

## CONDENSATION DE D-GLYCOSYLAMINES AVEC DES PROTÉINES

ELEMER MOCZAR ET GEORGES VASS

*Laboratoire de Biochimie du Tissu Conjonctif, Faculté de Médecine,  
Université Paris-Val de Marne, 6 rue du Général Sarrail, 94000 Créteil,  
et Institut de Chimie des Substances Naturelles, 91190 Gif-sur-Yvette (France)*

(Reçu le 8 septembre 1975; accepté sous forme révisée le 2 février 1976)

### ABSTRACT

4-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosylamine (lactosylamine),  $\beta$ -D-glucosyl-,  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-galactosyl-, and  $\beta$ -D-mannopyranosylamines were bound to the carbodiimide-activated carboxyl groups of lysozyme. Of the 11 free carboxyl groups of the protein,  $\sim 3$  were substituted by  $\alpha,\beta$ -lactosylamine, and  $\sim 2$  by the monohexosylamines. One of the 4 glycopeptides isolated from the tryptic digest of the lysozyme-lactosylamine conjugate was identical to synthetic 1-*N*-L-leucinoyl-4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosylamine, indicating the substitution of the carboxyl group of the C-terminal leucine residue. The isolation of a glycopeptide containing the aspartic acid residue in position 117 indicates that the second  $\alpha,\beta$ -lactosylamine residue is linked to the carboxyl group of this amino acid. Both of the 2 other glycopeptides contain the same free carboxyl groups (one glutamic and two aspartic acid residues in positions 35, 48, and 52, respectively). The third  $\alpha,\beta$ -lactosylamine residue seems to be linked to one of these carboxyl groups.

### SOMMAIRE

4-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosylamine (lactosylamine) ainsi que les  $\beta$ -D-glucosyl-,  $\alpha$ - et  $\beta$ -D-galactosyl- et  $\beta$ -D-mannopyranosylamines ont été conjuguées avec le lysozyme activé par un carbodiimide. Environ 3 des 11 groupements carboxyliques libres du lysozyme sont substitués dans le dérivé de l' $\alpha,\beta$ -lactosylamine et environ 2 dans les dérivés des monohexosylamines. Quatre glycopeptides ont été isolés à partir de l'hydrolysât tryptique du produit de conjugaison lysozyme-lactosylamine. L'un de ces produits est identique à la 1-*N*-L-leucinoyl-4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosylamine obtenue par synthèse, ce qui indique la conjugaison de la lactosylamine avec le groupement carboxylique du résidu de leucine C-terminal du lysozyme. L'isolement d'un glycopeptide contenant l'acide aspartique en position 117 indique qu'un autre résidu de l' $\alpha,\beta$ -lactosylamine est lié à ce résidu. L'étude de la composition en acide aminés des deux autres glycopeptides indique qu'un troisième résidu de la lactosylamine est lié à un des trois groupements carboxyli-

ques libres des résidus suivants : l'acide glutamique 35 et l'acide aspartique en position 48 et 52.

## INTRODUCTION

Une des méthodes pour obtenir des dérivés glycosylés des protéines consiste à faire réagir des glycosylamines avec des groupements carboxyliques des protéines activées par un carbodiimide hydrosoluble<sup>1-3</sup>. Dans ces composés, les glycannes sont directement liés à la chaîne polypeptidique. Dans cette communication, nous présentons l'étude de la structure des produits de condensation de la 4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranosylamine<sup>4</sup> (1) ainsi que des glycosylamines de quelques hexoses avec le lysozyme activé par un carbodiimide.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons choisi le lysozyme pour ces études parce que sa structure est bien connue et son poids moléculaire peu élevé<sup>5</sup>. Le taux des glucides dans les produits de couplage lysozyme-glycosylamines (Tableau I) indique la substitution en moyenne d'environ 2 des 11 groupements carboxyliques libres du lysozyme<sup>5</sup>. La teneur en oses du lysozyme modifié par conjugaison de  $\alpha$ , $\beta$ -lactosylamine (1) correspond à la

TABLEAU I

PRODUITS DE COUPLAGE DU LYSOZYME AVEC DES GLYCOSYLAMINES

<i>Pyranosylamines</i>	<i>Glycosylamine : lysozyme (mol/mol)</i>
$\beta$ -D-Glucosyl	2,3
$\beta$ -D-Galactosyl	2,2
$\alpha$ -D-Galactosyl (complexe NH <sub>3</sub> )	2,1
$\beta$ -D-Mannosyl	2,3
$\alpha$ , $\beta$ -Lactosyl	3,2
2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosyl (réf. 3)	2,0

TABLEAU II

RÉSIDUS GLYCOSYLES LIÉS AU LYSOZYME EN FONCTION DU pH

<i>pH</i>	<i>Nombre de résidus</i>
3	0,5
3,5	2,0
4	2,2
4,7	2,2
5,5	1,7
5,8	0,8

substitution de 3-4 groupements carboxyliques. Le degré de la substitution des groupements carboxyliques ne change pas en fonction du pH entre pH 3,5 et 5. Pour les autres pH, la baisse de rendement est considérable (Tableau II). L'identité du taux de couplage obtenu en utilisant la  $\beta$ -D-galactosylamine ou le complexe  $\alpha$ -D-galactosylamine-ammoniaque (Tableau I) pourrait être expliqué par l'établissement quasiment instantané de l'équilibre des formes anomériques<sup>6,7</sup> à pH 4,7. La chromatographie sur colonne de Biogel (Fig. 1) ainsi que l'électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium indique qu'environ 80 % de chaque produit de couplage étudié restent sous forme de monomères. La formation de 20 % de dimères pourrait être attribuée à la réaction des groupements carboxyliques activés avec des groupements aminés libres d'une autre molécule de protéine, conduisant à un pontage intermoléculaire par liaisons peptidiques.

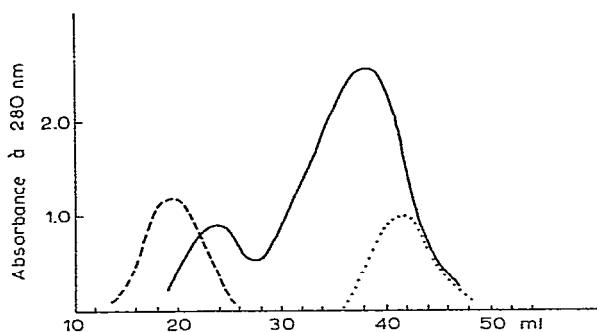


Fig. 1. Chromatographie d'exclusion de 2 sur colonne de Biogel P-60. Éluant : acide acétique 0,2M; ———, enregistrement continu de l'absorbance de l'éluat à 280 nm; calibration de la colonne : - - - -, pepsine (p. mol. 35.000), ..... , lysozyme (p. mol. 14.000).

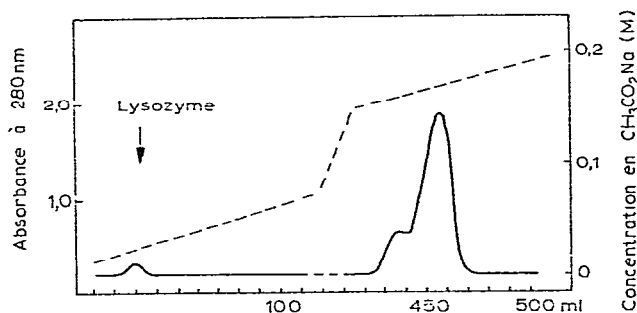
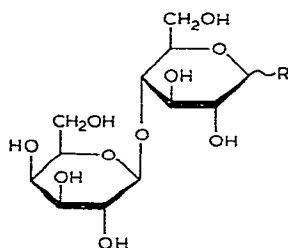


Fig. 2. Chromatographie de 2 sur colonne de carboxyméthylcellulose (Whatman CM 52) (20 × 2,5 cm); élution : gradient linéaire d'acétate de sodium 0,01-0,2M, pH 5,5; enregistrement continu de l'absorbance à 280 nm; - - - -, concentration en acétate de sodium.

Étant donné la teneur élevée en oses du produit de couplage (2) du lysozyme et de 1, nous nous sommes concentrés sur l'étude de ce produit. Purification de 2

brut sur une colonne de carboxyméthylcellulose donne un pic principal (80%) (Fig. 2). La carte peptidique réalisée à partir de l'hydrolysats tryptique de **2** est différente de celle du lysozyme<sup>2</sup>. La tache correspondant au résidu de leucine en position C-terminale est absente de la carte peptidique de **2**, ce qui indique la substitution quantitative du groupement carboxylique C-terminal au cours de la réaction de couplage<sup>2</sup>. Sur l'électrophorégramme<sup>2</sup> des peptides tryptiques sur plaque de silice, on retrouve quatre taches correspondant aux glycopeptides. La mobilité électrophorétique et chromatographique du glycopeptide dont la migration anodique est la plus élevée est indentique à celle de **4** obtenu par synthèse [ $R_{Lac}$  1,1 (butanol-acide acétique-eau, 12:3:5, v/v) et 1,3 (pyridine-acétate d'éthyle-acide acétique-eau, 5:5:1:3, v/v)]. Dans l'hydrolysats acide du produit isolé par électrophorèse on a mis en évidence par c.c.m. la présence de D-glucose, D-galactose et de L-leucine.



1  $R = NH_2$

2  $R = NHCO\text{-lysozyme}/n$

3  $R = NHCO\overset{H}{\underset{NHCBz}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

4  $R = NHCO\overset{H}{\underset{NH_2}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

5  $R = NHAc$

Pour établir la configuration de la liaison glucosylamine dans **3** et **4**, nous avons calculé<sup>8,9</sup> les pouvoirs rotatoires moléculaires des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de **3** et de **4** en prenant pour base les pouvoirs rotatoires moléculaires des anomères de la *N*-acétyllactosylamine<sup>10,11</sup> (**5**), du *N*-carbobenzyloxy-L-leucylamide<sup>12</sup> et de la L-leucine<sup>13</sup>. Les valeurs observées sont assez proches de la valeur calculée pour la forme  $\beta$  de **3** et de **4**, ce qui est en faveur de la liaison  $\beta$  dans les deux produits synthétisés (Tableau III).

Le spectre de r.m.n. du  $^{13}\text{C}$  de **3** a été interprété à l'aide des spectres de la L-leucine<sup>14,15</sup> et du méthyl- $\beta$ -lactoside<sup>16</sup>. On retrouve les signaux correspondant aux atomes de carbone des résidus du D-galactose [ $\delta$  103,7 (C-1), 71,81 (C-2), 73,18 (C-3), 75,51 (C-4), 76,36 (C-5), 60,38 p.p.m. (C-6)] et du D-glucose [ $\delta$  80,59 (C-1), 68,11 (C-2), 75,58 (C-3), 79,42 (C-4), 75,58 (C-5), 60,58 p.p.m. (C-6)] pratiquement

TABLEAU III

ROTATION MOLÉCULAIRE DE 3 ET DE 4 COMPARÉE À LA SOMME  
DE LA ROTATION MOLÉCULAIRE DES CONSTITUANTS

Composés	$[\phi]_D^{20}$ (°)
5, forme $\alpha$ (réf. 10)	+274
5, forme $\beta$ (réf. 11)	+5,8
<i>N</i> -Carbobenzyloxy-L-leucinamide <sup>12</sup>	-31,9
L-Leucine <sup>13</sup>	+21,9
3, forme $\alpha$ , calculée	+242,1
3, forme $\beta$ , calculée	-26,1
3, mesurée	+35,2
4, forme $\alpha$ , calculée	+295,9
4, forme $\beta$ , calculée	+27,7
4, mesurée	-27,2

aux mêmes fréquences que celles du méthyl- $\beta$ -lactoside (D-galactose:  $\delta$  104,1 (C-1), 72,1 (C-2), 73,9 (C-3), 69,8 (C-4), 76,4 (C-5), 62,1 (C-6); D-glucose:  $\delta$  104,1 (C-1), 73,4 (C-2), 75,9 (C-3), 79,8 (C-4), 75,6 (C-5), 61,4 p.p.m. (C-6)], excepté pour C-1 et C-2 du résidu de D-glucose. Ce déplacement est dû à la présence du substituant lié à C-1. L'identité de déplacement chimique de C-3 et C-5 du résidu de D-glucose de 3 et du méthyl- $\beta$ -lactoside est en accord avec une liaison C-1-N de configuration  $\beta$ . En effet, dans le cas d'une liaison  $\alpha$ , C-3 et C-5 devraient résonner à un champ plus fort (entre 72 et 74 p.p.m.) comme dans le spectre du méthyl- $\beta$ -D-glucoside<sup>17</sup> à cause de l'interaction 1,3-diaxiale due au substituant axial en position 1. On peut donc conclure à la formation de liaisons  $\beta$ -D-glycosylamines avec le groupe carboxylique C-terminal du lysozyme. Ce résultat suggère que deux autres résidus de lactosylamine, sur le groupement carboxylique de l'acide aspartique ou éventuellement sur celui de l'acide glutamique, doivent être liés également par une liaison  $\beta$ -D-glycosylamine.

Dans le but d'étudier les trois autres glycopeptides observés sur l'électrophorégramme<sup>2</sup>, l'hydrolysats trypsique de 2 a été soumis à une chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-15. Le pic exclu renferme environ 80 % des hexoses présents. Les fractions réunies correspondant à ce pic ont été soumises à une chromatographie sur colonne de résine Aminex A5 (Fig. 3). L'étude de la composition en acides aminés des trois glycopeptides majeurs obtenus de cette colonne (Pics 1, 2 et 3) a permis de localiser les autres groupements carboxyliques liés à la lactosylamine, par comparaison aux peptides obtenus par digestion trypsique de lysozyme non-modifié<sup>5</sup>. La composition en acides aminés (Tableau IV) du Pic 2 correspond au peptide trypsique T<sub>15-16</sub> du lysozyme<sup>5</sup>. Le seul acide aminé dans ce peptide ayant un groupement carboxylique libre est l'acide aspartique en position 117. Le deuxième résidu de lactosylamine est donc lié à ce groupement. La composition en acides aminés des glycopeptides (Tableau III) provenant des Pics 1 et 3 (Fig. 3) indique qu'ils renferment un segment assez long de la chaîne peptidique, à proximité du groupement N-terminal. Leur composition indique que le Pic 1 correspond aux

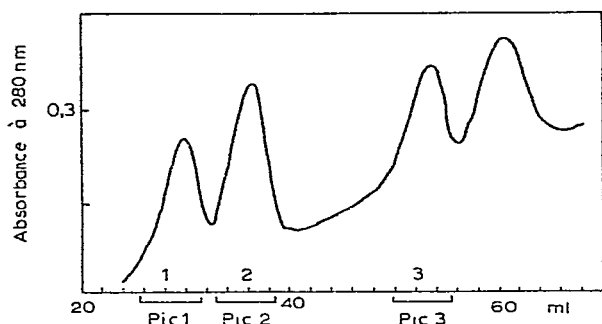


Fig. 3. Chromatographie de la fraction exclue de la colonne de Sephadex G-15 sur une colonne de résine Aminex A5 ( $20 \times 1$  cm); élution : gradient linéaire d'acétate de pyridine [de 0,2M (pH 3,1) à 2,0M (pH 5,0)]; —, absorbance à 280 nm. Des fractions de 1,0 ml ont été recueillies.

TABLEAU IV

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES<sup>a</sup> SÉPARÉS SUR RÉSINE AMINEX A5

Acide aminés (résidus)	Peptides					
	Pic 1	T <sub>6-7-8</sub>	Pic 2	T <sub>15-16</sub>	Pic 3	T <sub>5-6-7-8</sub>
Acide aspartique	7,5	8	0,95	1	9,2	10
Thréonine	3,6	4	0,9	1	3,5	4
Sérine	3,5	4	0,8	1	3,5	4
Acide glutamique	3,1	3	1,05	1	3,0	3
Glycine	4,2	4	0,2	0	4,1	4
Alanine	3,1	3	1,0	1	2,9	3
Valine	1	1	1	1	1	1
Isoleucine	2,1	2	0,95	1	1,9	2
Leucine	1,8	2	0,1	0	3,1	3
Tyrosine	1,7	2	—	0	2,5	2
Phénylalanine	2,1	2	0,1	0	2,2	2
Lysine	1,1	1	0,9	1	0,9	1
Histidine	0	0	0	0	0,8	1
Arginine	1,8	2	0	0	2,7	3
Tryptophane <sup>b</sup>		1		1		1

<sup>a</sup>Les glycopeptides ont été obtenus à partir de 2 et du lysozyme selon Canfield et Anfinsen<sup>5</sup>; les pics correspondent à ceux qui sont indiqués dans Fig. 3. <sup>b</sup>La teneur en tryptophane n'a pas été déterminée pour 2.

peptides tryptiques T<sub>6-8</sub>, tandis que le Pic 3 doit renfermer le segment du lysozyme correspondant aux peptides<sup>5</sup> T<sub>5-8</sub>. Dans ces peptides on retrouve trois groupements carboxyliques: un du résidu d'acide glutamique en position 35 et deux des résidus d'acide aspartique en positions 48 et 52. Le troisième résidu de la lactosylamine est donc lié à un de ces trois groupements carboxyliques. La cause de la résistance de cette région de la chaîne protidique de 2 à la digestion tryptique n'a pas été étudiée en détail.

Les résultats obtenus indiquent que la vitesse de réaction de certains groupe-

ments carboxyliques du lysozyme par la lactosylamine est plus élevée que celle des autres groupements, même en solution de chlorure de guanidinium 5M, où la molécule de protéine est presque entièrement dépliée<sup>18</sup>. Nous pensons que les protéines modifiées par des résidus de glycosylamines permettront une étude plus approfondie du rôle physiologique des chaînes glucidiques des glycoprotéines.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Méthodes.* — La carboxyméthylation des produits de condensation a été effectuée comme décrit par Butler *et al.*<sup>20</sup>. La digestion trypsique a été effectuée<sup>5</sup> dans du carbonate d'ammonium 0,5M. L'électrophorèse des peptides ainsi que les cartes peptidiques ont été réalisées sur couche mince de silice (Selecta 1500 de Schleicher et Schüll) et les glycopeptides ont été révélés par le réactif orcinol-acide sulfurique<sup>21</sup>. La séparation préparative des peptides tryptiques a été effectuée dans une première étape sur colonne de Sephadex G-15; le pic exclu, la fraction la plus importante renfermant des hexoses, a été soumis à une chromatographie sur échangeur de cations Aminex A5 à 50° utilisant un gradient d'acétate de pyridine pour l'élution<sup>22</sup> et les peptides ont été détectés par l'acide 2,3,5-trinitrobenzènesulfonique<sup>23</sup> et par la mesure de l'absorbance à 280 nm (Fig. 3). L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium a été réalisée suivant Weber et Osborne<sup>24</sup>. La méthode à l'orcinol a été utilisée pour le dosage des hexoses<sup>19</sup> qui ont été identifiés par chromatographie sur couche mince sur feuilles Kodak Chromagram V511<sup>25</sup> et sur cellulose (Selecta 1440). L'analyse des acides aminés a été réalisée à l'aide de l'auto-analyseur Technicon TSM1.

Les pouvoirs rotatoires ont été pris sur un Quick Polarimètre Roussel-Jouan et les points de fusion sur un bloc Maquenne (Prolabo). Le pouvoir rotatoire moléculaire a été calculé suivant une variante de la méthode de Klyne<sup>8</sup>. Le spectre r.m.n. du <sup>13</sup>C a été enregistré en solution dans le diméthyl sulfoxyde-*d*<sub>6</sub> sur un spectromètre Bruker HX 90E muni d'une transformée de Fourier. Les déplacements chimiques exprimés en p.p.m. sont donnés par rapport au tétraméthylsilane. Le spectre de masse a été pris sur un spectroscopie SM9 (fabrication AEI).

*Condensation du lysozyme avec des D-glycosylamines.* — Les glycosylamines du D-glucose, du D-galactose et du D-mannose ont été préparées comme décrit par Frush et Isbell<sup>6</sup>; la lactosylamine par Micheel *et al.*<sup>4</sup>. On dissout le lysozyme (10 mg) (3 × crist., Sigma Chem. Co., St-Louis, MO) et la glycosylamine (0,8 mmol) dans une solution de chlorure de guanidinium 5M (1 ml). On ajoute sous agitation à la température ambiante le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (20 mg) (Ott Chem. Co., Muskegon, MI). Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'acide chlorhydrique 3M et maintenu à cette valeur à l'aide d'un pH-stat (Radiometer, Copenhague). La consommation d'acide est terminée après 60–100 min. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre une solution d'acide chlorhydrique mM, puis contre de l'eau distillée.

Le pH optimum pour la condensation a été déterminé par la condensation de la β-D-glucosylamine et du lysozyme (dans les conditions décrites ci-dessus), en

faisant varier le pH de la réaction entre 3,0 et 5,8. La teneur en hexose des produits de la réaction a été déterminée par la méthode à l'orcinol<sup>19</sup> (Tableau II).

Le produit de condensation du lysozyme et de **1** a été purifié par chromatographie sur une colonne de Biogel P-60 (80 × 1 cm) avec élution par l'acide acétique à 2 % (Fig. 1), ou par chromatographie sur colonne (20 × 2,5 cm) de carboxyméthylcellulose (Whatman CM 52) éluee par un gradient linéaire d'une solution tampon d'acétate de sodium d'une force ionique de 0,01–0,2M (pH 5,5) à 4° (Fig. 2).

*1-N-(N-Carbobenzyloxy-L-leucinoyl)-4-O-β-D-galactopyranosyl-D-glucopyransylamine (3).* — On dissout la *N*-carbobenzyloxy-L-leucine (0,8 g) dans le méthanol aqueux à 50 % (20 ml). On ajoute **1** (2,0 g) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)carbodiimide (0,7 g). Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'acide chlorhydrique et maintenu à cette valeur pendant 2,5 h. Le mélange réactionnel est dilué par le méthanol à 50 % (100 ml), les ions sont éliminés par échangeur d'anions et de cations [Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>) et 45 (OH<sup>-</sup>)], la solution est évaporée à sec sous vide et le résidu est repris par le méthanol à 30 % (10 ml). Le lactose formé par l'hydrolyse de **1** est éliminé par chromatographie sur colonne (4 × 80 cm) de Sephadex G-15. La colonne est éluee avec eau-méthanol-acide acétique-pyridine 89:9:1:1 (v/v). On obtient deux pics contenant les fractions renfermant les hexoses repérées à l'aide du réactif à l'orcinol. Les fractions réunies du pic retardé sont évaporées à sec sous vide; on obtient une substance (0,5 g) chromatographiquement pure (*R*<sub>Lac</sub> 3,6 sur couche mince de silice, développée par butanol-acide acétique-eau 12:3:5, v/v). On recristallise dans eau-méthanol (9:1, v/v), p.f. 205°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 7,5° (c 1, méthanol-eau 1:1); s.m. du produit peracétylé (pyridine-anhydride acétique, 1:1, v/v, 24 h, 20°): 882 (M<sup>+</sup>), 826 (M<sup>+</sup> – 56), 747 (M<sup>+</sup> – 135), 535 (M<sup>+</sup> – 347).

*Anal.* Calc. pour C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>13</sub>N<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 51,50; H, 6,98; N, 4,62. Trouvé: C, 51,20; H, 6,93; N, 4,44.

*1-N-L-Leucinoyl-4-O-β-D-galactopyranosyl-β-D-glucopyranosylamine (4).* — Une solution de **3** (200 mg) dans méthanol-acide acétique-eau (20:3:2, v/v, 25 ml) est hydrogénée en présence de charbon palladié à 5 % (60 mg), pendant 3 h à la température ambiante. On recristallise dans l'éthanol à 95 % (rdt. 60 mg), p.f. 220° (déc., brunissement à 190°), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> – 6° (c 1, eau).

*Anal.* Calc. pour C<sub>18</sub>H<sub>2</sub>O<sub>11</sub>N<sub>3</sub>·0,5H<sub>2</sub>O: C, 47,75; H, 7,26; N, 6,05. Trouvé: C, 46,55; H, 7,42; N, 5,85.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec l'aide du C.N.R.S. (ER N° 53), de l'I.N.S.E.R.M. (ATP 2) et de la D.R.M.E. Nous tenons à remercier M<sup>lle</sup> A. Sepulchre et Mr. B. Das pour leur aide dans l'interprétation des spectres r.m.n. et des spectres de masse, ainsi que Mr. J. Leboul pour la correction du texte. Nous remercions également Mr. S. D. Gero qui a mis à notre disposition les appareils de son laboratoire.



## RÉFÉRENCES

- 1 J. C. WRISTON, JR., *FEBS Lett.*, 33 (1973) 93-95.
- 2 E. MOCZAR, *Experientia*, 29 (1973) 1576-1577.
- 3 E. MOCZAR ET J. LEBOUL, *FEBS Lett.*, 50 (1975) 300-302.
- 4 F. MICHEEL, R. FRIER, E. PLATE ET A. HILLER, *Chem. Ber.*, 85 (1952) 1092-1096.
- 5 R. CANFIELD ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2691-2697.
- 6 H. L. FRUSH ET H. S. ISBELL, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 47 (1951) 239-247.
- 7 H. S. ISBELL ET H. J. FRUSH, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 1309-1319.
- 8 W. KLYNE, *Biochem. J.*, 47 (1960) xli.
- 9 W. A. BONNER, M. J. KUBITSCHKE ET R. W. DRISKO, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5082-5086.
- 10 R. A. CADENAS ET J. O. DEFERRARI, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 1072-1075.
- 11 R. KUHN ET G. KRÜGER, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1544-1547.
- 12 F. WEYGAND ET F. STEGLICH, *Chem. Ber.*, 93 (1960) 2983-3005.
- 13 E. FISCHER ET O. WARBURG, *Ber.*, 38 (1905) 3997-4005.
- 14 W. J. HORSLEY, H. STERNLICHT ET J. S. COHEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 92 (1970) 680-686.
- 15 W. VOELTER, G. JUNG, E. BREITMAYER ET E. BAYER, *Z. Naturforsch. Teil A*, 26 (1971) 213-222.
- 16 D. E. DORMAN ET J. D. ROBERTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (1971) 4463-4472.
- 17 A. S. PERLIN, B. CASU ET H. J. KOCH, *Can. J. Chem.*, 48 (1970) 2596-2606.
- 18 C. TANFORD, K. C. ANNE ET A. IKAI, *J. Mol. Biol.*, 15 (1966) 489-504.
- 19 C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 931-940.
- 20 P. BUTLER, J. L. HARRIS, B. S. HEARTLEY ET R. LEBERMAN, *Biochem. J.*, 112 (1969) 679-689.
- 21 E. MOCZAR, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 417-424.
- 22 L. HILL ET R. DELANEY, *Methods Enzymol.*, 9 (1967) 339-361.
- 23 K. SATAKE, T. OKUYAMA, M. OHASHI ET T. SHINODA, *J. Biochem. (Tokyo)*, 47 (1959) 654-660.
- 24 K. WEBER ET M. OSBORNE, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4406-4412.
- 25 E. MOCZAR ET M. MOCZAR, dans K. NIEDERWIESER ET G. PATAKI (Eds.), *Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods*, Ann Arbor-Humphrey, Londres, 1970, pp. 169-194.