

Wenn die pK-Werte der einzelnen Dissoziationsstufen einer Verbindung zwei oder mehr pH-Einheiten auseinander lagen, wurden sie direkt aus der Titrationskurve als das pH halftiger Neutralisation der betreffenden Stufe abgelesen. Für $\Delta pK < 2$ berechneten wir die Dissoziationszahlen mit Hilfe der Formel von *Auerbach & Smolczyk*¹⁾. Danach ergibt sich z. B. eine Korrektur von -0,1 für das grössere und von +0,1 für das kleinere pK gegenüber den aus der Titrationskurve direkt abgelesenen Werten, wenn $\Delta pK = 1$ ist.

Zusammenfassung.

1. Die Dissoziationszahlen einer Reihe von aliphatischen, gesättigten Polyaminen werden ermittelt und miteinander verglichen.
2. Anhand der tabellarischen, durch einige bereits bekannte Daten ergänzten Übersicht lassen sich Regeln zur näherungsweisen Voraussage von Dissoziationszahlen solcher Polyamine ableiten. Deren wichtigste betrifft die Additivität der Dissoziationsintervalle.
3. Die mittlere Abweichung von der Regel beträgt $\pm 0,4$ pK-Einheiten.
4. Das Auftreten der Regelmässigkeiten und der möglichen Abweichungen wird anhand theoretischer Betrachtungen diskutiert.
5. Die theoretisch vorauszusehende Parallelität zwischen Dissoziation und Quaternisierbarkeit wird am Beispiel der aliphatischen Polyamine belegt.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

192. Recherches sur la synthèse biologique de l'acide hippurique²⁾

par F. Leuthardt et H. Nielsen.

(12 II 51)

En incubant des coupes de rein ou de foie de cobaye, de lapin ou de rat, dans une solution appropriée contenant de l'acide benzoïque, *Borsook & Dubnoff*³⁾ ont observé une formation d'acide hippurique. Ces auteurs ont calculé l'augmentation de l'énergie libre. Pour la réaction: benzoate (aq) + glycine (aq) = hippurate (aq), ils ont trouvé la valeur de $\Delta F = + 2670$ Cal. à 38°. Cela signifie que la synthèse ne représente pas simplement l'inverse de l'hydrolyse. Cette dernière peut se faire spontanément par l'hippuricase, mais la synthèse doit être liée à une réaction libérant de l'énergie. D'après les observations de *Borsook & Dubnoff*³⁾ cette énergie doit provenir d'une oxydation, car la synthèse est inhibée par une solution de KCN 0,001-m. Avec

¹⁾ *F. Auerbach & E. Smolczyk*, Z. physik. Ch. **110**, 65 (1924).

²⁾ Ce travail a été réalisé avec l'aide de la *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz*.

³⁾ *H. Borsook & J. W. Dubnoff*, J. Biol. Chem. **132**, 307 (1940).

la méthode des coupes, il n'a pas été possible de pousser plus loin l'étude des différentes étapes de la synthèse enzymatique. Cette dernière est limitée par la perméabilité des surfaces cellulaires. L'étude approfondie des facteurs influençant la synthèse ne pouvait se faire qu'en utilisant des homogénats de tissus. *Borsook & Dubnoff*¹⁾ furent les premiers à obtenir une formation d'acide hippurique à partir de benzoate et de glycine en utilisant un homogénat de foie de cobaye, préparé d'après la méthode de *Potter & Elvehjem*²⁾. L'addition, à leur milieu d'incubation, de cétoglutarate et d'acide adénylique avait pour effet de doubler la quantité d'acide hippurique synthétisé. *Cohen & McGilvery*³⁾ étudièrent la synthèse de l'acide p-amino-hippurique dans des homogénats de foie de rat. Ces auteurs ont établi que la synthèse dépend de l'acide adénosine-triphosphorique. En fractionnant l'homogénat de foie de rat par centrifugation, ils purent démontrer que la synthèse de l'acide p-amino-hippurique était liée aux particules insolubles de la cellule hépatique.

La glycine nécessaire à la synthèse de l'acide hippurique peut être formée à partir d'autres acides aminés. *Leuthardt*⁴⁾ ainsi que *Borsook & Dubnoff*⁵⁾ ont obtenu en présence de coupes de foie de cobaye une synthèse considérable d'acide hippurique, en remplaçant la glycine par la L-glutamine, la DL-sérine, la L-proline, l'hydroxyproline, l'acide aspartique et l'acide glutamique. *Shemin*⁶⁾, confirmant les résultats de *Leuthardt & Glasson*⁷⁾, prouva par la suite à l'aide de la L-sérine marquée (¹⁵N dans le groupe aminé et ¹³C dans le groupe carboxylique) que cet acide aminé est transformé en glycine par la scission entre les atomes α et β de la chaîne carbonée. Plusieurs auteurs ont montré que la réaction est réversible (*Sakami*⁸⁾, *Siekevitz & Greenberg*⁹⁾ et *Winnick* et coll.¹⁰⁾). Dans ce travail, nous montrerons que la synthèse de l'acide hippurique est localisée dans les mitochondries et nous étudierons les conditions de cette synthèse.

Résultats et discussion.

a) *Conditions de synthèse. Dépendance de l'A.T.P.* La constatation la plus importante concernant la synthèse de l'acide hippurique est sa dépendance de l'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.). Cette synthèse présente un nouvel exemple d'une réaction endergonique

¹⁾ H. Borsook & J. W. Dubnoff, *J. Biol. Chem.* **168**, 397 (1947).

²⁾ V. R. Potter & C. A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.* **114**, 495 (1936).

³⁾ P. P. Cohen & R. W. McGilvery, *J. Biol. Chem.* **171**, 121 (1947).

⁴⁾ F. Leuthardt, *Z. physiol. Ch.* **270**, 113 (1941).

⁵⁾ H. Borsook & J. W. Dubnoff, *J. Biol. Chem.* **132**, 307 (1940).

⁶⁾ D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **162**, 297 (1946).

⁷⁾ F. Leuthardt & B. Glasson, *Helv.* **25**, 245 (1942).

⁸⁾ W. Sakami, *J. Biol. Chem.* **179**, 495 (1949).

⁹⁾ P. Siekevitz & D. M. Greenberg, *J. Biol. Chem.* **180**, 845 (1949).

¹⁰⁾ T. Winnick, I. Moring-Claesson & D. M. Greenberg, *J. Biol. Chem.* **175**, 127 (1948).

couplée avec la déphosphorylation de l'A.T.P. Le tableau I montre l'activité des mitochondries en fonction de la concentration de l'A.T.P.

Tableau I.

Suspension de mitochondries $0,5 \text{ cm}^3$. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO_4 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonie est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm^3 . Incubation 30 min. à 38°.

$\mu\text{mol. A.T.P. par essai}$	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
0	0,15
0,5	0,20
1,0	0,40
3,0	1,10
6,0	3,05

Les mitochondries ainsi que la solution surnageante contiennent des ferment hydrolysant l'A.T.P. Pour maintenir une concentration suffisante en A.T.P., il faut ajouter un substrat oxydable permettant la rephosphorylation oxydative de l'acide adénylique (*Müller & Leuthardt*¹⁾). Nous avons utilisé le fumarate comme substrat oxydable. La synthèse se fait aussi bien avec une suspension de mitochondries préparée à partir d'un foie de rat que d'un foie de cobaye (tableau II).

Tableau II.

Suspension de mitochondries $0,5 \text{ cm}^3$. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO_4 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonie est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm^3 . Incubation 45 min. à 38°.

Essais	Conditions	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
Rat	blanc	0,49
	benzoate	0,54
	benzoate + glycine	3,04
Cobaye	blanc	1,00
	benzoate	2,03
	benzoate + glycine	4,91

b) *Localisation de la synthèse.* Pour obtenir la synthèse de l'acide p-amino-hippurique, *Cohen & McGilvery*²⁾ avaient travaillé avec des homogénats lavés et avaient trouvé que leur synthèse était liée aux particules insolubles de l'homogénat. En étudiant la synthèse de l'acide hippurique, à partir de benzoate et de glycine, dans les différentes fractions résultantes des centrifugations de l'homogénat, nous

¹⁾ *A. F. Müller & F. Leuthardt*, Helv. **32**, 2349 (1949).

²⁾ *P. P. Cohen & R. W. McGilvery*, J. Biol. Chem. **171**, 121 (1947).

constatons que le système de synthèse se trouve localisé dans les mitochondries, ceci aussi bien pour des mitochondries préparées à partir d'un foie de rat que d'un foie de cobaye (tableau III). La faible activité retenue dans le surnageant et le culot est due, dans ces deux fractions, à la présence d'un reste de mitochondries.

Tableau III.

Système enzymatique 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonicité est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 min. à 38°. Hc = homogénat complet; M = mitochondries; S = surnageant; C = culot (noyaux, débris cellulaires).

Additions	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$	
	Cobaye	Rat
Hc	0,112	0,028
Hc + acide benzoïque	0,760	0,133
Hc + acide benzoïque + glycine . .	2,55	1,25
M	0,083	0,054
M + acide benzoïque	0,304	0,092
M + acide benzoïque + glycine . .	3,94	2,06
S	0,112	0,179
S + acide benzoïque	0,158	0,108
S + acide benzoïque + glycine . .	0,179	0,195
C + acide benzoïque + glycine . .	0,340	0,230

c) *Précursor de la glycine.* En considérant l'activité de la synthèse, nous constatons qu'elle est plus élevée dans les essais contenant les mitochondries que dans les essais contenant de l'homogénat complet. Par contre, dans les essais qui ne contiennent comme substrat que du benzoate, la synthèse d'acide hippurique est plus forte avec l'homogénat complet qu'avec les mitochondries. Le surnageant contient donc des substances qui, avec le benzoate, donnent de l'acide hippurique. En prenant comme système enzymatique les fractions suivantes: mitochondries seules, mitochondries + surnageant, mitochondries + Kochsaft, et comme substrat du benzoate seul, nous avons constaté que la synthèse de l'acide hippurique est plus importante dans les essais contenant en plus des mitochondries, le surnageant ou le Kochsaft. Ces deux dernières fractions contiennent un précurseur thermostable de la glycine. La vitesse de synthèse à partir de ce précurseur est plus petite qu'à partir de la glycine (tableau IV). En outre, la quantité d'acide hippurique formée à partir de ce précurseur varie d'un animal à l'autre et peut atteindre après 90 min. d'incubation des valeurs considérables.

En étudiant la synthèse de l'acide hippurique à partir de benzoate et du précurseur en présence d'un surnageant dialysé et d'un

Tableau IV.

Système enzymatique 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonicité est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 et 90 min. à 38°. M = mitochondries; S = surnageant; K = Kochsaft.

	M	S	K	Benzoate	Glycine	$\mu\text{mol. acide hippurique}$
Incubation 45 min.	+	--	--	--	--	0,279
	--	+	--	--	--	0,312
	--	--	+	--	--	0,009
	+	--	--	+	--	0,387
	--	+	--	+	--	0,413
	--	--	+	+	--	0,013
	+	+	--	+	--	0,780
	+	--	+	+	--	1,610
	--	+	+	+	--	0,221
	+	--	--	+	+	3,200
Incubation 90 min.	+	--	--	+	--	0,805
	+	+	--	+	--	2,64
	--	+	--	+	--	0,155
	+	--	--	+	+	3,18

même surnageant non dialysé, nous constatons que le surnageant dialysé perd son activité. Cette dernière peut être restaurée en ajoutant le dialysat concentré aussi bien du surnageant que du Kochsaft (tableau V).

Tableau V.

Système enzymatique 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonicité est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 min. à 38°. M = mitochondries; S = surnageant gardé pendant 15 h. à 0°; Sd = surnageant dialysé; Ds = dialysat du surnageant; Kd = Kochsaft dialysé; DK = dialysat du Kochsaft.

M	S	Sd	Ds	Kd	DK	Benzoate	Glycine	$\mu\text{mol. acide hippurique}$
+	--	--	--	--	--	+	--	0,410
+	--	+	--	--	--	+	--	0,730
+	+	--	--	--	--	+	--	1,59
+	--	--	+	--	--	+	--	1,90
+	--	--	--	--	--	+	+	3,65
+	--	--	--	--	--	+	--	0,300
+	--	--	--	+	--	+	--	0,725
+	--	--	--	--	+	+	--	1,43
+	--	--	--	--	--	+	+	3,48

Les résultats mentionnés ci-dessus nous ont laissé supposer que le précurseur pourrait être un acide aminé ou un peptide à poids moléculaire peu élevé. En remplaçant la glycine par certains di- ou tripeptides contenant dans leur molécule de la glycine, nous constatons qu'en effet la synthèse de l'acide hippurique a lieu, et ceci aussi bien avec l'homogénat complet qu'avec les mitochondries. Donc les deux fractions contiennent les peptidases nécessaires à l'hydrolyse des peptides utilisés. En ayant comme système enzymatique une suspension de mitochondries, la synthèse à partir de la L-leucyl-glycyl-glycine, de la glycyl-glycyl-leucine ou du glutathion est plus lente qu'à partir de la glycyl-L-leucine. L'addition du surnageant ou du surnageant dialysé (donc ne contenant plus le précurseur), à la suspension de mitochondries, accélère de beaucoup la synthèse à partir du tripeptide (tableau VI). Mais comme nous l'avons indiqué¹⁾, il semble que

Tableau VI.

Système enzymatique 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; di- ou tripeptides 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonicité du milieu est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 60 min. à 38°. Hc = homogénat complet; M = mitochondries; S = surnageant; Sd = surnageant dialysé.

Additions	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
Hc + acide benzoïque	1,00
Hc + acide benzoïque + L-leucyl-glycyl-glycine	2,60
Hc + acide benzoïque + glutathion	2,03
Hc + acide benzoïque + glycyl-L-leucine	3,15
M + acide benzoïque	0,33
M + acide benzoïque + L-leucyl-glycyl-glycine	1,10
M + acide benzoïque + glutathion	1,43
M + acide benzoïque + glycyl-L-leucine	3,31
M + acide benzoïque + DL-alanyl-glycine	3,35
M + S + acide benzoïque	1,15
M + S + acide benzoïque + L-leucyl-glycyl-glycine	3,69
M + S + acide benzoïque + glycyl-L-leucine	3,26
M + Sd + acide benzoïque	0,73
M + Sd + acide benzoïque + L-leucyl-glycyl-glycine	3,27

les dipeptidases et tripeptidases sont différemment réparties entre les fractions protéiques solubles de la cellule et les mitochondries. Un phénomène analogue a été observé par Fodor, Price & Greenstein²⁾. La question se pose de savoir si la synthèse de l'acide hippurique à partir des peptides, contenant de la glycine en position terminale, pourrait se faire, en absence de l'A.T.P., par le passage de la glycine

¹⁾ H. Nielsen & F. Leuthardt, Helv. physiol. pharmacol. acta **7**, C 53 (1949).

²⁾ P. J. Fodor, V. E. Price & J. P. Greenstein, J. Biol. Chem. **180**, 193 (1949).

d'un groupe acyle à un autre (réaction analogue à la «*transpeptidation*» décrite par *Hanes* et ses collaborateurs¹⁾). Le tableau VII montre que tel n'est pas le cas. La synthèse à partir des peptides en absence de l'A.T.P. est aussi faible qu'à partir de la glycine libre. On peut en conclure que la glycine est libérée avant d'être incorporée à l'acide hippurique.

Tableau VII.

Suspension de mitochondries 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine ou dipeptides 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonie est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 30 min. à 38°.

Exp.	Substrats	$\mu\text{mol. A.T.P.}$ par essai	$\mu\text{mol. acide}$ hippurique formé
I	glycyl-L-leucine	0,5	0,10
	glycyl-L-leucine	1,0	0,20
	glycyl-L-leucine	3,0	0,30
	glycyl-L-leucine	6,0	2,15
II	glycyl-L-leucine	1,0	0,30
	glycyl-L-leucine	6,0	1,50
	DL-alanyl-glycine	1,0	0,40
	DL-alanyl-glycine	6,0	3,20
	glycine	6,0	3,35

d) *Analyse chromatographique du dialysat, du surnageant et du Kochsaft.* Nous avons essayé d'identifier la nature du précurseur par chromatographie sur papier filtre (*Consden, Gordon & Martin*²), *Dent*³)).

Le surnageant a été dialysé, le dialysat concentré et le résidu hydrolysé. Le chromatogramme développé révèle deux taches distinctes. Les niveaux de ces taches correspondent à l'acide glutamique et à la glycine témoins sur la piste S (fig. 1).

Nous avons opéré de la même manière avec l'hydrolysat du dialysat du Kochsaft (DK). Après développement à la ninhydrine, nous observons également des taches correspondant à l'acide glutamique et à la glycine (fig. 2).

Nous pouvons en déduire que le précurseur du surnageant est identique à celui du Kochsaft et, comme nous l'avons déjà mentionné, thermostable. Même une hydrolyse prolongée de 10 à 24 h. ne fait pas apparaître d'autres acides aminés que celui qui a une valeur de Rf de 0,77. D'après le tableau de *Dent*³) nous pouvons avoir à cet endroit l'ornithine, la valine, la norvaline ou le tryptophane. Il est possible que le précurseur se trouve être le glutathion, car cette substance est assez répandue dans les différents organes des mammifères

¹⁾ *C. S. Hanes, F. J. R. Hird & F. A. Isherwood*, Nature **166**, 288 (1950).

²⁾ *R. Consden, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, Biochem. J. **38**, 224 (1944).

³⁾ *C. E. Dent*, Biochem. J. **43**, 169 (1948).

(*Awapara*¹)). Dans nos conditions d'expérience nous n'avons néanmoins jamais pu prouver la présence de la cystéine sous forme de cystine.

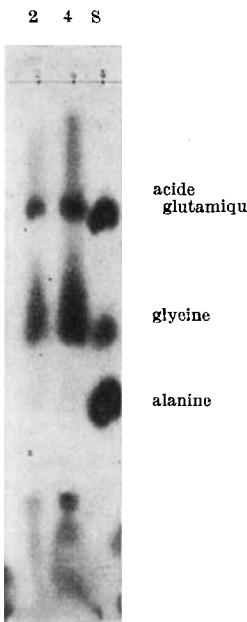


Fig. 1.

Chromatogramme du dialysat du liquide surnageant d'un homogénat de foie de cobaye centrifugé. Le dialysat est hydrolysé pendant 14 h. Après évaporation du HCl, le résidu est dissout dans 3 cm³ d'eau bidistillée et la solution filtrée. De ce filtrat on a déposé en 2 deux, en 4 quatre gouttes. En S on a déposé une goutte d'une solution standard de glycine

d'acide glutamique et d'alanine.

Développement à la ninhydrine.

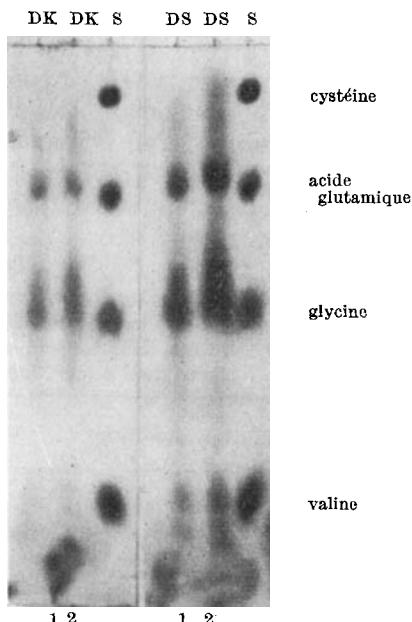


Fig. 2.

Chromatogramme du dialysat du liquide surnageant et du Kochsaft du même homogénat de foie de cobaye. Ds = chromatogramme de l'hydrolysat du dialysat du liquide surnageant. En 1 on a déposé une et en 2 deux gouttes de l'hydrolysat. DK = chromatogramme de l'hydrolysat du dialysat du Kochsaft. En 1 on a déposé une et en 2 deux gouttes de l'hydrolysat. En S des deux chromatogrammes, on a déposé une goutte d'une solution standard de valine, d'acide glutamique, de glycine et de cystéine.

Développement à la ninhydrine.

f) *Influence de la concentration de la glycine.* D'après les travaux de *Cohen & McGilvery*²) il faut 15 fois plus de glycine que d'acide p-amino-benzoïque pour obtenir en 45 min. une synthèse totale. Nous avons montré qu'à partir de benzoate et du précurseur on pouvait obtenir une quantité considérable d'acide hippurique. Il est peu probable que la glycine libérée ou formée à partir d'autres corps se trouve à une concentration dépassant celle de l'acide

¹⁾ *J. Awapara*, Arch. Biochem. **19**, 172 (1948).

²⁾ *P. P. Cohen & R. W. McGilvery*, J. Biol. Chem. **171**, 121 (1947).

benzoïque. En effet, dans nos conditions d'expérience, c'est-à-dire avec un système enzymatique tel que les mitochondries, nous obtenons en 45 min. d'incubation avec 4 μmol . de glycine une synthèse de 77 %. Avec 12 μmol . de glycine, donc une concentration trois fois supérieure à celle de l'acide benzoïque, nous obtenons une synthèse de 98 % (tableau VIII). Notons qu'un tel rendement n'est possible qu'avec une suspension de mitochondries suffisamment active contenant au moins 2 mg N par essai. En comparant nos expériences à celles de Cohen & McGilvery¹⁾ nous voyons que la conjugaison de la glycine avec l'acide benzoïque se fait plus rapidement qu'avec l'acide p-amino-benzoïque.

Tableau VIII.

Suspension de mitochondries 0,5 cm³, 2,07 mg N par essai. Acide benzoïque 0,001-m.; acide fumrique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonicité est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 min. à 38°.

Additions	μmol . acide hippurique	Rendement
4 μmol . acide benzoïque	0,25	—
4 μmol . acide benzoïque + 4 μmol . glycine .	3,08	76,9
4 μmol . acide benzoïque + 8 μmol . glycine .	3,56	89,5
4 μmol . acide benzoïque + 12 μmol . glycine .	3,95	98,6
4 μmol . acide benzoïque + 20 μmol . glycine .	3,98	99,5

g) *Synthèse de la glycine à partir d'autres acides aminés.* Comme l'ont montré les expériences de Borsook & Dubnoff²⁾, Leuthardt & Glasson³⁾, et de Shemin⁴⁾, la glycine nécessaire à la synthèse de l'acide hippurique peut être formée à partir d'autres acides aminés. Avec un homogénat de foie de cobaye ou une suspension de mitochondries, il ne nous a pas été possible d'obtenir une synthèse d'acide hippurique à partir des acides aminés suivants: acide DL- β -hydroxyglutamique, L-leucine, L-valine, L-asparagine, bétaine, DL-alanine et DL-sérine. Par contre, à partir de la DL-thréonine ou de la sarcosine, nous obtenons une quantité considérable d'acide hippurique, ceci aussi bien avec un homogénat qu'avec une suspension de mitochondries. L'activité de ces deux acides aminés est presque aussi grande que celle de la glycine. La synthèse de la glycine à partir de la thréonine et de la sarcosine se produit également dans des suspensions de mitochondries pures. Les enzymes nécessaires à la transformation de ces deux corps en glycine se trouvent localisés dans les mitochondries (tableau IX). Avec la glutamine ou l'acide glutamique nous obtenons

¹⁾ P. P. Cohen & R. W. McGilvery, J. Biol. Chem. **171**, 121 (1947).

²⁾ H. Borsook & J. W. Dubnoff, J. Biol. Chem. **132**, 307 (1940).

³⁾ F. Leuthardt & B. Glasson, Helv. **25**, 245 (1942).

⁴⁾ D. Shemin, J. Biol. Chem. **162**, 297 (1946).

Tableau IX.

Système enzymatique 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonie est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 min. à 38°. Hc = homogénat complet; M = mitochondries.

Additions	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
Hc + acide benzoïque	0,90
Hc + acide benzoïque + 40 $\mu\text{mol. thréonine}$. . .	1,50
Hc + acide benzoïque + 8 $\mu\text{mol. thréonine}$. . .	1,35
Hc + acide benzoïque + 40 $\mu\text{mol. sarcosine}$. . .	1,20
M + acide benzoïque	0,40
M + acide benzoïque + 40 $\mu\text{mol. thréonine}$. . .	2,20
M + acide benzoïque + 8 $\mu\text{mol. thréonine}$. . .	1,74
M + acide benzoïque + 40 $\mu\text{mol. sarcosine}$. . .	2,21

dans l'homogénat une faible formation d'acide hippurique. En présence d'une suspension de mitochondries, les valeurs sont semblables à celles obtenues à partir du précurseur naturel dont il était question plus haut (page 1621). Les combinaisons des systèmes enzymatiques: mitochondries + surnageant, mitochondries + surnageant dialysé ou mitochondries + Kochsaft, ne favorisent pas la formation de la glycine à partir des deux acides aminés sus-mentionnés. La prolongation du temps d'incubation a pour seul effet d'augmenter la synthèse de l'acide hippurique à partir du benzoate et du précurseur. Nous avons également varié la concentration du tampon, sans obtenir d'effet. Il est curieux que la DL-sérine soit inactive tandis que la DL-phényl-sérine nous donne une faible synthèse en présence d'une suspension

Tableau X.

Mêmes conditions que celles indiquées sous tableau IX. Incubation 45 min. à 38°. Hc = homogénat complet; M = mitochondries.

Additions	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
Hc + acide benzoïque	1,22
Hc + 40 $\mu\text{mol. glutamine}$	0,20
Hc + acide benzoïque + 40 $\mu\text{mol. glutamine}$	1,74
Hc + acide benzoïque	1,10
Hc + 40 $\mu\text{mol. acide glutamique}$	0,28
Hc + ac. benzoïque + 40 $\mu\text{mol. acide glutamique}$. . .	1,54
Hc + acide benzoïque	0,90
Hc + ac. benzoïque + 40 $\mu\text{mol. phényl-sérine}$	0,96
M + acide benzoïque	0,45
M + ac. benzoïque + 40 $\mu\text{mol. phényl-sérine}$	1,10

de mitochondries. Dans ce cas également, la combinaison des différentes fractions ou la prolongation du temps d'incubation n'a aucun effet (tableau X). Les résultats obtenus avec la glutamine, l'acide glutamique et la phényl-sérine ne sont pas réguliers. Or, nous constatons que le tissu intact (coupes) a la capacité de former de la glycine à partir de la DL-sérine, de la glutamine et de l'acide glutamique, tandis que ces transformations n'ont pas lieu dans le tissu homogénéisé. Nous ne pouvons pas expliquer la raison pour laquelle la scission de la chaîne carbonée ne peut se produire après la destruction du tissu. Il est possible que les conditions de nos expériences ne soient pas optimales parce qu'un facteur indispensable a été détruit pendant la préparation de l'homogénat, ou que ce facteur se trouve être trop dilué.

b) *Inhibition de la synthèse de l'acide hippurique par un facteur hépatique.* Dans le chapitre concernant la préparation des mitochondries (p. 1629), nous indiquons qu'une substance inhibitrice colorée se trouve dans les homogénats de foie de cobaye. En présence de cette substance, on obtient des suspensions de mitochondries légèrement colorées qui sont peu ou pas actives. Ces observations nous ont laissé supposer que le corps inhibiteur pouvait provenir de la bile. Nous avons, après neutralisation, dilué 10 fois la bile du même animal avec un tampon phosphates de pH 7,5. Nous avons ajouté une quantité croissante de cette solution à nos essais. L'inhibition de la synthèse de l'acide hippurique est nette, mais n'est pas toujours la même et varie d'un animal à l'autre (tableau XI). L'activité de la synthèse

Tableau XI.

Suspension de mitochondries 0,5 cm³. Acide benzoïque 0,001-m.; glycine 0,015-m.; acide fumarique 0,0025-m.; MgSO₄ 0,0026-m.; KCl 0,04-m.; A.T.P. 0,0005-m.; cytochrome C 0,0000145-m. L'isotonie est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5. Volume final 4 cm³. Incubation 45 min. à 38°. N bile = teneur en azote de la solution de bile ajoutée, exprimé en mg.

Additions	N bile	$\mu\text{mol. acide hippurique formé}$
benzoate + glycine . . .	—	3,60
benzoate + glycine . . .	0,007	3,28
benzoate + glycine . . .	0,028	0,70
benzoate + glycine . . .	0,010	3,60
benzoate + glycine . . .	0,020	3,12
benzoate + glycine . . .	0,030	2,57

dépend beaucoup de la manière dont les mitochondries sont préparées (voir p. 1629). La quantité du facteur inhibiteur, contenu dans le foie de cobaye, dépend de la nourriture de l'animal (herbe ou foin plus betteraves). Il est particulièrement abondant dans les foies des animaux recevant de l'herbe dans leur nourriture; il manque en hiver,

quand les cobayes sont nourris avec des betteraves, des carottes et du foin. Peut-être s'agit-il d'un produit de dégradation de la chlorophylle? Dans des expériences ultérieures il s'agira de chercher la nature chimique de cet inhibiteur.

Partie expérimentale.

a) *Matériel. Animaux.* Nous avons utilisé des rats albinos adultes de 150—200 g ainsi que des cobayes de 200—300 g. Les animaux avaient reçu une nourriture optimale et furent mis à jeun environ 36 à 40 h. avant l'expérience.

Substrats. Le benzoate de Na ainsi que le fumarate de Na sont des produits commerciaux recristallisés. La glycine, l'acide glutamique, la thréonine, la sarcosine, la leucyl-glycyl-glycine, la leucyl-glycine, le glutathion sont des produits Hoffmann-La Roche. L'acide β -hydroxyglutamique fut préparé selon la méthode de Harington & Randall¹⁾. L'acide adénosine-triphosphorique est préparé selon les méthodes combinées de Needham²⁾, Kerr³⁾ & Le Page⁴⁾. Le cytochrome C est préparé à partir de cœur de cheval selon la méthode de Keilin & Hartree⁵⁾, et gardé en solution. Une partie de ce produit nous a été fourni par la Robapharm, Bâle.

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée et leur pH est ajusté à 7,5. L'isotonicité du milieu est atteinte au moyen d'un tampon phosphates de K de pH 7,5.

b) *Préparation des suspensions enzymatiques.* Toute la préparation des différentes fractions s'effectue à 0° à l'aide d'une centrifugeuse à réfrigération. Après la mort de l'animal, le foie est immédiatement mis dans la glace. L'homogénéisation du tissu s'effectue pendant au moins 45 sec. dans l'appareil de Potter & Elvehjem⁶⁾, contenant du KCl isotonique comme milieu de suspension. L'homogénat ainsi obtenu est filtré à travers deux couches de gaze.

10 cm³ d'un homogénat de foie de cobaye à 20% sont centrifugés pendant 15 min. à 4600 t/min. (3500 g). Le surnageant est décanté et gardé pour la préparation soit du Kochsaft, soit d'un surnageant dialysé. Le foie de cobaye contient une substance de coloration verte, de densité un peu inférieure aux mitochondries. De ce fait, nous trouvons après la première centrifugation comme couche supérieure du résidu, un anneau vert dont l'épaisseur et l'intensité de coloration varient d'un homogénat à l'autre. Cet anneau est éliminé au moyen d'une pipette, car cette couche contient des corps inhibiteurs de la réaction étudiée. Il est dans bien des cas impossible, même avec plusieurs lavages à la mannite isotonique, d'éliminer complètement ce corps, et la suspension de mitochondries ainsi obtenue reste verdâtre. Pour notre synthèse, une telle suspension de mitochondries est peu active, dans certains cas même totalement inactive. La nature du corps inhibiteur est inconnue. Il semble qu'il provient de la bile (voir page 1628).

Au résidu on ajoute 3 cm³ d'une solution de mannite isotonique et on refait une suspension homogène. Cette dernière est centrifugée pendant 10 min. à 4600 t/min. Le surnageant est décanté. La troisième centrifugation ne dure que 7 à 9 min. Une partie des mitochondries ne s'est pas sédimentée et le surnageant blanc-verdâtre est décanté. Ce n'est qu'après la quatrième centrifugation que nous obtenons, avec ce procédé, une suspension de mitochondries presque blanche. Le contrôle microscopique (microscope à contraste de phase) révèle une suspension homogène de particules dans laquelle on ne trouve que rarement un noyau ou une hématie. L'activité des suspensions dépend du

¹⁾ C. R. Harington & S. S. Randall, Biochem. J. **25**, 1917 (1931).

²⁾ D. M. Needham, Biochem. J. **36**, 113 (1942).

³⁾ S. E. Kerr, J. Biol. Chem. **139**, 121 (1941).

⁴⁾ G. A. Le Page, dans W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

⁵⁾ D. Keilin & E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc., Ser. B, **122**, 298 (1937).

⁶⁾ V. R. Potter & C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. **114**, 495 (1936).

nombre des granules par unité de volume, mais leur dénombrement direct est très difficile. Dans quelques expériences, nous avons comparé la densité optique des suspensions (mesurée à 375 m μ à l'aide du photomètre de Beckman) avec leur teneur en azote. Le dosage de la densité optique pour différentes dilutions de la même suspension, montre que la densité optique est une fonction linéaire de la concentration de la suspension, donc du nombre des particules.

c) *Incubation.* Le volume final par essai est de 4 cm 3 . La phase gazeuse est de l'air. L'incubation s'effectue dans des erlenmeyers de 25 cm 3 . Ces derniers sont agités pendant 45 min. à 38°.

d) *Extraction de l'acide hippurique.* Après l'incubation, la réaction est arrêtée par l'adjonction de 1 cm 3 d'une solution à 10% d'acide métaphosphorique. Après centrifugation des protéines, on prélève 4 cm 3 que l'on pipette dans un petit appareil d'extraction du type *Kutscher-Steudel* d'une capacité d'environ 6 cm 3 . On ajoute 0,2 cm 3 H₂SO₄ n. Les tubes d'extraction sont refroidis à l'eau froide afin d'éviter une hydrolyse. L'extraction dure 5 h. Le résidu de l'extrait éthétré est dissout dans 3 cm 3 d'acide chlorhydrique azotropique. Le ballon est muni d'un réfrigérant à reflux et on fait bouillir la solution pendant 2 h. Après l'hydrolyse le HCl est complètement éliminé au vide à 100°. Le résidu sec est dissout dans 10 cm 3 d'eau distillée. On agite cette solution en présence de 0,5 g de permanganate de sodium pour éliminer NH₃. La solution est filtrée et une partie aliquote du filtrat sert à la détermination de la glycine sous forme de N aminé.

e) *Dosage de l'acide hippurique.* Dans les premières expériences nous avons employé pour le dosage de la glycine de l'acide hippurique, la méthode décrite par *Russell*¹⁾. Cette méthode n'est pas spécifique puisqu'elle englobe toutes les substances qui sont extraites par l'éther et qui par hydrolyse donnent des groupes aminés libres. La plupart des dosages de la glycine ont été effectués selon la méthode décrite par *Krueger*²⁾, qui est une modification de celle d'*Alexander* et coll.³⁾. Cette méthode se base sur le fait qu'une solution diluée de glycine donne à l'ébullition en présence de ninhydrine (hydrate de tricétohydridène) 1 mol. de formaldéhyde par mol. de glycine (*MacFadyen*⁴⁾). D'après *Eegriwe*⁵⁾ l'aldehyde formique se condense à 100° dans un milieu de H₂SO₄ conc. avec de l'acide chromotropique pour donner une coloration d'un violet intense. Les détails du procédé sont ceux proposés par *Krueger*²⁾. Le rendement de la première méthode est de 80 à 90%, tandis que la seconde méthode nous permet de retrouver 90 à 97% de l'acide hippurique ajouté.

f) *Récupération du précurseur de la glycine dans le dialysat.* Nous avons dialysé à 0°, 12 cm 3 de surnageant pendant 15 h. contre 80 cm 3 d'eau distillée. Le volume du dialysat (solution extérieure) est réduit à 3 cm 3 , sous vide, à 30°. La solution reste claire et il n'y a pas de précipitation. Simultanément 12 cm 3 du même surnageant sont gardés à la même température pendant le même temps. — 13 cm 3 de surnageant sont chauffés au bain-marie bouillant pendant 5 min. et centrifugés. Le surnageant ou Kochsaft est également dialysé pendant 15 h. contre 15 cm 3 d'eau distillée. Le dialysat est réduit au vide à 3 cm 3 et utilisé comme tel.

g) *Préparation du dialysat pour la chromatographie.* 12 cm 3 de surnageant, d'un homogénat de 20%, sont dialysés pendant 14 h. à 0° contre 70 cm 3 d'eau distillée. Le volume du dialysat est réduit au vide à 3 cm 3 . 1 cm 3 de cette solution est ajouté à 3 cm 3 HCl à 20% et le tout chauffé à ébullition pendant 10 h. L'acide chlorhydrique est évaporé sous vide. Le résidu sec est dissout dans 3 cm 3 d'eau et filtré. Le volume du filtrat, dont la couleur est jaune, est réduit au vide à environ 0,5 cm 3 . Nous avons utilisé du papier filtre *Whatman* n° 1 et avons développé le chromatogramme pendant 18 h. à la température ordinaire en utilisant comme solvant une solution de phénol saturée d'eau et en travaillant dans une atmosphère contenant de l'ammoniaque.

¹⁾ *J. A. Russell*, *J. Biol. Chem.* **156**, 467 (1944).

²⁾ *R. Krueger*, *Helv.* **32**, 238 (1948).

³⁾ *B. Alexander*, *G. Landwehr & A. M. Seligman*, *J. Biol. Chem.* **160**, 51 (1945).

⁴⁾ *D. A. MacFadyen*, *J. Biol. Chem.* **158**, 107 (1945).

⁵⁾ *E. Eegriwe*, *Z. anal. Ch.* **110**, 22 (1937).

13 cm³ d'un surnageant de 20% sont chauffés pendant 5 min. au bain-marie à 100°. Les protéines coagulées sont séparées par centrifugation. Le Kochsaft est dialysé pendant 15 h. à 0° contre 30 cm³ d'eau distillée. 13 cm³ du même surnageant et du même homogénat sont également dialysés contre 30 cm³ d'eau distillée pendant le même temps. Le volume des deux dialysats est réduit à sec par évaporation au vide. Chaque résidu est redissout dans 3 cm³ d'eau. De ces solutions 2 cm³ sont transférés dans deux ballons contenant 4 cm³ de HCl de 20% que l'on porte à ébullition durant 24 h. Après distillation du HCl au vide, chaque résidu est redissout dans 0,2 cm³ d'eau bidistillée.

RÉSUMÉ.

1^o Il y a synthèse d'acide hippurique à partir de benzoate et de glycine dans le tissu hépatique homogénéisé du rat et du cobaye. La synthèse n'a lieu qu'en présence de l'A.T.P.

2^o Le système enzymatique nécessaire à la synthèse de l'acide hippurique se trouve localisé dans les granules cytoplasmiques (mitochondries) de la cellule hépatique.

3^o En présence d'une suspension de mitochondries suffisamment concentrée, nous obtenons une synthèse stoechiométrique d'acide hippurique à partir de benzoate et de glycine.

4^o Le liquide surnageant, obtenu après centrifugation des mitochondries, des noyaux et des débris cellulaires contient un précurseur de la glycine, thermostable et dialysable sans altération.

5^o L'analyse par chromatographie sur papier du précurseur hydrolysé a révélé de l'acide glutamique et de la glycine.

6^o La glycine peut en effet être remplacée par certains polypeptides. Nous avons obtenu une synthèse d'acide hippurique à partir des peptides suivants: L-leucyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-leucine, glutathion, glycyl-L-leucine, et analyl-glycine. En présence d'une suspension de mitochondries, le rendement en acide hippurique est supérieur à partir des dipeptides. En ajoutant le liquide surnageant dialysé à la suspension de mitochondries, on augmente la synthèse à partir des tripeptides. Ceci montre que dans la cellule la répartition des di- et tripeptidases est différente entre les fractions protéiques solubles et les mitochondries.

7^o La synthèse à partir des peptides n'a lieu qu'en présence de l'A.T.P.

8^o Dans nos conditions d'expériences la sarcosine, la thréonine et la DL-phényl-sérine sont transformées en glycine. Nous obtenons quelquefois une très faible formation d'acide hippurique en remplaçant dans la synthèse la glycine par l'acide glutamique, la glutamine et la DL-sérine. Le système enzymatique permettant la transformation en glycine de la sérine et de l'acide glutamique dans le tissu intact est inactivé par l'homogénéisation du tissu.

9^o La bile de cobaye contient un facteur inhibiteur de la synthèse de l'acide hippurique.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.