

CHROM. 3470

UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE DE RECYCLAGE SUR SEPHADEX POUR L'ISOLEMENT DES HISTONES RICHES EN ARGININE*

GÉRARD BISERTE, MONIQUE BONTE, PIERRE SAUTIERE, ARLETTE MARTINAGE, YVES MOSCHETTO ET PAUL BOULANGER

Unité de Recherches No. 16 de l'I.N.S.E.R.M. sur la Biochimie des Protéines**, Lille 59 (France)
(Reçu le 19 février 1968)

SUMMARY

The use of recycling chromatography on Sephadex for the isolation of arginine-rich histones

Gel-filtration chromatography is a very convenient method for the fractionation of histones. To achieve their purification, the authors use recycling chromatography on Sephadex G 50. The amino acid composition of two "pure" histones has been determined. One of them, containing a high level of arginine and lysine, has been obtained from the fraction prepared by the selective method of JOHNS; isolation and purification proceed by means of chromatographic recycling with five cycles, in 0.02 N HCl.

En vue de déterminer la structure primaire de quelques histones caractéristiques du thymus de veau, nous avons été amenés à préciser les modalités d'application des méthodes de purification par chromatographie de gel-filtration. De nos observations, nous pouvons conclure que, pour obtenir des substances pures, il est indispensable de terminer la préparation par une chromatographie de recyclage sur Sephadex.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des histones

A partir des noyaux isolés du thymus de veau selon la technique de MIRSKY ET POLLISTER¹, les histones riches en arginine sont extraites par l'éthanol chlorhydrique et séparées en deux groupes f_{2a} et f₃, selon la méthode de JOHNS ET BUTLER². La méthode d'extraction des fractions f_{2(a)1} et f_{2(a)2} de JOHNS³, à partir des désoxyribonucléoprotéines du thymus, a également été utilisée.

Chromatographie de gel-filtration

La chromatographie descendante de gel-filtration est réalisée sur une colonne (92 × 2.6 cm) de Sephadex G 100 (forme perle) équilibrée soit dans une solution

* Dédié à M. le Professeur E. LEDERER à l'occasion de son 60ème anniversaire.

** Directeur: Professeur P. BOULANGER.

d'acide chlorhydrique 0.02 *N*, soit dans une solution d'acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M* (SAUTIERE, DAUTREVAUX ET BISERTE⁴). Le débit par le tube capillaire qui termine la colonne est de une goutte toutes les 10 sec. Les fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur automatique de fractions réglé au temps (fractions de 10 min).

Chromatographie de recyclage

Nous utilisons un appareil Recychrom (LKB). La colonne (Pharmacia) de dimensions 100 × 2.5 cm, est remplie de Sephadex G 50 (forme perle), et équilibrée soit en tampon acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M*, soit en acide chlorhydrique 0.02 *N* (chromatographie ascendante, débit moyen: 23 ml/heure; volume mort 138 ml; durée moyenne de l'opération: 48 h). La densité optique des éluats est enregistrée à 254 m μ par un absorptiomètre Uvicord, intégré dans le circuit chromatographique.

L'appareil est muni d'une valve sélective qui permet le passage des solutions soit en *circuit fermé* (colonne → analyseur → valve → pompe → colonne... etc.), soit en *circuit ouvert*.

Dans le cas du circuit ouvert, deux possibilités sont permises: soit aspiration de la solution à analyser ou du tampon d'éluion, soit exclusion du tampon ou des fractions séparées vers un collecteur automatique de fractions.

Au départ de l'expérience (appareil en circuit ouvert), on injecte 100 mg de la solution d'histones dans 4 ml de tampon. La valve est ensuite placée en circuit fermé. Au premier cycle, l'hétérogénéité de la fraction est observée avec attention. Au deuxième ou troisième cycle, le circuit est ouvert de façon à éliminer les fractions gênantes (pour les cas particuliers, voir les Fig. 3, 4, 8, 10). Après cinq (ou six) cycles, la séparation est généralement satisfaisante. A ce stade, les fractions purifiées sont recueillies sur un collecteur automatique de fractions. La densité optique est mesurée sur chaque tube à 278 m μ .

Electrophorèse en gel d'amidon

Les électrophorèses en gel d'amidon sont réalisées en tampon lactate de sodium 0.05 *M*-urée 4 *M* de pH 3.1 (BISERTE, SAUTIERE et coll.⁵). La migration est effectuée pendant 15 h sous le voltage de 2 V/cm. Pour la coloration du gel, on utilise une solution d'Amidoschwarz 10 B à 1 p. 100 dans le mélange éthanol-eau-acide acétique (5:5:1). Le pouvoir résolutif est très satisfaisant.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Nous utilisons la technique préconisée par MAURITZEN *et al.*⁶. La polymérisation du gel s'effectue en milieu urée. Le tampon est un mélange de β -alanine (13.2 g/l) et d'acide acétique (8 ml/l). Le pH de ce tampon est de 4.3, la force ionique de 0.06*.

Composition en acides aminés

Après hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique 5.6 *N* à 105° en tube scellé sous vide pendant 24 et 72 h, les acides aminés sont dosés à l'aide d'un auto-analyseur d'acides aminés Technicon.

* Nous remercions tout particulièrement Madame HAYEM et Madame VANDEWALLE qui ont effectué ces études électrophorétiques.

RÉSULTATS

Purification de la fraction f2a

Chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G 100. La colonne de Sephadex G 100 est équilibrée dans une solution d'acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M*. Les premières expériences ont été faites avec un dépôt de 100 mg d'histones dissous dans 5 ml d'urée 4 *M*. Des résultats très comparables peuvent être obtenus en augmentant nettement les quantités de départ (500 mg/5 ml d'urée 4 *M*). Dans ce cas, on observe toutefois un léger ralentissement du débit de la colonne au cours de l'éluion.

Lorsqu'on étudie les fractions f2a, la courbe d'éluion obtenue par lecture à 278 μ de la densité optique (DO) des éluats est constituée de 3 fractions (schéma C1 de la Fig. 1):

La fraction 1 correspond à des histones très polymérisées;

La fraction 2 est très hétérogène;

La fraction 3, nettement retardée, contient des histones de taille moléculaire plus petite.

L'étude comparative en électrophorèse en gel d'amidon des fractions de tête (3a), médianes (3b) et de queue (3c) démontre nettement leur hétérogénéité. Toutefois, elles contiennent principalement un système de deux bandes voisines très bien individualisé: la bande la plus lente est prédominante en 3a et la plus rapide prédominante en 3c. Il existe encore quelques bandes très lentes, déjà observées dans l'ensemble de la fraction (Schéma E de la Fig. 1). Les éluats correspondant à la fraction 3a sont rassemblés, dialysés pendant 4 jours, puis lyophilisés. On effectue la même opération sur les éluats correspondant à la fraction 3c.

Deuxième chromatographie sur Sephadex G 100. Les fractions 3a et 3c sont soumises à une deuxième chromatographie sur Sephadex G 100 (Schémas C2 et C3 de la Fig. 1), suivant les mêmes modalités opératoires que précédemment. Dans les deux cas, la courbe d'éluion est constituée par un pic très étalé et asymétrique.

Dans le cas de la fraction 3a, seules les fractions correspondant à la partie nettement ascendante du pic sont rassemblées (fraction 3a1 de la Fig. 1). L'étude en électrophorèse en gel d'amidon montre un enrichissement en la fraction la plus lente (schéma E2 de la Fig. 1 et Fig. 2) par rapport au diagramme précédent.

Dans le cas de la fraction 3c, seules les fractions correspondant à la partie descendante du pic sont rassemblées (fraction 3c1 de la Fig. 1). L'étude en électrophorèse en gel d'amidon montre également un enrichissement de la fraction la plus rapide (Schéma E3 de la Fig. 1) par rapport au diagramme précédent.

Chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50. Pour purifier définitivement les deux histones principales de ce groupe, nous avons réalisé une chromatographie de recyclage en milieu acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M*. Le fractionnement porte sur 100 mg d'histones et 5 (à 6) cycles sont effectués avec des phases d'exclusion qui sont indiquées sur les Figs. 3 et 4.

Lorsqu'on opère sur la fraction 3a1, on peut exclure à la fin des cycles deux sous-fractions R_I et R_{II} qui sont nettement individualisées (Fig. 3). La sous-fraction R_{II} est homogène en électrophorèse en gel d'amidon en tampon lactate-urée de pH 3.1 (Fig. 2) et en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig. 5). Par contre, la fraction

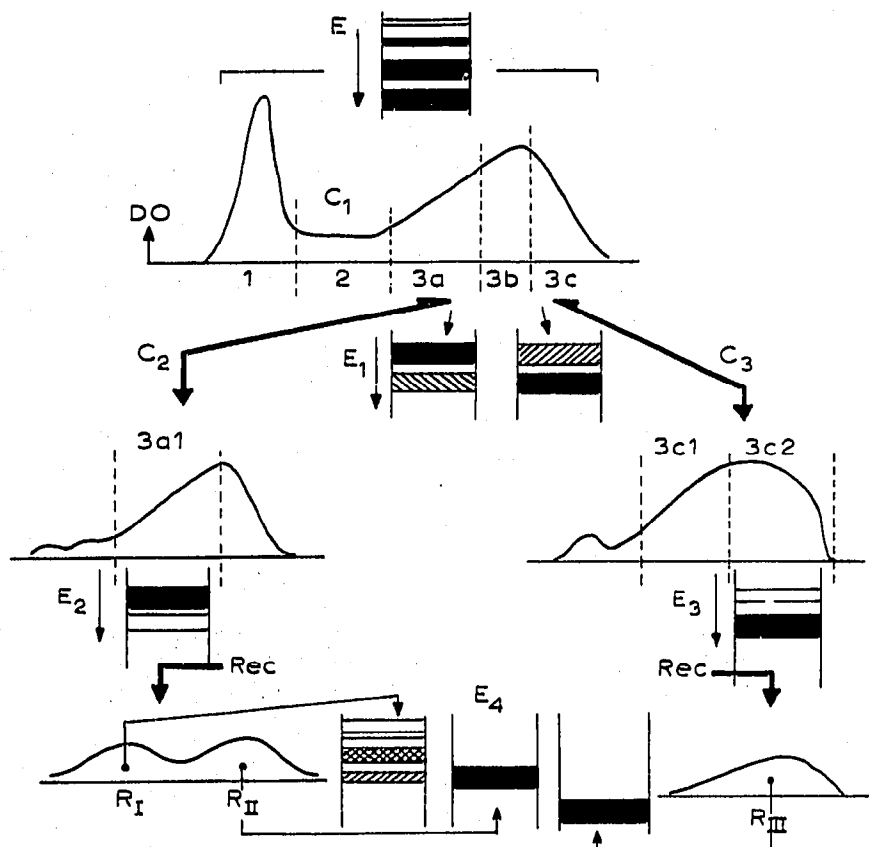


Fig. 1. C₁ = Chromatographie sur Sephadex G 100. Colonne de 92 × 2.6 cm; élution par HCl 0.02 N-urée 4 M. Dépôt de 500 mg dans 5 ml urée 4 M; débit: 1 goutte/8 sec. Fractions recueillies pendant 10 min. Les traits pointillés délimitent les zones d'élution qui ont été rassemblées (1, 2, 3a, 3b, 3c). E = Electrophorèse en gel d'amidon de la fraction de départ (f2a); E₁ = schématisation du diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon montrant la répartition du système majeur de deux bandes après la première chromatographie sur Sephadex G 100; C₂ = deuxième chromatographie sur Sephadex G 100 de la fraction 3a; C₃ = deuxième chromatographie sur Sephadex G 100 de la fraction 3c; E₂ = schématisation du diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon après la seconde chromatographie sur Sephadex G 100 (fraction 3a1); E₃ = schématisation du diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon après la seconde chromatographie sur Sephadex G 100 (fraction 3c2); Rec = chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50; R_I, R_{II} et R_{III} = sous-fractions élues après la chromatographie de recyclage; E₄ = schématisation du diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon des sous-fractions R_I, R_{II} et R_{III}.

R_I est hétérogène et contient des composants plus lents en électrophorèse en gel d'amidon (voir Fig. 1).

Avec la fraction 3c2, on peut exclure au cinquième cycle une sous-fraction R_{III} (Fig. 4) qui est électrophorétiquement homogène en électrophorèse en gel d'amidon (Fig. 6) et en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig. 7).

Définition chimique des histones isolées

Afin de définir les histones isolées à l'état pur, nous avons déterminé la composition en acides aminés (Tableau I).

La fraction R_{III} est très riche en arginine, en glycofolle et en lysine: elle est très comparable à la fraction 9 élue dans le pic 5 des diagrammes d'élution obtenus par chromatographie sur de très grandes colonnes de Sephadex G 100 par MAURITZEN *et al.*⁶. Elle correspond aussi à la fraction β₇ et f2(a)1 décrite antérieurement⁷⁻⁹: elle

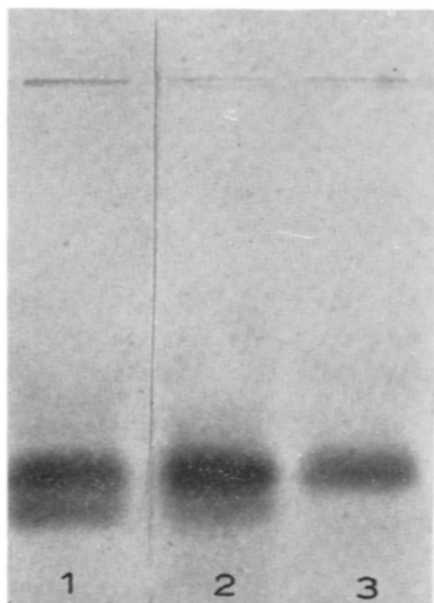


Fig. 2. Electrophorèse en gel d'amidon (tampon lactate-urée de pH 3.1). 1 = Fraction f2a brute préparée suivant JOHNS ET BUTLER²; 2 = fraction 3a1 obtenue après deux chromatographies sur Sephadex G 100; 3 = sous-fraction R_{II} obtenue après chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50.

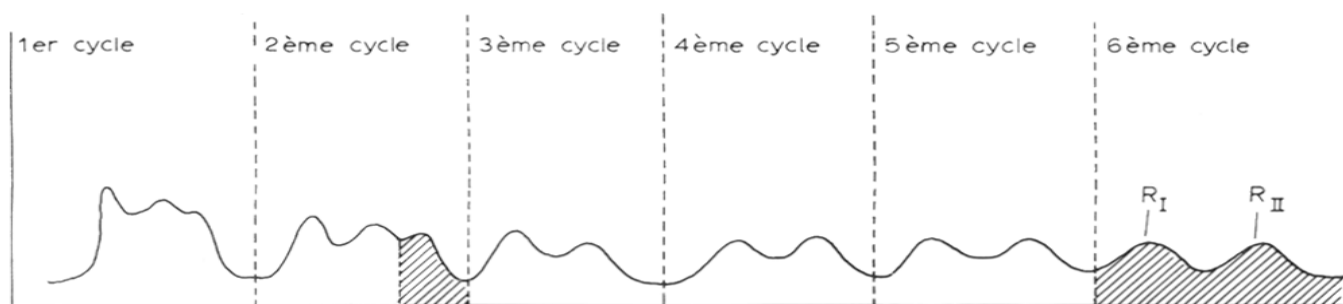


Fig. 3. Chromatographie de recyclage de la fraction 3a1. 6 cycles ont été effectués en milieu acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M*. Les zones hachurées représentent les zones soumises à l'exclusion. Les sous-fractions R_I et R_{II} sont recueillies (voir également Fig. 1).

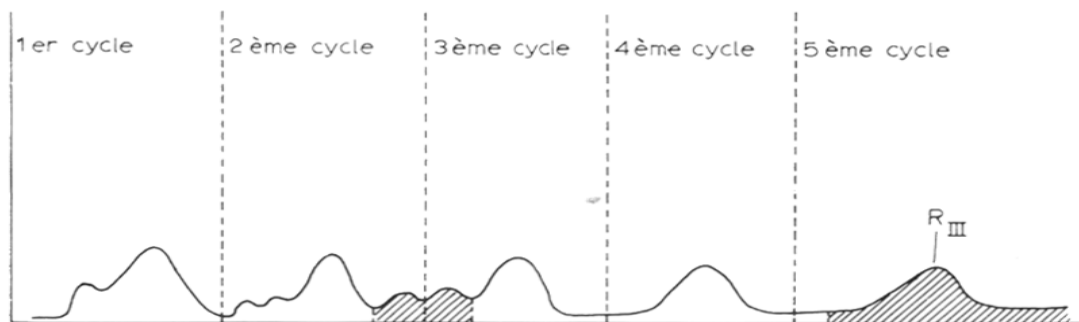


Fig. 4. Chromatographie de recyclage de la fraction 3c2 (voir Fig. 1). 5 cycles ont été effectués en milieu acide chlorhydrique 0.02 *N*-urée 4 *M*. Les zones hachurées représentent les zones soumises à l'exclusion. La fraction R_{III} est recueillie sur un collecteur de fractions.

est très voisine de l'histone f2(a)1 extraite des désoxyribonucléoprotéines par JOHNS (méthode 2 ou méthode 3)³. Pour simplifier la nomenclature, la terminologie de MAURITZEN *et al.*⁶ peut être adoptée: *histone riche en glycofolle et riche en arginine*.

La composition de la fraction R_{II} se rapproche de celles indiquées sous les numéros 6, 7 et 8, et qui proviennent du pic 4 du diagramme d'élution de MAURITZEN *et al.*⁶. Elle correspond à des histones décrites antérieurement sous le nom de β_0 et f2(a)2⁷⁻⁹; elle est voisine de l'histone f2(a)2 obtenue par les méthodes 2 et 3 de JOHNS³: toutefois, l'histone isolée par JOHNS est plus riche en arginine et en glycofolle et moins riche en lysine que la fraction R_{II} et que les fractions 6 et 7 du pic 5 de MAURITZEN *et al.*⁶.

De toute façon, cette histone (R_{II}) contient un pourcentage élevé de lysine et d'arginine et sa teneur en glycofolle est nettement plus faible. Le taux de ϵ -N-méthyl-lysine de la fraction R_{II} est plus faible que celui de la fraction R_{III}: ces résultats sont également en accord avec ceux de MAURITZEN *et al.*⁶.

Purification de la fraction f2(a)2 de Johns

JOHNS³ a décrit récemment une méthode d'extraction de la fraction f2a à partir des désoxyribonucléoprotéines en utilisant un mélange d'éthanol et de chlorhydrate

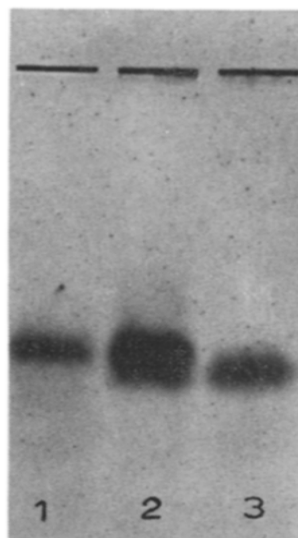
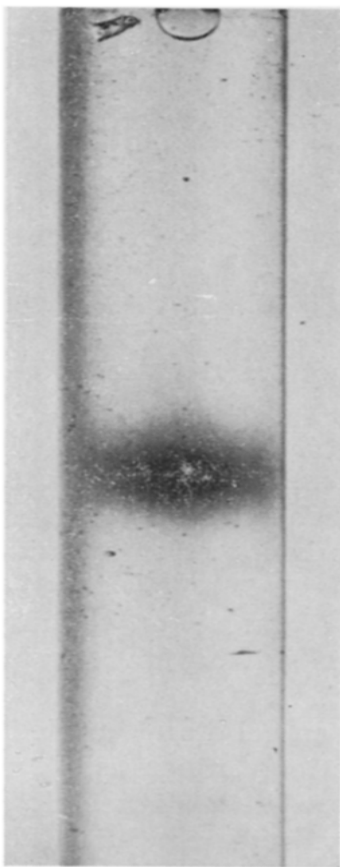


Fig. 5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la sous-fraction R_{II} provenant de la fraction 3a1 (voir Fig. 1). Cette sous-fraction est riche en arginine et en lysine.

Fig. 6. Electrophorèse en gel d'amidon (tampon lactate-urée de pH 3.1). 1 = Sous-fraction R_{II} (voir également Fig. 2); 2 = mélange artificiellement réalisé des sous-fractions R_{II} + R_{III}; 3 = sous-fraction R_{III}.

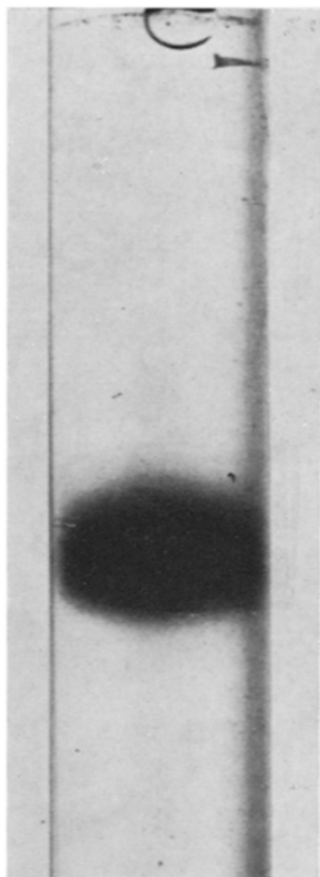


Fig. 7. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la sous-fraction R_{III} provenant de la fraction 3c2 (voir Fig. 1). Cette sous-fraction est riche en glycofolle, en arginine et en lysine.

de guanidine. La fraction f2a peut être séparée en deux sous-fractions f2(a)₁ et f2(a)₂ par précipitation acétonique en milieu acide (méthode 2) ou à pH 7 (méthode 3). Cette technique est commode et rapide. Les électrophorèses en gel de polyacrylamide effectuées par cet auteur à pH 2.4 (acide acétique 0.01 N) montrent que les préparations sont satisfaisantes. On peut assimiler f2(a)₁ à l'histone riche en glycofolle, en lysine et en arginine, et l'histone f2(a)₂ à une fraction riche en lysine et en arginine et sans prédominance du glycofolle.

Les contrôles électrophorétiques (électrophorèse en gel d'amidon en tampon lactate-urée à pH 3.1 et électrophorèse en gel de polyacrylamide suivant MAURITZEN *et al.*⁶ nous ont permis de démontrer l'hétérogénéité des fractions f2(a)₁ et f2(a)₂ obtenues par la méthode 3 (pH 7) de JOHNS. En électrophorèse en gel d'amidon de la fraction f2(a)₂, la fraction majeure est flanquée de deux fractions mineures, l'une plus lente, l'autre plus rapide correspondant à des traces de f2(a)₁ ou histone riche en glycofolle et en arginine. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide conduit à des résultats identiques, le nombre de fractions lentes étant même nettement plus grand (Schéma A de la Fig. 9).

Cette hétérogénéité peut d'ailleurs être également prouvée par l'étude des sous-fractions séparées après chromatographie de recyclage (Schémas 1 et 2 de la Fig. 11).

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES HISTONES ISOLÉES^a

	Fraction R _{II}		Fraction R _{III}	
	Résidus pour 100 acides aminés	Valeurs arrondies	Résidus pour 100 acides aminés	Valeurs arrondies
Asp	5.68	5.7	5.29	5.3
Thr	5.37	5.4	6.66	6.7
Ser	4.76	4.8	2.91	2.9
Glu	10.68	10.7	6.63	6.6
Pro	4.57	4.6	1.56	1.6
Gly	8.45	8.5	14.98	15.0
Ala	12.92	12.9	7.82	7.8
Cys	0	0	0	0
Val	5.82	5.8	7.39	7.4
Met	0.76	0.8	1.07	1.1
Ile	4.10	4.1	5.65	5.6
Leu	10.13	10.1	7.88	7.9
Tyr	2.24	2.2	3.03	3.0
Phe	1.60	1.6	1.76	1.8
Lys	10.72	10.7 ^c	10.64	10.6
His	2.38	2.4	2.07	2.1
Arg	9.22	9.2	13.26	13.3
ϵ -N Lys ^b	(0.59) (?)		(1.42) (?)	

^a Les valeurs ont été corrigées pour tenir compte de la destruction au cours de l'hydrolyse.

^b ϵ -N Lys = ϵ -N-méthyl-lysine; pour le calcul, le coefficient d'intégration de la lysine a été adopté: le résultat est donc donné sous réserve.

^c Les nombres soulignés correspondent aux valeurs des acides aminés caractéristiques.

Nous avons donc essayé de purifier davantage les préparations. Pour obtenir des fractions pures à partir de la fraction f2(a)2, qui est la moins complexe, nous avons procédé à une chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50.

Chromatographie de recyclage en milieu acide chlorhydrique 0.02 N et urée 4 M (Fig. 8). Les fractions isolées par les méthodes chimiques sont très soigneusement dialysées contre de l'eau distillée. L'expérience est réalisée avec 100 mg d'histones. Dès le deuxième cycle, l'hétérogénéité est bien précisée et il est possible d'exclure au troisième cycle les sous-fractions les plus lourdes. Au cinquième cycle, les fractions R'_I et R'_{II} sont recueillies; toutefois, après analyse de la courbe d'éluion à 278 m μ , la fraction R'_{II} est subdivisée en deux sous-fractions a et b (voir Fig. 8).

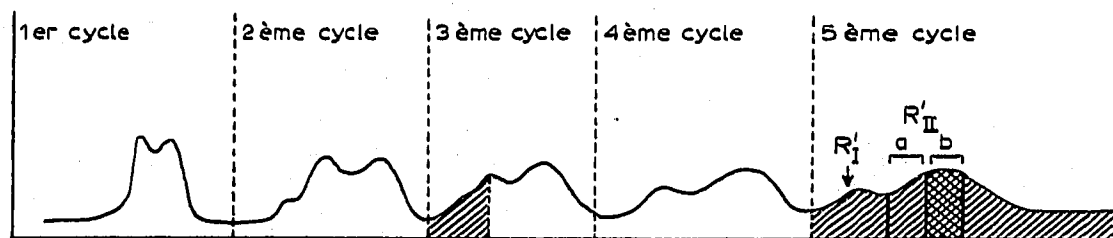


Fig. 8. Chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50 de la fraction f2(a)2 préparée suivant la méthode de JOHNS. Elution en milieu acide chlorhydrique 0.02 N-urée 4 M. Les zones hachurées représentent les zones soumises à l'exclusion. Les sous-fractions R'_I, R'_{IIa}, R'_{IIb} sont recueillies séparément au moyen d'un collecteur de fractions.

En électrophorèse en gel d'amidon, la fraction R'_{II} a le même comportement que la fraction R_{II} obtenue précédemment (voir Fig. 2 et 6). En électrophorèse en gel de polyacrylamide, la fraction R'_{II} apparaît très purifiée; il subsiste de faibles quantités de fractions lentes (Schéma D de la Fig. 9) lorsqu'on surcharge l'électrophorégramme.

Chromatographie de recyclage en milieu acide chlorhydrique 0.02 N. La même fraction f2(a)2 est soumise à une chromatographie de recyclage en milieu acide chlorhydrique 0.02 N, sans urée. L'expérience est réalisée avec 100 mg d'histones soigneusement dialysées. L'hétérogénéité apparaît très nettement dès le deuxième cycle: l'existence d'une fraction lourde est plus évidente que dans l'expérience précédente; l'absence d'urée peut certainement favoriser des réassociations. De plus, une hétérogénéité se manifeste nettement sur la partie descendante du deuxième pic. L'exclusion des fractions est donc conduite différemment (Fig. 10): au troisième cycle, ouverture du circuit pour éliminer la fraction lourde et le début du premier pic, fermeture pour récupérer le reste du premier pic et l'ensemble du second, ouverture pour éliminer la dernière sous-fraction, fermeture pour effectuer un quatrième cycle. Au cinquième cycle, le résultat obtenu est comparable à celui de l'essai précédent. La fraction R'_I est recueillie en totalité. Après analyse de la courbe d'éluion construite

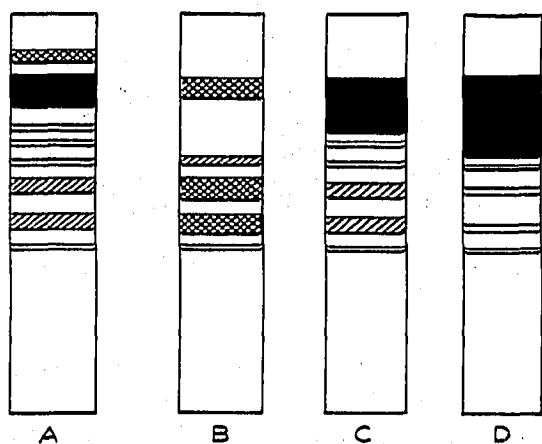


Fig. 9. Electrophorèse en gel de polyacrylamide selon MAURITZEN *et al.*⁶. A = Fraction f2(a)2 totale obtenue par la méthode 3 de JOHNS³; B = fraction R'_I obtenue après chromatographie de recyclage en milieu acide chlorhydrique-urée (voir Fig. 8); C = fraction R'_{IIa} ; D = fraction R'_{IIb} .

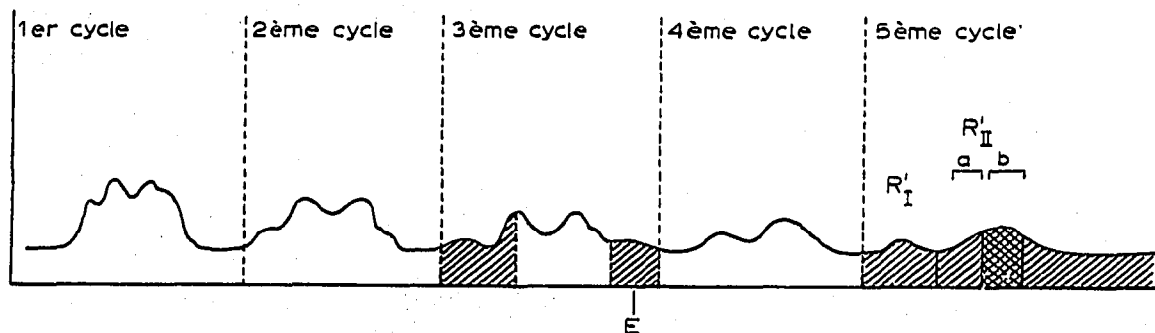


Fig. 10. Chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50 des fractions f2(a)2 en milieu acide chlorhydrique 0.02 N. La zone (E) est exclue au 3ème cycle (voir son étude électrophorétique sur la Fig. 11 (Schéma 1)). Les fractions R'_I et R'_{II} sont recueillies. La fraction R'_{II} correspond à l'histone riche en arginine et en lysine. Elle est subdivisée en R'_{IIa} et R'_{IIb} .

à 278 m μ , la fraction R'_{II} est séparée en deux sous-fractions R'_{IIa} et R'_{IIb}. Les préparations sont étudiées en électrophorèse en gel d'amidon. Les fractions R'_I sont très hétérogènes et correspondent essentiellement à des fractions lentes (Schéma 2 de la Fig. 11). Seules les fractions R'_{IIb} sont homogènes et correspondent à la fraction R_{II} (Fig. 11) qui est riche en arginine et en lysine (Schéma 3 de la Fig. 2).

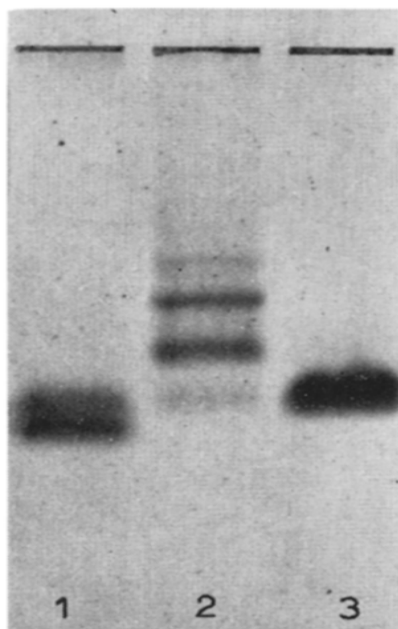


Fig. 11. Electrophorèse en gel d'amidon des histones f2(a)2 de JOHNS³. Chromatographie de recyclage en milieu chlorhydrique 0.02 N. (1) Electrophorèse de la fraction exclue au cours du recyclage (fraction E de la Fig. 10). Cette fraction est donc un mélange d'histone riche en glycofolle et en arginine (la plus rapide) et d'histone riche en arginine et en lysine (la plus lente). (2) Electrophorèse de la fraction R'_I (diagramme comparable à celui de la fraction R_I de la Fig. 1). (3) Electrophorèse de la fraction R'_{II} (qui est comparable à la fraction R_{II}) (Schéma 3 de la Fig. 2).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les essais de chromatographie de gel-filtration sans et avec recyclage nous permettent les conclusions suivantes.

A partir de la fraction des histones riche en arginine, le couplage de deux chromatographies sur Sephadex G 100 et d'une chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50 en milieu acide chlorhydrique 0.02 N et urée 4 M permet d'isoler à l'état pur une histone riche en glycofolle et en arginine et une histone dont les teneurs élevées en arginine et en lysine sont sensiblement équivalentes. Les résultats sont comparables à ceux donnés par la chromatographie d'exclusion de MAURITZEN *et al*⁶ qui met en oeuvre de très grandes colonnes (305 × 7.6 cm).

A partir de la fraction f2(a)2 préparée suivant la méthode 3 de JOHNS³ directement à partir du thymus et dialysée, une simple chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50 en milieu chlorhydrique 0.02 N sans urée permet d'isoler à l'état pur l'histone dont les teneurs élevées en arginine et en lysine sont sensiblement équivalentes.

L'addition d'une chromatographie de recyclage à la méthode originale de JOHNS nous paraît indispensable, car il est nécessaire d'éliminer des fractions mineures

qui n'ont pas le même comportement électrophorétique, ni la même composition en acides aminés. Pour obtenir l'histone riche en arginine et en lysine dans un état de pureté très satisfaisant, il est en outre recommandé de recueillir sélectivement la partie médiane du pic d'élu-tion.

Ce mode opératoire est rapide et commode, et l'utilisation d'un système d'élu-tion sans urée facilite considérablement les dialyses.

C'est ce procédé que nous avons retenu pour les études de structure que nous avons entreprises.

RÉSUMÉ

La chromatographie de gel-filtration représente une méthode très utile pour le fractionnement des histones. La purification finale de deux histones bien individualisées est considérablement facilitée par la chromatographie de recyclage sur Sephadex G 50. La composition en acides aminés de ces deux histones a été déterminée. L'isolement de l'une d'entre elles, dont la teneur en arginine et en lysine est élevée, est réalisé à partir de la fraction obtenue par la méthode sélective de JOHNS: il met en oeuvre une chromatographie de recyclage comportant cinq cycles en milieu acide chlorhydrique 0.02 N.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. E. MIRSKY ET A. W. POLLISTER, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1946) 117.
- 2 E. W. JOHNS ET J. A. V. BUTLER, *Biochem. J.*, 82 (1962) 15.
- 3 E. W. JOHNS, *Biochem. J.*, 105 (1967) 611.
- 4 P. SAUTIERE, M. DAUTREVAUX ET G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 353.
- 5 G. BISERTE, P. SAUTIERE, C. HOUARD ET M. DEVYS, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156 (1962) 1823.
- 6 C. M. MAURITZEN, W. C. STARBUCK, I. S. SAROJA, C. W. TAYLOR ET H. BUSCH, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 2240.
- 7 J. T. BELLAIR ET C. M. MAURITZEN, *Australian J. Biol. Sci.*, 18 (1965) 160.
- 8 D. M. P. PHILLIPS ET E. W. JOHNS, *Biochem. J.*, 94 (1965) 127.
- 9 L. S. HNILICA ET L. G. BESS, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 421.