

SUMMARY

The reactions of methyl dibromophosphine (CH_3PBr_2) with oxygen, ozone, sulfur, selenium, tellurium, primary and secondary amines, silver salts $[\text{AgX}; \text{X} = \text{CN}, \text{NCO}, \text{NCS}]$, GRIGNARD and silylmetallic compounds, alcohol and paraformaldehyde have been studied. The synthesis of $\text{CH}_3\text{P}(\text{X})\text{Br}_2$ [$\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$] and CH_3PR_2 [$\text{R} = \text{alkyl}, \text{aryl}, \text{SiR}_3, \text{R}_2\text{N}, \text{CN}, \text{NCO}, \text{NCS}$] is reported. The preparation of methyl-bromomethylphosphinic bromide, $\text{CH}_3(\text{BrCH}_2)\text{P}(\text{O})\text{Br}$, and O-ethylmethylphosphinate, $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)\text{H}$, is also described.

MONSANTO RESEARCH SA., Zürich 3/45

301. Recherches sur la biochimie des cyclitols VIII Sur la biosynthèse du méso-inositol et du scyllitol chez le Rat

par Th. Posternak, W. H. Schopfer †, Brigitte Kaufmann-Boetsch
et Susi Edwards

Dédié au Professeur D. MONNIER pour son 60^e anniversaire

(24 IX 63)

On sait que des interconversions de glucose et de *méso*-inositol s'effectuent dans l'organisme du Rat. Le mécanisme de la transformation de l'inositol en glucose, découverte déjà en 1946¹⁾, a pu être éclairci en grande partie²⁾, mais nous sommes beaucoup moins bien renseignés quant à la transformation inverse.

Une biosynthèse, chez le Rat, de l'inositol à partir du glucose a été mise en évidence par l'emploi de sucre marqué au ^{14}C . DAUGHADAY et coll.³⁾ injectaient à des jeunes rats du glucose- ^{14}C uniformément marqué, alors que HALLIDAY & ANDERSON⁴⁾ opéraient sur des rats adultes au moyen de glucose- ^{14}C . L'inositol total isolé ensuite à partir des animaux était radioactif. Une biosynthèse notable par la flore intestinale était peu probable car l'incorporation de la radioactivité dans l'inositol n'était pas diminuée lors d'expériences dans lesquelles le contenu intestinal avait été rejeté, ou encore, l'animal avait été préalablement caecotomisé, puis traité *per os* durant 3 jours par des agents bactériostatiques. Le fait que la biosynthèse du cyclitol a lieu essentiellement dans les tissus de l'animal fut encore confirmé par FREINKEL & DAWSON⁵⁾ qui montrèrent qu'après administration de glucose- ^{14}C l'incorporation de la radioactivité dans l'inositol était du même ordre de grandeur chez le Rat à intestin stérile (germ free rat) que chez le Rat normal. Plus récemment, HAUSER⁶⁾ étudia la formation d'inositol libre et d'inositol phospholipidique chez le Rat après injection de glucose- ^{14}C ; son travail porte sur certains tissus et il n'indique pas les incorporations totales, mais seulement les radioactivités spécifiques des divers échantillons d'inositol.

1) M. R. STETTEN & D. STETTEN JR., J. biol. Chemistry 164, 85 (1946).

2) Th. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & D. REYMOND, Helv. 38, 1283, 1660 (1955); 41, 235 (1958); L. ANDERSON & R. H. COOTS, Biochim. biophys. Acta 28, 666 (1958).

3) W. H. DAUGHADAY, J. LARNER & C. HARNETT, J. biol. Chemistry 212, 869 (1955).

4) J. HALLIDAY & L. ANDERSON, J. biol. Chemistry 217, 797 (1955).

5) N. FREINKEL & R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 81, 250 (1961).

6) G. HAUSER, Biochim. biophys. Acta 70, 278 (1963).

Le présent travail, dont nous avons déjà publié un résumé en 1959⁷⁾, avait été entrepris pour étudier comparativement l'incorporation dans l'inositol de la radioactivité de glucoses marqués à différents emplacements. Les travaux cités précédemment avaient été effectués avec plusieurs espèces de glucose marqué, mais les conditions expérimentales employées par les divers auteurs étaient si différentes qu'il est impossible de comparer les résultats.

Lors de l'isolement de l'inositol, nous avons toujours constaté que l'organisme du Rat contient du scyllitol dont la quantité peut atteindre 36% de celle de l'inositol. Nous n'avons pu déceler dans les tissus du Rat d'autres cyclitols. On sait que le scyllitol découvert dans les organes de poissons plagiostomes a été ensuite retrouvé dans plusieurs plantes. D'après une étude déjà ancienne de NEEDHAM⁸⁾ sur les œufs d'*Acanthus vulgaris*, l'embryon de ce poisson synthétiserait 90% de son scyllitol. A partir de 1950, des travaux de l'école de FLEURY⁹⁾ montrèrent la présence fréquente de scyllitol dans les urines de mammifères où il accompagne le *méso*-inositol; le scyllitol n'avait toutefois pu être décelé dans les tissus examinés: muscle de bœuf, rein de porc, foie¹⁰⁾. Un des objets du présent travail était alors d'étudier l'origine du scyllitol du Rat et, éventuellement, d'établir si l'animal peut en effectuer la biosynthèse.

Techniques expérimentales

Substances radioactives. Les origines des échantillons commerciaux employés étaient les suivantes: glucose uniformément marqué, glucose-[1-¹⁴C], acétate de sodium-[1-¹⁴C] et acétate de sodium-[2-¹⁴C]: RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham (Angleterre); glucose-[2-¹⁴C]: VOLK RADIO-CHEMICAL CO, Skokie (Illinois); glucose-[6-¹⁴C]: ORLANDO RESEARCH CORP., Orlando (Florida).

Le *méso*-inositol-[2-¹⁴C] a été préparé suivant la méthode de POSTERNAK, SCHOPFER & HUGUENIN¹¹⁾. A partir de ce *méso*-inositol marqué, on a pu obtenir par oxydation biochimique au moyen d'*Acetobacter suboxydans* du *ms*-inosose-[¹⁴C] et, par réduction de ce dernier au moyen d'amalgame de sodium, du scyllitol-[¹⁴C]¹²⁾.

Mesure de la radioactivité: Les substances ont été mesurées en couches minces sur des disques de laiton de 2,5 cm de diamètre. Dans le cas des cyclitols isolés du Rat, les quantités étaient généralement de 2 mg par disque. Les mesures ont été effectuées au moyen du Superscaler SC-18 TRACERLAB et du Manual Sample Changer SC-9D TRACERLAB, en apportant les corrections habituelles concernant notamment l'absorption de la radioactivité.

Dosages d'inositol. Ils ont été effectués par voie microbiologique au moyen de *Saccharomyces cerevisiae* souche HANSEN, en employant le milieu de PENNINGTON¹³⁾.

Animaux. Tous les animaux utilisés au cours de ce travail étaient des rats mâles WISTAR, mais ils provenaient de divers élevages: WANDER S. A., Berne; SPRICH, Biel-Benken (BL); INSTITUT D'HYGIÈNE, Genève. Des animaux d'âge et de poids analogues ont été employés autant que possible dans chaque série d'expériences.

Injection des substances marquées. Les substances radioactives dissoutes dans de l'eau bi-distillée stérile étaient additionnées de glucose non marqué. La solution était administrée en 11 injections sous-cutanées effectuées à 1 h d'intervalle; la première injection était de 0,8 ml, les 10 autres de 0,4 ml. Les animaux buvaient et mangeaient *ad libitum*. Ils étaient sacrifiés (coup sur la tête) 2 h après la dernière injection. On procédait ensuite immédiatement à l'isolement des cyclitols.

⁷⁾ TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & B. BOETSCH, Arch. Sc. (Genève) 12, 467 (1959).

⁸⁾ J. NEEDHAM, Biochem. J. 23, 319 (1929).

⁹⁾ P. F. FLEURY, J. E. COURTOIS & A. L. JOUANNET, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 1885 (1951).

¹⁰⁾ P. MALANGEAU, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 1003 (1956).

¹¹⁾ TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & R. HUGUENIN, Helv. 40, 1875 (1957).

¹²⁾ TH. POSTERNAK, Helv. 24, 1045 (1941).

¹³⁾ Cf. R. GERMANIER, Archiv Mikrobiol. 33, 333 (1959).

Isolément du ms-inositol et du scyllitol. Pour isoler l'inositol et le scyllitol à partir du Rat, nous avons utilisé la méthode de HALLIDAY & ANDERSON⁴⁾ à laquelle nous avons apporté diverses modifications. Le principe est le suivant: alors que les cyclitols sont relativement résistants à un traitement énergétique par les acides, d'autres composants des tissus sont décomposés avec formation de fonctions acides et basiques, et sont alors retenus par des échangeurs d'ions. HALLIDAY & ANDERSON indiquent que l'inositol peut ensuite être isolé par cristallisation directe. Nous n'avons pu obtenir ainsi que des échantillons très impurs contenant généralement encore du scyllitol. La purification peut par contre s'effectuer facilement par l'intermédiaire des dérivés acétylés; ces derniers permettent d'autre part une séparation efficace des deux cyclitols en raison de la très faible solubilité de l'hexa-O-acétyl-scyllitol dans l'alcool bouillant.

Le corps entier d'un rat (260–350 g) est passé à la machine à hâcher; on homogénéise avec 200 ml d'eau au Turmix; dans l'hypothèse que les tissus contiennent 80% d'eau en volume, on ajoute une quantité de H_2SO_4 conc. telle que le liquide soit 6N en acide. On autoclave ensuite 14 h à 8 atm. (température interne: environ 140°). Après refroidissement, on essore; l'insoluble est suspendu à plusieurs reprises dans l'eau chaude et essoré après refroidissement. On traite les liquides réunis, à 50°, par 50 g de charbon, puis on essore et lave. Le filtrat est neutralisé avec précaution au moyen de $CaCO_3$. Après refroidissement, le précipité est essoré et soigneusement lavé. La déionisation a lieu par passage successif sur des colonnes (8×60 cm) de Dowex 50 sous forme H^+ et de Dowex 2 sous forme OH^- . Les deux résines sont du type standard: 20–50 mesh size, 8% cross linking. Si l'on utilise des colonnes ayant les dimensions indiquées, il est nécessaire de compléter la déionisation en faisant passer encore sur des colonnes plus petites (3×28 cm) de Dowex 50 et de Dowex 2. A ce stade, on effectue par voie microbiologique un dosage de ms-inositol dans la solution. Cette dernière est concentrée dans le vide à consistance sirupeuse. On laisse sous l'alcool à 4°. Le précipité formé, ainsi que le résidu de l'évaporation de la solution alcoolique, sont chauffés 5 min. à l'ébullition avec 5–10 parties d'anhydride acétique en présence d'un peu de chlorure de zinc fraîchement fondu. Après refroidissement, on jette dans l'eau glacée; les dérivés acétylés précipitent et cristallisent après repos à 4°. Après dessiccation, ils sont repris par 40 parties d'alcool bouillant. L'insoluble (hexa-O-acétyl-scyllitol) est essoré à chaud et recristallisé à 3 reprises dans 20 parties d'anhydride acétique: F. (tube capillaire Pyrex) 286–288° n. corr., de même que le F. de mélange avec un échantillon authentique. L'hexa-O-acétyl-inositol contenu dans la solution alcoolique est recristallisé dans 35 parties d'alcool; par filtration à chaud, on le débarrasse des dernières traces d'hexa-acétyl-scyllitol; F. et F. de mélange avec un échantillon authentique: 212–214° n. corr.

Les cyclitols libres s'obtiennent en traitant à chaud, par un excès d'hydroxyde de baryum méthanolique, la solution ou la suspension dans l'alcool des dérivés hexa-acétylés. On dilue par l'eau pour dissoudre les complexes barytiques et précipite les ions Ba^{++} par la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique. Après évaporation du filtrat du sulfate de baryum, les cyclitols sont recristallisés à 3 reprises par dissolution dans un peu d'eau, suivie d'addition d'alcool. F. du ms-inositol: 222–224° n. corr.; F. du scyllitol 342–346° n. corr.; la pureté des substances a encore été contrôlée par chromatographie sur papier.

Calcul des teneurs en cyclitols. Des quantités connues d'inositol et de scyllitol ont été soumises aux traitements utilisés pour leur isolement à partir des rats; la quantité d'inositol restant dans la solution finale a été déterminée aussi bien par voie microbiologique que par isolement sous forme de dérivés hexa-acétylés¹⁴⁾. On constate par les deux méthodes une perte reproductible de 30%, due essentiellement à une destruction au cours de l'autoclavage. Les auteurs⁴⁾⁵⁾ qui avaient isolé précédemment l'inositol par un procédé analogue ne semblent pas avoir remarqué la destruction importante que comportent les traitements employés. De même, on ne peut récupérer que 70% du scyllitol sous forme de dérivé hexa-acétylé, ce qui indique une destruction identique à celle de l'inositol. Les teneurs primitives en inositol des rats ont donc été calculées en divisant par 0,70 les quantités obtenues par les dosages microbiologiques. Pour le calcul des teneurs primitives en scyllitol, nous avons considéré que le rapport des quantités primitives de scyllitol et d'inositol est égal au rapport des poids d'hexa-acétyl-scyllitol et d'hexa-acétyl-inositol obtenus après une

¹⁴⁾ A partir des tissus de Rat, on n'isole comme dérivé hexa-acétylé que 80–90% de la quantité d'inositol dosée par voie microbiologique.

recristallisation. Connaissant la teneur primitive en *ms*-inositol déterminée par voie microbiologique, on en déduit alors la teneur primitive en scyllitol.

Nous nous sommes assurés, par des expériences spéciales, que, dans nos conditions d'auto-clavage, il ne se produit pas d'interconversion, par voie purement chimique, du scyllitol et du *ms*-inositol.

Pureté radiochimique. Dans certaines de nos expériences la radioactivité spécifique du *ms*-inositol était de 10 à 50 fois supérieure à celle du scyllitol. Il était alors important de s'assurer que le scyllitol ne retient pas une quantité notable d'inositol comme impureté radioactive. Des essais ont été effectués sur des mélanges artificiels de *ms*-inositol radioactif et de scyllitol non radioactif; le scyllitol, séparé par les méthodes décrites ci-dessus, ne retenait qu'une radioactivité correspondant à une teneur en inositol de moins de 0,1%. Dans certaines expériences, le scyllitol de très faible radioactivité a encore été soumis à une chromatographie sur papier WHATMAN N° 1 dans le système phénol-eau, qui permet la séparation d'avec le *ms*-inositol¹⁵). La bande contenant le scyllitol a été extraite à l'eau; le cyclitol récupéré a encore été purifié par acétylation, recristallisation du dérivé hexa-acétylé suivie de saponification: la radioactivité spécifique était restée, dans la limite des erreurs de mesures, la même que celle du produit de départ.

Dans deux expériences les rats avaient reçu par injections du scyllitol radioactif. Le *ms*-inositol faiblement radioactif formé a été obtenu comme d'habitude sous forme de dérivé hexa-acétylé; ce dernier a été redissous dans 10 parties d'anhydride acétique en présence de 16 parties d'hexa-acétyl-scyllitol non radioactif. Au bout de 1 h à température ordinaire, on essore l'hexa-acétyl-scyllitol séparé et jette la solution-mère dans l'eau pour récupérer l'hexa-acétyl-inositol. Cette suite d'opérations est répétée (4 fois) jusqu'à constance de la radioactivité du dérivé de l'inositol.

Régimes alimentaires. Sauf indication contraire, les animaux étaient soumis à un régime «naturel» composé de pain, de biscuits, de carottes et de salade (laitue pommée). Après traitement de ces matières de la manière indiquée pour le dosage de l'inositol et du scyllitol chez le Rat, les teneurs suivantes ont été établies par voie microbiologique.

Tableau I. *Inositol en mg dans 100 g de matière*

	Pain	Biscuits	Carottes	Salade
Matière fraîche	121	71	95	124
Matière sèche	130	140	830	2070

Par voie chromatographique (système phénol-eau) on ne peut déceler dans le pain, les biscuits et la salade que des traces de scyllitol. Les carottes, par contre, renferment une quantité relativement considérable de ce cyclitol, représentant environ 20% de la teneur en inositol, soit 160 mg dans 100 g sec; le scyllitol des carottes a pu en outre être isolé comme dérivé hexa-acétylé de F. et F. de mélange 292–294°.

Dans certaines expériences, des animaux âgés de 4 semaines, d'un poids de 50 à 70 g, étaient soumis durant 3 mois à un régime artificiel¹⁶). Celui-ci contenait, à côté d'un mélange de sels minéraux (4%) et de vitamines du groupe B (à l'exception de l'inositol), les composants suivants: caséine DIFCO 18%; amidon BRITISH DRUG HOUSES 55,5%; saccharose *puriss.* MERCK 12,5%; huile de foie de morue LOFODOL 9%; graisse de coco 1%. Ce régime contient 7 mg d'inositol dans 100 g secs; 76% du cyclitol sont contenus dans l'amidon. La teneur en scyllitol déterminée approximativement par chromatographie sur papier représente moins de 2% de la teneur en inositol.

Traitement par des antibiotiques. Deux rats ont été soumis à un traitement par des antibiotiques dans le but de réduire leur flore intestinale⁴). Durant 2 semaines ils ont reçu 2 fois par jour 1 ml par voie buccale (sonde stomacale) et 1 ml par voie anale d'une solution dans 20 ml d'eau des produits suivants: terramycine 135 mg; bacitracine 90 mg; néosolvarsan 11 mg; Cibazol 2,2g; pénicilline (introduite au dernier moment) 50 mg.

¹⁵) TH. POSTERNAK, D. REYMOND & W. HAERDI, *Helv.* 38, 191 (1955).

¹⁶) H. PFALTZ, *Z. Vitamin-Forsch.* 12, 193 (1942).

Résultats et discussion¹⁷⁾

Teneurs en ms-inositol et en scyllitol des animaux. Au cours de ce travail, nous avons procédé à des dosages de ms-inositol et de scyllitol chez 36 rats d'âge et de poids différents, soumis au régime «naturel» (voir techniques expérimentales). Le tableau II indique les teneurs moyennes de 3 groupes d'animaux classés par ordre de poids croissant.

Tableau II. *Teneurs en inositol et en scyllitol de rats soumis au régime «naturel»*

Groupe	Nombre d'animaux	Poids des animaux en g (moy. $\pm$ ET)	Teneurs en mg dans 100 g (Moyenne $\pm$ ET)	
			Ms-inositol	Scyllitol
I	10	277 $\pm$ 10	43 $\pm$ 7	4,8 $\pm$ 2,2
II	15	301 $\pm$ 7	35 $\pm$ 7	5,2 $\pm$ 3,3
III	11	338 $\pm$ 14	26 $\pm$ 5	3,8 $\pm$ 1,5

Les travaux classiques de MEILLÈRE avaient montré que dans le règne végétal l'inositol est plus abondant dans les tissus à croissance rapide. On ne trouve par contre dans la littérature que quelques indications concernant certains tissus animaux. Le tableau précédent montre que la teneur en inositol de l'animal entier diminue lorsque le poids et l'âge augmentent; on n'observe par contre aucune corrélation de ce genre en ce qui concerne la teneur en scyllitol des animaux soumis au régime «naturel»: ceci est à rapprocher des observations de MALANGEAU⁸⁾ concernant le caractère capricieux de la scyllitolurie humaine.

Des rats ont été soumis d'autre part, durant 3 mois, au régime «artificiel» pauvre en inositol et en scyllitol (voir techniques expérimentales). Certains d'entre eux recevaient le même régime additionné de 0,2% d'inositol.

Tableau III. *Teneur en inositol de rats soumis à un régime «artificiel» additionné ou non d'inositol*

Régime	Nombre d'animaux	Poids des animaux en g (moy. $\pm$ ET)	Inositol en mg dans 100 g (moy. $\pm$ ET)
I. Sans addition d'inositol	8	193 $\pm$ 18	31 $\pm$ 7
II. Avec addition de 0,2% d'inositol	8	208 $\pm$ 30	38 $\pm$ 10

Le tableau III montre que les deux groupes de rats ne présentent pas de différence considérable en ce qui concerne leur teneur en inositol. Ceci confirme les observations anciennes concernant le pouvoir du Rat de synthétiser ce cyclitol. D'autre part, nous n'avons trouvé chez les animaux à régime «artificiel» des deux groupes que des traces de scyllitol; il devient ainsi probable que la majeure partie du scyllitol du Rat est d'origine alimentaire¹⁸⁾. Les tissus de l'animal ont ainsi un pouvoir remarquable de

¹⁷⁾ Abréviations employées: Glucose = G, p.ex. Glucose-[1-¹⁴C] = G-1-¹⁴C; G-U-¹⁴C = glucose uniformément marqué; ET = écart type (standard deviation); mC = millicurie; c/min = impulsions par minute.

¹⁸⁾ Il faut toutefois noter que les animaux soumis au régime artificiel cessent d'augmenter de poids au bout de 10-12 semaines, et leur pouvoir de synthèse du scyllitol n'est peut-être pas pareil à celui d'animaux normaux.

stockage de ce cyclitol: dans certains cas, la teneur en scyllitol atteint 36% de celle en inositol. Les expériences décrites ci-après ont cependant montré que le Rat possède le pouvoir de synthétiser le scyllitol.

Biosynthèse du ms-inositol et du scyllitol à partir de diverses substances marquées. Comme indiqué plus haut (techniques expérimentales) les diverses substances marquées ont été injectées en même temps que du glucose non radioactif. Deux séries d'expériences ont été effectuées: dans l'une des séries, la quantité totale de glucose injecté était de 7,5 mg, dans l'autre de 43 mg (tableau IV).

Tableau IV. *Radioactivité dans les cyclitols après injection de glucose- ^{14}C*
(moyenne $\pm$ ET)

Subst. admin. et nombre d'animaux	Ms-inositol		
	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. en % de la rad. admin.
I: 43 mg			
G-1- ^{14}C (4)	119,6 $\pm$ 33,6	220,7 $\pm$ 80,0	0,113 $\pm$ 0,042
G-6- ^{14}C (4)	83,8 $\pm$ 5,5	216,3 $\pm$ 49,1	0,081 $\pm$ 0,013
G-2- ^{14}C (4)	120,5 $\pm$ 13,5	268,7 $\pm$ 59,8	0,141 $\pm$ 0,025
II: 7,5 mg			
G-1- ^{14}C (4)	76,0 $\pm$ 11,8	180,8 $\pm$ 23,7	0,057 $\pm$ 0,017
G-U- ^{14}C (3)	78,0 $\pm$ 12,8	123,6 $\pm$ 17,3	0,040 $\pm$ 0,006

Subst. admin. et nombre d'animaux	Scyllitol		
	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. (en % de la rad. admin.) $\times 10^3$
I: 43 mg			
G-1- ^{14}C (4)	12,1 $\pm$ 3,7	6,0	0,31
G-6- ^{14}C (4)	12,3 $\pm$ 2,7	39,7	2,20
G-2- ^{14}C (4)	11,4 $\pm$ 3,6	4,7	0,23
II: 7,5 mg			
G-1- ^{14}C (4)	14,0 $\pm$ 7,3	8,1	0,46
G-U- ^{14}C (3)	8,9 $\pm$ 3,9	15,3	0,57

Les radioactivités administrées allaient de $22,0 \cdot 10^6$ à $24,3 \cdot 10^6$ c/min (0,080–0,088 mC) par animal. La radioactivité du scyllitol a été mesurée sur le mélange provenant de tous les animaux d'une même série.

Comme le montrent les essais avec le glucose- ^{14}C (G-1- ^{14}C) le pourcentage de radioactivité incorporé dans l'inositol est plus élevé lorsque la quantité de glucose est plus forte. Notons que d'après FELLER et coll.¹⁹⁾, le Rat catabolise par heure près de 100 mg de glucose par 100 g d'animal; la quantité de glucose administrée lors de nos expériences apparaît en comparaison comme peu élevée. Nous ne pouvons expliquer pour le moment l'effet observé. Toujours est-il que dans la plupart de nos expériences nous avons utilisé la dose plus élevée de glucose, de manière à augmenter l'incorporation de radioactivité.

¹⁹⁾ D. FELLER, E. H. STRISOWER & I. L. CHAIKOFF, J. biol. Chemistry 187, 571 (1950).

Le tableau IV montre qu'il se produit de fortes variations d'un animal à l'autre dans les incorporations de radioactivité, et le nombre d'animaux d'expérience de chaque série est trop faible pour qu'on puisse en tirer des conclusions rigoureuses. Notons toutefois que l'incorporation dans l'inositol diminuerait dans l'ordre suivant: glucose-[2-¹⁴C], glucose-[1-¹⁴C], glucose-[6-¹⁴C]. D'autre part, comme le montre la série II du tableau, l'incorporation serait plus forte à partir du glucose-[1-¹⁴C] qu'à partir du glucose uniformément marqué (G-U-¹⁴C).

Les incorporations dans le scyllitol sont beaucoup plus faibles et très irrégulières. Notons toutefois qu'à partir du glucose-[6-¹⁴C] il s'est produit une incorporation relativement plus élevée.

A partir des acétates, les incorporations sont beaucoup plus faibles qu'à partir du glucose. L'acétate-[2-¹⁴C] apparaît toutefois comme plus efficace que l'acétate-[1-¹⁴C] (voir tableau V).

Tableau V. *Incorporation radioactive dans les cyclitols après injection d'acétate-[¹⁴C]*
(les acétates [0,084 mC] étaient administrés en même temps que 7,5 mg de glucose)
Incorp. en % de la radioactivité admin. (moyennes de 2 rats)

Subst. admin.	Ms-inositol	Scyllitol
Acétate-[1- ¹⁴ C]	0,003 ± 0,001	Traces
Acétate-[2- ¹⁴ C]	0,015 ± 0,003	Traces

Mécanisme de la biosynthèse de l'inositol. Le mécanisme de la biosynthèse de l'inositol est encore très discuté. On connaît la représentation de MAQUENNE²⁰⁾ d'après laquelle ce cyclitol prendrait directement naissance à partir du glucose par une aldolisation interne, ce qui impliquerait une incorporation indépendante de la nature du glucose marqué. Il est devenu plus probable que le glucose commence par se scinder en fragments dont certains se recombinaient pour former le cyclitol. Dans le cas de *Torulopsis utilis*, CHARALAMPOUS²¹⁾ avait constaté que les radioactivités spécifiques de l'inositol synthétisé à partir de divers précurseurs, diminuaient dans l'ordre suivant de ces derniers: glucose-[6-¹⁴C], glucose-[1-¹⁴C], glucose-[2-¹⁴C], qui est exactement l'ordre inverse de celui que nous avons indiqué pour le Rat. D'autre part, l'acétate-[2-¹⁴C] était un précurseur très efficace pour la levure; dans le cas du Rat, par contre, l'incorporation est de 6 à 10 fois plus faible qu'à partir du glucose. Il paraît donc peu probable que chez le Rat le mécanisme de biosynthèse de l'inositol soit le même que dans la levure.

Mécanisme de la biosynthèse du scyllitol. La faculté du Rat de synthétiser le scyllitol à partir du glucose paraît bien établie, d'après le tableau IV. Il découle toutefois de ce qui précède que l'accumulation du scyllitol est très faible chez le Rat soumis à un régime artificiel pauvre en ce cyclitol; le scyllitol est probablement catabolisé au fur et à mesure de la synthèse, de sorte qu'il ne s'accumule pas dans les tissus. Chez le Rat soumis à un régime naturel, le cyclitol radioactif formé se mélange au scyllitol préexistant en quantité considérable et peut alors être décelé.

²⁰⁾ L. MAQUENNE, Ann. Chim. Phys. 12, 129 (1887); «Les sucres et leurs principaux dérivés», Paris 1900, p. 189.

²¹⁾ F. C. CHARALAMPOUS, J. biol. Chemistry 225, 595 (1957).

On peut alors émettre les deux hypothèses suivantes au sujet du mode de biosynthèse du scyllitol:

a) La substance se forme à partir du glucose par un mécanisme indépendant de celui de la biosynthèse de l'inositol.

b) Les biosynthèses des deux cyclitols sont interdépendantes, soit parce qu'elles comportent un intermédiaire commun, soit parce que c'est à partir de l'inositol que le scyllitol prend naissance.

La deuxième hypothèse a pu être confirmée. Comme le montre le tableau VI, le scyllitol isolé après injection d'inositol-[2-¹⁴C] présente une radioactivité spécifique considérable. Le rendement radioactif est de 1 à 1,7%, soit près de 1000 fois plus élevé qu'à partir du glucose radioactif.

Tableau VI. *Radioactivité dans les cyclitols isolés des animaux après injection de ms-inositol-[2-¹⁴C]*

Rad. admin. c/min	Inositol		
	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Rad. totale récupérée en %
733.200	96,1	2515	33,0
733.200	127,4	3007	52,3
625.300	115,4	2170	40,1
511.070	140,0	1753	48,8
494.860	121,6	2076	51,0

Rad. admin. c/min	Scyllitol		
	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. en % de la rad. admin.
733.200	14,2	730	1,41
733.200	4,6	1834	1,15
625.300	17,1	375	1,03
511.070	19,4	430	1,63
494.860	19,4	425	1,67

L'inositol (8,8–10 mg) était administré en même temps que 45 mg de glucose.

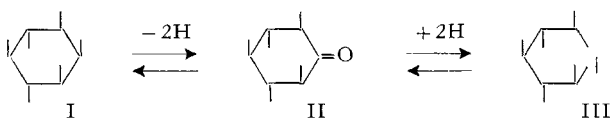
La conversion inverse se produit également; après injection de scyllitol-[¹⁴C], on peut isoler de l'inositol radioactif (tableau VII).

Tableau VII. *Radioactivité dans les cyclitols isolés des animaux après injection de scyllitol-[¹⁴C]*

Inositol			Scyllitol		
Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. en % de la rad. admin.	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Rad. récup. en % de la rad. admin.
131,3	46	1,3	23,1	10 378	52,1
74,3	35	0,6	23,3	12 267	62,4

Le scyllitol (7,8 mg; 457 600 c/min) était administré en même temps que 45 mg de glucose.

Le passage biochimique du *ms*-inositol I au scyllitol III s'effectuerait le plus simplement par l'intermédiaire du scyllo-*ms*-inosose II, par une déshydrogénation suivie d'une hydrogénation.



Des expériences ont alors été effectuées pour vérifier cette hypothèse. Nous avons commencé par constater que, par autoclavage en présence d'acide sulfurique et de tissus de Rat, l'inosose II radioactif n'est pas transformé notablement par voie chimique en inositol, ni en scyllitol. Après injection préalable d'inosose- ^{14}C , l'organisme du Rat a converti par contre, lors de toutes nos expériences, le cyclose en inositol et en scyllitol radioactifs. Comme le montre le tableau VIII, les rendements radioactifs globaux sont toutefois très irréguliers: chez 3 rats ils atteignaient de 50 à 73%, alors que chez 2 autres rats ces rendements globaux n'étaient que de 4 à 6%. Notons que les 3 premiers rats provenaient d'un élevage différent (WANDER S.A.) de celui des 2 autres (SPRICH)²²⁾. Ajoutons que 2 des rats WANDER S.A. avaient été traités préalablement par des antibiotiques; malgré la réduction résultante de la flore intestinale, les rendements radioactifs n'étaient pas diminués, ce qui indique que l'hydrogénation biochimique de l'inosose a bien lieu dans les tissus. Il devient ainsi probable que les interconversions biologiques du *ms*-inositol et du scyllitol s'effectuent par l'intermédiaire du scyllo-*ms*-inosose.

Tableau VIII. Incorporation radioactive dans les cyclitols après injection de scyllo-inosose- $[2-^{14}\text{C}]$

N° des rats et origine	Inositol			Scyllitol		
	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. en % de la rad. admin.	Par rat en mg	Rad. spéc. en c/min/mg	Incorp. en % de la rad. admin.
1. SPRICH	105,4	139,5	2,9	11,3	445	0,9
2. SPRICH	136,3	198,5	4,9	25,0	300	1,3
3. WANDER	105,2	787	16,0	32,7	9063	56,7
4. WANDER	126,0	627	11,2	26,9	10380	39,4
5. WANDER	120,4	688	12,3	31,9	9768	46,1

L'inosose (8,4–8,8 mg; 509000–708000 c/min) était administré en même temps que 45 mg de glucose. Les rats N° 3 et 5 avaient été traités par des antibiotiques.

HELLEU²³⁾ avait constaté chez l'Homme une corrélation entre les surcharges alimentaires en inositol et la fréquence de la scyllitolurie; il avait déjà émis l'hypothèse, sans la confirmer, d'une transformation de l'inositol en scyllitol par l'intermédiaire de l'inosose.

Le scyllo-*ms*-inosose a été préparé, comme on sait, par oxydation du *ms*-inositol au moyen d'*Acetobacter suboxydans*¹²⁾. Jusqu'à présent, ce cyclose n'avait pas été

²²⁾ Lors des autres expériences mentionnées, nous n'avons pas remarqué par contre de différences notables entre rats d'élevages différents.

²³⁾ C. HELLEU, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 462 (1957).

trouvé dans la nature; d'après les observations effectuées au cours du présent travail, il est toutefois probable qu'il joue un rôle dans le métabolisme animal.

Nous remercions vivement le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide qu'il nous a apportée. Nos remerciements vont également à Mlles A. F. LUDER et E. BERGER pour leur collaboration technique.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié chez le Rat la biosynthèse du *ms*-inositol à partir des glucoses [$1\text{-}^{14}\text{C}$], [$2\text{-}^{14}\text{C}$] et [$6\text{-}^{14}\text{C}$], et du glucose uniformément marqué. Dans nos conditions d'expériences, on constate des différences d'incorporation de radioactivité qui sont discutées. L'incorporation est beaucoup plus faible à partir d'acétates- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ et $[2\text{-}^{14}\text{C}]$.

L'organisme du Rat contient, à côté d'inositol, des quantités variables de scyllitol. Ce dernier est en très grande partie d'origine alimentaire, car sa quantité diminue considérablement lorsque les animaux sont soumis à un régime artificiel pauvre en scyllitol. Une biosynthèse du scyllitol s'effectue toutefois chez le Rat, car l'incorporation de radioactivité dans l'inositol à partir du glucose, s'accompagne d'une incorporation, beaucoup plus faible, il est vrai, dans le scyllitol. A partir d'inositol- $[2\text{-}^{14}\text{C}]$, il se produit une incorporation dans le scyllitol près de 1000 fois plus forte qu'à partir de glucose- $[^{14}\text{C}]$; de même, à partir du scyllitol- $[^{14}\text{C}]$, il se forme du *ms*-inositol radioactif. Aux dépens du scyllo-*ms*-inosose- $[^{14}\text{C}]$, il se forme, avec des rendements relativement élevés, de l'inositol et du scyllitol radioactifs: il est ainsi probable que l'inosose est un intermédiaire de l'interconversion des deux cyclitols chez le Rat.

Genève, Laboratoire de Chimie biologique
et organique spéciale de l'Université
Berne, Institut de Botanique de l'Université

302. Ringschlussreaktionen des Butadiendioxids mit Hydrazinen zu neuen Derivaten des Pyrazolidins und Piperidazins

von H. R. Meyer und R. Gabler

(25. IX. 63)

Im Rahmen von Untersuchungen über polymere Butadiendioxid-Addukte wurde auch die Reaktion von Butadiendioxid mit Hydrazinen studiert. Auf Grund der Strukturformel der Hydrazine kann rein formell sowohl eine Polyaddition wie auch die Bildung 5- oder 6 gliedriger cyclischer Addukte erwartet werden. Beim Anilin und bei einigen seiner Derivate ist die Ringbildung mit Butadiendioxid zu 1-Arylpyrrolidin-3,4-diolen bereits beobachtet worden¹⁾.

Beim Hydrazin zeigte sich nun eine deutliche Neigung zur Ringbildung, die besonders bei den untersuchten symmetrisch disubstituierten Hydrazinen eindeutig gegenüber der Polyaddition bevorzugt wird. Ausgehend von DL- bzw. *meso*-Butadiendioxid und symmetrisch disubstituierten Hydrazinen, wie N,N'-Dimethyl-

¹⁾ A. WEICKMANN, DBP 805 522 (1949); H. HOPFF & H. SPÄNIG, DBP 896 047 (1951). Vgl. J. J. ROBERTS, W. C. J. ROSS, J. chem. Soc. 1952, 4288; A. J. HILL, M. G. McKEON, J. Amer. chem. Soc. 76, 3548 (1954).