

SÉPARATIONS CHROMATOGRAPHIQUES D'ACIDES AMINÉS ET DE PEPTIDES

I. CHROMATOGRAPHIE DE PEPTIDES NEUTRES DANS LE FORMOL à 10%

par

EDGAR LEDERER ET TCHEN PAU KIUN *

Laboratoire de Chimie biologique, Institut de Chimie de l'Université, Lyon (France)

On connaît actuellement une série de méthodes chromatographiques permettant la séparation des acides aminés en plusieurs groupes.

Les acides *diaminés* (arginine, lysine, histidine) sont adsorbés sur des terres acides (TURBA¹) ou sur de l'alumine „basique” (WIELAND²), ou sur des résines synthétiques (BLOCK³, FREUDENBERG, WALCH et MOLTER⁴).

Les acides *dicarboniques* (aspartique et glutamique) et la *cystine* sont adsorbés sur alumine „acide” (WIELAND², TURBA et RICHTER⁵), ou sur une résine basique synthétique (FREUDENBERG, WALCH et MOLTER⁵; voir aussi CANNAN⁶).

Les acides aminés *neutres* ayant passé les deux premières colonnes, peuvent être séparés en acides *aromatiques* et *aliphatiques* par filtration sur une colonne de charbon qui retient seulement les premiers : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, (SCHRAMM et PRIMOSIGH⁷). WACHTEL et CASSIDY^{8,9}, ainsi que TISELIUS^{10,11}, ont effectué des séparations plus fines dans ces deux groupes, également à l'aide d'une colonne de charbon.

SCHRAMM et PRIMOSIGH⁷ ont montré que seuls le glyco-colle et la sérine sont adsorbés quand on filtre un mélange d'acides aminés neutres, en présence de formol, sur une colonne d'alumine „acide”.

Les séparations les plus efficaces parmi les acides aminés neutres ont été obtenus par GORDON, MARTIN et SYNGE^{12,13,14,15}, dans une série de mémoires brillants, par „chromatographie de partage” („partition chromatography”) des dérivés acétylés des acides aminés sur une colonne de gel de silice imprégné d'eau et coloré par un indicateur de p_H approprié. Récemment, SYNGE¹⁶ a analysé les produits d'hydrolyse de la gramicidine (polypeptide bactériostatique) par chromatographie de partage sur amidon, et CONSDEN, GORDON et MARTIN¹⁷, ont inventé une méthode très ingénieuse permettant l'analyse qualitative de la plupart des acides aminés par chromatographie de partage sur papier filtre.

Nous n'avons pas ici l'intention de passer en revue tous les mémoires récents concernant la chromatographie des acides aminés. Nous n'insisterons pas non plus sur les bases physico-chimiques des différentes méthodes mentionnées (adsorption vraie, échange d'ions, partage entre solvants non-miscibles); nous renvoyons à ce sujet le lecteur aux travaux originaux et à la revue de WIELAND¹⁸, ainsi qu'à celle, très récente, de MARTIN et SYNGE^{15**}.

* L'un de nous (TCHEN P. K.) devant retourner en Chine, nous publions ces résultats qui seront complétés et mis au point à Lyon.

** Nous remercions vivement Mr R. L. M. SYNGE de nous avoir communiqué le manuscrit de ce travail.

CHROMATOGRAPHIE DE PEPTIDES

SYNGE¹⁹ a récemment souligné tout l'intérêt que comporte l'étude des produits de l'hydrolyse partielle des protéines. Il est donc très important d'étendre les études chromatographiques sur les *peptides*.

Les premières recherches dans cette direction ont montré que les peptides ont généralement un comportement analogue à celui des acides aminés qui les composent. C'est ainsi que WALDSCHMIDT-LEITZ, TUREA et RATZER^{20, 21} ont pu adsorber et fractionner sur des terres acides des *peptides d'arginine* obtenus par dégradation de la clupéine. Ils ont ainsi séparé des peptides contenant 2, 3 et 4 molécules d'arginine. GORDON, MARTIN et SYNGE ont constaté que la vitesse de filtration des acétyl-peptides sur gel de silice était à peu près la moyenne des vitesses de filtration des acides aminés composant les peptides en question. Des phénomènes plus compliqués ont été observés par SYNGE¹⁶ au cours de l'*adsorption sur amidon* de peptides provenant de l'hydrolyse partielle de la gramicidine.

Nous avons constaté nous-mêmes, au cours d'essais préliminaires, que des *peptides acides*, p. ex. le *glutathion*, sont adsorbés sur alumine acide, comme les acides aminés dicarboxyliques.

On voit donc que les méthodes chromatographiques employées jusqu'ici *ne permettent pas aisément la séparation de peptides et d'acides aminés*, puisque les peptides se comportent généralement comme les acides aminés qui les composent.

CHROMATOGRAPHIE DE PEPTIDES EN PRÉSENCE DE FORMOL à 10%

L'adsorption d'acides aminés neutres en présence de formol a été étudiée par SCHRAMM et PRIMOSIGH⁷. Seuls, le glyocolle et la sérine sont adsorbés sur une colonne d'alumine „acide” (préparée d'après WIELAND² *), tandis que les autres acides aminés neutres passent la colonne sans être retenus. L'élution du glyocolle et de la sérine s'effectue en milieu alcalin.

D'après SCHRAMM et PRIMOSIGH, le comportement du glyocolle et de la sérine était à prévoir, puisque l'addition de formol déplace leur constante de dissociation acide apparente (pK_a') plus fortement que celle des autres acides aminés. C'est ainsi que le pK_a' de la glycine est déplacé de 9,60 dans l'eau à 5,92, dans le formol à 9%, celui de la sérine de 9,15 dans l'eau à 5,63, dans le formol à 9% ; cette même constante reste entre 6,8 et 7,47 pour les autres acides aminés neutres, (voir Tableau I, d'après DUNN et LOSHAKOFF²²).

En présence de formol (par réaction de celui-ci avec le groupe aminé), le glyocolle et la sérine deviennent donc des acides suffisamment forts pour être adsorbés sur l'alumine acide.

La position singulière du glyocolle s'explique d'après SCHRAMM et PRIMOSIGH par le fait que son groupe aminé est lié à un carbone primaire, tandis que pour la sérine, il y aurait à envisager la formation d'un noyau d'oxazolidine, le formol réagissant en même temps avec le-NH₂ et l'-OH. Le formol est ainsi, dans les deux cas, plus fortement fixé sur le groupe aminé que dans les autres acides aminés neutres, où le composé acide aminé-formol est fortement dissocié (SØRENSEN²³ ; WADSWORTH et PANGBORN²⁴).

TOMIYAMA²⁵ étudiant les constantes d'équilibre de la réaction acides aminés-

* L'alumine acide est obtenue par traitement d'alumine par HCl n; l'alumine se charge ainsi d'ions Cl⁻ qui peuvent être échangés contre des anions organiques.

TABLEAU I

CONSTANTES DE DISSOCIATION ACIDE APPARENTES D'ACIDES AMINÉS ET DE PEPTIDES DANS L'EAU ET DANS LE FORMOL A 9% (D'APRÈS DUNN ET LOSHAKOFF ²²).

Acide aminé	pKa'		Peptide	pKa'	
	Eau	Formol à 9%		Eau	Formol à 9%
dl-alanine	9,68	6,96	glycyl-glycine . . .	8,13	4,27
dl-valine	9,64	7,47	di-glycyl-glycine . .	8,0	4,24
dl-norleucine	9,77	7,10	glycyl-dl-leucine . .	—	4,40
dl-phénylalanine . . .	9,12	6,80	dl-alanyl-glycine . .	7,75	5,52
			dl-leucyl-glycine . .	—	5,57
glycocolle	9,60	5,92	dl-leucyl-l-tyrosine .	—	5,07
dl-sérine	9,15	5,63			

formol, à p_H 8—10, dit, en effet : „The value of the equilibrium constant for glycine is almost 9 times as great as that for alanine. Glycine has therefore a strong affinity for formaldehyde”.

DUNN et LOSHAKOFF ²² ont mesuré les constantes de dissociation acide apparentes de quelques acides aminés et peptides (voir Tableau I). Nous voyons que les *peptides* étudiés *ressemblent à la glycine et à la sérine* en ce qui concerne leur pKa' dans le formol à 9%.

Il était donc à prévoir que ces peptides neutres s'adsorbent sur alumine acide exactement comme la glycine et la sérine. Nos essais ont confirmé cette supposition. Nous trouvons qu'effectivement les *di- et tripeptides neutres étudiés sont adsorbés sur alumine acide* (voir Tableau II).

Nous avons ainsi en mains une méthode permettant la *séparation quantitative d'acides aminés et de peptides neutres*. La valeur de cette méthode est évidemment diminuée par le fait que le glycocolle et la sérine * sont adsorbés avec les peptides.

Des méthodes préparatives de séparation d'acides aminés des peptides simples n'existent pratiquement pas, sauf la méthode de FISCHER et ABDERHALDEN ²⁶, qui consiste à séparer les dipeptides des acides aminés et des peptides supérieurs en transformant les premiers en dicétopipérazines ; ce n'est cependant pas une méthode susceptible d'une application quantitative.

Nous avons vu que le déplacement du pKa' du glycocolle et de la sérine par action du formol s'expliquait par le fait que le formol était plus fortement lié avec eux qu'avec les autres acides aminés neutres.

Comme le pKa' des peptides neutres se déplace en présence de formol de la même façon que celui du glycocolle et de la sérine, il faut admettre que le formol est ici également plus fortement lié que dans le cas des autres acides aminés.

WADSWORTH et PANGBORN ²⁴, en étudiant la réversibilité de la réaction formol-acides aminés en présence de dimédon, ont trouvé, en effet, que *seuls les dipeptides étudiés* (alanyl-glycine et glycyl-alanine) *n'ont pas manifesté de réversibilité*. Bien plus : dans un mélange d'acides aminés et de peptides contenant insuffisamment d'aldéhyde

* Note après correction des épreuves : La thréonine et la cystéine sont également adsorbés avec les peptides.

formique pour réagir avec tous les groupes aminés, un dipeptide, l'alanyl-glycine, par exemple, enlève graduellement aux acides aminés le formol combiné avec eux.

D'après ces mêmes auteurs, HOLDEN et FREEMAN²⁷ ont trouvé „that the simple amino acids were markedly less reactive (with formaldehyde) than certain proteose and peptone preparations”.

Ceci confirme bien la grande stabilité de la liaison des peptides avec le formol qui conditionne l'acidité du complexe peptide-formol et son adsorbabilité sur alumine acide.

Le formol, en tant que dipole (voir p. ex. SCHOU²⁸) et acide faible (EULER et LÖVGREN²⁹) doit avoir des difficultés à se rapprocher du groupe aminé des α -amino-acides, étant repoussé par la charge négative du carboxyle voisin. Dans les peptides, le groupe-NH₂ étant loin du groupe carboxyle, le formol peut facilement entrer en réaction avec lui, et le complexe peptide-formol, n'aura plus de tendance à dissocier.

Nous pensons pouvoir, par le même raisonnement, expliquer le cas du glyocolle ; son groupe NH₂ étant fixé sur un carbone primaire, le formol peut s'approcher de lui beaucoup plus facilement (du côté opposé au carboxyle) que de celui des autres α -amino-acides. Dans l'alanine déjà, le groupe méthyle gênera l'approche du formol.

Les glycyl-peptides manifestent un phénomène analogue ; nous voyons, d'après les mesures de DUNN et LOSHAKOFF (Tableau I), que leur pKa', en présence de formol, est plus acide que celui des autres peptides. *

ADSORPTION DE LA β -ALANINE

Si, vraiment, l'effet du formol sur l'acidité du glyocolle est dû à la présence d'un -NH₂ lié à un carbone primaire, nous devons trouver le même phénomène chez tous les acides aminés en ω . Nous avons trouvé qu'en effet la β -alanine est quantitativement retenue sur la colonne d'alumine acide, en solution formolée à 10%. On peut ainsi la séparer quantitativement de son isomère α . Il est à prévoir que les acides aminés en γ , δ , etc., contenant le groupement -CH₂NH₂ se comporteront de la même façon. Nous vérifierons cette hypothèse dès que nous disposerons des substances nécessaires **.

On peut, pour ces acides, invoquer encore une autre raison pour expliquer leur affinité pour le formol : c'est la plus grande basicité de leur groupe aminé. D'après EDSALL et BLANCHARD³⁰, la basicité du groupe aminé augmente en effet avec la distance qui le sépare du groupe carboxyle. Il se peut que les deux phénomènes jouent un rôle simultanément.

Dans le cas des peptides, cependant, les mesures de SIMMS³¹, de MITCHELL et de GREENSTEIN^{32, 33}, ont bien montré que la liaison peptidique *affaiblit* la basicité du groupe -NH₂ (et l'acidité du carboxyle).

* Note après correction des épreuves : On peut utiliser ce phénomène pour séparer les glycyl-peptides des autres peptides neutres (voir un prochain mémoire de JUTISZ et LEDERER).

** Après rédaction de ce mémoire, nous avons eu connaissance d'un mémoire de W. O. TREADWELL et J. BERGLAND (Helv. Chim. Acta **28**, (1945) 945), contenant de nouvelles mesures de la dissociation acide apparente de plusieurs acides aminés en présence de formol. Nous y trouvons le chiffre de pKa' = 6,41 pour la β -alanine, dans le formol à 10%, contre 7,26 pour l' α -alanine. D'après ces chiffres, la β -alanine doit, en effet, rester adsorbée sur alumine acide.

ADSORPTIONS DES ACIDES O- ET P-AMINO BENZOÏQUES

Nous avons pensé pouvoir séparer aussi les acides o- et p-aminobenzoïques (adsorption de l'acide p-amino-benzoïque, contrairement à l'acide o-amino-benzoïque (anthranilique)).

L'essai a montré cependant que *les deux acides sont adsorbés sur alumine acide, même en absence de formol*. Ceci s'explique certainement par la plus grande acidité du carboxyle aromatique, par rapport aux carboxyles aliphatiques. La constante de dissociation acide de ces deux acides aminobenzoïques est en effet de $1,2 \times 10^{-5}$ contre $1,6 \times 10^{-10}$ pour l'alanine (voir BEILSTEIN, 4ème éd. vol. XIV).

Nous remercions vivement Monsieur CL. FROMAGEOT de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail et Monsieur H. PENAU (Laboratoires ROUSSEL) des suggestions qu'il nous a faites au cours de nos recherches et de la subvention qu'il nous a accordée.

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

Substances utilisées : Acides aminés et peptides de F. HOFFMANN-LA ROCHE, recristallisés dans l'eau ou dans un mélange d'eau et d'alcool. Nous avons synthétisé la dl-alanyl-dl-leucine d'après FISCHER et WARBURG ³⁴ et la dl-alanyl-dl-phénylalanine d'après LEUCHS et SUZUKI ³⁵.

Mode opératoire : Nous suivons essentiellement la technique de SCHRAMM et PRIMOSIGH. On dissout de 3 à 30 mg d'acide aminé ou de peptide dans 5 cm³ de formol à 10%. Le formol est purifié par distillation du formol commercial. Le distillat, exempt d'azote, contient environ 30% de formol ; on le dilue convenablement et le neutralise jusqu'au virage au rose de la phénolphthaléine (ph—8,5).

On filtre la solution de la substance à étudier sur une colonne de 20 g d'alumine acide (alumine MERCK préparée suivant WIELAND ²) préalablement lavée avec 75 cm³ de formol à 10%.

Dès que les 5 cm³ de solution ont pénétré dans la colonne, on y verse encore 50 cm³ de formol à 10%. On obtient ainsi le *filtrat* contenant les substances ayant passé la colonne sans être adsorbées.

Pour éluer les substances adsorbées, nous lavons la colonne avec de l'alcali dilué : d'abord 20 cm³ de KOH n/2, pour neutraliser l'acide de la colonne, puis 30 cm³ de KOH n/10, pour effectuer l'élution en milieu faiblement alcalin. Nous recueillons le liquide alcalin dans un léger excès d'acide sulfurique dilué : *éluat* b). On peut évidemment aussi effectuer les éluations avec de la baryte aqueuse, comme WIELAND, ce qui facilite un traitement ultérieur des éluats, après précipitation de la baryte avec de l'acide sulfurique *.

Nous dosons l'azote des substances étudiées, d'après KJELDAHL. Les résultats de nos expériences sont consignés dans le Tableau II.

Les essais 1, 2, 3 et 4 vérifient les données de SCHRAMM et PRIMOSIGH. Nous n'avons pas cru nécessaire de vérifier le comportement des autres acides aminés neutres ** qui passent dans le filtrat a) sans être adsorbés. On voit que le pourcentage de récupération des substances (colonnes 7 et 9) varie de 95 à 102%, variations dues surtout aux erreurs de dosage.

L'acide *p-amino-benzoïque* a été dissous dans l'eau distillée pH_{6,5} (4,4 mg/5cc d'eau calculé : 0,562 mg N ; trouvé 0,50 mg N). Cette solution a été filtrée sur 20 g d'alumine acide lavés avec 75 cm³ d'eau ; on a ensuite lavé la colonne avec 50 cm³ d'eau ; le *filtrat* ainsi obtenu ne contenait pas d'azote ; le *filtrat* b, obtenu comme décrit ci-dessus, contenait 0,493 mg N = 95% de l'azote de la prise. Les chiffres correspondants pour l'acide *anthranilique* sont : adsorbé 6,1 mg = 0,573 mg N. Filtrat a : 0 mg N. Filtrat b : 0,580 mg N = 102%.

* Dans une prochaine communication (JUTISZ et LEDERER) nous décrirons deux améliorations techniques : emploi de colonnes de 5 g d'alumine acide au lieu de 20 g (pour la même quantité de peptides) et élution des substances adsorbées, à l'eau chaude (au lieu de l'élution alcaline).

** valine, norvaline, isoleucine, norleucine, proline, hydroxy-proline, méthionine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane.

TABLEAU II

ADSORPTION D'ACIDES AMINÉS ET DE PEPTIDES EN PRÉSENCE DE FORMOL à 10%.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
No	Substance	pesée en mg	N en mg		Filtrat		Eluat	
			théor.	trouvé	N trouvé	% N	N trouvé	% N
1	glycocolle	4,0	0,746	0,735	0	0	0,722	98
2	dl-sérine	8,9	1,19	—	0	0	1,20	100
3	α -alanine	5,75	0,905	0,862*	0,836	97	0	0
4	dl-leucine	30,3	3,29	3,20	3,12	97,5	0	0
5	glycyl-dl-leucine	10,8	1,62	1,56	0	0	1,52	98
6	dl-leucyl-glycine	10,6	1,59	1,50*	0	0	1,45	96,5
7	dl-alanyl-glycine	7,88	1,52	—	0	0	1,55	102
8	dl-alanyl-dl-leucine	4,84	0,67	0,65	0	0	0,63	97
9	dl-alanyl-dl-phénylalanine	4,70	0,558	0,494*	0	0	0,478	97
10	glycyl-l-tyrosine	11,50	1,352	1,23	0	0	1,19	97
11	dl-leucyl-glycyl-glycine	4,27	0,74	0,71	0	0	0,70	99
12	β -alanine	3,86	0,62	0,59	0	0	0,562	95

Les chiffres des colonnes 7 et 9 sont calculés par rapport à ceux de la colonne 5, sauf pour les essais No. 2 et 7.

* Substances utilisées sans séchage préalable.

RÉSUMÉ

1. En solution dans le formol à 10%, les di- et les tripeptides neutres sont adsorbés sur alumine acide, comme le glycocolle et la sérine. On peut ainsi les séparer quantitativement des autres acides aminés neutres qui ne sont pas adsorbés. Les peptides adsorbés sont quantitativement élués en milieu alcalin.

2. La β -alanine est également adsorbée sur alumine acide; on peut ainsi la séparer quantitativement de son isomère α .

3. Les acides o- et p-aminobenzoïques sont adsorbés sur alumine acide, même en absence de formol.

SUMMARY

1. In a 10% formol solution neutral di- and tripeptides are adsorbed on acid-activated alumina, as are also glycine and serine. In this way they can be separated quantitatively from other neutral non-adsorbed amino acids. Adsorbed amino acids are quantitatively eluted in an alkaline medium.

2. β -Alanine is also adsorbed on acid activated alumina; in this way it can be separated quantitatively from its α -isomer.

3. Even in the absence of formol, o- and p-aminobenzoic acids are adsorbed on acid activated alumina.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In einer zehnprozentigen Formollösung werden die neutralen Di- und Tripeptide, ebenso wie Glykokoll und Serin, an säurehaltige Tonerde adsorbiert. Sie können auf diese Weise von den anderen neutralen nicht adsorbierten Aminosäuren quantitativ getrennt werden. Die adsorbierten Peptide werden in alkalischem Medium quantitativ eluiert.

2. β -Alanin wird ebenfalls an säurehaltige Tonerde adsorbiert; man kann es auf dieser Weise von seinem α -Isomer quantitativ trennen.

4. Die o- und p-Aminobenzoësäuren werden an säurehaltige Tonerde selbst in Abwesenheit von Formol adsorbiert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. TURBA, *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **74** (1941) 1829.
- ² TH. WIELAND, *Z. physiol. Chem.*, **273** (1942) 24; *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **75** (1942) 340; *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **75** (1942) 1001.
- ³ R. J. BLOCK, *Proc. Soc. exp. Biol. et Med. N.Y.*, **51** (1942) 252.
- ⁴ K. FREUDENBERG, H. WALCH et H. MOLTER, *Naturwiss.*, **30** (1942) 87.
- ⁵ F. TURBA et M. RICHTER, *Ber. dtsh. chem. Ges.*, **75** (1942) 340.
- ⁶ R. K. CANNAN, *J. Biol. Chem.*, **152** (1944) 401.
- ⁷ G. SCHRAMM et J. PRIMOSIGH, *Ber. dtsh. chem. Ges.*, **76** (1943) 373.
- ⁸ J. WACHTEL et H. G. CASSIDY, *Science*, **95** (1942) 233.
- ⁹ J. WACHTEL et H. G. CASSIDY, *J. Amer. Chem. Soc.*, **65** (1943) 665.
- ¹⁰ A. TISELIUS, *Advances in Colloid Sci.*, **1** (1941) 81.
- ¹¹ A. TISELIUS, *Koll. Z.*, **105** (1943) 101, 177.
- ¹² A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, **37** (1943) 79, 86, 92, 313.
- ¹³ A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, **38** (1944) 65.
- ¹⁴ A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, **35** (1941) 1358.
- ¹⁵ A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Advances in Protein Chemistry*, **2** (1945) 1-84.
- ¹⁶ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, **38** (1944) 285.
- ¹⁷ R. CONSDEN, A. H. GORDON et A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, **38** (1944) 224.
- ¹⁸ TH. WIELAND, *Chemie*, **56** (1943) 213.
- ¹⁹ R. L. M. SYNGE, *Chem. Rev.*, **32** (1943) 135.
- ²⁰ E. WALDSCHMIDT-LEITZ et F. TURBA, *J. pr. Chem.*, **156** (1940) 55.
- ²¹ E. WALDSCHMIDT-LEITZ, J. RATZER et F. TURBA, *J. pr. Chem.*, (2), **158** (1941) 72.
- ²² M. S. DUNN et A. LOSHAKOFF, *J. Biol. Chem.*, **113** (1936) 691.
- ²³ S. P. L. SØRENSEN, *Biochem. Z.*, **7** (1907) 45; *C.R. Lab. Carlsberg*, **7** (1907) 1.
- ²⁴ A. WADSWORTH et M. C. PANGBORN, *J. biol. Chem.*, **116** (1936) 423.
- ²⁵ T. TOMIYAMA, *J. biol. Chem.*, **111** (1935) 51.
- ²⁶ E. FISCHER et E. ABDERHALDEN, *Z. physiol. Chem.*, **46** (1905) 52.
- ²⁷ H. F. HOLDEN et M. FREEMAN, *Australian J. exp. Biol. and Med. Sc.*, **8** (1931) 189.
- ²⁸ S. A. SCHOU, *Thèse doctorat ès-Sciences*, Paris 1928.
- ²⁹ H. v. EULER et T. LÖVGREN, *Z. anorg. Chem.*, **147** (1925) 123.
- ³⁰ J. T. EDSALL et M. H. BLANCHARD, *J. amer. Chem. Soc.*, **55** (1933) 2337.
- ³¹ H. S. SIMMS, *J. gen. Physiol.*, **12** (1928) 231.
- ³² P. H. MITCHELL et J. P. GREENSTEIN, *J. gen. Physiol.*, **14** (1930) 255.
- ³³ J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chem.*, **93** (1931) 479.
- ³⁴ E. FISCHER et O. WARBURG, *Liebigs Ann. Chem.*, **340** (1905) 152.
- ³⁵ H. LEUCHS et U. SUZUKI, *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **37** (1904) 3306.

Reçu le 13 novembre 1945.