

EFFETS DE NOUVEAUX DERIVES GUANIDYLES ET DE DIVERSES AMIDINOALKYLUREES SUR LES OXYDOPHOSPHORYLATIONS

RAYMOND MICHEL, ROGER TRUCHOT et VÉRONIQUE GULLY-MARTIN*

Endocrinologie, U E R mécanismes d'action des médicaments et des toxiques, 4, avenue de l'Observatoire—Paris VIème, et Biochimie Pharmaceutique, U E R des Sciences pharmaceutiques et biologiques 21 Dijon

(Received 21 December 1970; accepted 25 March 1971)

Abstract—The effect on respiration of rat liver mitochondria by two classes of compounds was studied.

The first contained the mono- and di-guanide derivatives of phenylethylamine and 4-hydroxyphenylethylamine. When mitochondria were in state 4 with succinate the rate of oxygen consumption was reduced with diguanides and also with the diiodo-monoguanide derivative but was increased slightly with the noniodinated monoguanides. In state 3, all the compounds, but especially the 3,5-iodinated derivatives inhibited respiration.

The other group of products were mono- (nonyl, decyl and undecyl) and the di- (dibutyl, dioctyl and amylhexyl) alkylamidinoureas. All compounds stimulated respiration of mitochondria in state 4, the undecyl derivative being the most potent, the dialkylated being a little less active. All the products inhibited respiration in state 3.

It appears that the group —NH—C—NH— is essential if a compound is to influence

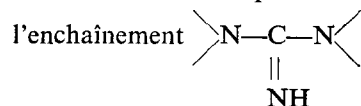


mitochondrial respiration. Adjacent group can be either CH_2 as in phenylethylamine derivatives or CO as in amidinoalkylureas.

LES EFFECTEURS des oxydophosphorylations mitochondriales possèdent des structures très variées; on y trouve des substances aussi diverses que des phénols iodés, parmi lesquels les hormones thyroïdiennes, et des dérivés guanidylés comme le phényléthyldiguanide. Cependant, tous ces produits n'agissent pas de façon semblable sur les mécanismes de synthèse de l'ATP. Les iodothyronines activent la respiration des mitochondries placées dans l'état contrôlé ou état 4, c'est-à-dire lorsque le milieu renferme un substrat¹ oxydable; mais, par contre, l'inhibe avec les particules se trouvant dans l'état actif ou état 3, donc lorsque les réactions ont lieu en présence d'ADP.²

Les composés guanidylés ralentissent la consommation d'oxygène des mitochondries fortement couplées; l'intensité des réponses dépend de la nature des substituants puisque l'inhibition augmente avec la longueur de la chaîne alkyle cependant qu'elle diminue par l'introduction d'un second radical guanidine.^{3,4}

Il reste encore des inconnues concernant les relations entre activités mitochondriales et structures des produits guanidylés. Nous nous sommes proposé d'apporter notre contribution à cette question en étudiant les effets de nouveaux composés possédant



* Avec l'assistance technique de Mme J. Roman (C.N.R.S.).



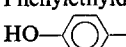
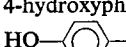
RECHERCHES PERSONNELLES

Nos recherches ont porté sur l'influence exercée par deux groupes de substances sur les oxydophosphorylations des mitochondries hépatiques de rat placées dans divers états respiratoires.

Dans une première série, nous avons essayé les dérivés de la phényléthylamine, de la 4-hydroxyphényléthylamine ou tyramine, de la 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine ou 3,5-diiodotyramine.

Nous avons comparé les composés monoguanidylés aux diguanidylés en fonction de la présence ou non d'une fonction phénol et d'une double substitution iodée sur le noyau aromatique à cause des mouvements électroniques susceptibles de se répercuter jusqu'au niveau de la chaîne latérale. Nous avons utilisé les produits suivants dont les formules sont indiquées sur les Tableau 1 et 2:

TABLEAU 1. EFFETS COMPARÉS DES DÉRIVÉS MONOGUANIDYLÉS DE LA PHÉNYLÉTHYLAMINE ET DE LA TYRAMINE À DEUX CONCENTRATIONS (mM) SUR LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS L'ÉTAT CONTRÔLÉ 4 ET DANS L'ÉTAT ACTIF 3

Produit	Effet (%)		
Formule	Concentration (mM)	Etat contrôlé 4	Etat actif 3
 $\text{C}_6\text{H}_5\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C(=NH)—NH}_2$	0,5	+10	— 7
Phényléthylguanidine	1,0	+33	— 9
 $\text{C}_6\text{H}_5\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C(=NH)—NH—C(=NH)—NH}_2$	0,5	—18	—21
Phényléthyldiguanide	1,0	—28	—44
 $\text{HO—C}_6\text{H}_4\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C(=NH)—NH}_2$	0,5	+ 9	—32
4-hydroxyphényléthylguanidine	1,0	+15	—37
 $\text{HO—C}_6\text{H}_4\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C(=NH)—NH—C(=NH)—NH}_2$	0,5	—12	—51
4-hydroxyphényléthyldiguanide	1	—17	—70

phényléthylguanidine, 4-hydroxyphényléthylguanidine, phényléthyldiguanide, 4-hydroxyphényléthyldiguanide, 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine, 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylguanidine, 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthyldiguanide.

Le second groupe des substances étudiées se caractérise par la présence au voisinage

immédiat du groupement guanidyle d'une fonction chimique —C(=O)— qui crée des déplacements électroniques très intenses. Leur formule générale est:

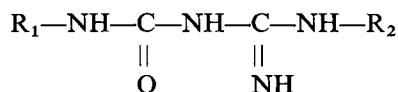
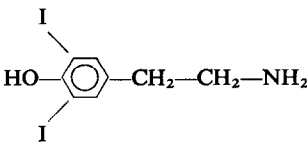
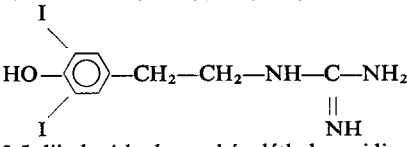
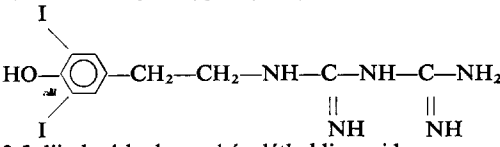


TABLEAU 2. EFFETS COMPARÉS DE LA 3,5-DIIODOTYRAMINE ET DE SES DÉRIVÉS MONO ET DIGUANIDYLÉS À TROIS CONCENTRATIONS (mM) SUR LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS L'ÉTAT CONTRÔLÉ 4 ET DANS L'ÉTAT ACTIF 3

Produit	Effet (%)		
	Formule	Concentration (mM)	Etat contrôlé 4 Etat actif 3
 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine		0,05	+13 - 5
		0,10	+ 3 -26
		1,00	-31 -83*
 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylguanidine		0,01	-23 -36
		0,03	-30 -63
		0,06	-31 -78
 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylbiguanide		0,01	-15 -17
		0,02	-17 -29
		0,04	-19 -46

* Après déduction de la consommation d'oxygène due à la monoamine oxydase.

TABLEAU 3. CONCENTRATIONS (mM) DE DIVERS DÉRIVÉS GUANIDYLÉS ET DE LA 3,5-DIIODOTYRAMINE QUI DIMINUENT DE 25 ET 50 % LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES PLACÉES DANS L'ÉTAT ACTIF 3. CES DONNÉES SONT DÉDUITES DES COURBES EXPÉRIMENTALES REPRÉSENTANT L'INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PRODUIT

Produit	Effet inhibiteur (%)	Concentration (mM)
Phényléthylguanidine	25	2,9
	50	5,0
Phényléthylbiguanide	25	0,6
	50	1,8
4-hydroxyphényléthylguanidine	25	5,1
	(40)*	15*
4-hydroxyphényléthylbiguanide	25	8,8
	(45)*	13*
3,5-diiodo 4-hydroxyphényléthylamine	25	0,16
	50	0,36
3,5-diiodo 4-hydroxyphényléthylguanidine	25	0,02
	50	0,03
3,5-diiodo 4-hydroxyphényléthylbiguanide	25	0,02
	50	0,04

* Concentration correspondant à l'inhibition maximum.

R_1 représente une chaîne hydrocarbonée et R_2 soit un substituant alkyl, soit un atome d'H. Les produits essayés ont été les nonyl, décyl et undécyl amidino monoalkylurées et les dibutyl, amyl- hexyl et dioctyl amidino dialkylurées; leurs formules sont représentées sur le Tableau 4.

TABLEAU 4. EFFETS COMPARÉS DE DIVERSES AMIDINOALKYLURÉES, D'URÉES SUBSTITUÉES ET DE L'OCTYL-GUANIDINE SUR LA RESPIRATION DANS L'ÉTAT CONTRÔLÉ 4 ET DANS L'ÉTAT ACTIF 3. LA CONCENTRATION INDICUÉE POUR CHAQUE PRODUIT CORRESPOND À CELLE QUI PROVOQUE L'ACTIVATION RESPIRATOIRE MAXIMUM DE L'ÉTAT CONTRÔLÉ 4

Produit	Effet (%)		
	Concentration (mM)	Etat contrôlé 4	Etat actif 3
Formule			
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ amidinononylurée	0,07	+30	-54
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ amidinodécylurée	0,06	+47	-47
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ amidinoundécylurée	0,10	+80	-75
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$ amidinobutylbutylurée	0,12	+50	-42
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$ amidinoamylhexylurée	0,05	+50	-13
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ amidinooctyloctylurée	0,12	+72	-61
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ octylurée	1,00	+30	-45
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ nonylurée	1,00	+31	-25
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$ octylguanidine	0,45	+16	-58

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les mitochondries hépatiques de Rat sont préparées selon la méthode de Schneider et Hogeboom modifiée.^{5,6} Elles sont conservées dans le saccharose 0,25 M, la suspension mitochondriale renfermant 30-40 mg de protéines par ml.

Les expériences sont conduites à 25° dans un milieu tampon de pH = 7,35 renfermant les sels minéraux suivants aux concentrations indiquées: KH_2PO_4 3mM; K_2HPO_4 13mM; NaCl 26mM; KCl 58mM; MgCl_2 6mM; NaF 12mM.

Par ailleurs, l'addition de roténone (1,5 μM) bloque la NADH deshydrogénase et évite le reflux des électrons vers le NAD. On emploie comme substrat le succinate de sodium à la concentration finale 6 mM.

La consommation d'oxygène provoquée par l'addition de mitochondries (représentant 1,5-3 mg de protéines par essai) est déterminée au moyen d'un oxygraphe GME à électrode de platine vibrante recouverte d'une membrane de polyéthylène.

Les composés étudiés sont introduits en solution sous un volume n'excédant pas 0,04 ml alors que le liquide d'incubation a pour chaque essai un volume final de 1,70 ml. A chaque reprise un témoin est effectué en présence du même volume du solvant qui a permis la mise en solution des substances essayées.* Les dérivés mono et diguanidylés de la phényléthylamine et de la tyramine, les amidino monoalkylurées et la dibutylamidinoalkylurée sont dissous dans l'eau, les produits guanidylés diiodés dans l'acide acétique dilué, la 3,5-diiodotyramine dans HCl 0,1N et les amylhexyl et dioctyl amidinoalkylurées dans le mélange éthanol-eau (3:2, v/v).

RÉSULTATS

Les résultats des composés guanidylés et de la 3,5-diiodo 4-hydroxyphényléthylamine sur la respiration mitochondriale font l'objet des Tableaux 1, 2, 3. Les deux premiers traduisent les effets comparatifs d'une même dose de dérivés lorsque les

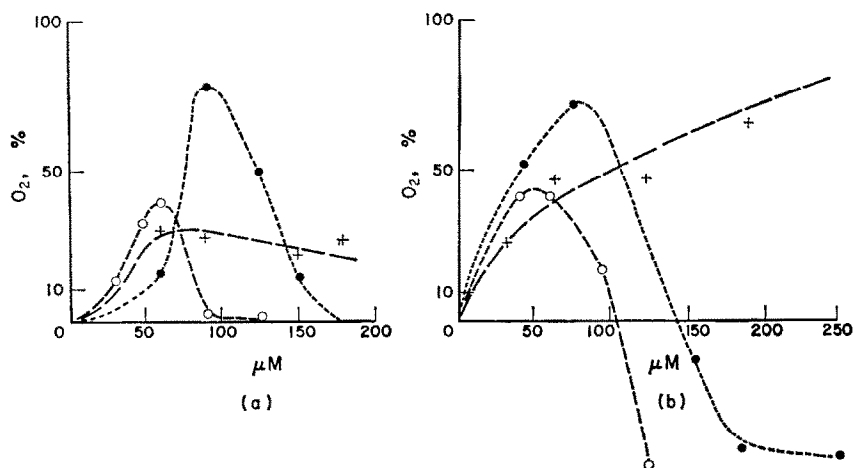


FIG. 1. Courbes traduisant l'influence des divers produits sur la respiration des mitochondries dans l'état contrôlé.

En ordonnée, pourcentage de la variation de la respiration (O_2) par rapport au témoin en fonction des concentrations en μM en abscisse.

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| ○ --- ○ --- amidinononylurée | + --- + --- amidinobutylbutylurée |
| (a) + --- + --- amidinodécylurée | (b) ○ --- ○ --- amidinoamylhexylurée |
| ● --- ● --- amidinoundécylurée | ● --- ● --- amidinooctyloctylurée. |

* Le 4-hydroxyphényléthyldiguanide nous a été fourni par les Laboratoires de Laire et les amidinoalkylurées par les Laboratoires Winthrop. Nous tenons à les remercier.

particules sont placées dans les états contrôlé et actif. Le Tableau 3 fait état des concentrations de produit qui inhibent de 25 et 50 pour cent la consommation d'oxygène dans l'état actif 3.

Les courbes de la Fig. 1 illustrent l'influence qu'exercent divers amidinoalkylurées à concentrations variables sur la respiration des mitochondries dans l'état contrôlé 4. Le Tableau 4 rend compte du pourcentage de l'activation maximum provoquée par les amidino alkylurées, les urées substituées et l'octylguanidine avec des mitochondries placées dans l'état contrôlé 4. Sur ce tableau figure, à titre de comparaison, la réponse inhibitrice sur la consommation d'oxygène dans l'état actif 3 pour la même concentration de produit.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Une constatation générale s'impose à l'issue de nos expériences; elle révèle que les produits possédant une structure guanidine influencent la respiration mitochondriale dans l'état actif comme dans l'état contrôlé. Ce fait est particulièrement significatif pour les dérivés à chaîne octylique. Alors que l'octylurée exige des concentrations de 1 mM pour influencer—d'ailleurs faiblement—sur la consommation d'O₂ des mitochondries, l'octylguanidine dès la concentration 0,4 mM provoque une inhibition voisine de 50 pour cent. L'amidinooctyl-octylurée est encore plus active que cette dernière puisque les mêmes effets sont obtenus avec des doses quatre fois inférieures.

(1) Dans le domaine des substances à structure monoguanide ou diguanide proprement dites, les résultats que nous avons obtenus indiquent cependant certaines différences de détail dans le comportement des produits essayés.

(a) L'examen du tableau 1 montre qu'en présence de mitochondries maintenues à l'état 4, les dérivés monoguanidylés de la 2-phényléthylamine ou de la tyramine activent la respiration de façon peu intense, au demeurant, tandis qu'au contraire les dérivés diguanidylés homologues l'inhibent. Par ailleurs, les chiffres du Tableau 2 paraissent indiquer une légère stimulation de la consommation d'O₂ par la 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine; cependant, ce résultat ne peut pas être considéré comme significatif car cette substance se comporte comme un substrat vis-à-vis de la monoamine oxydase (EC 1.4.3.4) et il est difficile d'apprécier cet effet avec une grande précision.⁸ Pour leur part, les dérivés mono et diguanidylés de la 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine possèdent une influence inhibitrice.

(b) Tous les dérivés mono et diguanidylés que nous avons essayés ralentissent la respiration des mitochondries placées dans l'état 3 ainsi qu'il ressort du Tableau 3, mais ils le font avec des intensités différentes suivant leur structure. Il est intéressant de noter tout d'abord qu'en présence d'ADP, tous les produits iodés freinent nettement la respiration mitochondriale, ce qui rejoint les résultats obtenus antérieurement avec d'autres *ortho*-diiodophénols.⁵ L'activité inhibitrice de 50 pour cent correspond à une concentration de 0,36 mM pour la 3,5-diiodo-4-hydroxyphényléthylamine et nettement inférieure à 0,04 mM pour ses dérivés mono et diguanidylés, lesquels manifestent des réponses assez proches.

Par comparaison, l'activité des composés phénoliques non iodés (Tableau 3) demeure très faible puisque une inhibition de 50 pour cent ne peut être atteinte, même avec des concentrations très élevées.

On note enfin que les dérivés non phénoliques ont une influence plus importante

que celle des précédents quoique nettement moindre que celle des phénols diiodés, le diguanide étant relativement plus actif que le composé monoguanidylé.

(2) Les données obtenues au cours des essais des amidinoalkylurées présentent une grande homogénéité du point de vue qualitatif. Ces substances stimulent la respiration des mitochondries dans l'état contrôlé en l'absence d'accepteur de phosphate tandis qu'elles l'inhibent dans l'état actif après addition d'ADP. Néanmoins, les effets diffèrent en intensité suivant la nature de la chaîne ou des deux chaînes alkyles présentes dans la molécule. Les principaux résultats font l'objet des Tableaux 4 et 5 et de la Fig. 1.

(a) On observe ainsi dans la série des amidinomonoalkylurées que le dérivé undécyclique provoque une activation de près de 80 pour cent de la consommation d'O₂ des mitochondries à l'état 4 tandis qu'avec une chaîne à 9 atomes de carbone, l'effet

TABLEAU 5. CONCENTRATIONS (mM) DE DIVERSES AMIDINOALKYLURÉES, D'URÉES SUBSTITUÉES ET DE L'OCTYLGUANIDINE QUI DIMINUENT DE 25 ET 50 % LA VITESSE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES PLACÉES DANS L'ÉTAT ACTIF 3. LES DONNÉES SONT DÉDUITES DES COURBES EXPÉRIMENTALES REPRÉSENTANT L'INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PRODUIT

Produit	Effet inhibiteur (%)	Concentration (mM)
Amidinononylurée	25	0,02
	50	0,06
Amidinodécylurée	25	0,02
	50	0,07
Amidinoundécylurée	25	0,01
	50	0,02
Amidinobutylbutylurée	25	0,05
	50	0,17
Amidinoamylhexylurée	25	0,10
	50	0,19
Amidinooctyloctylurée	25	0,05
	50	0,10
Octylurée	25	0,65
	50	1,20
Nonylurée	25	1,00
	(25)*	1,00*
Octylguanidine	25	0,17
	50	0,40

* Concentration correspondant à l'inhibition maximum.

maximum—atteint il est vrai avec une concentration légèrement inférieure—ne dépasse pas 30 pour cent. Par ailleurs, en présence de deux substituants à l'azote (amidinodialkylurées) l'effet est moins intense.

(b) Les amidinoalkylurées possèdent à l'inverse un effet de freinage sur la respiration mitochondriale dans l'état 3; on constate que la relation entre l'intensité de cette influence inhibitrice et la structure chimique est à très peu de choses près la même que pour l'influence activatrice de l'état 4; en particulier, le dérivé undécyclique se montre, là encore, le plus actif alors que la double substitution à l'azote possède un effet défavorable.

(c) On notera néanmoins dans cette série de substances, une certaine dissociation entre l'influence stimulante de l'état 4 (contrôlé) et le freinage de l'état actif. Elle est

Néanmoins, il n'en résulte pas un bouleversement total de l'influence exercée sur la respiration mitochondriale. On confirme ainsi qu'en ce domaine c'est la présence de la fonction —NH—C—NH_2 qui revêt l'importance primordiale. La nature des sub-



stituants qu'elle porte n'amène pas de changement profond de cette activité, mais plutôt des modifications de son intensité. On doit souligner à cet égard, la très forte influence de la 3,5 diiodo-4-hydroxyphényléthylguanidine sur la consommation d' O_2 des mitochondries ce qui traduit une synergie entre la fonction guanidine et la structure *ortho*-diiodophénol.

Résumé—Les recherches ont porté sur les effets exercés par deux groupes de substances sur les propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries hépatiques de rat.

La première série de produits comprend les dérivés mono- et diguanidiques de la phényléthylamine et de la 4-hydroxyphényléthylamine. Leur action sur la respiration des mitochondries placées dans l'état 4, en présence de succinate se manifeste par une inhibition avec les diguanidylés et le diiodomonoguanidylé et par une faible activation avec les monoguanidylés non halogénés. Tous les composés, mais surtout ceux 3,5-diiodés, freinent la vitesse de l'oxydation du substrat avec les mitochondries à l'état 3.

Le second groupe étudié comporte des amidinoalkylurées substituées qui sont d'une part les nonyl-, décyl- et undécyl- amidinomonoalkylurées et d'autre part les dibutyl-, dioctyl-, amylhexyl dialkylurées. Tous ces dérivés stimulent la respiration des mitochondries placées dans l'état 4 succinate, le plus actif étant le dérivé undécylé, les dialkylés semblent moins efficaces. Par contre, ils inhibent la vitesse de consommation du succinate lorsque les particules sont dans l'état 3.

En conclusion, il apparaît essentiel qu'un produit possède le radical —NH—C—NH— pour qu'il influence la respiration des mitochondries, les groupements $\begin{array}{c} || \\ \text{NH} \end{array}$ adjacents pouvant être un CH_2 comme dans les dérivés de la phényléthylamine NH ou un CO comme dans les amidinoalkylurées.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. ROCHE, R. MICHEL et A. LEBLANC, *C.r. Acad. Sci.* **260**, 1497 (1965).
2. B. CHANCE et C. R. WILLIAMS, *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1965).
3. R. J. GUILLORY et E. C. SLATER, *Biochim. biophys. Acta* **105**, 221 (1965).
4. B. C. PRESSMAN, *J. biol. Chem.* **238**, 401 (1963).
5. W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
6. J. ROCHE, J. E. RALL, R. MICHEL, O. MICHEL et S. VARRONE, *Biochim. biophys. Acta* **56**, 188 (1962).
7. D. F. WILSON et R. D. MERZ, *Archs Biochem. Biophys.* **119**, 470 (1967).
8. R. MICHEL, R. TRUCHOT, N. AUTISSIER et B. ROSNER, *Biochem. Pharmac.* **15**, 1127 (1966).
9. J. ROCHE, R. MICHEL et A. LEBLANC, *C.r. Soc. Biol.* **159**, 1338 (1965).
10. H. C. HEMKER, *Biochim. biophys. Acta* **81**, 1 (1964).
11. R. TRUCHOT, J. KLEPPING, R. MICHEL, A. ESCOUSSE et H. TRON-LOISEL, *C.r. Soc. Biol.* **158**, 1249 (1964).
12. CRENTZ FEDOT, H. D. SOELING et Z. ZARDAY, *Metab. Clin. Exptl* **12**, 264 (1963).
13. ERNSTER et C. LEE, *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 739 (1964).
14. B. CHANCE et G. HOLLUNGER, *J. biol. Chem.* **238**, 432 (1963).
15. G. HASS, *Biochim. biophys. Acta* **92**, 433 (1964).
16. J. B. CHAPPELL, *J. biol. Chem.* **238**, 410 (1963).
17. B. C. PRESSMAN, *Fedn Proc.* **21**, 55 (1962).
18. G. SCHAFER, *Biochim. biophys. Acta* **93**, 279 (1964).
19. G. SCHAFER, Abstr. 6th Int. Congr. Biochem. New York, p. 708 (1964).
20. G. SCHAFER, *Biochim. biophys. Acta* **172**, 334 (1969).
21. R. MICHEL, O. MICHEL et P. HUET, *C.r. Soc. Biol.* **160**, 1396 (1966).
22. R. MICHEL, *C.r. Soc. Biol.* **160**, 1399 (1966).
23. STERLING DRUG INC., *Neth. Appl.* **6**, 607 (1966).