

DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN
AMINO-ACIDES ET DU POIDS MOLECULAIRE DE L'ALPHA
AMYLASE PANCREATIQUE DU MOUTON DES DOUKKALA

M. ETTALIBI

Département de Biochimie générale

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, RABAT.

L' α amylase ou α 1,4 glucane 4-Glucanohydrolase (EC.3.2.1.1.) est présente dans la plupart des organismes vivants. Chez les animaux, l'enzyme est synthétisée et sécrétée par les glandes salivaires et le pancréas exocrine, celui-ci étant le principal fournisseur.

Sur le plan physiologique, le taux cellulaire de l' α amylase dans cette dernière glande varie selon :

- la composition du régime pour une espèce donnée (1,2,3,4,5),
- la présence ou l'absence de stimulants ou d'inhibiteurs endogènes ou exogènes (6,7,8,9,10) et ou selon l'espèce à laquelle on s'adresse (11,12,13,14). L'amylase pancréatique, très abondante chez les non-ruminants comme le rat et le porc, est par contre en très faible quantité chez les ruminants y compris le mouton (15).

Cette faible teneur du pancréas de mouton en amylase suggère qu'une partie de l'énorme quantité de polysaccharides ingérées serait digérée et absorbée dans l'intestin grêle. La sécrétion enzymatique intestinale serait, dans ce cas, complémentaire de la sécrétion pancréatique (16,17). Toutefois, les capacités de l'intestin étant limitées, l'amidon non hydrolysé subira une fermentation microbienne dans le caecum (18).

La question que nous nous sommes posés est de savoir en quoi l'arsenal digestif des polygastriques diffère de celui des monogastriques (19). Pour cerner une partie du problème, nous nous sommes proposés d'étudier la composition en amino-acides et le poids moléculaire de l'amylase de mouton.

1. MATERIEL ET METHODES

L' amylase pancréatique de moutons (originaires des Doukkalas) est obtenue à l'état pur selon la méthode de ETTALIBI et AL (19); l'homogénéité de l'enzyme est vérifiée entre autres par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par électrofo-calisation (16).

1.1. Dosage des amino-acides

La solution d'amylase est hydrolysée en milieu acide (HCl 5,7 N tétradistillé) à 110°C pendant 24 et 72 heures. L'hydrolysate est analysé selon la technique de SPACKMAN et AL (20). La Thréonine et la sérine sont déterminées par extrapolation au temps zéro d'hydrolyse selon la méthode de WILCOX et AL (21). Pour la valine et l'Isoleucine, les valeurs adoptées sont celles obtenues à 72 heures d'hydrolyse. La Méthionine et la Cysteine sont déterminées sous forme respectivement de Méthionine-sulfone et d'acide cystéique après oxydation performique selon la méthode de HIRS (22). L'excès d'acide performique est détruit après ajout de quelques gouttes d'acide bromhydrique 48 % suivant la technique de MOORE (23). Toutefois la durée d'hydrolyse est ramenée à 20heures.

Le Tryptophane, en présence de para-Diméthyl-Amino-Benzaldehyde, est dosé suivant la méthode de SPIES et AL (16,24,25).

1.2. Détermination du poids moléculaire

1.2.1. D'après la composition en acides aminés

Trois méthodes sont utilisées :

- la méthode de DELAGE (26) consiste à calculer la fonction d'écart Y en fonction du poids moléculaire. Y passe par un minimum correspondant à la valeur exacte du poids moléculaire de la protéine.

- la méthode classique de BRAND et AL (27)

- la 3ème méthode consiste à calculer la somme des poids moléculaires partiels (poids moléculaire d'un acide-amino) (i) que multiplie le nombre Ni de ce résidu i dans la protéine). (16)

1.2.2. Par électrophorèse sur gel de Polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (S.D.S.)

La technique de SHAPIRO et AL (28), rapide et sensible, requiert peu de matériel (5 à 30 microgrammes). Les meilleurs résultats sont obtenus avec des gels de 10 % d'Acrylamide (29). Ces gels contiennent 0,2 % de Persulfate d'Ammonium et 0,26 % de N,N' Méthylène bisacrylamide. Les échantillons à analyser sont dilués dans du tampon Phosphate 100 mM, pH 7,0 contenant 2% de SDS et 2 % de 2-Mercaptoéthanol V/V Urée 8 M (16). Ils sont ensuite carboxyméthylés suivant la méthode de CRESFIELD et AL (30). Des aliquotes de 10 à 20 microgrammes sont déposées sur des gels déjà préparés puis recouverts de 20 microlitres de Saccharose à 20 %. La migration dure 4h 30mn sous une intensité de 9 mA par gel. Après électrophorèse, le bleu de bromophénol, ayant servi à visualiser le front de migration, est repéré avant fixation par l'acide sulfosalicylique à 20 % pendant 18 heures. Les bandes protéiques sont révélées par immersion des gels - pendant 4 à 5 heures - dans une solution de bleu de coomassie 0,025 % dans l'acide acétique 7 % fraîchement préparé. Les mobilités électrophorétiques relatives des protéines de référence et de l'alpha amylase pancréatique de mouton réduites et carboxyméthylées (RCM-Protéines) sont mesurées.

1.2.3. par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20 %

La méthode requiert 20 à 100 microgrammes de protéines. Les échantillons d'amylase de mouton et de trois protéines de référence (serum albumine, ovalbumine et Trypsine), déposés au préalable dans des tubes contenant un gradient de saccharose 5-20 %, sont centrifugés à 56 000 tours/minutes pendant 18 heures à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman Spinco L2-65 réfrigérée à 4°C.

Après ultracentrifugation, les tubes en plastique du type SW-56 sont percés par le fond et la solution, qu'ils contiennent, est soigneusement poussée - à l'aide d'une seringue automatique remplie de saccharose 40 % coloré par une goutte de bleu de Méthylène à travers la cellule photoélectrique absorbant à 280 nm d'un densitomètre enregistreur du type ISCO.

Les spectres sont homogènes ; les pics sont parfaitement symétriques. Le maximum d'absorption correspond dans ce cas à un volume d'élution. De ce fait on peut déduire la migration relative R_f .

$$R_f = \frac{\text{Volume d'élution correspondant au pic d'absorption maximale}}{\text{Volume total de la solution centrifugée}}$$

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2. 1. Dosage des acides aminés autres que le Tryptophane

Les hydrolysats sont préparés en double pour des temps d'hydrolyse de 24 et 72 heures. Deux déterminations sont effectuées sur un échantillon oxydé par l'acide performique selon la technique de HIRS (22) d'une part et la technique de MODRE (23) d'autre part.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1.

Les résultats de l'analyse d'acides aminés sont traités par la méthode de calcul mise au point par DELLAGE (25) pour déterminer la composition en acides aminés la plus cohérente.

Soit x (inconnu) le nombre de micromoles de protéine analysée et x_i le nombre de micromoles de chaque acide aminé (i)

$$x_i = N_i \cdot x$$

où N_i est le nombre de résidus d'acides aminés d'espèce (i) dans une mole de protéine. On recherche x , plus grand commun diviseur des x_i , on en déduit les N_i et de là, le poids moléculaire.

Si l'analyse est idéale, la relation :

$$N_i = x_i/x$$

n'est pas vérifiée. On admet que, pour la valeur réelle de x , la variable aléatoire $n_i = x_i/x$ se distribue autour de N_i , nombre entier, le plus proche. On calcule alors la fonction d'écart :

$$Y = \sum_i \left(\frac{n_i}{N_i} - 1 \right)^2$$

Si l'on fixe arbitrairement x et que l'on donne à N_i la valeur la plus proche de $n_i = x_i/x$, la fonction Y mesure l'écart entre la composition obtenue et la composition entière la plus proche, la bonne valeur de x est celle qui rend Y minimum.

D'autre part, x est relié au poids moléculaire P . Connaissant le poids p de l'échantillon,

$$P = \sum_i x_i \cdot P_i$$

où P_i est le poids moléculaire d'un acide aminé (i), le poids moléculaire associé à x est donc $P = p/x$

Dans une calculatrice à programmes, on introduit les x_i et l'intervalle de variation de x qui correspond aux valeurs extrêmes attendues pour P . Dans notre cas, les valeurs prises sont 48.500 et 60.000. On introduit également le pas de variation. Le programme de calcul est actuellement bien établi (31). Pour chaque valeur de x , la machine calcule les rapports $n_i = x_i/x$, recherche l'entier N_i le plus proche, forme Y , change la valeur de x et le calcul se reproduit par un procédé itératif.

L'intérêt de la méthode est qu'on peut écarter une valeur dont on n'est pas sûr. Dans notre cas, la valeur du Tryptophane dosé par une autre méthode est écartée.

Sans machine, la détermination de chaque acide aminé est effectuée en postulant la présence de 3 résidus de Méthionine comme base de calcul. Il s'agit là du nombre minimum de résidus de Méthionine compatible avec le poids moléculaire de l'amylase estimé à 52.000 daltons (Tryptophane non compris)

Résidus	Nombre de résidus par mole			Composition de l'amylase de porc (33)	Différence
	amylase de mouton				
	calculé (a)	calculé (b)	intégré		
Thr (c)	24,03	24,06	24	23	1
Ser (c)	30,12	30,20	30	32	2
Glx	42,87	42,91	43	38	5
Pro	22,71	22,75	23	21	2
Gly	44,78	44,84	45	52	7
Ala	28,70	28,78	29	30	1
Val (d)	33,49	33,54	33	37	4
1/2 cys (e)	13,97	13,98	14	10	4
Asx	73,65	73,72	74	64	10
Met (e)	3,00	2,98	3	8	5
Ile (d)	23,16	23,20	23	21	2
Leu	25,07	25,13	25	23	2
Tyr	12,03	12,05	12	18	6
Phe	23,32	23,35	23	23	0
Lys	24,66	24,72	25	20	5
His	11,47	11,50	11	9	2
Arg	28,09	28,12	28	27	1
Trp (f)	16,88	16,88	17	16	1
Total			482	475	60
Résidus polaires			1,71	1,53	
Résidus apolaires					

Tableau 1. Composition en amino-acides des amylases pancréatiques de mouton et de porc.

(a) calculé avec base Met = 3

(b) calculé selon la méthode de DELAGE (26)

(c) Ser et Thr sont déterminées par extrapolation au temps zéro

(d) Val et Ile sont déterminées sur des hydrolysats de 72 heures

(e) Cys et Met sont dosés sous forme d'acide cystéique et de Méthionine-sulfone

(f) Trp est dosé selon la méthode de SPIES et AL (24,25).

Le choix de la Méthionine qui est l'acide aminé le moins représenté dans l'amylase pancréatique de mouton est correct car le nombre entier pris 3 est le plus proche de la valeur vraie 2,989. L'Histidine, prise comme base de calcul dans le cas de l'amylase pancréatique de porc (32), ne peut être prise dans le cas de l'enzyme de mouton à moins de prendre un nombre fractionnaire très voisin de 11,5.

On peut même se passer de cette base de calcul et chercher le poids minimum correspondant à chaque acide aminé. Connaissant le poids moléculaire de l'enzyme, nous pouvons calculer assez facilement le nombre de résidus avec autant de précision que précédemment.

2.2. Dosage du Tryptophane

Le protocole K de la méthode de SPIES et Al (25) est retenu mais le temps de réaction est porté à 14 heures (16). Une expérience témoin est réalisée sur l'amylase II du pancréas de porc et l'amylase pancréatique de rat.

Nous trouvons pour ces deux enzymes 5,44 % et 3,30 % respectivement contre 5,30 % et 3,10 % trouvés précédemment par COZZONE et Al (33) et VANDERMEERS et Al (34).

Dans le cas de l'amylase pancréatique de mouton, la valeur trouvée est de 5,76 % en poids de tryptophane. Le calcul du nombre de résidus de Tryptophane nous amène à poser les équations suivantes :

Soient A les poids moléculaire de l'enzyme,
a le poids moléculaire minimum de l'amylase,
52.000 le poids moléculaire de la protéine sans le tryptophane,
b le poids moléculaire du Tryptophane,
et x le nombre de résidus de tryptophane.

Nous pouvons écrire :

$$\begin{aligned} A &= 52.000 + b.x & (1) \\ A &= a.x & (2) \\ & b.x & (3) \\ a.x &= \frac{\quad}{\quad} \\ & \text{g de résidus pour} \\ & \text{100 g de protéine} \end{aligned}$$

Connaissant les grammes de résidus pour 100 grammes de protéine, l'équation (3) s'écrit alors : $a.x = b.x / 0,0576$.
L'équation (1) devient donc : $52.000 = 3267,36.x - 188,20.x$
d'où $52.000 = 3079,16.x$
donc $x = 16,88$
Le nombre de résidus de Tryptophane par mole d'enzyme est très proche de 17.

2.3. Etude de la composition totale en amino-acides

La composition de l'amylase pancréatique de mouton se caractérise, comme le plupart des autres amylases, par un haut pourcentage en acides aminés aromatiques (environ 10 % en poids de Tryptophane et de Tyrosine contre 11% environ dans l'amylase pancréatique de porc).

La teneur élevée en acides aminés acides (26 % en poids d'Aspartate + Asparagine (Asx) et Glutamate + Glutamine (Glx) laisse prévoir pour l'amylase pancréatique de mouton un caractère très acide voire même nettement plus acide que celui des amylases I (23 à 24 %) et II (22 à 23 à 24 %) du pancréas de porc (32) et également plus acide que celui de l'amylase d'*Aspergillus oryzae* (22 %) (35) de pI, 3,8 (36). Ceci semble expliquer pourquoi l'amylase de mouton a un point isoélectrique de l'ordre de 3,2 (16,19).

Les acides aminés les moins représentés sont la Méthionine et l'Histidine. Cette pauvreté en Méthionine et Histidine semble être une caractéristique de la plupart des α amylases. On trouve en poids de Méthionine + Histidine

- 4,2 % dans l'amylase pancréatique de porc (33)
- 4,2 % dans l'enzyme du pancréas de lapin (37)
- 5,5 % dans l'amylase pancréatique de souris (38)
- 5,6 % dans l'enzyme du pancréas de rat (39)
- 4,1 % dans l'amylase de *Aspergillus oryzae* (35)
- 4,3 % dans l'enzyme de *Bacillus stearothermophilus* (40).

Dans notre travail sur l'amylase pancréatique de mouton, nous trouvons une valeur de 3,6 % inférieure à celle observée pour toutes les autres amylases. Ceci est dû à la pauvreté en Méthionine : elle ne contient que 3 Méthionines contre 8 dans l'amylase pancréatique de porc. De plus, la teneur élevée en Tyrosine, Aspartate + Asparagine, Glutamate + Glutamine et acides aminés hydroxylés (9,3% en poids de Sérine et Thréonine suggère que la composition en acides aminés de l'amylase pancréatique de mouton est compatible avec la formation de nombreuses liaisons intramoléculaires du type Hydrogène voire même du type ionique ou encore du type covalent avec la partie glucidique (19).

Quant à la proportion relative des résidus polaires et apolaires, les acides aminés polaires (Asx, Glx, Thr, Lys, et Arg) semblent prédominer les résidus apolaires (Val, Leu, Ile, Met, Pro et Phe). Le rapport des résidus polaires aux résidus apolaires est de 1,71 contre 1,53 pour l'amylase de porc (33) Selon la classification de HATCH (41), l'amylase pancréatique de mouton se situe entre les protéines à structures hélicoïdales et les protéines, à haut degré d'asymétrie. Toutefois elle se rapproche davantage de ces dernières sans sortir de la gamme jusque là trouvée qui va de 1,44 pour l'amylase pancréatique de lapin jusqu'à 1,81 pour l'enzyme de *Bacillus subtilis* type liquéfiant.

Enfin le tableau 1. montre qu'il existe une différence de 60 aminoacides entre l'amylase de mouton et l'enzyme de porc.

2.4. Détermination du poids moléculaire

2.4.1. D'après la méthode de DELAAGE (26)

Comme cela est décrit plus haut, la fonction d'écart

$$Y = \sum_i \left(\frac{n_i}{N_i} - 1 \right)^2 \quad \text{avec } n_i = x_i / x$$

passé par un minimum lorsque la valeur de x est bonne. On introduit dans la machine les valeurs de x_i et l'intervalle de variation de x qui correspond aux bornes extrêmes attendues pour le poids moléculaire par exemple 48.500 et 60.000. Dans ce calcul, la valeur trouvée pour le Tryptophane est écartée. Finalement, la fonction d'écart Y calculée par la machine passe par un minimum correspondant à un poids moléculaire de 51.998.

Par ailleurs, connaissant le nombre de résidus de Tryptophane, il est facile de déterminer le poids moléculaire total de la protéine soit : $51.998 + 17 \times 188,2$. Le poids moléculaire total de l'amylase pancréatique de mouton est donc de 55.200 daltons. Il correspond au minimum de Y .

Comme le montre le figure 1, on peut estimer l'intervalle de confiance qui entoure le poids moléculaire le plus vraisemblable comme étant constitué de l'ensemble des points voisins pour lesquels nous avons : $Y = 1,5Y_{\text{minimum}}$. Le poids moléculaire est donc : $P = 55.200 \pm 1400$ daltons.

2.4. D'après la méthode de Brand et Al (27)

Si P_i est le pourcentage en poids de l'enzyme du résidu i , de masse moléculaire M_i , le poids moléculaire minimum PM_{min}^i de la protéine est :

$$PM_{\text{min}}^i = \frac{M_i \times 100}{P_i}$$

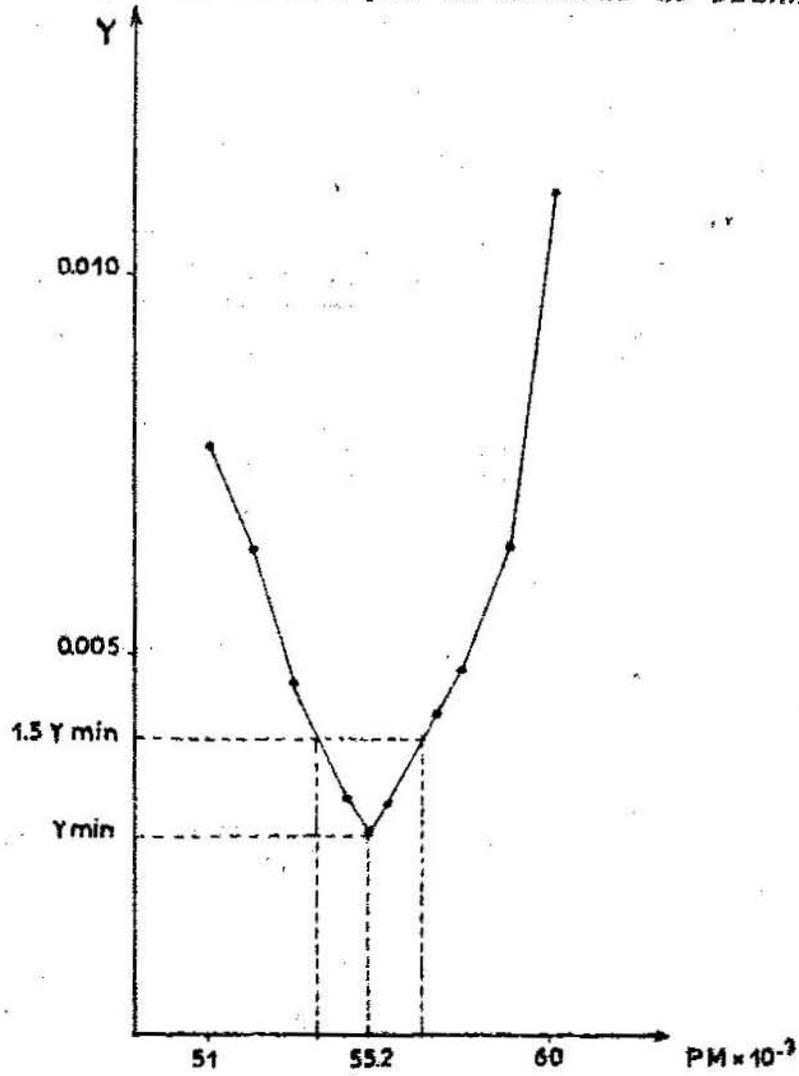
Connaissant le nombre réel N_i de chacun des résidus i dans l'enzyme, nous pouvons calculer facilement le poids moléculaire selon la relation :

$$PM = PM_{\text{min}}^i \times N_i$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2. La valeur du poids moléculaire de la protéine sans le Tryptophane est estimée à 52.614. En ajoutant la contribution des résidus de Tryptophane nous avons obtenu 55.775 pour le poids moléculaire réel de l'amylase.

D'autre part, la somme des $M_i \times N_i$ donne la même valeur soit 55.770. Finalement, le poids moléculaire de l'amylase pancréatique de mouton déterminé par cette méthode est de l'ordre de 55.800 ± 200 daltons.

Figure 1. Détermination du poids moléculaire de l'Amylase pancréatique de mouton par la méthode de DELAAGE (26)



AL ETTALIBI

Amino acide	g de résidus pour 100g de protéine sans Trp.	Poids moléculaire min. sans Trp	Nombre de résidus par mole		Poids moléculaire sans Trp.	$M_i \times N_i$
			trouvé	proche de l'entier		
Asx	16,36	715,7	73,6	74	52.675,3	8.618,5
Thr	4,70	2 193,6	24,0	24	52.646,4	2.474,4
Ser	5,09	1 750,5	30,1	30	52.690,0	2.681,9
Glx	10,66	1 229,8	42,8	43	52.635,4	5.611,0
Pro	4,27	2 370,8	22,7	23	52.682,1	2.249,5
Gly	5,02	1 177,2	44,7	45	52.620,8	2.641,7
Ala	3,98	1 836,6	28,7	29	52.710,4	2.097,9
Val	6,43	1 573,8	33,4	33	52.722,3	3.380,0
Cys	4,06	3 722,4	13,9	14	52.436,3	2.138,8
Met	0,94	17 574,4	3,0	3	52.723,5	495,6
Ile	5,06	2 276,6	23,1	23	52.589,4	2 661,1
Leu	5,48	2 102,1	25,0	25	52,552,5	2 880,0
Tyr	3,77	4 381,9	12,0	12	52,582,8	1 982,0
Phe	6,60	2 260,6	23,3	23	52.671,9	3 476,3
Lys	6,09	2 137,9	24,6	25	52.592,0	3 202,9
His	3,03	4 594,0	11,4	11	52.371,6	1 586,8
Arg	8,43	1 876,6	28,0	28	52.544,8	4 429,6
Total	99,97					52.608,0
Moyenne sans Trp.					52.614,	
Trp	5,76	3 267,3*	16,8	17	55.544*	3 162
Moyenne avec Trp					55 775*	55 770*

Tableau 2. Détermination du poids moléculaire de l'amylase pancréatique de mouton d'après la méthode de BRAND et al (27).

Les chiffres suivis d'un astérisque concernent les poids moléculaires de la protéine complète.

2.4.3. Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La technique employée (16) permet à la fois d'estimer le poids moléculaire et de rechercher la présence éventuelle de sous-unités. Les échantillons à analyser sont dénaturés, réduits et carboxyméthylés. Le traitement par le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate ou Sodium Lauryl Sulfate) a pour effet de rendre nulle la charge propre à chaque protéine. De cette façon, les chaînes polypeptidiques sont rendues uniformément anioniques et peuvent être séparées par électrophorèse en fonction de leur taille.

La figure 2 montre la corrélation linéaire qui existe entre le poids moléculaire et la migration électrophorétique relative des protéines. Le gel de polyacrylamide est calibré à l'aide de quatre protéines de poids moléculaire connus (serum albumine bovine, ovalbumine, Trypsine, Ribonucléase).

L'électrophorèse de l'amylase du pancréas de mouton montre une seule bande dont le R_f est égal à 0,65. Ce résultat indique que l'enzyme se comporte comme une protéine monomère à chaîne polypeptidique unique dont le poids moléculaire est estimé à 56.000 + 1.000 daltons.

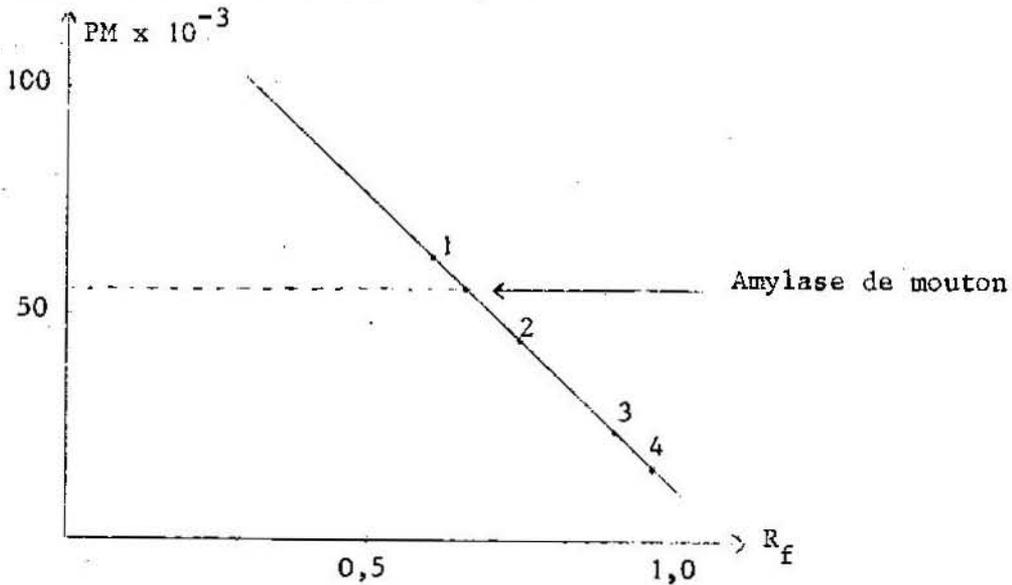


Figure 2. Détermination du poids moléculaire de l'amylase pancréatique de mouton par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en milieu SDS 0,1 %.

Les poids moléculaires apparents de quatre protéines connues sont exprimés en fonction de la migration relative de chacun des marqueurs suivants:

1. Serum albumine bovine monomère	66.000
2. Ovalbumine	46.000
3. Trypsine	24.000
4. Ribonucléase	16.500

2.4.4. Par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20 %

Trois protéines, la sérum albumine bovine, l'ovalbumine et la Trypsine, sont utilisées comme marqueurs. 100 microlitres de chaque échantillon, contenant 20 à 100 μ g de protéines, sont déposés dans des tubes en plastique préalablement remplis d'un gradient de saccharose 5-20 %. L'amylase est traitée de la même façon.

Après ultracentrifugation, les tubes sont lus à 280 nm comme précédemment décrit. Les bandes protéiques sont repérées grâce à leur migration relative définie comme étant le rapport du volume d'éluion correspondant à l'absorption maximale de la protéine au volume total.

En traçant la courbe représentant le poids moléculaire des marqueurs en fonction de leurs migrations relatives, nous pouvons déduire très facilement le poids moléculaire de la protéine recherchée comme l'indique la figure 3.

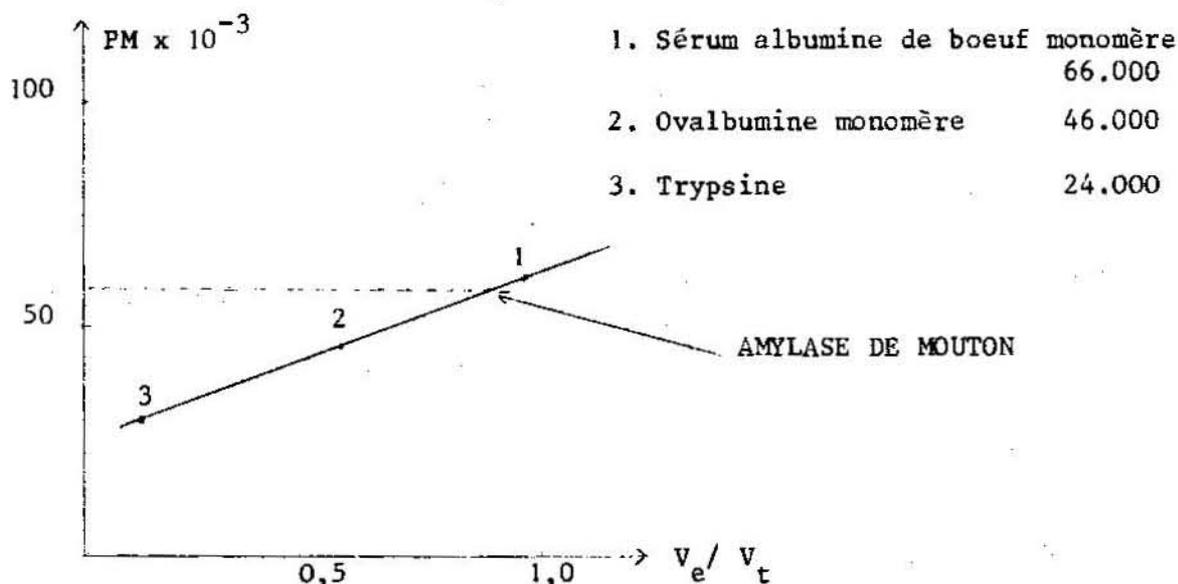


Figure 3. Détermination du poids moléculaire de l'amylase pancréatique de mouton par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20%.

Nous trouvons pour l'amylase pancréatique de mouton un poids moléculaire de 58.500 + 1 000 daltons.

Dans ces conditions, l'enzyme n'a subi aucun traitement au préalable. Sa partie glucidique doit donc rester intacte (16). Or le poids moléculaire de la protéine enzymatique d'après la composition en acides aminés est environ 55.000. Donc la différence 58.500 - 55.000 donne un poids moléculaire de l'ordre de 3.500 qui correspondrait à la partie glucidique.

Les trois méthodes utilisées donnent des résultats comparables .

3. CONCLUSION

La composition en amino-acides de l'amylase pancréatique du mouton diffère de celle de l'enzyme du porc par 60 résidus; elles sont similaires. du point de vue poids moléculaire.

4. REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué en partie à l'Institut de Chimie Biologique de Marseille grâce à une subvention du CNRS. L'auteur remercie Messieurs les Professeurs A. BEN ABDELJLIL, P. DESNUELLE, G. MARCHIS-MOUREN et L. SARDA pour l'intérêt qu'ils ont attaché à ce travail.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. BEN ABDELJLIL (A), A.M. VISANI et P. DESNUELLE
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 10, 112.
2. BEN ABDELJLIL (A) et P. DESNUELLE
Biochem. Biophys. Acta, 1964, 81, 163.
3. BEN ABDELJLIL (A)
Thèse de Doctorat ès sciences, Marseille, 1965
4. MARCHIS-MOUREN (G), L. PASERO et P. DESNUELLE
Biochem. Biophys. Res. Comm, 1963. 13, 262.
5. REBOUD (J.B.), G. MARCHIS-MOUREN, L. PASERO, A. COZZONE ET P. DESNUELLE
Biochem. Biophys. Acta, 1966, 117, 351.
6. BEN ABDELJLIL (A), J.C. PALLA et P. DESNUELLE
Biochem. Biophys. Res. Comm, 1965, 18, 71
7. PALLA (J.C.)
Thèse de Doctorat ès sciences, Marseille 1970
8. ETTALIBI (M)
Diplôme d'Etudes Approfondies, Marseille, 1971.
9. REGGIO (H)
Thèse de Doctorat ès sciences, Marseille, 1973.
10. PALLA (J.C.), A. BEN ABDELJLIL et P. DESNUELLE
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 158,25
11. REGGIO (H)
Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Marseille, 1968
12. MARCHIS-MOUREN (G) et H REGGIO
Progress in Pancreatology.
Czechoslovak medical press, Praha, 1970,86.
13. REGGIO (H), H. CAILLA-DECKMYN et G. MARCHIS-MOUREN
J. Cell. Biol., 1971, 50, 333.

14. STOCK(C), P. STOEGBNER, J. KACHELHOFFER et J.F. GRENIER
Ann. Biol. Clin. (PARIS), 1973, 31, 377.
15. MARCHIS-MOUREN (G)
Bull. Soc. Chim. Biol. , 1965, 47, 2207
16. ETTALIBI (M)
Diplôme d'Etudes Supérieures (Doctorat de 3ème cycle de Biochimie) 1975, RABAT.
17. MARCHIS-MOUREN(G), M. CHARLES, A. BEN ABDELJLIL et P. DESNUELLE
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 186.
18. TOUTAIN (P.L. et L. BUENO
Revue Med. Vet. 1974, 125, 5, 719.
19. ETTALIBI (M), A. BEN ABDELJLIL and G. MARCHIS-MOUREN
Biochimie, 1975, 57, 995.
20. SPACKMAN (D.H.), W.H. STEIN et S. MOORE
Anal. Chem. 1958, 30.1190
21. WILCOX (P.E.), E. COHEN et W. TAN
J. Biol. Chem, 1957, 228, 999.
22. HIRS (C.H.W.)
J. Biol. Chem. 1956, 219, 611.
23. MOORE (S)
J. Biol. Chem, 1963 ; 238, 235.
24. SPIES (J.R. et D.C. CHAMBERS
Anal. Chem., 1948, 20, 30.
25. SPIES (J.R.) et D.C. CHAMBERS
Anal. Chem., 1949, 21, 1249.
26. DELAAGE (M).
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 168, 573.
27. BRAND (E), L.J. SAIDEL, W.H. GOLDWATER, B. KASSEL et F.J. RYAN
J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 1524.
28. SHAPIRO (A.L.), E. VINUELA et J.V. MAIZEL
Biochem. Biophys. Res, Comm. 1967, 28, 815.
29. DUNKER (A.K. et R.R. RUECKERT
J. Biol. Chem. 1969, 244, 5074.
30. CRESTFIELD (A.M.,) S. MOORE et W.H. HIRS
J. Biol. Chem. 1963, 238, 622.
31. DELAAGE
Communication personnelle, Marseille, 1977.
32. COZZONE (P)
Thèse de Doctorat ès sciences, Marseille, 1971.
33. COZZONE (P), L. PASERO, B. BEAUPOIL et G. MARCHIS-MOUREN
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 207, 490.
34. VANDERMEERS (A) et J. CHRISTOPHE
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 154, 110.

35. NARITA (K), H. MURAKAMI et T. IKENAKA
J. Biochem. (TOKYO), 1966, 59, 1970.
36. MORITA (Y) et A. WADANO
Arg. Biol. Chem., 1971, 35, 1128.
37. MALACINSKI (G.M.) et W.J. RUTTER
Biochem., 1969, 8, 4382.
38. DANIELSSON (A), S. MARKLUND et T. STIGBRAND
Int. J. Biochem., 1975, 6, 585.
39. SANDERS (T.G.) et W.J. RUTTER
Biochem., 1972, 11, 130.
40. PFUELLER (S.L. et W. H. ELLIOT
J. Biol. Chem., 1969, 244, 48.
41. HATCH (F.J.)
Nature, 1965, 206, 777.