

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE
DE LA SALMINE D'*ONCORHYNCHUS*

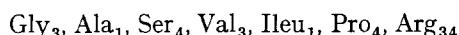
I. ENCHAÎNEMENT DES AMINOACIDES AU VOISINAGE
DU RÉSIDU N-TERMINAL ET ÉTUDE DE QUELQUES PEPTIDES
RÉSULTANT DE L'HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE

par

ROGER MONIER ET MARIAN JUTISZ

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

VELICK ET UDENFRIEND¹ ont récemment étudié la composition en aminoacides ainsi que la nature et le nombre des résidus N-terminaux d'une salmine extraite d'un saumon du genre *Oncorhynchus*. Selon ces auteurs, la formule brute de cette monoprotamine serait la suivante:



ce qui correspondrait à un poids moléculaire de 7000.

Cette formule et le poids moléculaire correspondant ne sont pas parfaitement en accord avec ceux donnés par d'autres auteurs^{2,3,4}. Il est vraisemblable que les désaccords sont dûs à des différences spécifiques, les auteurs cités ayant soumis à l'analyse des salmopes qui n'ont pas la même origine animale que celle qui nous occupe. Il convient donc de préciser que les résultats que nous allons décrire ne sont strictement valables que pour la salmine considérée et ne pourraient être étendus dans leur détail à une salmine d'une autre origine.

VELICK ET UDENFRIEND n'ont pas définitivement établi l'homogénéité de la salmine d'*Oncorhynchus*; cependant ils ont pu montrer que le seul aminoacide décelable en position N-terminale, par la technique aux dérivés pipsyl, était la proline, la quantité trouvée correspondant à un résidu par unité de poids moléculaire.

Etant donné la simplicité relative de la composition en aminoacides de cette monoprotamine ainsi que son importance biologique probablement considérable, il nous a paru intéressant de chercher à élucider quelques points de sa structure. Nous nous sommes proposés de déterminer, sur une préparation de même origine que celle utilisée par VELICK ET UDENFRIEND, d'une part l'enchaînement des aminoacides au voisinage de la proline N-terminale, et d'autre part la disposition des aminoacides neutres le long de la chaîne peptidique. Dans cette première publication nous décrivons: 1. l'application de la technique de SANGER⁵ à la salmine; 2. l'isolement et l'étude de quelques peptides résultant de son hydrolyse partielle acide.

Bibliographie p. 558.

PARTIE EXPÉIMENTALE

Enchaînement des aminoacides au voisinage du résidu N-terminal

La salmine étudiée est une préparation commerciale, sous forme de sulfate, fournie par Sharp & Dohme, West Point, Pa., U.S.A. Nous en avons préparé le dérivé dinitrophényle (DNP) selon les indications de SANGER⁶. Toutefois, la concentration en alcool du milieu réactionnel est portée à 75 %, ce qui permet une mise en suspension plus facile de la protamine. La durée de la réaction est de 24 heures. La DNP-salmine est entièrement soluble en milieu acide et la solution peut être extraite à l'éther. La DNP-protamine est ensuite récupérée par précipitation à l'alcool. La correspondance entre la DNP-salmine et la salmine intacte est établie par dosage de l'arginine, selon la méthode colorimétrique de SAKAGUCHI⁷, sur un hydrolysat total du DNP-dérivé. La teneur en DNP-proline de l'échantillon obtenu est contrôlée par spectrophotométrie de solutions acides (HCl N) de la DNP-protamine. En effet, dans la région 340-400 m μ , seul le DNP-résidu terminal contribue à l'absorption. D'autre part, la DNP-proline, en milieu acide, présente un maximum d'absorption à 377 m μ , ce qui la distingue des DNP-dérivés des autres aminoacides. En utilisant cette technique, la salmine étudiée s'est révélée contenir 1.01 résidu de proline, en position N-terminale, pour 7000 g.

Pour l'obtention de DNP-peptides à partir de la DNP-salmine, nous avons eu recours à deux types d'hydrolyses partielles: l'hydrolyse partielle en milieu acide et l'hydrolyse par la trypsine.

Hydrolyse partielle en milieu acide

L'utilisation de l'hydrolyse acide présente quelques difficultés, étant donnée l'instabilité de la DNP-proline en milieu acide. Les résultats les plus nets nous ont été fournis par l'emploi du mélange d'acides proposé par HANES et ses collaborateurs⁸.

La DNP-protamine (environ 20 mg) est chauffée en tube scellé à 100° en présence de 0.2 ml* d'un mélange d'acide formique (10 vol.), d'anhydride acétique (5.5 vol.) et d'acide perchlorique (1.5 vol.) pendant 2 heures. Après l'hydrolyse, les acides volatils sont éliminés au dessicteur, sous vide, sur KOH. A partir de ce moment et dans toutes les opérations ultérieures, les DNP-dérivés doivent être manipulés à l'abri d'une lumière trop vive. L'hydrolysat est ensuite repris par l'eau et extrait par l'éther. Le résidu des extraits éthérisés réunis est analysé par chromatographie de partage sur papier et sur colonne de kieselguhr tamponné.

Les chromatographies sur papier sont réalisées soit à l'aide du mélange alcool isomélique-phénol-eau⁹, soit sur papier Whatman N° 1 traité au préalable par une solution de benzoate de potassium 0.05 M à l'aide du mélange alcool amylique tertiaire-méthyléthylcétone-solution de benzoate (54:40:6). Le Tableau I donne les R_F de quelques DNP-dérivés dans ce dernier système.

Les chromatographies sur colonnes de kieselguhr (Hyflo-supercell) sont effectuées à pH 7.25 dans les conditions décrites par PERRONE¹⁰. Ces deux types de chromatographies permettent de constater que la fraction éthérösoluble renferme une quantité importante de dinitrophénol, issu de la dégradation de la DNP-proline¹¹, et une faible quantité de DNP-proline libre, qui peut être recueillie après chromatographie sur colonne et dosée par spectrophotométrie.

* Il n'est pas recommandable d'utiliser des volumes plus grands en raison des dangers d'explosion.

TABLEAU I

Rf DE QUELQUES DNP-AMINOACIDES DANS LE MÉLANGE ALCOOL AMYLIQUE TERTIAIRE
— MÉTHYLÉTHYLCÉTONE — BENZOATE

DNP-aminoacide	<i>Rf</i>	DNP-aminoacide	<i>Rf</i>
DNP-isoleucine	0.52	DNP-séroline	0.15
DNP-valine	0.46	DNP-arginine	0.25
DNP-alanine	0.30	Dinitroaniline	0.86
DNP-proline	0.26	Dinitrophénol	0.50
DNP-glycocolle	0.21		

Le DNP-peptide présent dans la fraction acidosoluble est purifié par chromatographie sur talc⁵. Cette purification est complétée par une chromatographie de partage sur colonne de kieselguhr, tamponné à pH 6.35 (tampon phosphate 0.25 M) dans un mélange méthyléthylcétone-chloroforme (85:15) saturé d'eau. L'éluat du talc donne une seule bande jaune, qui, par chromatographie sur papier Whatman N° 1 dans un mélange n-butanol-acide formique-eau (75:15:10), fournit une seule tache de *Rf* 0.70. Le réactif de SAKAGUCHI¹² et la ninhydrine permettent, après cette chromatographie, de constater l'absence d'autres produits.

La chromatographie sur papier de l'hydrolysat du DNP-peptide révèle deux aminoacides, la proline et l'arginine. La comparaison de cet hydrolysat avec des mélanges de DNP-proline synthétique et d'arginine, traités dans les conditions de l'hydrolyse, indique que proline et arginine sont présentes en quantités équimoléculaires, la proline provenant elle-même de la destruction par hydrolyse de la DNP-proline.

Le spectre d'absorption dans l'U.V., proche du peptide non hydrolysé, est déterminé en solution dans HCl *N*. Ce spectre est identique à celui de la DNP-proline. Le rapport stoechiométrique de la DNP-proline ainsi déterminée à l'arginine dosée par colorimétrie avant ou après hydrolyse du DNP-peptide, est toujours très voisin de 1 (voir Tableau III).

L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure que le DNP-peptide obtenu possède la structure DNP-prolylarginine. Les résultats du Tableau II montrent que la quantité de DNP-peptide isolé correspond à environ 50% de la DNP-proline contenue dans la DNP-salmine employée.

TABLEAU II

DNP-PROLINE RÉCUPÉRÉE APRÈS HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE EN % DE LA DNP-PROLINE PRÉSENTE DANS LA DNP-SALMINE HYDROLYSÉE

	<i>Agent d'hydrolyse</i>	
	HCOOH + CH ₃ COOH + ClO ₄ H	HCl 1 <i>N</i>
Fraction éthérosoluble (DNP-proline libre)	6.9	30.3
Fraction acidosoluble (DNP-prolylarginine)	52.7	6.4
Total	59.6	36.7

La deuxième colonne du Tableau II donne les résultats obtenus en utilisant comme agent d'hydrolyse HCl 11 N¹³. On voit que la récupération de la DNP-proline est beaucoup plus faible en présence de cet acide. En outre, nous avons observé la production par HCl 11 N d'artefacts, qui, après hydrolyse totale, donnent de la proline et de l'arginine, mais dont le spectre U.V. est très différent de celui de la DNP-proline (maximum à 350 m μ en solution HCl N). Ces artefacts, d'autant plus gênants qu'ils pourraient être confondus avec des DNP-peptides normaux, correspondent vraisemblablement à une étape intermédiaire dans la destruction de la DNP-proline.

Hydrolyse par la trypsine

On sait que la trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptide situées du côté carboxylique d'un résidu d'arginine ou de lysine¹⁴. Il semblait possible, a priori, de produire par hydrolyse trypsique de la DNP-salmine, le DNP-peptide précédemment obtenu en milieu acide et, éventuellement, des DNP-peptides plus longs, ce mode d'hydrolyse présentant l'avantage de n'entraîner aucune destruction de la DNP-proline.

L'hydrolyse par la trypsine est réalisée sur le chlorhydrate de DNP-salmine, préparé à partir du sulfate par déminéralisation sur l'échangeur d'anions Dowex I (200-400 mesh). La solution fortement basique (pH 12) résultant du passage sur cet échangeur est amenée à pH 7.8 (mesuré à l'électrode de verre) à l'aide d'acide chlorhydrique, puis additionnée de trypsine cristallisée (Worthington Lab.) et maintenue à 37° pendant 3 heures. La concentration en DNP-salmine de l'hydrolysat est de 2% et le rapport pondéral enzyme: substrat de 1:50. L'hydrolyse est arrêtée après 3 heures par acidification (pH 2 à 3) à l'aide d'acide chlorhydrique.

Il est préférable d'utiliser le chlorhydrate de DNP-salmine plutôt que le sulfate, des essais antérieurs ayant montré que, en partant du sulfate, la séparation des DNP-peptides est compliquée du fait de l'existence, après chromatographie sur talc, de leurs deux formes salines chlorhydrate et sulfate.

Les DNP-peptides sont séparés des peptides incolores par chromatographie sur talc, puis isolés les uns des autres par chromatographie monodimensionnelle préparative sur papier Whatman N° 3 MM, dans le mélange *n*-butanol-acide formique-eau. L'éluat du talc donne dans ces conditions deux bandes principales accompagnées de traces de produits jaunes de *R*_F presque nuls, qui doivent correspondre à des DNP-peptides très longs ou à de la DNP-protamine non hydrolysée.

Après élution à l'eau, les deux DNP-peptides recueillis sont étudiés de la même manière que le DNP-peptide obtenu en milieu acide. Le Tableau III donne les résultats de cette étude.

TABLEAU III

<i>R</i> _F *	Composition des hydrolysats*	<i>Arg/DNP-proline**</i>		Structure
		I	II	
1. Hydrolyse par HCOOH + CH ₃ COOH + ClO ₄ H				
0.70	Pro, Arg	0.92	0.98	DNP-proylarginine
2. Hydrolyse par HCl 11 N				
0.70	Pro, Arg	1.02	1.01	DNP-proylarginine
3. Hydrolyse par la trypsine				
0.70	Pro, Arg	—	0.98	DNP-proylarginine
0.20	Pro, Arg ₂	—	2.05	DNP-proylarginyllarginine

* Par chromatographie sur papier Whatman No. 1, dans le mélange *n*-butanol-acide formique-eau.

** Rapport des concentrations moléculaires en arginine et en DNP-proline déterminé par colorimétrie, avant hydrolyse du peptide (I) et après hydrolyse du peptide (II).

Nous avons pu vérifier qu'après hydrolyse partielle acide, le peptide auquel nous attribuons la structure DNP-Pro·Arg·Arg donne un corps acidosoluble qui a le même comportement chromatographique que la DNP-Pro·Arg précédemment isolée. Les rendements en DNP-peptides n'ont pu être déterminés avec précision, l'élation après chromatographie préparative sur papier n'étant pas quantitative. Toutefois, la quantité de DNP-proline retrouvée dans les deux DNP-peptides isolés correspond au total à 80% au moins de la DNP-proline initialement présente dans la DNP-salmine utilisée.

Etude de quelques peptides résultant de l'hydrolyse acide partielle

Hydrolyse et obtention d'une fraction neutre et d'une fraction basique. La plupart de nos recherches ont été réalisées sur des hydrolysats préparés de la façon suivante: 100 mg de sulfate de salmine sont hydrolysés, en tube scellé, par HCl 2 N, à 100° pendant 3 heures. L'acide chlorhydrique est chassé sous vide.

Les aminoacides et peptides neutres sont séparés de l'arginine et de ses peptides par chromatographie sur un échangeur de cations (Dowex 50, 200-400 mesh) sous sa forme H⁺. Une fraction d'hydrolysat, correspondant à environ 20 mg de sulfate de salmine, dissoute dans 5 ml d'eau, est chromatographiée sur une colonne de 1 g de résine. On lave par 10 ml d'eau pour éliminer les anions, et l'élation est effectuée de la façon suivante: 60 ml de HCl 0.1 N, suivis de 15 ml de HCl 2 N, permettent de récupérer les aminoacides et peptides neutres (fraction a). La fraction basique est élue soit en bloc à l'aide d'HCl 4 N (250 ml) (fraction b), soit en deux fois à l'aide de 120 ml d'ammoniaque 0.15 N (fraction b₁) et d'une solution de diéthylamine à 5% (fraction b₂). Le Tableau IV donne la répartition de l'azote total des hydrolysats, déterminée par micro-Kjeldahl, entre la fraction a et la fraction b.

TABLEAU IV

RÉPARTITION DE L'AZOTE TOTAL DANS LES HYDROLYSATS ACIDES PARTIELS DE SALMINE

Conditions d'hydrolyse	N total en % de l'N total de l'hydrolysat		
	Fraction neutre (a)	Fraction basique (b)	a + b
HCl 1 N à 37° pendant 8 jours	5.4	94.0	99.4
HCl 2 N à 100° pendant 3 heures	5.3	94.9	100.2

On voit que la récupération de l'azote total est quantitative après la chromatographie sur résine et que les deux modes d'hydrolyse employés conduisent, au point de vue de la répartition de l'azote total, à des résultats pratiquement identiques.

La chromatographie sur papier, dans le mélange *n*-butanol-acide formique-eau, suivie de deux révélations à la ninhydrine et au réactif de SAKAGUCHI, nous a permis de contrôler l'absence d'arginine et de peptides de l'arginine dans la fraction a.

Isolement des peptides. L'isolement de tous les peptides de la fraction a et de quelques peptides de la fraction b₁ est réalisé par chromatographie monodimensionnelle préparative sur papier.

La fraction a est soumise à une première chromatographie sur papier Whatman N° 1, d'une durée de 24 heures, dans le solvant *n*-butanol-acide formique-eau. Chacun des peptides élut après cette première chromatographie est purifié par une

deuxième chromatographie dans un solvant convenable. Ce solvant est le *n*-propanol-eau (80:20) (8) pour les peptides I et II (voir Tableau V), et le phénol à 0.1% d'ammoniaque pour les autres peptides. Les taches correspondant aux aminoacides libres sont traitées de la même façon que les peptides, afin de vérifier que chacune d'elles correspond uniquement à l'aminoacide attendu et non à un mélange de cet aminoacide et d'un peptide.

La fraction b_1 de son côté est soumise à une première chromatographie sur papier Whatman N° 3 MM, d'une durée de 70 heures, dans le mélange *n*-butanol-acide formique — eau. Les peptides VI à X (voir Tableau VI) sont ensuite chromatographiés sur papier Whatman N° 1 dans le mélange pyridine-alcool amylique tertiaire-eau (40:40:20). Le peptide XI est purifié par une seconde chromatographie sur papier Whatman N° 1 dans le mélange *n*-butanol-acide acétique glacial-eau (45:45:10).

Les bandes témoins des chromatogrammes préparatifs sont toujours réalisées en double, une partie étant révélée à la ninhydrine et l'autre à l'isatine. On utilise une solution d'isatine à 0.2% dans le *n*-propanol (ou l'*isopropanol*) renfermant 20% d'acide acétique glacial. Après pulvérisation de cette solution, le chromatogramme encore humide est chauffé à 100° pendant 15 min. Dans ces conditions, non seulement la proline libre¹⁵, mais encore les prolyl-peptides donnent une coloration bleue intense. Ce réactif permet donc de déceler ces peptides, que la ninhydrine ne révèle généralement pas, et renseigne immédiatement sur leur structure, puisque seuls les peptides dans lesquels la proline possède son groupe iminé libre réagissent¹⁶.

Etude des peptides isolés. La nature et les proportions relatives des aminoacides constituant les peptides sont déterminées par chromatographie semi-quantitative¹⁷ des hydrolysats totaux. Les solvants employés sont le phénol tamponné à pH 4¹⁸ qui sépare tous les aminoacides présents dans la salmine, ou le mélange *n*-butanol-acide formique-eau. L'estimation de la proline est plus facile après chromatographie dans ce dernier solvant et révélation à l'isatine.

La pureté des peptides est contrôlée et la nature de leur extrémité aminée est établie par leurs dérivés DNP préparés selon les indications de SANGER ET THOMPSON¹⁹. Après hydrolyse des DNP-peptides, les DNP-aminoacides libérés sont identifiés par deux chromatographies sur papier réalisées dans les conditions déjà décrites. Dans le cas des prolyl-peptides, étant donnée l'instabilité de la DNP-proline en milieu acide, ce sont ses produits de destruction: dinitrophénol et proline libre, que nous récupérons.

Les Tableaux V et VI rassemblent les résultats obtenus pour les peptides isolés ainsi que la structure que ces résultats permettent de proposer pour chacun d'eux.

TABLEAU V
PEPTIDES NEUTRES ISOLÉS DANS UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE SALMINE

Peptide	Coloration		Composition de l'hydrolysat	DNP	Structure
	Ninhydrine	Isatine			
I	—	bleu	Pro, Ileu	—	Pro · Ileu
II	—	bleu	Pro, Val	—	Pro · Val
III	violet	rouge	Val, Gly	DNP-Val	Val · Gly
IV	violet	rouge	Val, Ser	DNP-Val	Val · Ser
V	jaune puis violet	rouge	Gly	DNP-Gly	Gly · Gly

TABLEAU VI
PEPTIDES BASIQUES ISOLÉS D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE SALMINE

<i>Peptide</i>	<i>Réaction à l'isatine</i>	<i>Composition de l'hydrolysat</i>	<i>DNP</i>	<i>Structure</i>
VI	bleu	Pro, Ileu, Arg	—	Pro·Ileu·Arg
VII	bleu	Pro, Val, Arg	—	Pro·Val·Arg
VIII	rouge	Pro, Val, Arg	DNP-Arg	Arg·Pro·Val
IX	bleu	Pro, Val, Arg ₂	—	Pro·Val·Arg·Arg
X	rouge	Val, Arg	DNP-Arg	Arg·Val
XI	bleu	Pro, Arg	—	Pro·Arg

Le peptide V a été comparé au moyen de la chromatographie sur papier à un échantillon de glycyl-glycocolle synthétique. La structure proposée pour les peptides VI, VII, VIII et IX a été vérifiée en soumettant chacun de ces peptides à une hydrolyse acide partielle et en étudiant les produits de dégradation par chromatographie sur papier. Le peptide VI donne dans ces conditions un corps réagissant en bleu à l'isatine, et de même comportement que le peptide I. Les peptides VII, VIII et IX de leur côté, donnent un corps chromatographiquement identique au peptide II.

DISCUSSION

1. Les résultats obtenus sur la DNP-salmine permettent de conclure que l'enchaînement N-terminal de la molécule de salmine est: Pro·Arg·Arg···. Le peptide XI (Tableau VI) provient selon toute apparence de cet enchaînement.

2. L'hydrolyse acide partielle de la salmine fournit cinq peptides neutres, dans lesquels sont représentés dix des seize résidus d'aminoacides neutres qu'elle renferme.

3. Tous les peptides neutres isolés sont des dipeptides et ce résultat doit être rapproché de ceux que FELIX et ses collaborateurs²⁰ ont obtenus dans le cas de la clupéine et qui les ont conduits à proposer pour cette protamine le schéma de structure suivant: Pro·(Arg·Arg·Arg·Arg·M·M)_n·Arg·Arg, dans lequel M désigne un résidu d'aminoacide neutre. Cependant, si l'on suppose que les aminoacides neutres sont effectivement répartis le long de la chaîne de la salmine sous forme de dipeptides, la composition en aminoacides permet de prévoir l'existence d'un nombre de dipeptides neutres plus élevé que celui que nous avons effectivement rencontré. L'absence de quelques-uns des dipeptides possibles n'est pas surprenante, si l'on tient compte que les peptides manquant sont, d'après la composition en aminoacides, des peptides de la sérine, particulièrement fragiles au cours de l'hydrolyse acide²¹. Le seul peptide de la sérine retrouvé ici est la valyl-sérine, dont la présence, après hydrolyse acide, s'explique probablement par l'action stabilisante exercée sur la liaison par le résidu valy²².

4. Si l'on considère les résultats donnés dans les Tableaux V et VI, il est vraisemblable que les peptides I et VI proviennent d'un même enchaînement. De même, la présence des peptides II, VII, VIII et IX dans nos hydrolysats, permet de suggérer l'existence, dans la molécule de salmine, de l'enchaînement:···Arg·Pro·Val·Arg·Arg···.

RÉSUMÉ

1. L'étude des produits d'hydrolyse acide ou trypsique de la DNP-salmine, préparée à partir de la salmine d'*Oncorhynchus*, permet d'attribuer à l'extrémité iminée de cette protamine la structure: Pro·Arg·Arg···.

2. Les peptides neutres et quelques peptides basiques renfermant des résidus d'aminoacides neutres, présents dans des hydrolysats acides partiels de salmine, ont été isolés et leur structure établie.

SUMMARY

1. The products of acid or trypsic hydrolysis of DNP-salmine, prepared from the salmine of *Oncorhynchus*, have been studied and the imino end of this protamine has been given the structure: Pro·Arg·Arg···.

2. Neutral peptides and some basic peptides containing neutral amino acid residues, present in the partial acid hydrolysates of salmine, have been isolated and their structures established.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Saure oder trypthische Hydrolysat von DNP-Salmin, hergestellt aus Salmin von *Oncorhynchus*, wurden untersucht und dem Iminoende dieses Protamins die Struktur Pro·Arg·Arg··· zugeschrieben.

2. Neutrale Peptide und einige basische Peptide aus dem sauren Partialhydrolysat von Salmin, die neutrale Aminosäurereste enthalten, wurden isoliert und ihre Struktur festgestellt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. F. VELICK ET S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 233.
- ² R. J. BLOCK, D. BOLLING, H. GERSHON ET H. A. SOLES, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 70 (1949) 494.
- ³ G. R. TRISTRAM, *Adv. Prot. Chem.*, 5 (1949) 129.
- ⁴ S. BLACKBURN ET A. ROBSON, *Biochem. J.*, 54 (1953) 295;
- M. C. CORFIELD ET A. ROBSON, *Biochem. J.*, 65 (1953) 517.
- ⁵ F. SANGER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 563.
- ⁶ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ⁷ S. SAKAGUCHI, *J. Biochem. (Japan)*, 37 (1950) 23.
- ⁸ C. S. HANES, F. J. R. HIRD ET F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, 51 (1952) 25.
- ⁹ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- ¹⁰ J. C. PERRONE, *Nature*, 167 (1951) 513.
- ¹¹ R. ACHER ET U.-R. LAURILA, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 413.
- ¹² R. ACHER ET C. CROCKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 705.
- ¹³ R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- ¹⁴ M. BERGMANN ET J. S. FRUTON, *Adv. Enzymol.*, 1 (1941) 63.
- ¹⁵ R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- ¹⁶ W. GRASSMAN ET K. V. ARNIM, *Ann.*, 519 (1938) 192.
- ¹⁷ A. POLSON, V. M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1947) 603.
- ¹⁸ E. F. Mc FARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- ¹⁹ F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 366.
- ²⁰ K. FELIX, *Experientia*, 8 (1952) 312.
- ²¹ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ²² R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 351.

Reçu le 30 mars 1954