

NOUVEAUX ACIDES AMINES LIBRES DE *AFZELIA BELLA*: *TRANS*-HYDROXY-4-L-PROLINE ET *TRANS*-CARBOXY-4-L-PROLINE*

ANDRÉ WELTER†, MICHEL MARLIER‡ et GASTON DARDENNE‡

†Chimie organique, Université de Liège, Sart-Tilman par Liège 1, 4000, Belgique; ‡Chimie organique et biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux 5800, Belgique

(Received 15 July 1977)

Key Word Index—*Azalia bella*; Leguminosae; seeds; *trans*-4-hydroxy-L-proline; *trans*-4-carboxy-L-proline; *cis*-4-hydroxymethyl-L-proline; 4-methylene-DL-proline; 4-methylene-L-glutamic acid.

Abstract—Two new free imino acids have been isolated from seeds of *Azalia bella*: *trans*-4-hydroxy-L-proline and *trans*-4-carboxy-L-proline. They are accompanied by relatively large quantities of proline, pipecolic acid, 4-methylene-DL-proline, *cis*-4-hydroxymethyl-L-proline and 4-methylene-L-glutamic acid. Small amounts of acetylornithine are also present. It is the first time that *trans*-4-hydroxy-L-proline has been found as a component of the free amino pool of plants.

INTRODUCTION

La proline et la *trans*-hydroxy-4-L-proline sont les seuls imino acides trouvés normalement dans les protéines végétales. Un nombre relativement important d'acides aminés à noyau pyrrolidine ont été isolés, à l'état libre, du règne végétal. Ces substances fournissent des colorations spécifiques à la ninhydrine et à l'isatine, ce qui rend leur localisation aisée.

La *trans*-méthyl-4-L-proline a été isolée de poires [1] et elle se trouve en petites quantités dans d'autres fruits de la famille des Rosaceae [2, 3]. Cette forme *trans* est aussi présente dans les antibiotiques grisélomycine [4] et monamycine [5] tandis que la forme *cis* aurait été trouvée dans l'antibiotique ICI 13959 [6]. La *cis*-méthyl-3-L-proline a été signalée dans un peptide antibiotique [7, 8] et la *cis*-méthyl-5-L-proline est un constituant de l'actinomycine Z5 [9]. L'hydroxy-3-oxo-4-méthyl-5-proline est présente dans l'actinomycine Z1 [10]. La méthylène-4-DL-proline a été isolée de graines d'*Eriobotrya japonica* par Gray et Fowden [11]. Ces auteurs signalent également sa présence dans les graines d'un genre voisin, *Raphiolepis*. Trois autres dérivés de la proline ont aussi été identifiés dans des antibiotiques: la propyl-4-*N*-méthyl-L-proline [12], l'éthyl-4-*N*-méthyl-L-proline [13] et la dichloro-3,4-proline [14, 15]. La *cis*-hydroxyméthyl-4-L-proline a été isolée de pommes et de poires [16, 17]. Récemment, la *cis*-hydroxyméthyl-4-L-proline a été associée à la *trans*-hydroxyméthyl-4-proline (64% forme D et 36% forme L) dans les graines d'*Eriobotrya japonica* [11, 18]. La *trans*-hydroxy-4-L-proline n'a jamais été trouvée à l'état libre dans les plantes: elle a été isolée pour la première fois dans un hydrolysate de gélatine [19]; on la trouve aussi dans de nombreuses protéines et notamment dans le collagène [20] et dans les protéines de *Santalum album* [21]. La *cis*-hydroxy-4-L-proline a été isolée à l'état libre dans les feuilles de santal [22, 23].

Sa distribution dans les différentes espèces de Santalaceae a été étudiée [24–26]. Ce composé *cis* a aussi été caractérisé dans *Fagus sylvatica* [27] et dans des peptides de *Ammannia phalloides* et *Agaricus phalloides* [28]. La *cis*-hydroxy-4-D-proline est présente dans l'étamycine [29]. L'oxo-4-proline ne se trouverait que dans des antibiotiques [30]. La *trans*-hydroxy-3-L-proline a été isolée de graines et de jeunes pousses de *Delonix regia* [31]. Elle a été observée dans le collagène [32–34] et dans des éponges [35–37]. Les isomères *cis* et *trans* ont été identifiés dans la télomycine [38, 39]. La *cis*(*exo*)-méthano-3,4-L-proline est l'acide iminé principal de *Aesculus parviflora* [40]. Les protéines de diatomées, *Navicula pelliculosa*, contiennent la *cis*-2,3-*trans*-3,4-dihydroxy-L-proline [41, 42]. Deux dérivés basiques de la proline ont été identifiés: la carboxy-3-amino-3-proline (cucurbitine) dans *Cucurbita moschata* [43] et la *cis*-amino-3-L-proline de différentes espèces de *Morchella* [44]. L'amino-3-proline a aussi été trouvée dans la viomycidine [45]. Très peu d'acides iminés acides ont été observés dans la nature. Nous citerons l'acide kaïnique et l'acide allo-kaïnique (carboxy-méthyl-3-isopropényl-4-L-proline) de *Digena simplex* [46–48], l'acide domoïque (carboxyméthyl-3-(2-carboxy-1-méthylhexane-1,3-diényl)-4-L-proline) de *Chondria armata* [49] et la *trans*-carboxy-5-L-proline d'algues rouges marines [50]. Comme dérivés de la proline, il faut encore citer l'amino-1-D-proline isolée sous forme de dipeptide [51], l'hydroxy-4-*N*-méthyl-L-proline de *Afrormosia elata* [52] trouvée dans la farine d'arachides [53] et dans l'écorce de *Croton gubougia* [54]. Un imino-alcool, qui pourrait être un intermédiaire de synthèse de l'acide α iminé correspondant, a été isolé de *Derris elliptica*. Il s'agit de la dihydroxyméthyl-2,5-dihydroxy-3,4-pyrrolidine [55].

Dans le cadre de nos études sur la répartition des acides aminés libres des légumineuses [56], nous venons d'isoler, pour la première fois, deux dérivés de la proline présents à l'état libre. Il s'agit de la *trans*-hydroxy-4-L-proline et de la *trans*-carboxy-4-L-proline. Les graines d'*Azalia bella* contiennent aussi de grosses quantités de proline, d'acide pipécolique, de méthylène-4-DL-proline

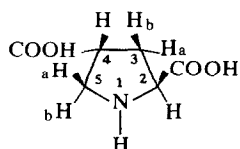
*Part 17 in the series 'Acides aminés libres des légumineuses'. For part 16, see Despontin, J., Marlier, M. and Dardenne, G. (1977) *Phytochemistry* 16, 387.

et dans une proportion moindre, de la *cis*-hydroxyméthyl-4-L-proline et de l'acide méthylène-4-L-glutamique. Une substance qui migre comme l'acétyl-5-ornithine est aussi présente. Plusieurs composés inconnus qui réagissent en violet ou en jaune à la ninhydrine et dont un réagit comme la méthylène proline à l'isatine sont décelables en traces.

Ce premier isolement de la *trans*-hydroxy-4-L-proline à l'état libre doit être signalé dans le contexte de l'étude de Kuttan et Radhakrishnan qui ont montré que, dans *Santalum album*, la *cis*-hydroxy-4-L-proline était synthétisée par hydroxylation directe de la proline [57].

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'étude de la distribution des acides aminés libres de la fraction soluble dans l'éthanol aqueux des graines de *Azalia bella* Harms (Caesalpinioideae) a permis par 2D PC et par HVE à pH 3,6, de mettre en évidence une tache de nature indéterminée et se révélant en jaune avec la ninhydrine et en bleu-vert avec l'isatine. A la chromatographie, elle migre comme la glycine au butanol et au niveau de la thréonine au phénol pH 4,2. A l'électrophorèse, elle se comporte comme un acide aminé plus acide que l'acide aspartique. Après purification de l'extrait hydro-alcoolique, le résidu d'acides aminés a été fractionné sur une colonne de Dowex 1 \times 8, forme AcO⁻ dans H₂O. Après séparation des acides aminés neutres par H₂O, les composés acides ont été élués par HOAc 2 N. Le nouveau produit a été purifié par chromatographie préparative sur papier et ensuite recristallisé.



Le test au nitroprussiate-acétaldéhyde, caractéristique des amines secondaires, est positif [58]. Le spectre IR présente une bande intense à 1725 cm⁻¹, ce qui démontre la présence d'un groupe carboxyle non ionisé. Le spectre de masse de l'acide aminé libre donne un pic moléculaire $m/e = 159,0535$ (C₆H₉NO₄ = 159,1474). Le fragment à $m/e = 114,0557$ (C₅H₈NO₂ = 114,0358) est dû à la perte de —COOH; cette fragmentation est typique des pyrrolidines α substituées [59, 60]. Le dérivé TMS fournit un pic moléculaire à $m/e = 375$ correspondant à la fixation de 3 groupes triméthylsilyles.

Les résonances observées en ¹³C RMN sont attribuables aux atomes de carbone d'un dérivé de la proline substituée, en position 3 ou 4, par un groupe carboxyle [61] (voir partie expérimentale). La substance a aussi été étudiée par ¹H RMN. L'attribution des multiplets aux protons sur les carbones cycliques est évidente grâce à l'examen des déplacements chimiques, des surfaces intégrées et des multiplicités observées. (voir Tableau 1). Ces résultats fixent la substitution du groupe carboxyle en position-4 de la proline. Le système de 6 noyaux couplés a été analysé suivant le procédé d'Abraham-McLaughlan [62]. Le spectre a été décomposé en un système ABMX avec AB = H_{3a}, H_{3b}; M = H₂ et X = H₄. Ce dernier proton fait en outre partie d'un système A'B'X comprenant H_{5a}, H_{5b} et H₄. Les paramètres obtenus par cette analyse ont été confirmés par double irradiation sur

Tableau 1. ¹H RMN de la *trans*-carboxy-4-L-proline

	H ₂	H _{3a}	H _{3b}	H ₄	H _{5a}	H _{5b}
δ (D ₂ O)	4,30	2,58	2,42	3,34	3,65	3,62
Multiplicités observées	4	16	7	8		
Double résonance	+	8	7	8		
	4	8	+	4		
δ (D ₂ O + TFA)	4,62	2,74	2,59	3,49	3,72	3,72
J (Hz, D ₂ O)		$J_{3a-3b} = 14,05$		$J_{5a-5b} = 12,01$		
		$J_{3a-2} = 7,08$		$J_{3a-4} = 4,82$		
		$J_{3b-2} = 8,72$		$J_{5b-4} = 5,65$		

Les spectres de la carboxyproline ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 270 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au 2,2,3,3-tétradeutério-3-(triméthylsilyl) propionate de Na

les résonances H₂ et H₄. Ne disposant que des valeurs des constantes de couplages vicinales d'un seul des quatre diastéréoisomères possibles, la comparaison de celles-ci avec celles de dérivés *cis* et *trans* de la proline substituée en position 4 ne permettent pas de déterminer avec certitude la stéréochimie de la molécule [62, 63]. L'étude de diffraction des rayons X de l'acide iminé à l'état cristallin fixe les substituants en position *trans* [64]. Ce résultat confirme ainsi le fait que l'anhydride interne n'a pu être formé. Les valeurs des pouvoirs rotatoires et l'effet Cotton positif observé montrent que nous sommes en présence d'un L-imino acide; ce qui établit dès lors sa configuration absolue: *trans*-carboxy-4-L-proline ou 2(S), 4(R)-dicarboxypyrrolidine.

La carboxy-4-L-proline complète la liste déjà longue de dérivés de la proline, principalement ceux substitués en position 4. L'intérêt de la découverte de ces nouveaux composés n'est plus à souligner car, par comparaison avec le rôle physiologique que jouent certains acides iminés, la carboxy-4-proline pourrait aussi présenter des propriétés antimétaboliques intéressantes. La présence de ces différents dérivés et en particulier de *cis*-hydroxyméthyl et de *trans*-carboxyproline dans la même plante suggère un mécanisme de biosynthèse particulier surtout, comme nous l'avons signalé, que la *cis*-hydroxyproline est biosynthétisée par hydroxylation directe de la proline. Du point de vue chimiotaxonomique, cette découverte est intéressante. En effet, les Caesalpinioideae étant les plus primitives des Légumineuses, la découverte de ces substances caractéristiques des Rosaceae, confirme les relations phylogénétiques entre cette famille et les Leguminosae. Ceci est un argument en faveur du rattachement des Legumineuses à l'ordre des Rosales (Maréchal, comm personnelle).

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. Les graines de *Azalia bella* proviennent du Zaïre.

Méthodes d'analyses. La 2D PC sur papier Whatman 3 MM a été réalisée en utilisant comme solvants le *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (15 3.2) et le phénol saturé par un tampon à pH 4.2 (acide citrique-Na₂HPO₄, 2H₂O, 0.08 M). R_{A1} , COOH-4-Prol-BuOH = 0,57; PhOH = 0,79. HVE a été réalisé à pH 3,6; 70V/cm; 90 min; les mobilités par rapport à l'anode sont en cm. Ac.glut., 1,3; Ac.asp., 3,8. COOH-4-Pro., 5,2. Les spectres de ¹³C RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker HX 90E à 22,63 MHz.

Isolement de la carboxy-4-proline. Les graines de *A. bella* (1750 g) ont été grossièrement broyées et extraites par 3 fois 1,5 l. de CHCl_3 . Elles ont alors été pulvérisées finement et extraites avec 21 l. d'EtOH à 50%. L'extrait filtré a été purifié sur une colonne de Lewatit S 1080, H^+ , 50–70 mesh, 5×60 cm. Après passage de la solution alcoolique, la résine a été lavée à l'EtOH 50% et à l'eau. Les acides aminés ont ensuite été élués par la pyridine 1 N. Après évaporation à sec, le résidu a été repris par le minimum d'eau et les acides aminés ont été fixés sur une colonne de Dowex 1×8 , forme AcO^- , 200–400 mesh, 4×90 cm. Les acides aminés neutres ont été élués par H_2O et les acides aminés acides ont été désorbés par HOAc 2 N. La substance passe directement après l'acide aspartique. Elle a été purifiée par chromatographie préparative sur papier (PhOH pH 4,2) et ensuite recristallisée dans un mélange EtOH- H_2O (240 mg) ^{13}C RMN. δ (TMS interne) dans $\text{D}_2\text{O} = \text{C}_2$, 61,5; C_3 , 33,0; C_4 , 43,2; C_5 , 48,3; α COOH, 174,0; COOH, 176,8 ppm; dans $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA} = \text{C}_2$, 59,6; C_3 , 31,7; C_4 , 41,8; C_5 , 47,9; α COOH, 170,9; COOH, 175,4 ppm. $[\alpha]_D^{20} = -46,2^\circ$ (c 1,2, H_2O), $[\alpha]_D^{20} = -9,7^\circ$ (c 1,1, HCl 1 N). Un effet Cotton positif a été observé par la mesure des courbes de dichroïsme circulaire : $\lambda_{\text{max}} = 213$ nm, $\Delta\epsilon = 0,58$ (0,075 M H_2O); $\lambda_{\text{max}} = 208$ nm, $\Delta\epsilon = 0,99$ (0,069 M HCl 1 N).

Isolement de l'acide méthylène-4-L-glutamique. 70 mg de substance ont été séparés sur Dowex 1×8 , AcO^- . Le spectre IR est tout à fait identique au produit de référence.

Isolement des acides aminés neutres. La fraction neutre provenant de l'éluat par H_2O sur la colonne de Dowex 1×8 a été passée sur une colonne de Dowex 50 W $\times 8$, forme H^+ et élue par HCl 1 N (4×100 cm). Après séparation en groupes, les imino acides ont été séparés par chromatographie préparative sur papier avec comme solvants le BuOH- $\text{HCOOH}-\text{H}_2\text{O}$ et le PhOH pH 4,2. Nous avons ainsi isolé la proline, l'acide pipécolique, la méthylène-4-DL-proline (1200 mg), la cis-hydroxyméthyl-4-L-proline (86 mg) et la trans-hydroxy-4-L-proline (200 mg). Tous ces imino acides ont été recristallisés plusieurs fois et leur structure confirmée par spectrographie IR. Ils sont chromatographiquement purs et leurs spectres IR sont tout à fait identiques à ceux d'échantillons de référence (publiés également dans la littérature) [65, 66a]. Nulle trace de cis-hydroxy-4-proline ni de trans-hydroxyméthyl-4-proline n'a été détectée à HVE—pH 1,9—70 V/cm, 3 hr. Méthylène-4-DL-proline : $[\alpha]_D^{20} = -0,2^\circ$ (c 5,1, H_2O), Litt. : $[\alpha]_D^{20} = +0,5$ (c 3,1, H_2O) [11]. cis-Hydroxyméthyl-4-L-proline : $[\alpha]_D^{20} = -74,1^\circ$ (c 2,46, H_2O), Litt. : $[\alpha]_D^{20} = -75,4^\circ$ (c 0,4, H_2O) [18]. trans-Hydroxy-4-L-proline : $[\alpha]_D^{25} = -75,7^\circ$ (c 0,81, H_2O), Litt. : $[\alpha]_D^{25} = -75,9^\circ$ (c 2, H_2O) [66b].

Remerciements.—Nous tenons à remercier MM. les Professeurs Casimir J. (Gembloux) et Jadot J. (Université de Liège) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, de même que Mr. le Professeur P. O. Larsen (Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhague) qui a permis à l'un de nous (GD) de séjourner dans son laboratoire où le spectre de masse a été pris grâce à l'amabilité du Dr. Lars Dalggaard. Les spectres ^1H et ^{13}C RMN ont été enregistrés par le Professeur C. Pedersen, Organic Chemical Institute, Technical University of Denmark. Nous le remercions.

REFERENCES

- Hulme, A. C. (1954) *Nature* **174**, 1055.
- Burroughs, L. F. (1960) *J. Sci. Food Agr.* **11**, 14.
- Burroughs, L. F., Dalby, S., Kenner, G. W. et Sheppard, R. C. (1961) *Nature* **189**, 394.
- Terlain, B. et Thomas, J. P. (1971) *Bull. Soc. Chim. France* **2349**.
- Bevan, K., Davies, J. S., Hassal, C. H., Morton, R. B. et Phillips, D. A. S. (1971) *J. Chem. Soc. C* **514**.
- Kenner, G. W. et Sheppard, R. C. (1958) *Nature* **181**, 48.
- Cox, P. F. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 380.
- Nakamura, S., Chikaei, T., Karasawa, K., Tanaka, N., Yonehara, H. et Umezawa, H. (1975) *J. Antibiot.* **18**, 47.
- Katz, E., Mason, K. T. et Mauger, A. B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 819.
- Brockman, H. et Stahler, E. A. (1973) *Tetrahedron Letters* **3685**.
- Gray, D. O. et Fowden, L. (1972) *Phytochemistry* **11**, 745.
- Hoeksema, H., Bannister, B., Birkenmayer, R. D., Kagan, F., Magerlein, B. J., Mac Keller, F. A., Schroeder, W., Slomp, G. et Herr, R. R. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 4223.
- Argoudelis, A. D., Fox, J. A., Mason, D. J. et Eble, T. E. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5044.
- Marumo, S. et Sumiki, Y. (1955) *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **29**, 305.
- Marumo, S. (1959) *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* **23**, 428.
- Urbach, G. (1955) *Nature* **175**, 170.
- Mauger, A. B. et Witkop, B. (1966) *Chem. Rev.* **66**, 47.
- Gray, D. O. (1972) *Phytochemistry* **11**, 751.
- Fisher, E. (1902) *Chem. Ber.* **35**, 2660.
- Lamport, D. T. A. (1965) *Advan. Bot. Res.* **2**, 151.
- Kuttan, R. et Radhakrishnan, A. N. (1970) *Biochem. J.* **119**, 651.
- Giri, K. V., Gopalakrishnan, K. S., Radhakrishnan, A. N. et Vaidianajhan, C. B. (1952) *Nature* **170**, 579.
- Radhakrishnan, A. N. et Giri, K. V. (1954) *Biochem. J.* **38**, 57.
- Radhakrishnan, A. N., Gopalakrishnan, K. S. et Giri, K. V. (1961) *Biochem. J.* **80**, 378.
- Kuttan, R., Pattabhiraman, K. S. V. et Radhakrishnan, A. N. (1974) *Phytochemistry* **13**, 453.
- McKee, H. S. et Urbach, G. (1970) *Nature* **175**, 470.
- Kristensen, I. et Larsen, P. O. (1973) *Acta Chem. Scand.* **27**, 3123.
- Wieland, T. et Witkop, B. (1940) *Ann. Chem.* **543**, 171.
- Sheehan, J. C., Zachau, H. G. et Lawson, W. B. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3349.
- Broeckmann, H. et Manegold, J. A. (1960) *Chem. Ber.* **93**, 2971.
- Sung, M. L. et Fowden, L. (1968) *Phytochemistry* **7**, 2061.
- Piez, K. A. et Gross, J. (1959) *Biochem. Pharmacol.* **16**, 2299.
- Piez, K. A. et Gross, J. (1963) *Biochemistry* **2**, 58.
- Ogle, J. D., Arlinghaus, R. B. et Logan, M. A. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3667.
- Irreverre, F., Morita, K., Robertson, A. V. et Witkop, B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2824.
- Irreverre, F., Morita, K., Robertson, A. V. et Witkop, B. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 453.
- Irreverre, F., Morita, K., Ishii, S. et Witkop, B. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 69.
- Sheehan, J. C. et Withney, J. G. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3980.
- Sheehan, J. C. et Withney, J. G. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3863.
- Fowden, L. et Smith, A. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1043.
- Nakajima, T. et Volcani, B. R. (1969) *Science* **164**, 1400.
- Karle, I. L., Daly, J. W. et Witkop, B. (1969) *Science* **164**, 1401.
- Fang, S. D., Li, L. C., Niu, C. I. et Tseng, K. F. (1961) *Scientia Sinica* **4**, 845.
- Hatanaka, S. I. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1305.
- Gallina, G., Koch, V. et Romeo, A. (1969) *Tetrahedron Letters* **35**, 3055.
- Murakami, S., Takemoto, T. et Shimizu, Z. (1953) *J. Pharm. Soc. (Japan)* **73**, 1026.
- Ueno, Y., Tanaka, K., Ueyanagi, J., Nawa, H., Sanno, Y., Honjo, M., Nakamori, R., Sugawa, T., Uchibayashi, M., Osugi, K. et Tatsuoka, S. (1957) *Proc. Japan Acad.* **33**, 53.
- Tanaka, K., Miyamoto, M., Honja, M., Morimoto, H., Sugawa, T. et Uchibayashi, M. (1957) *Proc. Japan Acad.* **33**, 47.
- Daigo, K. (1959) *J. Pharm. Soc. Japan* **79**, 353.
- Impellizzeri, G., Mangiafico, S., Oriente, G., Piattelli, M., Sciuto, S., Fattorusso, E., Magno, S., Santacrose, C. et Sica, D. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1549.
- Klosterman, H. J., Lamoureux, G. L. et Parsons, J. L. (1967) *Biochemistry* **6**, 170.
- Morgan, J. W. W. (1964) *Chem. Ind. (Lond.)* **542**.
- Lin, J. K., Ling, T. A. et Tung, T. C. (1965) *J. Formosan Med. Assoc.* **64**, 265.

54. Goodson, J. A. et Clewer, H. W. B. (1919) *J. Biol. Chem.* **110**, 151.
55. Welter, A., Jadot, J., Dardenne, G., Marlier, M. et Casimir, J. (1976) *Phytochemistry* **15**, 747.
56. Dardenne, G. (1977) Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux.
57. Kulan, R. et Radhakrishnan, A. N. (1970) *Biochem. J.* **117**, 1015.
58. Feigl, F. (1954) Vol. II, p. 198. Elsevier, New York.
59. Bieman, K., Seibl, J. et Gapp, F. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3795.
60. Porter, Q. N. et Baldas, J. (1971) *Mass Spectroscopy of Heterocyclic Compounds* p. 306. Wiley Intersciences, New York.
61. Horsley, W., Sternlicht, H. et Cohen, J. S. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 680.
62. Abraham, R. J. et McLauchlan, K. A. (1962) *Mol. Phys.* **5**, 195.
63. Andreatta, R. H., Nair, V. et Robertson, A. V. (1967) *Australian J. Chem.* **20**, 2701.
64. Dupont, L., Lamotte, J., Campsteyn, H., Vermeire, M. et Welter, A. (1977) *Acta Cryst.* sous presse.
65. Hulme, A. C. et Steward, F. C. (1955) *Nature* **175**, 171.
66. Greenstein, J. P. et Winitz, M. (1961) *Chemistry of Amino Acids* Vol. 3 (a) p. 2041. (b) p. 2019. John Wiley, New York.