

ANALYSE QUANTITATIVE DES AMINOACIDES AROMATIQUES
(TYROSINE ET PHÉNYLALANINE) CONTENUS DANS
L'HYDROLYSAT D'UNE FAIBLE QUANTITÉ DE PROTÉINE
RADIOACTIVE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER*

ROGER MUNIER

Service de biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)

Au cours de l'étude du mode d'action des analogues structuraux d'aminoacides sur les biosynthèses effectuées par *Escherichia coli*¹, nous avons dû rechercher une méthode de dosage des aminoacides et spécialement des aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) applicable à une faible quantité de protéine radioactive. Ayant utilisé la chromatographie quantitative sur papier pour l'étude des hydrolysats chlorhydriques de protéine, nous nous sommes aperçu que la teneur en tyrosine variait considérablement, pour une même protéine, d'un hydrolysat à l'autre. Tout se passait comme si la tyrosine était l'objet d'une dégradation irrégulière (voir également²).

Nous nous proposons de montrer ici:

(1) que la tyrosine se transforme partiellement en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique de très faibles quantités de protéine;

(2) que la teneur en tyrosine d'une protéine, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique, n'est plus variable d'un hydrolysat à l'autre lorsqu'on tient compte de sa transformation partielle en 3-chlorotyrosine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits

¹⁴C-Fructose

Le ¹⁴C-fructose, uniformément marqué, utilisé nous a été fourni par le laboratoire des Radioisotopes de l'Institut Pasteur.

Aminoacides naturels

Les aminoacides naturels utilisés, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, étaient des produits commerciaux (Hoffman La Roche) chromatographiquement purs.

Tyrosines chlorées

Les tyrosines chlorées ont été préparées par synthèse:

3,5-Dichlorotyrosine: Cet aminoacide a été préparé par chloruration directe de

* Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation Rockefeller de New-York, du "Jane Coffin Childs Memorial Fund for medical research".

la tyrosine (8 atomes de chlore pour une molécule de tyrosine selon la suggestion de THOMPSON³). Le chlore produit par addition lente (3 h 45 min) de 24 ml d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,22$) à des cristaux de permanganate de potassium est entraîné, par un courant d'azote, dans une solution de 6 g de L(—)-tyrosine (32 ml d'acide chlorhydrique 2 N + 1328 ml d'acide acétique pur). Lorsque le dégagement de chlore a cessé, le contact de ce dernier avec la solution de tyrosine est maintenu pendant 72 h. Après élimination sous vide (40°, évaporateur rotatif) de l'acide acétique et de l'eau, le résidu sec est entraîné, sur filtre de Buchner, par de l'éther sec (exempt de peroxydes). Une partie importante de l'acide acétique restant, et des impuretés très oxydables est entraînée dans le filtrat. Le résidu insoluble est dissout dans un peu d'eau. La 3,5-dichlorotyrosine est précipitée (en amenant le pH de la solution au pH isoélectrique de la chlorotyrosine) par addition ménagée d'ammoniaque. Le précipité est cristallisé dans l'eau chaude et traité par une très faible quantité de charbon actif (Activite 50 XL*). Après cinq cristallisations dans l'eau et séchage à 105°, le produit obtenu répond à la formule: $C_9H_9O_3NCl_2 \cdot H_2O$ [% de C: 40.4 (théorique), 40.2 (trouvé); % d'H: 4.12 (théorique), 4.10 (trouvé)].

3-Chlorotyrosine: Après préparation (par chloruration directe de la L(—)-tyrosine: 4 atomes de chlore pour une molécule de tyrosine selon la suggestion de THOMPSON³) d'un mélange environ équimoléculaire de 3-chlorotyrosine et de 3,5-dichlorotyrosine, la 3-chlorotyrosine est séparée de la 3,5-dichlorotyrosine par chromatographie sur colonne (3 × 31 cm) de résine cationique Dowex 50-x4 (200-400 mesh, forme hydrogène) dans l'acide chlorhydrique 2.5 N.

La résine échangeuse d'ions était préparée, après tamisage à l'état humide de la résine "minus 400 mesh", selon le procédé de MOORE ET STEIN⁴. Le mélange des

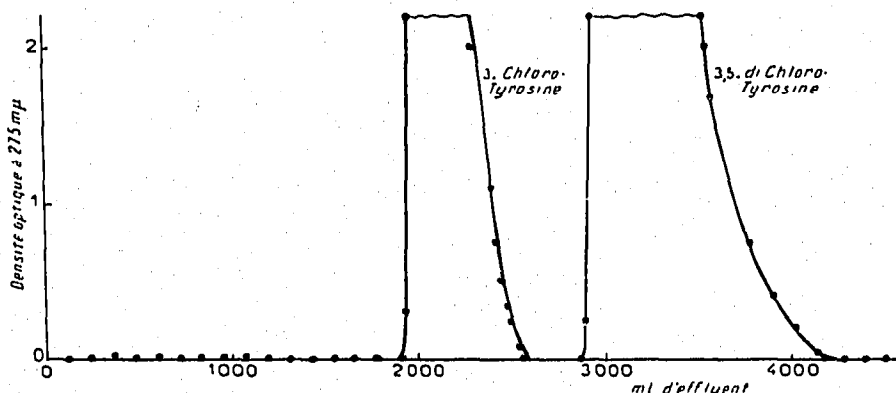


Fig. 1. Séparation de la 3-chlorotyrosine de la 3,5-dichlorotyrosine par chromatographie préparative sur colonne (3 × 31 cm) de résine cationique Dowex 50-x4 (200-400 mesh), forme hydrogène; échantillon soumis à la chromatographie: 1.3 g du mélange des chlorotyrosines en solution dans l'acide chlorhydrique 2.5 N (15 ml); élution par l'acide chlorhydrique 2.5 N: 1 ml/min; fractions collectées: 23 ml.

chlorotyrosines (1.3 g) en solution dans l'acide chlorhydrique 2.5 N (15 ml) est versé au sommet de la colonne de résine. Les substances sont éluées par l'acide chlor-

* Société Activite, 66 Rue d'Argenteuil, Paris 16e.

hydrique 2.5 *N* (1 ml/min; fractions collectées: 23 ml). La concentration des substances dans l'éluat est déterminée par mesure de la densité optique à 275 m μ (spectrophotomètre de Beckman) des fractions collectées (voir Fig. 1). Les fractions contenant la 3-chlorotyrosine sont amenées à sec sous vide. Le résidu sec est dissout dans un volume d'eau minimum. La 3-chlorotyrosine est précipitée par addition ménagée d'ammoniaque (précipitation au pH isoélectrique), traitée (en solution aqueuse chaude) par une trace de charbon actif (Activite 50 XL), recristallisée dans l'eau. Le produit obtenu, après séchage à 105°, répond à la formule: C₉H₁₀O₃NCl·H₂O [% de C: 46.2 (théorique), 46.9 (trouvé); % d'H: 5.15 (théorique), 5.15 (trouvé)].

Les deux chlorotyrosines obtenues étaient chromatographiquement pures (système solvant de BOISSONNAS⁵; révélation au réactif à la ninhydrine).

Protéines radioactives

Protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs: La protéine utilisée dans cette étude était la fraction protéinique principale d'*E. coli*². Un échantillon *radioactif* (uniformément marqué au carbone) de cette protéine était obtenu à partir d'*E. coli* souche ML 308 (poids sec bactérien initial: 76 μ g/ml)* cultivé sur milieu (10 ml) minéral No. 63 (KH₂PO₄: 13.6 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; MgSO₄·7H₂O: 0.2 g; FeSO₄·7H₂O: 0.0005 g; pH 7.0; eau q.s.p. 1000 ml) contenant 1200 μ g de ¹⁴C-fructose uniformément marqué (40 μ C). Après agitation de la culture à 37° jusqu'à épuisement de la source de carbone et d'énergie (30 à 45 min) les bactéries (poids sec bactérien final: 114 μ g/ml) étaient fractionnées selon la technique de ROBERTS *et al.*² en vue de la préparation de la fraction protéinique principale d'*E. coli*: traitement à l'eau à 5% d'acide trichloracétique (0°; 30 min); à l'alcool à 75% (50°; 30 min), à l'eau à 5% d'acide trichloracétique chaud (100°; 30 min; 2 fois). Dans ces conditions, le résidu solide final du fractionnement représente 400 à 600 μ g de fraction protéinique principale d'*E. coli* (12 μ C environ).

Protéines dont un seul des aminoacides n'est pas radioactif: Ces échantillons de fraction protéinique principale d'*E. coli* dont un seul des aminoacides n'est pas radioactif (tous les autres aminoacides sont uniformément marqués dans tous leurs carbones) sont obtenus dans des conditions similaires à celles décrites précédemment et selon le principe des expériences de compétition isotopique introduit et développé par ROBERTS *et al.*².

Ici le ¹⁴C-fructose et l'acide aminé naturel (tyrosine, phénylalanine ou tryptophane; concentration finale: 10⁻³ M) sont ajoutés simultanément à la suspension bactérienne lavée*. Par suite de la compétition et des échanges pendant la biosynthèse des protéines entre l'acide aminé radioactif endogène, biosynthétisé par *E. coli* en présence de ¹⁴C-fructose, et l'acide aminé non radioactif exogène, la protéine isolée ne contient pas plus de 2 à 5% de l'acide aminé radioactif (voir^{2, 1} et Tableau I de ce Mémoire).

* Culture en phase exponentielle de croissance sur fructose, lavée par centrifugation avec du milieu minéral 63 frais (3 fois).

Hydrolyse des protéines radioactives et préparation des échantillons à soumettre à la chromatographie

Dans les conditions où on observe la formation de 3-chlorotyrosine (voir au paragraphe: RÉSULTATS), le résidu final du fractionnement selon ROBERTS *et al.*² (fraction protéinique principale) est dissout dans l'acide chlorhydrique 12 *N* et transféré quantitativement dans un tube (2.5 ml d'acide). Après addition de 2.5 ml d'eau, le tube est scellé et son contenu soumis à l'hydrolyse (100°, 20 h). Après élimination de la plus grande partie de l'acide chlorhydrique à 45° sous courant d'azote (exempt d'oxygène), le résidu sec repris par quelques gouttes d'eau est à nouveau amené à sec (3 fois) puis maintenu sous vide en présence de potasse (4 à 6 jours).

Analyse chromatographique des aminoacides de l'hydrolysats de protéine radioactive

L'hydrolysats de protéine radioactive est soumis à l'analyse chromatographique sur papier (Whatman No. 4; feuille 56 × 46 cm) à deux dimensions avec écoulement contenu des solvants de BOISSONNAS⁵.

1^{re} dimension: Butanol tertiaire-méthylethylcétone-eau (4:4:2).

2^e dimension: Butanol tertiaire-méthanol-eau (4:5:1). La chromatographie est interrompue lorsque le spot jaune de la phénolsulfone phtaléine (marqueur coloré à valeur de R_F légèrement plus élevée que celle de l'acide le plus rapide) a atteint l'extrémité de la feuille de papier. Dans ces conditions, les spots de phénylalanine et de 3-chlorotyrosine sont nettement séparés.

Chromatographie sur papier quantitative

Une quantité d'hydrolysats de protéine (correspondant à 3 μC de protéine, soit environ 100 à 150 μg) est soumis à l'analyse chromatographique*; après repérage sur le chromatogramme des divers spots d'acides radioactifs grâce à un radioautogramme (film Kodak-kodirex 30 × 40 cm), les morceaux de papier portant les spots sont découpés dans le chromatogramme. Les acides sont élués par 2 à 8 ml d'eau (43°; 12 h, une goutte de chloroforme par tube) dans un tube bouché; 0.8 ml d'éluat sont versés dans une cupule d'aluminium; après séchage du contenu de la cupule, sa radioactivité est déterminée au compteur de Geiger (efficacité du compteur: 5.5%; reproductibilité entre deux comptages: 2%; reproductibilité entre deux pipettages et comptages d'un même éluat: 5%).

Connaissant l'activité spécifique par carbone du ¹⁴C-fructose (uniformément marqué) fourni à la culture d'*E. coli*, le nombre de carbones dans chaque acide, l'activité radioactive de chaque spot d'acide (d'un même chromatogramme), il est possible de calculer le nombre de moles des divers acides présents dans

* La méthionine est oxydée (eau oxygénée à 11 volumes) dans le spot d'hydrolysats de départ. Le chevauchement des spots de méthionine et phénylalanine est ainsi évité. Au cours de cette oxydation, il ne se forme pas de chlorotyrosine bien que les acides soient sous forme de chlorhydrates. Cette oxydation ne doit pas être trop poussée si l'on veut éviter que la 3-chlorotyrosine, présente dans l'hydrolysats, ne s'oxyde partiellement en formant deux substances visibles, sur les chromatogrammes, sous forme de spots radioactifs allongés.

les protéines d'*E. coli* pour une mole de valine. Si nécessaire, les résultats sont corrigés pour les pertes qui ont lieu au cours de la chromatographie.

RÉSULTATS

Domaine d'application de la méthode

On pourra s'étonner de voir réaliser des hydrolyses d'aussi faibles quantités de protéine par des volumes d'acide chlorhydrique relativement importants. Il nous faut préciser ici les conditions expérimentales très particulières qui nous ont obligé à mettre au point cette méthode.

Lorsque nous effectuons des expériences de compétition isotopique (principe et technique développés par ROBERTS *et al.*²) destinées à étudier l'influence des agents exogènes (intermédiaires métaboliques, antimétabolites non radioactifs, etc.) sur la composition en aminoacides radioactifs des protéines biosynthétisées par *E. coli*, ce microorganisme croissant sur milieu minéral contenant une seule source de carbone et d'énergie uniformément radioactive, nous obtenons 400 à 600 μg de protéine radioactive (12 μC)*. En vue de son hydrolyse, cette faible quantité de protéine doit être quantitativement transvasée dans un tube (voir mode opératoire page 527) et, dans ces conditions, il est difficile d'utiliser une quantité d'acide chlorhydrique 12 N inférieure à 2.5 ml.

Divergence des teneurs en phénylalanine et tyrosine d'une même protéine d'un hydrolysats à l'autre

Lorsque nous avons voulu étudier la composition en aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) de ces hydrolysats par chromatographie quantitative sur papier, nous n'avons obtenu que des résultats apparemment incohérents.

En effet, si on opère sur papier Whatman No. 1 (26 \times 26 cm) en utilisant les conditions de développement du chromatogramme décrites par BOISSONNAS⁵, la teneur en phénylalanine et tyrosine d'une même protéine paraît varier d'un hydrolysats à l'autre. Si le développement chromatographique est réalisé avec le même système solvant mais dans les conditions de développement du chromatogramme décrites page 527 (3 μC d'hydrolysats correspondant à 150 μg de protéine analysé par chromatogramme) on observe la présence constante d'un spot (α) radioactif de mobilité très voisine de celle de la phénylalanine et ne correspondant à aucun aminoacide connu (voir le cliché α de la Fig. 3). Dans ce dernier cas, la teneur en phénylalanine est constante, tandis que la teneur en tyrosine d'une même protéine varie d'un hydrolysats à l'autre.

Pour des hydrolysats correspondant à une même quantité de protéine, l'importance du spot α varie dans de larges limites d'une expérience à l'autre (voir Tableau I).

Transformation partielle de la tyrosine en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique d'une faible quantité de protéine radioactive

Le cliché de gauche de la Fig. 2, correspond à l'analyse chromatographique d'un mélange des aminoacides aromatiques isolés d'un hydrolysats de fraction protéinique

* Conditions opératoires similaires à celles décrites, page 526.

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINOACIDES DE LA FRACTION PROTÉINIQUE PRINCIPALE D'*E. coli*. EFFET DE L'HYDROLYSE, PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE 6 N, SUR LA TRANSFORMATION DE LA TYROSINE EN 3-CHLOROTYROSINE

Aminoacides radioactifs (en moles par mole de valine dans la protéine)	Protéines biosynthétisées en présence de ^{14}C -fructose*															
	seul												et de			
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	L-Phénylalanine (10^{-3} M)	L-Tyrosine (10^{-3} M)	L-Tryptophane (10^{-3} M)
Valine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phénylalanine	0.49	0.49	0.48	0.51	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02***	0.51	0.50
Tyrosine**	0.33	0.33	0.33	0.35	0.34	0.37	0.37	0.37	0.33	0.33	0.33	0.33	0.31	0.32	0.0***	0.34
Leucine + isoleucine	2.10	2.04	1.90	2.17	1.95	1.97	1.98	1.91	1.90	1.92	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.95
Tyrosine transformée en																
3-chlorotyrosine (%)	13	14	16	16	12	9	15	94	69	28	37	—	—	—	—	23
Expérience No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

* Fraction protéinique principale d'*E. coli* provenant d'une culture d'*E. coli* ML 308 (poids sec bactérien initial: 760 μg) sur 1,200 μg de ^{14}C -fructose uniformément marqué (40 μC) en présence et en l'absence d'acides aminés naturels (L-phénylalanine, L-tyrosine ou L-tryptophane: 10^{-3} M).

** Teneur en tyrosine déterminée en tenant compte de sa transformation partielle en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse (400 à 600 μg de protéine radioactive/5 ml d'acide chlorhydrique 6 N, 100°, 20 h).

*** Protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs sauf la phénylalanine ou la tyrosine respectivement (voir page 526).

principale d'*E. coli* (1 mg de protéine/1 ml d'acide chlorhydrique 6 N, 20 h, 100°) par chromatographie sur charbon (Activite 50 XL) selon FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER⁶. On peut remarquer la présence, sur ce chromatogramme d'un spot (réaction positive à la ninhydrine) ayant la mobilité du spot radioactif α présent sur le cliché a de la Fig. 3.

À la suite de cette observation, nous avons pensé que ce spot (α) correspondait à un produit de transformation de la tyrosine. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons soumis à l'hydrolyse chlorhydrique (100 μ g de protéine/1 ml d'acide chlor-

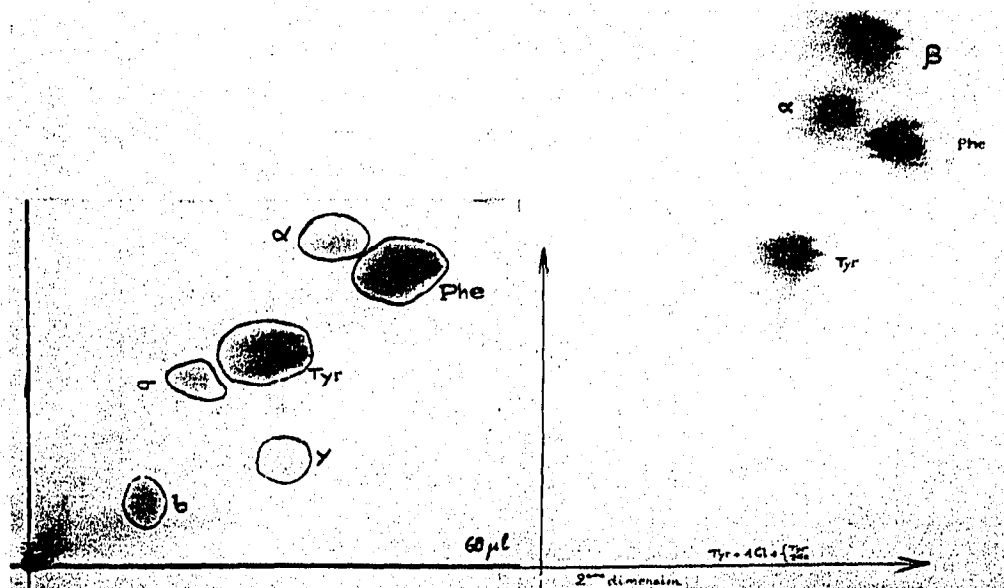


Fig. 2. Mise en évidence de la 3-chlorotyrosine dans un hydrolysate chlorhydrique de protéine. *Cliché de gauche*: mélange des aminoacides aromatiques obtenu par chromatographie sur charbon à partir de l'hydrolysate chlorhydrique de protéine (1 mg de protéine/1 ml d'acide 6 N, 100°, 24 h). Remarquer la présence de 3-chlorotyrosine (α) donnant une réaction positive à la ninhydrine. *Cliché de droite*: chromatogramme de substances pures montrant les mobilités relatives de la 3-chlorotyrosine (α), de la 3,5-dichlorotyrosine (β), de la phénylalanine (Phe), de la tyrosine (Tyr) dans le système solvant de BOISSONNAS⁵.

hydrique 6 N, 100°, 20 h) des protéines radioactives dont un seul des aminoacides n'était pas radioactif (voir le mode de préparation de ces protéines, page 526). Le spot (α) radioactif est présent sur les chromatogrammes des hydrolysats de protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs (cliché a, Fig. 3) et des protéines dont tous les aminoacides sont radioactifs à l'exception du tryptophane (cliché d, Fig. 3) ou de la phénylalanine (cliché c, Fig. 3); il est absent lorsque ces protéines radioactives ne referment pas de tyrosine radioactive (cliché b, Fig. 3).

Comme le montre le cliché photographique de la Fig. 4, relatif à un co-chromatogramme d'acides aromatiques purs (phénylalanine, tyrosine, 3-chlorotyrosine de synthèse: 8-15 μ g) et d'éluats de morceaux de papier contenant la substance radioactive du spot α (0.022 μ C, 0.54 μ g) le spot radioactif de la substance α se superpose dans ses moindres détails au spot violet de la 3-chlorotyrosine après révélation à la ninhydrine.

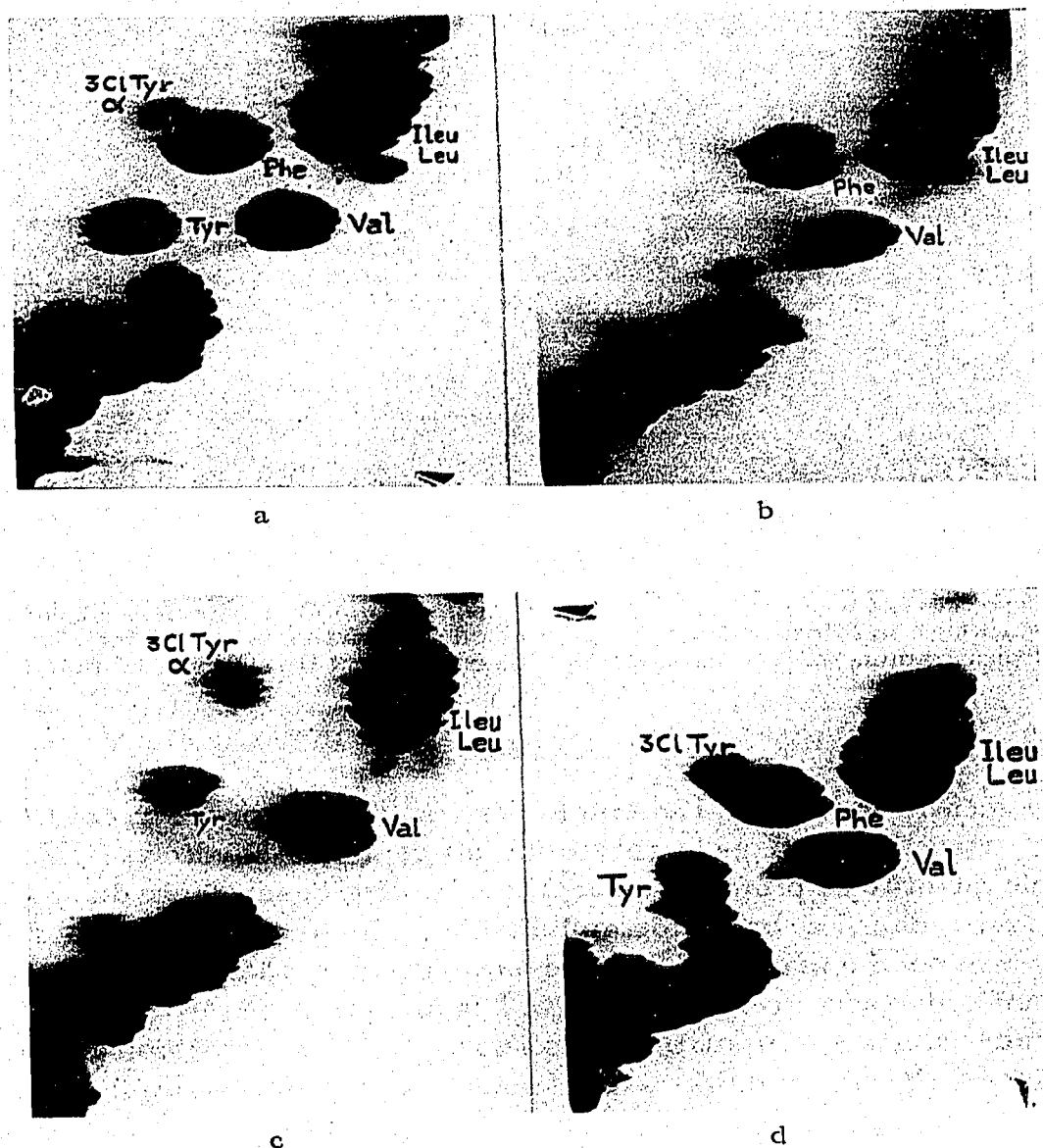


Fig. 3. Analyse chromatographique d'hydrolysats de protéines radioactives dont tous les aminoacides sont radioactifs (cliché a), et de protéines radioactives ne contenant pas de tyrosine radioactive (cliché b), de phénylalanine radioactive (cliché c) ou de tryptophane radioactif (cliché d); hydrolysats de fraction protéinique principale d'*E. coli* (400 à 600 μg de protéine radioactive/5 ml d'acide chlorhydrique 6 N, 100°, 20 h); chaque radioautogramme correspond au chromatogramme de l'hydrolysats de 150 μg de protéine environ (300,000 imp./min, compteur de Geiger à 5.5% de rendement). Noter l'absence simultanée de tyrosine et de 3-chlorotyrosine (a) radioactives sur le chromatogramme b.

Nous en concluons que la tyrosine se transforme partiellement en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique. S'il en est ainsi, la teneur en tyrosine d'une protéine ne doit plus varier d'un hydrolysats à l'autre lorsqu'on tient compte de cette transformation. Comme on peut le voir au Tableau I, cette prévision se vérifie parfaitement: quel que soit le pourcentage de tyrosine transformée en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique la teneur en tyrosine des protéines, calculée en tenant compte de cette transformation, reste constante.

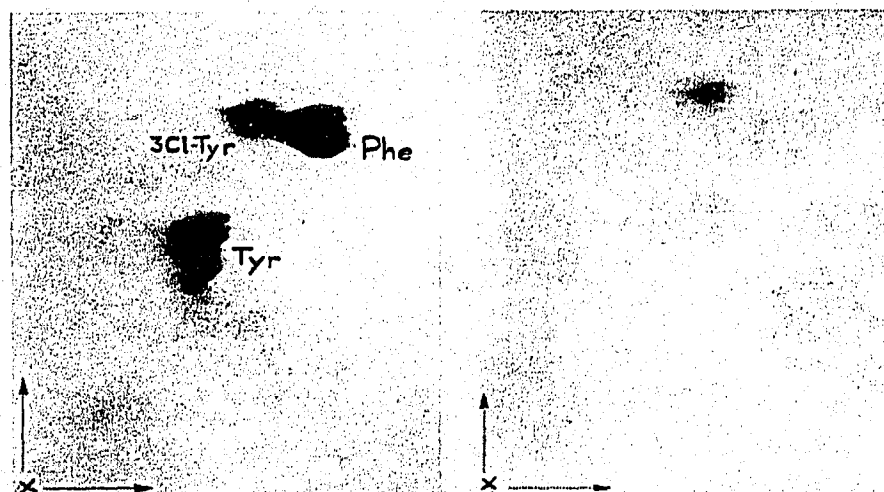


Fig. 4. Identification de la substance du spot radioactif α par co-chromatographie avec la 3-chlorotyrosine de synthèse. *Cliché de gauche*: chromatographie d'un mélange de substances pures, phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), 3-chlorotyrosine (3Cl-Tyr) et d'éluat de morceaux de papier portant le spot de la substance radioactive (α) ayant la mobilité chromatographique de la 3-chlorotyrosine (mise en évidence des substances à l'aide du réactif à la ninhydrine). *Cliché de droite*: radioautogramme du chromatogramme précédent avant révélation à la ninhydrine.

DISCUSSION

Comme le montre nettement l'ensemble des résultats rapportés précédemment, la tyrosine se transforme en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique d'une faible quantité de protéine radioactive. En effet, la substance du spot α qui est toujours présent dans les chromatogrammes d'hydrolysats chlorhydriques de protéine et qui ne correspond à aucun aminoacide naturel connu, a les propriétés:

- (1) d'un aminoacide: réaction positive à la ninhydrine;
- (2) d'une substance aromatique: isolement sélectif par chromatographie sur charbon dans les mêmes conditions que les aminoacides aromatiques;
- (3) d'un dérivé de la tyrosine: la teneur en tyrosine d'une protéine n'étant constant d'un hydrolysats à l'autre (quelle que soit l'importance de la substance α) que si l'on admet, pour le calcul, que la substance α est un produit de transformation simple de la tyrosine;
- (4) de la 3-chlorotyrosine: par co-chromatographie, le spot radioactif de la substance α se superpose dans ses moindres détails au spot violet (révélation à la ninhydrine) de la 3-chlorotyrosine de synthèse.

Cette transformation partielle de la tyrosine en 3-chlorotyrosine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique est due vraisemblablement au chlore libre contenu dans l'acide. Il faut cependant signaler, que dans certains cas, un pourcentage très élevé de la tyrosine est transformé en 3-chlorotyrosine (voir expérience 8, 9, 10, 11 du Tableau I).

Si cette transformation apparaît très importante dans le cas qui nous intéresse, c'est que la quantité de protéine soumise à l'hydrolyse est faible par rapport à la quantité d'acide mis en jeu (environ 100 μg de protéine/ml d'acide chlorhydrique

6 N). Ce sont les conditions habituelles de travail lorsqu'on manipule sur de faibles quantités de protéines (400–600 μg ; 12 μC) à haute activité radioactive spécifique en vue de leur analyse par chromatographie quantitative sur papier.

RÉSUMÉ

Lors de l'hydrolyse de faibles quantités de protéines radioactives par l'acide chlorhydrique, on observe la formation de 3-chlorotyrosine.

C'est seulement en tenant compte de cette transformation que les résultats obtenus pour la teneur en tyrosine d'une protéine sont identiques d'un hydrolysats à l'autre.

SUMMARY

During the hydrolysis of small quantities of radioactive proteins with hydrochloric acid 3-chlorotyrosine is formed.

Constant values for the tyrosine content of a protein can only be obtained if this transformation is taken into account.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. MUNIER ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, sous presse.
- ² R. B. ROBERTS, P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON ET R. J. BRITTEN, *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, Carnegie Inst., Washington, 1955.
- ³ E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 440.
- ⁴ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- ⁵ R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1966.
- ⁶ C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.

Reçu le 6 mai 1958