

ent à choisir une réaction des pentoses, l'assamment lente pour que dans un pré- du désoxyribose soit complète.

noisi n'est pas nouveau [2, 6, 7, 8, 9, 10, p. 100 d'orcinol (3,5-dihydroxy toluène) centré ($d = 1,18$) contenant 10 gouttes l pour 100 cm³. Il donne d'excellents es d'acide nucléinique ou de ses sels vec 0,2 cm³ de lessive de soude diluée éactif et on chauffe pendant 5 minutes n agitant fréquemment. Il apparaît une et un précipité bleu. Après refroidis- u et extrait par 10 cm³ d'alcool iso- qui décante en quelques minutes est nêmes conditions, l'acide thymonucléi- coloration jaune verdâtre.

osons permet d'identifier l'acide ribo- sai de 0,01 g d'acide thymonucléique, nt que 1 à 2 p. 100. Il faut veiller à ne sinon la déshydratation du ribodésosse complète et, comme prévu, la réaction thymonucléique.

CONCLUSION.

acide thymonucléique est basée sur la Aux méthodes précédemment décrites mino-benzoïque.

t être identifié par réaction orcinique. tré, on peut le différencier de l'acide ibose, transformé en acide lévulinique, de la réaction permet d'apprécier 1 à en mélange avec l'acide thymonucléi-

iques Roussel - UCLAF).

BIBLIOGRAPHIE.

- 1.). — *Ber.*, 1922, 55, 18.
 .. 1902, 28, 253 ; 1903, 29, 477.
 930, 8, 4.
). — *Z. physiol. Chem.*, 1924, 135, 203.
Z. physiol. Chem., 1924, 135, 249 ; 1924.
 ed. *Woch.*, 1907, 54, 730.
em., 1901, 31, 564.
chim. Sucr. Dist., 1908-1909, 26, 46.
 16. 1, 383.
Chem., 1899, 27, 507.
im., 1939, (8), 29, 529.
em. Ges., 1896, 29, 1202.
 n KIEN (L. K.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*
 ad (G.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1948.
 — *Ann.*, 1889, 254, 304 ; 1889, 254, 320.
 1928, 199, 298.

9-10.

RECHERCHES SUR LA CONSTITUTION DU FUSEAU ACHROMATIQUE.

I. — ÉTUDES CHIMIQUES DE QUELQUES MODÈLES PROTÉIQUES.

par B. RYBAK.

(Mémoire reçu le 20 mai 1950).

On a exposé antérieurement [1, 2] certaines raisons qui nous ont conduit à poser l'hypothèse que le fuseau achromatique devait être principalement constitué par la combinaison, au moment de la rupture de la membrane nucléaire, des protéines à point isoélectrique basique du caryoplasme avec les protéines à point isoélectrique acide du cytoplasme, celles-ci étant liées à des lipides (*). Peut-être faut-il considérer, d'une façon plus générale, que des protéines à point isoélectrique basique tant nucléaires que cytoplasmiques peuvent intervenir dans la formation des fuseaux et asters à la suite de leur diffusion à partir de centres riches en ces protéines (**). Par protéines à point isoélectrique acide nous entendons non seulement les protéines « libres » (facilement extractibles : albumines, certaines globulines), mais encore les protéines combinées (plus ou moins difficilement extractibles (8)-protéines de structure-) type protéine-lipide (hydrate de carbone ?) (comme l'*ellipsine* de BENSLEY [9] ou type nucléoprotéine (comme les *microsomes* de CLAUDE [10, 11, 12] (***)). Des combinaisons entre protéines « libres » à point isoélectrique acide et protéines à point isoélectrique basique ont déjà été signalées principalement par KOSSEL [14], HUNTER [15], GAY et ROBERTSON [16], UGGLAS [17], SCHMIDT [18], ROBERTSON [19], PRZYLECKI [20].

(*) KOPAC examinant notre hypothèse (*Ann. Rev. Physiol.*, 1950, XII, 7) y rapporte les résultats de HEILBRUNN et WILSON (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 70, 179) qui ont trouvé que l'héparine prévient la gélification qui accompagne la formation des structures fibrillaires mitotiques (fuseau, aster). KOPAC envisage que, étant donné le caractère basophile de l'héparine, celle-ci pourrait entrer en compétition avec les substances structurales basophiles de la cellule et, par là, perturber la gélification fibrillaire. Cette interprétation nous paraît très vraisemblable.

(**) Au sujet des petits fuseaux d'origine chromosomiale [3], on sait que les chromosomes possèdent des protéines à point isoélectrique basique [4, 5]. En ce qui concerne les structures fusoriales d'origine cytoplasmique, voir : a) les résultats de LAMS [6] relatifs à l'apparition de fibres extranucléaires dans la prophase de la deuxième mitose de segmentation de l'œuf d'*Arion empiricorum* avant que la membrane nucléaire ne soit rompue ; b) les résultats de E. B. HARVEY [7] relatifs à l'apparition de formations d'allure astérienne dans l'œuf d'*Arbacia punctulata* privé de noyau.

(***) La considération de ce dernier type permet peut-être d'expliquer qu'on ait pu déceler de l'acide ribonucléique dans le fuseau [13].

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N° 9-10.

insolubles (soit en eau distillée soit dans le cas des euglobulines) entre électrique acide et protéines à point isoelectrique paraissent nécessaires : 1) électriques des corps réagissant doit être précipité par 3 volumes d'acide picrique à saturation et centrifugé. Le culot de centrifugation est repris par une série de mises en suspension — dans de l'éthanol à 95° + quelques gouttes de H_2SO_4 concentré — et de centrifugations jusqu'à ce que le surnageant soit limpide et incolore (précipité blanc de x grammes). On reprend alors ce précipité par 8-10 x d'eau distillée en agitant et on laisse en contact une nuit à + 4° C. Après ce temps on centrifuge à 4000 t/m pendant 30 minutes et on dialyse le surnageant opalescent dans des sacs de collodion (voir ci-dessous) pendant 30 heures contre de l'eau distillée changée 4 fois. Après une nouvelle centrifugation le liquide opalescent est conservé à + 4° C. Notre préparation-stock renfermait 0,03 g d'azote Kjeldahl/100 cm^3 et des traces de phosphore (pH = 7,5).

l'isoélectrique basique n'est pas connue, le point isoélectrique acide surtout des lipides [25, 26, 27, 28, 29, 30] et la liaison entre la protéine proprement dite et le rôle éventuel de lipides lipo-protéiques avec les protéines ; signalons à ce sujet et dans le cadre de WILSON [31] — disparition des résultats de RUNNSTRÖM [32, 33] — la relation mitotique après la fécondation contemporaine des lipides. Le point isoélectrique acide-protéine à + 4° C agit soit d'une réaction de salification de BRÜSTED des réactions acido-basiques d'ions (perte de charges). La réaction auquel nous avons affaire, est celle des complexes hétéropolaires.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Préparation. — Nous nous sommes servis de la technique suivante : Nous avons trouvé : N (Kjeldahl) p. 100 se est limpide et incolore.

avons préparé de la façon suivante : nous avons mécaniquement au mieux,

lorsqu'il sera question de protéines on n'emploiera que l'expression : protéines dans le cadre des premières études sur des modèles à propos du même type de cellules que des combinaisons entre protéines « libres » à point isoélectrique basique et les protéines combinées cytotétiques des constituants submicroscopiques, nous étudierons des systèmes électriques basiques et des constituants extraits de cellules. Laboratoires ROUSSEL à la Direction des remerciements.

est broyé le plus tôt possible après l'abatage des animaux dans un moulin à viande. La bouillie est placée dans 5 litres de HCl N/1 pendant 1-2 heures à la température du laboratoire (ce liquide se conserve pendant plusieurs semaines à + 4° C). On centrifuge alors à froid à 3700 t/m pendant 20-30 minutes (centrifugeuse « International ») et on décante sur de la gaze. Le liquide très opalescent est alors précipité par 3 volumes d'acide picrique à saturation et centrifugé. Le culot de centrifugation est repris par une série de mises en suspension — dans de l'éthanol à 95° + quelques gouttes de H_2SO_4 concentré — et de centrifugations jusqu'à ce que le surnageant soit limpide et incolore (précipité blanc de x grammes). On reprend alors ce précipité par 8-10 x d'eau distillée en agitant et on laisse en contact une nuit à + 4° C. Après ce temps on centrifuge à 4000 t/m pendant 30 minutes et on dialyse le surnageant opalescent dans des sacs de collodion (voir ci-dessous) pendant 30 heures contre de l'eau distillée changée 4 fois. Après une nouvelle centrifugation le liquide opalescent est conservé à + 4° C. Notre préparation-stock renfermait 0,03 g d'azote Kjeldahl/100 cm^3 et des traces de phosphore (pH = 7,5).

Protéines à point isoélectrique acide. — Nous avons utilisé des protéines du sérum de cheval que nous avons préparées de la façon suivante :

a) *albumine amorphe* : on se débarrasse des globulines par précipitation du sérum par $(NH_4)_2SO_4$ à 1/2 saturation et centrifugation ; on précipite ensuite le surnageant limpide par $(NH_4)_2SO_4$ de façon à amener la concentration finale à la saturation théorique en sulfate d'ammonium. Après centrifugation le précipité est dissous par adjonction d'eau distillée et la solution protéique est mise à dialyser en sac de collodion contre de l'eau de conduite pendant 24 heures, puis pendant 24 heures contre de l'eau distillée changée 2 fois (à + 4° C) et on termine par une centrifugation à froid. La solution plus ou moins jaune est conservée à + 4° C.

b) *albumine cristallisée* : nous avons utilisé la technique classique de cristallisation au point isoélectrique. On se débarrasse des globulines par précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ à 1/2 saturation et centrifugation et filtration s'il y a lieu jusqu'à obtenir un liquide limpide que l'on amène alors à l'opalescence par adjonction de H_2SO_4 . On place aussitôt à la glacière (+ 4° C) et on agite le liquide le plus souvent possible. Généralement après une nuit on obtient un précipité cristallin (fines aiguilles) que l'on redissout par adjonction d'eau distillée légèrement alcalinisée s'il y a lieu par de l'ammoniaque diluée. On dialyse 24 heures contre de l'eau courante puis 24 heures contre de l'eau distillée changée 2 fois (+ 4° C). Nous nous sommes rarement servi de préparations d'albumine cristallisée qui avaient été cristallisées 2 fois, l'allure du phénomène que nous étudions se présentant similairement que l'albumine ait été cristallisée une ou deux fois.

Acide adénosinetriphosphorique. — Nous devons notre préparation à la générosité des Laboratoires Schwarz (N-Y) que nous remercions vivement. C'est un ATP de fermentation sans baryum ; il renferme : N = 12,35 p. 100 ; P = 14,85 p. 100 ; N/P = 0,83.

Technique de dialyse. — Nous préparons nos sacs avec du collodion à l'éther à 5 p. 100. Chaque sac est monté sur une petite bouteille (d'environ 50 cm³ de capacité) sans fond et possédant un goulot si possible conique. La fixation du sac se fait par collage au collodion. On ferme le goulot de la bouteille par un bouchon en caoutchouc de telle sorte que celui-ci serve de piston. On comprime ainsi l'air contenu dans l'espace clos bouteille-sac. Notre dispositif permet une dialyse sous pression sans montage spécial.

Photométrie. — Nous nous sommes servi d'un électrophotomètre Klett-Summerson et les mesures ont été exécutées en plaçant les solutions étudiées dans des tubes calibrés Klett-Summerson.

pH-métrie. — Nous avons utilisé l'électrophotomètre Meci avec une électrode en verre Corning.

RÉSULTATS.

Allure du phénomène.

Exemples :

1) Soit un système obtenu par l'adjonction de 4 cm³ d'albumine amorphe (A) à 0,213 g N/100 cm³ + 1 cm³ de sulfate d'histone (H) à 0,03 g N/100 cm³. Il donne en lumière bleue et à 21° C (Tableau I) :

TABLEAU I.

Désignation	Valeurs opacimétriques après			
	15 sec	7 min	20 min	25 min
A + H	290	290	270	280-290
A + H/2	210	250	209	219
A + H/4	105	145	160	160
A + H/8	37	70	69	76

2) Soit un système obtenu par l'adjonction de 4 cm³ d'euglobuline (E) à 0,023 g d'azote/100 cm³ (en eau physiologique) + 1 cm³ de sulfate d'histone (H) à 0,03 g d'azote/100 cm³. Il donne les valeurs opacimétriques suivantes (écran bleu ; $\theta = 21^\circ$ C ; lectures après 15 minutes) :

E + H	→	230-234 (pH 7,26)
E + H/2	→	176 (pH 7,0)
E + H/8	→	57 (pH 6,6)
E + 1 cm ³ H ₂ O physiologique	→	12

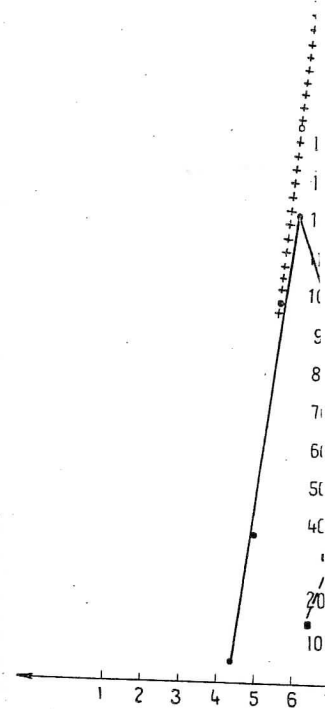
Aspect au microscope optique.

Nous n'avons jamais pu discerner de filaments mais toujours des granules isolés ou en agrégats. Ces granules pouvaient avoir 1-1,5 μ et les agrégats étaient surtout nets après la floculation d'un système considéré, floculation qui apparaissait avec des systèmes du type décrit ci-dessus après quelques heures à 22° C ou à 4° C.

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10.

Suivant la nature des con isoélectrique (minimum de se à titre d'exemple les courbes rentes ($\theta = 22^\circ$ C).

Gra



Fig

La courbe I correspond à un système à 0,106 g N/100 cm³ pour 1 partie N/100 cm³, en eau distillée.

La courbe II correspond à un système à 2496 mg N/l pour 34 parties N/l, système que l'on a centrifugé et travaillé sur le surnageant de densité (eau distillée).

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10

s préparons nos sacs avec du collodion. Le sac est monté sur une petite bouteille sans fond et possédant un goulot si le sac se fait par collage au collodion. Elle par un bouchon en caoutchouc de piston. On comprime ainsi l'air du sac. Notre dispositif permet une diapositive spéciale.

Les mesures ont été exécutées en plaçant les solutions dans des cuvettes Klett-Summerson.

On a utilisé l'électrophotomètre Meci avec une

RÉSULTATS.

du phénomène.

Après l'adjonction de 4 cm³ d'albumine (1 cm³ + 1 cm³ de sulfate d'histone (H)) en lumière bleue et à 21° C (Tableau I) :

TABLEAU I.

Valeurs opacimétriques après		
7 min	20 min	25 min
290	270	280—290
250	209	219
145	160	160
70	69	76

Après l'adjonction de 4 cm³ d'euglobuline (en eau physiologique) + 1 cm³ de sulfate d'histone/100 cm³. Il donne les valeurs opacimétriques ; $\theta = 21^\circ \text{C}$; lectures après 15 min :

→ 230-234 (pH 7,26)
 → 176 (pH 7,0)
 → 57 (pH 6,6)
 physiologique → 12

microscope optique.

On a observé des filaments mais toujours des granules. Ces granules pouvaient avoir 1-1,5 μ et après la floculation d'un système on obtenait avec des systèmes du type décrit à 22° C ou à 4° C.

9-10.

Rôle du pH.

Suivant la nature des constituants et leurs proportions le point isoélectrique (minimum de solubilité) est différent. La fig. 1 donne à titre d'exemple les courbes correspondant à 3 préparations différentes ($\theta = 22^\circ \text{C}$).

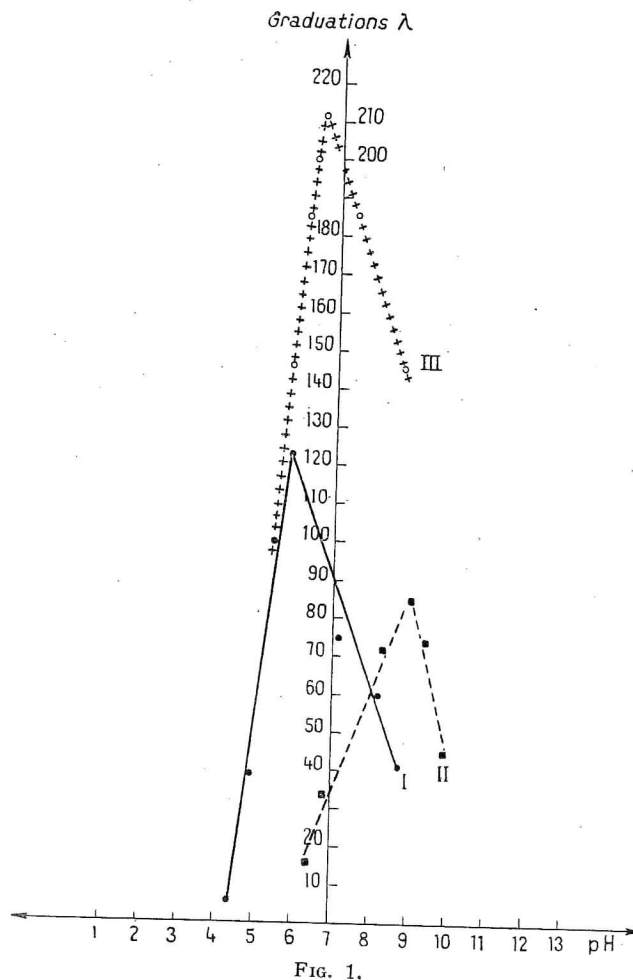


FIG. 1.

La courbe I correspond à un système : 4 parties d'albumine amorphe à 0,106 g N/100 cm³ pour 1 partie de sulfate d'histone à 0,0038 g N/100 cm³, en eau distillée.

La courbe II correspond à un système : 4 parties d'albumine cristallisée à 2496 mg N/l pour 34 parties de sulfate de salmine à 215,4 mg N/l, système que l'on a centrifugé à 3700 t/m pendant 15 min. On travaille sur le surnageant de densité optique en lumière bleue = 21 (eau distillée).

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10.

La courbe III correspond à un système : 4 parties d'euglobuline à 0,24 mg N/cm³ (dans KCl 0,1 M) pour 1 partie de sulfate de salmine à 0,35 mg de sulfate de salmine/cm³ (en eau distillée).

Les variations du pH ont été obtenues par adjonction soit de NaOH soit de HCl ou de H₂SO₄. Les hauteurs différentes des courbes s'expliquent par des quantités différentes des protéines mises en jeu dans chacun des systèmes.

Réversibilité. — Les résultats ci-dessous montrent que le phénomène lié au pH est réversible.

Soit un système constitué par : 40 cm³ d'albumine amorphe à 0,106 g N/100 cm³ + 10 cm³ de sulfate d'histone à 0,0038 g N/100 cm³. Sa valeur opacimétrique en lumière bleue, à 22° C, après 15 minutes est 95. On prélève 10 cm³ de ce système et on en fait 2 parts de 5 cm³ chacune, soit AH pour chaque fraction aliquote. Les valeurs opacimétriques suivantes ont été obtenues en lumière bleue, à 22° C, après 90 secondes :

- a) AH + 1/10 cm³ HCl = x N/100 → 110 + 1/10 cm³ NaOH = x 100 → 90-92
 b) AH + 1/10 cm³ NaOH = x N/100 → 75 + 1/10 cm³ HCl = x 100 → 92

Le phénomène n'est pas réversible si on utilise de trop grandes quantités d'acide ou de base minéraux car il se forme dans ces conditions une *quantité suffisante de sel minéral* (ici NaCl) pour amener la dissociation du complexe hétéropolaire considéré. C'est là un point important si on le considère du point de vue de la « dénaturation » des protéines et nous l'examinerons dans un travail ultérieur en utilisant particulièrement la dialyse.

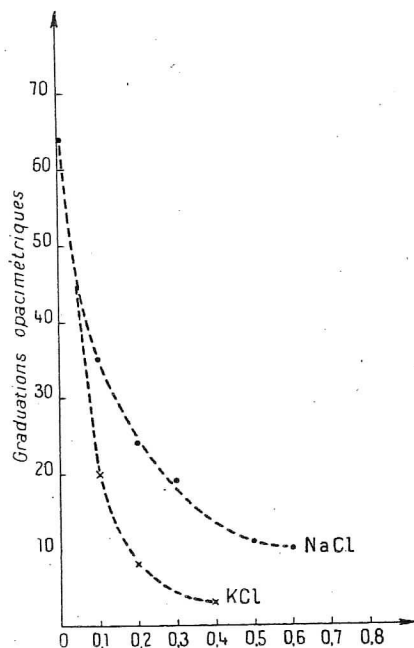
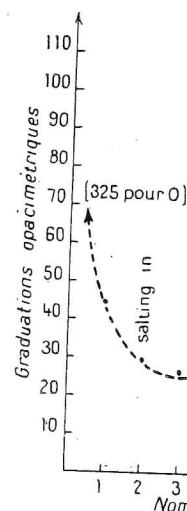


Fig. 2.

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, nos 9-10.

Par leur force ionique ils tème considéré (dissolution complexe hétéropolaire en se d'exemple les courbes corres un système : 4 parties de ci 1 partie de sulfate d'histone tures en écran rouge à 21° C

La figure 3 indique le comp d'albumine amorphe à 0,213 g tone à 0,03 g N/100 cm³ (eau nium à saturation (environ 5 en lumière bleue à 22° C (or 1 cm³ d'eau distillée ajouté 325 — 185). On remarquera l'inverse de celle que montre sence de différentes concentra



Allure en fonction des prop

Soit : une solution de cristall eau distillée et une solution ég salmine (S) à 35 mg de sulfate d Le Tableau II résume nos résu salmine n'est pas neutralisée (solution-sœur de sulfate de salm la soude d'où présence de petite

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, n° 9

ystème : 4 parties d'euglobuline à
our 1 partie de sulfate de salmine
3 (en eau distillée).

nuées par adjonction soit de NaOH
ars différentes des courbes s'expli-
des protéines mises en jeu dans

-dessous montrent que le phéno-

cm³ d'albumine amorphe à 0,106 g
histone à 0,0038 g N/100 cm³. Sa
eue, à 22° C, après 15 minutes est
ne et on en fait 2 parts de 5 cm³
ion aliquote. Les valeurs opacimé-
en lumière bleue, à 22° C, après

0 + 1/10 cm³ NaOH = * 100 → 90-92
75 + 1/10 cm³ HCl = * 100 → 92

ble si on utilise de trop grandes
aux car il se forme dans ces con-
el minéral (ici NaCl) pour amener
olaire considéré C'est là un point
oint de vue de la « dénaturation »
s dans un travail ultérieur en uti-

Action des sels.

Par leur force ionique ils agissent en diminuant l'opacité d'un sys-
tème considéré (dissolution : nous admettons une dissociation du
complexe hétéropolaire en ses constituants). La figure 2 montre à titre
d'exemple les courbes correspondant à l'action de NaCl et de KCl sur
un système : 4 parties de cristalalbumine à 0,0168 g N/100 cm³ pour
1 partie de sulfate d'histone à 0,0038 g N/100 cm³ (eau distillée). Lec-
tures en écran rouge à 21° C ; pH * 6

La figure 3 indique le comportement particulier d'un système : 4 cm³
d'albumine amorphe à 0,213 g N/100 cm³ pour 1 cm³ de sulfate d'his-
tone à 0,03 g N/100 cm³ (eau distillée) en présence de sulfate d'ammo-
nium à saturation (environ 5,8 M) de pH 4,35. Lectures instantanées
en lumière bleue à 22° C (ordre de grandeur de l'effet de dilution —
1 cm³ d'eau distillée ajoutée au système de valeur opacimétrique
325 — : 185). On remarquera que cette courbe est approximativement
l'inverse de celle que montre une désoxyribonucléoprotéine en pré-
sence de différentes concentrations de NaCl.

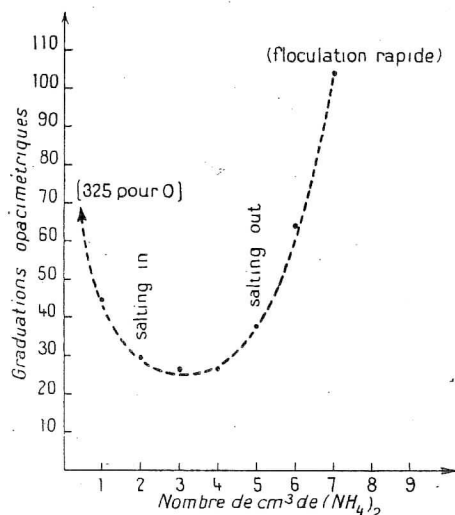


FIG. 3.

Allure en fonction des proportions relatives des constituants.

Soit : une solution de cristalalbumine (A) à 2364 mg N/1 (pH 6,25) en
eau distillée et une solution également en eau distillée de sulfate de
salmine (S) à 35 mg de sulfate de salmine/100 cm³.

Le Tableau II résume nos résultats lorsque la solution de sulfate de
salmine n'est pas neutralisée (pH 4,3) et le Tableau III lorsqu'une
solution-sœur de sulfate de salmine est à pH 7,0 (neutralisation par de
la soude d'où présence de petites quantités de Na₂SO₄) ; θ = 24° C.

TABLEAU II.

Valeurs en cm ³ de		Valeurs opacimétriques (écran bleu)		pH final
A	S	Instantanées (15 sec)	Après 15 min	
mis en présence				
4,5	0,5	198	180	6,2
4	1	260	210	5,8
3,5	1,5	175	150	5,65
3	2	40	39	5,60
2,5	2,5	2	2	5,5
2	3	1	1	5,40
1,5	3,5	0	0	5,2
1	4	0	0	4,8
0,5	4,5	0	0	4,65

TABLEAU III.

Valeurs en cm ³ de		Valeurs opacimétriques (écran bleu)		pH final
A	S	Instantanées (15 sec.)	Après 15 min	
mis en présence				
4,5	0,5	185	173	6,35
4	1	290	250	6,45
3,5	1,5	290	204	6,25
3	2	258	200	6,30
2,5	2,5	230	175	6,35
2	3	206	160	6,6
1,5	3,5	145	110	6,55
1	4	51	43	6,6
0,5	4,5	0	0	6,75

On voit que c'est dans la relation pratiquement indépendante du pH (dans le domaine de comptabilité pH — complexe hétéropolaire) 4 A/S en volumes que la combinaison est maximum ; elle apparaît donc comme n'étant ni equi-moléculaire ni isoazotée. Nous discuterons ultérieurement la signification de ce point.

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10.

Action de sub.

Si le fuseau achromatique e protéine à point isoélectrique a sique, de tels systèmes doivent lière vis-à-vis des substances exemples :

1) 1 cm³ de *taurocholate* de sur le fuseau a été décrite par sur un système : 4 cm³ d'albu (A) + 1 cm³ de sulfate d'histon valeurs opacimétriques suivante

	AH avant (15)
Taurochlorate	16
Témoin de dilution : eau distillée	15

On voit que le taurocholate s sultat n'est pas démonstratif car sérumalbumine il précipite le su avec la l-colchicine (Houdé) qui ni le sulfate d'histone.

2) 1 cm³ de *colchicine* à 0,2 tème précédent (cf 1) dans les suivantes :

	AH av
Colchicine.....	
Témoin de dilution : eau distillée	

ou encore dans les rapports vol même préparation d'albumine + sulfate d'histone dans les mêmes

	AH av
Colchicine.....	
Eau distillée	

La colchicine renforce donc l'état caractérisé par leur insolubilité.

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-

EAU II.

Valeurs opacimétriques (écran bleu)		pH final
avant 15 sec)	Après 15 min	
198	180	6,2
260	210	5,8
175	150	5,65
40	39	5,60
2	2	5,5
1	1	5,40
0	0	5,2
0	0	4,8
0	0	4,65

EAU III.

Valeurs opacimétriques (écran bleu)		pH final
avant 5 sec.)	Après 15 min	
185	173	6,35
290	250	6,45
290	204	6,25
258	200	6,30
230	175	6,35
206	160	6,6
145	110	6,55
51	43	6,6
0	0	6,75

pratiquement indépendante du pH H — complexe hétéropolaire) 4 A/S st maximum ; elle apparaît donc ni isoazotée. Nous discuterons ulté-
rieurement.

Action de substances mitoclasiques.

Si le fuseau achromatique est constitué par un système du type protéine à point isoélectrique acide-protéine à point isoélectrique basique, de tels systèmes doivent se comporter d'une façon particulière vis-à-vis des substances mitoclasiques. Nous prendrons deux exemples :

1) 1 cm³ de *taurocholate de sodium* à 0,5 p. 100 — dont l'action sur le fuseau a été décrite par DEYSSON et DEYSSON [36] — agissant sur un système : 4 cm³ d'albumine amorphe à 0,213 g N/100 cm³ (A) + 1 cm³ de sulfate d'histone à 0,0075 g N/100 cm³ (H) donne les valeurs opacimétriques suivantes (écran bleu ; 0 = 22° C) :

	AH avant adjonction (15 min)	AH après adjonction (15 min)	pH final
Taurochlorate	160	190	6,45
Témoin de dilution : eau distillée	155	124	6,55

On voit que le taurocholate *superprécipite* le système mais ce résultat n'est pas démonstratif car si le taurocholate ne précipite pas la sérulalbumine il précipite le sulfate d'histone [21] d'où notre étude avec la l-colchicine (Houdé) qui elle, ne précipite ni la sérulalbumine ni le sulfate d'histone.

2) 1 cm³ de *colchicine* à 0,2 p. 100 (pH 6,35) agissant sur le système précédent (cf 1) dans les mêmes conditions donne les valeurs suivantes :

	AH avant adjonction (15 min)	AH après adjonction (15 min)
Colchicine.....	155	160
Témoin de dilution : eau distillée	155	125

ou encore dans les rapports volumétriques suivants : 4,5 cm³ de la même préparation d'albumine + 0,5 cm³ de la même préparation de sulfate d'histone dans les mêmes conditions que précédemment :

	AH avant adjonction (15 min)	AH après adjonction (15 min)
Colchicine	104	125
Eau distillée	104	86

La colchicine renforce donc l'état de moindre dispersion des systèmes caractérisé par leur insolubilité.

Nous avons également essayé l'éthyluréthane à 0,2 p.100, le cacodylate de sodium à 0,001 N [37] mais ces agents n'ont pas superprécipité nos systèmes protéiques et le cacodylate les a même nettement dissous ; il est possible qu'en ce qui concerne cette substance nous soyons en présence d'une propriété commune des sels (dissolution par augmentation de la force ionique) et à ce sujet il nous paraît important d'insister sur ce que les études *in vitro* doivent être interprétées avec prudence étant donné que le phénomène considéré — par exemple dans nos recherches : l'opacité, la biréfringence d'écoulement [38] — peut être influencé par des conditions foncières *non spécifiques* comme l'effet de pH propre à chaque corps étudié (par exemple la cocaïne) ou l'effet salin soit que l'on travaille en présence de tampons soit que l'on utilise la substance sous forme d'un sel (par exemple l'hydrochlorure de cocaïne).

Gélification. — Obtention de fils et de films.

Nous avons constaté que si on centrifuge par exemple un système albumine amorphe ou cristallisée-salmine en eau distillée on obtient un culot de centrifugation qui est un *gel* transparent et légèrement teinté de jaune (albumine concentrée) ou violacé (albumine diluée) (*), ces gels sont solubles dans les solutions salines de force ionique convenable dans des conditions analogues à celles des mêmes systèmes dilués en milieu aqueux. Dans le cas albumine-salmine cette gélification est remarquable, elle souligne l'analogie entre de tels systèmes et les globulines les plus condensées. Avec des gels albumine-salmine nous avons obtenu des formations filiformes très évanescences en les insufflant dans de l'eau distillée suivant la technique classique de WEBER [39] pour l'obtention de fils de myosine. Par contre les gels d'euglobuline-salmine ou même d'euglobuline seule donnent dans les mêmes conditions des formations filiformes moins labiles mais cassantes. Jusqu'à présent nous n'avons pu obtenir de synérèse avec de tels fils ni avec l'ATP acide ou sous forme de sel sodique dans les conditions décrites par SZENT-GYORGYI pour les fils de myosine [40] ni même avec la colchicine qui pourtant superprécipite nos systèmes dilués en milieu aqueux ; c'est un point que nous réexaminerons dans des recherches ultérieures. Nous avons également obtenu des *formations nématiques par agitation rotative* :

Exemple : à 3,5 cm³ d'albumine cristallisée à 2496 mg N/1 d'eau distillée on ajoute 11 cm³ de sulfate de salmine à 215,4 mg N/1 d'eau distillée, on dissout le système dans le minimum de NaCl à M/2 et on ajoute de l'eau distillée goutte à goutte en agitant circulairement pendant 30 minutes, on obtient généralement des filaments de 2 mm de long. On peut accentuer le nombre de filaments en faisant tourner le système pendant une minute à 3750 sec⁻¹ dans l'entrefer d'un appareil à biréfringence d'écoulement. En collaboration avec M. JOLY, avec un système albumine-salmine en eau distillée *non redissous*, nous avons constaté que l'on obtenait déjà des filaments de 1,5 mm de long environ avec un temps de rotation de 10 secondes à 3750 sec⁻¹ ; si on soumet

(*) Avec un système euglobuline-salmine on obtient également un gel mais opaque et blanc, de plus l'euglobuline seule précipitée par l'eau se présente sous forme d'un gel opaque et blanc après centrifugation.

un tel système à un écoulement à la même vitesse mais pendant un nombre de filaments qui peut être quasi-instantané, dans ce cas la rotation indique que le phénomène — chocs suivant les lignes de *gélification linéaire*. Ces lignes, matérialisées, si on regarde en effet à biréfringence d'écoulement, brillantes ayant comme rayons lumineux utilisés. Les fils ainsi obtenus avec la colchicine.

La plasticité des systèmes protéine à point isoélectrique suivants : les formations nématiques fuggées à 12.000 t/m pendant tube de centrifugation en forment venant de la déformation des pressions de gravité.

Remarque sur la révélation plexes hétéropolaires que nous leur nature semi-artificielle, distillées (orientées) que sont les convient d'avoir constamment cytoplasme fondamental est un [42] et dans certains cas, si on Dans le cas d'une structure plus renforcera cette structure ou comme modèle d'une telle éventualité distillée obtenu par refroidissement gélatine portée à 45° C ; dans un milieu fibreux lamellaire. Si on hypodermique (en la déplacement par exemple à 0,03 g N formation de zones de précipitation). (Si on remplace la solution distillée et si on procède de la lamellaires mais non blanchissement différente et qui disparaît agent de précipitation — comme se comporte comme le sulfate que sur les plans vecteurs en [46] et de SCHAEDE [47] selon lamelles (voir aussi [48, 49, 50]).

Comportement

Si l'on considère que les substances de type myosinogène de l'acide adénosinetriphosphat. Nous avons donc étudié étant bien entendu, répétons-

un tel système à un écoulement laminaire dans le même appareil et à la même vitesse mais pendant 2 minutes on obtient un plus grand nombre de filaments qui peuvent atteindre 4 mm de long. Le caractère quasi-instantané, dans certaines conditions, de la filamentation rotative indique que le phénomène est dû aux chocs immédiats d'orientation — chocs suivant les lignes de courant — qui conduisent à une *gélification linéaire*. Ces lignes de courant sont en quelque sorte matérialisées, si on regarde en effet dans le système optique de l'appareil à biréfringence d'écoulement, on constate la présence de lignes très brillantes ayant comme rayon de courbure celui du système de cylindres utilisés. Les fils ainsi obtenus ne se contractent ni avec l'ATPNa ni avec la colchicine.

La plasticité des systèmes protéine à point isoélectrique basique-protéine à point isoélectrique acide est encore illustrée par les faits suivants : les formations nématiques (obtenues par rotation) centrifugées à 12.000 t/m pendant 30 minutes se déposent sur le fond du tube de centrifugation en formations aplaties — en pellicules — provenant de la déformation des gels filamenteux sous l'influence de la pression de gravité.

Remarque sur la révélation de structures organisées. — Les complexes hétéropolaires que nous étudions constituent seulement, par leur nature semi-artificielle, des modèles des structures hyperorganisées (orientées) que sont les appareils cinétiques des cellules ; or il convient d'avoir constamment à l'esprit certaines considérations : le cytoplasme fondamental est un milieu déjà gélifié [41] déjà micellaire [42] et dans certains cas, si ce n'est dans tous, structuré [43, 44, 45]. Dans le cas d'une structure préexistante la combinaison hétéropolaire renforcera cette structure ou en réorientera les éléments. Prenons comme modèle d'une telle éventualité un gel de gélatine à 5 p. 100 en eau distillée obtenu par refroidissement non perturbé jusqu'à 21° C d'une gélatine portée à 45° C ; dans ces conditions le milieu est fibreux [58] voire fibro-lamellaire. Si on injecte à la seringue, avec une aiguille hypodermique (en la déplaçant ou non) une solution de sulfate d'histone par exemple à 0,03 g N/100 cm³, on obtient instantanément la formation de zones de précipitation lamellaires blanchâtres, biréfringentes. (Si on remplace la solution de sulfate d'histone par de l'eau distillée et si on procède de la même façon on obtient aussi des zones lamellaires mais non blanchâtres, visibles seulement par leur réfringence différente et qui disparaissent d'ailleurs rapidement). Tout autre agent de précipitation — comme l'acide trichloracétique à 10 p. 100 — se comporte comme le sulfate d'histone. Nous avons fait cette remarque sur les plans vecteurs en considération des conceptions de BELAR [46] et de SCHAEDE [47] selon lesquelles le fuseau serait constitué de lamelles (voir aussi [48, 49, 50, 51, 52]).

Comportement vis-à-vis de l'A.T.P.

Si l'on considère que le fuseau achromatique est constitué par des substances de type myosinique [53] on examinera avec intérêt l'action de l'acide adénosinetriphosphorique (ATP) sur son comportement. Nous avons donc étudié l'action de l'ATP sur nos complexes, étant bien entendu, répétons-le, que nos systèmes protéiques ne cons-

tituent que des *modèles* de constituants du fuseau achromatique étant donné que les protéines à point isoélectrique acide que nous utilisons proviennent du sérum et non du cytoplasme de cellules.

Soit un système : 4 cm³ d'euglobuline en solution KCl 0,1 M (pH 6,65 ; N/cm³ = 0,24 mg) (E) + 1 cm³ de sulfate de salmine à 0,35 mg/m³ (pH 5,3) (S). Nous étudierons l'adénosinetriphosphate de sodium à 0,1 p. 100 et pH 6,55 (ATPNa) et, à titre comparatif, la l-colchicine à 0,1 p. 100 et pH 5,9 (C) par opacimétrie (lectures à 22°C en lumière bleue) ; tableau IV.

TABLEAU IV.

N°	Système	Valeurs opacimétriques		Adjonction de	Valeurs opacimétriques		pH final
		Instantanées	15 min		Instantanées	15 min	
1	4 cm ³ E + 1 cm ³ S	190	200	1 cm ³ ATPNa	165	158	6,45
2	4 cm ³ E + 1 cm ³ H ₂₀ dist.	0	0	1 cm ³ ATPNa	0	7	6,45
3	4 cm ³ E + 1 cm ³ S	190	200	1 cm ³ eau dist.	170	166	6,25
4	3 cm ³ E + 1 cm ³ H ₂₀ dist.	0	0	1 cm ³ eau dist.	25	39	6,35
5	4 cm ³ E + 1 cm ³ S	190	200	1 cm ³ C	212	209	6,35
6	4 cm ³ E + 1 cm ³ S H ₂₀ dist.	0	0	1 cm ³ C	45	70	6,30

On voit que l'ATPNa dissout le complexe E-S (*), nous avons d'ailleurs pu constater qu'il dissolvait également les systèmes albumine-histone ou albumine-salmine. Cette action de l'ATPNa doit être attribuée à sa force ionique; l'ATP acide dissout également les complexes hétéropolaires, dans ce cas c'est le pH qui intervient. Par contre la colchicine se comporte comme un agent superprécipitant. On remarquera à ce sujet que la colchicine précipite l'euglobuline seule (comparer les n°s 4 et 6) ; or, comme le font dans une certaine mesure les myosines, les *complexes albumine-histone ou albumine-salmine se comportent comme des globulines* et à ce sujet il est intéressant de rappeler que la colchicine possède une propriété contracturante sur les muscles du squelette [59] ; d'autre part il est vraisemblable que la colchicine est un agent superprécipitant également vis-à-vis des protéines combinées (difficilement extractibles) à point isoélectrique acide du cytoplasme et qu'en conséquence sa propriété mitoclasique pourrait provenir en grande partie de son action sur les substrats cytoplasmiques. Nous examinerons dans le prochain mémoire de cette

(*) Soulignons que le système E-S étudié est celui qui a fait l'objet d'une étude de l'action du pH (Courbe III, fig. 1) et qu'en conséquence, les résultats du Tableau IV sont d'autant plus démonstratifs.

K.

ts du fuseau achromatique étant
ectrique acide que nous utilisons
oplasme de cellules.

line en solution KCl 0,1 M (pH
m³ de sulfate de salmine à 0,35
s l'adénosinetriphosphate de so-
) et, à titre comparatif, la l-col-
opacimétrie (lectures à 22°C en

IV.

ljonction de	Valeurs opacimétriques		pH final
	Instan- tanées	15 min	
3 ATPNa	165	158	6,45
3 ATPNa	0	7	6,45
3 eau dist.	170	166	6,25
3 eau dist.	25	39	6,35
3 C	212	209	6,35
3 C	45	70	6,30

plexe E-S (*), nous avons d'ail-
alement les systèmes albumine-
tion de l'ATPNa doit être attri-
dissout également les complexes
H qui intervient. Par contre la
nt superprécipitant. On remar-
cipite l'euglobuline seule (com-
nt dans une certaine mesure les
stone ou albumine-salmine se
ce sujet il est intéressant de rap-
propriété contracturante sur les
art il est vraisemblable que la
nt également vis-à-vis des pro-
ctibles) à point isoélectrique
ence sa propriété mitoclasique
on action sur les substrats cyto-
le prochain mémoire de cette

é est celui qui a fait l'objet d'une
) et qu'en conséquence, les résul-
onstratifs.

série si les complexes hétéropolaires étudiés ici possèdent une acti-
vité AT Pasique.

Existence d'un complexe insoluble Polymixine-sérumalbumine.

En vue de généraliser la réaction protéine à point isoélectrique ba-
sique-protéine à point isoélectrique acide nous avons cherché si un
antibiotique polypeptidique basique, comme la polymixine, pouvait
former des complexes insolubles avec de l'albumine par exemple et
nous avons effectivement constaté que de tels complexes pouvaient
exister réellement.

Allure du phénomène. — Soit une solution en eau distillée de sulfate
de polymixine B à 445 mg/100 cm³ (1 mg = 4635 unités antibiotiques)
(P) et une préparation d'albumine amorphe à 2496 mg N/1 également
en eau distillée (A). Les lectures opacimétriques sont faites en lumière
bleue à 21°C après 15 minutes. On obtient :

— pour 2,5 cm³ A + 2,5 cm³ P : 125.
— pour 2,5 cm³ A + 2,5 cm³ eau distillée : 75 (témoin de co-
loration (*)).

Superprécipitation par la colchicine. — Substrats utilisés :

— même préparation de polymixine que ci-dessus (P)
— albumine amorphe à 2464 mg N/1 (A)
— l-colchicine à 10⁻³ g/l $\approx$ M/400 (C)

Lectures opacimétriques en lumière rouge à 22°C (Tableau V).

TABLEAU V.

Désignation	Valeurs opacimétriques après		
	5 min	45 min	90 min
4 cm ³ A + 1 cm ³ C	9	7	8
4 cm ³ P + 1 cm ³ C	10	8	9
4 cm ³ A + 1 cm ³ P + 1 cm ³ eau dist....	19	23	31
4 cm ³ A + 1 cm ³ P + 1 cm ³ C	22	28	39

On voit que le phénomène est moins net ici qu'avec le système sal-
mine-albumine par exemple, toutefois l'intensité de la précipitation est
également considérablement moindre avec la polymixine qu'avec la
salmine ou l'histone. Il est possible que la colchicine renforce l'activité
antibiotique de la polymixine B.

CONCLUSIONS.

Les principaux arguments chimiques découlant des expériences rap-
portées dans ce mémoire qui tendent — indirectement — à démontrer

(*) Jaune.

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10.

notre hypothèse sur la constitution du fuseau achromatique sont les suivantes :

- 1) la réaction est instantanée et a lieu dans des pH physiologiques ;
- 2) la forte condensation entre les molécules des constituants caractérisée par la formation de gels plastiques de solubilité considérablement plus faible que celle des constituants est en bon accord avec les résultats de MIRSKY [56] sur la perte de solubilité des protéines ovulaires après la fécondation (*) et avec ceux de BELAR [57] qui a montré par microchirurgie le caractère relativement rigide des cônes du fuseau (**) ;
- 3) la combinaison — aussi bien diluée en milieu aqueux que sous forme de gel — est labile dans certaines conditions pouvant être physiologiques (influence des sels) ;
- 4) la colchicine superprécipite nos systèmes (augmente l'état de moindre dispersion caractérisé par la précipitation — opalescence —) et on peut concevoir que son activité mitoclasique est liée à cette action superprécipitante : dans les cellules soumises à son action les complexes préfibrillaires en formation seraient immédiatement « fixés », d'où une inhibition plus ou moins totale dans le développement des structures radiantées.

RÉSUMÉ.

1) On a étudié photométriquement le comportement de complexes protéine à point isoélectrique basique (sulfate d'histone ou sulfate de salmine) — protéine à point isoélectrique acide (sérumalbumine amorphe ou cristallisée ou sérumeuglobuline) en milieu aqueux vis-à-vis du pH et de la salinité (NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ainsi que les proportions de combinaison.

2) La colchicine superprécipite ces systèmes protéiques tandis que l'adénosinotriphosphate de sodium les dissout.

3) Ces complexes se présentent sous forme de gels après centrifugation. On peut obtenir des fils par insufflation des gels ou par rotation des complexes dilués dans de l'eau (particulièrement dans l'entrefer d'un appareil à biréfringence d'écoulement). Jusqu'à présent nous n'avons pu obtenir de contraction de ces formations ni par l'ATP ni par la colchicine. Les fils obtenus par rotation forment des pellicules par centrifugation à grande vitesse. Ces complexes se présentent en définitive comme des *protéines de structure*.

4) La polymixine B forme également un complexe insoluble en eau distillée avec la serumalbumine, ce complexe superprécipite aussi par la colchicine. Cette propriété de la colchicine paraît caractéristique des substances globulinoïdiques.

SUMMARY.

1) One have studied photometrically the behavior of complexes protein of basic isoelectric point (histone sulfate or salmin sulfate)

(*) On peut considérer que lorsqu'ils sont engagés dans le complexe, chacun des constituants est *dénaturé* puisqu'il a perdu ses propriétés propres.

(**) A rapprocher de ceci : 1) les résultats de RUNNSTRÖM [33, 34, 35] ; 2) notre première conception sur les constituants du fuseau — intervention des lipides — ; 3) ce que nous disions au début de ce mémoire sur le mode de liaison entre les protéines à point isoélectrique acide et protéines à point isoélectrique basique (présence de lipides).

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, N°s 9-10.

protein of acidic isoelectric point (amorphous or crystallized serumalbumine or serum-euglobuline) in aqueous medium towards pH and salinity (Na Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) as well as proportions of combination.

2) Colchicine superprecipitates these protein systems whereas adenosintriphosphate dissolves them.

3) These complexes appear in gel form after centrifugation. One can obtain threads by insufflation of gels or by rotation of complexes delucted in water (particularly inside the jacket of a streaming birefringence apparatus). We have been unable to obtain contraction of those formations neither by ATP nor by colchicine. The threads obtained by rotation form pellicles by high speed centrifugation. Those complexes occur finally like *structure-proteins*.

4) Polymixine B gives also an insoluble complex in distilled water with serumalbumine, this complex superprecipitates also by colchicine. This property of colchicine seems characteristic of globulinoidic substances.

ZUSAMMENSETZUNG.

1) Das Verhalten von Komplexen Eiweiss mit basischem isoelektrischem Punkt (Histonsulfat oder Salminsulfat) — Eiweiss mit saurem isoelektrischem Punkt (gestaltloses oder kristallisiertes Serum-eiweiss oder Serum-euglobulin) in wässriger Phase in Bezug auf pH und Salzinhalt (NaCl , KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sowie die Bindungsverhältnisse sind photometrisch untersucht worden.

2) Diese Eiweissysteme werden von Colchicin überausgefällt und von Natriumadenosintriphosphat gelöst.

3) Nach Zentrifugierung bieten sich diese Komplexe in Form von Gel dar. Es ist möglich, durch Einblasen des Gels oder Drehen der im Wasser gelösten Komplexe (hauptsächlich in Zwischenraum eines Stromdoppelbrechungsapparats) Fäden zu erhalten. Es ist uns bisher nicht gelungen, weder durch Adenosintriphosphat noch durch Colchicin eine Zusammenziehung dieser Komplexe zu erhalten. Nach hochrascher Zentrifugierung bilden die durch Drehen erhaltenen Fäden Filme. Diese Komplexe bieten sich schliesslich als *Strukturproteine* dar.

4) In destilliertem Wasser bildet auch Polymixin einen unlöslichen Komplex, wird auch von Colchicin überausgefällt. Diese Eigenschaft der Colchicin scheint für die globulinoidischen Substanzen charakteristisch zu sein.

(Laboratoire de Physiologie du Service de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur de Paris).

Nous adressons nos sincères remerciements au Professeur et à Madame TRÉFOUEL ainsi qu'au D^r JACOB pour les grandes facilités de travail qu'ils nous ont accordées.

BIBLIOGRAPHIE.

1. RYBAK (B.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 226, 1145.
 2. RYBAK (B.). — Congrès de Chimie biologique de Paris, octobre 1948 ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 464.
 3. BELLING (J.). — *J. Genet.*, 1927, 18, 177.
- BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1950, 32, nos 9-10.

4. MIRSKY (A. E.) et POLLISTER (A. W.). — *Biol. Symposia*, 1943, 10, 247.
5. MIRSKY (A. E.) et RIS (H.). — *J. Gen. Physiol.*, 1948, 31, 7.
6. LAMS (H.). — *Acad. Roy. Belgique, Cl. Sc., Sér. in-4°*, 1910, 2, 1-144 (IX pl.).
7. HARVEY (E. B.). — *Biol. Bull.*, 1936, 71, 101.
8. Voir par exemple BANGA (I.) et SZENT-GYÖRGYI (A.). — *Enzymologia*, 1940, 9, 111.
9. BENSLEY (R. R.). — *Science*, 1942, 96, 389.
10. CLAUDE (A.). — *Science*, 1940, 91, 77.
11. CLAUDE (A.). — *Cold Spring Harbor Symp.*, 1941, 9, 263.
12. CLAUDE (A.). — *Biol. Symposia*, 1943, 10, 111.
13. PASTEELS (J.). — *Experientia*, 1948, 4, 150.
14. KOSSEL (A.). — *Deutsche med. Wochenschr.*, 1894, n° 7.
15. HUNTER (A.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1907, 53, 526.
16. GAY (F. P.) et ROBERTSON (T. B.). — *J. Exp. Med.*, 1912, 16, 470.
17. UGGAS (B. af). — *Bioch. Ztschr.*, 1914, 61, 469.
18. SCHMIDT (C. L. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1916, 25, 63.
19. ROBERTSON (T. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1913, 13, 499.
20. PRZYLECKI (S. J.). — *Proc. Roy. Soc. (London)*, sér. B, 170, 65.
21. RYBAK (B.) et GROS (F.). — *Experientia*, 1948, 4, 396.
22. RYBAK (B.), GROS (F.) et GRUMBACH (F.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 77, 148.
23. RYBAK (B.), GRUMBACH (F.) et GROS (F.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 77, 237.
25. HOPPE-SEYLER (F.). — *Med. Chem. Untersuch.*, 1886, 216.
26. OSBORNE (T. B.) et CAMPBELL (G. F.). — *Conn. Agric. Exp. Stat. Report*, 1900, 23.
27. PLIMMER (R. H. A.). — *J. Chem. Soc.*, 1908, 93, 1500.
28. CHICK (H.). — *Biochem. J.*, 1914, 8, 404.
29. MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 11, 485.
30. GRABAR (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 57, 1094.
31. WILSON (E. B.). — *Arch. f. Entwickel. d. Org.*, 1902, 13, 353.
32. RUNNSTRÖM (J.). — *Acta Zoologica*, 1924, 5, 345.
33. RUNNSTRÖM (J.). — *Ark. f. Zool.*, 1924, 16, n° 27.
34. RUNNSTRÖM (J.). — *Ark. f. Zool.*, 1924, 16, n° 30.
35. BRÖNSTED (J. N.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1923, 4, 718.
36. DEYSSON (G.) et DEYSSON (M.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1950, 230, 121.
37. Voir GAVAUDAN (P.). — *Pharmacodynamie de l'inhibition de la caryocinèse*, Paris, 1947.
38. JOLY (M.) et RYBAK (B.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1950, 230, 1214.
39. WEBER (H. H.). — *Ergeb. Physiol.*, 1933, 36, 109.
40. SZENT-GYÖRGYI (A.). — *Chemistry of muscular contraction*, New-York, 1947.
41. Voir FREY-WYSSLING (A.). — *Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives*, New-York, 1948.
42. NÄGELI (C.). — *Ostwalds Klassiker*, n° 227, Leipzig, 1928.
43. SEIFRIZ (W.). — *Bot. Rev.*, 1945, 11, 231.
44. MONNE (L.). — *Ark. f. Zool.*, 1946, 38 A, n° 15.
45. LEHMANN (F. E.) et BISS (R.). — *Rev. Suisse Zool.*, 1949, 56, 264.
46. BELAR (K.). — *Arch. f. Entwkm.*, 1929, 118, 359.
47. SCHAEDE (R.). — *Planta*, 1930, 11, 243.
48. HARDY (W. B.). — *J. Physiol.*, 1899, 24, 158.
49. BÜTSCHLI (O.). — *Arch. f. Entwkm.*, 1901, 11, 499.
50. FISCHER (A.). — *Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas*, Iena, 1899.
51. FISCHER (A.). — *Arch. f. Entwkm.*, 1901, 13, 1.
52. WALKER (C. E.) et ALLEN (M.). — *Proc. Roy. Soc. London*, 1927, ser. B, 101, 468.
53. DANIELI (J. F.) in BOURNE (G.). — *Cytology and Cell physiology*, Oxford (1945), 2 id., p. 68 et suiv.
54. BENEDEN (E. van). — *Arch. Biol.*, 1883, 4, 265.
55. FÉLIX (K.) et MAGER (A.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1937, 249, 126.
56. MIRSKY (A. E.). — *Science*, 1936, 84, 2180.
57. BELAR (K.). — *Arch. f. Entwkm.*, 1929, 118, 359.
58. JOLY (M.). — *Koll. Ztschr.*, 1949, 115, 83.
59. FREY (E.). — *Arch. f. Path. u. Pharm.*, 1923, 98, 21.