

## KURZE MITTEILUNGEN

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht  
Es werden auch Manuskripte aus dem Auslande angenommen

## L'inhibition de la croissance bactérienne par la S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine. Rôle privilégié des dipeptides ayant la lysine ou son analogue en position N-terminale\*

Depuis la découverte de WOODS<sup>1</sup>, que l'action inhibitrice des sulfonamides était due au fait qu'elles agissaient comme analogues de structure de l'acide *p*-amino-benzoïque, l'emploi des antimétabolites, parmi lesquels nous ne citons que les anti-vitamines, anti-acides aminés et anti-pyrimidines, est devenu chose courante en biochimie expérimentale. Le rôle de la lysine en nutrition étant un des sujets de recherches de notre laboratoire, notre intérêt s'est porté également sur les antagonistes éventuels de la lysine. Parmi ces derniers, la S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine nous a paru susceptible d'avoir une action anti-lysine à cause de la ressemblance structurelle très grande de ces deux acides aminés (fig. 1). La S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine a été préparée pour la première fois par CAVALLINI<sup>2</sup> en 1955 par couplage direct de la cys-

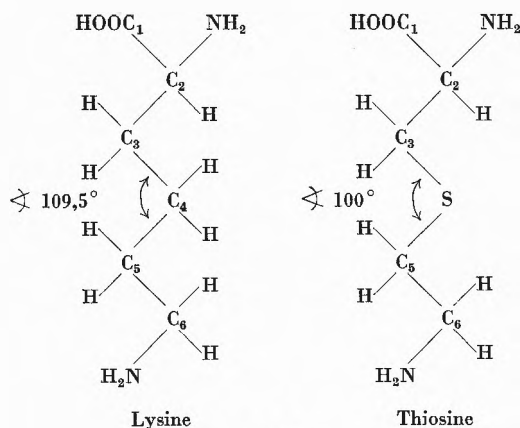


Fig. 1

téine et de la 2-bromoéthylamine et l'hypothèse avait été formulée que cet acide aminé soufré pourrait être un intermédiaire possible lors de la synthèse *in vivo* du coenzyme A. En 1956 LINDLEY<sup>3</sup> montra que la S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine dans une chaîne polypeptidique remplissait les conditions de spécificité pour l'hydrolyse de la liaison peptidique par la trypsine et l'année sui-

vante FOLK<sup>4</sup> trouva qu'il en était de même pour la carboxypeptidase-B. En 1959, enfin, nous avons trouvé que la S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine était décarboxylée par la lysine-décarboxylase du *Bacterium cadaveris*. Ces premiers résultats montraient ainsi que la S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine pouvait fonctionner comme analogue de structure de la lysine lors de la protéolyse et de la décarboxylation. Aurait-elle la même action sur l'utilisation de la lysine par un microorganisme ?

Deux microorganismes furent utilisés pour cette recherche, le *Leuconostoc mesenteroides* P-60, qui a besoin d'une source de lysine exogène et le *Lactobacillus plantarum* 17-5, qui peut faire la synthèse de la lysine<sup>5</sup>. Le *Leuconostoc mesenteroides* était cultivé sur le milieu de BARTON-WRIGHT<sup>6</sup> et le *Lactobacillus plantarum* sur celui de DUNN<sup>7</sup>, tous deux évidemment sans lysine. Des quantités de lysine et de S-( $\beta$ -aminoéthyl)-cystéine ainsi que de leurs peptides variant de 0,5 à 25  $\mu$  moles/3 ml furent utilisées. La croissance bactérienne était mesurée par turbidimétrie après 23 heures d'incubation à 37 °C.

La S-( $\beta$ -aminoéthyl)-L-cystéine, appelée dorénavant L-thiosine, a été synthétisée selon LINDLEY<sup>8</sup> en couplant la CBZ (carbobenzoxy)-iodoéthylamine avec la L-cystéine. Le groupe carbobenzoxy a été enlevé par l'acide bromhydrique, puis l'acide aminé libre, préparé par passage du bromhydrate sur Amberlite IR 4, a été reconverti en chlorhydrate.

Pour préparer la glycyl-L-thiosine, l' $\epsilon$ -CBZ-L-thiosine a été estérifiée avec l'alcool benzylique en présence d'acide polyphosphorique, puis l'ester benzylique couplé avec la CBZ-glycine en présence d'isobutylchlorocarbonate selon la méthode des anhydrides mixtes. Par traitement du peptide protégé avec l'acide bromhydrique on obtient la glycyl-L-thiosine  $\cdot 2\text{HBr}$ , utilisée directement pour le test microbiologique. La L-thiosyl-glycine a été préparée d'une manière analogue, en couplant la  $\alpha, \epsilon$ -di-CBZ-L-thiosine avec l'ester benzylique de la glycine. Les détails de l'expérimentation paraîtront ailleurs<sup>9</sup>.

<sup>4</sup> F. TIETZE, J. A. GLADNER et J. E. FOLK, *Biochim. Biophys. Acta* 26 (1957) 659.

<sup>5</sup> T. SHIOTA, J. E. FOLK et F. TIETZE, *Arch. Biochem. Biophys.* 77 (1958) 372.

<sup>6</sup> E. C. BARTON-WRIGHT, *Analyst* 71 (1946) 267.

<sup>7</sup> M. S. DUNN, M. N. CAMIEN et S. SHANKMAN, *J. Biol. Chem.* 161 (1945) 657.

<sup>8</sup> H. LINDLEY, *Austral. J. Chem.* 12 (1959) 296.

<sup>9</sup> T. SHIOTA, J. MAURON et J. E. FOLK, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.

\* Note préliminaire. Communication présentée aux VI<sup>es</sup> Journées Biochimiques Latines à Genève, 25-28 mai 1961.

<sup>1</sup> D. D. WOODS, *Brit. J. Exper. Pathol.* 21 (1940) 74.

<sup>2</sup> D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVI et G. F. AZZONE, *Experientia* 11 (1955) 61.

<sup>3</sup> H. LINDLEY, *Nature* 178 (1956) 647.

## Résultats

### 1. Avec *Leuconostoc mesenteroides*

A des doses croissantes de lysine, glycyllsine et lysyl-glycine nous avons ajouté des doses croissantes de thiosine, glycyllthiosine et thiosylglycine. La concentration d'inhibiteur nécessaire à l'arrêt total de la croissance fut déterminée. L'index d'inhibition n'est alors rien d'autre que le rapport entre cette concentration de l'inhibiteur et la concentration en lysine ou peptides de lysine. Une valeur constante de cet index pour des concentrations variables de métabolite indique qu'il s'agit d'un antagonisme dit compétitif, où le métabolite et l'antimétabolite sont en compétition pour le même site actif d'un enzyme.

Les résultats mentionnés au tableau 1 montrent qu'il existe un antagonisme compétitif très net entre la lysine et la thiosine ainsi qu'entre les dipeptides de la lysine et de la thiosine. En effet, l'index d'inhibition reste constant pour des concentrations de métabolite allant de 1 à 50.

Tableau 1: Inhibition de la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* par la thiosine

Concentration lysine ou peptides	Index d'inhibition			
	$\mu\text{m}/3 \text{ ml}$	L-thiosine	Glycyl-L-thiosine	L-thiosyl-glycine
L-lysine	0,5	2,0	1,0	0,80
	5,0	1,0	1,0	0,40
	10,0	1,0	1,0	0,20
	25,0	—	1,0	0,32
Glycyl-L-lysine	0,5	30,0	1,0	0,80
	5,0	20,0	1,0	0,80
	10,0	30,0	2,0	0,40
	25,0	—	3,0	0,32
L-lysyl-glycine	0,5	30,0	5,0	1,60
	5,0	20,0	2,0	0,80
	10,0	30,0	1,0	0,80
	25,0	—	1,0	0,80

Signalons, cependant, que l'index d'inhibition est plus élevé pour les peptides de la lysine que pour la lysine elle-même. En d'autres termes, en présence de thiosine, les dipeptides de la lysine sont une source plus efficace de lysine pour le *Leuconostoc mesenteroides* que la lysine libre et ceci quelle que soit la position de la lysine (N ou C-terminale) dans le dipeptide. C'est là une indication, que le mécanisme d'utilisation de l'acide aminé n'est pas exactement le même que celui des dipeptides, ce qui serait confirmé par le fait que les peptides de la lysine perdent leur supériorité en présence des peptides de la thiosine. Vu que les peptidases intracellulaires annuleraient assez vite l'effet «peptide», nous pensons que c'est au niveau de l'absorption dans la cellule que l'acide aminé et les dipeptides sont transportés soit par des mécanismes différents, soit à des vitesses différentes.

Tableau 2: Inhibition de la croissance de *Lactobacillus plantarum* par la thiosine

Concentration lysine ou peptides	Index d'inhibition			
	$\mu\text{m}/3 \text{ ml}$	L-thiosine	Glycyl-L-thiosine	L-thiosyl-glycine
L-lysine	0,5	2,0	10,0	1,6
	5,0	2,0	10,0	0,4
	10,0	5,0	5,0	0,2
	25,0	—	10,0	0,3
Glycyl-L-lysine	0,5	20,0	5,0	1,6
	5,0	> 40,0	10,0	0,4
	10,0	> 20,0	5,0	0,4
	25,0	—	10,0	0,3
L-lysyl-glycine	0,5	> 300	> 250	8,00
	5,0	—	—	4,00
	10,0	—	—	4,00
	25,0	—	—	4,00
Glycyl-L-lysyl-glycine	0,5	> 300	> 250	4,00
	5,0	—	—	0,40
	10,0	—	—	0,80
	25,0	—	—	0,32

### 2. Avec *Lactobacillus plantarum* (tableau 2)

Avec cet organisme, qui n'a pas besoin d'une source exogène de lysine, l'index d'inhibition est basé sur la quantité d'inhibiteur qui provoque une réduction de la croissance de 50%.

Nous retrouvons ici d'une manière générale l'inhibition de la lysine par la thiosine, mais l'effet «peptide» est encore plus prononcé. Ainsi la glycyllsine n'est que peu inhibée par la thiosine, mais environ quatre fois plus par la glycyllthiosine. Cette dernière est d'autre part moins efficace contre la lysine que la thiosine.

L'acide aminé inhibe donc de préférence l'acide aminé et le dipeptide le dipeptide.

Un fait nouveau apparaît cependant avec le *Lactobacillus plantarum*: la glycyllsine et la lysylglycine ne sont plus équivalentes. Ainsi la lysylglycine ne peut plus être inhibée du tout par la thiosine ou même par la glycyllthiosine, tandis que la glycyllsine l'est. Quant au tripeptide glycyll-lysyl-glycine il se comporte comme la lysylglycine, il semble donc être hydrolysé en glycine + lysylglycine.

Si nous comparons maintenant la glycyllthiosine et la thiosylglycine nous constatons qu'elles diffèrent aussi fondamentalement, puisque seule la thiosylglycine est capable d'inhiber tous les métabolites testés, tandis que la glycyllthiosine est inopérante sur la lysylglycine.

Ainsi, le peptide-métabolite avec la lysine en position N-terminale est le plus résistant aux inhibiteurs et le peptide antagoniste avec la thiosine en même position N-terminale est le plus puissant inhibiteur. De toute évidence la position N-terminale de la lysine et de son analogue est privilégiée dans les dipeptides.

Il semble donc bien que sous cette forme «lysyl» la lysine soit utilisée de préférence par le *Lactobacillus plantarum*. Ce ne sont là pour l'instant que des constatations qu'il n'est pas possible de grouper parfaitement en une hypothèse valable sur l'utilisation de la lysine par ces microorganismes. Signalons, cependant, que nos résultats sont compatibles avec la théorie assez bien étoffée de SNELL<sup>10</sup>, selon laquelle le transport des acides aminés libres et des peptides à travers la paroi cellulaire se fait par des mécanismes différenciés.

Il est possible que pour le *Lactobacillus plantarum* l'antagonisme constaté intervienne également au niveau intracellulaire, lors de l'incorporation de la lysine dans les protéines. On aboutirait ainsi au schéma représenté à la figure 2.

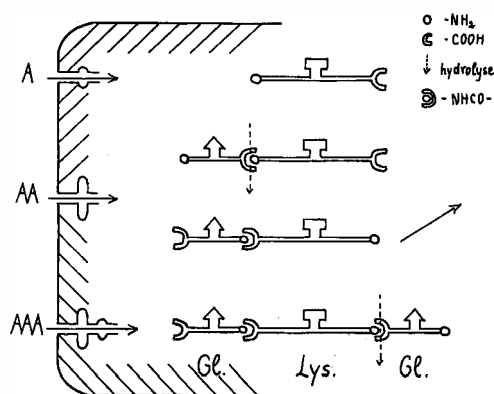


Fig. 2

La première phase de l'utilisation des acides aminés se situerait à l'entrée de la cellule, à travers laquelle le transport serait sélectif. Nous avons admis trois méca-

<sup>10</sup> F. R. LEACH et E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3523.

nismes différents pour le passage de la paroi cellulaire, un pour les acides aminés, A, un pour les dipeptides, AA, et un pour les tripeptides, AAA. Ceci expliquerait l'effet «peptide» général constaté tout au long de ce travail, effet qui ne dépend pas de la structure du dipeptide. Une fois à l'intérieur de la cellule, les liaisons peptidiques seraient rapidement hydrolysées par les peptidases intracellulaires, sauf certaines liaisons privilégiées, utilisées directement pour la synthèse protéique, selon un mécanisme de transpeptidation<sup>11</sup> par exemple. La liaison «lysyl» serait une telle liaison privilégiée dans le *Lactobacillus plantarum*. Rappelons qu'il s'agit là d'une simple hypothèse de travail et que des recherches beaucoup plus poussées devront être entreprises pour éclaircir ce problème de l'utilisation des peptides.

En ce qui concerne la première question soulevée, à savoir, l'antagonisme entre thiosine et lysine, nous pouvons être plus formels. Nos résultats montrent, que la thiosine et ses peptides sont des inhibiteurs compétitifs puissants de la lysine et de ses peptides. Ceci n'a rien de très surprenant, vu la très grande ressemblance de la lysine et de la thiosine, telle qu'elle ressort de la figure 1. Non seulement les groupes fonctionnels ( $\text{COOH}$ ,  $\alpha\text{-NH}_2$ ,  $\epsilon\text{-NH}_2$ ) sont identiques, mais aussi la chaîne aliphatique est de nature très voisine, puisque l'angle des valences du carbone tétraédrique ( $109,5^\circ$ ) est proche de celui du soufre ( $100^\circ$ ).

Ainsi la thiosine, de synthèse facile, pourra-t-elle servir d'outil pour étudier l'utilisation et le métabolisme de la lysine dans d'autres organismes.

<sup>11</sup> R. B. JOHNSTON, M. J. MYCEK et J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 187 (1950) 205.

J. MAURON, J. E. FOLK et T. SHIOTA

Laboratoires de Recherche des Produits Nestlé, Vevey (Suisse)  
et National Institute of Dental Research,  
National Institutes of Health, Bethesda, Md. (U. S. A.)

## Purification et propriétés de la phosphatase alcaline rénale de cheval\*

La phosphatase alcaline *intestinale*, préparée à l'état pur dans notre Institut montrait une activité spécifique correspondant à 450 000  $\gamma$  P/min/mg N protéique. Cette protéine contenait environ 7% d'hexoses et 5% d'hexosamines. Comme il avait été très difficile de séparer la phosphatase des glycoprotéides présents en abondance dans la muqueuse intestinale, il nous a semblé intéressant et nécessaire d'isoler la phosphatase alcaline d'un autre organe qui, moins riche en glycoprotéides, permettrait de mieux séparer cet enzyme des glycoprotéides accompagnants. On espérait ainsi apporter une preuve supplémentaire à la question de savoir si la phosphatase

alcaline était un glycoprotéide ou non. En même temps, on pouvait, par ces études, aborder le problème de la parenté des phosphatases de différents organes, problème intéressant mais encore peu travaillé. Notre choix tomba sur la phosphatase *ré nale* dont la purification n'avait donné de résultats appréciables que ces toutes dernières années. Les résultats des principaux travaux effectués sur la phosphatase rénale sont rassemblés dans le tableau 1.

\* Note préliminaire. Communication présentée aux VI<sup>es</sup> Journées Biochimiques Latines à Genève, 25-28 mai 1961.

Tableau 1: Résultats récents des essais de purification de la phosphatase alcaline rénale

Auteurs	Année	Activité spécifique	
		en unités Roche ( $\gamma$ P/min/mg N)	en unités King (mg de phénol/15 min/mg N)
R. K. MORTON <sup>1</sup> . . . . .	1954	6 900	—
F. BINKLEY <i>et al.</i> <sup>2</sup> . . . . .	1957	146 000	—
E. F. ALVAREZ et M. LORA-TAMAYO <sup>3</sup> . . . . .	1958	166 000	—
J. C. MATHIES <sup>4</sup> . . . . .	1958	env. 250 000	10 500 (à 25°)
O. SCHALES et K. ARAI <sup>5</sup> . . . . .	1959	env. 200 000	11 600 (à 37°)
F. BINKLEY <sup>6</sup> . . . . .	1961	300 000	—
P. PORTMANN et G. GERFAUX . . . . .	1961	440 000	env. 18 250 (à 25°) ou env. 26 200 (à 38°)

Notre préparation, citée en dernier lieu, possède une activité spécifique au moins deux fois plus grande que celle des autres préparations et atteint pratiquement l'activité de notre préparation de phosphatase intestinale. Pour le moment nous ne retenons pas la préparation de BINKLEY<sup>6</sup> dont l'auteur prétend qu'il ne s'agit plus d'une protéine et dont le caractère enzymatique ne nous semble pas encore suffisamment établi.

Nous nous sommes efforcés de n'appliquer durant toute la purification que des procédés dont nous connaissons le caractère inoffensif pour la phosphatase. C'est à ce mode de purification et à la pureté de nos préparations que nous croyons devoir la très haute activité spécifique atteinte. Ayant d'abord essayé d'appliquer le mode de purification employé pour la phosphatase intestinale, nous avons constaté qu'il serait difficile d'arriver par ce chemin à une préparation pure. Deux modifications furent nécessaires qui tenaient compte de la nature du tissu d'où on voulait extraire la phosphatase. La première a été de faire l'extraction à partir du tissu rénal frais et non pas à partir d'une poudre séchée à l'acétone, la seconde d'introduire un nouveau mode de fractionne-

<sup>1</sup> R. K. MORTON, *Biochem. J.* 57 (1954) 595.

<sup>2</sup> F. BINKLEY, V. ALEXANDER, F. E. BELL et C. LEA, *J. Biol. Chem.* 228 (1957) 559.

<sup>3</sup> E. F. ALVAREZ et M. LORA-TAMAYO, *Biochem. J.* 69 (1958) 312.

<sup>4</sup> J. C. MATHIES, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 1121.

<sup>5</sup> O. SCHALES et K. ARAI, *Arch. Biochem. Biophys.* 83 (1959) 152.

<sup>6</sup> F. BINKLEY, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 735.

Tableau 2: Schéma d'extraction et de purification de la phosphatase rénale de cheval

Etape de purification	Fractions* (Vol.-%)	Activité	
		totale ( $\gamma$ P/min)	spécifique ( $\gamma$ P/min/mg N)
I Homogénéisation au butanol de 15 kg de reins frais			
II 2-3 extractions successives du résidu avec une solution d'acétate de Mg (0,01 M) et de Na (0,1 M) à pH 8,4 . . . . .		13,0 · 10 <sup>6</sup>	—
III Précipitation à 65 Vol.-% d'alcool . . . . .		11,9 · 10 <sup>6</sup>	364
IV 1 <sup>er</sup> fractionnement à l'alcool . . . . .	0-45% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">45-80%</span>	9,1 · 10 <sup>6</sup>	3 000
V 2 <sup>e</sup> fractionnement à l'alcool . . . . .	0-45% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">45-75%</span>	8,6 · 10 <sup>6</sup>	9 470
VI 1 <sup>er</sup> fractionnement à l'acétone . . . . .	0-35% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">35-50%</span> 50-60%	8,5 · 10 <sup>6</sup>	15 200
VII 2 <sup>e</sup> fractionnement à l'acétone . . . . .	0-40% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">40-48%</span> 48-60%	7,6 · 10 <sup>6</sup>	23 000
VIII Relargage au sulfate de magnésium . . . . .	filtrat <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">précipité</span>	3,7 · 10 <sup>6</sup>	58 000
IX Fractionnement à l'alcool en solution saturée d'acétate de magnésium . . . . .	0-72% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">72-77%</span> 77-85%	2,15 · 10 <sup>6</sup>	196 000
X 3 <sup>e</sup> fractionnement à l'acétone . . . . .	0-42% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">42-46%</span> 46-49%	1,2 · 10 <sup>6</sup>	410 000
XI 4 <sup>e</sup> fractionnement à l'acétone d'une solution contenant deux préparations analogues (étape X)	0-44,2% <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">44,2-49%</span> 49-65%		

\* Les fractions encadrées sont celles qui contiennent la phosphatase de l'activité spécifique citée dans la dernière colonne.

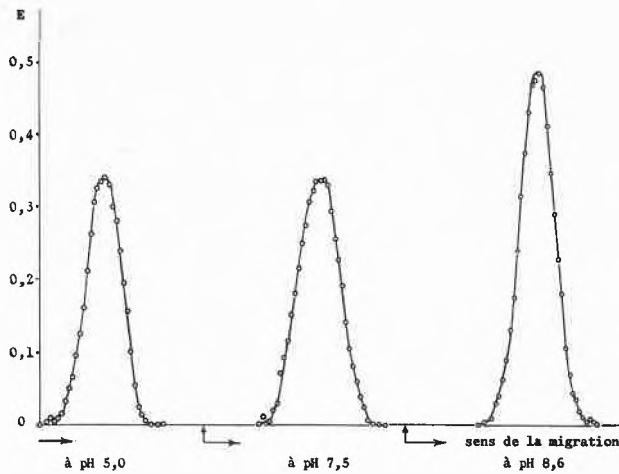


Fig. 1. Electrophorèse de la phosphatase rénale purifiée (activité: 440 000  $\gamma$  P/min/mg N)

ment à l'alcool en solution saturée d'acétate de magnésium très pur (le seul qui convient est «l'Analar» BDH). Cela permet la séparation des protéines accompagnantes, tandis que dans les conditions employées pour la préparation de la phosphatase intestinale, c'est-à-dire: les fractionnements à l'alcool en présence d'acétate de magnésium 1N, ceux à l'acétone et le relargage au sulfate

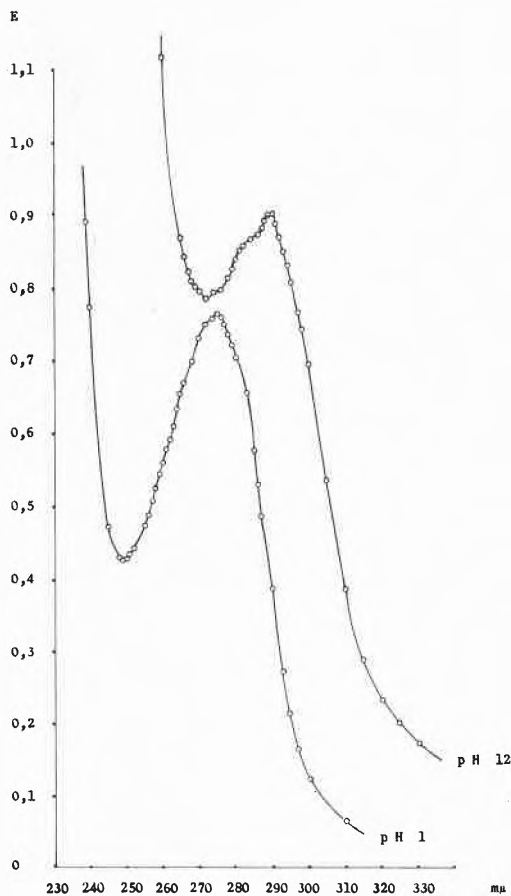


Fig. 2. Spectre d'absorption de la phosphatase rénale

de magnésium, la solubilité de la phosphatase était trop semblable à celle des protéines accompagnantes pour pouvoir en être séparée. Cette séparation une fois réalisée, il nous fut assez facile d'éliminer le reste des protéines étrangères par des fractionnements répétés à l'acétone. Le tableau 2 montre le schéma de purification finalement employé.

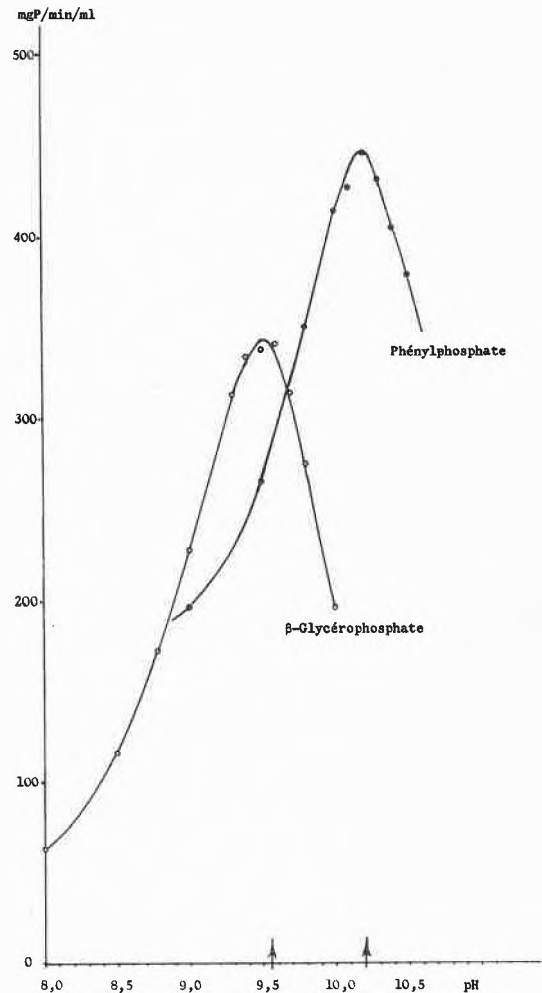


Fig. 3. pH-Optimum de la phosphatase alcaline rénale

L'homogénéité de la préparation pure de phosphatase a été démontrée par électrophorèse sur papier à différents pH (figure 1). Les électrophérogrammes aux pH 5,0, 7,5 et 8,6 mettent en évidence l'absence de fractions secondaires et, de plus, montrent des pics parfaitement symétriques. La teneur en azote, en hexoses et en hexosamines d'une de ces préparations pures a été déterminée après une dialyse de trois jours. On a alors trouvé les valeurs suivantes: 14% d'azote, 13,2% d'hexoses et 12,8% d'hexosamines, tandis que les valeurs correspondantes pour la phosphatase intestinale étaient: 14,6% d'azote, 7% d'hexoses et 5% d'hexosamines. Il est intéressant de constater que la phosphatase rénale, bien que tirée d'un organe relativement pauvre en glyco-

protéides, contient des quantités d'hexoses et d'hexosamines plus grandes que la phosphatase intestinale.

D'autre part on a analysé la composition en acides aminés de la phosphatase. A part la cystéine et l'hydroxyproline, tous les acides aminés habituels ont pu être décelés dans l'hydrolysate d'une préparation pure de phosphatase rénale. Les mêmes acides aminés avaient aussi été trouvés dans l'enzyme intestinal. De plus, les acides aspartique et glutamique, la thréonine, la sérine, la glycine, l'alanine, la leucine et l'isoleucine se retrouvent dans les deux enzymes à un pourcentage analogue et élevé.

Le spectre d'absorption (figure 2) est presque identique à celui de la préparation intestinale<sup>7</sup>. Pourtant il existe une très petite épaule située à 260  $m\mu$  que nous n'avons pas été en mesure de trouver dans le spectre de la phosphatase intestinale. Il faudrait une nouvelle étude approfondie pour déterminer exactement l'importance

et la signification de cette épaule. Bien que très faible, elle pourrait quand même confirmer l'affirmation d'ALVAREZ et LORA-TAMAYO<sup>3</sup> reprise ensuite par BINKLEY<sup>6</sup>, suivant laquelle un dérivé de l'uridine ferait partie intégrante de la phosphatase rénale.

Enfin, nous avons comparé les propriétés enzymatiques des deux phosphatases et nous avons pu constater un parallélisme étroit entre les deux enzymes. C'est ainsi que la détermination du  $pH$  optimum de la phosphatase rénale a donné les résultats suivants: 9,55 pour le  $\beta$ -glycérophosphate et 10,2 pour le phénylphosphate comme substrat (figure 3). Nous avons trouvé pratiquement les mêmes valeurs (9,55 et 10,15) pour notre préparation pure de phosphatase intestinale. Cette comparaison nous a permis de constater qu'à l'état pur les phosphatases alcalines de différents organes montraient des activités spécifiques très voisines et des propriétés chimiques et enzymatiques très semblables.

P. PORTMANN et G. GERFAUX

Institut de chimie physiologique, Université, Fribourg

<sup>7</sup> P. PORTMANN, R. ROSSIER et H. CHARDONNENS, *Helv. Physiol. Acta* 18 (1960) 414.

## L'influence des rayons X sur l'activité enzymatique de la moelle osseuse du rat\*

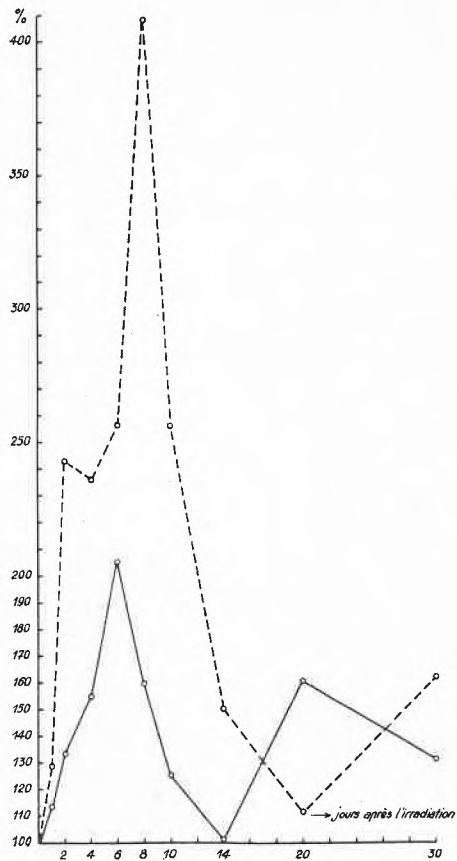
Le fait qu'une des suites les plus constantes d'une irradiation répétée ou excessive de l'homme par des rayons X ou par des radiations corpusculaires radioactives se manifeste sous forme d'une leucémie myéloïde nous a incités à étudier l'effet des rayons X sur la moelle osseuse du rat. Il nous a paru spécialement intéressant de suivre l'activité de quelques enzymes dès le premier jour après l'application d'une dose de 800 r ou de 1600 r et pendant les trente jours suivants. Dans les conditions techniques de: 60 kV, 3 mA, 0,5 mm de filtre d'Al, 23 r/min et à une distance focale de 25 cm les 800 r ont été appliqués en une seule séance de 35 minutes, les 1600 r en deux séances et en deux jours successifs. Dans ces conditions de travail et pour la durée de nos expériences ces doses étaient en dessous de la dose létale. Aussi, aucun des 162 rats irradiés ne succombait-il avant son emploi pour l'expérience.

Notre méthode de travail a été la suivante: on a fait sortir la moelle osseuse des fémurs et des tibias par un jet de solution de NaCl à 1% refroidie à 0°. Après une légère homogénéisation, une partie de l'homogénat a été employée pour la mesure de la respiration dans du sérum homologué, tandis que l'autre partie fut homogénéisée à fond. Ce dernier homogénat a servi pour les dosages des activités enzymatiques. Nous avons choisi les enzymes de telle façon qu'ils puissent nous donner un aperçu général sur les métabolismes cellulaires. Ainsi nous avons dosé les phosphatases acide et alcaline à côté de la res-

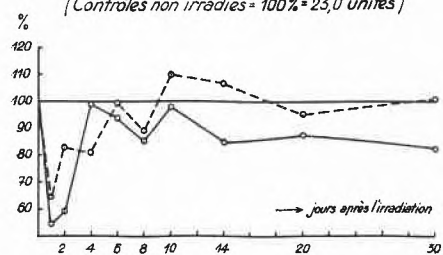
piration pour l'appréciation générale du métabolisme, l'aldolase et la deshydrogénase lactique pour celle de la glycolyse, les transaminases GO (glutamique/oxaloacétique) et GP (glutamique/pyruvique) pour juger du métabolisme protéique, la deshydrogénase malique enfin comme représentant de l'oxydation finale. A part les deux phosphatases tous les autres enzymes ont été dosés par test optique. Nos résultats sont réunis dans la figure 1.

Le 100% représenté par les lignes de base, est égal à la moyenne des valeurs obtenues sur 30 rats de contrôle non irradiés. Les variations de la respiration et des activités enzymatiques des rats irradiés sont indiqués en pourcent de la moyenne normale correspondante. Les lignes continues indiquent les valeurs obtenues sur les rats irradiés une fois, les lignes pointillées celles des rats irradiés deux fois. Chaque point des courbes représente la moyenne des valeurs obtenues sur 9 rats irradiés. Ces dosages, dont les valeurs furent rapportées à 1 mg d'azote, ont été faits après un, deux, quatre, six, huit, dix, quatorze, vingt et trente jours après l'irradiation. Sur ces courbes, nous pouvons observer les variations suivantes: la respiration, après une légère diminution initiale s'étendant sur un ou deux jours, revient pratiquement à la valeur normale et y reste. Des sept enzymes étudiés, quatre, soit: l'aldolase, la transaminase GP, la phosphatase alca-

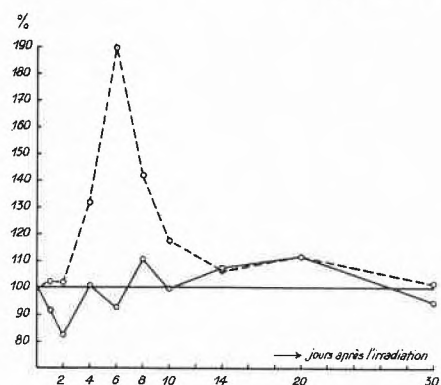
\* Note préliminaire. Communication présentée aux VI<sup>es</sup> Journées Biochimiques Latines à Genève, 25-28 mai 1961.



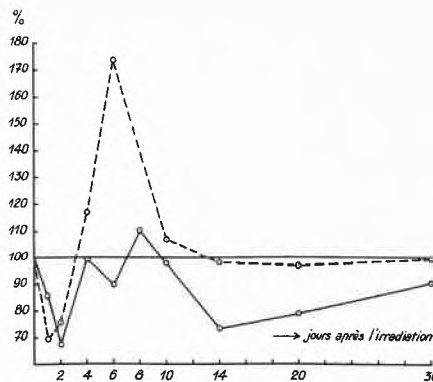
1,6-Diphosphofructalobase  
(Contrôles non irradiés = 100% = 23,0 unités)



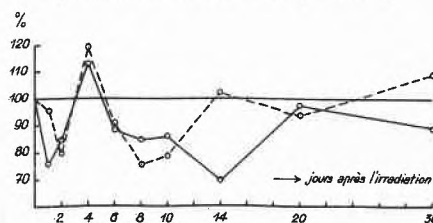
Respiration  
(Contrôles non irradiés = 100% = 27,4 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>/mg N/60 min)



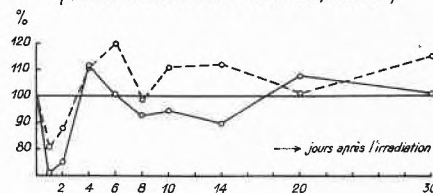
Transaminase GP  
(Contrôles non irradiés = 100% = 137,7 unités)



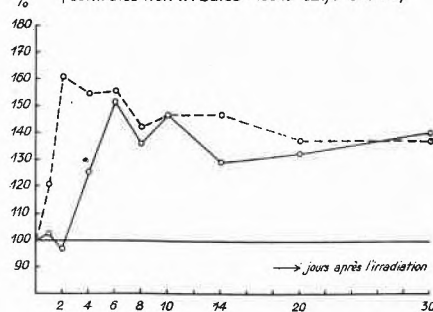
Phosphatase acide  
(Contrôles non irradiés = 100% = 1,181 unités)



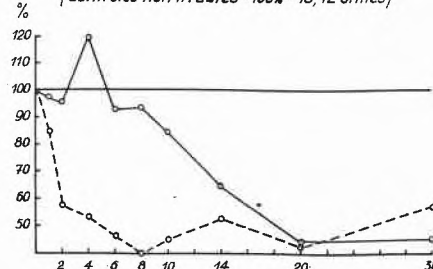
Déshydrogénase maléique  
(Contrôles non irradiés = 100% = 2687,8 unités)



Transaminase GO  
(Contrôles non irradiés = 100% = 621,4 unités)



Phosphatase alcaline  
(Contrôles non irradiés = 100% = 18,42 unités)



Déshydrogénase lactique  
(Contrôles non irradiés = 100% = 4289,6 unités)

Fig. 1. Influences des rayons X sur la respiration et les activités enzymatiques de la moelle osseuse du rat  
Doses appliquées: — 1 x 800 r - - - - - 2 x 800 r  
Tests optiques: 1 unité = 0,001 ΔE<sub>240</sub>/min/mgN Phosphatase: 1 unité = 1 γ P/min/mgN

line et la phosphatase acide montrent en principe, pour une certaine période du moins, une *augmentation* de l'activité, précédée ou non d'une diminution initiale. La transaminase GP et la phosphatase alcaline reviennent à leurs valeurs de base au cours des trente jours. La phosphatase acide par contre se maintient à une valeur augmentée. Des trois autres enzymes, à savoir: la malicodéshydrogénase, la transaminase GO et la lactico-déshydrogénase, seul le dernier, le lactico-déshydrogénase, montre une *diminution* immédiate et persistante. La malicodéshydrogénase et la transaminase GO suivent en grande ligne les variations de la respiration, spécialement en ce qui concerne la diminution initiale.

Deux faits principaux ressortent de l'examen de ces variations:

- 1° Les changements en plus et en moins pour les rats irradiés une fois sont très semblables à ceux observés sur les rats irradiés deux fois. De plus, pour plusieurs enzymes l'effet de la double irradiation accentue encore ces changements. Nous y voyons un indice que les variations observées sont réellement dues à l'effet des rayons X.
- 2° En comparant le même jour après l'irradiation l'effet des rayons X sur l'activité de différents enzymes, on constate que quelques enzymes montrent une augmentation, d'autres une diminution d'activité. C'est ainsi que l'activité de l'aldolase est fortement augmentée du 2<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour tandis que celle de la dés-hydrogénase lactique est diminuée pendant la même période. Ceci exclut, à notre avis, la possibilité de rapporter ces changements à un facteur commun, comme l'a fait EICHEL<sup>1</sup> qui voulait expliquer l'effet

<sup>1</sup> H. J. EICHEL, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 95 (1957) 38.

des rayons X sur l'activité de la catalase par le seul changement de la teneur en azote de la fraction mitochondriale.

L'interprétation de ces courbes est difficile. Nous pouvons néanmoins envisager trois possibilités d'explication: la première serait que seulement certains enzymes soient lésés par l'irradiation. Cette destruction pourrait être accompagnée d'une augmentation compensatrice d'autres enzymes afin de permettre la bonne marche du métabolisme vital de la cellule par d'autres voies métaboliques. La seconde explication mettrait en jeu un changement de la fréquence de la population cellulaire sous l'effet de l'irradiation à laquelle, comme il est connu, certains types de cellules sont plus sensibles. Les activités enzymatiques trouvées seraient alors celles des cellules survivantes ou encore celles des cellules en régénération. Il est intéressant de comparer à ce sujet les travaux de BETZ<sup>2</sup> sur la régénération sélective des cellules myéloïdes et lymphatiques dans la moelle osseuse et la pulpe rouge splénique après irradiation aux rayons X à dose subléthale. La troisième explication serait la combinaison d'une diminution d'azote due à l'irradiation avec une lésion de certains enzymes seulement, d'où résulterait, suivant le cas, une augmentation ou une diminution de l'activité.

Il nous semble que, pour nous faire progresser dans l'appréciation du ou des facteurs qui sont à l'origine des changements enzymatiques observés, il faudrait combiner des dosages enzymatiques semblables aux nôtres à une étude morphologique de la moelle osseuse.

<sup>2</sup> H. BETZ, *C. R. Soc. Biol.* 147 (1953) 168, 171.

P. PORTMANN et C. D. SCHOELLER  
Institut de chimie physiologique, Université, Fribourg

## Recherches sur le Métabolisme de l'Apo-8'-caroténal\*

Les expériences faites au cours de ces dernières années dans le domaine de la coloration artificielle des aliments ont amené d'importantes restrictions dans le choix des colorants autorisés.

Toutefois, pour des raisons multiples, on ne peut ou ne veut pas renoncer à la coloration de certains aliments. L'utilisation de colorants qui représentent des constituants naturels de notre nourriture permet la coloration alimentaire en même temps qu'une élimination de tout risque d'effets nuisibles pour le consommateur.

Les caroténoïdes liposolubles, largement distribués dans le règne animal et végétal, répondent aux exigences devant être remplies par un colorant alimentaire.

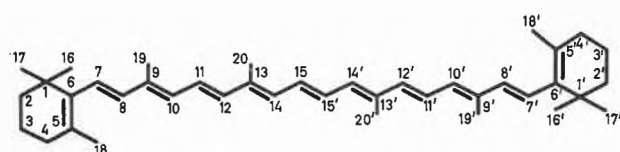
On a beaucoup utilisé des extraits naturels contenant une grande variété de substances diverses (en grande

partie inconnues ou altérées). Aujourd'hui, ce sont les pigments de synthèse chimiquement purs, et dont le comportement dans l'organisme est plus ou moins connu, qui sont appliqués. La possibilité d'opérer la synthèse des caroténoïdes à l'échelle industrielle a permis l'utilisation du  $\beta$ -carotène, par exemple comme colorant alimentaire. Mentionnons également le lycopène, pigment rouge de la tomate, ou la torularhodine trouvée dans la levure. Une question importante est celle de la dose permettant d'obtenir l'intensité de coloration voulue. Il a été démontré récemment que le  $\beta$ -apo-8'-caroténal ( $C_{30}$ ) et l'acide correspondant, l'acide  $\beta$ -apo-8'-caroténoïque ( $C_{30}$ )

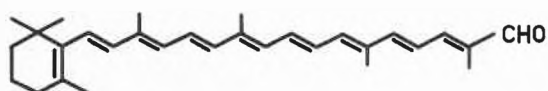
\* Note préliminaire: Communication présentée aux VI<sup>es</sup> Journées Biochimiques Latines à Genève, 25-28 mai 1961.



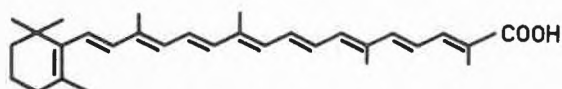
(figure 1) produisent en très petite concentration de hautes intensités de coloration. Le  $\beta$ -apo-8'-caroténal, possédant également une activité provitaminique A, est probablement un métabolite au cours de la dégradation du  $\beta$ -carotène. Le  $\beta$ -carotène peut en effet être transformé en vitamine A de deux manières. D'une part, une scission en deux molécules de vitamine A est possible, d'autre part, on peut assumer une oxydation partant de l'une des extrémités de la molécule et donnant naissance, entre autres, au  $\beta$ -apo-8'-caroténal. Celui-ci peut alors être transformé, ou bien en vitamine A par dégradation oxydative de la chaîne, ou bien en acide  $\beta$ -apo-8'-caroténoïque par oxydation directe de la fonction aldéhyde.



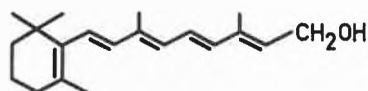
$\beta$  - carotène



$\beta$  - apo - 8' - caroténal (C<sub>30</sub>)



acide -  $\beta$  - apo - 8' - caroténoïque (C<sub>30</sub>)



vitamine A

Fig. 1

Nous nous sommes occupés spécialement de l'apo-8'-caroténal et de son comportement dans l'organisme du rat, de la poule et du singe au cours d'essais de toxicité, pour lesquels des doses de 50 mg/kg par jour avaient été choisies. On trouve dans le foie de rats, ayant reçu de l'apo-8'-caroténal comme seul caroténoïde dans leur nourriture, l'apo-8'-caroténal tel quel, ainsi qu'une quantité importante d'acide apo-8'-caroténoïque.

L'œuf de poule constitue, lui aussi, un objet d'étude très approprié. Nous avons donné à des poules nourries sans aucun apport de caroténoïdes une dose orale d'environ 1 mg d'apo-8'-caroténal par animal et par jour, et examiné ensuite le jaune de l'œuf. L'aldéhyde utilisé dans ces expériences était tritié stéréospécifiquement en 15-15', ce qui permettait de le déceler en quantités même infimes.

Il résulte de cette expérience que l'aldéhyde ainsi que l'acide correspondant sont responsables de la coloration du jaune d'œuf. En effet, la presque totalité de la radioactivité retrouvée était localisée dans l'acide apo-8'-caroténoïque dont les 9/10 étaient estérifiés, et le reste à l'état libre.

La quantité d'aldéhyde était insignifiante, elle put toutefois être décelée après condensation avec la rhodanine. L'administration prolongée de 1 mg d'apo-8'-caroténal par animal et par jour donne une concentration constante de 100-150  $\gamma$  d'acide par jaune d'œuf. Une coloration décelable du jaune d'œuf peut toutefois être obtenue avec des doses d'environ 30  $\gamma$  d'acide apo-8'-caroténoïque par jour.

Nous avons eu, par hasard, l'occasion de donner de l'apo-8'-caroténal à des singes rhésus. Après dissection, nous avons constaté que les graisses et le foie avaient une coloration orange qui manquait chez l'animal de contrôle, ce qui prouve une résorption partielle de l'aldéhyde.

Le foie contenait en plus de l'aldéhyde et de l'acide correspondant un métabolite dont le comportement chromatographique et spectrographique indique qu'il s'agit d'un caroténoïde acide de 24-25 atomes de carbone. En raison des quantités insuffisantes de cette substance il ne nous a pas encore été possible de l'isoler.

Nous avons également examiné des extraits de champignons et démontré l'existence d'un acide hydroxylé apparenté à l'acide  $\beta$ -apo-8'-caroténoïque (C<sub>30</sub>). Des extraits de carottes et d'épinard contiennent également de petites quantités de caroténoïdes acides.

Nous avons lieu de croire que l'acide apo-caroténoïque ou des acides homologues sont des pigments naturels tout comme l'aldéhyde, ainsi que l'indiquent nos résultats spectrographiques et la chromatographie sur couche mince. Les très petites quantités trouvées jusqu'ici ont toutefois rendu impossible la préparation du corps cristallisé.

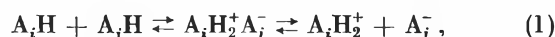
L'acide  $\beta$ -apo-8'-caroténoïque présente, comme colorant alimentaire, des qualités et propriétés intéressantes, et nous poursuivons nos recherches tendant à l'isoler d'un substratum naturel.

H. THOMMEN

Département de Recherches  
sur les Vitamines et la Nutrition de la Maison  
F. Hoffmann-La Roche & Cie. S. A., Bâle

## Programmgesteuerte Berechnung von Säure-Basen-Gleichgewichten in nichtwässrigen Medien\*<sup>1</sup>

In einer früheren Mitteilung<sup>2</sup> wurde eine Methode zur Berechnung des pH-Wertes von wässrigen Lösungen beliebiger Säuren und Basen beschrieben. Diese Rechenmethode ist jedoch in Medien kleiner Dielektrizitätskonstanten nicht mehr anwendbar, da die interionalen Wechselwirkungen an Bedeutung gewinnen und Ionenpaare<sup>3</sup> und höhere Ionenaggregate auftreten. In Anlehnung an die grundlegenden Arbeiten von KOLTHOFF und BRUCKENSTEIN<sup>3</sup> können Säure-Basen-Gleichgewichte in derartigen Lösungsmitteln allgemein formuliert werden:



wobei als Ausgangspunkt für die Betrachtungen ein System bestehend aus  $n$  einbasischen Säuren  $A_iH$  diene. Die dem Gleichgewicht (1) zuzuordnenden Ionisationskonstanten  $I_{ij}$ <sup>3</sup>, Dissoziationskonstanten  $D_{ij}$  und Massenwirkungskonstanten  $K_{ij}$  sind:

$$I_{ij} = \frac{[A_jH_2^+][A_i^-]}{[A_iH][A_jH]} \quad (2)$$

$$D_{ij} = \frac{[A_iH_2^+][A_j^-]}{[A_iH_2^+][A_j^-]} \quad (3)$$

$$K_{ij} = \frac{[A_iH_2^+][A_j^-]}{[A_jH][A_iH]} = I_{ij} D_{ij} \quad (4)$$

Weiter lauten die Bedingungen für die Elektroneutralität sowie die Massenbilanz:

$$\sum_i [A_iH_2^+] = \sum_i [A_i^-] \quad (5)$$

$$c_i = [A_iH] + [A_iH_2^+] + [A_i^-] + \sum_j [A_iH_2^+ A_j^-] + \sum_j [A_jH_2^+ A_i^-] \quad (6)$$

Dabei symbolisieren die Ausdrücke in eckigen Klammern die Gleichgewichtskonzentrationen der betreffenden Spezies und  $c_i$  die analytische Konzentration der eingebrachten Komponenten  $A_iH$ . Nach Einführung der Größen

$$x_i = [A_iH] \quad (7)$$

$$\mu = \sum_i [A_iH_2^+] = \sum_i [A_i^-] = \left( \sum_{ij} K_{ij} x_i x_j \right)^{1/2} \quad (8)$$

und

$$a_{ij} = \frac{K_{ij} + K_{ji}}{\mu} + I_{ij} + I_{ji} \quad (9)$$

läßt sich das folgende *nichtlineare* Gleichungssystem aus den Beziehungen (2) bis (6) ableiten:

$c_1 = x_1 + x_1 (a_{11} x_1 + a_{12} x_2 + \dots + a_{1n} x_n)$	(10)
$c_2 = x_2 + x_2 (a_{21} x_1 + a_{22} x_2 + \dots + a_{2n} x_n)$	
.....	
$c_n = x_n + x_n (a_{n1} x_1 + a_{n2} x_2 + \dots + a_{nn} x_n)$	

Dieses Gleichungssystem wurde linearisiert und mit Hilfe einer programmgesteuerten Rechenanlage IBM650 iterativ gelöst. Somit ist es möglich, die Gleichgewichtskonzentration sämtlicher am System beteiligter Spezies zu berechnen. Als Eingangsdaten für die Berechnungen dienen die Konstanten  $K_{ij}$  und  $I_{ij}$ , die auch iterativ aus den thermodynamischen Konstanten mit Hilfe der Debye-Hückelschen Korrektur unter Verwendung der berechneten Ionenstärken  $\mu$  (8) ermittelt werden können. In gleicher Weise lassen sich die Aktivitäten aus den Gleichgewichtskonzentrationen ableiten.

Das Verfahren wurde auf das System organische Base / Wasser / Essigsäure (Lösungsmittel) / Perchlorsäure, unter Verwendung der von KOLTHOFF und BRUCKENSTEIN<sup>3</sup> ermittelten Konstanten angewendet. Die Übereinstimmung mit experimentellen Daten<sup>3,4</sup> sowie mit Größen, die mit Hilfe der von diesen Autoren vorgeschlagenen Näherungsformeln berechnet wurden, ist sehr befriedigend.

J. P. ESCARFAIL dankt der Eidgenössischen Technischen Hochschule für ein Stipendium, das ihm die Ausführung dieser Arbeit ermöglichte.

### Summary

A method is described for the calculation of equilibrium concentrations of the constituents of arbitrary mixtures of acids and bases in nonaqueous solvent systems using a digital computer.

<sup>4</sup> N. F. HALL und T. H. WERNER, *J. Amer. Chem. Soc.* 50 (1928) 2367.

J. P. ESCARFAIL und W. SIMON

Organisch-Chemisches Laboratorium  
der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

\* Eingegangen am 22. Juli 1961.

<sup>1</sup> Vorläufige Mitteilung. Eine ausführlichere Arbeit ist in Vorbereitung und wird 1962 in den *Helvetica Chimica Acta* erscheinen.

<sup>2</sup> J. P. ESCARFAIL und W. SIMON, *Helv. Chim. Acta* 44 (1961) 977.

<sup>3</sup> I. M. KOLTHOFF und S. BRUCKENSTEIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 1; S. BRUCKENSTEIN und I. M. KOLTHOFF, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 2974; I. M. KOLTHOFF und S. BRUCKENSTEIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1; S. BRUCKENSTEIN und I. M. KOLTHOFF, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 5915; S. BRUCKENSTEIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (1960) 307.