

## II. SUR LA PARTICIPATION DES PHOSPHATES AUX RÉACTIONS D'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE

par

PAULETTE CHAIX, GEORGES-ANDRÉ MORIN ET JACQUES JEZEQUEL

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences, Lyon (France)*

En vue de rechercher la participation éventuelle des phosphates aux réactions d'oxydation de l'adrénaline antérieurement décrites<sup>8</sup>, se développant en solutions tampon-phosphate, nous avons été naturellement conduits à étudier l'oxydation de cette même molécule en solution tampon exempte de phosphates et à comparer nos deux séries d'expériences.

Des essais préliminaires nous ont montré que parmi les tampons sans phosphates utilisables dans la zone des  $p_H$  voisins de la neutralité: tampons au bicarbonate, tampons au véronal<sup>16</sup> tampons à l'acide maléique<sup>19</sup>, les tampons au bicarbonate correspondaient aux conditions les plus simples et permettaient les observations les plus fructueuses.

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude de l'oxydation de l'adrénaline en solution tampon bicarbonate, la deuxième partie à une comparaison entre le mode d'oxydation de l'adrénaline en solution tampon phosphate et en solution bicarbonate.

Les expériences réalisées en solution tampon bicarbonate comme celles effectuées en solution tampon phosphate montrent que l'adrénaline n'est pas autoxydable, que son oxydation par l'oxygène moléculaire dépend de la formation d'une combinaison adrénaline-métal autoxydable, que la combinaison adrénaline-cuivre, mieux que toutes les autres combinaisons adrénaline-métal étudiées, présente une aptitude remarquable à réagir avec l'oxygène moléculaire.

Elles permettent en outre:

1. De dissocier la réaction de formation du complexe adrénaline-cuivre de la réaction d'oxydation de ce même complexe;

2. d'obtenir une stabilisation temporaire de la dégradation oxydative de l'adrénaline au stade *adrénochrome*.

La comparaison entre réactions d'oxydation de l'adrénaline en présence de cuivre et oxygène en solution tampon phosphate<sup>8</sup> et en solution tampon bicarbonate conduit à mettre en évidence la participation des phosphates à la dégradation de l'adrénaline. En effet, toutes choses égales d'ailleurs, la réaction d'oxydation se stabilise:

— dans le premier cas (bic.) quand l'oxygène consommé correspond à une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline: formation d'une substance rouge (adrénochrome);

— dans le second cas (phos.) quand l'oxygène consommé correspond à 3 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline: formation d'un composé brun-madère.

La dégradation oxydative de l'adrénaline obtenue par action du ferricyanure de

potassium en atmosphère exempte d'oxygène évolue aussi d'une façon différente en tampon bicarbonate et en tampon phosphate.

La notion de participation des phosphates aux réactions d'oxydation de l'adrénaline que nous venons de mettre en évidence nous conduit à émettre une nouvelle hypothèse quant au rôle de l'activité inhibitrice de l'adrénochrome dans les réactions de glycolyse.

### CONDITIONS GÉNÉRALES ET TECHNIQUES DES EXPÉRIENCES

La plupart des réactions sont étudiées à l'aide de la technique manométrique de WARBURG, à la température de 37°. Les conditions générales des expériences sont dans l'ensemble les mêmes que celles décrites dans notre précédent travail<sup>8</sup> notamment en ce qui concerne la préparation et l'introduction de l'adrénaline. Ici encore le chlorhydrate d'adrénaline, est placé dans l'ampoule latérale des récipients sous un volume de 0.02 à 0.06 ml et renversé au temps 0 de l'expérience dans la capacité principale des récipients contenant tampon et, éventuellement, catalyseur.

Comme le tampon utilisé est ici le bicarbonate, la préparation des essais est modifiée de la façon suivante:

1. L'ampoule centrale des récipients ne contient pas de solution de potasse.
2. La capacité principale des récipients contient 2 ml d'une solution de  $\text{CO}_3\text{NaH}$  0.03 *m*, additionnée ou non de la solution du sel métallique catalyseur, introduit sous un volume de l'ordre de 0.01 à 0.06 ml.

3. Les réactions effectuées en absence d'oxygène ont lieu:

soit en atmosphère de  $\text{CO}_2$  pur:  $\text{pH} = 6.4$   
 soit en atmosphère de 95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ :  $\text{pH} = 7.3$   
 soit en atmosphère de  $\text{N}_2$  pur:  $\text{pH} = 8.0$

4. Les réactions effectuées en présence d'oxygène ont lieu

soit en atmosphère 50%  $\text{O}_2$  + 50%  $\text{CO}_2$ :  $\text{pH} = 6.4$   
 soit en atmosphère 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ :  $\text{pH} = 7.3$   
 soit en atmosphère  $\text{O}_2$  pur:  $\text{pH} = 8.0$

### RÉSULTATS EXPÉIMENTAUX

#### PREMIÈRE PARTIE

##### ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN SOLUTION TAMPON BICARBONATE

###### *I. Formation de combinaisons adrénaline-métal en atmosphère exempte d'oxygène*

###### *1. Essais témoins non additionnés de métal lourd*

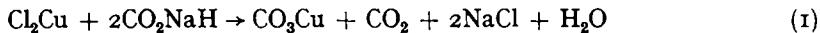
Le renversement de 0.02 ml d'une solution incolore de chlorhydrate d'adrénaline  $10^{-1}$  *m* dans 2 ml de solution de  $\text{CO}_3\text{NaH}$  0.03 *m* en atmosphère de  $\text{CO}_2$  pur ne détermine aucun changement de couleur, ni aucune variation manométrique pendant au moins 3 heures à 37°.

###### *2. Essais en présence de cuivre*

Si la solution de bicarbonate contient certains ions métalliques, il se manifeste, au moment du renversement, des variations manométriques traduisant l'entrée en combinaison de l'adrénaline avec le métal.

a. *Réaction du chlorure cuivrique avec le bicarbonate.* Des essais *sans adrénaline*, préparés en plaçant 0.02 ml de solution de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$   $10^{-1}$  *m* dans l'ampoule latérale des récipients, montrent que le renversement du chlorure cuivrique dans la solution de bicarbonate saturée de  $\text{CO}_2$  pur s'accompagne du dégagement de 45  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$ , soit une

molécule de gaz carbonique par molécule de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$  (valeur théorique 44.8  $\mu\text{l}$ ) et d'une précipitation de  $\text{CO}_3\text{Cu}$  d'après la relation:



Si le précipité était de l'hydroxyde de cuivre le dégagement serait de 2 molécules de  $\text{CO}_2$  par molécule de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$ , et si le précipité était du carbonate basique de cuivre ( $\text{CO}_3\text{Cu} \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ) il serait de 3 molécules de  $\text{CO}_2$  pour 2 molécules de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$ .

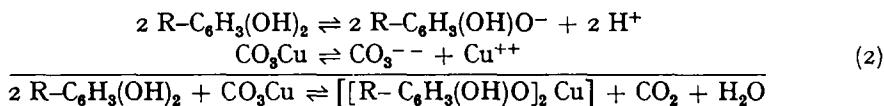
L'existence de cette réaction interdit de substituer au retournement d'adrénaline le retournement de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$  au temps zéro.

b. *Réaction de l'adrénaline avec le cuivre préalablement introduit dans la solution de bicarbonate sous forme de chlorure cuivrique.* La capacité principale des récipients contient 2 ml de solution de  $\text{CO}_3\text{NaH}$  0.03  $m$  + 0.02 ml de solution de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$   $10^{-1} m$  (le précipité de  $\text{CO}_3\text{Cu}$  se forme immédiatement); dans l'ampoule latérale il y a 0.02 ml de solution d'adrénaline  $10^{-1} m$ . L'atmosphère des essais est soit  $\text{CO}_2$  pur, soit ( $\text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$ ), soit  $\text{N}_2$  pur.

Après mise au bain-marie et équilibration de la température à 37°, le renversement d'adrénaline provoque:

- la disparition du précipité de  $\text{CO}_3\text{Cu}$
- un dégagement de  $\text{CO}_2$ .

A  $\text{pH} = 7.3$ , quand la concentration moléculaire en  $\text{Cl}_2\text{Cu}$  est moitié moindre ou égale à celle de l'adrénaline, le dégagement de gaz carbonique est de 48  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  par essai, soit environ 1 molécule de  $\text{CO}_2$  dégagé par molécule d'adrénaline mise en jeu. Ceci conduirait, dans ces conditions de faible alcalinité, à se représenter la réaction de la façon suivante:



Le Tableau I donne le nombre de  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  dégagés mesurés expérimentalement à différents  $\text{pH}$  (6.4, 7.3 et 8.0) pour différents rapports de concentrations Cu/Adrénaline. Le fait que les essais restent incolores montre que le chlorure cuivrique à lui seul n'exerce pas d'action oxydante.

TABLEAU I

GAZ CARBONIQUE DÉGAGÉ, EN MILLIMÈTRES CUBES, AU COURS DE LA FORMATION DE LA COMBINAISON  
ADRÉNALINE-CUIVRE, EN ABSENCE D'OXYGÈNE, EN SOLUTION BICARBONATE, À DIFFÉRENTS  $\text{pH}$  ET  
EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN CHLORURE CUIVRIQUE

- Adrénaline  $10^{-3} m$
- $\text{CO}_3\text{NaH}$  0.03  $m$

pH	Concentration moléculaire en $\text{Cl}_2\text{Cu}$							
	0	$10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$
6.4	$\pm 1$ (5)	—	—	21 (4)	33.8 (9)	28.3 (2)	25.6 (2)	—
7.3	—	16 (2)	36 (2)	47 (4)	48.6 (4)	41 (2)	—	41.7 (2)
8.0	—	—	—	—	20 (2)	—	—	—

Les nombres entre parenthèses indiquent combien de fois l'essai a été réalisé dans les mêmes conditions.

A  $p_H = 7.3$ , le dégagement maximum est atteint dès que le rapport des concentrations  $Cu^{++}/adrénaline = \frac{1}{2}$ . Les variations du dégagement en fonction du  $p_H$  dépendent sans doute des variations de dissociation de l'adrénaline et aussi à  $p_H = 8$  d'un certain degré de rétention de  $CO_2$ .

Dans tous les cas la formation de la combinaison adrénaline-Cu est une réaction très rapide se manifestant de la même manière entre  $10^\circ$  et  $37^\circ$ .

c. *Analogie des complexes adrénaline-Cu et pyrocatechol-Cu.* Des expériences identiques à celles venant d'être décrites, effectuées en substituant le pyrocatechol\* à l'adrénaline, montrent qu'en atmosphère de  $N_2 + 5\% CO_2$  ( $p_H = 7.3$ ), le pyrocatechol formé, lui aussi, avec le cuivre un complexe incolore correspondant à un dégagement de  $CO_2$  de  $37 \mu l$ , soit  $0.82$  mol de  $CO_2$  dégagé par mol de pyrocatechol.

Il est difficile de dire si le dégagement de  $CO_2$ , plus faible que dans le cas de l'adrénaline, dépend de phénomènes de dissociation ou de différences entre les modes de formation des composés adrénaline-Cu et pyrocatechol-Cu.

### 3. *Essais contenant d'autres ions métalliques que Cu*

a. Le fer ajouté à la solution de bicarbonate à l'état de sulfate ferrique, à la concentration finale  $10^{-3} m$ , en présence d'air, donne lieu à la formation d'un précipité jaune; en atmosphère de  $CO_2$  pur ( $p_H = 6.4$ ), après le renversement d'adrénaline, le mélange réactionnel prend une teinte violette et l'on observe un dégagement de  $CO_2$  de  $13 \mu l$  soit  $0.29$  mol de  $CO_2$  dégagé par mol d'adrénaline.

Le fer, comme le Cu, est capable d'entrer en combinaison avec l'adrénaline, en atmosphère exempte d'oxygène.

b. Les ions  $Ni^{++}$  et  $Mn^{++}$  ajoutés respectivement à la solution de bicarbonate à l'état de  $Cl_2Ni$  et  $Cl_2Mn$ , à la concentration finale de  $10^{-3} m$  ne donnent lieu après renversement de l'adrénaline en atmosphère de  $CO_2$  pur, ni à un changement de coloration de la solution ni à aucun dégagement gazeux. Ceci semblerait indiquer que Ni et Mn ne se combinent pas à l'adrénaline si les mêmes essais, effectués en présence d'oxygène moléculaire (dont il sera question plus loin), ne démontrent le contraire.

## II. Autoxydation des composés adrénaline-métal en atmosphère contenant de l'oxygène

### 1. Inaptitude de l'adrénaline à s'autoxyder en l'absence de sels de métaux lourds

Si en atmosphère d' $O_2 + 5\% CO_2$ , on renverse  $0.02$  ml de solution de chlorhydrate d'adrénaline  $10^{-1} m$  dans  $2$  ml de solution de  $CO_2NaH$   $0.03 m$  ( $p_H = 7.3$ ) non additionnée de sels de métaux lourds on ne constate ni variation manométrique appréciable, ni changement d'aspect des solutions qui restent incolores pendant au moins  $45$  minutes à  $37^\circ$ . La teinte rosée et les faibles variations manométriques se développant ultérieurement doivent être mises sur le compte d'une oxydation de l'adrénaline dépendant des traces d'impuretés métalliques présentes dans les essais.

### 2. Autoxydation de la combinaison adrénaline-Cu

Si l'expérience précédente est répétée en utilisant une solution de  $CO_2NaH$  additionnée de  $Cl_2Cu$  à une concentration moléculaire au moins égale à la moitié de la concentration moléculaire de l'adrénaline, que ce soit en atmosphère  $O_2 + 5\% CO_2$  ( $p_H = 7.3$ ) ou en atmosphère  $50\% O_2 + 50\% CO_2$  ( $p_H = 6.4$ ), on constate, immédiatement après le renversement de l'adrénaline, un dégagement gazeux brutal suivi d'une absorption gazeuse un peu plus lente. A cette phase de variations manométriques dont la durée est d'environ  $20-25$  minutes, à  $37^\circ$ , succède, pendant une heure environ, une phase de stabilité manométrique pratiquement totale (Fig. 3).

Ces phénomènes s'accompagnent de la dissolution totale ou partielle (suivant le rapport des concentrations Cu/adrénaline) du précipité de  $CO_2Cu$  et de l'apparition d'une coloration d'abord jaune paille puis rose de plus en plus accentué, se stabilisant au rouge

\* Pyrocatechol provenant de "The British Drug Houses".

cerise. Des mesures photométriques effectuées sur des essais préparés à 18°, montrent comme l'indique le Tableau II, qu'à cette température la teinte des essais atteint son intensité maximum au bout d'environ 1 heure et reste stable au moins 1 heure.

TABLEAU II  
STABILISATION DE L'OXYDATION DE L'ADRENALINE AU STADE ADRENOCHROME  
EN TAMpon BICARBONATE

Adrénaline et  $\text{Cl}_3\text{Cu} 0.5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$

Bicarbonate de Na  $0.03 \text{ m}$

Atmosphère  $\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2, \text{pH} = 7.3$

Les temps sont comptés à partir de l'introduction de l'adrénaline.

La réaction est suivie à l'aide de l'électrophotomètre de P. MEUNIER.

LECTURES PHOTOMÉTRIQUES

Temps en minutes	Ecran bleu	Ecran vert	Ecran jaune	Ecran rouge
2'	86	47	25	11
9'	228	150	59	10
34'	555	320	127	24
44'	575	329	149	39
59'	585	337	155	38
74'	590	339	155	40
99'	587	339	157	41
114'	585	339	156	41

Le spectre ultra-violet de la solution rouge stabilisée (Fig. 2) présente deux maxima d'absorption à  $300 \text{ m}\mu$  et  $490 \text{ m}\mu$  indiquant que le produit d'oxydation formé est de l'adrénochrome<sup>4</sup>. Le spectre ultra-violet de l'adrénaline dont nous nous sommes servis dans ces expériences (Fig. 1) est reproduit à titre de comparaison.

Fig. 1. Spectre ultra-violet d'une solution de chlorhydrate d'adrénaline ( $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ ) dans l'eau bidistillée  $\text{pH} = 3-4$ ; Maximum à  $2790 \text{ \AA}$  (cf. LOPEZ<sup>11</sup>  $2780 \text{ \AA}$ )

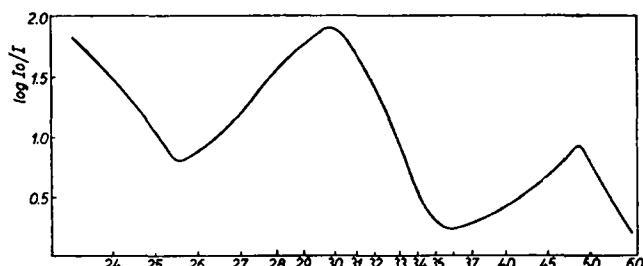
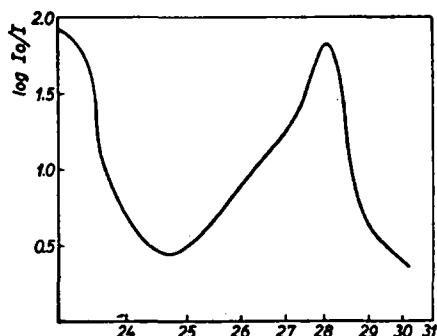


Fig. 2. Spectre ultra-violet de la substance rouge stabilisée, 50 minutes après l'introduction d'adrénaline ( $t = 18^\circ$ ). Le mélange bicarbonate  $0.6 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ ,  $\text{Cl}_3\text{Cu}$  et adrénaline  $0.2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$  est saturé de:  $(\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2) - \text{pH} = 7.3$ . Les deux maxima  $300 \text{ m}\mu$  et  $490 \text{ m}\mu$  correspondent à ceux de l'adrénochrome (cf. S. ELLIS<sup>4</sup>).

Nous avons tenté d'évaluer le  $CO_2$  dégagé et l'oxygène consommé au cours de cette réaction d'oxydation: la dénivellation manométrique observée à la phase de stabilisation est une résultante entre un dégagement de gaz carbonique et une absorption d'oxygène (Fig. 3). Si l'on fait l'hypothèse que la quantité de  $CO_2$  dégagé est, toutes choses égales d'ailleurs, la même en présence ou en l'absence d'oxygène, autrement dit si l'on admet que le  $CO_2$  dégagé correspond uniquement à la formation du complexe d'adrénaline-Cu, on peut calculer que la formation du corps rouge relativement stable a nécessité la consommation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline (Tableau III) (soit 4 atomes d'hydrogène mobilisés) (Fig. 5).

Ce résultat est confirmé si, indépendamment de toute hypothèse, à l'aide de deux récipients manométriques de même capacité, contenant des volumes de mélange réactionnel respectivement égaux à 4 ml et 1.5 ml on mesure la dénivellation manométrique résultante de la phase de stabilisation et on calcule  $x_{O_2}$  et  $x_{CO_2}$  d'après les relations classiques établies par O. WARBURG<sup>22</sup> (Méthode indirecte), Tableau III.

TABLEAU III

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN ADRÉNOCHROME EN ATMOSPHÈRE ( $O_2 + 5\% CO_2$ ),  
 $pH = 7.3$ , EN PRÉSENCE DE CUIVRE

— Concentration en adrénaline =  $10^{-3} m$

— Tampon bicarbonate Na 0.03 m.

A = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

B = molécules d'anhydride carbonique dégagées par molécule d'adrénaline.

Les valeurs affectées d'un astérisque correspondent à des mesures effectuées à l'aide de la méthode des doubles manomètres.

Concentration moléculaire en $Cl_2 Cu$	$x_{O_2}$	A	$x_{CO_2}$	B
$0.5 \cdot 10^{-3}$	50	1.11	47	1.05
$1 \cdot 10^{-3}$	50	1.11	48	1.07
	44*	0.97*	47*	1.02*
	47*	1.03*	45*	0.99*
$2 \cdot 10^{-3}$	44	0.98	41	0.91

Ainsi les mesures manométriques et spectrographiques concourent à montrer que l'oxydation de l'adrénaline catalysée par le cuivre, en présence d'oxygène moléculaire en solution tampon bicarbonate, à  $pH$  voisin de la neutralité, à 37°, aboutit à la formation d'adrénochrome.

En atmosphère d'oxygène pur ( $pH = 8$ ), la réaction évolue en gros de la même façon qu'en atmosphère  $O_2 + 5\% CO_2$ , ( $pH = 7.3$ ).

En atmosphère d'air ( $pH = 8$ ) la réaction se stabilise moins bien au stade rouge et évolue assez rapidement vers le brun; ceci joint au fait que les essais contenant de fortes concentrations en adrénaline ( $7.5 \cdot 10^{-3} m$ ), même en présence d'une atmosphère  $O_2 + 5\% CO_2$ , évoluent assez rapidement vers le brun, semble indiquer que la pression partielle d'oxygène interviendrait.

Alors que la réaction de formation de la combinaison adrénaline-Cu est pratiquement insensible aux variations de températures entre 10° et 37°, la formation d'adrénochrome est influencée par la température.

C'est ainsi que les valeurs de  $x_{O_2}$  25 minutes sont les suivantes lorsque la température passe de 10° à 21° et à 37° :

Température	10°	21°	37°
$x_{O_2}$ (25 minutes)	17.4	33	45

La substitution de bicarbonate de potassium au bicarbonate de sodium ne change rien aux résultats de l'ensemble des expériences qui viennent d'être décrites.

De même que la combinaison adrénaline-Cu est autoxydable, de même la combinaison pyrocatechol-Cu est autoxydable en milieu tampon bicarbonate à  $pH$  voisin de la neutralité. Ces deux processus se distinguent nettement l'un de l'autre en ce sens que

— l'autoxydation du complexe adrénaline-Cu aboutit à la formation d'un composé rouge relativement stable (adrénochrome) correspondant à la consommation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline en l'espace de 20 minutes, tandis que

— l'autoxydation du complexe pyrocatechol-Cu aboutit à la formation d'un composé vert correspondant à une consommation d'oxygène beaucoup plus lente (environ 0.48 molécule d' $O_2$  par molécule de pyrocatechol, en 20 minutes) se prolongeant plus de deux heures sans que l'on n'assiste à une phase bien différenciée de stabilisation.

La comparaison entre l'autoxydation de la combinaison adrénaline-Cu et celle de la combinaison pyrocatechol-Cu dans les mêmes conditions, montre l'individualité du processus d'autoxydation du composé adrénaline-Cu et notamment l'importance de la chaîne latérale de la molécule d'adrénaline.

### 3. Essais en présence de fer, nickel ou manganèse

La combinaison adrénaline-Fe violette, précédemment décrite, susceptible de se former en absence d'oxygène, est autoxydable. Au cours de cette autoxydation la teinte évolue au rose puis au "lie de vin"; la consommation d'oxygène est lente et faible (Fig. 3).

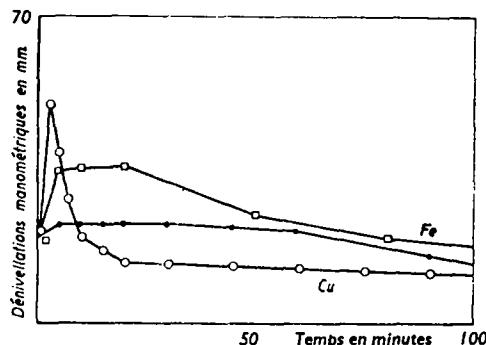
Comme il a été dit, aucune combinaison adrénaline-Mn ou adrénaline-Ni n'a été mise en évidence par nos expériences manométriques réalisées en l'absence d' $O_2$ . Cependant, si ces mêmes expériences sont répétées en présence d'oxygène, on constate que le mélange réactionnel fixe de l'oxygène à une vitesse incomparablement plus grande que celui non additionné de métal lourd.

Quand le manganèse est introduit sous forme de  $Cl_2Mn$  dans la solution de bicarbonate, la solution incolore devient successivement rose, rouge, puis de nouveau rose quelques minutes après le renversement de l'adrénaline; il ne se manifeste, initialement, aucun dégagement gazeux; ensuite apparaît une absorption gazeuse dont la vitesse reste constante pendant une heure environ; puis un dégagement gazeux correspondant sans doute à une décarboxylation (Fig. 4).

Le nickel, introduit dans la solution de bicarbonate de sodium sous forme de  $Cl_2Ni$ , déclanche aussi quelques minutes après le renversement de l'adrénaline, une oxydation de cette dernière se manifestant par une fixation d'oxygène et par une coloration rouge. Ultérieurement la teinte vire au jaune paille et l'absorption gazeuse, fait place, comme dans le cas du Mn, à un dégagement gazeux dépendant sans doute, là aussi, d'une décarboxylation (Fig. 4).

Il convient de souligner que les courbes des Fig. 3 et 4 donnent simplement l'allure du phénomène observé et ne permettent aucun calcul d'absorption ou de dégagement gazeux.

L'ensemble des essais réalisés en solution tampon bicarbonate à  $pH$  voisin de la neutralité, en atmosphère contenant de l'oxygène, montrent que le cuivre occupe une place tout à fait à part en ce qui concerne son aptitude à se combiner à l'adrénaline



Dénivellations manométriques en mm mesurées en fonction du temps au cours de l'oxydation de l'adrénaline  $10^{-3} \text{ m}$ , introduite au temps 0 dans un tampon bicarbonate  $\text{pH} = 7.3$  ( $\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ )

Fig. 3

—●— sans addition de métal lourd  
—○— en présence de  $\text{Cl}_2\text{Cu} 10^{-3} \text{ m}$   
—□— en présence de  $(\text{S0}_4)_2\text{Fe}_2^{+} 10^{-3} \text{ m}$

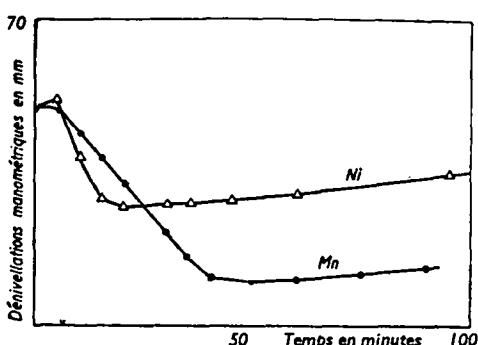


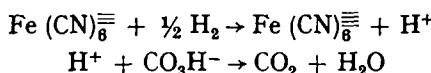
Fig. 4

—△— en présence de  $\text{Cl}_2\text{Ni} 10^{-3} \text{ m}$   
—●— en présence de  $\text{Cl}_2\text{Mn} 10^{-3} \text{ m}$

pour donner une combinaison adrénaline-métal autoxydable à partir de laquelle se forme d'une façon relativement stable, de l'adrénochrome. Parmi les métaux essayés, le fer possède les propriétés catalytiques les plus faibles. L'action du nickel et du manganèse ne se manifeste qu'après une certaine période d'induction. Dans ces deux derniers cas les transformations de la molécule d'adrénaline dépassent rapidement le stade adrénochrome.

### III. Oxydation de l'adrénaline par le ferri-cyanure de potassium en atmosphère exempte d'oxygène

Le potentiel d'oxydo-réduction de l'adrénaline<sup>1</sup> étant très élevé  $E_{\text{O'}} = + 0.380 \text{ v}$  ( $\text{pH} = 7.0$ ,  $t = 30^\circ$ ), peu de systèmes oxydo-réducteurs sont capables de la déshydrogénier en absence d'oxygène. Le système ferri-ferrocyanure est du nombre<sup>9</sup>. En milieu bicarbonaté et en absence d'oxygène moléculaire, à chaque molécule de ferricyanure réduite, correspond une molécule de gaz carbonique libérée, d'après la relation<sup>7</sup>:



WAJZER<sup>20</sup> a déjà utilisé cette réaction pour préparer de l'adrénochrome en 1946.

Il opérait avec une concentration en ferri-cyanure 10 fois supérieure à celle de l'adrénaline, en atmosphère d'azote pur ( $\text{pH} = 8.0$ ), à  $25^\circ$ . En 10-12 minutes il constatait un dégagement de  $\text{CO}_2$  de 3.9 molécules de  $\text{CO}_2$  par molécule d'adrénaline et concluait que 4 H avaient été mobilisés en même temps que se formait une substance rouge devant être l'adrénochrome.

Nous avons repris ces expériences à  $37^\circ$  à différents  $\text{pH}$  (6.4 et 7.3) et nous avons constaté qu'avec une concentration en adrénaline de  $10^{-3} \text{ m}$  et une concentration en ferri-cyanure de  $10^{-2} \text{ m}$ , le dégagement de  $\text{CO}_2$ , en 10 minutes, est de 5 molécules de  $\text{CO}_2$  par molécule d'adrénaline et ne dépasse pas cette valeur pendant plus de 50 minutes.

A  $p_H = 8$ , à  $37^\circ$ , le dégagement correspond à:

3.3 molécules  $CO_2$ /molécule adrénaline en 10 minutes

4.4 molécules  $CO_2$ /molécule adrénaline en 50 minutes

5.7 molécules  $CO_2$ /molécule adrénaline en 110 minutes

Il est certain qu'à  $p_H = 8$  la rétention de  $CO_2$  dans le bicarbonate fausse l'interprétation des résultats.

Nous avons recherché si en utilisant une concentration en ferricyanure égale à la concentration théorique nécessaire pour obtenir la mobilisation de 4 H on obtenait un dégagement de  $CO_2$  de 4 mol  $CO_2$ /mol d'adrénaline. Dans ce but, pour une même concentration en adrénaline ( $10^{-3} m$ ), nous avons fait varier la concentration en ferricyanure de  $10^{-4} m$  à  $10^{-2} m$ . Les dégagements de  $CO_2$  mesurés dans ces conditions sont donnés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV  
OXYDATION DE L'ADRÉNALINE PAR LE FERRICYANURE DE POTASSIUM

Température =  $37^\circ$

Adrénaline  $10^{-3} m$

Tampon bicarbonate 0.03  $m$

Atmosphère  $N_2 + 5\% CO_2$ ,  $p_H = 7.3$

Les chiffres du tableau indiquent le nombre de molécules de gaz carbonique dégagées par molécule d'adrénaline.

Concentration moléculaire en ferricyanure de potassium

Temps en minutes	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$10^{-2}$
5	0.22 rosé	1.3 rose +	2.5 rose - +	3.9 rose + + +	4.9 rouge	4.9 rouge	4.9 rouge
200'	—	1.5 citron	2.7 orange +	4.2 orange + +	5.2 rouge orange	6.2 rouge	7.0 rouge

En fait le dégagement de  $CO_2$  immédiatement maximum est bien atteint à partir d'une concentration en ferricyanure 4 fois supérieures à celle de l'adrénaline. Il est remarquable toutefois que ce dégagement correspond non pas à 4 mol  $CO_2$ /mol d'adrénaline mais à 5 mol  $CO_2$ /mol d'adrénaline, comme si, à côté des 4 molécules de  $CO_2$  déplacées par la mobilisation de 4 H à partie d'une même molécule d'adrénaline, il y avait une molécule de  $CO_2$  issue d'un phénomène de décarboxylation.

L'oxydation de l'adrénaline par le ferricyanure de potassium va plus loin que l'oxydation de l'adrénaline par le système (Cu;  $O_2$ ): la substance rouge obtenue n'est probablement pas l'adrénochroïne mais un dérivé de l'adrénochroïne.

## DEUXIÈME PARTIE

## COMPARAISON ENTRE LES RÉACTIONS D'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN SOLUTION TAMPON BICARBONATE ET EN SOLUTION TAMPON PHOSPHATE

## I. Autoxydation de la combinaison adrénaline-cuivre

Les Tableaux V et VI indiquent les différences essentielles entre les essais réalisés en solution tampon bicarbonate d'une part et ceux réalisés en tampon phosphate<sup>3</sup> d'autre part

## 1. en ce qui concerne la coloration:

- en solution tampon bicarbonate l'oxydation de l'adrénaline aboutit à la formation d'un composé rouge vif relativement stable (adrénochrome)
- en solution tampon phosphate, l'oxydation dépasse rapidement le stade rouge et donne lieu à l'apparition d'une teinte brun madère.

## 2. en ce qui concerne l'oxygène consommé:

- en solution tampon bicarbonate, la formation du corps rouge, relativement stable, correspond à la fixation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline.
- en solution tampon phosphate, la dégradation oxydative de l'adrénaline aboutit à une fixation de 3 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline.

TABLEAU V

COMPARAISON ENTRE LA COLORATION DES PRODUITS DE L'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE ÉVOLUANT EN SOLUTION TAMPON PHOSPHATE OU EN SOLUTION TAMPON BICARBONATE, EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS MÉTAUX LOURDS

Concentration en adrénaline:  $10^{-3} \text{ m}$

Concentration en ion métallique:  $10^{-3} \text{ m}$

bic = essais en présence de tampon au bicarbonate Na et en atmosphère  $\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ ;  $\text{pH} = 7.3$   
phos = essais en présence de tampon au phosphate K, 0.2 m, en atmosphère d'oxygène pur;

$\text{pH} = 7.3$

Température =  $18^\circ$

Incolore = o; rose très pâle = r; rose pâle = r+; rose vif = r++; rouge = r+++; jaune = j; saumon pâle = s; saumon accentué = s+; violet = v; lie de vin = lv; brun madère = m; essais troubles = t

## COLORATION DES ESSAIS

Temps en minutes	Cu		Ni		Mn		Fe		O	
	bic	phos	bic	phos	bic	phos	bic	phos	bic	phos
1	—	r+	—	o	—	o	r+	v	—	o
2	r+	—	r+	—	o	—	—	—	o	—
3	s	—	r++	—	r	—	—	—	o	—
13	r++	r++	r++	—	r+	—	lv	—	—	—
16	—	m	—	s+	—	s	—	v.t.	—	o
55	r+++	m	r++ . j.	—	r+++	—	—	—	o	—
76	—	m	—	j	—	s+	—	v.t.	—	j
85	r+++	—	j	—	r++	—	lv	—	o	—

Tous les ions métalliques ont été introduits sous forme de chlorure, sauf Fe sous forme de  $(\text{SO}_4)_3 \text{ Fe}_2$

Bibliographie p. 488.

TABLEAU VI

COMPARAISON ENTRE LE NOMBRE DE MOLÉCULES D'OXYGÈNE CONSOMMÉES PAR MOLÉCULE D'ADRÉNALINE EN SOLUTION TAMPON BICARBONATE OU EN SOLUTION TAMPON PHOSPHATE, À 37°, EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS MÉTAUX LOURDS

Concentration enadrénaline et en ions métal lourd:  $10^{-3} \text{ m}$

Tampon	pH	Durée de la réaction en minutes	Cu	Ni	Mn	Fe	Mg	O
Phosphate	7.6	8	1	0.14	0	0	0	0
Phosphate	7.6	15	2	0.42	0.15	0	0	0
Phosphate	7.6	25	2.4	0.94	1.05	1.12	0.07	0.07
Phosphate	7.6	85	3	3.6	4.2	1.57	1.02	1.02
Phosphate	7.6	105	3.04	3.9	4.3	2.0	1.3	1.3
Phosphate	7.3	25	2.2	—	—	—	—	0.05
Bicarbonate	7.3	25	1	? *	0.6 *	~ 0	—	0
Bicarbonate	7.3	105	1	? *	? *	—	—	0.2

Les chiffres en caractères gras indiquent que la consommation d'oxygène a atteint sa phase de stabilisation.

\* Valeurs impossibles à calculer ou incertaines du fait que les mesures manométriques sont la résultante entre l'oxygène fixé et un dégagement de gaz carbonique (décarboxylation?) qui s'amorce.

De plus dans des essais contenant initialement un mélange phosphate (0.2 m) + bicarbonate (0.02 m) l'oxydation de l'adrénaline (catalysée par Cu, en atmosphère  $O_2 + 5\% CO_2$  à  $pH = 7.3$ ) ne se stabilise pas au stade adrénochrome, mais évolue en 15 minutes vers une teinte madère. Dans ces conditions les mesures manométriques sont impossibles du fait de l'action réciproque des phosphates sur les bicarbonates<sup>2, 18</sup>.

Enfin l'introduction de phosphate (0.04 m,  $pH = 7.3$ ) dans la solution d'adrénochrome évoluant depuis 30 minutes en tampon bicarbonate seul ( $pH = 7.3$ ) fait virer le mélange réactionnel au brun madère alors que l'essai témoin non additionné de phosphate reste rouge vif dans le même temps.

L'ensemble de ces faits montre que, toutes choses égales d'ailleurs, l'oxydation de l'adrénaline est fortement influencée par la nature du tampon en présence duquel elle évolue (cf. oxydation des sucres<sup>10, 21</sup>): l'oxydation se stabilise au stade adrénochrome en solution tampon bicarbonate, tandis qu'en solution tampon phosphate, elle se stabilise à un stade brun-madère ultérieur au stade adrénochrome.

Des expériences analogues effectuées en substituant le pyrocatechol à l'adrénaline, montrent que ces deux tampons n'exercent pas vis à vis de l'oxydation du pyrocatechol une action analogue à celle qu'ils exercent vis à vis de l'oxydation de l'adrénaline. En tampon phosphate comme en tampon bicarbonate l'oxydation du pyrocatechol aboutit à la formation de produits d'une même teinte verdâtre; de plus, la consommation d'oxygène, dans le cas des deux tampons plus lente qu'en présence d'adrénaline, est nettement moins rapide en tampon phosphate qu'en tampon bicarbonate (Tableau VII).

## II. Oxydation de l'adrénaline catalysée par différents autres métaux (Tableaux V et VI)

### 1. Nickel

La coloration des essais en tampon bicarbonate, en présence de nickel, évolue vers le jaune en

Bibliographie p. 488.

TABLEAU VII  
OXYDATION DU PYROCATÉCHOL

Température = 37°

Concentration en pyrocatechol et en  $\text{Cl}_3\text{Cu}$ :  $10^{-3} \text{ m}$

Phos. = tampon phosphate (0.2 m); atmosphère  $\text{O}_2$  pur;  $\text{pH} = 7.3$

Bic. = tampon bicarbonate 0.03 m; atmosphère  $\text{O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ ;  $\text{pH} = 7.3$

MOLÉCULES D'OXYGÈNE CONSOMMÉES PAR MOLÉCULE DE PYROCATÉCHOL

Tampon	en 20 minutes	en 1 heure	en 2 heures
Phosphate	0.12	0.33	0.65
Bicarbonate	0.48	0.9	1.14

Les essais témoins, sans  $\text{Cl}_3\text{Cu}$ , restent incolores et ne donnent lieu à aucune variation manométrique pendant au moins 2 heures.

passant par des teintes roses. En tampon phosphate il en est de même, si ce n'est que la teinte rose paraît plus fugace et la teinte jaune plus soutenue.

Nos mesures manométriques en tampon bicarbonate ne permettent pas de se faire une idée exacte de la consommation d'oxygène, car, il est évident qu'un dégagement gazeux, dépendant sans doute d'une décarboxylation, interfère avec la fixation d'oxygène. En tampon phosphate au contraire, comme le gaz carbonique éventuellement formé se fixe sur la potasse concentrée contenue dans les ampoules centrales des récipients manométriques, la consommation d'oxygène est mesurable, elle atteint au moins 4 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline. *Contrairement à ce qui se passe dans le cas d'une catalyse par le cuivre, aucune stabilisation de la réaction d'oxydation n'est décelable dans aucune des conditions étudiées.*

### 2. Manganèse

Les remarques faites à propos de la catalyse par le nickel sont dans l'ensemble valables pour les essais catalysés par le manganèse.

### 3. Fer

Le fer initialement introduit sous forme de  $\text{SO}_4\text{Fe}$  ou de  $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}_3$  donne lieu, en tampon bicarbonate, à la formation de corps dont la coloration évolue du rose au "lie de vin" et, en tampon phosphate, du violet au violet pâle.

Là non plus on n'assiste à aucune stabilisation du métabolisme gazeux qui évolue sensiblement de la même façon que dans les essais témoins non additionnés de métal.

## III. Oxydation de l'adrénaline sans intervention d'oxygène moléculaire

Les réactions d'oxydation de l'adrénaline par le ferricyanure de potassium en solution tampon bicarbonate et en solution tampon phosphate se distinguent essentiellement par la différence des colorations observées.

En tampon bicarbonate la solution devient instantanément rouge vif (adrénochrome ou substance voisine), d'une façon relativement très stable plus d'une heure à 37°,  $\text{pH} = 7.3$ .

En tampon phosphate, la solution devient également instantanément rouge mais, évolue en l'espace de 5 à 10 minutes vers une teinte brun-madère. Bien entendu en présence de phosphate il n'est possible d'enregistrer aucune variation manométrique.

Dans ce cas, comme dans celui de l'oxydation de l'adrénaline par le système cuivre-oxygène, l'oxydation de l'adrénaline est influencée par la présence de phosphate.

## DISCUSSIONS

## I. INTERPRÉTATION DE NOS RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

La molécule d'adrénaline dont les caractères dépendent de deux fonctions phénol d'une part et de la structure particulière de sa chaîne latérale d'autre part est capable de subir des déshydrogénations donnant lieu à la formation de produits dont certains sont déjà connus:

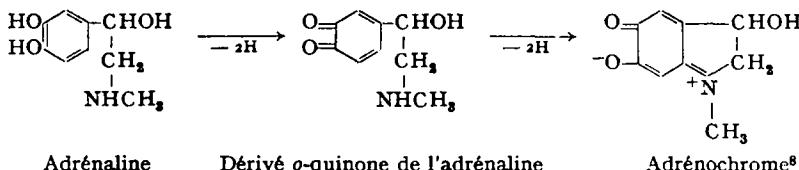


Fig. 5

— forme quinonique de l'adrénaline par départ de 2 H

— adrénochrome, substance rouge de structure indolique, par départ de 4 H (Fig. 5).

La dégradation oxydative de l'adrénaline dépasse généralement le stade adrénochrome et aboutit à la formation d'une série de substances brunes plus ou moins bien définies.

Il est possible d'obtenir la déshydrogénéation de l'adrénaline en l'absence d'oxygène moléculaire par action d'un système oxydo-réducteur plus positif que le système adrénaline-quinone; c'est ce que WAJZER<sup>20</sup> et nous-mêmes avons réalisé avec le ferricyanure de potassium en solution tampon bicarbonate. Cette déshydrogénéation aboutit à la formation d'adrénochrome ou d'un de ses proches dérivés.

L'oxygène moléculaire en présence de métal, le cuivre notamment, (cf. cuivre des phénolases végétales) permet la déshydrogénéation de l'adrénaline en adrénochrome.

La cinétique des réactions de transformation de l'adrénaline en adrénochrome dépend du  $p_H$ , de la température et de la nature du système oxydant. La stabilisation de la réaction d'oxydation au stade adrénochrome ou son évolution rapide au-delà du stade adrénochrome dépendent de la nature de la solution tampon au sein de laquelle a lieu la réaction.

Le rôle des tampons bicarbonate et phosphate ressort particulièrement de la comparaison entre expériences d'oxydation de l'adrénaline par le système ferri-ferrocyanure ou par le système (cuivre-O<sub>2</sub>), en solution bicarbonate d'une part et en solution tampon phosphate d'autre part.

Si l'on rejette la possibilité d'une action stabilisatrice du bicarbonate qui dépendrait d'un mécanisme difficile à concevoir, on est amené à interpréter le rôle des tampons d'après *l'hypothèse d'une entrée en combinaison des phosphates avec un terme intermédiaire de la dégradation oxydative de l'adrénaline*, cette intervention des phosphates n'aurait certainement pas lieu avant le stade adrénochrome, puisque les essais effectués en présence de phosphate passent toujours par une phase rouge avant de devenir brun-madère et puisque les phosphates ajoutés à la substance rouge obtenue par les systèmes oxydant (cuivre-oxygène) ou ferri-ferrocyanure en solution tampon bicarbonate font virer la substance rouge au brun-madère. Cette intervention des phosphates porterait soit sur l'adrénochrome lui-même, soit sur un de ses dérivés de dégradation très proches.

II. INTERPRÉTATION DE L'ACTIVITÉ INHIBitrICE DE L'ADRÉNOCHROME  
DANS LES RÉACTIONS DE GLYCOLYSE

ENGELHARDT ET SAKOV; WAJZER; RANDALL, O. MEYERHOF et coll. ont montré que l'adrénochrome était un inhibiteur de la glycolyse. Il nous paraît intéressant de discuter le mécanisme de cette action inhibitrice à la lumière de nos propres expériences.

*1. Expériences d'ENGELHARDT ET SAKOV<sup>5</sup>*

Ces auteurs étudiant la réaction enzymatique de trans-estérisation entre adénosinetriphosphate et ester de NEUBERG (fructose-6-phosphate) sous l'action de la phosphophérase de l'ester de NEUBERG, qui aboutit à la formation de l'hexosediphosphate, ont montré que cette réaction, réalisée en tampon borate d'après PALITZCH,  $pH = 7.0$ ;  $t = 37^\circ$ , était inhibée par un grand nombre de substances comprenant:

*a. des indicateurs d'oxydo-réduction de potentiel  $E_O' > + 0.05 v$ , sous forme oxydée (les formes réduites sont inactives)*

2,6-dibromophénolindophénol	$E_O' = + 0.218$ à $pH = 7.6$
2,6-dichlorophénolindophénol	$E_O' = + 0.217$ à $pH = 7.6$
<i>o</i> -crésolindophénolindophénol	$E_O' = + 0.191$ à $pH = 7.6$
<i>m</i> -crésolindophénolindophénol	$E_O' = + 0.208$ à $pH = 7.6$
1-naphto-2-sodiumsulphonate-indo-2,6-dichlorophénol	$E_O' = + 0.119$ à $pH = 7.6$
b. quinone et 2-méthyle-1,4-naphtoquinone	$E_O' = + 0.07$ à $pH = 7.0$
c. acide déshydroascorbique	$E_O' = + 0.06$ à $pH = 7.0$
d. alloxane	$E_O' = + 0.06$ à $pH = 7.0$
e. systèmes polyphénols-polyphénoloxydase, notamment système adrénaline phénolase → <i>adrénochrome</i> ; et système polyphénols-cytochromes-cytochromoxydase.	

Les effets observés ne sont pas tous directement en rapport avec la valeur du potentiel d'oxydo-réduction des substances essayées; c'est ainsi que:

- le thymol-indophénol,  $E_O' = + 0.174$  à  $pH = 7.6$ , est peu inhibiteur
- L'ac. déshydroascorbique,  $E_O' = + 0.07$  à  $pH = 7.0$  est assez fortement inhibiteur
- L'alloxane,  $E_O' = + 0.06$  à  $pH = 7.0$  est fortement inhibiteur (cf.<sup>6</sup>)

A.T.P. et ester de NEUBERG sont des antagonistes des substances inhibitrices, mais l'hexosediphosphate ne l'est pas.

ENGELHARDT ET SAKOV reconnaissent une certaine dépendance entre activité inhibitrice et nature chimique de l'inhibiteur, mais concluent néanmoins à une influence d'oxydation spécifique provoquant le blocage de l'enzyme de trans-estérisation qui commande l'"Effet Pasteur".

*2. Expériences de WAJZER<sup>20</sup>*

Travaillant dans le même sens qu'ENGELHARDT ET SAKOV, cet auteur montre que la formation d'hexosediphosphate par le muscle de grenouille à partir soit de glycogène soit d'ester d'Emden, est inhibée par l'adrénochrome (substance normalement présente dans les muscles squelettiques) alors que la synthèse du glycogène à partir de l'ester de Cori (glucose-1-monophosphate), est accélérée par l'adrénochrome ( $9 \cdot 10^{-7} m$ ); ferri et ferro-cyanure ( $2 \cdot 10^{-6} m$ ) sont sans effet. A noter que dans les expériences de ENGELHARDT ET SAKOV le ferri-cyanure à la concentration de  $0.46 \cdot 10^{-3} m$  provoquait une inhibition de 50% et, à la concentration de  $1.5 \cdot 10^{-3} m$ , une inhibition de 80%.

WAJZER suppose que l'adrénochrome serait le coferment de l'"Effet Pasteur".

A propos de l'effet accélérateur de l'adrénochrome sur la synthèse du glycogène ayant lieu sans que le phosphate libéré apparaisse sous forme de phosphate minéral, WAJZER pense qu'il y a une trans-phosphorylation et se demande quel est l'accepteur de phosphate.

### 3. *Expériences de RANDALL<sup>15, 17</sup>, O. MEYERHOF et coll.<sup>12, 13, 14, 15</sup>*

Ces auteurs ont mis en évidence l'inhibition de la glycolyse des homogénéisats de cerveau par l'adrénochrome  $4 \cdot 10^{-6} \text{ m}$  et aussi par l'*o*-naphtoquinone; ces inhibitions se manifestent par une diminution de la phosphorylation des hexoses.

Ils les attribuent à un blocage de l'hexokinase ou de la phospho-hexokinase.

Là encore, les concentrations inhibitrices en adrénochrome sont d'autant plus grandes que les quantités d'A.T.P. présentes sont plus élevées.

### 4. *Interprétation du rôle inhibiteur de l'adrénochrome*

L'effet inhibiteur de l'adrénochrome a généralement été considéré comme dépendant exclusivement de ses propriétés oxydantes, en raison d'un certain parallélisme entre son action et celle de différents systèmes oxydo-réducteurs.

Si l'on tient compte, toutefois, du fait que les systèmes oxydo-réducteurs capables d'inhiber la glycolyse dans les expériences citées n'ont pas une activité inhibitrice dans tous les cas en rapport avec la valeur de leur potentiel d'oxydo-réduction et qu'elles présentent toutes, par contre, une structure cétonique ou quinonique, et si l'on tient compte également du fait que A.T.P.<sup>5, 15</sup> et ester de Neuberg<sup>5</sup> sont antagonistes de l'action inhibitrice de l'adrénochrome, on est conduit à se demander si l'adrénochrome n'interviendrait pas autrement que comme système oxydo-réducteur. La possibilité que nous venons de mettre en évidence, d'une réaction des phosphates avec l'adrénochrome, ou un de ses proche dérivés, dans des conditions physiologiques de température et de  $\text{pH}$ , nous incite à penser que l'adrénochrome interviendrait comme accepteur de phosphate, la stabilité de la combinaison adrénochrome-phosphate dépendrait des conditions du milieu. Notre hypothèse fait de l'adrénochrome une substance capable de dévier les réactions de phosphorylation des sucres.

## RÉSUMÉ

I. En solution tampon bicarbonate l'autoxydation de l'adrénaline dépend de la formation d'une combinaison adrénaline-métal autoxydable.

Il est possible de dissocier la réaction de formation de la combinaison adrénaline-métal de la réaction d'oxydation de cette combinaison:

A  $\text{pH} = 7.3$  et  $t = 37^\circ$  le complexe adrénaline-cuivre correspond à un atome de cuivre pour deux molécules d'adrénaline.

Ce complexe adrénaline-cuivre présente une aptitude remarquable à l'autoxydation; cette autoxydation se stabilise après consommation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline et formation d'adrénochrome.

En tampon bicarbonate et en l'absence d'oxygène moléculaire, l'adrénaline peut être oxydée par un système oxydo-réducteur plus positif que le système adrénaline, le ferri-cyanure de potassium par exemple. La vitesse d'oxydation maximum est obtenue quand l'adrénaline est en présence d'une concentration moléculaire de ferri-cyanure quatre fois supérieure à sa propre concentration. Le produit d'oxydation est soit l'adrénochrome lui-même soit un de ses proches dérivés.

II. De la *comparaison* entre les réactions d'oxydation de l'adrénaline en solution tampon bicarbonate et celles antérieurement décrites<sup>8</sup> en solution tampon phosphate, se dégagent les faits suivants:

1. En présence de cuivre et d'oxygène moléculaire:

a. Tampon bicarbonate: stabilisation de l'oxydation au stade adrénochrome; consommation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline; formation d'adrénochrome.

b. Tampon phosphate: stabilisation de l'oxydation bien au delà du stade adrénochrome après consommation de trois molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline; formation de substance brun-madère.

2. En présence de ferri-cyanure de potassium, en atmosphère exempte d'oxygène: la réaction comme dans le cas précédent se stabilise au stade d'un composé rouge identique ou apparenté à l'adrénochrome, en tampon bicarbonate, et évolue jusqu'au brun-madère en tampon phosphate.

Ces résultats conduisent à émettre l'hypothèse que l'adrénochrome interviendrait comme accepteur de phosphate dans les réactions de glycolyse.

## SUMMARY

I. In bicarbonate buffer solution the autoxydation of adrenaline depends upon the formation of an autoxidizable adrenaline-metal complex.

The reaction in which the adrenaline-metal complex is formed can be separated from the oxidation of this complex:

At  $pH = 7.3$  and  $t = 37^\circ$  the adrenaline-copper complex is composed in a ratio of one atom of copper to two molecules of adrenaline.

This adrenaline-copper complex is remarkably predisposed to autoxidation; this autoxidation is stabilized after consumption of one molecule of oxygen per molecule of adrenaline and formation of adrenochrome.

In bicarbonate buffer, without molecular oxygen, adrenaline can be oxidized by a redox-system possessing a more positive potential than the adrenaline system, for example potassium ferricyanide. The maximal oxidation velocity is obtained when the molar concentration of ferricyanide is four times that of adrenaline. The oxidation product is either adrenochrome or one of its close derivatives.

II. Upon comparing the oxidation reactions of adrenaline in bicarbonate buffer to those in phosphate buffer previously described<sup>8</sup>, the following facts emerge:

1. In the presence of copper and molecular oxygen:

a. Bicarbonate buffer: oxidation is stabilized at the adrenochrome step; one molecule of oxygen is consumed per molecule of adrenaline; adrenochrome is formed.

b. Phosphate buffer: oxidation is stabilized far beyond the adrenochrome step after consumption of three molecules of oxygen per molecule of adrenaline; a madeira-brown substance is formed.

2. In the presence of potassium ferricyanide, in an oxygen-free atmosphere: As in the previous case, in bicarbonate buffer the reaction is stabilized at the stage of formation of a red compound, identical with or related to adrenochrome; and in phosphate buffer the reaction proceeds up to the formation of a madeira-brown compound.

These results lead to the hypothesis that adrenochrome would intervene as phosphate acceptor in the reactions of glycolysis.

## ZUSAMMENFASSUNG

I. In Bicarbonatpufferlösung hängt die Autoxydation des Adrenalins von der Bildung eines autoxydablen Adrenalin-Metallkomplexes ab.

Die Bildungsreaktion des Adrenalin-Metallkomplexes kann von dessen Autoxydation getrennt werden.

Bei  $pH 7.3$  und bei  $37^\circ$  enthält der Adrenalin-Kupferkplex je ein Atom Kupfer für je zwei Moleküle Adrenalin.

Dieser Adrenalin-Kupferkomplex ist besonders autoxydabel; die Autoxydation wird nach Aufnahme von 1 Molekül Sauerstoff pro Molekül Adrenalin und Bildung von Adrenochrom stabilisiert.

In Bicarbonatpuffer und in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff kann Adrenalin durch ein Redox-System oxydiert werden, das ein positiveres Potential hat, als das Adrenalsystem, z. B. durch  $K_3(Fe(CN)_6$ . Die maximale Oxydationsgeschwindigkeit wird erreicht, wenn die molare Konzentration des Ferricyanides viermal grösser ist als die des Adrenalins. Das Oxydationsprodukt ist entweder Adrenochrom selbst oder ein ihm nahestehendes Derivat.

II. Aus dem Vergleich der Oxydationsreaktionen des Adrenalins in Bicarbonat- und in Phosphatpufferlösung (siehe<sup>8</sup>) ergibt sich:

i. In Gegenwart von Kupfer und von molekularem Sauerstoff:

a. In Bicarbonatpuffer: Stabilisierung der Oxydation in dem Stadium Adrenochrom, Verbrauch eines Moleküls Sauerstoff pro Molekül Adrenalin; Bildung von Adrenochrom.

b. In Phosphatpuffer: Stabilisierung der Oxydation weit nach Überschreitung des Stadiums

Adrenochrom nach Verbrauch von 3 Molekülen Sauerstoff pro Molekül Adrenalin; Bildung einer Madeira-braunen Substanz.

2. In Gegenwart von  $K_3Fe(CN)_6$  in Sauerstoff-freier Atmosphäre: wie im vorhergehenden Fall stabilisiert sich die Reaktion in Bicarbonatpuffer in dem Stadium einer roten Verbindung, welche mit Adrenochrom identisch oder diesem ähnlich ist, und schreitet in Phosphatpuffer bis zum Madeira-Braun fort.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Adrenochrom als Phosphatacceptor and en Reaktionen der Glycolyse teilnehmen könnte.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. G. BALL ET T. T. CHEN, *J. Biol. Chem.*, 102 (1933) 702.
- 2 V. H. BOOTH, F. J. W. ROUGHTON, *J. Physiol.*, 92 (1938) 36.
- 3 P. CHAIX, J. CHAUVENT ET J. JEZEQUEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 471.
- 4 S. ELLIS, *J. Pharmacol.*, 79 (1943) 364.
- 5 W. A. ENGELHARDT, N. E. SAKOV, *Biochimia U.R.S.S.*, 8 (1943) 35.
- 6 M. GRIFFITHS, *Arch. Biochem.*, 20 (1949) 451.
- 7 E. HAAS, *Biochem. Z.*, 291 (1937) 79.
- 8 J. HARLEY-MASON, *Experientia*, 4 (1948) 307.
- 9 J. M. KOLTHOFF, *Zeit. anorg. u. allgem. Chem.*, 110 (1920) 143.
- 10 H. KREBS, *Biochem. Z.*, 180 (1927) 377.
- 11 LOPEZ, *Tables annuelles de constantes et données numériques*, 8 (1928) 1313.
- 12 O. MEYERHOF ET K. MATSUOKA, *Biochem. Z.*, 150 (1924) 1.
- 13 O. MEYERHOF ET N. GELIAZKOWA, *Arch. Biochem.*, 12 (1947) 495.
- 14 O. MEYERHOF ET J. R. WILSON, *Arch. Biochem.*, 17 (1948) 153.
- 15 O. MEYERHOF ET L. O. RANDALL, *Arch. Biochem.*, 17 (1948) 171.
- 16 L. MICHAELIS, *J. Biol. Chem.*, 87 (1930) 33.
- 17 L. O. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 733.
- 18 F. J. W. ROUGHTON ET V. H. BOOTH, *Biochem. J.*, 32 (1938) 2049.
- 19 G. SMITS, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 280.
- 20 J. WAJZER, *Bull. soc. chim. biol.*, 28 (1946) 341, 345; 29 (1947) 237.
- 21 O. WARBURG ET M. YABUSOE, *Biochem. Z.*, 146 (1924) 380.
- 22 O. WARBURG, *Biochem. Z.*, 152 (1924) 51.

Reçu le 9 novembre 1949