

QUELQUES RELATIONS ENTRE LE PHOSPHATE
DE PYRIDOXAL ET LA DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE CYSTÉINE-
SULFINIQUE PAR DIVERS ORGANES DU RAT NORMAL OU
DU RAT CARENCÉ EN VITAMINE B₆*

par

BERNADETTE BERGERET, FERNANDE CHATAGNER ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Des investigations précédentes² ont montré que, chez le rat carencé en vitamine B₆, la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique n'a plus lieu, ce qui se manifeste par la disparition dans l'urine, de l'hypotaurine et de la taurine, ainsi que par la perte de toute activité décarboxylante de préparations du foie de ces animaux. En outre, il est apparu que, dans ce dernier cas, l'addition de phosphate de pyridoxal est inefficace pour restituer à de telles préparations leur activité normale. Dans le but de rechercher ce que devient l'apodécarboxylase en question lors d'une telle carence, il était intéressant d'étudier systématiquement la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par des broyats de divers organes (foie, cerveau, rein, cœur) d'animaux carencés en vitamine B₆, soit sans addition de phosphate de pyridoxal, soit au contraire après addition du coenzyme au broyat en expérience, et de comparer cette décarboxylation avec celle fournie par les mêmes organes d'animaux normaux, également sans addition ou avec addition de phosphate de pyridoxal.

D'autre part, étant donné la possibilité d'une genèse de la taurine à partir de l'acide cystéique, il convenait également d'étudier de la même façon la décarboxylation de cet acide, et de comparer à ce point de vue son comportement avec celui de l'acide cystéinesulfinique. Enfin, il n'était pas sans intérêt de faire quelques observations parallèles sur la décarboxylation de l'acide glutamique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation des homogénats. La nature des régimes auxquels sont soumis les rats a été indiquée précédemment². Après un jeûne de 24 heures, les animaux sont sacrifiés par décapitation; immédiatement, les organes sont prélevés, pesés et placés à — 20°. Ils sont ensuite broyés à froid avec du sable, et le broyat est dilué avec de l'eau distillée froide, de manière à obtenir une suspension contenant de 100 à 300 mg d'organes frais par ml. Dans les cas où il est nécessaire d'éliminer toute activité transaminante qui consommerait une partie de l'acide cystéinesulfinique³, la suspension aqueuse du broyat est dialysée pendant 20 heures à 4° contre une solution de bicarbonate de sodium à 0.1%; on élimine ainsi les acides α -cétoniques libres du milieu. Les vitesses absolues de décarboxylation (Q_{CO_2} = ml CO₂/heure/mg poids sec) peuvent varier du simple au double pour un même organe

* Les résultats essentiels de ce travail ont été exposés au cours d'une Harvey Lecture (24 Septembre, 1953)¹.

d'une expérience à l'autre, selon l'origine de l'animal*; aussi les comparaisons ont-elles été toujours faites avec des préparations de l'organe d'un même animal. Dans ce qui suit, nous exprimons la quantité des préparations enzymatiques utilisée en poids frais d'organe en jeu. Le poids sec correspond très sensiblement à 18.5 % du poids frais.

Disposition des expériences. La décarboxylation du substrat étudié est suivie par dégagement du CO_2 selon la technique classique de Warburg, à 35° . D'une façon générale, le milieu réactionnel est constitué par le mélange de 2 ml de suspension de broyat d'organe, 0.8 ml d'une solution tampon 0.25 M de phosphate monopotassique et de phosphate disodique**, 0.2 ml de la solution du substrat préalablement neutralisée et initialement placée dans une fiole latérale, et éventuellement 0.1 ml d'une solution de phosphate de pyridoxal (sel de calcium)***. En outre, une autre fiole latérale contient 0.2 ml d'une solution d'acide sulfurique 5 N servant à libérer à la fin de l'expérience le CO_2 formé, mais retenu par la solution tampon. Le tout est en atmosphère d'azote pur.

Remarques. En utilisant une solution connue de bicarbonate de sodium, nous avons déterminé la proportion de CO_2 dégagé selon le pH du tampon utilisé, avant acidification du milieu. Nous avons d'autre part constaté que la proportion de CO_2 retenu est indépendante de la quantité totale de ce gaz qui doit théoriquement apparaître. Nous avons donc pu établir (Tableau I) un coefficient permettant, pour un pH donné, de calculer les valeurs vraies de CO_2 formé à partir des valeurs obtenues au cours des expériences. Le contrôle de la validité de cette manière de faire est fourni par la quantité de CO_2 totale mesurée, en fin d'expérience, après introduction dans le milieu de l'acide sulfurique de la fiole latérale.

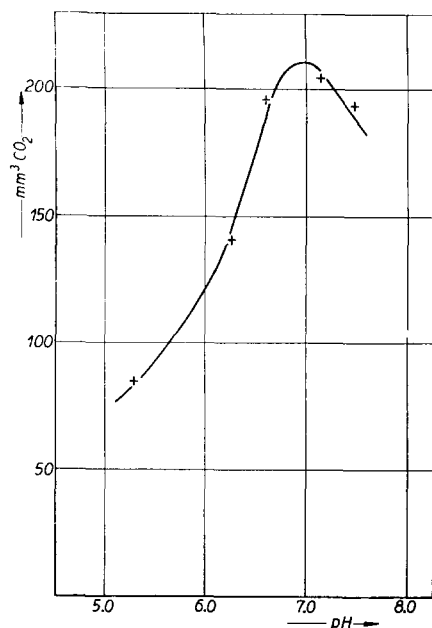


Fig. 1. Détermination du pH optimum de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique. Solution tampon phosphates 0.067 M; homogénat de foie 220 mg (poids frais); acide cystéinesulfinique 0.01 M; durée 1 heure.

TABLEAU I
POURCENTAGE DE CO_2 DÉGAGÉ, SELON LE pH DU MILIEU RÉACTIONNEL, EN SOLUTION TAMPON PHOSPHATE

pH	% de CO_2 dégagé
4.5	94
5.6	93
6.4	74
6.8	57
7.1	43
7.3	28
8.3	0

Lorsque les mesures de décarboxylation sont terminées, une analyse qualitative par chromatographie sur papier du liquide réactionnel convenablement traité permet de s'assurer de la formation de la molécule organique attendue.

pH optimum. Le pH optimum de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est de 6.8 à 7.0, quel que soit l'organe étudié; la Fig. 1 illustre, à titre d'exemple l'influence du pH sur la décarboxylation en question dans le cas du foie.

Influence de la concentration en substrat. Les courbes de la Fig. 2 montrent que la vitesse de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique reste pratiquement la même pour des concentrations en

* Il n'est pas sans intérêt de signaler à ce propos que le cerveau et le foie des rats "normaux" recevant l'alimentation habituelle de l'élevage ont une action décarboxylante sensiblement plus intense que celle des animaux "témoins" soumis à un régime défini.

** Des expériences préliminaires ont montré que, aux mêmes pH la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfinique est sensiblement plus faible en solution tampon bicarbonate qu'en solution phosphates.

*** Nous sommes heureux de remercier ici Dr. K. FOLKERS (Merck and Co, Rahway, N.J.) qui nous a aimablement offert le phosphate de pyridoxal utilisé au cours de ce travail.

substrat dans le milieu réactionnel comprises entre $2 \cdot 10^{-2} M$ et $2 \cdot 10^{-3} M$. D'autre part, la courbe représentative de la décarboxylation pour la concentration de $2 \cdot 10^{-3} M$ indique que cette réaction se poursuit jusqu'à utilisation complète du substrat. Dans les autres expériences du présent travail nous avons toujours utilisé la concentration de $10^{-2} M$.

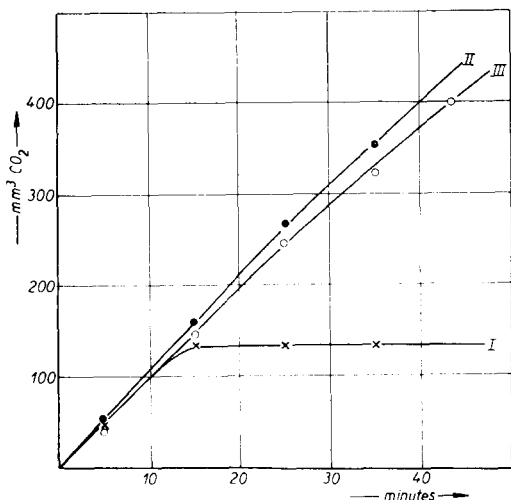


Fig. 2. Influence de la concentration en substrat sur la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le foie du rat. Solution tampon phosphates 0.067 M pH = 6.8; homogénat de foie 220 mg (poids frais); I: acide cystéinesulfinique 0.002 M; II: acide cystéinesulfinique 0.010 M; III: acide cystéinesulfinique 0.020 M.

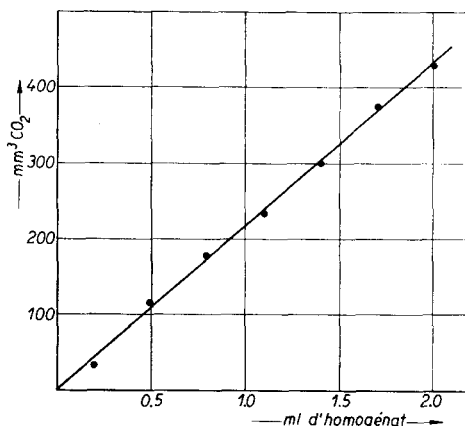


Fig. 3. Influence de la concentration en enzyme sur la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le foie du rat. Solution tampon phosphates 0.067 M pH = 6.8; 1 ml d'homogénat = 240 mg de foie (poids frais); acide cystéinesulfinique 0.01 M; durée 40 minutes.

Influence de la concentration en enzyme.
D'après les courbes des Figs. 3 et 4, il apparaît que la vitesse de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est, toutes conditions égales d'ailleurs et dans les limites de nos expériences, rigoureusement proportionnelle à la quantité d'enzyme en jeu.

1. Comparaison des vitesses de décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le foie du rat témoin et par le foie du rat carencé, en présence ou en absence de phosphate de pyridoxal,

Les expériences dont les résultats sont représentés par les courbes de la Fig. 5 indiquent que: (1) l'addition de phosphate de pyridoxal à une préparation de foie de rat témoin n'augmente guère la vitesse de décarboxylation ($Q_{CO_2} = 1.5$ au lieu de 1.4); on remarque toutefois que l'introduction du phosphate de pyridoxal permet à la pré-

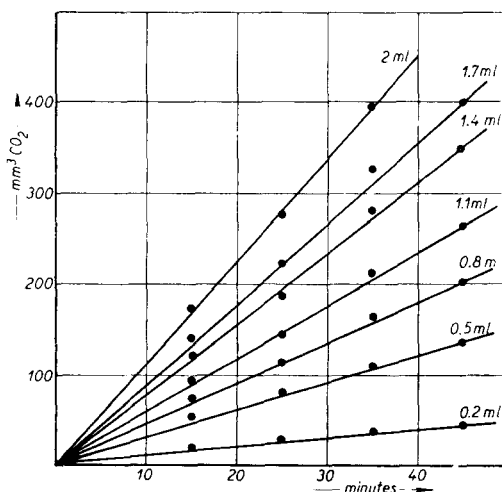


Fig. 4. Influence de la concentration en enzyme sur la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le foie de rat. Mêmes conditions que dans la Fig. 3, sauf en ce qui concerne la durée.

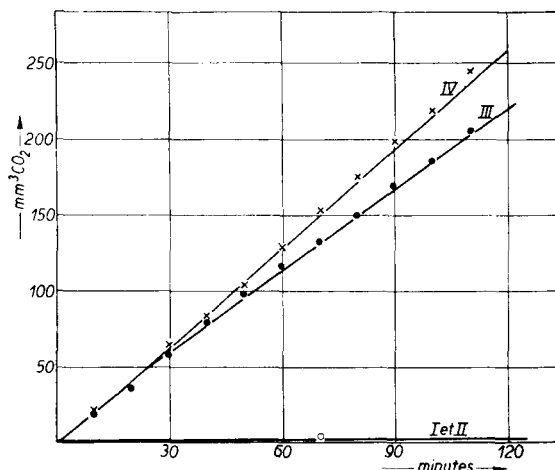
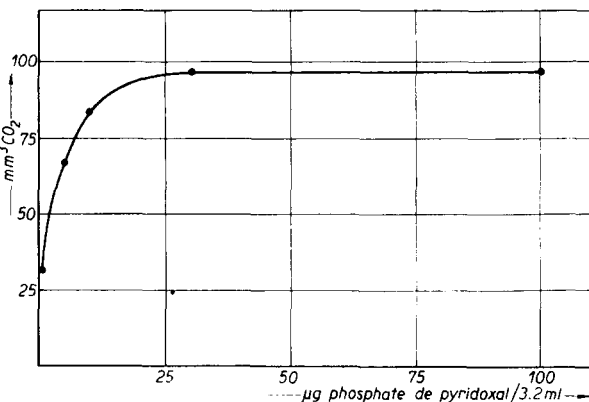
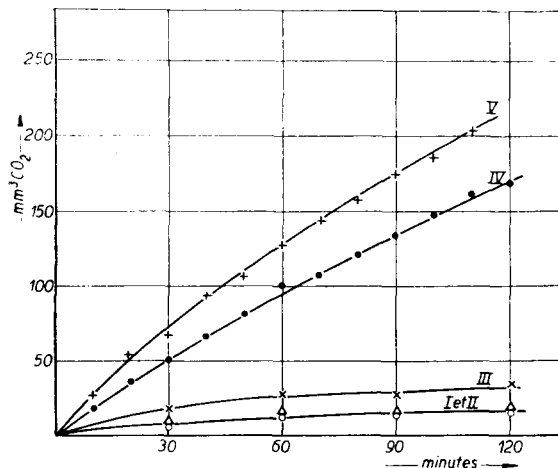


Fig. 5. Décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le foie du rat témoin et du rat carencé en vitamine B_6 , avec ou sans addition de phosphate de pyridoxal. Solution tampon phosphates $0.067 M$ $pH = 6.8$; homogénat de foie $450 mg$ (poids frais); acide cystéinesulfinique $0.01 M$; I = foie de rat carencé; II = foie de rat carencé additionné de $100 \mu g$ de sel de calcium de phosphate de pyridoxal; III = foie de rat témoin; IV = foie de rat témoin additionné de $100 \mu g$ de sel de calcium de phosphate de pyridoxal.

Fig. 6. Influence de la concentration en phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le cerveau du rat. Solution tampon phosphates $0.067 M$ $pH = 6.8$; homogénat de cerveau $160 mg$ (poids frais); acide cystéinesulfinique $0.01 M$; durée 1 heure.



passé dans le cas du foie, l'addition de phosphate de pyridoxal à une préparation de cerveau de rat normal accroît considérablement l'intensité de la décarboxylation, il convenait alors d'étudier l'influence de la concentration en coenzyme sur la vitesse de décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le cerveau du rat.



paration enzymatique de conserver pendant plus longtemps son activité initiale; (2) le foie du rat carencé a perdu toute activité décarboxylante et l'addition de phosphate de pyridoxal reste ici complètement inopérante.

2. Comparaison des vitesses de décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le cerveau du rat témoin et par le cerveau du rat carencé, en présence ou en absence de phosphate de pyridoxal

Des observations préliminaires ayant montré que, contrairement à ce qui se

Fig. 7. Décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par le cerveau du rat témoin et du rat carencé en vitamine B_6 , avec ou sans addition de phosphate de pyridoxal. Solution tampon phosphates $0.067 M$ $pH = 6.8$; homogénat de cerveau $228 mg$ (poids frais); acide cystéinesulfinique $0.01 M$; I = cerveau sans acide cystéinesulfinique; II = cerveau de rat carencé; III = cerveau de rat témoin; IV = cerveau de rat témoin additionné de $100 \mu g$ de sel de calcium de phosphate de pyridoxal; V = cerveau de rat carencé additionné de $100 \mu g$ de sel de calcium de phosphate de pyridoxal.

Les conditions d'une telle étude et les résultats obtenus sont donnés par la Fig. 6: on constate que l'action du phosphate de pyridoxal (sel de calcium) s'accroît avec sa concentration jusqu'à ce que cette dernière atteigne sensiblement 10 μg par ml; l'action du coenzyme atteint alors son maximum. D'après ces données, nous avons décidé, dans les expériences suivantes, d'introduire le phosphate de pyridoxal à une concentration telle qu'elle soit finalement de 30 μg par ml dans le milieu réactionnel.

Les courbes de la Fig. 7 montrent que: (1) l'addition de phosphate de pyridoxal à une préparation de cerveau de rat témoin accroît considérablement la vitesse de décarboxylation ($Q_{\text{CO}_2} = 1.8$ au lieu de 0.18); (2) le cerveau du rat carencé a perdu, comme le foie, toute action décarboxylante, mais l'addition de phosphate de pyridoxal restitue à une préparation de cerveau une activité au moins égale et souvent même quelque peu supérieure (ici $Q_{\text{CO}_2} = 2.3$) à celle de l'organe de l'animal témoin.

De toute façon, l'activité décarboxylante du cerveau du rat normal, sans addition de phosphate de pyridoxal, est toujours inférieure à celle du foie. Etant donné d'autre part que les réactions de transamination sont particulièrement faibles dans le cerveau, on conçoit que c'est dans cet organe où l'acide cystéinesulfonique ne disparaît que lentement, qu'on ait pu en déceler la présence⁴.

3. Comparaison des vitesses de décarboxylation de l'acide cystéinesulfonique, de l'acide cystéique et de l'acide glutamique par le foie du rat normal, sans addition de phosphate de pyridoxal.

Il est bien établi⁵ que le foie du rat ne provoque aucune décarboxylation en α de l'acide glutamique; il était néanmoins intéressant de confirmer ce fait dans le cas actuel. D'autre part, puisque, le pH optimum de la décarboxylation de l'acide cystéique est, d'après BLASCHKO⁶, de 7.3, alors que le pH optimum de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfonique est de 6.8, nous avons étudié chacune des deux réactions en question à pH 6.8 et à pH 7.3. Les résultats obtenus au cours de ces déterminations sont illustrés par les courbes de la Fig. 8.

Ces courbes montrent que: (1) l'acide glutamique, comme on pouvait s'y attendre, ne subit ici aucune décarboxylation; (2) l'acide cystéinesulfonique est décarboxylé avec une vitesse notable (Q_{CO_2} à pH 6.8 = 5.4; Q_{CO_2} à pH 7.3 = 4.7); (3) l'acide cystéique est décarboxylé, mais avec une intensité nettement moins grande (Q_{CO_2} à pH 6.8 = 0.40; Q_{CO_2} à pH 7.3 = 0.65).

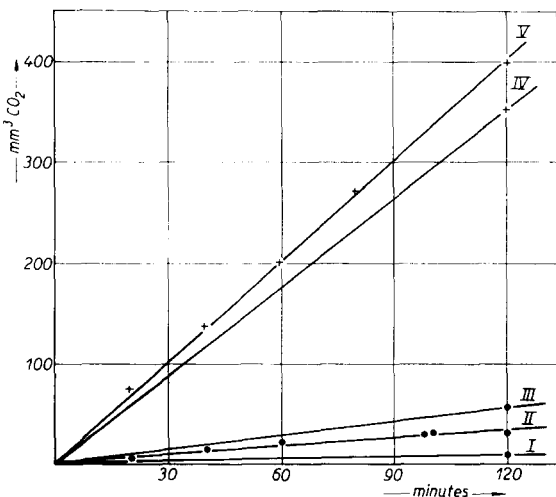


Fig. 8. Décarboxylation de l'acide cystéinesulfonique, de l'acide cystéique et de l'acide glutamique par le foie du rat normal. Solution tampon phosphates 0.067 M; homogénat de foie 200 mg (poids frais); substrats 0.01 M. I = Acide glutamique à pH = 6.8; II = Acide cystéique à pH = 6.8; III = Acide cystéique à pH = 7.3; IV = Acide cystéinesulfonique à pH = 7.3; V = Acide cystéinesulfonique à pH = 6.8.

4. Comparaison des vitesses de décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique, de l'acide cystéique et de l'acide glutamique par le cerveau de rat normal, avec addition de phosphate de pyridoxal.

Les expériences sont faites ici avec addition de 100 μ g de phosphate de pyridoxal

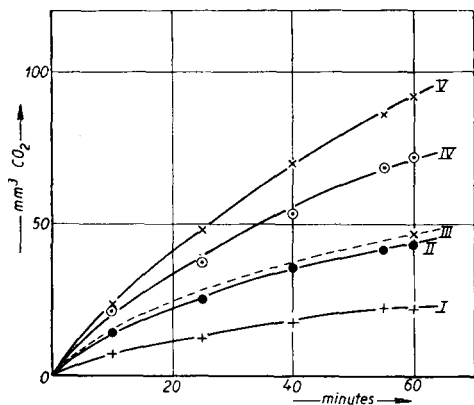


Fig. 9. Décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique, de l'acide cystéique et de l'acide glutamique par le cerveau du rat normal. Solution tampon phosphates 0.067 M; homogénat de cerveau 250 mg (poids frais); substrats 0.01 M. I = cerveau sans substrat; II = Acide cystéique à pH = 6.8; III = Acide cystéique à pH = 7.3; IV = Acide cystéinesulfinique à pH = 6.8; V = Acide glutamique à pH = 6.8.

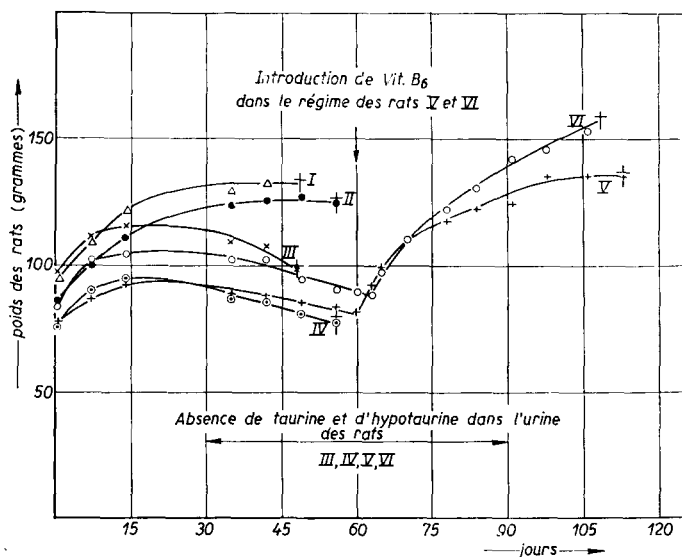


Fig. 10. Courbes de poids des rats en fonction du temps. I et II = rats témoins; III et IV = rats carencés; V et VI = rats carencés: essais de régénération. Les rats sont sacrifiés au temps indiqué par le signe †.

5. Régénération, par addition de pyridoxine au régime, de la décarboxylase de l'acide cystéinesulfinique dans le foie d'animaux préalablement carencés en vitamine B₆.

On a vu précédemment que le foie des animaux carencés en vitamine B₆ a vraisemblablement perdu toute apodécarboxylase de l'acide cystéinesulfinique. Nous avons constaté qu'il était possible de restituer au foie une activité décarboxylante au moins partielle, en fournissant à des animaux soumis depuis deux mois au régime de carence une quantité convenable (15 μ g/jour) de pyridoxine. Le détail des expériences est donné par la Fig. 10.

Les résultats obtenus indiquent que, dans les conditions expérimentales réalisées

la production de taurine telle qu'on peut en juger d'après sa présence dans l'urine, n'a plus lieu après un mois de carence mais se rétablit environ un mois après la cessation de cette carence; en outre, le foie des animaux sacrifiés 45 jours après la réintroduction de pyridoxine dans leur alimentation manifeste à nouveau une activité décarboxylante vis à vis de l'acide cystéinesulfinique, activité qui correspond ($Q_{CO_2} = 0.6$) à peu près au quart de celle du foie des animaux témoins. D'autre part, 8 jours après la suppression du régime dépourvu de vitamine B₆, on constate, par chromatographie sur papier, la présence dans l'urine d'une quantité importante d'acide γ -aminobutyrique, quantité qui semble nettement supérieure à ce qu'elle sera dans la suite, et à ce qu'elle est généralement chez les animaux témoins.

DISCUSSION

Le présent travail confirme tout d'abord divers résultats obtenus antérieurement montrant que la décarboxylation de l'acide glutamique^{7,8}, celle de l'acide cystéique⁹ et celle de l'acide cystéinesulfinique² sont dues à des systèmes enzymatiques comportant le phosphate de pyridoxal comme coenzyme. Il met en outre en évidence une différence frappante en ce qui concerne le comportement des systèmes enzymatiques qui, dans le foie et dans le cerveau, exercent une action décarboxylante sur l'acide cystéinesulfinique: l'apodécarboxylase du foie d'un animal témoin ou normal apparaît comme étant saturée en coenzyme, alors que l'apodécarboxylase du cerveau d'un animal normal semble loin d'être saturée en coenzyme. D'autre part, chez un animal carencé, toute apodécarboxylase du foie semble avoir disparu alors que celle du cerveau paraît être restée intacte; ce dernier fait est analogue à celui signalé par ROBERTS *et al.*^{7,8} dans le cas de la décarboxylase de l'acide glutamique. Ces observations conduisent à penser que l'apodécarboxylase de l'acide cystéinesulfinique du foie et l'apodécarboxylase de l'acide cystéinesulfinique du cerveau sont deux apoenzymes distincts, dont les constantes d'affinité pour le coenzyme sont différentes, et dont les stabilités sont aussi différentes; il est d'ailleurs possible que ces deux phénomènes soient liés. Peut-être aussi la présence d'acide cystéinesulfinique dans le cerveau⁴, même en faible quantité, contribue-t-elle à la stabilité de l'apoenzyme de cet organe. Il ne s'agit ici encore que d'hypothèses dont la valeur reste à vérifier.

En ce qui concerne les décarboxylations de l'acide cystéinesulfinique et de l'acide cystéique, on peut se demander si ces réactions sont dues à un même système enzymatique ou, au contraire, à des décarboxylases spécifiques. D'après un travail récent de BLASCHKO ET HOPE¹⁰ dans le foie de divers mammifères (chien, rat, cobaye, souris) il s'agirait d'un seul et même enzyme. Nous avons cependant constaté¹¹ que le rein de lapin exerce une action décarboxylante relativement intense vis à vis de l'acide cystéinesulfinique, sans présenter la moindre activité sur l'acide cystéique.

Cependant, et surtout s'il s'agit du même enzyme, le fait que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique soit toujours, chez le rat, plus intense que celle de l'acide cystéique apporte un nouvel argument en faveur de l'opinion selon laquelle la taurine prend naissance, au moins chez cet animal, beaucoup plus par oxydation de l'hypotaaurine que par décarboxylation de l'acide cystéique.

RÉSUMÉ

On a étudié systématiquement la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par des broyats de foie et de cerveau de rats normaux ou carencés en vitamine B₆, ces broyats étant additionnés ou non de pyridoxal phosphate. En outre, on a comparé l'activité décarboxylante des mêmes organes d'animaux normaux vis à vis de l'acide glutamique, de l'acide cystéique et de l'acide cystéinesulfinique. On a ainsi observé la différence frappante existant entre le foie et le cerveau, en ce qui concerne leur action décarboxylante sur l'acide cystéinesulfinique: l'apodécarboxylase du foie d'un animal témoin ou normal apparaît comme étant saturée en coenzyme, alors que l'apodécarboxylase du cerveau d'un animal normal semble loin d'être saturée en coenzyme. D'autre part, dans le cas d'un animal carencé, toute apodécarboxylase du foie semble avoir disparu alors que celle du cerveau paraît être restée intacte. On a constaté d'autre part que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est toujours plus intense que celle de l'acide cystéique, ce qui confirme que, chez le rat, le précurseur de la taurine est l'hypotaurine plutôt que l'acide cystéique.

SUMMARY

A systematic study has been made of the decarboxylation of cysteinesulphinic acid by liver and brain homogenates of both normal and B₆ deficient rats, with and without the addition of pyridoxal phosphate. The decarboxylase activities of normal animal tissues were compared using glutamic, cysteic and cysteinesulphinic acids as substrates. A striking difference was observed between the decarboxylation of cysteinesulphinic acid by the brain and liver: liver apodecarboxylase of normal or control animals appears to be saturated with coenzyme, whereas the brain apodecarboxylase of normal animals seems to be far from saturated by coenzyme. On the other hand, in the case of B₆ deficient animals all liver apodecarboxylase appears to have disappeared although that of the brain remains intact. We have observed that decarboxylation of cysteinesulphinic acid is always more than the decarboxylation of cysteic acid, and it is suggested that, in the rat, the precursor of taurine is hypotaurine rather than cysteic acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Decarboxylierung von Cysteinsulfinsäure durch Leber- und Gehirnhomogenate von normalen und an Vitamin B₆ mangelnden Ratten, ohne oder mit Zusatz von Pyridoxalphosphat, wurde eingehend untersucht. Des weiteren wurde die Decarboxylierungswirksamkeit derselben Organe normaler Tiere gegenüber Glutaminsäure, Cysteinsäure und Cysteinsulfinsäure vergleichsweise untersucht. Dies ermöglichte es den ausgeprägten Unterschied, der zwischen Leber und Gehirn in Bezug auf ihre decarboxylierende Wirkung gegenüber Cysteinsulfinsäure besteht, zu beobachten: die Apodecarboxylase der Leber eines normalen Tieres scheint mit Coenzym gesättigt zu sein, während die Apodecarboxylase des Gehirnes eines Normaltieres weit davon entfernt ist. Andererseits scheint im Falle des an Vitamin B₆ mangelnden Tieres jegliche Spur von Apoenzym aus der Leber zu verschwinden, während das Gehirnapoenzym unverändert zu bleiben scheint.

Es wurde gleichfalls festgestellt dass, die Decarboxylierung der Cysteinsulfinsäure immer stärker ist als die der Cysteinsäure. Diese Tatsache bestätigt die Annahme, wonach, im Rattenorganismus Taurin sich eher aus Hypotaurin als aus Cysteinsäure bildet.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT, *Harvey Lectures*, 49 (1953-1954) 1.
- ² F. CHATAGNER, H. TABECHIAN ET B. BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 313.
- ³ F. CHATAGNER, B. BERGERET, T. SÉJOURNÉ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 340.
- ⁴ B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 297.
- ⁵ O. SCHALES, dans J. B. SUMNER ET K. MYRBÄCH, *The Enzymes*, Academic Press Inc., New York, 1950, vol. II, première partie, p. 216.
- ⁶ H. BLASCHKO, *Biochem. J.*, 36 (1942) 571.
- ⁷ E. ROBERTS ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 789.
- ⁸ E. ROBERTS, F. YOUNGER ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 277.
- ⁹ K. BLASCHKO, S. P. DATTA ET K. HARRIS, *Brit. J. Nutrition*, 7 (1953) 364.
- ¹⁰ H. BLASCHKO ET D. B. HOPE, *Journal of Physiology*, 126 (1954) 52-53 P.
- ¹¹ B. BERGERET, F. CHATAGNER ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).

Reçu le 1 décembre 1954