

UTILISATION D'ÉCHANGEURS D'IONS POUR LA SÉPARATION DE  
QUELQUES ACIDES AMINÉS FORMÉS AU COURS DE LA  
DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE  
CYSTÉINESULFINIQUE. APPLICATION À L'ISOLEMENT DE  
L'HYPOTAURINE (ACIDE 2-AMINOÉTHANESULFINIQUE)

par

BERNADETTE BERGERET ET FERNANDE CHATAGNER

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

Des investigations récentes concernant le métabolisme de l'acide L-cystéine-sulfinique chez les animaux supérieurs ont montré que cet acide est susceptible de participer aux réactions suivantes:

*Transamination* avec l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique donnant naissance finalement à l'acide glutamique, à l'acide pyruvique par l'intermédiaire de l'acide  $\beta$ -sulfinylpyruvique et à l'alanine<sup>1</sup>.

*Décarboxylation* produisant de l'hypotaurine (acide 2-aminoéthane-sulfinique)<sup>2</sup>. L'hypotaurine ainsi formée est d'autre part capable d'être oxydée en taurine<sup>3</sup>.

*Oxydation* donnant naissance à l'acide cystéique<sup>4</sup>, qui est lui-même susceptible d'être décarboxylé avec formation de taurine<sup>5</sup>.

Les diverses substances, acides aminés et acides cétoniques, formées au cours de ces réactions ont été identifiées par chromatographie sur papier, sauf l'acide  $\beta$ -sulfinylpyruvique<sup>6</sup>. Mais la séparation des acides aminés contenant ou non du soufre, en vue de leur dosage quantitatif ou même éventuellement de leur isolement en nature, n'avait fait encore l'objet d'aucune description précise.

Le présent travail est donc consacré, d'une part à l'étude du comportement de ces différents acides aminés vis à vis de divers échangeurs d'ions, et d'autre part à l'application directe des données ainsi acquises à l'isolement de l'hypotaurine formée par décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfinique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Séparation de l'acide cystéinesulfinique, de l'acide cystéique, de la taurine, de l'hypotaurine, des acides aminés dicarboxyliques et de l'alanine sur échangeurs d'ions*

La caractérisation qualitative de ces différents acides aminés est toujours faite par chromatographie sur papier Whatman 1, dans les mélanges phénol à 1 %  $\text{NH}_3$  ou phénol-eau (80:20). Les chromatogrammes sont révélés par la ninhydrine ou par l'iodoplatinate. L'analyse quantitative de ces acides aminés est effectuée, soit après isolement de chaque substance par dosage de l'azote aminé selon VAN SLYKE-NEILL (méthode qui s'applique

également à la taurine et à la  $\beta$ -alanine), soit par chromatographie quantitative sur papier selon une technique analogue à celle d'AWAPARA<sup>7</sup> mais modifiée en ce que les solutions initiales d'acides aminés sont à des concentrations de 0.06 à 0.12 *M*, et les chromatogrammes sont séchés, non à 75°, mais à la température ordinaire par un courant d'air pendant 24 heures.

Les échangeurs d'ions utilisés ici sont: l'alumine "acide", la permutite 50, l'amberlite IRA 400 après traitement par le bicarbonate ou par la soude.

#### *Utilisation de l'alumine "acide"*

L'alumine est utilisée sous forme de colonne; elle est préparée selon WIELAND<sup>8</sup> et lavée comme il a été indiqué précédemment<sup>9</sup>. On sait que cet échangeur est susceptible de séparer quantitativement, d'une part les acides aminés basiques et neutres qui ne sont pas retenus sur la colonne, et d'autre part les acides aminés acides qui sont adsorbés et peuvent être élués par la soude<sup>9</sup>. L'acide cystéinesulfonique se comporte, sur une telle colonne, comme les acides aminés dicarboxyliques et se retrouve par conséquent quantitativement avec eux dans l'éluat<sup>10</sup>. D'autre part sur une telle colonne, l'hypotaurine et la taurine se comportant comme les acides aminés neutres, passent quantitativement dans le filtrat<sup>11</sup>. La disposition des colonnes d'alumine employée ici est celle qui a été décrite antérieurement<sup>10,11</sup>.

#### *Utilisation de la permutite 50*

La permutite 50 retient les cations minéraux et la plupart des acides aminés; ces derniers peuvent être élués sélectivement par l'ammoniaque normale, ce qui permet de réaliser la déminéralisation des solutions d'acides aminés; cependant, la taurine non retenue sur cette résine passe intégralement dans le filtrat<sup>12</sup>. Les colonnes utilisées ici ont généralement 1 cm de diamètre intérieur et contiennent 5 g de permutite (hauteur = 10.5 cm). Les solutions étudiées sont soit des solutions de l'un des acides aminés suivants: acide cystéique, acide cystéinesulfonique, taurine, hypotaurine, alanine, glycolle, acide aspartique, acide glutamique, soit des solutions d'un mélange de deux ou de plusieurs d'entre eux, soit des solutions obtenues après déprotéinisation à partir d'un milieu enzymatique ayant exercé son action sur l'acide cystéinesulfonique. Le volume de la solution à analyser est amené à environ 5 ml. La quantité totale des acides aminés introduits ne doit pas dépasser une certaine limite (voir plus loin) qui pour les acides aminés les mieux retenus ne saurait en aucun cas être supérieure à 1% du poids de résine employée, soit ici 50 mg. Après le passage de la solution à analyser, la résine est lavée par 50 ml d'eau, et l'élution des acides aminés est effectuée le plus souvent par 50 ml d'ammoniaque N. Toutefois, dans certaines expériences, l'agent éluant est constitué par 250 ml d'acide chlorhydrique N/500.

Les résultats obtenus sont les suivants:

*Qualitativement*: La chromatographie sur papier montre que:

*L'acide cystéique* passe intégralement dans le filtrat.

*L'acide cystéinesulfonique* passe également complètement dans le filtrat.

*L'acide aspartique* est retenu sur la résine; on le récupère par élution à l'ammoniaque normale. Il faut faire ici deux remarques:

1. la différence de comportement entre l'acide cystéine-sulfonique et l'acide aspartique correspond vraisemblablement à ce que la dissociation du groupement sulfonique est supérieure à celle du groupement carboxylique. L'ionophorèse sur papier montre

en effet que l'acide cystéinesulfinique possède un point isoélectrique beaucoup plus bas que ceux des acides aminés dicarboxyliques ou de la taurine<sup>6</sup>.

2. La rétention de l'acide aspartique sur la permutite 50 est relativement faible. Pour que cette rétention soit totale, dans les conditions réalisées, la quantité d'acide aspartique ne doit pas dépasser 25 mg.

*L'hypotaurine\** est retenue sur la permutite 50; on la récupère par élution à l'ammoniaque normale; elle se trouve ainsi dans l'éluat avec les autres acides aminés: dicarboxyliques, neutres et basiques. Ici aussi il convient de faire les remarques suivantes:

1. la rétention de l'hypotaurine sur la permutite est encore plus faible que celle de l'acide aspartique; pour obtenir une adsorption complète, dans les conditions actuelles, la quantité d'hypotaurine ne doit pas dépasser 10 mg.

2. si, au lieu d'éluer par l'ammoniaque normale, on effectue l'élution par une solution très diluée d'acide chlorhydrique (*N*/500), l'hypotaurine, à l'exclusion de tout autre acide aminé, y compris les acides aminés dicarboxyliques, se détache lentement de la résine. Il faut un relativement grand volume d'acide chlorhydrique dilué pour éluer ainsi l'hypotaurine; et ce volume est environ de 250 ml pour une colonne de 5 g de permutite, l'hypotaurine n'étant présente que dans les 150 derniers ml. Une application d'une telle élution différentielle est donnée dans le schéma 2.

On sait que ni l'hypotaurine, ni la taurine ne sont adsorbées sur l'alumine acide: vis à vis de cet adsorbant elles ne se différencient donc pas des acides aminés neutres. Il apparaît au contraire, que vis à vis de la permutite, elles se comportent comme plus acides que les acides aminés dicarboxyliques; ce comportement pourrait correspondre à une influence s'exerçant différemment selon les divers adsorbants, non seulement de la dissociation des groupes acides, mais aussi de leur nombre.

*Quantitativement.* Le Tableau I, qui précise les conditions expérimentales réalisées, montre que la proportion de récupération des acides aminés après passage sur permutite 50 d'un mélange synthétique comprenant de l'acide cystéinesulfinique, de l'acide glutamique et de l'alanine est très satisfaisante.

TABLEAU I

DEGRÉ DE RÉCUPÉRATION DES ACIDES AMINÉS APRÈS PASSAGE SUR PERMUTITE 50 (5 g)  
5 ml de solution à analyser; élution par 50 ml  $\text{NH}_4\text{OH N}$

Nature de l'acide aminé	Filtrat	Eluat	$\mu\text{mol.}$ initiales	$\mu\text{mol.}$ retrouvées	% récupération
Acide cystéine-sulfinique	+	o	46.8	45.2	96.5
Alanine	o	+	112.4	112.4	100.0
Ac. glutamique	o	+	75.2	71.6	95.2

La permutite 50 permet ainsi de séparer quantitativement les acides aminés qui nous intéressent en deux groupes:

- filtrat: acide cystéique, acide cystéinesulfinique, taurine.
- éluat: hypotaurine, acides aminés dicarboxyliques, alanine.

\* Résultant de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfinique.

### Utilisation de l'amberlite IRA 400

a. *Après traitement à la soude 4%*. A cause de sa carbonatation rapide, l'amberlite IRA 400 doit être lavée immédiatement avant usage successivement par HCl 2 N, eau distillée, soude 4% exempte de  $\text{CO}_2^{13}$ , et eau exempte de  $\text{CO}_2$ . Une telle résine adsorbe alors énergiquement les anions et la plupart des acides aminés sauf l'arginine. Cette résine est utilisée ici sous forme d'une colonne de 1 cm de diamètre contenant 5 g de résine (hauteur = 14.5 cm). Les solutions étudiées contiennent les mêmes acides aminés qui ont été mentionnées à propos de la permutite, mais à une concentration très inférieure: 5 ml d'une solution contenant 1 mg de chacun des acides aminés sont versés sur la colonne, puis celle-ci est lavée par 50 ml d'eau. L'élution est faite successivement par des solutions d'acide acétique N/10, N et 2 N, puis par une solution d'acide chlorhydrique N/10, en utilisant chaque fois 50 ml de solution. Les résultats obtenus sont les suivants:

*Qualitativement.* La chromatographie sur papier montre que:

*L'alanine, l'hypotaaurine, et la taurine* sont libérés seules par l'acide acétique N/10. L'utilisation d'acide acétique à des concentrations inférieures à N/10 ne permet pas de séparer ces trois constituants.

*L'acide aspartique* seul est élué par l'acide acétique normal.

*L'acide cystéinesulfinique* seul est élué par l'acide acétique 2 N.

*L'acide cystéique* qui est le plus énergiquement fixé sur la résine est élué par l'acide chlorhydrique N/10.

*Quantitativement:* le Tableau II, qui précise les conditions expérimentales réalisées, montre que la méthode permet de séparer l'acide cystéinesulfinique de l'acide cystéique. Malheureusement, le degré de récupération des acides aminés après passage sur amberlite, IRA 400 ne dépasse pas en général 80%, sauf pour l'acide cystéique.

TABLEAU II

DEGRÉ DE RÉCUPÉRATION DES ACIDES AMINÉS APRÈS PASSAGE SUR AMBERLITE  
IRA 400 TRAITÉE PAR LA SOUDE

5 g de résine; 5 ml de solution contenant 1 mg de chaque acide aminé; 50 ml de chaque agent éluant.

Agent éluant	Ac. aminé élué	$\mu\text{mol.}$ initiales	$\mu\text{mol.}$ retrouvées	% récupération
Ac. acétique N/10	Alanine Taurine	26.7	21.9	82
Ac. acétique N	Acide aspartique			
Ac. acétique 2 N	Ac. cystéine- sulfinique	6.5	5.1	78
HCl N/10	Ac. cystéique	5.9	5.8	99

b. *Après traitement par une solution saturée de bicarbonate de sodium* (technique de PIEZ<sup>14</sup>). On agite pendant 2 heures et à la température ordinaire la résine préalablement traitée par la soude (voir précédemment) avec une solution saturée de bicarbonate de sodium; on la lave ensuite avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. La résine se trouve alors saturée en ions  $\text{CO}_3\text{H}$  qu'elle est capable d'échanger contre des anions plus forts en libérant  $\text{CO}_2$ . Elle ne fixe pas la plupart des acides aminés. Cette résine permet donc la désacidification d'une solution d'acides aminés.

Le dégagement du  $\text{CO}_2$  au cours des échanges ne permet pas d'utiliser sous forme de colonne l'amberlite ainsi traitée. Cette résine est introduite directement dans les solutions à désacidifier où elle est agitée pendant 30 minutes. Elle est ensuite recueillie par décantation puis lavée plusieurs fois à l'eau distillée.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes :

a. *acide glutamique*: 20 mg d'acide glutamique sont dissous dans 25 ml d'eau. On ajoute à cette solution 2 g d'amberlite; la résine est ensuite lavée trois fois, chaque fois par 10 ml d'eau; on constate alors que l'acide glutamique est entièrement retenu par la résine.

b. *acide cystéinesulfinique, acide cystéique, taurine*. 2 mg de chacun de ces acides aminés sont dissous dans 7 ml d'eau. On ajoute à cette solution 500 mg d'amberlite; la résine est lavée ensuite 3 fois, chaque fois par 8 ml d'eau. La chromatographie sur papier et des dosages d'azote aminé, montrent que, dans ces conditions, l'acide cystéinesulfinique et l'acide cystéique sont adsorbés sur la résine alors que 1/3 de la taurine est adsorbé et les 2/3 passent dans le filtrat.

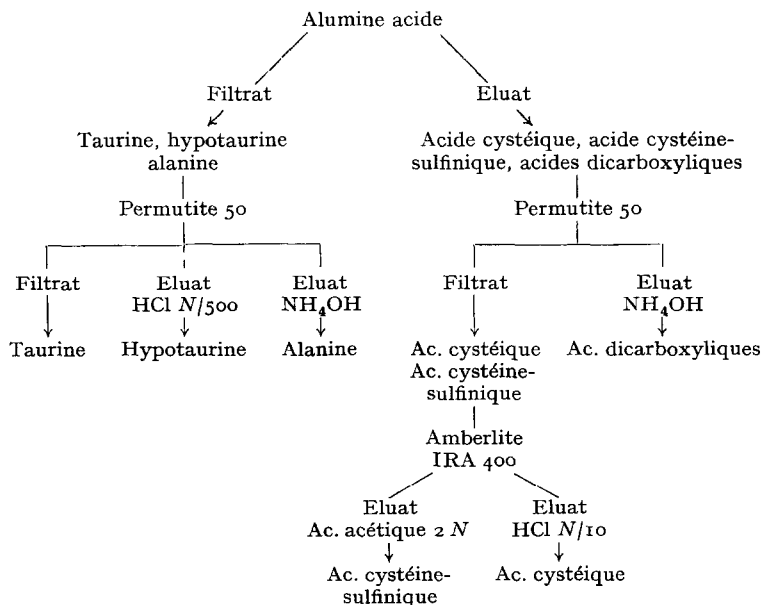
c. quant à l'*hypotaurine*, les observations faites lors de son isolement (voir plus loin) montrent que, dans les conditions réalisées, l'hypotaurine n'est pas retenue sur la résine.

Il apparaît ainsi que l'amberlite IRA 400 après traitement par la soude puis par le bicarbonate n'adsorbe absolument pas l'hypotaurine, ne fixe la taurine que faiblement mais retient énergiquement les acides aminés dicarboxyliques, l'acide cystéinesulfinique et l'acide cystéique. L'amberlite sous cette forme ne peut donc pas être utilisée pour désacidifier des solutions autres que celles d'acides aminés mono-basiques.

L'ensemble des résultats précédents permettant de réaliser la séparation des acides aminés en question ici, peut être résumé par le schéma I.

#### SCHÉMA I

SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS RÉSULTANT DU MÉTABOLISME DE L'ACIDE L-CYSTÉINESULFINIQUE



### Isolement de l'hypotaurine

L'hypotaurine résultant de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéine-sulfonique n'avait été caractérisée jusqu'à ces derniers temps que par chromatographies sur papier<sup>2</sup>, comportant entr'autres choses une comparaison avec l'acide aminoéthane-sulfonique synthétique<sup>15</sup>. Il était donc nécessaire d'isoler l'hypotaurine en quantités suffisantes afin de pouvoir en établir définitivement la composition.

Le milieu réactionnel est constitué par le mélange de 190 ml de solution tampon

de phosphates  $M/15$  à pH 6.8; 190 ml de suspension de broyat de foie de lapin; cette suspension est obtenue par broyage au "turmix" de 95 g de foie de lapin (organe prélevé immédiatement après la mort de l'animal et perfusé avec les précautions habituelles) dans 95 ml d'eau distillée; cette suspension est dialysée pendant 24 heures à 4° contre une solution de bicarbonate de soude à 0.01%; 1 ml d'une solution contenant 100  $\mu$ g du sel de calcium de phosphate de pyridoxal; 2 mg de thiamine; 5 ml d'une solution de cystéinesulfinate de sodium correspondant à 760 mg d'acide L-cystéinesulfonique.

L'ensemble est maintenu sous azote à 37° pendant 5 heures. Au bout de ce temps la réaction est arrêtée en plaçant le mélange pendant 8 minutes au bain-marie bouillant; on refroidit, on centrifuge et on lave une ou deux fois à l'eau distillée le culot de protéines précipitées. On obtient ainsi environ 300 ml d'un liquide coloré; on en prélève quelques gouttes pour une analyse par chromatographie sur papier (I, Fig. 1); en même temps on effectue une analyse chromatographique parallèle d'un milieu préparé de manière analogue mais dans lequel on n'a pas introduit d'acide cystéinesulfonique (II, Fig. 1). Les chromatographies montrent qu'il existe dans la préparation enzymatique toute une série d'acides aminés; après 5 heures il

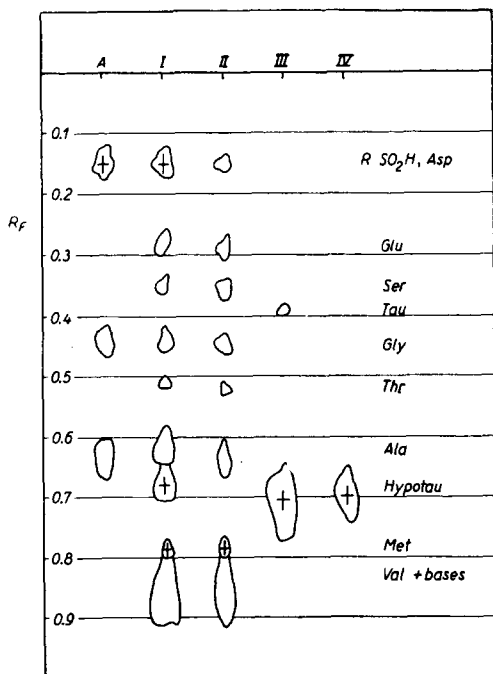


Fig. 1. Schéma des chromatogrammes obtenus aux différents stades de l'isolement de l'hypotaurine. Chromatogrammes obtenus sur papier Whatman 1 dans le phénol-eau (80:20). A. Mélange synthétique comprenant: acide cystéinesulfonique, glycocolle, alanine. I. Liquide déprotéinisé; II. Liquide témoin déprotéinisé; III. Eluat par HCl  $N/500$  de permutite 50; IV. Solution d'hypotaurine obtenue après second passage sur permutite 50. Les taches révélabes à la fois par la ninhydrine et par l'iodoplatinate sont marquées d'une croix.

reste encore une quantité notable d'acide cystéinesulfonique, et il est apparu de l'hypotaurine. On dose approximativement cette dernière par chromatographie quantitative sur papier, en établissant une courbe de référence à l'aide de  $\beta$ -alanine, dont le  $R_F$  dans le phénol est très voisin de celui de l'hypotaurine et qui réagit vis à vis de la ninhydrine à peu près comme l'hypotaurine. Il convient ici d'autre part de laisser le solvant s'écouler suffisamment hors du papier pour obtenir une bonne séparation entre l'alanine et l'hypotaurine. On constate alors qu'il s'est formé au cours de l'action enzymatique environ 150 mg d'hypotaurine.

Le liquide déprotéinisé, additionné de quelques gouttes d'alcool octylique est concentré à 30 ml environ, cette concentration ayant lieu sous azote à pression réduite et à une température ne dépassant pas 40°. Le liquide obtenu est dialysé à 4° pendant 20 heures contre 4 fois 400 ml d'eau distillée. Le liquide extérieur de dialyse est concentré dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à 125 ml ( $L_1$ ).  $L_1$  est alors chromatographié sur permutite; on utilise deux colonnes constituées chacune par 50 g de résine; on fait passer sur chaque colonne la moitié de  $L_1$  puis 500 ml d'eau distillée. L'élution est effectuée par une solution d'acide chlorhydrique  $N/500$ ; on recueille l'éluat par fractions de 600 ml, et la présence d'hypotaurine est détectée par des touches sur papier (spot-tests) révélées à l'iodoplatinate. Les deux premières fractions ne contiennent pas d'hypotaurine; celle-ci apparaît dans la troisième, passe par un maximum dans la quatrième et la cinquième et subsiste jusque dans la septième.

Les fractions éluées contenant l'hypotaurine sont réunies; le liquide est désacidifié par addition, en agitant, d'amberlite IRA 400 traitée par le bicarbonate, en quantité suffisante (environ 25 g) pour que le pH du liquide surnageant soit de 5; on décante et on filtre la résine qui est lavée avec de l'eau distillée; on ajoute les eaux de lavage au liquide obtenu. Celui-ci est alors concentré à 50 ml, dans les conditions indiquées plus haut. Une chromatographie qualitative sur papier montre que la solution ne contient pas d'acides aminés autres que l'hypotaurine (III, Fig. 1). Un dosage indique que cette solution contient environ 140 mg de cette dernière.

Pour obtenir l'hypotaurine libre et à l'état aussi pur que possible, la solution précédente est passée par moitié, chaque moitié parallèlement sur une colonne de 35 g de permutite; les deux colonnes sont traitées chacune par 300 ml d'ammoniaque  $N$ . Les éluats sont recueillis par fraction de 50 ml. L'hypotaurine sort de la colonne en même temps que l'ammoniac dans la quatrième fraction (IV, Fig. 1); celle-ci est rapidement évaporée sous vide jusqu'à siccité; on reprend le résidu par quelques ml d'eau et on évapore de nouveau à sec. On élimine ainsi tout l'ammoniac et l'hypotaurine reste sous forme libre. Le résidu sec, légèrement jaunâtre, est repris par quelques ml d'eau. On ajoute alors à la solution un peu de charbon (acticarbone CECA S.2) préalablement lavé par  $HCl$  2  $N$  puis par de l'eau saturée de  $H_2S$  (un tel traitement est indispensable pour éviter toute oxydation de l'hypotaurine en taurine au contact du charbon). Le contact de la solution avec le charbon ne dure que quelques minutes; le charbon est filtré et lavé avec de l'eau saturée de  $H_2S$ . Le filtrat est rapidement évaporé sous pression réduite puis séché sous vide poussé en présence de potasse. On obtient ainsi finalement 98 mg d'une poudre blanche très hygroscopique. Cette hygroscopicité rend son analyse difficile; néanmoins l'analyse élémentaire de la substance donne les résultats suivants:

	C	H	N	S
Calculé pour $C_2H_7O_2NS = 109$	22.01	6.46	12.83	29.35
Trouvé:	21.30	6.48	12.6	29.1

Le produit obtenu est très soluble dans l'eau et assez soluble dans l'alcool et l'acétone. Ses sels de zinc et de baryum sont également hygroscopiques et difficilement précipitables par les solvants organiques. On peut titrer l'hypotaurine par le permanganate de potassium de la même manière que l'acide cystéinesulfonique<sup>16</sup>.

## RÉSUMÉ

L'emploi de divers échangeurs d'ions (alumine acide, permutite 50, amberlite IRA 400 préalablement traitée par la soude ou par la soude et le bicarbonate) permet de séparer commodément les divers acides aminés résultant de la dégradation de l'acide L-cystéinesulfinique. L'amberlite IRA 400 permet de séparer l'acide cystéique, l'acide cystéinesulfinique et les acides aminés dicarboxyliques des autres acides aminés; la permutite 50 réalise la séparation de la taurine qui n'est pas adsorbée et de l'hypotaurine qui reste fixée, mais que l'on peut éluer sélectivement par l'acide chlorhydrique dilué. Ces données ont été appliquées à l'isolement de l'hypotaurine (acide 2-amino-éthanésulfinique).

## SUMMARY

The use of various ion exchangers (alumina, permutite 50, amberlite IRA 400 previously treated with sodium hydroxide or with sodium hydroxide and bicarbonate) permits easy separation of the amino acids resulting from the degradation of L-cysteinesulphinic acid. Amberlite IRA 400 can be used for the separation of cysteic acid, cysteinesulphinic acid and the dicarboxylic acids from the other amino acids; permutite 50 is used for the separation of taurine which is not adsorbed and hypotaurine which remains fixed, but which can be eluted selectively by dilute hydrochloric acid. These data have been applied to the isolation of hypotaurine (2-aminoethanesulphinic acid).

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Verwendung von Ionenaustauschern (Tonerde, Permutit 50 und Amberlit IRA 400, das mit Natriumhydroxyd oder Natriumhydroxyd und Natriumbikarbonat vorbehandelt wurde), gestattet eine einfache Trennung der Aminosäuren, die bei der Zersetzung von L-Cysteinsulfinsäure entstehen. Amberlit IRA 400 kann zur Trennung von Cysteinsäure, Cysteinsulfinsäure und Dicarboxylsäuren von den anderen Aminosäuren verwendet werden. Permutit 50 wird zur Trennung von Taurin und Hypotaurin benutzt. Taurin wird nicht adsorbiert, während Hypotaurin gebunden wird, aber mit verdünnter Salzsäure eluiert werden kann. Diese Ergebnisse werden zur Isolierung von Hypotaurin (2-Aminoäthansulfinsäure) angewandt.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> F. CHATAGNER, B. BERGERET, T. SÉJOURNÉ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 340.
- <sup>2</sup> F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Compt. rend.*, 232 (1951) 448.
- <sup>3</sup> H. TABECHIAN, B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 615.
- <sup>4</sup> G. MEDES, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1559.
- <sup>5</sup> H. BLASCHKO, *Biochem. J.*, 36 (1942) 571.
- <sup>6</sup> F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Expériences inédites*.
- <sup>7</sup> J. AWAPARA ET B. SEALE, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 497.
- <sup>8</sup> T. WIELAND, *Z. Physiol. Chem.*, 273 (1942) 24.
- <sup>9</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- <sup>10</sup> C. FROMAGEOT, F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 294.
- <sup>11</sup> B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 141.
- <sup>12</sup> P. BOULANGER ET G. BISERTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1930.
- <sup>13</sup> S. M. PARTRIDGE ET R. C. BRIMLEY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 153.
- <sup>14</sup> K. A. PIEZ, E. B. TOOPER ET L. S. FOSDICK, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 669.
- <sup>15</sup> J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 183.
- <sup>16</sup> M. P. SCHUBERT, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 3336.

Reçu le 29 mars 1954