

SYNTHÈSES PEPTIDIQUES A PARTIR D'UN DÉRIVÉ DU
GLYCYLPHOSPHATE

par

H. CHANTRENNE*

*Laboratoire de Morphologie animale,
Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles (Belgique)*

I. INTRODUCTION

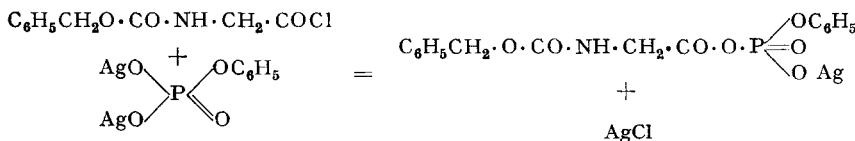
Nous avons montré précédemment^{1, 2, 3} que le dibenzoylphosphate ou le benzoylphosphate de phényle réagissent avec le glycocolle en formant de l'acide hippurique. Cette réaction se produit rapidement à 37° en solution aqueuse diluée, de pH 7.4.

Les expériences que nous décrivons ci-dessous montrent qu'il est facile d'obtenir des peptides dans les mêmes conditions à partir de dérivés d'aminoacylphosphates. Elles ouvrent la voie à une nouvelle méthode générale de synthèse des peptides.

II. PRÉPARATION DE CARBOBENZOXYGLYCYLPHOSPHATE DE PHÉNYLE

Avant d'engager le carboxyle d'un acide aminé dans une liaison anhydride mixte avec l'acide phénylphosphorique, il faut protéger son groupe NH₂. Le radical carbo-benzoxyle a été choisi comme groupe protecteur, parce qu'il peut être détaché très facilement par une hydrogénéation catalytique douce qui n'affecte pas les liaisons peptidiques⁴ ou acylphosphoriques⁵, ni la liaison ester du phosphate de phényle⁶, ni les cycles benzéniques⁶.

Nous avons obtenu du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle en faisant agir du chlorure de carbobenzoxyglycyle sur du phénylphosphate d'argent diargentique.



Le chlorure de Carbobenzoxyglycyle a été préparé selon BERGMANN ET ZERVAS⁴, et le phénylphosphate d'argent par la méthode que nous avons décrite dans une publication antérieure³.

a. *Synthèse*

On dissout 5 g de chlorure de carbobenzoxyglycyle recristallisé, dans 35 ml d'éther exempt d'alcool; on y ajoute 4 g de phénylphosphate d'argent C₆H₅PO₄Ag₂. On secoue

* Chargé de Recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique.

le mélange à la machine pendant deux heures à la température du laboratoire (20-22°). On isole les produits insolubles par centrifugation, on les lave à l'éther et on les sèche dans le vide.

Lorsqu'on met ces produits bruts au contact d'eau, ou d'une solution aqueuse d'hydroxylamine (p_{H} 7), on observe un assez vif dégagement de CO_2 ; en présence d'hydroxylamine, il se forme en même temps des acides hydroxamiques reconnaissables à la coloration rouge que prennent leurs solutions en milieu acide fort contenant des ions ferriques.

b. *Etude du produit brut*

Il est facile de séparer différents acides hydroxamiques par chromatographie de partage sur papier filtre, en utilisant du *n*-butanol aqueux comme solvant.

La technique utilisée couramment pour les acides aminés⁷ convient parfaitement; on dépose sur le papier des solutions neutres (p_{H} 7) des acides hydroxamiques. Après développement, on asperge le papier d'une solution de FeCl_3 à 2% dans HCl n/10 et on laisse sécher à la température ordinaire. Des taches rouges se détachent sur le fond jaune aux endroits occupés par les acides hydroxamiques.

Une telle analyse montre que la réaction de l'hydroxylamine avec le produit brut donne naissance à deux acides hydroxamiques. L'un d'eux se comporte comme un échantillon d'acide carbobenzoxyglycylhydroxamique préparé par action de chlorure de carbobenzoxyglycyle sur une solution alcaline d'hydroxylamine: (R_F : 0.80).

L'autre est identique à l'acide glycylhydroxamique qu'on obtient par action de l'hydroxylamine sur la 2,5-oxazolidinedione (anhydride du N-carboxyglycocolle) (R_F : 0.03).

Le dégagement de CO_2 et la formation d'acide glycylhydroxamique au contact de la solution d'hydroxylamine révèlent la présence de 2,5-oxazolidinedione dans le produit brut; on sait que cette substance, insoluble dans l'éther, se forme très facilement à partir du chlorure de carbobenzoxyglycyle et d'autres corps à structure analogue^{4, 9, 10}.

c. *Elimination de la 2,5-oxazolidinedione*

On peut l'éliminer facilement en agitant le produit brut dans l'acétate d'éthyle (deux lavages avec 25 ml de solvant). Le produit lavé de cette façon et séché dans le vide ne libère plus de CO_2 au contact de l'eau ou d'une solution d'hydroxylamine. Il réagit rapidement avec cette dernière substance en formant un seul acide hydroxamique que la chromatographie permet d'identifier à l'acide carbobenzoxyglycylhydroxamique (R_F : 0.80).

La seule substance porteuse de groupes carboxyles activés que contienne encore le produit lavé à l'acétate d'éthyle est donc un anhydride du carbobenzoxyglycocolle.

Il ne s'agit certainement pas de chlorure de carbobenzoxyglycyle non transformé, car celui-ci est très soluble dans l'éther et insoluble dans l'eau. La substance que nous étudions est au contraire insoluble dans l'éther et soluble dans l'eau.

d. *Propriétés de la liaison anhydride*

Nous avons déterminé la vitesse d'hydrolyse de la liaison anhydride à 37° dans une solution aqueuse de p_{H} 7.4, et étudié son comportement en présence de glycocolle.

Expérience

On a mis en thermostat à 37° trois tubes contenant les solutions suivantes:

- A. 3 ml d'une solution M/300 en groupes anhydride;
- B. 3 ml de la même solution + 2.3 mg de glycocolle (= M/100);
- C. 3 ml de la même solution + 22.5 mg de glycocolle (= M/10).

Après des durées d'incubation bien déterminées, on a prélevé des échantillons des différents liquides et dosé les groupes anhydride par la méthode à l'hydroxylamine^{3, 11}.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau suivant:

TABLEAU I

A		B		C	
Durée d'incubation	Groupes anhydride restant	Durée d'incubation	Groupes anhydride restant	Durée d'incubation	Groupes anhydride restant
0 min	100%	0 min	100%	0 min	100%
60 "	88%	5 "	69.5%	1 "	56%
120 "	81%	10 "	53%	2 "	32%
360 "	73%	20 "	35%	5 "	10%
—		30 "	27.5%	10 "	2%
		60 "	12%	—	

Cette expérience montre que l'anhydride du carbobenzoxyglycocolle qui se trouve dans le produit étudié est assez stable à 37° en solution aqueuse M/300 de p_{H} 7.4. En présence de glycocolle, au contraire, il disparaît très rapidement: sa demi-durée de vie est inférieure à 2 minutes dans une solution M/10 de glycocolle p_{H} 7.4; elle est d'environ 12 minutes dans une solution de glycocolle M/100.

La fonction anhydride étudiée se comporte donc exactement à la façon de celle des acylphosphates substitués^{1, 2, 3}.

Les quantités limitées de produit dont nous disposions ne nous ont pas permis d'isoler à l'état pur la substance qui possède une liaison anhydride. Cependant, considérant la méthode de préparation et la similitude des propriétés de cette substance et de celles du benzoylphosphate de phényle³, nous croyons pouvoir admettre qu'elle n'est autre que le sel d'argent du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle.

Dans les expériences qui suivent, nous avons utilisé un produit qui contenait, à côté de cette substance, un peu de phénylphosphate et de carbobenzoxyglycocolle. La concentration des solutions a été déterminée par dosage des groupes anhydride selon LIPMANN ET TUTTLE¹¹ en utilisant du benzoylphosphate de phényle³ comme substance de référence.

III. SYNTHÈSES PEPTIDIQUES

1. *Glycylglycine*

Le produit de la réaction du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle avec le glycocolle a été hydrogéné en présence de palladium à la température du laboratoire, jusqu'à ce que tout dégagement de CO_2 eût cessé. La solution hydrogénée a été débarrassée du catalyseur, par centrifugation, puis étudiée par chromatographie de partage sur papier filtre⁷:

Sur une bande de papier filtre de 15 cm sur 40 on a déposé une goutte de la solution hydrogénée, une goutte d'une solution de glycocolle et une goutte d'une solution de glycylglycine. On a chromatographié pendant 5 jours à température ordinaire en utilisant comme solvant un mélange de 100 volumes de *n*-butanol et 17 volumes d'eau.

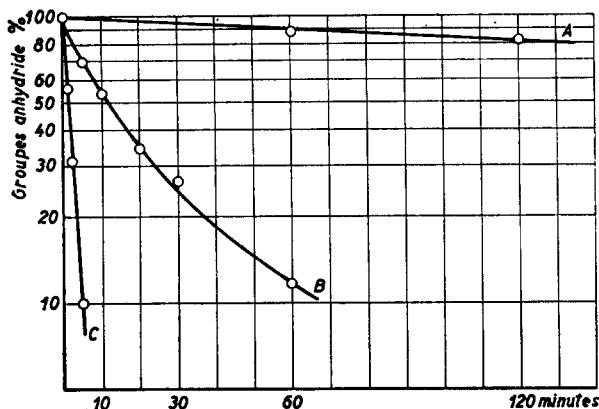


Fig. 1. Stabilité de la liaison anhydride à 37°, pH 7.4
Conc: M/300. A. en l'absence de glycocolle; B. en présence de glycocolle M/100; C. en présence de glycocolle M/10

Ce comportement est caractéristique des peptides dont le groupe aminé libre appartient à une molécule de glycocolle¹².

Cette expérience démontre que la réaction du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle avec le glycocolle a donné naissance à de la carbobenzoxyglycylglycine dont on a libéré la glycylglycine par hydrogénéation.

2. Glycyltryptophane

A une solution (M/100) de 20 mg de tryptophane dans 10 ml de tampon de phosphate M/30 pH 7.4, on a ajouté environ 10^{-4} molg de sel d'argent du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle, puis un peu de NaCl et on a éliminé l'AgCl par centrifugation. Après une demi-heure à 37°, la solution ne contenait plus de groupes anhydride décelables par la méthode à l'hydroxylamine¹¹. La solution a été agitée dans l'hydrogène en présence de 10 mg de palladium pendant une heure à la température du laboratoire, puis chromatographiée sur papier. Les chromatogrammes ont été analysés selon la méthode de HOTCHKISS¹³:

Sur une bande de papier filtre de 15 cm sur 40 on a déposé 7 gouttes identiques de la solution hydrogénée, et on a chromatographié pendant 40 heures (solvant: 100 volumes de *n*-butanol + 17 volumes d'eau). Le chromatogramme a été découpé en bandelettes transversales larges de 8 mm qu'on a fait séjournier pendant une heure dans des tubes contenant 3 ml d'eau; le tryptophane a été dosé dans les éluats, par la méthode de HOPKINS (modification de SHAW ET MACFARLANE¹⁴).

Les résultats de cette analyse sont rassemblés dans le graphique 2b. La Fig. 2a donne le résultat d'une analyse identique de la solution de tryptophane. La comparaison des deux figures montre que le gros du tryptophane se retrouve dans une combinaison dont le R_F vaut environ 0.35 fois celui du tryptophane.

Ce composé réagit avec la ninhydrine comme les glycylpeptides¹² en formant une substance jaune qui vire peu à peu au violet. A l'hydrolyse, il libère du glycocolle, qui a été identifié par chromatographie sur papier.

La détermination du rapport Azote/Tryptophane dans ce produit a conduit aux résultats suivants:

trouvé (pour deux expériences indépendantes)

2.95

3.10 équiv. N/équiv. Tryptophane

chiffre exact pour le glycyltryptophane:

3.00

Méthodes

Dosage du tryptophane selon HOPKINS, modification de SHAW et MACFARLANE¹⁴.

Dosage de l'azote: méthode de KJELDAHL, minéralisation selon WHITE et SECOR¹⁵; Appareil de MARKHAM¹⁶. La méthode, appliquée à une solution pure de tryptophane, a fourni des chiffres compris entre 1.97 et 2.00 équivalents d'azote par équivalent de tryptophane.

La nouvelle substance isolée sur le chromatogramme est donc du glycyltryptophane.

3. Glycylglycyltryptophane

On a ajouté environ 10^{-4} mol g de carbobenzoxyglycylphosphate de phényle à la solution hydrogénée; on a mis le mélange en thermostat après avoir ajusté le p_H à 7.4.

Après 20 minutes d'incubation, tous les groupes anhydride décelables par la méthode à l'hydroxylamine avaient disparu. On a soumis la solution à l'hydrogénéation dans les conditions indiquées plus haut.

La Fig. 2c traduit les résultats de l'analyse chromatographique de cette solution. En comparant 2c à 2b on constate que le glycyltryptophane a presque complètement disparu; il a fait place à un nouveau composé du tryptophane qui progresse encore plus lentement, et dont le comportement est celui qu'on pouvait prévoir pour le glycylglycyltryptophane.

On notera que le carbobenzoxyglycylphosphate de phényle a réagi beaucoup plus vite avec le dipeptide qu'avec le tryptophane qui se trouvait encore dans la solution. Ceci s'explique facilement: les acylphosphates substitués réagissent avec les NH_2 non ionisés^{2, 3}; or, le pK du groupe NH_3^+ du tryptophane vaut 9,4 et celui des dipeptides se situe vers 8²⁴. Il en résulte qu'à p_H 7.4 le glycyltryptophane offre environ 20 fois plus d' NH_2 non ionisés que le tryptophane à la même concentration.

IV. LE GLYCYLPHOSPHATE DE PHÉNYLE

Si on agite une solution de carbobenzoxyglycylphosphate de phényle à p_H 7.4 dans l'hydrogène, en présence de palladium, on observe une disparition rapide des liaisons anhydride, et l'apparition de peptides et de dicétotripéptidé.

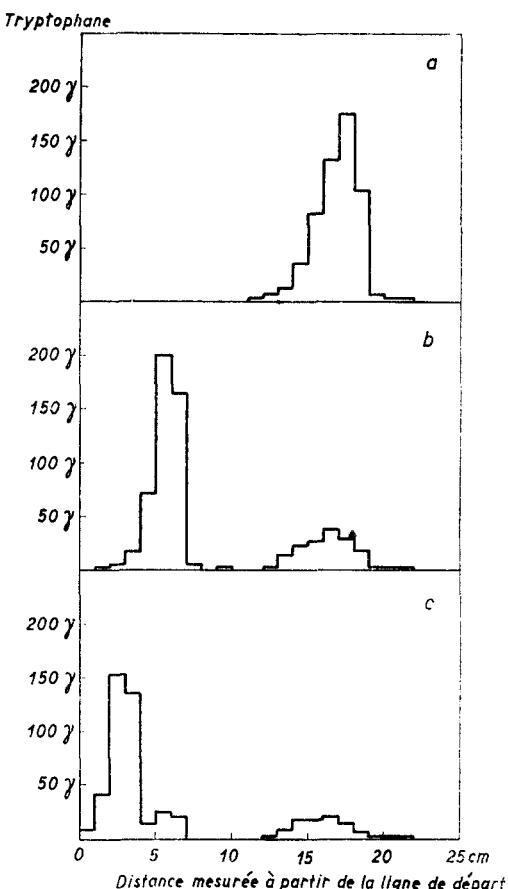


Fig. 2. Distribution du tryptophane sur les chromatogrammes

L'hydrogénéation ne brise pas les liaisons anhydride; elle libère les NH_2 en détruisant les groupes carbobenzoxy- qui les protégeaient; les NH_2 ainsi démasqués réagissent immédiatement avec les fonctions anhydride en formant des liaisons peptidiques. On peut en effet dissocier facilement ces deux réactions.

Le carbobenzoxyglycylphosphate de phényle est aussi stable à pH 3.0 qu'à pH 7.4, mais à pH 3, il ne réagit pas avec les NH_2 d'acides aminés, qui sont complètement ionisés.

Une solution M/100 de carbobenzoxyglycylphosphate de phényle dans un tampon de formiate M/30 pH 3.0 a été agitée dans l'hydrogène en présence de palladium, à la température ordinaire, jusqu'à ce que tout dégagement de CO_2 eût cessé. Cette opération n'a pas entraîné la disparition des liaisons anhydride décelables par la réaction à l'hydroxylamine¹¹; mais alors que l'acide hydroxamique obtenu à partir de la solution primitive était de l'acide carbobenzoxyglycylhydroxamique (R_F : 0.80 dans le butanol aqueux), le produit de la réaction de l'hydroxylamine avec la solution hydrogénée à pH 3, était l'acide glycylhydroxamique (R_F : 0.03).

Tout se passe donc comme si l'hydrogénéation à pH 3 avait détruit le groupe carbobenzoxy- et libéré le glycylphosphate de phényle, stable à pH 3.

Il a suffi d'élever à 7-7.4 le pH de la solution hydrogénée pour voir disparaître rapidement les fonctions anhydride, tandis qu'apparaissaient des peptides du glycocolle: la chromatographie de partage révèle la formation d'un peu de glycylglycine et d'autres peptides décelables à la ninhydrine, qui progressent plus lentement sur le chromatogramme.

Il s'est formé en outre de grandes quantités de dicétopipérazine, reconnaissable par la réaction de SASAKI²⁵.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Les expériences décrites ci-dessus montrent que le carbobenzoxyglycylphosphate de phényle réagit rapidement à 37° avec les acides aminés, en solution aqueuse (pH 7.4) en formant le carbobenzoxy-dipeptide correspondant, dont le dipeptide peut être libéré par hydrogénéation.

Cette réaction jette les bases d'une nouvelle méthode générale de synthèse peptidique. Notons-en les particularités:

La liaison peptidique se forme à température ordinaire entre des substances en solution aqueuse neutre (la réaction marche de pH 6 à pH 8). L'affinité des acylphosphates substitués pour les NH_2 d'acides aminés ou de peptides est telle que la réaction s'effectue avec un rendement de 90% entre des substances en solution M/100. A une concentration M/1000 la réaction se produit encore à une vitesse notable. Pour des concentrations de l'ordre de M/10, le rendement atteindrait sans doute près de 100%.

La synthèse comporte les étapes préliminaires suivantes: carbobenzoxyaminoacide, chlorure d'acide correspondant, carbobenzoxyaminoacylphosphate de phényle (dont le sel d'argent se conserve plusieurs mois à -5°). Pour réaliser la synthèse peptidique proprement dite, il suffit de dissoudre dans l'eau des quantités équimoléculaires du carbobenzoxyaminoacylphosphate de phényle, et de l'acide aminé à acyler, d'ajuster le pH à 7.4, d'abandonner la solution une demi-heure à 37°, puis de l'agiter dans l'hydrogène en présence de palladium.

Un avantage important de la méthode que nous présentons réside dans la possibilité d'enchaîner plusieurs acides aminés en un oligopeptide, en solution aqueuse neutre et

sans qu'il soit nécessaire d'isoler les produits intermédiaires (dipeptide, tripeptide, etc.). Par exemple, soit à réaliser la synthèse du pentapeptide ABCDE, dans lequel nous supposerons que le COOH libre est porté par l'acide aminé E et le NH₂ libre par l'acide aminé A. On procédera de la manière que voici: à une solution M/10 de E, on ajoutera une quantité équimoléculaire de carbobenzoxy-D-phosphate de phényle; après 30 minutes on hydrogénera en présence de palladium (ce qui libérera D-E). On ajoutera ensuite une quantité équimoléculaire de carbobenzoxy-C-phosphate de phényle; après 30 minutes on hydrogénera, libérant le tripeptide CDE; et ainsi de suite. On pourra donc enchaîner des acides aminés par une série d'additions de carbobenzoxyaminoacyl-phosphates de phényle, alternant avec des hydrogénations, toutes les opérations s'effectuant dans une même solution aqueuse et sans qu'aucun isolement ou fractionnement soit requis.

Cette méthode de synthèse est illustrée par la préparation du glycylglycyltryptophane.

L'essai de polycondensation de glycylphosphate de phényle a conduit à la formation d'un peu de polyglycines, mais d'une quantité beaucoup plus grande de dicétopipérazine; on pouvait s'y attendre car le cycle à six atomes de la dicétopipérazine se forme très facilement. Il est permis de penser qu'un tripeptidylphosphate de phényle aurait au contraire une forte tendance à former des chaînes polypeptidiques ouvertes. A partir d'un tripeptide formé de trois acides aminés différents, on obtiendrait ainsi, en une seule opération, des chaînes polypeptidiques linéaires à *structure périodique*, dans lesquelles les trois acides aminés se répéteraient régulièrement, et toujours dans le même ordre.

2. Les recherches de LIPMANN¹⁸, COHEN ET McGILVERY¹⁹, BORSOOK ET DUBNOFF¹⁷, SPECK²⁰, ELLIOT²¹ montrent que des phosphorylations interviennent dans la synthèse biologique des liaisons peptidiques; elles suggèrent qu'il se formerait un intermédiaire phosphorylé à potentiel chimique élevé, appartenant vraisemblablement à la classe des acylphosphates.

La formation rapide de peptides dans une réaction qui met en jeu précisément un dérivé d'aminoacylphosphate et un acide aminé libre, constitue un modèle de synthèse peptidique dont l'intérêt, au point de vue biochimique, est augmenté du fait que cette réaction se déroule rapidement à 37° en solution aqueuse diluée, tamponnée à pH 7.4, c'est à dire dans les conditions physiologiques de pH, concentrations et température.

Soulignons que les acylphosphates ne réagissent avec les groupes NH₂ dans ces conditions que si leur reste phosphorique porte un substituant (dans le modèle, le radical phényle)^{1, 2, 3}.

Ceci suggère que les intermédiaires phosphorylés à potentiel chimique élevé qui semblent participer aux synthèses peptidiques dans les cellules vivantes, seraient probablement des *acylphosphates substitués*, c'est à-dire des acylphosphates dont le reste phosphorique serait lié à un autre constituant cellulaire.

Cette suggestion semble appuyée par des résultats tout récents de KAPLAN ET LIPMANN²⁶ qui ont isolé d'extraits de bactéries incubés en présence d'ATP, un dérivé de l'acétylphosphate, qui n'a pas encore été identifié.

Les mécanismes de la synthèse des protéines sont encore complètement inconnus; l'existence d'une relation entre la teneur en acide ribonucléique d'une cellule et l'importance des synthèses protéiques qui s'y déroulent^{22, 23} s'est affirmée de plus en plus nettement au cours des dernières années; aucune interprétation satisfaisante de cette coïncidence n'a pu être donnée jusqu'ici. Il nous semble que nos résultats font entrevoir

une possibilité d'expliquer l'intégration des acides nucléiques dans les mécanismes des synthèses peptidiques: nous imaginerions volontiers que les groupes phosphoriques d'acides nucléiques sont les "groupes phosphoriques substitués" au niveau desquels les acides aminés ou leurs précurseurs viendraient s'activer en formant avec eux des liaisons anhydride mixte du type de celle des acylphosphates substitués; les carboxyles ainsi activés réagiraient avec les NH_2 d'autres molécules d'acides aminés en formant des chaînes polypeptidiques tandis que l'acide nucléique libéré servirait de support pour l'activation de nouvelles molécules. Cette suggestion, soulignons-le, n'est qu'une hypothèse de travail qui devra subir l'épreuve de l'expérience.

Le phosgène nécessaire à la préparation des dérivés carbobenzoxylés nous a été procuré par Mlle DE BROUCKÈRE; Mr. J. PETIT en a préparé des solutions à notre intention. La préparation du carbobenzoxyglycocolle a été effectuée, en partie, au laboratoire de chimie organique de MM. R. MARTIN et DE GRAEF. Nous devons à MM. R. MARTIN et C. F. JACOBSEN des indications sur la préparation du noir de palladium.

C'est un grand plaisir pour nous de pouvoir leur présenter à tous nos plus vifs remerciements.

RÉSUMÉ

Synthèse du carbobenzoxyglycylphosphate de phényle.

Cette substance réagit rapidement à 37° avec les acides aminés en solution aqueuse (pH 7.4) en formant le carbobenzoxydipeptide correspondant; le dipeptide libre s'obtient par hydrogénéation catalytique.

Exemples de synthèses peptidiques: synthèse de glycylglycine, glycyltryptophane et glycylglycyltryptophane.

Discussion: possibilités nouvelles offertes par cette méthode de synthèse; intérêt biochimique de la réaction mise en jeu.

SUMMARY

Phenyl carbobenzoxyglycylphosphate has been synthesized. It reacts readily at 37° with free amino acids in aqueous solution of pH 7.4, forming the corresponding carbobenzoxydipeptide, from which the free dipeptide is obtained by catalytic hydrogenation.

Synthesis of glycylglycine, glycyltryptophane and glycylglycyltryptophane was thus achieved. The new perspectives opened by this method and the biochemical significance of the reaction involved are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Phenylcarbobenzoxyglycylphosphat wurde synthetisiert. Es reagiert schnell bei 37° mit freien Aminosäuren in wässriger Lösung bei pH 7.4 unter Bildung des entsprechenden Carbobenzoxydipeptids aus dem das freie Dipeptid durch katalytische Hydrierung erhalten wird.

Als Beispiele von Peptidsynthesen werden die Synthese des Glycylglycins, Glycyltryptophans und Glycylglycyltryptophans angeführt.

Die Aussichten dieser neuen Methode und die biochemische Bedeutung der Reaktion die ihr zu Grunde liegt werden erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. CHANTRENNE, *Nature*, 160 (1947) 603.
- 2 H. CHANTRENNE, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.*, 26 (1948) 297.
- 3 H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 286.
- 4 M. BERGMANN ET L. ZERVAS, *Ber.*, 65 (1932) 1192.
- 5 F. LYNNEN, *Ber.*, 73 (1940) 367.
- 6 P. BRIGL ET H. MILLER, *Ber.*, 72 (1939) 2121.
- 7 R. CONSDEN, A. R. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224 etc.
- 8 H. CHANTRENNE, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.*, 26 (1948) 231.

- ⁹ F. WESSELY, *Z. physiol. Chem.*, 146 (1925) 72.
¹⁰ LEUCHS, *Ber.*, 39 (1906) 857.
¹¹ F. LIPMANN ET C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
¹² R. CONSDEN, A. R. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
¹³ R. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 315.
¹⁴ R. J. BLOCK, *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods*, Springfield 1947.
¹⁵ L. WHITE ET G. SECOR, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18 (1946) 457.
¹⁶ R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 790.
¹⁷ H. BORSOOK ET J. W. DUBNOFF, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 397.
¹⁸ F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 173.
¹⁹ P. P. COHEN ET R. MCGILVERY, *J. Biol. Chem.*, 166 (1946) 261; 169 (1947) 119; 171 (1947) 121.
²⁰ J. F. SPECK, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 493.
²¹ W. H. ELLIOT, *Nature*, 161 (1948) 128.
²² J. BRACHET, *Enzymologia*, 10 (1941) 87.
²³ T. CASPERSSON, H. LANDSTRÖM ET L. AQUILONIUS, *Chromosoma*, B 2 (1941) 111.
²⁴ E. COHN ET J. EDSALL, *Proteins, Amino acids and Peptides*, New York 1943.
²⁵ T. SASAKI, *Biochem. Z.*, 114 (1921) 63.
²⁶ N. KAPLAN ET F. LIPMANN, *Federation Proc.*, 7 (1948) 163 et *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 459.

Reçu le 20 avril 1949