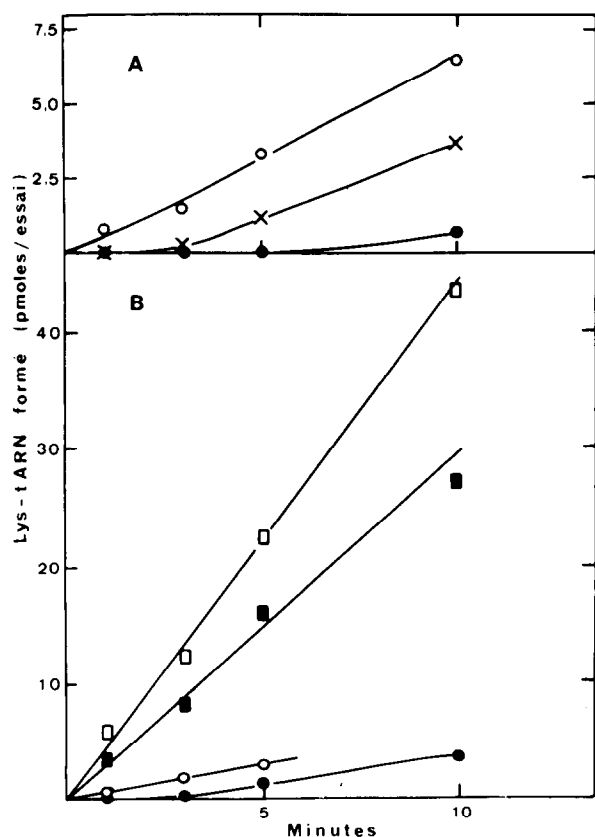


Fig. 3. Effet des lipides sur la lysyl-tARN-ligase native purifiée. L'extraction à l'éther est effectuée sur 150 µg de protéines. Les essais sont effectués en présence de polyéthylène glycol 600 (0,1 ml pour 0,47 ml de milieu réactionnel analysé par aliquotes de 50 µl), contenant une proportion variable du lipide présent originellement dans la quantité d'enzyme utilisée. Cette proportion est désignée par L: A - Cinétiques de charge de l'enzyme délipidée. Les concentrations d'enzyme sont les suivantes: ●, 5,1 µg/ml; X, 10,2 µg/ml; O, 15,3 µg/ml; B - Effet de l'addition de lipide sur la cinétique de charge par l'enzyme extraite à l'éther. Concentration d'enzyme: 10,2 µg/ml; concentration de lipides: ●, L = 0; O, L = 0,62; ■, L = 1,0; □, L = 1,88; C - Influence de la proportion de lipides sur le taux de réactivation. Les concentrations d'enzyme sont les mêmes qu'en A. L'activité est mesurée sur 5 min.

activité après addition de la fraction lipidique (fig. 3, B et C). L'activité spécifique de l'enzyme délipidée est très faible et augmente avec la concentration en protéines. D'autre part, il semble que la réaction comporte une phase de latence jusqu'à 10 µg/ml d'enzyme. Ces observations suggèrent que l'enzyme délipidée a tendance à se dissocier en sous-unités inactives, à faible concentration. Il en est d'ailleurs de même avec l'enzyme native de départ, avec l'enzyme délipidée à laquelle on a rajouté la fraction lipidique en concentration optimale, et avec l'enzyme protéolysée (fig. 4), mais ceci pour des concentrations en protéine bien plus faibles. Dans tous les cas, la non-

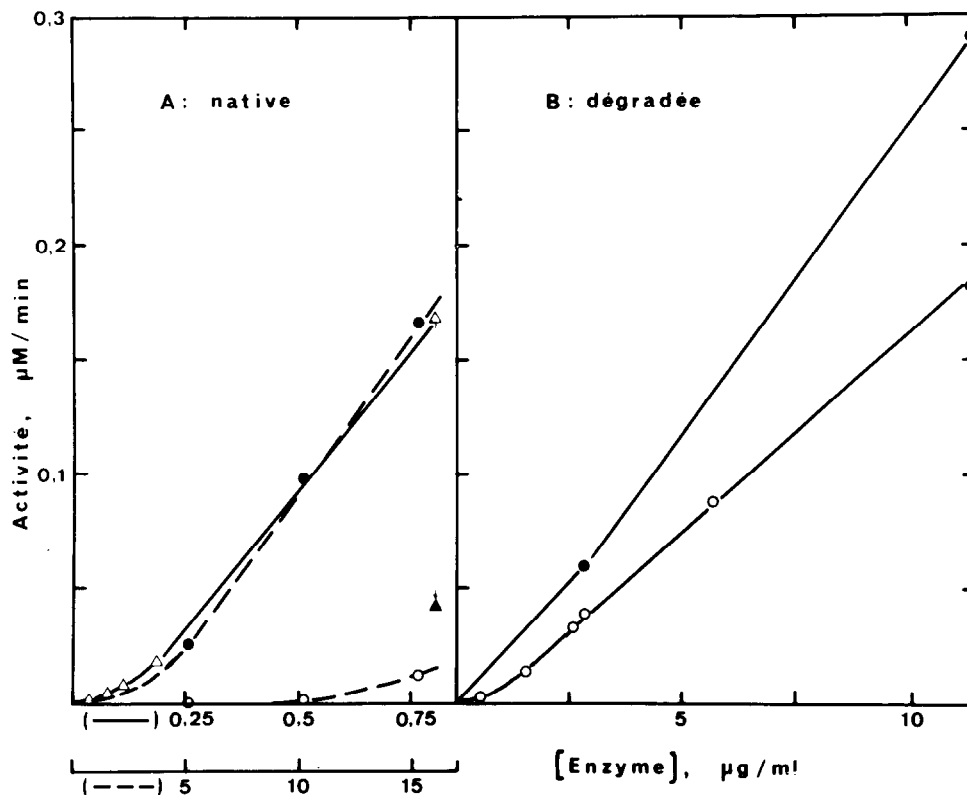


Fig. 4. Effet de la concentration de lysyl-tARN-ligase sur son activité. Les vitesses initiales sont mesurées sur les 3 premières minutes de réaction, temps au-delà duquel les cinétiques ne sont, en général, plus linéaires: A – Enzyme native. ( $\Delta$ ) Non traitée à l'éther. Dans un cas ( $0,8 \mu\text{g/ml}$ ) une concentration de lipide correspondant à celle présente dans  $1,6 \mu\text{g/ml}$  d'enzyme native est ajoutée. La vitesse initiale est inchangée, mais une inhibition de 75% est observée au-delà de 1 min ( $\blacktriangle$ ); ( $\circ$ ) Enzyme extraite à l'éther, sans addition de lipide; ( $\bullet$ ) Enzyme délipidée, essais faits en présence de la proportion optimum de lipides (résultats repris de la fig. 3); B – Enzyme dégradée. ( $\circ$ ) Sans addition de lipide; ( $\bullet$ ) Avec addition d'une concentration de lipide équivalente à celle présente dans  $1,6 \mu\text{g/ml}$  d'enzyme native.

linéarité de l'activité en fonction de la concentration d'enzyme se produit dans la zone des activités inférieures à  $20 \text{ nM/min}$ . La réactivation de l'enzyme délipidée n'est pas instantanée [2] et elle est probablement d'autant plus lente que la concentration de lipide est plus faible. Cela peut expliquer l'allure sigmoïde des courbes de réactivation en fonction de la concentration d'enzyme, qui correspondent à un temps d'incubation de 5 min (fig. 3, C). Lorsqu'on rajoute un excès de lipide à l'enzyme native, on constate une inhibition qui ne se manifeste qu'au bout d'une minute à  $30^\circ\text{C}$  (dans le milieu réactionnel) (fig. 4, A).

La *lysyl-tARN-ligase dégradée* est peu affectée par l'extraction à l'éther (tableau 2), et contient une

quantité très faible de lipides. Elle est cependant activée par la fraction lipidique extraite de l'enzyme native (fig. 4, B).

Tableau 2  
Effet de l'extraction à l'éther sur la lysyl-tARN-ligase dégradée

	Activité (nmoles/min/mg)
Témoin	9.7
Enzyme extraite à l'éther	9.0

L'enzyme dégradée ( $4 \text{ mg}$ ) est extraite à l'éther comme décrit dans 'Méthodes'. L'activité est mesurée avec une  $45 \mu\text{g/ml}$  d'enzyme sur 2 min.

### 3.3. *Nature de la fraction lipidique*

Des résultats préliminaires (chromatographie sur plaque de silice dans le benzène) indiquent que la fraction lipidique se compose d'un stérol libre, et de plusieurs de ses esters d'acides gras. Le spectre U.V. dans l'hexane montre deux bandes à 283 nm et 275 nm, ayant des coefficients d'extinction équivalents. Il pourrait donc s'agir d'isomères de l'ergostérol [6]. Les résultats obtenus avec le foie de rat montrent que seul le méthylhexadécanoate de cholestéryle est capable de réactiver les ligases délipidées [2,7]; il y a peut-être une spécificité analogue chez la levure. En tous cas, le stéarate de cholestéryle n'est pas capable de réactiver la lysyl-tARN-ligase de levure.

L'intégrité de la fraction lipidique est indispensable au maintien de l'activité de l'enzyme dans une préparation brute: cette préparation qui perd rapidement son activité au cours du stockage à 4°C est en effet protégée très efficacement par la superoxyde dismutase [8]. On sait que cette enzyme élimine les radicaux  $O_2^-$  et ralentit ainsi fortement l'oxydation des lipides qui semble donc être la cause principale de l'inactivation.

## 5. Conclusion

La lysyl-tARN-ligase peut donc être obtenue sous deux formes différentes: une forme native, liée à des lipides, qui lui confèrent une densité anormalement faible, et qui a tendance à s'agréger, et une forme partiellement dégradée, mais active, qui ne se trouve pas en association avec des lipides. L'enzyme native, qui possède des sous-unités de poids moléculaire 70 000 [1], perd une grande partie de son activité si l'on en enlève la fraction lipidique, et recouvre cette activité après addition du lipide (dont la nature exacte est encore indéterminée). L'enzyme dégradée, dont les sous-unités ont des poids moléculaires de 50 000 et 60 000 [1,9], est également activée par la fraction lipidique extraite de l'enzyme native, mais à un degré moindre. Toutes les préparations de lysyl-tARN-ligase semblent se dissocier en sous-unités inactives, à très faible concentration, mais particulièrement l'enzyme native délipidée. Le rôle de la fraction lipidique pourrait être de favoriser la réassociation, soit directement, soit indirectement en augmentant l'affinité pour un substrat qui se fixerait de préfé-

rence sur la forme associée. Cependant, l'enzyme dégradée, bien qu'elle contienne très peu de lipides, se dissocie beaucoup moins facilement que l'enzyme native délipidée. Peut-être cette enzyme a-t-elle perdu au cours de la protéolyse une portion de chaîne polypeptidique qui rendait l'association plus difficile.

La lysyl-tARN-ligase n'est pas un cas isolé: les ligases pour plusieurs autres acides aminés se comportent de la même façon; leur cas est donc analogue à celui des ligases de foie de rat [2]. Il est probable que la levure, de même que de nombreux tissus animaux (10–13) possède des complexes de haut poids moléculaire (15 S à 30 S) regroupant les tARN-ligases, du tARN, et peut-être aussi les facteurs d'élongation [13]. Ces agrégats contiennent également des lipides [11]. Il faut remarquer que souvent les ligases des tissus animaux se trouvent en grande partie associées avec les ribosomes [12,14,15] et les microsomes [14], ce qui est à rapprocher de leur fort contenu en lipide. Néanmoins ce n'a pas été le cas ici: 10% seulement de l'activité lysyl-tARN-ligase était associée au ribosome, probablement parce que les cellules ont été lysées dans un milieu de faible force ionique, sans addition d'ion divalent. Dans d'autres conditions, nous avons trouvé une fraction importante de la ligase adsorbée sur les microsomes. Ce n'est peut-être pas représentatif de la situation *in vivo*.

Il semble que la lysyl-tARN-ligase native, lorsqu'elle est associée au tARN se trouve sous une forme non-agrégée [1]. Il serait intéressant de savoir si l'enzyme est alors dissociée de la fraction lipidique et si, *in vivo*, elle peut également exister dans des états d'agrégation différents correspondant à des phases différentes de son fonctionnement.

## Remerciements

Ce travail a bénéficié des subventions suivantes accordées à Mme Grunberg-Manago, Chef du Service de Biochimie: Centre National de la Recherche Scientifique (G.R.N° 18); Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Interactions moléculaires en Biologie; Convention 72.7.0388); Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité de la Seine); et d'une participation du Commissariat à l'Energie Atomique.

Nous remercions également le Docteur Jean-Pierre

Waller pour les discussion qui nous ont été très utiles dans l'élaboration de ce travail.

Nous remercions aussi Mr le Professeur Edgard Lederer qui a bien voulu nous accueillir à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, ainsi que Madame le Docteur Lenfant, pour son aide précieuse et ses conseils, en ce qui concerne la caractérisation des lipides.

### Bibliographie

- [1] Dimitrijevic, L. (1972) FEBS Letters 25, 170–174.
- [2] Hradeč, J. et Dušek, Z. (1968) Biochem. J. 110, 1–7.
- [3] Chlumeckà, V., Von Tigerstrom, M., D'Obrenan, P. et Smith, C. J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5481.
- [4] Berry, S. et Grunberg-Manago, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 217, 83–94.
- [5] Massoulié, J. et Rieger, F. (1969) Eur. J. Biochem. 11, 441–455.
- [6] Dimitrijevic, L. et Lenfant, M. (résultats non publiés).
- [7] Hradeč, J. et Dolejš, L. (1968) Biochem. J. 107, 129.
- [8] Lavelle, F., Michelson, A. M. et Dimitrijevic, L. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 350–357.
- [9] Rymo, L., Ludvik, L., Lagerkvist, U. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3888–3897.
- [10] Vennegoor, C. et Bloemendal, H. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 462.
- [11] Bandyopadhyay, A. K. et Deutscher, M. P. (1971) J. Mol. Biol. 60, 113.
- [12] Roberts, W. K. et Coleman, W. H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 206.
- [13] Henriksen, O. et Smulson, M. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1047.
- [14] Irvin, J. D. et Hardesty, B. (1972) Biochemistry 11, 1915.
- [15] Tscherne, J. S., Weinstein, I. B., Lanks, K. W., Gersten, N. B. et Cantor, C. R. (1973) Biochemistry 12, 3859.