

RÉSUMÉ

1. L'éthynylation des aldéhydes et cétones aliphatiques et cyclaniques en solution dans le méthylal et en présence de potasse caustique solide pulvérisée, conduit aux éthynylcarbinols avec des rendements satisfaisants. Le sel formé intermédiairement est l'alcoolate de l'éthylcarbinol.

2. Le méthyl-2-butyne-3-ol-2 peut être halogéné tant par HCl gazeux que par HBr gazeux. Divers produits mono- et polyhalogénés ont été isolés. Ils correspondent aux stades successifs des possibilités réactionnelles. Tandis que la règle habituelle relative à la saturation des triples liaisons est applicable à la chloruration, c'est celle de *Kharasch* qui régit la bromuration. Il en résulte que le mécanisme de la saturation de la triple liaison est différent dans les deux cas d'halogénéation étudiés.

3. La réactivité du chloro-3-méthyl-3-butyne-1 est caractérisée par la mobilité de l'halogène qui peut être arraché par la pipéridine, la pyridine, le magnésium amalgamé, et substitué par le bromure d'éthylmagnésium. La réactivité de la fonction acétylénique, par contre, n'est pas influencée par la présence de l'atome de chlore.

4. Chez le bromo-4-méthyl-2-butyne-3-ol-2, la fonction hydroxyle présente une réactivité normale (estérification, halogénéation, salification), tandis que la triple liaison est fortement stabilisée par la proximité de l'atome de brome. Celui-ci peut être éliminé par l'anhydride acétique (formation de résines) ou substitué par le sodium, la pipéridine ou un organomagnésien.

Institut de Chimie de l'Université, Neuchâtel.

294. Sur un nouveau facteur de la coagulation du sang, le facteur VII

par F. Duckert, A. Loeliger et F. Koller.

(14 IX 51)

La coagulation du sang s'effectue en deux stades successifs; la conversion de la prothrombine en thrombine, favorisée par des accélérateurs, et la transformation du fibrinogène en fibrine, provoquée par la thrombine. Ces dernières années les principaux travaux dans le domaine de la coagulation du sang ont porté sur la phase qui suit immédiatement la formation de la fibrine. On a déterminé la teneur du

sérum en prothrombine, «*prothrombin utilization*» de *Brinkhous*¹⁾ et «*prothrombin consumption test*» de *Quick*²⁾. En comparant les résultats obtenus d'une part par *Brinkhous* et *Quick* qui constatent la disparition de la prothrombine dans le sérum, et de l'autre par *Owren*³⁾ qui a tout d'abord affirmé avoir retrouvé dans le sérum la presque totalité de la prothrombine, nous avons été amenés à conclure à l'existence d'un accélérateur⁴⁾ de la conversion de la prothrombine en thrombine, que nous avons appelé le facteur VII.

Nous décrivons ici une méthode de purification partielle de ce facteur VII à partir du sérum humain et nous indiquons quelques-unes de ses propriétés. Le produit final que nous obtenons ne contient plus d'autres facteurs de coagulation.

Produit de départ. Nous utilisons un mélange de sérums humains conservés quelques jours à 2°, afin que les dernières traces de prothrombine disparaissent. Les sérums colorés en jaune à la suite d'ictères d'origines variées n'exigent pas de modification du cours de la purification; ils sont moins riches en facteur VII que les sérums normaux.

*Méthode de dosage*⁴⁾. On utilise comme source de fibrinogène, de prothrombine et de facteur V, un plasma de bœuf filtré sur filtre d'amiante. Cette filtration élimine totalement le facteur VII et partiellement la prothrombine. Ce plasma de bœuf contient encore 10 à 15 % du taux de prothrombine d'un plasma humain normal. La thrombokinasase est préparée à partir de cerveau humain.

L'activité des préparations de facteur est rapportée à celle d'un plasma humain normal, contenant, par définition, 100 unités de facteur VII par cm³.

Le «degré de pureté» est exprimé par le quotient: unités facteur VII/mg N *Kjeldahl*.

Purification. Le facteur VII, comme la prothrombine, est facilement adsorbé sur le sulfate de baryum⁵⁾. Nous avons utilisé cette propriété pour purifier ce facteur. La méthode comprend cinq stades: adsorption, lavage, élution, dialyse et séchage. L'élution peut se faire soit avec un tampon phosphates m./15, pH 8,0, soit avec du citrate trisodique 5 % (0,14-m.), pH 7,8. L'élution au citrate donne des rendements plus élevés et des produits plus purs (tableau I): on enrichit le facteur 250 fois à partir du sérum. La poudre sèche (dessiccation à l'état congelé) est plus facile à obtenir à partir des éluats aux phosphates.

1) K. M. *Brinkhous*, Am. J. med. Sci. **198**, 509 (1939).

2) A. J. *Quick*, Am. J. clin. Path. **15**, 560 (1945).

3) P. A. *Owren*, Nord. Med. **43**, 977 (1950).

4) F. *Koller*, A. *Loeliger* et F. *Duckert*, Acta haem. **6**, 1 (1951).

5) D. M. *Surgenor*, B. *Alexander*, R. *Goldstein* et K. *Schmid*, J. Phys. a. Coll. Chem. **55**, 94 (1951).

Tableau I.

Produits	Rendement	Activité/mg N
Sérum oxalaté	100%	10 Unités
Elution citrate 0,14-m.	75—80%	2500 Unités
Elution tampon phosphates . . .	60%	1800 Unités

Electrophorèse. Les électrophorèses du facteur VII purifié, effectuées dans un tampon véronal-acétate à pH 8,6 et $\mu = 0,1$ indiquent la présence d'un constituant principal, le facteur VII, représentant le 80 % des protéines en solution.

Propriétés. Les solutions du facteur VII donnent les réactions des protéines. Le facteur VII est un accélérateur de la conversion de la prothrombine en thrombine¹⁾. La quantité de prothrombine transformée ou de thrombine formée ne dépend pas de la quantité de facteur VII, mais seulement de la quantité de prothrombine initiale. Par contre, en faisant varier la concentration du facteur VII, on change la durée de la conversion prothrombine \rightarrow thrombine. Le facteur VII ne semble pas avoir d'influence sur la transformation du fibrinogène en fibrine.

A température ordinaire, les solutions de facteur VII perdent, en présence de toluène ou d'alcool octylique, 80 % de leur activité en une semaine. A 2°, les solutions de facteur VII sont stables pendant trois semaines au moins. Les solutions congelées perdent 20 % de leur activité au moment du dégel.

Partie expérimentale.

1. *Purification.* Nous utilisons les réactifs suivants:

Chlorure de sodium 0,9%	Citrate trisodique 0,14-m. et 0,006-m.
Oxalate de sodium 0,1-m.	Sulfate de baryum <i>Merck</i> .
Tampon phosphates m./15, pH 8,0.	

Toutes les opérations doivent se faire entre 2 et 5°. Elles doivent être rapidement enchaînées.

Préparation du sérum. Le mélange de sérums humains est centrifugé à 2600 tours/min. (1500 g) pour éliminer les derniers érythrocytes et les autres éléments figurés qui restent encore en suspension. On dilue ensuite le sérum avec $\frac{1}{10}$ de son volume d'une solution d'oxalate de sodium 0,1-m.

Stade I. Le facteur VII est adsorbé sur le sulfate de baryum. On suspend 10 g de sulfate de baryum dans 200 cm³ de sérum dilué. On maintient le sulfate en suspension pendant 45 min. en agitant lentement. Il est indiqué d'ajouter quelques gouttes d'alcool octylique. Après 45 min., on centrifuge et rejette le sérum qui ne contient plus que des traces de facteur VII.

Stade II. Le culot de sulfate de baryum, coloré en jaune, très souvent visqueux, est suspendu à la baguette dans 30 cm³ de chlorure de sodium 0,9% et finement divisé. On

¹⁾ F. Koller, A. Loeliger et F. Duckert, *Acta haem.* **6**, 1 (1951).

centrifuge aussitôt et rejette les eaux de lavage. Cette opération est répétée encore deux fois. Finalement, on suspend le culot dans 30 cm³ de citrate trisodique 0,006-m. On centrifuge et élimine la solution. On perd au cours de ce lavage moins de 5% de l'activité totale.

Stade III. Le facteur est élué soit par la solution de citrate trisodique, soit par le tampon phosphates. La méthode est la même dans les deux cas. Le culot de sulfate de baryum lavé est suspendu dans la solution éluante (30 cm³). On maintient en suspension homogène par lente agitation mécanique, pendant 30 min. En répétant cette opération une seconde fois on élué encore un peu de facteur VII en même temps que des impuretés. Les rendements et enrichissements sont indiqués dans le tableau I.

Stade IV. L'éluat est dialysé contre de l'eau distillée, plusieurs fois renouvelée pendant 48 h., entre 2 et 5°. La dialyse n'entraîne aucune perte d'activité.

Stade V. Poudre sèche. On congèle à -30° la solution dialysée puis on sublime la glace au vide poussé sur silicagel. La poudre sèche obtenue après élution avec le tampon phosphates est plus fine, moins hygroscopique que celle préparée avec le citrate. La poudre sèche est soluble dans les solutions salines.

2. *Electrophorèse.* Les électrophorèses ont été effectuées avec un «Mikroelektrophoresegerät» d'après le Prof. Antweiler, *Gerätebau Boskamp*¹⁾.

17 mg de poudre sèche sont dissous dans 1 cm³ de tampon véronal-acétate pH 8,6, $\mu = 0,1$, à froid. On centrifuge le faible résidu insoluble. La solution est dialysée contre le tampon véronal-acétate pendant 4 h. La concentration finale en protéines de cette solution est de 1,5%. L'électrophorèse se fait à 15° et dure 18 min.; elle indique une pureté de 80%.

3. *Stabilité.* La stabilité des solutions de facteur VII a été déterminée à température ordinaire (20°) et à froid (2°). On dose régulièrement le facteur VII en prélevant 0,2 cm³ de solution chaque fois. Ces déterminations se font sur les solutions dialysées avec ou sans alcool cetylique ou toluène.

D'autre part, on a congelé à -30° des solutions de facteur, VII et on les a abandonnées à cette température. Au moment du dosage, on les dégèle rapidement en plongeant les tubes dans un thermostat à 37°.

Nous remercions la *Fondation Emil Barell pour des Recherches dans le Domaine de la Médecine*, qui nous a permis d'effectuer ces travaux.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Reinigung des Faktors VII aus menschlichem Serum beschrieben. Die Elektrophorese dieses Faktors zeigt eine Reinheit von 80% an. Der Faktor VII wurde aus dem Serum 250mal angereichert. Es handelt sich um einen Beschleuniger der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

Medizinische Klinik der Universität Zürich.

¹⁾ Nous remercions le Prof. K. H. Meyer de Genève qui a obligeamment mis son appareil à notre disposition.