

ANALYSES CHIMIQUES DES POLYOSIDES EXTRAITS DE *Salmonella johannesburg* 5 58 SAUVAGE ET CONVERTIE PAR LE PHAGE φ 1(40)*

R. GIRARD ET A. M. STAUB

Service des Antigènes Bactériens, Institut Pasteur, 75-Paris XV^e (France)

(Reçu le 10 décembre 1971, accepté pour publication le 23 août 1972)

ABSTRACT

After conversion by phage φ 1(40) *S. johannesburg* 5 58 (40) acquires a new specificity which cross reacts with all Factors 1 present on other *Salmonella*. The structure of the specific polysaccharides, obtained from both wild (polysaccharide R⁻) and converted (polysaccharide R⁺) strains, was established by determination of the component sugars and by methylation and periodate oxidation of the polysaccharides and a few oligosaccharides obtained after partial hydrolysis. The specific chain of polysaccharide R⁻ contains residues of D-glucose and D-mannose, and a tetrasubstituted residue of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose on which two residues of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose and -D-galactose are linked. The specific chain of polysaccharide R⁺ apparently differs only from that of polysaccharide R⁻ by the addition of an α -D-glucose residue to the 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose residue. The terminal disaccharide residue α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-GalNAc of polysaccharide R⁺ is similar to the residue α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Gal which carries the specificity of Factor 1 in other *Salmonella*. Both the very small quantities of 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose obtained after methylation and the resistance of the terminal residue of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose to periodate oxidation cannot be explained by the structure proposed for polysaccharide R⁺, unless by a special conformation which is discussed and is presently tested by immunochemical analysis.

SOMMAIRE

L'étude par méthylation et oxydation par le périodate des polyosides R⁻ et R⁺ extraits respectivement de *Salmonella johannesburg* 5 58 sauvage (40) et convertie par le phage φ 1(40) ainsi que des oligosides en dérivant après hydrolyse partielle a permis de proposer une structure comprenant des résidus de D-glucose, D-mannose et 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose et étrasubstitué sur lequel sont greffées deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et -D-galactose. Les structures des deux polyosides ne semblent différer que par l'addition sur le polyoside R⁺ d'un résidu de α -D-glucose.

*Dédicé au Professor Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

à l'extrémité-d'une chaîne latérale. Le dioside terminal α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-GalNAc présent sur R $^+$ (1,40) rappelle le dioside α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Gal responsable de la spécificité 1 sur d'autres *Salmonella*. Certains résultats, obtenus avec le polyoside R $^+$, sont difficiles à interpréter et ne pourraient s'expliquer que par une conformation spatiale particulière qui a été discutée et fait actuellement l'objet d'analyses immunochimiques.

INTRODUCTION

La souche 5 58 de *Salmonella johannesburg* (symbolisée par Sj 5 58 dans ce travail) appartient au groupe sérologique R du tableau de Kauffmann-White¹ et possède le facteur 40. L'infection de cette souche par le phage φ 1(40), suivie ou non de lysogénisation, fait apparaître à sa surface un nouveau déterminant antigénique détecté par agglutination avec des antisérum anti-1, d'où la formule 1,40 donnée à la souche lysogénisée². On a démontré dans d'autres systèmes que les déterminants antigéniques O ont pour support une macromolécule polysaccharidique située au niveau de la paroi bactérienne. On a donc essayé au cours de ce travail de déterminer la structure du polysaccharide extrait de la souche Sj 5 58 non lysogénisée, dite sauvage, et du polysaccharide extrait de la souche Sj 5 58 lysogénisée par le phage φ 1(40) en vue de localiser les modifications apportées par le phage et d'établir la structure chimique des facteurs antigéniques 40, 1 et 1₄₀ (propre à la souche lysogénisée).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation des polyosides — Ils ont été extraits des bactéries entières par l'acide acétique 0,1M à 100° pendant 1,5 h, purifiés par la technique de Freeman³ et lyophilisés. 283 g de germes secs Sj 5 58 souche sauvage ont fourni 4,5 g (ca 1,6%) de polyoside FPS R $^-$ et 270 g de germes secs de Sj 5 58 lysogénisés par φ 1(40) ont fourni 3,5 g (ca 1,3%) de polyoside FPS R $^+$.

Identification des oses constitutifs des polyosides — Les polyosides sont hydrolysés pendant 4 h à 100° par l'acide sulfurique 0,5M ou par l'acide chlorhydrique 4M. Les hydrolysats sont chromatographiés sur papier Schleicher 2043 b Mg I ou sur plaques de cellulose (t 1 c)⁴ dans les solvants (A) 1-butanol-pyridine-eau (9 5 4, v/v), (B) 1-butanol-pyridine-eau (6 4 3, v/v), (C) 1-butanol-acide acétique-eau (4 1 1, v/v), (D) 1-butanol-éthanol-eau (2 1 1, v/v), (E) éthyle acétate-pyridine-acide acétique-eau (5 2 4 3, v/v). Les composés sont révélés par le réactif de Trevelyan *et al*⁵ au nitrate d'argent, par la ninhydrine 0,1% dans l'acétone⁶ et par le réactif d'Elson-Morgan⁷.

Les hydrolysats sont chromatographiés en phase gazeuse (c p g) sous forme d'alditols acétates avec un appareil Packard de la série 7400 avec enregistreur Honeywell sur ECNSS-M 3% adsorbé sur du GasChrom Q (100-120 mesh) pour les oses neutres⁸ et OV-17 3% adsorbé sur du GasChrom Q (100-120 mesh) pour la glucosamine et la galactosamine⁹.

Les osamines isolées sont également identifiées par oxydation par la ninhydrine selon la technique de Stoffyn et Jeanloz¹⁰

Dosages des oses neutres et osamines — Le D-glucose est déterminé par la glucose oxydase¹¹, le D-galactose par la galactose oxydase¹², le D-mannose par la mannose isomérase^{13 14}, pour ces deux derniers dosages, il a fallu tenir compte des interférences de la D-galactosamine pour le D-galactose et de l'heptose pour le D-mannose. Les osamines totales sont déterminées par la technique d'Elson-Morgan⁷, alors que la galactosamine était dosée spécifiquement par la technique de Ludowieg et Benmaman^{15 16}. Les osamines sont également séparées sur colonnes échangeuses d'ions Dowex 50 W X 8 et dosees par le procédé de Gardell¹⁷ ainsi que par la méthode au Technicon de Monsigny¹⁸. Le L-glycéro-D-manno-heptose est dosé par la méthode d'Osborn¹⁹, et l'acide 3-désoxyoctulosonique (KDO) par la méthode à l'acide thiobarbiturique²⁰.

Préparation des oligosides — L'hydrolyse partielle des polyosides R⁺ et R⁻ est effectuée avec l'acide sulfurique 0,5M pendant 30 min à 100° sur des solutions de 5 à 10 mg de polyoside par ml afin de réduire au maximum les phénomènes de transglycosylation²¹. Les hydrolysats sont neutralisés à l'aide de résines échangeuses d'anions IRA 400 (HCO_3^-)

La séparation des oligosides est réalisée par passage des hydrolysats sur une colonne de charbon-Celite selon la technique de Whistler et Durso²². L'elution est faite dans un premier temps avec de l'eau bidistillée puis avec un gradient exponentiel d'alcool de 0 à 40 %, v/v²³. Les groupes d'oligosides obtenus ont été ensuite séparés par chromatographie sur papier dans les solvants A ou B. Les fractions élues de la colonne de charbon sont caractérisées par des lettres majuscules pour le polyoside R⁻, et minuscules pour le polyoside R⁺. Ces lettres symbolisent la nature de l'éluant utilisé E pour eau, A pour alcool. Les fractions élues par l'alcool, A et a, ont été reunies en lots numérotés de I à XII pour le polyoside R⁻, et de 1 à 8 pour le polyoside R⁺ (Fig. 1). Chacun de ces lots est désigné par la lettre A (ou a) accompagnée d'un indice rappelant le numéro du lot, et d'un exposant d'autant plus élevé que l'oligoside migre plus vite en chromatographie sur papier dans le solvant A. Ainsi l'oligoside A_{XII}³ appartient au système R⁻, a été élue par l'alcool dans le lot N° XII et migre plus rapidement que l'oligoside A_{XII}².

Détermination de la séquence et des types de liaison des oses dans les oligosides étudiés — La détermination du résidu terminal réducteur s'effectue en dosant les oses avant et après réduction par le borohydrure de sodium²⁴. L'électrophorèse en tampon molybdate²⁵ permet également de détecter l'ositol. L'oxydation périodique²⁶ avec calcul de la consommation de periodate et de la libération d'acide formique s'effectue selon la technique de Fleury et Lange²⁷ ou la microtechnique de Schiffman²⁸. L'étude du comportement des osides en milieu pyridine à chaud s'effectue selon Whistler et BeMiller²⁹. L'utilisation d' α -D-mannosidase extraite de l'épididyme de rat s'effectue selon la technique de Conchie *et al.*³⁰, celle de β -D-glucosidase selon Mage et Kabat³¹. Les polyosides R⁺ et R⁻ sont méthylés selon la technique d'Hakomori³² et les modifications de Sandford et Conrad³³ et de Hellerqvist *et al.*³⁴. Chaque polyo-

side a subi deux cycles de méthylation. Les oses méthylos sont identifiés par c p g sur une colonne en verre (2,4 m × 3,1 mm) d'ECNSS-M 3% adsorbé sur GasChrom Q (100–120 mesh) à 150° isotherme, injection à 250°, détecteur à ionisation de flamme 230°, débit de l'azote 35–40 ml/min. Certains oligosides ont été méthylos selon une modification de la technique de Diner *et al.*³⁵ dans laquelle le milieu de méthylation est constitué par du *N,N*-dimethylformamide anhydre, de l'hydrure de sodium et de l'iode de méthyle.

RÉSULTATS

Identification et dosage des oses constitutifs des polyosides R⁺ et R[−] — L'hydrolyse par l'acide sulfurique 0,5M ou par l'acide chlorhydrique 4M pendant 4 h à 100° suivie de c p g des ositols acétates révèlent la présence de glucose, galactose, mannose, glucosamine et galactosamine dans les deux polyosides. Le polyoside R[−] renferme en outre un constituant dont le temps de rétention correspond à celui d'un méthyl pentose absent du polyoside R⁺. Cet ose migre comme le rhamnose en chromatographie sur papier et, après isolement, donne une réaction positive avec le réactif de Dische et Schettles spécifique des 6-didésoxyhexoses³⁶. De plus le polyoside R[−] contient des quantités plus importantes d'aminés et de L-glycéro-D-manno-heptose que le polyoside R⁺ (Tableau I).

TABLEAU I

NATURE ET DOSAGE DES SUCRES CONSTITUTIFS DES POLYOSIDES FPS R⁺ ET FPS R[−]^a

Données analytiques en %	Polyosides	
	FPS R [−]	FPS R ⁺
Azote total	5,5	4
D-Glucose	12–14	22–25
D-Galactose	7–8, 5–6 ^b	7–8, 2–3 ^b
D-Mannose	7, 4, 2–5 ^b	8–8,5, 7–8 ^b
Osmamines	20	30–32
2-Amino-2-désoxy-D-glucose	8	7–10
2-Amino-2-desoxy-D-galactose	11–10	22–25
Groupes O-acétylés	0?	0
KDO	2,5	0,2
Rhamnose	+	0
Heptose	10	4,5
Amines	++	±

^aL'azote a été dosé par la technique de Kjeldahl³⁷, les sucres aminés par la technique d'Elson-Morgan modifiée par Reissig, Strominger et Leloir³⁸, les groupes O-acétylés ont été recherchés par la technique de Kotelko³⁹. Les oses neutres sont dosés après hydrolyse des polyosides R⁺ et R[−] par l'acide sulfurique 0,5M à 100° pendant 4 h. Les sucres aminés sont dosés après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 4M pendant 4 h à 100°. Pourcentages corrigés en tenant compte de l'interférence au cours de ces dosages colorimétriques avec d'autres oses.

Le polyoside R⁺ contient environ deux fois plus de glucose et de galactosamine que le polyoside R⁻. D'autre part le polyoside R⁻ est plus riche en sucres spécifiques du noyau basal (KDO, heptose, galactose) que le polyoside R⁺. Le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal³⁷ montre que le polyoside R⁻ est plus riche en azote total (5,5 %) que le polyoside R⁺ (4 %). Or l'azote correspondant aux hexosamines du polyoside R⁻ représente 1,3 %, alors que l'azote des hexosamines du polyoside R⁺ représente 2 %. Le pourcentage d'azote plus élevé dans le cas du polyoside R⁻ s'explique par l'extraction, avec le polyoside R⁻, de plus grandes quantités d'aminés (putrescines, spermidines par exemple), environ 20 à 25 %, dans le cas du polyoside R⁺ on en extrait environ 10 à 12 %.

Cette analyse chimique montre que le comportement des deux polyosides R⁺ et R⁻, au cours de l'extraction et de la purification par la méthode de Freeman, est différent : extraction plus faible d'aminés et d'oses du noyau basal dans le cas de la souche Sj 5 58 lysogénisée que dans le cas de la souche Sj 5 58.

Le polyoside R⁺ semble donc posséder soit des chaînes O spécifiques plus longues soit un plus grand nombre de chaînes que le polyoside R⁻. La très faible teneur du polyoside R⁺ en galactose (2 à 3 %) permet de supposer que cet ose

TABLEAU II

POURCENTAGE DES OSSES CONSTITUTIFS DES POLYOSIDES R⁻ ET R⁺ ENTRANT DANS LA COMPOSITION DU NOYAU BASAL ET DES CHAÎNES O SPECIFIQUES

Données analytiques en %	Polyosides	
	R ⁻	R ⁺
Zone des chaînes spécifiques		
D-Glucose	7	21,5
D-Mannose	4,2-5	8-8,5
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	5-7	8-9
2-Acétamido-2-desoxy-D-galactose	11	22-25, 23,5
Zone du noyau basal		
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	2,5-3	1-1,5
D-Glucose	5-6	2-3
D-Galactose	5-6	2-3
Heptose	10	4
Phosphate ^a	1,16	0,4
KDO	2,5	0,25
Structure admise pour une région du noyau basal ⁴⁰⁻⁴²		
II	I	
→4)-D-G-(1→2)-D-Gal-(1→3)-D-G-(1→ ⁹)-Heptose-Heptose-KDO		
2	6	
↑	↑	
1	1	
D-GNac	D-Gal	
		PO ₄
		PO ₄

^aPhosphate dosé selon la méthode de Lowry⁴³

n'est pas présent dans les chaînes et n'appartient qu'au noyau basal Il est alors possible de calculer, en se basant sur la structure de ce noyau basal⁴⁰⁻⁴², le pourcentage des différents oses entrant dans la composition du noyau basal et des chaînes O spécifiques (Tableau II) Ces dernières sont composées de D-glucose, D-mannose, 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions approxim 1.1 1 2 alors que celles-ci sont d'environ 2 1.1 2 pour les chaînes O spécifiques du polyoside R⁺

TABLEAU III

SUCRES CONSTITUTIFS DES POLYOSIDES R⁺ ET R⁻ RESISTANT A L'OXYDATION PERIODIQUE

Sucres	Polyosides			
	R ⁻		R ⁺	
	Non oxyde	Oxyde	Non oxyde	Oxyde
2-Acétamido-2-désoxy-D-galactose	10-11	4 6-5	22-25	11 9
2-Acétamido-2-désoxy-D-glucose	10-8	≈0	10	8
D-Glucose	12-14	5,5	22-25	3
D-Galactose	5-6	0	3	0
D-Mannose	4,2-5	+ ^a	8	+ ^a

^aLe D-mannose restant après oxydation périodique n'a pu être dosé, car le dosage par la D-mannose-isomérase est perturbé par la présence des ions periodate

Le dosage des oses après une oxydation périodique de 96 h des polyosides R⁺ et R⁻ (Tableau III) montre que 50% du 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose est détruit lors de cette oxydation, aussi bien dans le cas du polyoside R⁺ que dans le cas du polyoside R⁻. Donc la moitié de ces résidus sont soit situés à l'extrémité d'une chaîne latérale, soit liés en (1→6) dans les chaînes O spécifiques (les deux propositions pouvant coexister). Le D-glucose restant correspond de façon très satisfaisante au D-glucose du noyau basal (Tableau II) ce qui signifie que tous les résidus de D-glucose des chaînes latérales sont détruits par l'agent oxydant La persistance du D-mannose après l'oxydation suggère que cet ose est lié en C-3 dans les deux polyosides ou qu'il est trisubstitué La disparition du D-galactose est en accord avec la structure connue noyau basal (Tableau II), quant à celle du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dans le cas du polyoside R⁻, elle peut s'expliquer par sa position à l'extrémité d'une chaîne latérale ou par l'existence d'une liaison (1→6) si elle est engagée dans la chaîne principale On constate que, à l'opposé de ce qu'on observe avec le polyoside R⁻, les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose du polyoside R⁺ ne sont pratiquement pas détruits au cours de cette oxydation (la fraction détruite correspond aux résidus des chaînes latérales du noyau basal)

Établissement de la séquence des résidus osidiques dans les polyosides R⁻ et R⁺ — La chromatographie sur charbon-Celite des hydrolysats partiels, obtenus par l'acide sulfurique, des polyosides R⁺ et R⁻, (Fig 1, fractions e_{1,2} et a₁₋₈, E_{I-II} et A_{I-XII},

TABLEAU IV
PRINCIPAUX OLIGOSIDES ISOLÉS DU POLYSIDE R⁻ ET DU POLYSIDE R⁺

Groupe	FPS R ⁻		FPS R ⁺		R _{en} (Solv A)	Sucres constitutifs				
	Fraction	Rendit (mg)	Fraction	Rendit (mg)		G	Gal	Man	GalN	GN
I	A _{II} ^{2a}	2,4			0,53	+	+			
	A _{VIII} ⁴	2,3			0,53	+	+			
	A _{II} ⁴	2,7			0,60	+	+			
II	{ A _V ¹ , A _V ² , A ₃ ³ _{II} A ₃ ³ _{III} , A _X ³ _{II} A _X ³ _{IV} , A _X ³ _{II} A _X ² _{II} , A _X ² _{III}	29,0	a ₂ ³ , a ₃ ⁴ , a ₈ ⁴ a ₅ ³ , a ₈ ² a ₄ ³ , a ₃ ²	23,4 3,6 14,5	0,79 0,98 0,36-0,40	+	+	+	+	+
	A _X ² _{II}	14,3	a ₄ ³	2,05	0,30	+	+	+	+	+
	A _X ² _{III}	11,9	a ₃ ²	4,40	0,20 0,12-0,15	+	+	+	+	+
	(A _X ¹ _{II}) ₂	7,0	(a ₃ ¹) ₂	8,5	0	+	+	+	+	+
	A _V ⁴				0,56 (2 disides)	+	+	+	+	+
	A _V ^{3b} , A _V ⁴	2,7			0,56	+	+	+	+	+
	A _V ³	4,7			0,52	+	+	+	+	+
III	A _{II} ⁵ , A _V ^{6a}	13,9	a ₂ ⁴	17,9	0,95-0,97	+	+	+	+	+
	(A _X ¹ _{II}) ₂	7,3			0	+	+	+	+	+
	(A _X ¹ _{II}) ₂	15			0	+	+	+	+	+

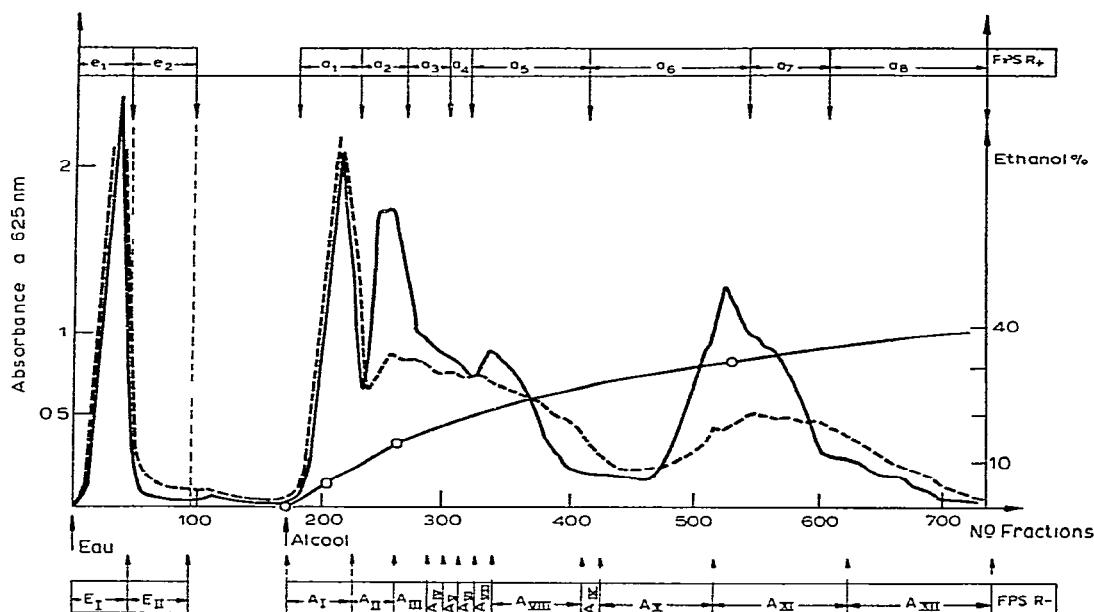


Fig 1 Chromatographie sur colonne de charbon-Célite (longeur 50 cm, diam int 2,5 cm) des polyosides R⁺ et R⁻ hydrolysés par l'acide sulfurique 0,5M à 100° pendant 30 min, volume des fractions 10 ml, temp ≈ 4°

respectivement), suivie de chromatographie sur papier dans le solvant A et d'élution par l'eau distillée a permis d'isoler toute une gamme d'oligosides (Tableau IV).

L'analyse qualitative des sucres constitutifs des oligosides obtenus en quantités assez importantes a permis de classer ceux-ci en oligosides ne contenant que des oses neutres (Groupe I), oligosides renfermant des oses neutres et un type d'osamine (galactosamine ou glucosamine) (Groupe II), et oligosides renfermant des oses neutres et les deux types d'osamines

La grande majorité de ces oligosides ne migrent pas en électrophorèse en tampon pyridine-acide acétique-eau (5243, v/v, dilué 4 fois) à pH 5,4. Donc la fonction aminée des osamines est substituée par des groupements acétyles, comme le laisse penser l'isolement des 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et -D-galactose des fractions A₁ et a₁ (Fig 1); en outre, les oses de ces oligosides ne possèdent aucune fonction alcool substituée par des groupements chargés positivement ou négativement (*i.e.* PO₄³⁻, CO₃²⁻, etc.).

Oligosides du Groupe I, A_{II}^{2a} et A_{VIII}⁴, R_{Gal} 0,53 Ces oligosides renferment des résidus de D-mannose et de D-glucose dans les mêmes proportions. La réduction par le borohydrure de sodium entraîne la transformation totale des résidus de D-glucose en résidus de D-glucitol, indiquant que ces oligosides sont des diosides mannosyl-glucoses. La stabilité du dioside A_{II}^{2a} en milieu pyridine à 100° pendant 1 h exclut la possibilité d'une liaison (1→3). D'autre part, ce dioside est retrouvé après hydrolyse

partielle du trioside *O*-Man-(1→4)-*O*-G-(1→4)-GalNAc étudié ci-dessous Le dioside A_{II}^{2a} a donc la structure

O-D-mannosyl-(1→4)-D-glucose

Oligosides du Groupe II, A_{VI}² et a₄⁴, R_{Gal} 0,39-0,40 L'analyse qualitative et quantitative des oses présents dans ces deux oligosides, confirmés par l'examen du spectre de masse de leurs composés perméthylés, indiquent que ce sont deux triosides constitués de résidus de D-mannose, D-glucose et D-galactosamine La D-galactosamine occupe la position terminale réductrice, et l'absence de migration en électrophorèse montre que la fonction amine est bloquée probablement par un groupement acétyle L'action d'une D-mannosidase, contenue dans un extrait d'épididyme de rat, sur ces deux triosides a libéré du D-mannose Ce résidu occupe donc la position terminale non réductrice dans l'oligoside, le résidu de D-glucose occupant la position médiane L'oxydation de chaque trioside consomme trois moles d'acide périodique et libère 1,22 mole d'acide formique L'hydrolyse de ces oligosides oxydés et réduits fournit de l'érythritol et du glycérol L'hydrolyse de A_{VI}² perméthylé libère du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-mannose et du 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose Tous ces résultats conduisent à proposer pour ces deux triosides la structure *O*-D-mannopyranosyl-(1→4)-*O*-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose L'absence de formation de chromogène au cours de la réaction d'Elson-Morgan effectuée sur ces deux triosides non hydrolysés est également en accord avec la liaison (1→4) entre les résidus de D-glucose et de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose

Oligosides du Groupe II, A_{XII}³ et a₄³, R_{Gal} ca 0,30 Ces deux oligosides sont des tétraosides constitués par un résidu de D-glucose, un résidu de D-mannose et deux résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose La réduction par le borohydrure de sodium indique qu'un des résidus de galactosamine est en position terminale réductrice La résistance du résidu de D-mannose à l'oxydation périodique prouve que celui-ci est substitué en C-3 L'hydrolyse partielle de cet oligoside a fourni le trioside A_{VI}² et les diosides A_{II}^{2a} et a₈⁵ Le deuxième résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose est donc en position terminale non réductrice et lie au C-3 du résidu de D-mannose La structure proposée pour ce tétraoside est

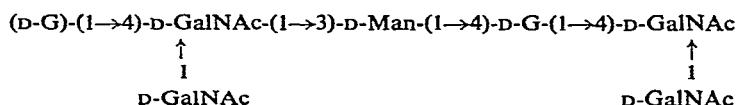
D-GalNAc-(1→3)-D-Man-(1→4)-G-(1→4)-GalNAc

Oligoside du Groupe II, A_{XII}², R_{Gal} ca 0,20 Cet oligoside est constitué de résidus de D-glucose, D-mannose et 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions 2.1.2. Un résidu d'hexosamine est en position terminale réductrice L'hydrolyse partielle a libéré les oligosides A_{XII}³, A_{VI}², a₈⁵ et A_{II}^{2a} Il s'agit donc d'un pentaoside comportant un résidu de D-glucose dont la position reste indéterminée Toutefois la proportion des oses dans le polyoside R⁻ (D-glucose-D-mannose-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose 1.1.2) est incompatible avec l'existence d'une chaîne latérale de D-glucose Il faut donc attribuer à l'oligoside A_{XII}² la structure

G-(1→4)-GalNAc-(1→3)-Man-(1→4)-G-(1→4)-GalNAc

Oligoside du Groupe II, (A_{XII}^1)₂, R_{Gal} 0 Cet oligoside a été purifié par filtration sur colonne de Biogel P₂ (100-120 mesh). Il est constitué de résidus de D-glucose, D-mannose et 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions voisines de 1,3 1 4. La réduction par le borohydrure de sodium indique qu'un des résidus d'hexosamine est en position terminale réductrice. L'hydrolyse partielle de cet oligoside a fourni les oligosides A_{XII}^2 , A_{XII}^3 , A_{VI}^2 , a_8^5 et A_{II}^{2a} et un oligoside migrant comme a_5^2 . En outre la méthylation par l'iode de méthyle en présence d'hydrure de sodium dans la N,N-diméthylformamide et l'analyse des oses méthylés en c p g sur la phase stationnaire ECNSS-M 3% adsorbée sur du GasChrom Q (100-120 mesh) à 160° a révélé l'existence de 3 pics majeurs correspondant au 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose ou -D-mannose (3,5 min), au 2,4,6-tri-O-méthyl-D-mannose (6,5 min) et au 2,3,6 tri-O-méthyl-D-glucose (8 min).

La libération de l'oligoside A_{XII}² au cours de l'hydrolyse partielle suggère que les deux résidus de galactosamine supplémentaires trouvés dans ce polyoside forment des chaînes latérales. Celles-ci ne peuvent être liées à aucun des deux résidus d'hexose puisqu'ils donnent des dérivés triméthyles après méthylation de l'oligoside, il reste alors la possibilité de 2 embranchements portés par chacun des résidus de D-galactosamine ou d'une seule chaîne latérale contenant 2 résidus de D-galactosamine. En se rapportant aux proportions trouvées dans le polyoside (2-acétamido-2-désoxy-D-galactose-D-glucose-D-mannose 2 1 1) on est amené à conclure à l'existence de deux chaînes latérales, et à attribuer à l'oligoside (A_{XII}²)₂ la structure



La proportion de 1,3 résidu de D-glucose pour 1 résidu de D-mannose serait alors due à la coexistence dans $(A_{XII}^1)_2$ de deux oligosides possédant ou non le résidu de D-glucose terminal non réducteur.

Oligoside du Groupe II, (α_2^3), R_{Gal} 0,79-0,80 Cet oligoside est constitué de D-glucose et de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions 1/1, la réduction entraîne la destruction totale de l'osamine, celle-ci est donc en position terminale réductrice et α_2^3 est un D-glucosyl-2-acétamido-2-désoxy-galactose

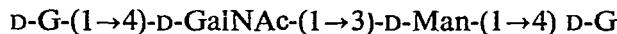
L'oligoside est résistant à l'action de la β -glucosidase. La stabilité de a_2^3 en milieu pyridine à 100° et la faible libération de chromogène au cours de la réaction d'Elson-Morgan effectuée sur le dioside total excluent la possibilité d'une liaison (1→3). Une consommation de 3,87 moles de periodate avec formation de 2,1 moles d'acide formique par mole de dioside est en accord avec la structure.

O-D-glucosyl-(1→6)-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose

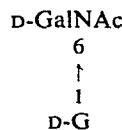
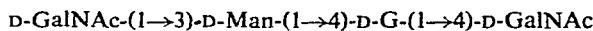
Oligoside du Groupe II, (a_8^5), R_{Gal} ca 0,97. Cet oligoside est formé d'un résidu de D-glucose et d'un résidu de 2 acétamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions 1,1, le résidu de D-galactosamine est en position terminale réductrice. D'autre part ce dioside est retrouvé lors de l'hydrolyse partielle des triosides A_{vi}^2 ou a_4^4 de structure

Man-(1→4)-G-(1→4)-GalNAc Le peu de chromogène libéré par la réaction d'Elson-Morgan effectue sur cet oligoside avant hydrolyse est également en accord avec la structure *O*-D-glucosyl-(1→4)-2-acetamido-2-désoxy-D-galactose

Oligoside du Groupe II, (α_5^2), R_{Gal} ca 0,15 Cet oligoside renferme du D-glucose, du D-mannose et du 2-acetamido-2-désoxy-D-galactose dans les proportions 2 1 1 Un résidu de D-glucose occupe la position terminale réductrice L'hydrolyse partielle de cet oligoside fournit essentiellement le dioside *O*-D-mannosyl-(1→4)-D-glucose, très peu de dioside *O*-D-glucosyl-(1→4)-2-acetamido-2-désoxy-D-galactose et un dioside *O*-D-glucosyl-(1→4)-2-amino-2-désoxy-D-galactose ayant son osamine désacétylée (oligoside A_{VI}^{3b} , Tableau IV) On peut proposer pour cet oligoside la structure



Oligoside du Groupe II, (α_5^1)₂, R_{Gal} 0 Cet oligoside, purifié par filtration sur une colonne de Biogel P₂, est constitué de D-glucose, D-mannose, 2 acetamido-2-désoxy-D-galactose (plus des traces de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose) dans les proportions 2 1 3 La réduction par le borohydrure de sodium montre qu'un des résidus d'hexosamine est en position terminale réductrice L'hydrolyse partielle de cet oligoside a libéré les oligosides A_{XII}^3 , A_{VI}^2 , A_{II}^{2a} et a_2^3 Ces résultats suggèrent pour cet oligoside, en analogie avec l'oligoside (A_{XII}^1)₂ du polyoside R⁻, la structure



La position de la liaison du résidu D-G-(1→6)-D-GalNAc sur l'une ou l'autre des deux galactosamines reste indéterminée

Oligosides du Groupe III, A_{III}^5 , A_{IV}^6 et a_2^4 , R_{Gal} ca 0,97 Ces oligosides sont constitués de D-glucose, 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose et 2-acetamido-2-désoxy-D-glucose dans la proportion de 1 glucose pour 2 osamines Après réduction par le borohydrure de sodium la quantité de D-glucose est inchangée alors qu'on note une disparition presque totale des osamines On peut donc conclure que le résidu de D-glucose n'est pas en position terminale réductrice L'hydrolyse partielle de A_{III}^5 par l'acide sulfurique 0,25M pendant 15 min à 100° donne naissance à 3 composés principaux (A_{III}^5)₁, (A_{III}^5)₂ et (A_{III}^5)₃ séparés en chromatographie sur papier dans le solvant A (Fig 2) L'isolement de ces 3 composés et l'étude de leurs constituants indiquent que (A_{III}^5)₁ est composé de D-glucose et D-galactosamine, (A_{III}^5)₂ de D-glucosamine et D-galactosamine et (A_{III}^5)₃ de D-glucose D'autre part l'analyse en spectrographie de masse de A_{III}^5 perméthylé revèle la nature triosidique de cet oligoside (sortie du pic moléculaire à 709) La liaison entre les résidus de D-glucose et D-galactosamine ne peut être que (1→4) puisque A_{III}^5 a été trouvé dans R⁻ qui ne possède pas de dioside D-G-(1→6)-GalNAc La liaison (1→3), labile en milieu alcalin,

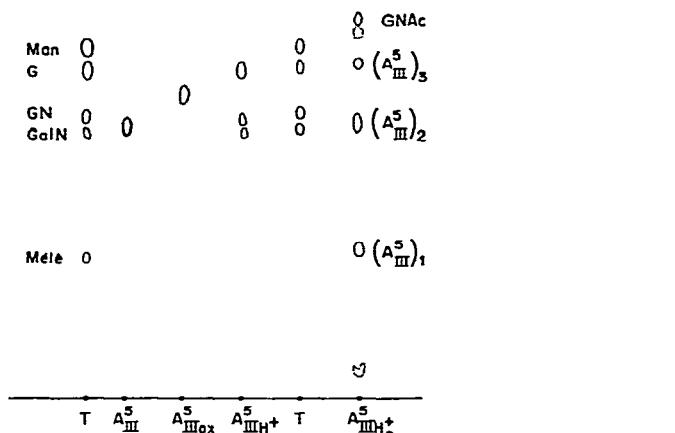


Fig 2 Chromatographie sur papier de l'oligoside A_{III}⁵, A_{III}⁵ oligoside natif, A_{IIIox}⁵ oligoside oxydé par l'acide périodique, A_{MH+}⁵ oligoside hydrolysé par l'acide sulfurique 0,5M pendant 4 h à 100°, A_{III+P}⁵ oligoside hydrolysé par l'acide sulfurique 0,25M pendant 15 min à 100°, T, témoins, Mélè, mélécitose

entre les deux restes d'hexosamines est suggérée par la disparition des deux hexosamines lors de la réduction par le borohydrure de sodium. L'étude cinétique de la consommation de periodate par le trioside A_{III}⁵ montre qu'environ 3 moles de periodate sont consommées par mole d'oligoside. Ceci n'est compatible qu'avec la présence d'un résidu de D-glucosamine sur une chaîne latérale. Ces résultats suggèrent la structure

O-D-glucosyl-(1→4)-[*O*-2-acétamido-2-désoxy-D-glucosyl-(1→3)]-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose

Méthylation des polyosides R⁻ et R⁺ — Les temps de rétention (T_r) des pics (Fig. 3) par c p g des oses méthylés sous forme d'acétates d'alditols sont déterminés par rapport au 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucitol⁴⁴

La méthylation du polyoside R⁻ a fourni le 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose (pic B, T_r 1,29) correspondant au résidu de D-galactose du noyau basal lié (1→6) à un résidu de D-glucose I (Tableau II). Les pics G et H ont des T_r de 3,6–3,8 et 4,02–4,03 correspondant à ceux du 2,4-di-*O*-méthyl-D-glucose (T_r 3,6) et 3,6-di-*O*-methyl-D-glucose (T_r 4,1). Ces résidus trisubstitués correspondent vraisemblablement à ceux de D-glucose I et II du noyau basal (Tableau II). Les pics F et D (T_r respectifs de 2,50 et 1,98–2,08) correspondent aux dérivés triméthylés des oses neutres des chaînes spécifiques, respectivement le 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose (T_r 2,85) et le 2,4,6-tri-*O*-methyl-D-mannose (T_r 1,95) déjà trouvés lors de l'étude de l'oligoside (A_{XII}¹)₂. Toutefois l'intensité très forte du pic F par rapport au pic D laisse supposer que celui-ci renferme également du 3,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose (T_r 2,85). Ces dérivés triméthylés du D-glucose pourraient correspondre aux résidus de D-glucose II (Tableau II) du noyau basal non substitués par les chaînes polyosidiques spécifiques. Le pic C a un

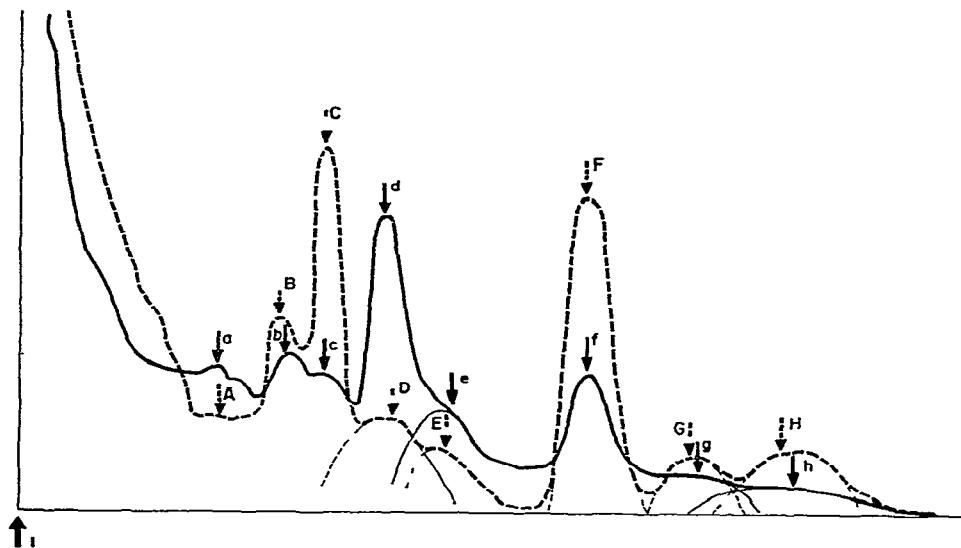


Fig 3 Separation par chromatographie en phase gazeuse des oses méthyles obtenus à partir des hydrolysats des polyosides R^- et R^+ , méthylés suivant la technique d'Hakomori³²⁻³⁴, sous la forme d'alditols acetates Chromatogramme obtenu avec le polyoside R^- (----), avec le polyoside R^+ (- - -); i injection Les pics sont décrits dans Resultats

T_r (1,52) voisin de celui du 2-*O*-méthyl-L-rhamnose (1,6) ou d'un dérivé méthylé du L-glycéro-D-manno-heptose, or le polyoside R^- est riche en heptose (10%) et contient un peu de rhamnose (Tableau I)

Le chromatogramme des dérivés méthylés obtenus du polyoside R^+ révèle deux pics majeurs (d, 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-mannose, T_r 1,98-2,08, f, 2,3,5-tri-*O*-methyl-D-glucose, T_r 2,50) L'intensité faible des pics b, g et h correspond à l'extraction moins importante des oses du noyau basal dans le cas de la souche SJ 5 58 lysogénisée (Tableau I) Le pic mineur a (T_r 1) correspond au 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose (ou -D-mannose) (T_r 1)

La colonne d'adsorbant utilisée en c p g ne permet pas d'identifier les dérivés méthyles des osamines (T_r trop longs)

DISCUSSION

Polyoside R⁻ — Pour la chaîne spécifique de ce polyoside (Schéma I), on retrouve la structure proposée pour l'oligoside (A_{XII}^1)₂, sur laquelle a été ajoutée la ramifications d'un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose trouvé dans les oligosides A_{III}^5 et A_{IV}^6 . Ce résidu étant attaché au C-3 du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose de la chaîne principale, il ne reste plus que le C-6 libre pour fixer la ramification d'un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose

Cette structure rend compte des proportions des oses trouvées dans le polyoside, de la destruction par oxydation périodique des résidus de D-glucose liés aux chaînes

spécifiques des résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, et de la destruction par oxydation périodique de 50% des résidus terminaux non réducteurs de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose. Les liaisons entre les sucres de la chaîne principale, tant de certains oligosides que du polyoside entier, ont été établies par méthylation ou par oxydation périodique ou par les deux procédés. Les liaisons des ramifications restent plus sujettes à caution.

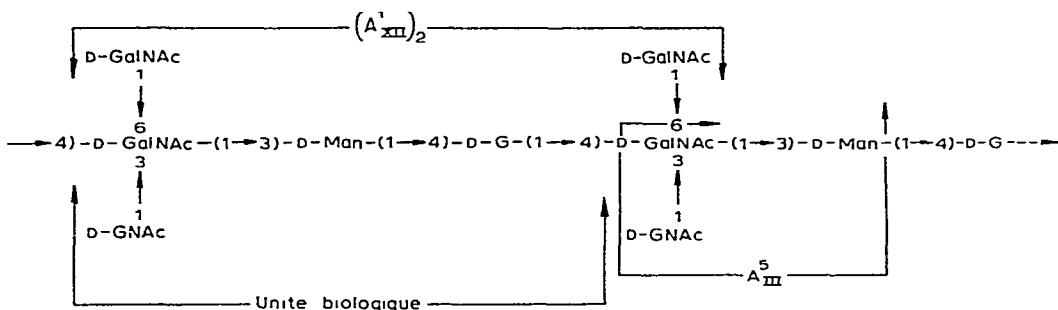


Schéma I

L'absence de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose ou -D-mannose dans l'hydrolysat du polyoside R⁻ perméthylé est en accord avec cette structure; elle suggère de plus que l'extrémité non réductrice des chaînes serait constituée par un résidu de D-galactosamine et que l'unité biologique du polyoside serait constituée par l'oligoside indiqué sur le Schéma I.

La présence d'un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose tétrasubstitué, est inhabituelle. On aurait pu penser que le polyoside R⁻ était constitué de deux populations de macromolécules ayant la même chaîne D-mannosyl-D-glucosyl-(2-acétamido-2-désoxy-D-galactosyle) mais dont l'une possèderait uniquement des ramifications de D-galactosamine et l'autre possèderait uniquement des ramifications de D-glucosamine. Dans cette perspective on devrait avoir deux fois plus de résidus de D-glucose dans les chaînes O spécifiques que de résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, ce qui n'est pas le cas, les proportions étant de 1:1. Le résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose est donc vraisemblablement tétrasubstitué.

Outre ces chaînes spécifiques le polyoside R⁻ contient une forte proportion du noyau basal qui, d'après les résultats de la méthylation, semble identique ou très semblable à celui de *Salmonella* d'autres groupes. Nous ne savons pas à quoi rattacher les très petites quantités de rhamnose trouvées dans ce polyoside, peut-être s'agit-il du rhamnolipide trouvé dans la paroi d'autres bactéries Gram-négatives⁴⁶.

Polyoside R⁺ — On retrouve dans la chaîne spécifique de ce polyoside (Schéma II) la structure de l'oligoside (A₅¹)₂ et celle de l'oligoside A₂⁴. Comme pour le polyoside R⁻, la liaison de la D-glucosamine sur le C-3 de la D-galactosamine présente dans la chaîne principale ne laisse que le C-6 libre pour fixer la seconde ramifications. Cette structure rend compte des proportions des oses trouvées dans le polyoside R⁺, et de la destruction par oxydation périodique des résidus de D-glucose des chaînes spéci-

fiques et de 50 % de ceux de la D-galactosamine (liée en 1→6) Elle n'explique pas la résistance des résidus de D-glucosamine au cours de cette oxydation.

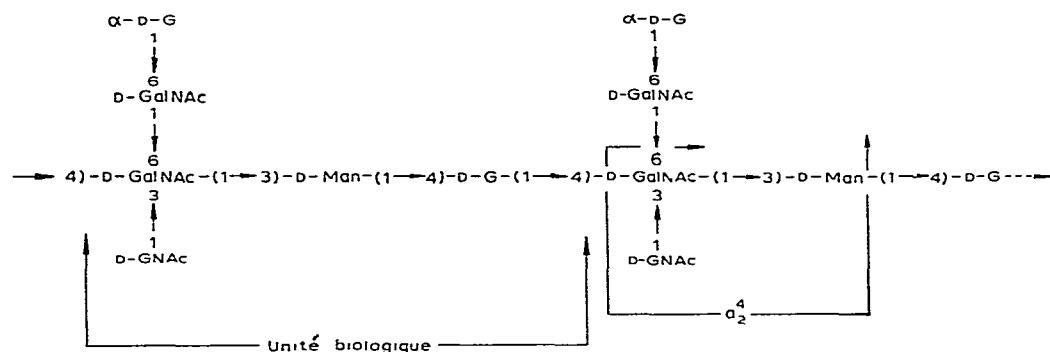


Schéma II

Toutes les liaisons sauf celles qui relient la D-galactosamine de la chaîne principale aux deux osamines des ramifications ont été établies par méthylation ou par oxydation périodique ou par les deux procédés

L'existence d'un 2,3,4,6-tétraméthyl-D-glucose après méthylation du polyoside est en accord avec l'existence d'un résidu de D-glucose terminal non réducteur, absent du polyoside R⁻. Mais on ne s'explique pas la très faible quantité de ce sucre. La configuration α de ce résidu de D-glucose terminal a été précisée lors d'études immunochimiques en cours

La quantité de noyau basal présent dans le polyoside R⁺ est environ deux fois plus faible que dans le polyoside R⁻, on n'y a pas décelé de rhamnose

Comparaison entre les polyosides R⁻ et R⁺ — En rapprochant les résultats trouvés pour les polyosides R⁻ et R⁺ on constate que (a) R⁺ possède un résidu de D-glucose terminal absent de R⁻, (b) R⁺ possède environ moitié moins de noyau basal que R⁻ et (c) le résidu de D-glucosamine présent dans les ramifications de R⁺ n'est pas oxydable par l'ion périodique, à l'opposé du résidu présent dans R⁻

L'addition d'un résidu d' α -D-glucose terminal rappelle les résultats obtenus avec d'autres phages convertisseurs et d'autres *Salmonella*. On remarque en outre que la structure du nouveau dioside terminal O- α -D-glucopyranosyl-(1→6)-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose est très voisine de celle du dioside O- α -D-glucopyranosyl-(1→6)-D-galactose qui porte la spécificité des Facteurs 1 présents sur d'autres *Salmonelles*⁴⁰⁻⁴²

Dans le polyoside R⁺ les oses de la chaîne spécifique représentent environ 60 à 61 %; ils n'en représentent que 29 à 30 % dans le cas du polyoside R⁻. L'hypothèse la plus simple consisterait à penser que le polyoside R⁻ a été extrait à partir d'un mélange de bactéries smooth et rough. Néanmoins, l'absence de précipitation entre ce polyoside et un immunsérum anti-R_{II} semble exclure cette éventualité. Ce polyoside peut alors posséder des chaînes spécifiques plus petites que celles du polyoside R⁺, ou

avoir des chaînes O spécifiques aussi longues mais moins nombreuses. Dans cette éventualité un certain nombre de résidus de D-glucose II (Tableau II) du noyau basal ne devraient pas être substitués par des chaînes spécifiques et l'on devrait, lors de la méthylation du polyoside R⁻, retrouver du 3,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose L'intensité assez forte du pic F (Fig. 3) correspondant à du 3,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose peut faire pencher pour cette hypothèse.

La construction d'un modèle du polyoside R⁺ d'après le Schéma II montre la possibilité d'un rapprochement étroit entre le résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et celui de D-glucose terminal des deux ramifications. La contiguïté des groupes H et OH présents en C-3 et C-4 pourrait expliquer la résistance des résidus de D-glucosamine de R⁺ à l'oxydation périodique. Cette position stéréochimique très particulière pourrait peut-être aussi expliquer la faible intensité du pic de tétra-O-méthyl-D-glucose observé après méthylation du polyoside R⁺. Il faut admettre soit que l'hydrolyse du polyoside méthylique R⁺ a été très incomplète, particulièrement au niveau de la liaison D-G-(1→6)-GalNAc, libérant très peu de D-glucose tétraméthylé, soit que la méthylation du D-glucose n'a été que partielle.

Des études immunochimiques en cours tendent à montrer que le résidu de D-glucose lié à la ramifications de galactosamine (2-acétamido-2-désoxy-D-galactose) pourrait modifier la spécificité immunologique du résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, ce qui serait en faveur de la proximité dans l'espace de ces deux sucres.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame E. Duflot avec qui nous avons réalisé la plupart de ces expériences. Ce travail a été en partie subventionné par la D.G.R.S.T. (Convention N° 67 00 502).

RÉFÉRENCES

- 1 F KAUFFMANN, *Die Bakteriologie der Salmonella Species*, Munksgaard, Copenhague, 1961, p 000
- 2 L LE MINOR, *Ann Inst Pasteur*, 105 (1963) 879
- 3 G G FREEMAN, *Biochem J*, 36 (1942) 340
- 4 A SCHWEIGER, *J Chromatogr*, 9 (1962) 374
- 5 W E TREVELYAN, D P PROCTER ET J S HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 144
- 6 R CONSDEN, A M GORDON ET A J P MARTIN, *Biochem J*, 38 (1944) 224
- 7 L A ELSON ET W T J MORGAN, *Biochem J*, 27 (1933) 1824
- 8 J S SAWARDECKER, J H SLONEKER ET A JEANES, *Anal Chem*, 37 (1965) 1602
- 9 R GIRARD, résultats non publiés
- 10 P S STOFFYN ET R W JEANLOZ, *Arch Biochem Biophys*, 52 (1954) 373
- 11 L KRUGER, O LUDERITZ, J L STROMINGER ET O WESTPHAL, *Biochem Z*, 335 (1962) 548
- 12 W FISCHER ET J ZAPF, *Z Physiol Chem*, 337 (1964) 186, 339 (1964) 54
- 13 N J PALLERONI ET M DOUDOROFF, *J Biol Chem*, 218 (1956) 538
- 14 Z DISCHE ET E BORENFREUND, *J Biol Chem*, 192 (1951) 583
- 15 J J LUDOWIEG ET J D BENMAMAN, *Anal Biochem*, 19 (1967) 80
- 16 J J LUDOWIEG ET J D BENMAMAN, *Carbohydr Res*, 8 (1968) 185
- 17 S GARDELL, *Acta Chem Scand* 7 (1953) 207
- 18 M MONSIGNY, *Bull Soc Chim Biol*, 51 (1969) 1263.
- 19 M J OSBORN, *Proc Nat Acad Sci, U S*, 50 (1963) 499

- 20 A WEISSBACH ET J HURWITZ, *J Biol Chem*, 234 (1959) 705
21 P T MORA ET J W WOOD, *J Amer Chem Soc*, 80 (1958) 685
22 R L. WHISTLER ET D F DURSO, *J Amer Chem Soc*, 72 (1950) 677
23 J DAVY, *Ann Pharm Fr*, 24 (1966) 703
24 M ABDEL-AKHER, J K HAMILTON ET F SMITH, *J Amer Chem Soc*, 73 (1951) 4691
25 H MAYER ET O WESTPHAL, *J Chromatogr*, 33 (1968) 514
26 J M BOBBITT, *Advan Carbohydr Chem*, 11 (1956) 1
27 P FLEURY ET J LANGE, *J Pharm Chim*, 17 (1933) 196
28 G SCHIFFMAN, E A KABAT ET S LESKOWITZ, *J Amer Chem Soc*, 84 (1962) 73
29 R L WHISTLER ET J N BE MILLER, *Advan Carbohydr Chem*, 13 (1958) 289
30 J CONCHIE, J FINDLAY ET G A LEVY, *Biochem J*, 71 (1959) 318
31 R G MAGE ET E A KABAT, *Biochemistry*, 2 (1963) 1278
32 S HAKOMORI, *J. Biochem*, 55 (1964) 205
33 P A SANDFORD ET H E CONRAD, *Biochemistry*, 5 (1966) 1508
34 C G HELLERQVIST, B LINDBERG ET S SVENSSON, *Carbohydr Res*, 8 (1968) 43
35 V E DINER, F SWEET ET R K BROWN, *Can J Chem*, 44 (1966) 5691
36 Z DISCHE, L B SHETTLES ET M OSNOS, *Arch Biochem Biophys*, 22 (1949) 169
37 E A KABAT ET M M MAYER, *Experimental Immunochemistry*, 2^e ed, C Thomas, Springfield, I11, 1961, p 476
38 J L REISSIG, J L STROMINGER ET L F LELOIR, *J Biol Chem*, 217 (1955) 959
39 K KOTELKO, A M STAUB ET R TINELLI, *Ann Inst Pasteur*, 100 (1961) 618
40 O LUDERITZ, A M STAUB ET O WESTPHAL, *Bact Rev*, 30 (1966) 192
41 O LUDERITZ, O WESTPHAL, A M STAUB ET H NIKAIDO, *Microbial Toxins*, 4 (1971) 145
42 M J OSBORN, *Annu Rev Biochem*, 38 (1969) 501
43 C H FISKE ET Y SUBBAROW, *J Biol Chem*, 66 (1925) 375
44 C G LINDBERG, B LINDBERG, S SVENSSON, T HOLME ET A A LINDBERG, *Carbohydr Res*, 9 (1969) 237.
45 A M STAUB ET R GIRARD, *Bull Soc Chim Biol*, 47 (1965) 1245
46 M BURGER, L GLASER ET R M BURTON, *Biochem Biophys Acta*, 56 (1962) 172