

## ACKNOWLEDGEMENTS

Tetradeterosuccinate was synthesized by T. R. SATO. Analyses for deuterium content were carried out by Dr. H. L. CRESPI. Triply distilled D<sub>2</sub>O was made available through Dr. J. J. KATZ, whom we thank for his interest in this work.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> J. J. KATZ, H. L. CRESPI, R. J. HASTERLIK, J. F. THOMSON AND A. J. FINKEL, *J. Natl. Cancer Inst.*, 18 (1957) 641.
- <sup>2</sup> M. B. THORN, *Biochem. J.*, 49 (1951) 602.
- <sup>3</sup> T. R. SATO AND J. H. POMEROV, unpublished observations.
- <sup>4</sup> J. F. THOMSON AND F. J. KLIPFEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 224.
- <sup>5</sup> E. C. SLATER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 8.
- <sup>6</sup> W. C. SCHNEIDER AND V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 217.
- <sup>7</sup> E. B. KEARNEY AND T. P. SINGER, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 963.
- <sup>8</sup> H. A. LARDY AND H. WELLMAN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 215.
- <sup>9</sup> T. THUNBERG, *Enzymologia*, 3 (1937) 56.
- <sup>10</sup> K. P. JACOBSON AND M. SOARES, *Compt. rend. soc. biol.*, 126 (1937) 592.
- <sup>11</sup> J. F. THOMSON AND F. J. KLIPFEL, *Am. J. Physiol.*, 197 (1959) 1128.
- <sup>12</sup> H. G. BARBOUR, *Yale J. Biol. Med.*, 9 (1937) 651.
- <sup>13</sup> E. O. WEINMANN, M. G. MOREHOUSE AND R. J. WINZLER, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 717.
- <sup>14</sup> S. ENGLAND AND S. F. COLOWICK, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 1019.

*Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 72-77

## OXYDATION DU SULFITE EN SULFATE PAR LA RACINE D'AVOINE

P. FROMAGEOT, R. VAILLANT ET H. PEREZ-MILAN

*Service de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique,  
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Gif-sur-Yvette (France)*

(Reçu le 27 Février, 1960)

---

### SUMMARY

#### *Oxidation of sulphite to sulphate by wheat roots*

Wheat roots contain an enzymic system catalysing the oxidation of sulphite to sulphate. The optimum pH of the non-purified system is 7.0 in a phosphate buffer. The metal-chelating agents used are shown to inhibit the oxidation.

---

### INTRODUCTION

Au cours de l'étude de la réduction du sulfate en sulfite dans la feuille de tabac<sup>1</sup>, il est apparu que le sulfite est simultanément réoxydé en sulfate. La rapidité de cette oxydation est telle qu'elle compromet une mesure exacte de la quantité de sulfite

formé par réduction. Pour tenter d'éliminer cette difficulté nous avons entrepris l'examen des modalités d'oxydation du sulfite par les tissus végétaux. Dans des essais préliminaires, nous avons utilisé avec des résultats du même ordre les feuilles de tabac, de physalis, d'avoine, et les racines des mêmes plantes. Nous avons finalement retenu la racine d'avoine comme matériel de départ pour des raisons de commodité: développement de ces racines sans support solide, en toutes saisons, et absence des pigments foliaires.

L'oxydation du sulfite en sulfate dans les végétaux a déjà fait l'objet des travaux de TAGER ET RAUTANEN<sup>2,3</sup>. Ces auteurs utilisent les mitochondries isolées des feuilles d'avoine. Sans conclure sur le mécanisme de l'oxydation étudiée, TAGER ET RAUTANEN indiquent cependant qu'il est différent de celui décrit par HANDLER<sup>4,5</sup> pour l'oxydation du sulfite par les tissus animaux.

Le présent travail donne quelques aspects de l'oxydation du sulfite en sulfate en présence d'un extrait aqueux de racine d'avoine, et montre que cette réaction est catalysée par un agent thermolabile, non dialysable et qui possède un métal. Ce catalyseur est très actif puisque l'on peut observer, au pH optimum de l'oxydation à 37°, et en présence d'une concentration en sulfite  $5 \cdot 10^{-3} M$ , un  $Q_{O_2}$  rapporté à 1 mg d'azote total supérieur à 24,000.

#### *Mise en évidence et influence du pH sur l'oxydation du sulfite en sulfate*

*Partie expérimentale:* Les racines sont prélevées de plantules d'avoine germée développées à l'obscurité. Les graines et les plantules sont lavées chaque jour à l'eau ordinaire et rincées à l'eau distillée. Elles se développent sur un tamis en matière plastique dans une enceinte saturée de vapeur d'eau. La récolte des racines a lieu 5 jours après la germination. Les racines sont lavées à l'eau distillée et broyées à 0° au mortier dans un tampon phosphate 0.1 M pH 7.0 contenant du chlorure de sodium à la concentration de 0.35 M. On utilise 1 ml de tampon/g de racines fraîches. Le broyat est filtré sur mousseline et est centrifugé à 0° à  $1,600 \times g$  pendant 10 min.

L'oxydation du sulfite est mesurée par voie manométrique avec l'appareil de Warburg, à la température de 37° et avec une agitation correspondant à 220 alternances/min. On n'a pas utilisé de potasse dans la cupule centrale des cellules de Warburg, des essais préliminaires en ayant montré l'inutilité. Chaque essai comporte, sauf mention contraire: sulfite de sodium 9.5  $\mu$ moles, soit 0.2 ml de sa solution aqueuse, broyat 0.1 ml, tampon phosphate ou Tris 0.05 M pH 7.0. Le volume total est de 2 ml. On attend 10 min pour obtenir l'équilibre de la température avant de mettre le sulfite en présence du broyat. Toutes les solutions aqueuses sont faites dans de l'eau d'abord purifiée par échangeurs d'ions, puis distillée dans un appareil en pyrex.

L'estimation du sulfite introduit ou restant à la fin d'une expérience est faite par iodométrie. La variation du pH du milieu est obtenue par l'emploi de tampons phosphate ou Tris 0.05 M. La mesure du pH n'est faite que lorsque tous les réactifs utilisés ont été introduits.

*Résultats:* L'oxydation du sulfite par le broyat de racines est totale. 9.5  $\mu$ moles de sulfite correspondent à une consommation d'oxygène théorique de 105  $\mu$ l. La consommation d'oxygène au cours de nos essais se stabilise vers 80-95  $\mu$ l. La différence correspond à une auto-oxydation du sulfite pendant les 10 min d'attente, le manomètre étant ouvert, nécessaires à l'équilibre de la température. Ce point a été vérifié

par la mesure du sulfite restant après ces 10 min, et par le fait qu'il n'y a plus de sulfite décelable par iodométrie lorsque la consommation d'oxygène a atteint son maximum.

La vitesse d'oxydation est fonction de la quantité de broyat présente (Fig. 1). Le broyat bouilli ne conduit qu'à une lente absorption d'oxygène. L'influence du pH sur la vitesse d'oxydation du sulfite en présence de broyat de racines d'avoine est donnée par la Fig. 2. Pour le calcul du  $Q_{O_2}$  on a utilisé la consommation d'oxygène pendant les six premières minutes de la réaction. On voit que le pH optimum se situe au voisinage de pH 7. Le  $Q_{O_2}$  pour un tel broyat non purifié est supérieur à 24.000, ce qui témoigne de l'intensité de la réaction étudiée. Les résultats sont semblables que l'on se trouve en présence d'un tampon phosphate ou d'un tampon Tris.

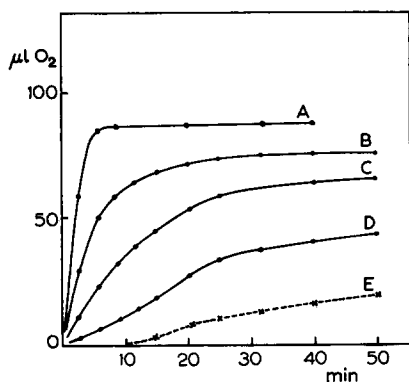


Fig. 1. Influence de la quantité de broyat de racines sur la vitesse d'oxydation du sulfite. Sulfite, 9.5  $\mu$ moles; broyat, 600  $\mu$ g d'azote total/ml; tampon phosphate, 0.05 M; pH, 7.2, volume total, 2 ml; température, 37°. A, 0.3 ml de broyat; B, 0.1 ml; C, 0.04 ml; D, 0.02 ml; E, 0.02 ml de broyat bouilli.

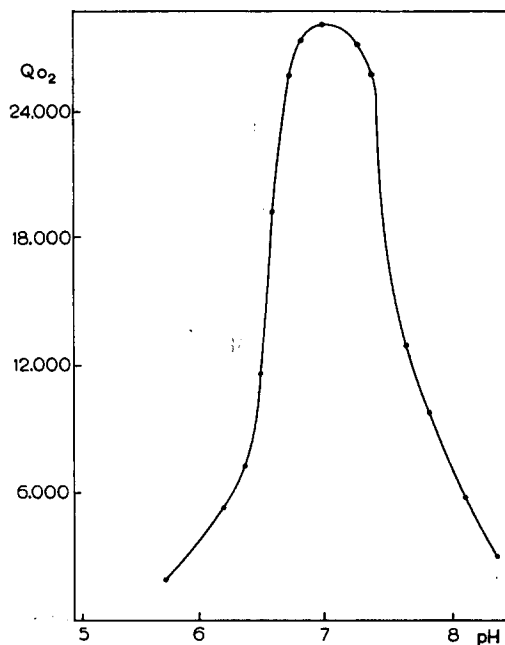


Fig. 2. Influence du pH sur l'oxydation du sulfite par le broyat de racines d'avoine. Sulfite, 9.5  $\mu$ moles; broyat, 0.2 ml (30  $\mu$ g N total); tampon phosphate, 0.05 M; volume total, 2 ml; température, 37°. Le  $Q_{O_2}$  est calculé à partir de la quantité d'oxygène absorbée pendant les 6 premières minutes, déduction faite de l'oxygène utilisé par un témoin comportant du broyat chauffé.

#### *Nature possible du catalyseur de l'oxydation du sulfite en sulfate présent dans les racines d'avoine*

Que le chauffage jusqu'à ébullition du broyat annule pendant les 10 premières minutes l'oxydation du sulfite et ne permette après qu'une lente consommation d'oxygène n'est pas une preuve contraignante à elle seule, de l'existence d'un système enzymatique oxydant cet ion. En effet, les nombreux travaux consacrés<sup>6</sup> à l'auto-oxydation du sulfite soulignent le rôle catalytique extrêmement accentué des métaux et en particulier du cuivre<sup>7</sup>. On peut alors penser que la dénaturation des protéines du broyat par la chaleur fait apparaître des groupes qui complexent les traces métalliques présentes, et par suite, provoque une inhibition de la catalyse inorganique.

Pour montrer que la catalyse inorganique ne peut rendre compte de l'oxydation du sulfite en présence de broyat de racines, nous avons fait les expériences suivantes:

*Partie expérimentale:* Sans modifier le protocole décrit dans la première section, on procède premièrement à l'addition au milieu d'une solution de sérum albumine (0.3, 0.6, 3 mg), ou d'ultrafiltrat de broyat, obtenu par passage forcé de celui-ci à travers une membrane de cellophane; deuxièmement à la comparaison de l'oxydation du sulfite obtenue en présence de  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  ou  $\text{Mn}^{++}$  introduits sous forme de sulfate et de concentration finale  $1 \cdot 10^{-5} M$ , et de celle à laquelle conduit le broyat de racines. Ce parallèle a été examiné à divers pH en présence d'un tampon Tris 0.05  $M$ , de sérum albumine 1 mg et d'ultrafiltrat 0.4 ml; troisièmement à l'étude de l'influence du  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mo}$  sous forme de molybdate d'ammonium,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  et  $\text{Cd}^{++}$  sur l'oxydation du sulfite à pH 7 en présence de tampon phosphate ou Tris 0.05  $M$ .

*Résultats:* La Fig. 3 montre que l'oxydation du sulfite n'est pas inhibée par 0.3 ou 0.6 mg de sérum albumine. On peut introduire 3 mg de cette protéine dans le milieu réactionnel sans modifier la cinétique de l'oxydation. L'ultrafiltrat du broyat, qui ne présente par lui-même aucune action oxydante sur le sulfite, et inhibe même

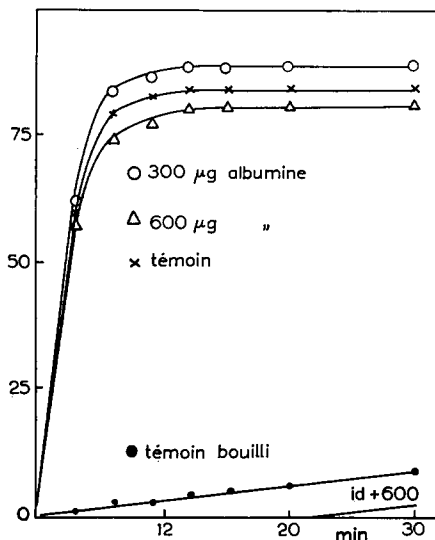


Fig. 3. Oxydation du sulfite par le broyat de racines en présence de sérum albumine. Sulfite, 9.5  $\mu\text{moles}$ ; broyat, 0.1 ml (78  $\mu\text{g}$  N total); tampon phosphate, 0.05  $M$ ; pH 7.0, sérum albumine, 300 et 600  $\mu\text{g}$ ; volume total, 2 ml; température, 37°.

complètement son oxydation spontanée, ne modifie pas l'oxydation du sulfite lorsqu'il est ajouté au broyat de racines. Sur la base de ces données il nous paraît difficile d'admettre que le catalyseur de l'oxydation du sulfite présent dans le broyat de racines puisse être un ion métallique ou un complexe métallique de faible poids moléculaire. Ce point de vue est confirmé par l'examen de la catalyse de l'oxydation du sulfite que les ions métalliques introduits provoquent. Les Tableaux I et II montrent que seul l'ion cuivre dans les conditions utilisées, peut catalyser l'oxydation du sulfite. Toutefois, l'ultrafiltrat ou l'ultrafiltrat et la sérum albumine inhibent cette oxydation.

Le molybdène sous forme de molybdate d'ammonium, l'ion cobalt à la concentration de  $1 \cdot 10^{-3} M$  sont sans effet à pH 7, que le tampon soit constitué de phosphate ou de Tris. Les ions magnésium, zinc et cadmium enfin, non seulement ne favorisent pas l'oxydation du sulfite, mais l'inhibent, comme l'indique le tableau II.

TABLEAU I

INFLUENCE DU pH SUR L'OXYDATION DU SULFITE PAR LE BROyat DE RACINES OU PAR DES MÉTAUX, SOIT SEULS SOIT ADDITIONNÉS D'ULTRAFILTRAT DE BROyat, OU D'ULTRAFILTRAT ET DE SÉRUM ALBUMINE

Sulfite 9.5  $\mu$ moles; broyat 0.1 ml (73  $\mu$ g N total); métal 0.2 ml concentration finale  $1 \cdot 10^{-5} M$ ; tampon Tris 0.05  $M$  pH variable; ultrafiltrat 0.4 ml; sérum albumine 1 mg. Volume total 2 ml. Température, 37°. Résultats exprimés en  $\mu$ l  $O_2$  consommés dans les 6 premières minutes.

	pH 5	5.6	6	6.2	6.5	7	7.3	7.6	8.1
Broyat témoin	0	0	0	9	60	72	60	48	18
Cu <sup>++</sup>	10	51	60	60	57	42	28	22	4
Cu <sup>++</sup> et ultrafiltrat	0	0	0	0	2	3	3	2	1
Cu <sup>++</sup> ultrafiltrat et sérumalbumine	0	0	0	0	1	2	2	1	1
Fe <sup>++</sup>	0	4	6	9	8	6	5	5	1
Fe <sup>++</sup> et ultrafiltrat	0	0	0	1	2	2	2	2	2
Fe <sup>++</sup> ultrafiltrat et sérumalbumine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mn <sup>++</sup>	0	0	1	2	4	6	5	5	4
Mn <sup>++</sup> et ultrafiltrat	0	0	0	0	1	4	4	4	0
Mn <sup>++</sup> ultrafiltrat et sérumalbumine	0	0	0	0	0	4	5	4	0

TABLEAU II

INFLUENCE DU MAGNÉSIUM, DU ZINC ET DU CADMIUM SUR L'OXYDATION DU SULFITE PAR LE BROyat DE RACINES D'AVOINE

Sulfite 9.5  $\mu$ moles, broyat 0.1 ml (30  $\mu$ g N total) tampon phosphate 0.05  $M$  pH 7.0.  $MgCl_2$ ,  $6H_2O$   $5 \cdot 10^{-4} M$ ;  $Zn(CH_3-COO)_2$   $5.5 \cdot 10^{-4} M$ ;  $Cd(CH_3-COO)_2$   $3.5 \cdot 10^{-4} M$ . Température 37°, volume final 2 ml. Oxygène consommé exprimé en  $\mu$ l.

Conditions	Temps (min)			
	3	6	12	20
Broyat	18	27	35	41
Broyat + Mg <sup>++</sup>	15	25	32	36
Broyat + Zn <sup>++</sup>	6	9	14	16
Broyat + Cd <sup>++</sup>	8	14	21	23

### *Influence des composés cétoniques*

*Partie expérimentale:* On opère dans les conditions décrites dans la première section. On utilise 9.5  $\mu$ moles de sulfite et introduit 9.5  $\mu$ moles de pyruvate de sodium et 9.5  $\mu$ moles d' $\alpha$ -céto-glutarate de sodium. Dans ces essais on place 0.1 ml de potasse à 10 % dans la cupule centrale des cellules de Warburg. Dans une autre série d'expériences, on met en présence les mêmes quantités de sulfite et de composés cétoniques à 37° et à pH 7, 40 min avant l'apport du broyat de racines (0.1 ml correspondent à 50  $\mu$ g N total).

*Résultats:* En présence de broyat de racines d'avoine, ni le pyruvate ni l' $\alpha$ -céto-glutarate n'inhibent l'oxydation du sulfite, que l'on fasse le mélange en proportions équimoléculaires juste avant la mesure de l'oxydation ou qu'on laisse le sulfite et

le composé cétonique en contact pendant 40 min. De plus, lorsque l'absorption d'oxygène atteint son maximum, il n'y a plus de sulfite décelable par iodométrie.

HANDLER<sup>4</sup>, avec une préparation de foie de rat constate également que la présence de pyruvate ou d' $\alpha$ -cétoglutarate en proportion équimoléculaire avec le sulfite conduit à la même cinétique d'absorption d'oxygène que le sulfite seul. Au contraire TAGER<sup>2</sup>, observe que le pyruvate à la concentration  $5 \cdot 10^{-3} M$  et à pH 7.4 inhibe de 40 % la vitesse d'oxydation du sulfite ( $4 \cdot 10^{-2} M$ ) en présence de mitochondries de feuilles d'avoine. TAGER suggère que cette inhibition est due à la formation d'un composé bisulfite. Si cela est le cas, on doit admettre qu'en présence de broyat de racines la décomposition à pH 7 du complexe bisulfite est au moins aussi rapide que l'oxydation du sulfite, ou que ce complexe peut être directement oxydé.

### *Influence des agents complexants*

**Partie expérimentale:** On se place dans les conditions optima suivantes: sulfite 9.5  $\mu$ moles, broyat 0.1 ml correspondant à 74  $\mu$ g d'azote total, tampon phosphate 0.05  $M$  pH 7.0 et on introduit les substances indiquées:

**Résultats:** L'oxyde de carbone, les acides tartrique, citrique, sulfosalicylique et le fluorure de sodium n'inhibent pas aux concentrations utilisées l'oxydation du sulfite. Le cyanure au contraire (Fig. 4) est un inhibiteur. Une concentration en cyanure de  $2 \cdot 10^{-5} M$  conduit à une diminution de 40 % de la consommation d'oxygène mesurée après 6 min. Avec une concentration 25 fois plus élevée,  $0.5 \cdot 10^{-3} M$ , on

<i>Agents complexants du Fe<sup>+++</sup></i>	<i>Concentration dans le milieu (M)</i>
Acide tartrique	$1 \cdot 10^{-3}$
Acide citrique	$1 \cdot 10^{-3}$
Acide sulfosalicylique	$0.5 \cdot 10^{-3}$
Fluorure de sodium	$2 \cdot 10^{-2}$
Cyanure de potassium	$2 \cdot 10^{-5}$
Cyanure de potassium	$0.5 \cdot 10^{-3}$
Versène	$0.5 \cdot 10^{-5}$
Versène	$1 \cdot 10^{-5}$
Versène	$2 \cdot 10^{-5}$
Versène	$4 \cdot 10^{-5}$

#### *Agents complexants du Fe<sup>++</sup>*

Oxyde de carbone: atmosphère constituée de CO-O<sub>2</sub> (90:10) l'expérience est réalisée à 25° et à l'obscurité, en présence de témoins maintenus dans une atmosphère formée de N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (90:10).

<i>o</i> -phénanthroline	$2 \cdot 10^{-5}$
$\alpha, \alpha'$ -dipyridyle	$2 \cdot 10^{-5}$

#### *Agents complexants du Cu<sup>++</sup>*

Pyrophosphate	$1 \cdot 10^{-3}$
Acide rubéanique	$1 \cdot 10^{-4}$
Acide thioglycolique	$2 \cdot 10^{-4}$
Acide thioglycolique	$2 \cdot 10^{-3}$
$\beta$ -naphthol	$2 \cdot 10^{-4}$
$\beta$ -naphthol	$2 \cdot 10^{-3}$
Hydroquinone	$2 \cdot 10^{-5}$
Hydroquinone	$1 \cdot 10^{-3}$
Hydroquinone	$5 \cdot 10^{-3}$
8-hydroxyquinoléine	$1 \cdot 10^{-5}$

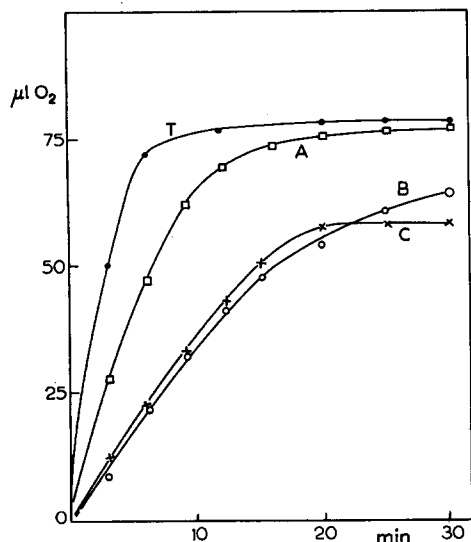


Fig. 4. Influence du cyanure de potassium sur l'oxydation du sulfite par le broyat de racines d'avoine. Sulfite, 9.5  $\mu$ moles; broyat, 0.1 ml (74  $\mu$ g N total); tampon phosphate, 0.05 M; pH, 7.0. T, expérience témoin sans cyanure; A, KCN  $2 \cdot 10^{-5}$  M; B, KCN  $0.5 \cdot 10^{-3}$  M; C, KCN  $0.5 \cdot 10^{-3}$  M, sans broyat.

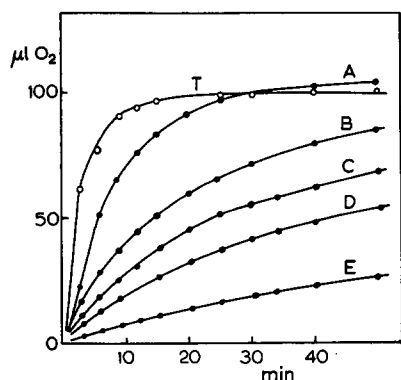


Fig. 6. Influence du Versène sur l'oxydation du sulfite par le broyat de racines d'avoine. Sulfite 9.5  $\mu$ moles; broyat, 0.1 ml (60  $\mu$ g N total); tampon phosphate, 0.05 M, pH, 7.2; volume, 2 ml, température, 37°. T, expérience témoin; A, Versène  $0.5 \cdot 10^{-5}$  M; B,  $1 \cdot 10^{-5}$  M; C,  $2 \cdot 10^{-5}$  M; D,  $4 \cdot 10^{-5}$  M; E,  $10 \cdot 10^{-5}$  M.

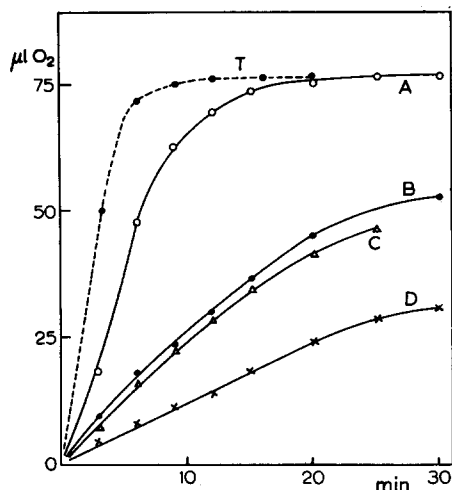


Fig. 5. Influence d'agents complexants du fer sur l'oxydation du sulfite par le broyat de racines d'avoine. Sulfite, 9.5  $\mu$ moles; broyat, 0.1 ml (74  $\mu$ g N total); tampon phosphate, 0.05 M; pH, 7.0. Agents complexants à la concentration  $2 \cdot 10^{-5}$  M. Volume, 2 ml; température, 37°. T, expérience témoin; A, cyanure de potassium; B, Versène; C, *o*-phénanthroline; D,  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyle.

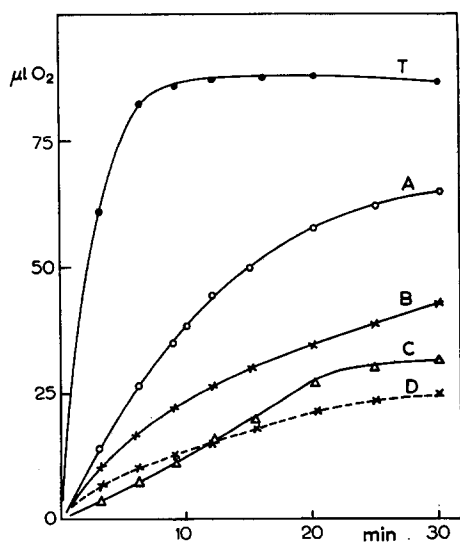


Fig. 7. Influence d'agents complexants du cuivre sur l'oxydation du sulfite par le broyat de racines d'avoine. Sulfite, 9.5  $\mu$ moles; broyat, 0.1 ml (74  $\mu$ g N total); tampon phosphate, 0.05 M; pH, 7.0; volume final, 2 ml; température, 37°. T, expérience témoin; A, hydroquinone  $1 \cdot 10^{-3}$  M; B, naphthol  $2 \cdot 10^{-3}$  M; C, hydroquinone  $5 \cdot 10^{-3}$  M; D, thioglycollate de sodium  $2 \cdot 10^{-3}$  M.

observe encore une absorption d'oxygène égale à 30 % de celle du témoin après 6 min.

Si cependant, avec les conditions expérimentales décrites par la courbe B de la Fig. 4 on omet d'introduire l'extrait aqueux de racines, on observe une cinétique de l'absorption d'oxygène sensiblement égale à celle que l'on obtient avec le système complet: courbe C, Fig. 4.

Il en résulte qu'à la concentration  $0.5 \cdot 10^{-3} M$  le cyanure inhibe complètement l'oxydation enzymatique du sulfite propre à l'extrait de racines d'avoine. A titre de comparaison, on rappellera que l'oxydation du sulfite par le foie de rat est insensible au cyanure<sup>4</sup>.

Que le cyanure puisse favoriser la catalyse par des ions métalliques de l'oxydation du sulfite est un phénomène signalé comme probable par HUNTER ET FORD<sup>8</sup>, observé par TAGER<sup>2</sup> et démontré par HANDLER<sup>9</sup> avec le fer ferreux et le molybdène. En outre, la xanthine oxydase se comporte comme une sulfite oxydase après traitement par le cyanure<sup>10</sup>. On peut rapprocher de ces résultats les travaux de POSNER<sup>11</sup> et de BODLÄNDER<sup>12</sup> sur l'oxydation de l'or et de l'argent par le cyanure.

Parmi les autres agents complexants utilisés, le Versène, l' $\alpha, \alpha'$ -dipyridyle et l'*o*-phénanthroline sont des inhibiteurs dès la concentration  $2 \cdot 10^{-5} M$  (Figs. 5 et 6). Ce sont des chélateurs du fer. Les agents chélateurs du cuivre n'influencent pas la vitesse d'oxydation du sulfite à la concentration  $2 \cdot 10^{-5} M$ , bien qu'ils en bloquent l'auto-oxydation en absence de broyat de racines. Mis à part le pyrophosphate qui n'est jamais inhibiteur, il faut augmenter la concentration de ces réactifs du cuivre jusqu'à une valeur de l'ordre de  $10^{-3} M$  pour obtenir une inhibition de l'oxydation enzymatique du sulfite (Fig. 7).

Ces résultats montrent que le système enzymatique présent dans la racine d'avoine possède un métal dont l'affinité pour l' $\alpha, \alpha'$ -dipyridyle, l'*o*-phénanthroline et le Versène est supérieure à celle qu'il manifeste à l'égard des agents complexants du cuivre, et nous conduisent à suggérer que ce métal pourrait être le fer. Dès lors, on peut envisager la possibilité pour la sulfite oxydase d'être un enzyme héminique.

#### *Etude de l'influence de l'hémoglobine, du cytochrome c et de la catalase sur l'oxydation du sulfite*

*Partie expérimentale:* On introduit en présence de  $9.5 \mu\text{moles}$  de sulfite dans les conditions habituelles, en solution dans du tampon phosphate  $0.05 M$  pH 7.0 de l'hémoglobine, du cytochrome *c* ou de la catalase pures, de façon que la concentration finale soit de  $1 \cdot 10^{-5} M$  et de  $2 \cdot 10^{-5} M$ .

*Résultats:* Non seulement aucune de ces protéines héminiques ne catalyse l'oxydation du sulfite, mais elles inhibent l'auto-oxydation du sulfite au même titre qu'une protéine quelconque. On doit en conclure que la sulfite oxydase est un enzyme distinct des protéines héminiques usuelles.

#### CONCLUSION

L'extraction de racines de plantules d'avoine âgées de 5 jours par un tampon phosphate  $0.1 M$  pH 7, contenant du chlorure de sodium à la concentration  $0.35 M$ , permet d'obtenir une solution qui catalyse l'oxydation du sulfite en sulfate. Le pH optimum pour cette réaction est de 7 en tampon phosphate comme en tampon Tris  $0.05 M$ .

Dans l'extrait aqueux étudié plusieurs substances peuvent contribuer à la



catalyse de l'oxydation du sulfite en sulfate. L'une d'entre elles, et la plus active, que l'on peut provisoirement appeler sulfiteoxydase, est thermolabile, non ultra-filtrable à travers la cellophane, et possède un métal dont la nature n'est pas connue. Il est cependant possible que ce métal soit le fer, hypothèse qui n'est pas en contradiction avec les résultats obtenus à l'aide de divers agents chélateurs, ni avec l'aptitude de l'hématine à catalyser l'oxydation du sulfite en sulfate.

Cette sulfite oxydase de la racine d'avoine possède une activité catalytique qui, pour une concentration en sulfite  $5 \cdot 10^{-3} M$ , à pH 7 et à  $37^\circ$  conduit à un  $Q_{O_2}$  rapporté à 1 mg d'azote total de l'extrait, supérieur à 24,000. Le système enzymatique présent dans la racine d'avoine est ainsi plus actif que celui que TAGER a mis en évidence dans les mitochondries des feuilles d'avoine. Ce dernier en effet, pour une concentration en sulfite  $2 \cdot 10^{-2} M$  à pH 7.4 et à  $30^\circ$ , possède un  $Q_{O_2N}$  d'environ 100. Ces systèmes enzymatiques catalysant l'oxydation du sulfite se distinguent aussi par l'action inhibitrice du pyrophosphate et du pyruvate. Ces composés n'inhibent que l'enzyme présent dans ces mitochondries des feuilles. Cependant le cyanure inhibe la sulfite oxydase qu'elle provienne des feuilles, ou de la racine d'avoine. Quoiqu'il en soit il paraît prématuré de tirer des conclusions de ces comparaisons avant d'avoir des systèmes enzymatiques purifiés. Il paraît cependant certain que la sulfite oxydase des racines d'avoine est différente de celle, étudiée par HANDLER<sup>4</sup> dans les tissus des mammifères, qui en particulier n'est pas inhibée par le cyanure.

#### RÉSUMÉ

Il existe dans les racines d'avoine un système enzymatique catalysant l'oxydation du sulfite en sulfate. Le pH optimum pour le système enzymatique non purifié est de 7, en tampon phosphate. Les agents chélateurs de métaux sont en général des inhibiteurs.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. FROMAGEOT ET H. PEREZ-MILAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 457.
- <sup>2</sup> J. M. TAGER ET N. RAUTANEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1956) 111.
- <sup>3</sup> J. M. TAGER ET N. RAUTANEN, *Physiol. Plant.*, 9 (1956) 665.
- <sup>4</sup> M. HEIMBERG, I. FRIDOVICH ET P. HANDLER, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 913.
- <sup>5</sup> I. FRIDOVICH ET P. HANDLER, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 321.
- <sup>6</sup> E. ABEL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 815.
- <sup>7</sup> E. C. FULLER ET R. H. CRIST, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 1644.
- <sup>8</sup> E. E. HUNTER ET L. FORD, *Federation Proc.*, 13 (1954) 234.
- <sup>9</sup> I. FRIDOVICH ET P. HANDLER, *Federation Proc.*, 15 (1956) 256.
- <sup>10</sup> P. HANDLER ET I. FRIDOVICH, dans ROSCOFF, C. N. R. S., *Colloque sur la Biochimie du Soufre*, Paris, 1956, p. 83.
- <sup>11</sup> L. POSNER, *J. Prakt. Chem.*, 34 (1846) 441.
- <sup>12</sup> G. BODLÄNDER, *Angew. Chem.*, 19 (1896) 583.