

STRUCTURE DE L'ITURINE C DE *BACILLUS SUBTILIS*

F. PEYPOUX, F. BESSON et G. MICHEL

Laboratoire de Biochimie Microbienne, Université de Lyon I, 69621 Villeurbanne, France

L. DELCAMBE

Centre National de Production et d'Etudes des Substances d'Origine Microbienne, Boulevard de la Constitution 32, B 4020 Liège, Belgique

et

B. C. DAS

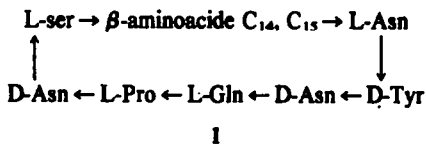
Institut de Chimie des Substances Naturelles, 91190 Gif-sur-Yvette, France

(Received in France 25 April 1977; Received in the UK for publication 22 September 1977)

Résumé—Par hydrolyse acide, l'iturine C donne des α aminoacides et des β aminoacides dans des rapports molaires identiques à ceux qui ont été trouvés précédemment pour l'iturine A. La migration électrophorétique et le titrage alcalimétrique indiquent la présence d'un groupement carboxylique dans l'iturine C. La réduction de l'iturine C par le diborane montre que ce groupement carboxylique appartient à un résidu aspartyle. La séquence a été démontrée par spectrométrie de masse de l'iturine C perméthylée en comparaison avec la spectrométrie de masse de l'iturine A perméthylée. Le résidu aspartyle est lié au groupement carboxyle du β aminoacide. De plus un composé liposoluble a été isolé par hydrolyse partielle de l'iturine C. Ce composé a été identifié au séryl- β -aminoacide. Contrairement à l'iturine A, l'iturine C ne possède pas d'activité antibiotique.

Abstract—The hydrolysate of iturin C contains α -aminoacids and liposoluble β -aminoacids in the same molar ratios as in iturin A. Electrophoretic migration and alkaline titration indicate the presence of one carboxyl group in iturin C. The reduction of iturin C with diborane shows that this carboxyl group is in an aspartyl residue. The sequence was determined by mass spectrometry of permethylated iturin C in comparison with mass spectrometry of permethylated iturin A. The aspartyl residue is linked to the carboxyl group of the β -aminoacid. In addition, a liposoluble compound seryl- β -aminoacid was isolated from partial hydrolysis which confirmed the cyclic structure of iturin C. In contrast to iturin A, iturin C has no antibiotic activity.

L'iturine est un antibiotique antifongique isolé par Delcambe de *Bacillus subtilis*.^{1,2} Le fractionnement de la préparation antibiotique brute a donné 3 composés chromatographiquement distincts: les iturines A, B et C.³ L'iturine A, quantitativement la plus importante, a été étudiée et sa structure a été déterminée.⁴ C'est un peptidolipide cyclique constitué d'un β aminoacide liposoluble à 14 ou 15 atomes de carbone et d'une fraction heptapeptidique hydrosoluble (1):



L'iturine A possède une activité antibactérienne réduite sur quelques bactéries des genres *Micrococcus* et *Sarcina* et une forte activité antifongique. L'iturine C qui accompagne l'iturine A existe dans des proportions variables suivant les préparations; elle représente, en moyenne, 1-3% de l'iturine brute. L'iturine C a été isolée et purifiée et nous décrivons ici la détermination de sa structure.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits

L'iturine C est obtenue à partir de préparations brutes selon la méthode décrite précédemment.³ La L-glutamyl-2-oxo-glutarate aminotransférase et la L-glutamyl-décarboxylase

proviennent de Sigma Chemical Company, la D-aminoacide-oxydase de Worthington Biochemical Corporation. Les divers réactifs et produits utilisés proviennent soit de E. Merck A.G., soit de Fluka A.G.

Etude des acides aminés hydrosolubles

Les acides aminés hydrosolubles ont été analysés par chromatographie sur couches minces de poudre de cellulose MN 300 G dans les solvants: isopropanol/pyridine/acide acétique/eau (40/40/5/20, en vol) et pyridine/alcool amylique tertiaire/eau (35/35/30, en vol). La révélation est effectuée par une solution de ninhydrine selon Russell.⁵ L'analyse quantitative des acides aminés a été réalisée par la méthode de Ghuyssen *et al.*⁶ avec les dérivés dinitrophényles après séparation par chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 (Merck) dans le solvant chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, en vol) puis dans le solvant chloroforme/méthanol/acide acétique (92/5/3, en vol).

La configuration optique des acides aminés a été déterminée par des méthodes enzymatiques.⁴ L'action de la D-aminoacide oxydase à pH 8.2 pendant 15 h à 37° a été utilisée pour la sérine, la proline et la tyrosine. La L-glutamyl-décarboxylase à pH 4.5 pendant 15 h à 37° a été utilisée pour l'acide glutamique et la L-glutamyl-2-oxoglutarate aminotransférase à pH 7.6 pendant 21 h à 37° en présence de 2-oxoglutarate a été utilisée pour l'acide aspartique. Après action des enzymes les acides aminés sont dosés sous la forme de dérivés dinitrophényles.

La préparation des dérivés dansylés est effectuée selon Gray et Smith.⁷ La réaction a lieu dans le bicarbonate de sodium 0.2 M, pendant 15 min à 50° par action du chlorure de dansyle en solution acétonique.

Etude des acides aminés liposolubles

L'analyse des acides aminés liposolubles a été effectuée par chromatographie gazeuse des N-trifluoroacétyl-n-butylesters

préparés selon Roach et Gehrke⁸ avec programmation de la température de 80° à 215°. La phase stationnaire est l'éthylène-glycoladipate (0.65%) sur Chromosorb W.

Réduction de l'iturine C

La réduction de l'iturine C par le diborane a été effectuée selon la méthode de Airoldi et Doonan.⁹ L'iturine C (2 mg) est traitée par quelques gouttes d'acide trifluoroacétique. Cet acide est éliminé par évaporation sous vide puis l'échantillon est additionné de 6 ml d'une solution 1 M de diborane dans le tétrahydrofurane. Le diborane est obtenu par action de l'iode sur le borohydrure de potassium selon Cuculleron et Mongeot.¹⁰ La réaction du diborane sur l'iturine C a lieu pendant 2 h à 0°. Le tétrahydrofurane et le diborane sont ensuite éliminés sous un courant d'azote et le résidu est traité par 10 ml de méthanol acidifié par l'acide trifluoroacétique. Après évaporation des solvants le produit obtenu est hydrolysé par HCl 6 N pendant 8 h à 150°. Les acides aminés résultant de l'hydrolyse sont analysés par chromatographie sur papier et les dérivés dansylés par chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 dans le solvant de Stebelin et Duranton.¹¹

Titrage alcalimétrique

L'iturine C (1.5 mg) est dissoute dans 1 ml d'une solution 0.1 M de NaCl; le titrage est effectué sous un courant d'azote par une solution M/160 de NaOH ou de HCl avec un ensemble Radiometer. Un titrage témoin est effectué parallèlement avec une solution d'iturine A (1 mg/ml).

Electrophorèse

L'électrophorèse est effectuée sur un appareil Pherograph avec un papier Whatman No. 1 dans un tampon Tris-HCl 0.1 N à pH 8. Elle a lieu pendant 2.75 h avec un courant de 20 V/cm.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse a été réalisé avec un appareil MS9 (AEI) à 70 eV sur l'iturine C perméthylée. La perméthylation de l'iturine est effectuée selon la méthode d'Hakomori par action de l'iodeure de méthyle en présence d'hydrure de sodium dissous dans le diméthylsulfoxyde.¹²

RESULTATS

Analyse des constituants

Nature de la fraction lipidique. La fraction lipidique représente 20% du produit initial. La chromatographie sur gel de silice 60 avec chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, en vol) donne une tache révélable à la ninhydrine de même R_f ($R_f = 0.63$) que les acides β aminés isolés précédemment de l'iturine A.³ La chromatographie gazeuse a été effectuée sur les N-trifluoroacétyl n butylesters en comparaison avec les mêmes dérivés de la fraction lipidique de l'iturine A. Les chromatogrammes des dérivés des iturines A et C sont identiques. L'iturine C renferme donc, comme l'iturine A, un mélange de deux β aminoacides homologues, l'acide amino-3 méthyl-12 tétradécanoïque (54%) et l'acide amino-3 méthyl-12 tridécanoïque (46%).†

Nature des acides aminés hydrosolubles. Les acides aminés hydrosolubles sont identifiés après hydrolyse acide de l'iturine C par chromatographie sur couches minces de cellulose dans plusieurs solvants et ils sont dosés sous la forme de dérivés dinitrophénylés. L'iturine C a la composition suivante: Asp_{3.1}, Glu₁, Pro₁, Ser_{0.8}, Tyr_{0.8}.

La détermination de la configuration optique montre que la tyrosine et deux moles d'acide aspartique ont la conformation D, une mole d'acide aspartique, l'acide

glutamique et la sérine ont la configuration L. La composition en acides aminés de l'iturine C est identique à celle de l'iturine A. Cependant l'analyse des acides aminés étant effectuée sur des hydrolysats chlorhydriques ne permet pas de préciser la présence d'acides aspartique et glutamique ou d'asparagine et de glutamine dans le peptide initial.

Presence d'une fonction acide carboxylique dans l'iturine C

Etude électrophorétique et potentiométrique. Le comportement chromatographique des iturines A et C sur gel de silice 60 dans le solvant chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, en vol) indique une polarité plus grande pour l'iturine C ($R_f = 0.25$) que pour l'iturine A ($R_f = 0.39$). Cette différence de polarité est confirmée par l'étude électrophorétique à pH 8.0 de l'iturine C, de l'iturine A et de la bacillomycine L, antibiotique de la famille de l'iturine dont la structure a été déterminée récemment.¹³ Dans les conditions opératoires (voir Matériel et Méthodes), l'iturine A a une migration nulle. L'iturine C a une migration de 2 cm et la bacillomycine L a une migration de 5 cm.

L'iturine A ne possède aucun groupement carboxylique⁴ et la bacillomycine L a deux groupements carboxyliques. Le comportement électrophorétique de l'iturine C est en accord avec la présence d'un groupement carboxylique.

Un titrage alcalimétrique est effectué parallèlement sur l'iturine C et sur l'iturine A. Le pH de la solution aqueuse d'iturine A est 5.7, celui de l'iturine C 4.1. On constate l'absence de fonction acide dans l'iturine A et la présence d'une fonction acide carboxylique dans l'iturine C. La quantité de soude utilisée correspond à la neutralisation d'un groupement carboxyle pour un poids moléculaire voisin de 1000.

Etude de l'iturine C réduite. L'iturine C est réduite par le diborane dans les conditions indiquées précédemment (voir Matériel et Méthodes). Le diborane est un réducteur spécifique des groupements carboxyles qu'il transforme en groupements alcools primaires et il est sans action sur les fonctions amides. Dans un peptide il transforme les résidus d'acide aspartique en homosérine et les résidus d'acide glutamique en acide α amino δ hydroxyvalérique, l'asparagine et la glutamine restent inchangées. L'iturine C réduite par le diborane est hydrolysée par HCl 6 N à 150° pendant 8 h et les acides aminés sont analysés par chromatographie sur papier dans le solvant isopropanol/pyridine/acide acétique/eau (40/40/5/20, en vol). En plus des acides aminés identifiés précédemment un composé révélable à la ninhydrine est présent. Il est élué du chromatogramme et chromatographié à nouveau dans la phase supérieure du solvant phénol/citrate trisodique 10% (50/50, en vol) en présence d'homosérine et d'acide α amino δ hydroxyvalérique authentiques. Le R_f du composé inconnu est identique à celui de l'homosérine témoin: $R_f = 0.58$.

Le dérivé dansylé a été préparé et identifié par chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 dans le solvant chloroforme/n-butanol/acide acétique (60/40/15, en vol) en présence des dérivés dansylés des acides aminés témoins. Le R_f correspond à celui du dérivé dansylé de l'homosérine ($R_f = 0.34$).

La présence d'homosérine dans l'iturine C réduite indique donc la présence d'un résidu aspartyle dans l'iturine C.

†Les abréviations β NC₁₄ et β NC₁₃ seront utilisées par la suite pour les β aminoacides en C₁₄ et C₁₃.

Structure de l'iturine C

Les résultats exposés ci-dessus ont montré que la composition en acides aminés hydrosolubles et liposolubles de l'iturine C était identique à celle de l'iturine A avec une seule différence: la présence d'un résidu aspartyle dans l'iturine C à la place d'un résidu asparaginylique dans l'iturine A. On peut supposer vraisemblablement que, à cette différence près, les séquences peptidiques sont identiques dans les deux composés. Cette hypothèse a été vérifiée par spectrométrie de masse.

Spectrométrie de masse de l'iturine C perméthylée. La séquence peptidique de l'iturine C ainsi que la position du résidu aspartyle ont été démontrées par spectrométrie de masse de l'iturine C perméthylée. Le spectre de masse est représenté Fig. 1(a).

L'interprétation de ce spectre a été effectuée en comparaison avec celui de l'iturine A perméthylée⁴ représentée Fig. 1(b).

Le remplacement dans la chaîne peptidique d'un résidu asparaginylique par un résidu aspartyle donne pour les dérivés perméthylés, une différence de 13 unités de masse correspondant au remplacement du groupement latéral $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ par le groupement $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$. On sait également que la chaîne latérale de l'acide aspartique peut subir une C-méthylation au cours de la perméthylation^{14,15} ce qui conduit au fragment $-\text{CH}-\text{COOCH}_3$ présentant une différence d'une unité de

masse avec la chaîne latérale de l'asparagine N-diméthylée: $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$.

Lorsqu'une différence d'une unité de masse existe entre des fragments de l'iturine A et de l'iturine C perméthylées, ces fragments contiennent donc le résidu aspartyle dans l'iturine C et asparaginylique dans l'iturine A.

D'autre part, la présence d'une mole de β aminoacide

en C_{14} ou en C_{15} donne, pour les fragments renfermant ce β -aminoacide, deux pics homologues différant de 14 u.m.

Le spectre de masse de l'iturine C perméthylée présente deux pics moléculaires homologues à m/e 1281 et 1295 correspondant aux deux β aminoacides C_{14} et C_{15} , ces pics diffèrent d'une unité de masse de ceux de l'iturine A perméthylée à m/e 1280 et m/e 1294. L'iturine C perméthylée donne, en plus, un pic homologue à m/e 1267 qui indique une C-méthylation non totale de la chaîne latérale de l'acide aspartique.

La chaîne peptidique cyclique de l'iturine C perméthylée subit, comme celle de l'iturine A perméthylée, une fragmentation au niveau de la liaison $\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)$ en donnant un résidu de la forme $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO} \dots$ (Fig. 2).

Des fragmentations de ce type ont été observées précédemment avec des peptides perméthylés renfermant l'histidine,¹⁶ le tryptophane, l'acide aspartique, la tyrosine, l'asparagine^{4,17-19} et également au niveau des β aminoacides en C_{14} et C_{15} .⁴ Les fragments peptidiques linéaires ainsi obtenus subissent ensuite les fragmentations classiques des liaisons peptidiques.

La comparaison des spectres de l'iturine C et de l'iturine A perméthylées montre un premier groupe de pics communs dans les deux spectres. Les fragments correspondants sont indiqués dans le Tableau I, ils ne renferment pas le résidu aspartyle dans l'iturine C.

Un deuxième groupe comprend des pics différant d'une unité de masse dans les deux spectres. Dans l'iturine C perméthylée ce pic est accompagné d'un pic homologue, inférieur de 14 unités de masse, correspondant à une C-méthylation incomplète de l'acide aspartique. On trouve ainsi les doublets à m/e 318, 304. m/e 474, 460, m/e 644, 630 qui correspondent respectivement aux fragments: $|\text{A}| \rightarrow \text{Tyr}$, $|\text{A}| \rightarrow \text{Tyr} \rightarrow \text{Asn}$ et $|\text{A}| \rightarrow \text{Tyr} \rightarrow$

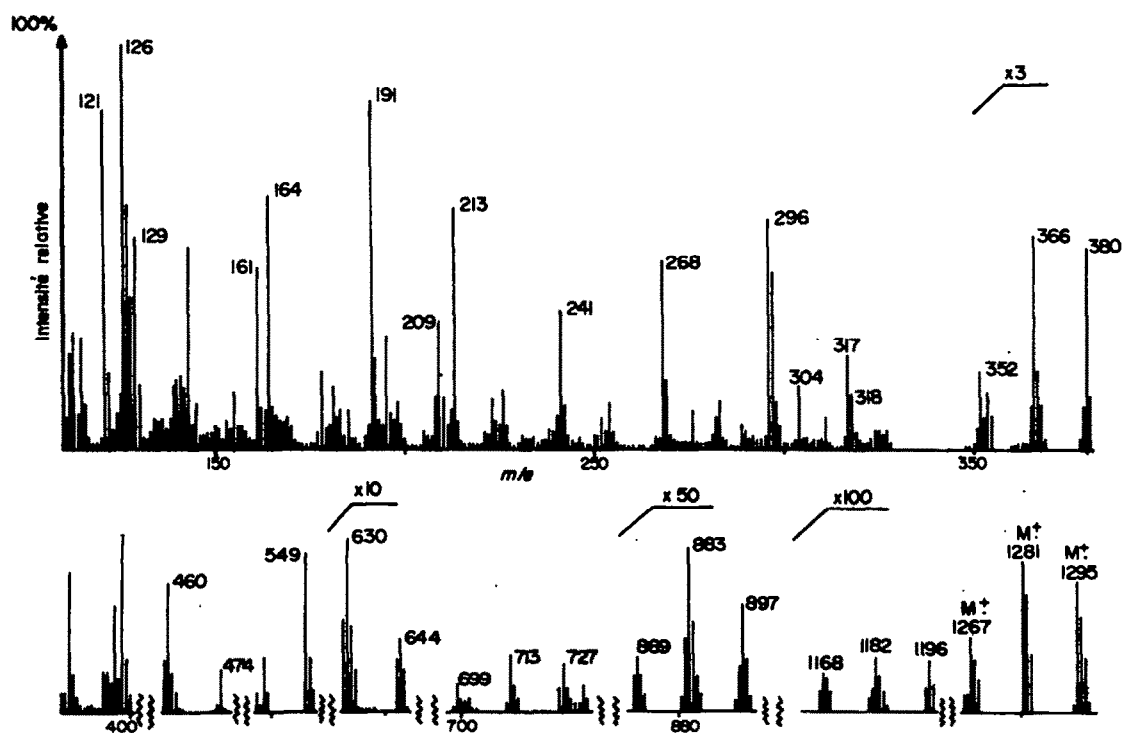


Fig. 1(a). Spectre de masse de l'iturine C perméthylée.

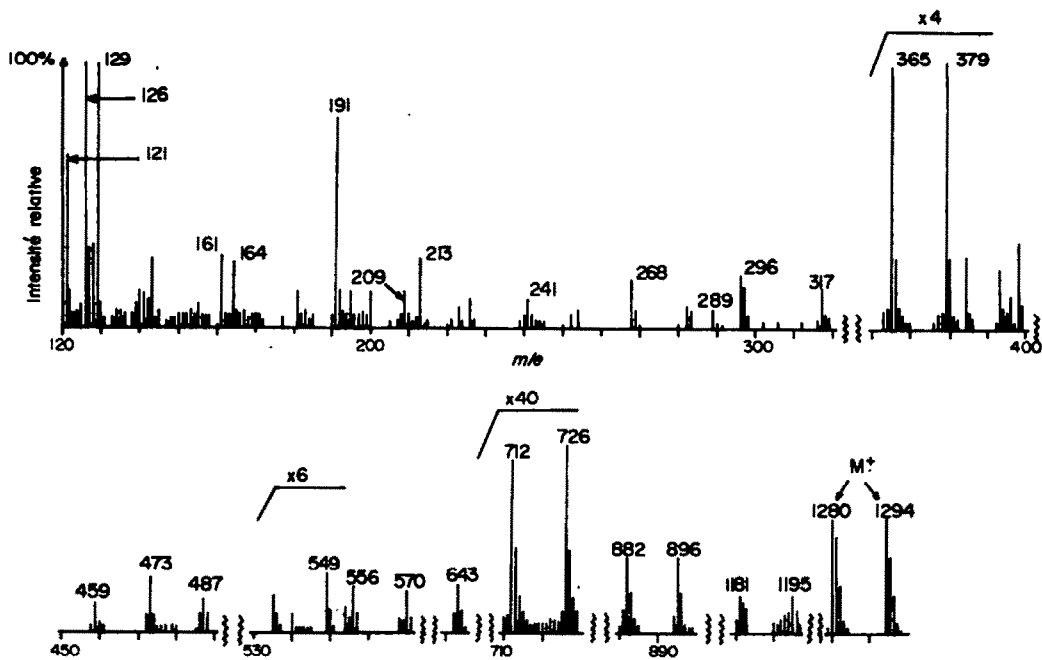


Fig. 1(b). Spectre de masse de l'iturine A perméthylée.

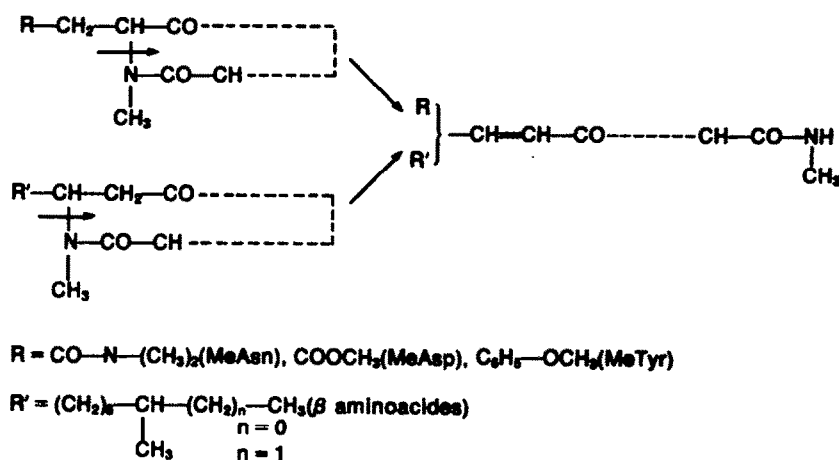


Fig. 2. Fragmentations de la chaîne peptidique de l'iturine C.

Asn \rightarrow Gln. Dans l'iturine A perméthylée les pics analogues se situent à m/e 317: $[\text{An}] \rightarrow \text{Tyr}$, m/e 473: $[\text{An}] \rightarrow \text{Tyr} \rightarrow \text{Asn}$ et m/e 643: $[\text{An}] \rightarrow \text{Tyr} \rightarrow \text{Asn} \rightarrow \text{Gln}$.†

Un troisième groupe correspond aux fragments renfermant un résidu de β aminoacide en C_{14} ou C_{15} . Ces fragments donnent, dans l'iturine A perméthylée, des paires de pics différant de 14 unités de masse. Dans l'iturine C perméthylée on retrouve les mêmes paires de pics avec une unité de masse de plus que dans l'iturine A en raison de la présence du résidu aspartyle C-méthylé au lieu du résidu asparaginye. Cette paire de pics est accompagnée d'un pic d'intensité plus faible, inférieur de 14 unités de masse, dû à une C-méthylation incomplète de l'acide aspartique. Ces pics et les fragments correspondants sont indiqués dans le Tableau 2.

†Les symboles $[\text{A}]$ et $[\text{An}]$ représentent les résidus provenant de la fragmentation au niveau de la liaison $\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)$ pour l'acide aspartique et l'asparagine respectivement.

Dans ces fragments le β aminoacide a subi la coupure de la liaison $\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)$ indiquée ci-dessus. On trouve en outre dans ce groupe les pics moléculaires à m/e 1280 et 1294 pour l'iturine A et à m/e 1267, 1281 et 1295 pour l'iturine C et les pics provenant de l'élimination de la chaîne latérale de la glutamine perméthylée à partir des ions moléculaires: $\text{M}^+ - [(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2]^+$ à m/e 1181 et 1195 pour l'iturine A et à m/e 1168, 1182 et 1196 pour l'iturine C.

Structure cyclique de l'iturine C. Les pics moléculaires homologues de l'iturine C sont en accord avec une structure cyclique. D'autre part l'iturine C ne renferme pas de groupement NH_2 libre, elle ne réagit pas à la ninhydrine et ne donne aucun dérivé N-dinitrophénylé par action du dinitrofluorobenzène mais seulement la O-dinitrophényltyrosine. En outre le titrage alcalimétrique a montré, comme la spectrométrie de masse, l'existence d'un seul groupement carboxylique. Cependant les séquences peptidiques données par la

Tableau 1. Pics de fragmentation identiques dans les spectres de masse de l'iturine A et de l'iturine C perméthylées. [An] et [T] représentent les groupements provenant de la fragmentation de la liaison CH-N(CH₃) des résidus d'asparagine et de tyrosine. (Voir le texte et Ref. 4)

m/e	Fragments d'acides aminés et de peptides.
121	
126	Me ₂ NCOCH=CHCO ⁺ =[An]
129	Me ₂ NCOCH ₂ CH=NHMe
161	
164	
191	
241	[An] → Ser
209	[An] → Ser (-MeOH)
213	[An] → Ser (-CO)
296	[An] → Gln
268	[An] → Gln (-CO)
317	[T] → Asn
549	[An] → Gln → Pro → Asn

spectrométrie de masse n'indiquent pas la liaison entre la sérine et le β aminoacide (Tableau 3). Cette liaison a été démontrée par l'isolement et l'identification d'un composé liposoluble après hydrolyse partielle de l'iturine C par HCl 6 N à 105° pendant 15 h. Ce composé est isolé par chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 dans le solvant chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, en vol) (R_f = 0.33). Une hydrolyse totale donne les acides β aminés et la sérine. La position N-terminale de la sérine est indiquée par dinitrophénylation et identification de la dinitrophénylsérine. La structure cyclique est ainsi complètement démontrée et la formule de l'iturine C est représentée Fig. 3.

L'iturine C diffère de l'iturine A par la présence d'un résidu L-aspartyle à la place d'un résidu L-asparaginylié lié au carboxyle du β-aminoacide. Cette différence de structure a des conséquences importantes au niveau de l'activité biologique. En effet les premiers essais ont montré que l'iturine C n'a aucune activité antifongique sur *Penicillium chrysogenum*, microorganisme qui est très sensible à l'iturine A.²⁰ Il est certain que le remplacement d'un groupement carboxamide par un groupement carboxyle ionisable entraîne des modifications dans la conformation de la molécule. La conformation est sans doute en relation étroite avec l'activité antibiotique du composé.

Remerciements—Nous remercions le Dr. S. Doonan (University College, London) qui nous a fourni un échantillon d'acide α-amino β-hydroxyvalérique et le Dr. M. Mongeot (Laboratoire de Chimie minérale, Université de Lyon I) pour la préparation du diborane.

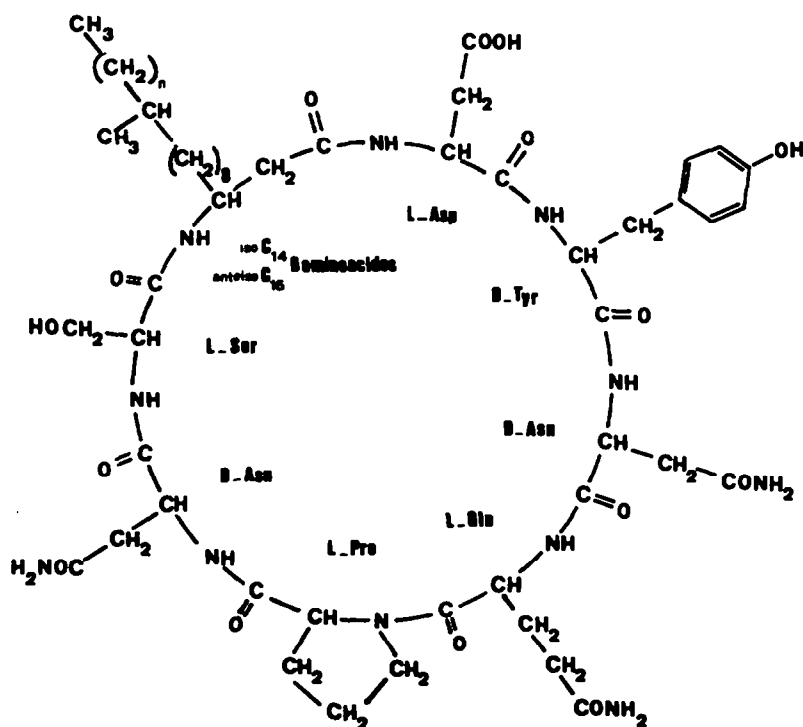


Fig. 3. Formule de l'iturine C. n = 0, acide amino-3 méthyl-12 tridécanoïque; n = 1, acide amino-3 méthyl-12 tétradécanoïque.

Tableau 2. Pics de fragmentation homologues différant de 14 unités de masse obtenus par spectrométrie de masse de l'iturine A et de l'iturine C perméthylées. $|\beta C_{14}|$ et $|\beta C_{15}|$ représentent les groupements acyles provenant de la fragmentation de la liaison CH-N(CH₃) des résidus des β aminoacides en C₁₄ et C₁₅ (voir le texte et Ref. 4). Asp (C-Me) est le résidu aspartyle C-méthylé

m/e		Fragments peptidiques	
Iturine A	Iturine C	Iturine A	Iturine C
	352		$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp
365	366	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asn	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp (C-Me) + $ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp
379	380	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asn	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp (C-Me)
	699		$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn
712	713	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asn \rightarrow Tyr \rightarrow Asn	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp (C-Me) \rightarrow Tyr \rightarrow Asn + $ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn
726	727	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asn \rightarrow Tyr \rightarrow Asn	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp (C-Me) \rightarrow Tyr \rightarrow Asn
	869		$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln
882	883	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asn \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln	$ \beta C_{14} \rightarrow$ Asp (C-Me) \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln + $ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln
896	897	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asn \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln	$ \beta C_{15} \rightarrow$ Asp (C-Me) \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln

Tableau 3. Séquences résultant des fragmentations par spectrométrie de masse de l'iturine C perméthylée. $|\beta C_{14,15}|$, [A] et [An] représentent les groupements provenant de la fragmentation de la liaison CH-N(CH₃) des résidus respectifs de β aminoacides en C₁₄ et C₁₅, de l'acide aspartique et de l'asparagine (voir le texte et Ref. 4).

$ \beta C_{14,15} \rightarrow$ Asp
$ \beta C_{14,15} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn
$ \beta C_{14,15} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln
[A] \rightarrow Tyr
[A] \rightarrow Tyr \rightarrow Asn
[A] \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln
[An] \rightarrow Gln
[An] \rightarrow Gln \rightarrow Pro \rightarrow Asn
[An] \rightarrow Ser
$\beta NC_{14,15} \rightarrow$ Asp \rightarrow Tyr \rightarrow Asn \rightarrow Gln \rightarrow Pro \rightarrow Asn \rightarrow Ser.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹L. Delcambe, *Bull. Soc. Chim. Belge* 74, 315 (1965).
- ²L. Delcambe, *Ibid.* 74, 329 (1965).
- ³F. Peypoux, M. Guinand, G. Michel, L. Delcambe, B. C. Das, P. Varenne et E. Lederer, *Tetrahedron* 29, 3455 (1973).
- ⁴F. Peypoux, M. Guinand, G. Michel, L. Delcambe, B. C. Das et E. Lederer, *Biochemistry* sous presse.
- ⁵D. W. Russell, *J. Chromatog.* 4, 251 (1960).
- ⁶J. M. Ghuyens, D. J. Tipper et J. L. Strominger, *Meth. Enzymol.* 8, 685 (1966).
- ⁷W. R. Gray et J. P. Smith *Anal. Chem.* 33, 36 (1970).
- ⁸D. Roach et C. W. Gehrke, *J. Chromatog.* 4, 251 (1969).
- ⁹L. P. Airoidi et S. Doonan, *FEBS Letters* 50, 155 (1975).
- ¹⁰J. Cuellieron et M. Mongeot, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 76 (1966).
- ¹¹D. Stehelin et H. Duranton, *J. Chromatog.* 43, 93 (1969).
- ¹²S. I. Hakomori, *J. Biochem.* 55, 205 (1964).
- ¹³F. Besson, F. Peypoux, G. Michel et L. Delcambe, *Europ. J. Biochem.* 77, 61 (1977).
- ¹⁴K. L. Agarwal, R. A. W. Johnstone, G. W. Kenner, D. S. Millington et R. C. Sheppard, *Nature* 219, 498 (1968).
- ¹⁵D. W. Thomas, *FEBS Letters* 5, 53 (1969).
- ¹⁶H. R. Morris, *Ibid.* 22, 257 (1972).
- ¹⁷H. R. Morris, D. H. Williams et R. P. Ambler, *Biochem. J.* 125, 189 (1971).
- ¹⁸H. R. Morris, K. E. Batley, N. G. L. Harding, R. A. Bjur, J. G. Dann et R. W. King, *Ibid.* 137, 409 (1974).
- ¹⁹B. C. Das et R. D. Schmid, *FEBS Letters* 25, 253 (1972).
- ²⁰F. Besson, F. Peypoux, G. Michel et L. Delcambe, *J. Antibiotics* 29, 1043 (1976).