

*Synthèse du linoléate et de l'arachidonate de cholestéryle doublement marqués **

L. BARDOU¹ et A. CRASTES DE PAULET

Laboratoire de Biochimie — Institut de Biologie — Montpellier
et Laboratoire de Biochimie du Centre Régional de Lutte contre le Cancer —
Montpellier

SUMMARY

The transesterification method used by MAHADEVAN and LUNDBERG for cholesterol esters synthesis, following the scheme cholesterol acetate + fatty acid methyl ester → cholesterol ester + methyl acetate, has been adapted to the microscale (1 to 10 μ M) imposed by the use of labelled molecules of high specific activity.

This method is particularly suitable for the synthesis of polyethylenic fatty acid cholesterol esters : it has enable us to obtain the following esters : 4^{14}C and $7\alpha^3\text{H}$ cholesteryl linolenate and arachidonate, cholesteryl linolenate U^{14}C and arachidonate (5-6, 8-9, 11-12, 14-15) ^3H ; the mixture of these two types of esters of high specific activity give rise to series of doubly labelled esters, at the user's convenience.

RESUME

La méthode de transestérification utilisée par MAHADEVAN et LUNDBERG pour synthétiser des esters du cholestérol selon : acétate de cholestéryle + ester méthylique d'acides gras → ester du cholestérol + acétate de méthyle, a été adaptée aux microquantités (1 à 10 μ M) de l'échelle imposée par l'emploi de molécules marquées d'activités spécifique élevée.

Cette méthode particulièrement adaptée aux synthèses d'esters d'acides gras polyéthyléniques a permis d'obtenir les esters suivants : linoléate et arachidonate de cholestéryle 4^{14}C ou $7\alpha^3\text{H}$, linoléate U^{14}C de cholestéryle et arachidonate (5-6, 8-9, 11-12, 14-15) ^3H de cholestéryle : le mélange de ces 2 types d'esters de haute activité spécifique permet de réaliser une série d'esters doublement marqués, à la convenance de l'expérimentateur.

* Reçu le 29 décembre 1964.

¹ Actuellement Attaché de Recherches à l'I. N. S. E. R. M.

INTRODUCTION. — OBJET DU TRAVAIL

Le métabolisme des esters du cholestérol fait actuellement l'objet d'études intensives : étude de l'estérfication du cholestérol par des homogénats de foie *in vitro* [1], hydrolyse de ces esters par des homogénats de foie [2], par le sérum [3], études du turnover des différents esters *in vivo* dans le plasma humain [4], biosynthèse des esters du cholestérol, des chylomicrons [5] ¹.

Ces études sont généralement effectuées soit au moyen de cholestérol $7\alpha^3\text{H}$ [1], soit au moyen d'acides gras ^{14}C [5], parfois au moyen d'esters (stéarate, oléate, linoléate de cholestéryle $7\alpha^3\text{H}$) parfois au moyen d'un précurseur du cholestérol, généralement l'acide mévalonique 2^{14}C [4].

Des effets remarquables de la nature de l'acide gras sur certains de ces métabolismes ont pu être ainsi mis en évidence.

Toutefois ces études dissocient toujours les 2 « moitiés » de l'ester, acide gras et stérol, et l'on n'a jamais, de ce fait, une idée complète du métabolisme de ces esters. De plus, ces études au moyen de molécules traceurs ont été limitées dans le groupe des esters d'acides gras polyéthyléniques, à l'acide linoléique. Il nous a paru intéressant de pouvoir étendre la série des esters marqués aux acides tri et tétraéthyléniques par union du cholestérol 4^{14}C ou $7\alpha^3\text{H}$ au linoléate et arachidonate de cholestéryle inactif, ou inversement, le mélange des 2 types d'esters réalisant une série d'esters doublement marqués à la convenance de l'expérimentateur.

Les seuls acides gras tri et tétraéthyléniques marqués dont nous avons pu disposer étaient l'acide linoléique U^{14}C et l'acide arachidonique (5-6; 8-9; 11-12; 14-15) ^3H ; la série des molécules que nous avons synthétisé s'est trouvée de ce fait limitée à 6 esters : linoléate et arachidonate de cholestéryle 4^{14}C , linoléate et arachidonate de cholestéryle $7\alpha^3\text{H}$, linoléate U^{14}C de cholestéryle, arachidonate (5-6; 8-9; 11-12; 14-15) ^3H de cholestéryle.

L'objet de ce travail est de rapporter nos essais pour ces différents esters.

Les méthodes généralement utilisées pour la synthèse de l'ester du cholestérol unissent le stérol libre à l'acide gras, son anhydride ou son chlorure d'acide [6, 7, 8, 9, 10, tableau I.] Elles s'avèrent malheureusement difficilement utilisables avec les acides gras polyéthyléniques, extrêmement fragiles : en particulier il est difficile d'obtenir le chlorure d'acide correspondant.

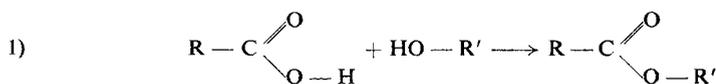
Certes, la méthode de WOOD [11] permet encore d'obtenir le chlorure de linoléyle et récemment encore PINTER [12] l'a utilisée pour synthétiser le chlorure de linoléyle et d'arachidonyle; mais les rendements sont mauvais,

¹ Cf. également « Recent Studies on the metabolism of cholesterol esters » (DEWITT and S. GOODMAN) et « Origin and role of plasma cholesterol esters » (L. GIDEZ) in Gordon Research Conferences. 15-19 juin 1964.

même à l'échelle du gramme, et nous n'avons pu transposer cette méthode à l'échelle du mg, échelle imposée par la conservation d'une activité spécifique élevée lorsqu'on se propose par exemple de synthétiser le linoléate U¹⁴C de cholestéryle.

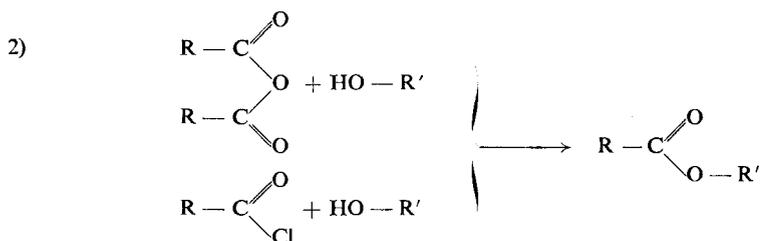
Puisque ce qui limite les possibilités des méthodes utilisant le chlorure d'acide est précisément la difficulté d'obtenir du chlorure d'acide à l'échelle semi-micro (et il en est évidemment de même pour l'anhydride d'acide) des méthodes utilisant l'acide gras libre pourraient mieux convenir : telle la

TABLEAU I



— PAGE et RUDY [6] ($\theta = 200^\circ/t = 3 \text{ à } 4 \text{ h}/\text{CO}_2$)

— CATALINE et Coll. [7] ($\theta = 130 - 140^\circ/t = 3 \text{ h } \text{C}_6\text{H}_6 + \text{H}$)



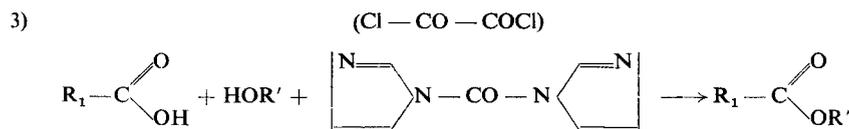
— PAGE et RUDY [6]

— SWELL et TREADWELL [9]

— FRONT et DAUBERT [8]

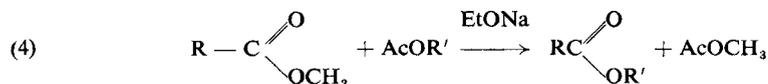
— LABARRERE et Coll. [10]

— WOOD et Coll. [11]



— KAUFMANN et Coll. [14]

(R₁ = hydroxy ou cetoacide)



— MAHADEVAN et LUNDBERG [15]

R = chaîne carbonée d'acides gras

R' = cholestérol

méthode de STAAB [13] utilisée par KAUFMANN [14] dont le principe est basé sur la condensation directe du stérol et de l'acide gras libre en présence de NN' carbonyl diimidazole. Mais cette méthode est complexe et nous a paru très difficilement transposable à l'échelle semi-micro utilisée. Notre choix s'est finalement porté sur la méthode de transestérification utilisée par MAHADEVAN et LUNDBERG [15] pour le même type de synthèse que celle que nous avons en vue mais pour des quantités de l'ordre du gramme.

Le principe de cette méthode est le suivant : la transestérification est réalisée entre l'acétate de cholestéryle et l'ester méthylique ou éthylique de l'acide gras par chauffage sous vide (30 mm Hg) et faible courant d'azote d'un mélange de ces 2 substances, sans solvant, avec une faible quantité d'éthylate ou de méthylate de sodium jouant le rôle de catalyseur.

Cette méthode nous a paru pouvoir être adaptée aux problèmes que posent les microsynthèses de produits radioactifs puisqu'elle utilisait deux dérivés, acétate de cholestéryle et méthyl ester de l'acide gras, que l'on sait obtenir quantitativement (même sur des quantités très faibles) à partir du stérol ou de l'acide gras marqué dont nous disposions.

De nombreux essais en inactif, que nous ne rapporterons pas ici, nous ont permis de préciser les meilleures conditions expérimentales pour des quantités de stérol ou d'acide gras de l'ordre de 1 à 10 μ M, et nous ont conduit à imaginer un dispositif miniature du montage proposé par MAHADEVAN [15] (fig. 1).

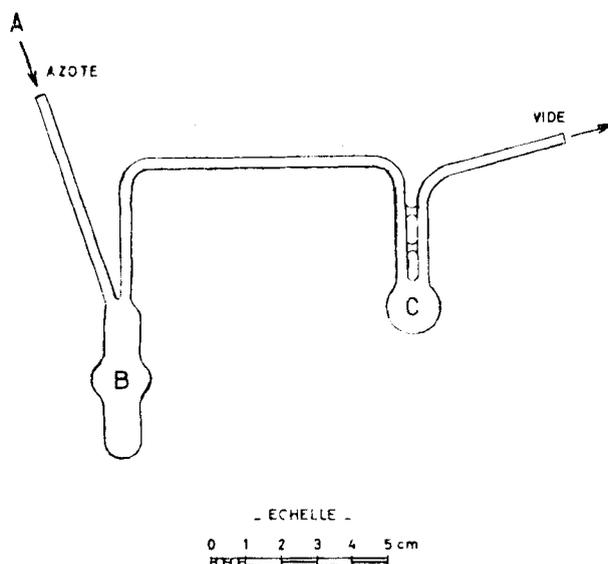


FIG. 1. — Appareil utilisé pour la semi-microsynthèse de l'arachidonate ou du linoléate de cholestéryle.

Le tableau II rassemble les résultats des 6 synthèses effectuées. Ces résultats appellent quelques commentaires :

1. Pour les synthèses 1, 2 et 5, nous avons effectué la réaction avec un dérivé marqué ayant l'activité spécifique maximum sans entraîneur froid.

Pour les synthèses 3 et 4 l'activité spécifique du cholestérol $7\alpha^3\text{H}$ dont nous disposions (1,97 Ci/mM) a été ramenée à 50 mCi/mM par addition de cholestérol froid avant l'acétylation, car nous n'avions pu réussir de synthèse pour des quantités (0,2 mg) d'acétate de cholestéryle inactif de l'ordre de celle que représentait la totalité de l'acétate de cholestérol $7\alpha^3\text{H}$ dont nous aurions disposé si nous avions conservé l'activité spécifique originale.

Pour la synthèse 6, l'activité spécifique élevée (139 mCi/mM) de l'acide linoléique U^{14}C a été ramenée à 10 mCi/mM par addition d'acide linoléique froid *avant la méthylation*.

2. L'activité spécifique des esters est identique à celle du composé traceur mis en réaction puisque à ce stade de la réaction nous n'ajoutons pas d'entraîneur.
3. Compte tenu des conditions de la réaction on peut estimer que les rendements sont satisfaisants, de l'ordre de 30 à 45 %, même lorsque les proportions de stérol et d'esters méthyliques passent du rapport 1/5 (synthèses 1, 2, 3, 4) au rapport 3/1 (synthèse 5).

Fait exception la synthèse 6 dont le rendement est très bas : nous pensons que ce résultat est en rapport avec la quantité extrêmement faible de substances mises en jeu (10 mg) alors que toutes les autres réactions portent sur des quantités beaucoup plus importantes (18 à 36 mg).

Le rendement pour le linoléate de cholestéryle 4^{14}C est inférieur à celui donné par PINTER [12] (58 % contre 40 %) qui utilise la méthode au chlorure d'oxalyle. Par contre, le rendement pour l'arachidonate de cholestéryle 4^{14}C est supérieur à celui obtenu par cet auteur avec la méthode au chlorure d'oxalyle (30-32 % contre 45 %).

Si l'on compare ces valeurs à celles données par GOODMAN [2] pour le linoléate de cholestéryle $7\alpha^3\text{H}$ (77 %) toujours avec la méthode au chlorure d'oxalyle, on voit que les méthodes utilisant les chlorures d'acides se révèlent de moins en moins rentables lorsque le degré d'insaturation de l'acide gras augmente.

4. Le bilan des réactions ne fait pas état de la récupération des produits marqués qui n'ont pas réagi : la chromatographie sur colonne ou sur plaque de Kieselgel G nous a toujours permis de retrouver la quasi totalité du matériel radioactif mis en jeu, partie sous forme d'esters, partie sous forme d'acétate de cholestéryle (ou de cholestérol) ou sous forme de méthyl-esters (ou d'acides gras libres) selon la nature des traceurs mis en réaction.

TABLEAU II

Synthèse n°	Marquage isotopique	Acétate de cholestéryle		Ester méthylique de l'acide gras				Ester du cholestérol obtenu		Rendement %	
		mg	mCi	Arachidonate de méthyle		Linoléate de méthyle		mg	mCi		Act. Spec. mCi/mM
				mg	mCi	Act. Spec. mCi/mM	Act. Spec. mCi/mM				
1	Stérol 4 ¹⁴ C	5,70	0,333	25	21,17			4,040	0,150	25	45
2	Stérol 4 ¹⁴ C	7,35	0,333	19,4		25,07		4,450	0,133	19,4	40
3	Stérol 7 α ³ H	7,71	0,90	50,0	28,64			4,48	0,333	50	37
4	Stérol 7 α ³ H	7,71	0,90	50,0		26,30		3,26	0,252	50	28
5	Ac. gras H ³	15,14			3,75	10	850	2,375	3	850	28
6	Ac. gras U ¹⁴ C	8,35				1,90	0,065	0,32	0,005	10	8

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. — Matériel

I. — Molécules marquées utilisées.

1) Cholestérol 4^{14}C en solution benzenique : 2 lots : l'un d'activité spécifique 25 mCi/mM (origine « Radio Chemical Centre Amersham »), l'autre d'activité spécifique 19,4 mCi/mM (même origine).

2) Cholestérol $7\alpha^3\text{H}$ en solution benzenique : activité spécifique 1,97 Ci/mM (origine « Radio Chemical Centre Amersham »).

3) Acide linoléique $U^{14}\text{C}$ en solution benzenique : activité spécifique 139 mCi/mM (origine « Radio Chemical Centre Amersham »).

4) Acide arachidonique (5-6; 8-9; 11-12; 14-15) 3H en solution benzenique : activité spécifique : 850 mCi/mM; origine : gracieusement fourni par « Laboratoire de Synthèses Hoffmann-La Roche (Bâle) ».

II. — Autres molécules utilisées :

- 1) Cholestérol « Fluka » puriss U.S.P. cristallisé F = 148-149° (α)²⁰ = -39° , 5 ± 9 (N° A.52.310).
- 2) Linoléate de méthyle « Fluka » puriss (N° A. 55.243).
- 3) Arachidonate de méthyle « Hoffmann-La Roche » (Bâle).

B. — Essais de radioactivité

Toutes les mesures de radioactivité ont été réalisées à l'aide d'un scintillateur liquide Tri-Carb « Packard » 314 FS, par dissolution dans 10 ml de toluène contenant 4 g de 2,5 diphenyl oxazole (P.O.P.) et 0,5 g de 1-4-bis-2(4 methyl 5 phenyl oxazole) (P.O.P.O.P.) par litre de toluène.

Le rendement pour le ^{14}C est de 46 %, et pour le ^3H de 19 %. L'exactitude des mesures effectuées sur les composés ^{14}C et ^3H a été obtenue par l'emploi d'un étalon interne de toluène ^{14}C ou ^3H .

La pureté radiochimique des produits de départ, et de ceux de synthèse, a été vérifiée par autoradiographie sur film Kodak Régulix H.S. type 2, de leur CCM sur Kieselgel G selon la méthode de RICHARDSON et coll. [16].

C. — Synthèse de l'acétate de cholestéryle $7\alpha^3\text{H}$ ou 4^{14}C

Le cholestérol 4^{14}C ou $7\alpha^3\text{H}$ est chauffé 1 heure à reflux avec un mélange à parties égales de benzène anhydre (1 ml) et d'anhydride acétique (1 ml).

La vérification de l'ester synthétisé a été faite par CCM sur Kieselgel G (solvant : Hexane/Ether Isopropylique : 98,5/1,5. Révélateur : anisaldéhyde) et par autoradiographie de cette chromatoplaque. Ont été acétylés par ce procédé :

- 0,5 mCi de cholestérol 4^{14}C d'activité spécifique 25 mCi/mM.
- 0,5 mCi de cholestérol 4^{14}C d'activité spécifique 19,4 mCi/mM.
- 2 mCi de cholestérol $7\alpha^3\text{H}$ d'activité spécifique 50 mCi/mM.

D. — *Méthylation de l'acide linoléique U¹⁴C
et de l'acide arachidonique (5-6; 8-9; 11-12; 14-15) 3 H*

La méthylation de l'acide gras libre est réalisée selon BOWYER et coll. [17] par le méthanol sulfurique à 10 % (10 ml, 1 H à 80°).

Après addition de 20 ml d'eau, on extrait 3 fois avec 10 ml de Pentane. La solution organique est lavée à l'eau jusqu'à pH 7 et séchée sur « Sikkon ». L'ester méthylique est séparé par CCM préparative sur Kieselgel G : rendement 98 %. La pureté de l'ester méthylique obtenu est contrôlée par CCM sur Kieselgel G (solvant : Hexane/Benzène 5/5, Révélateur : anisaldéhyde), et par autoradiographie de cette chromatoplaque.

Nous avons ainsi méthylé : 0,1 mCi d'acide linoléique U¹⁴C d'activité spécifique 10 mCi/mM, et 10 mCi d'acide arachidonique (5-6; 8-9; 11-12; 14-15)³H, d'activité spécifique 850 mCi/mM.

E. — *Réaction de transestérification*

*Méthode générale*¹

A l'aide d'une seringue, on introduit par la tubulure A dans le réservoir B de l'appareil (fig. 1) 1 ml d'éther anhydre contenant en solution :

- a) dans le cas où le produit radioactif est le stérol : pour 1 micromole d'acétate de cholestéryle, 5 micromoles de l'ester méthylique de l'acide gras.
- b) dans le cas où le produit radioactif est l'ester méthylique de l'acide gras : pour 1 micromole d'ester méthylique de l'acide gras, 3 micromoles d'acétate de cholestéryle.

Les différents récipients sont rincés par 2 fois 0,5 ml d'éther anhydre. La solution étherée est ensuite évaporée sous azote à température ambiante. On ajoute alors 100 à 200 micromoles de méthylate de sodium à l'aide d'un tube effilé. L'appareil est alors mis en communication avec le vide, (30 mm de mercure) tout en conservant le balayage d'azote, et l'on chauffe le réservoir B 7 heures à 80-90°.

Une fois la réaction terminée, les produits sont extraits 3 fois avec 5 ml d'éther anhydre. La solution étherée est rapidement filtrée sur verre fritté, et évaporée à sec.

F. — *Séparation et purification des esters*

La séparation des produits de réaction est réalisée soit par chromatographie sur colonne d'acide silicique ou de Kieselgel G soit par CCM préparative sur Kieselgel G.

— dans le cas de la chromatographie sur colonne d'acide silicique (3 g) l'ester du cholestérol est élué par le mélange Pentane/Benzène 9/1; l'acétate de cholestéryle et l'ester méthylique de l'acide gras qui n'ont pas réagi sont élués par le mélange Pentane-Benzène 8/2.

¹ Les détails du mode opératoire ont été donnés dans une publication antérieure [18].

La pureté de chaque fraction est étudiée par CCM sur Kieselgel G (solvant : Hexane/Ether isopropylique : 98,5/1,5, révélateur : anisaldéhyde). Ce procédé a été appliqué aux synthèses 3 et 4 (voir tableau 2).

- dans le cas de la chromatographie sur colonne de Kieselgel G (5g), l'ester du cholestérol est élué par le mélange Hexane/Ether isopropylique 98,5/1,5; chaque fraction est étudiée par CCM sur Kieselgel G (solvant : Hexane/Ether isopropylique 98,5/1,5, Révélateur : anisaldéhyde). Les fractions ester du cholestérol pures en CCM sont réunies. Ce procédé a été appliqué aux synthèses 1 et 2 (voir tableau 2).
- dans le cas de la CCM préparative sur Kieselgel G, le résidu de l'éther est déposé sur une chromatoplaque de 1 mm d'épaisseur sous forme d'une bandelette de 10 cm de long, et encadrée par deux taches témoins (100 μ g) d'un mélange ester méthylique de l'acide gras + ester du cholestérol + acétate de cholestéryle. La chromatoplaque est développée dans le système Benzène/Hexane 5/5. Seules, les parties correspondantes aux témoins sont révélées à l'anisaldéhyde. On repère ainsi la position de l'ester du cholestérol synthétisé.

La zone correspondante est alors récupérée par grattage; la poudre de Kieselgel G ainsi obtenue est extraite par 3 fois 20 ml d'éther anhydre.

Ce procédé a été appliqué aux synthèses 5 et 6 (voir tableau 2).

Des trois procédés de purification et de séparation utilisés, le plus intéressant nous paraît être la CCM préparative. Ce procédé s'adapte en effet parfaitement bien à la séparation de quantités de produit de l'ordre de 10 à 100 mg. La séparation entre l'ester du cholestérol ($R_f = 0,45$) et l'ester méthylique ($R_f = 0,20$) est bonne, et très rapidement obtenue (20 minutes).

G. — Contrôle d'identité

1) La pureté chimique des esters synthétisés a été vérifiée :

- par CCM sur Kieselgel G (solvant : Benzène/Hexane 5/5; Révélateur : anisaldéhyde : un seul spot de $R_f 0,45$).
- par spectrophotométrie I. R. : dépôt de 1 mg de produit sur lame de KBr. Ce procédé évite la contamination des cuves et permet la récupération du produit radioactif déposé : (les spectres I. R. ainsi obtenus sont identiques à ceux d'échantillons d'esters témoins analysés par les procédés spectrophotométriques I. R. usuels (solvant CS_2) (fig. 2, 3, 4 et 5).

2) La pureté radiochimique a été vérifiée par autoradiographie (sur film Kodak régulix H.S. type 2.) de la CCM sur Kieselgel G, selon la technique décrite par RICHARDSON et coll. [16].

H. — Essais de conservation

Les échantillons d'esters du cholestérol marqués au ^{14}C ou 3H sur le stérol ou l'acide gras sont conservés en solution benzénique en ampoules scellées sous vide, maintenues au congélateur à -25° .

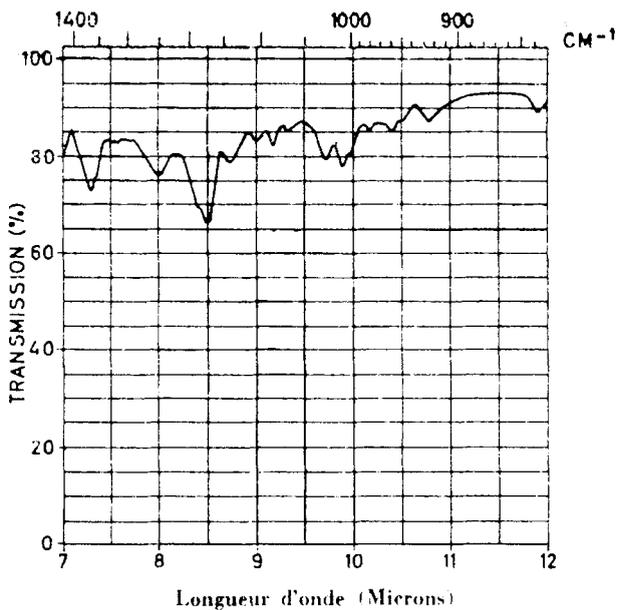


FIG. 2. — Spectre I. R. du linoléate de cholestéryle ⁴14C obtenu par évaporation sur pastille de KBr d'une solution chloroformique de 1 mg de produit.

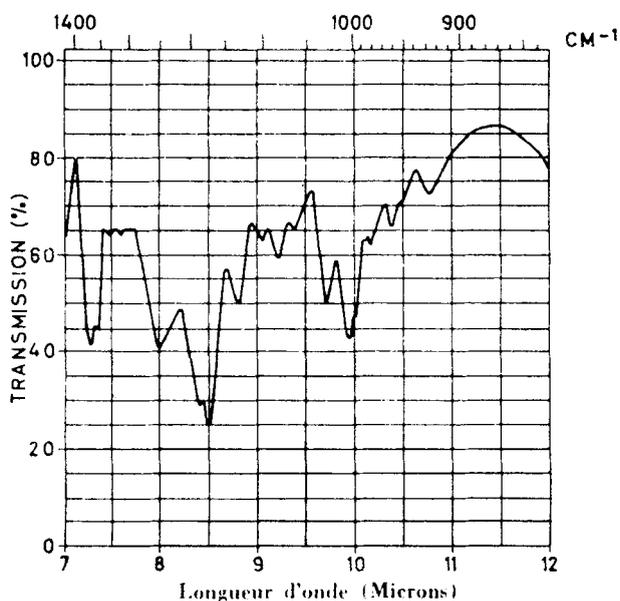


FIG. 3. — Spectre I. R. du linoléate de cholestéryle dans le CS₂ (50 mg/ml).

Au bout de neuf mois, la CCM sur Kieselgel G ne donnait que un seul spot de $R_f = 0,45$. On peut donc affirmer l'absence de produit d'auto-oxydation ou de radiolyse.

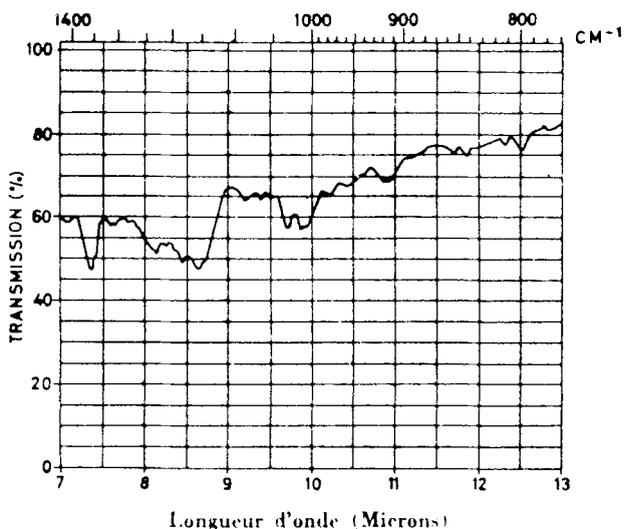


FIG. 4. — Spectre I. R. de l'arachidonate de cholestéryle ^{414}C obtenu par évaporation sur pastille de KBr d'une solution chloroformique de 1 mg de produit.

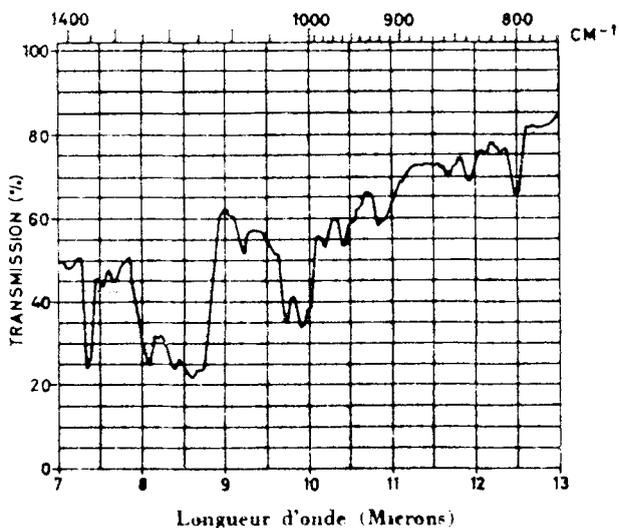


FIG. 5. — Spectre I. R. de l'arachidonate de cholestéryle dans le CS_2 (50 mg/ml).

BIBLIOGRAPHIE

1. DEYKIN, D. and GOODMAN, DEWITT, S. — *Biochem. and Biophys. Research communications*, **8**, n° 6 : 411 (1962).
GOODMAN, DEWITT, S., DEYKIN, D. and SHIRATORI, T. — *J. of Biol. Chem.*, **239** : 1335 (1964).
2. DEYKIN, D. and GOODMAN, DEWITT S. — *J. of Biol. Chem.*, **237** : 3649 (1962).
3. SWELL, L. and TREADWELL, C. R. — *J. Biol. Chem.*, **185** : 349 (1950).
GLOMSET, J. A. — *Biochem. Biophys. Acta*, **65** : 128 (1962).
GLOMSET, J. A. — *Biochem. Biophys. Acta*, **70** : 389 (1963).
4. GOODMAN, DEWITT S. and SHIRATORI, T. — *Biochem. Biophys. Acta*, **84** : 104 (1964).
GOODMAN, DEWITT S. — *J. of Invest.*, **43** : 2026 (1964).
GOODMAN, DEWITT S. and SHIRATORI, T. — *J. Lipid Research*, **5** : 578 (1964).
5. KARMEN, A., WHYTE, M., GOODMAN, DEWITT S. — *J. Lipid Research*, **4** : 312 (1963)
6. PAGE, I. H. and RUDY, H. — *Biochem. Z.*, **220** : 305 (1930).
7. CATALINE, E. L., WORRELL, L., JEFFRIES, S. F. and ARONSON, S. A. — *J. Am. Pharm. Assoc.*, **33** : 107 (1944).
8. FRONT, J. S. and DAUBERT, B. F. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **67** : 1509 (1945).
9. SWELL, L. and TREADWELL, C. R. — *J. Biol. Chem.*, **212** : 141 (1955).
10. LABARRERE, CHIPAULT, J. C. and LUNDBERG, W. O. — *Anal. Chem.*, **30** (1958).
11. WOOD, T. R., JACKSON, E. L., BALDWIN, A. R. and LONGENECKER, H. E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **66** : 287 (1944).
12. PINTER, K. G., HAMILTON, J. G. and MULDRY, J. E. — *J. Lipid. Research*, **5** : 273 (1964).
13. STAAB, H. A. — *Angew. Chem.*, **71** : 194 (1959).
14. KAUFMANN, H. P., GARLOFF, H., DEICKE, F. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **11** : 1037 (1962).
15. MAHADEVAN, V. and LUNDBERG, W. O. — *J. Lipid Research*, **1** : 552 (1962).
16. RICHARDSON, G. S., WELIKY, I., BATCHELDER, N., GRIFFITH, M. and ENGEL, L. L. — *J. of Chromatography*, **12** : 115 (1963).
17. BOWYER, D. E., LEAT, W. M. F., HOWARD, A. N. and GRESHAM, G. A. — *Biochem. Biophys. Acta*, **70** : 423 (1963).
18. CRASTES DE PAULET, A. et BARDOU, L. — Actes de la conférence sur les méthodes de préparation et de conservation des molécules marquées — Euratom, Bruxelles, 13-16 nov. 1963 — Presses Académiques Européennes, 87-96, 1964.