

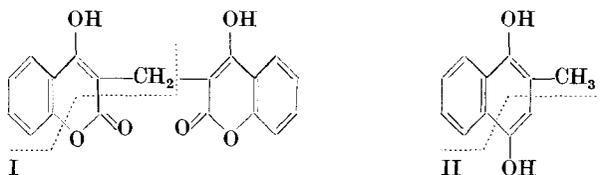
159. Sur quelques dérivés monocoumariniques à action antivitaminique K (hémorragiques)

par Paul Meunier, Charles Mentzer et Mlle Andrée Vinet.

(25 V 46)

A l'occasion d'une étude sur le poison hémorragique du mélilot gâté que venaient d'identifier les auteurs américains *Stahman*, *Hübner* et *Link*¹⁾, le «dicoumarol», il nous est apparu, en 1942²⁾, que ce composé devait être considéré comme une *antivitamine* d'un type nouveau, comme une antivitamin K. Et cela pour les raisons suivantes:

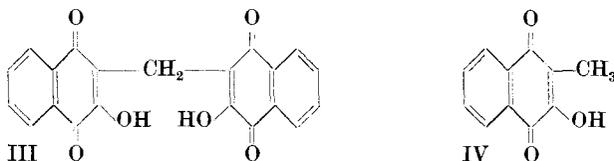
1^o Le noyau hydroxycoumarinique, deux fois répété dans la molécule du «dicoumarol» (I), présente une parenté structurale évidente avec la méthyl-naphtoquinone (II), squelette fondamental des vitamines K:



2^o L'action du «dicoumarol» est très spécifique et exactement opposée à celle d'une vitamine K: il détermine par seule ingestion un abaissement de la prothrombine plasmatique.

3^o Cette action peut être, partiellement au moins, inhibée par des doses suffisantes de vitamine K. Cet antagonisme a, par la suite, été fréquemment nié ou réaffirmé, selon les conditions de posologie adoptées dans les essais. Il est maintenant bien reconnu (voir à ce sujet la revue récente de *Quick*³⁾).

Dès 1943, nous avons pu, avec *Buu-Hoï* et *Cagniant*⁴⁾, préparer une antivitamin K *artificielle*, à squelette naphthoquinonique, la méthylène-bis-oxynaphtoquinone (III), dérivant du phticol (IV):



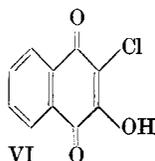
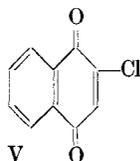
¹⁾ *Stahman*, *Hübner* et *Link*, J. Biol. Chem. **138**, 513 (1941).

²⁾ *P. Meunier* et *Ch. Mentzer*, Bull. Soc. Chim. biol. **24**, 371 (1942).

³⁾ *A. J. Quick*, Physiol. Rev. **24**, 297—318 (1944).

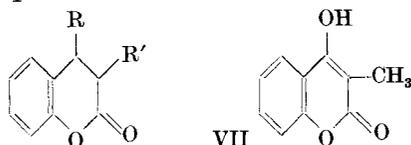
⁴⁾ *P. Meunier*, *Ch. Mentzer*, *Buu-Hoï* et *P. Cagniant*, Bull. Soc. Chim. biol. **25**, 384, (1943).

Plus tard, nous inspirant des résultats obtenus par *Kuhn* et collaborateurs¹⁾ sur la lactoflavine, nous avons apporté de nouveaux exemples d'antivitamines K naphthoquinoniques, la chloro-2-naphthoquinone et la chloro-2-oxy-naphthoquinone, V et VI, d'activité hémorragique, il est vrai, très faible¹⁾.



Indépendamment de nos recherches, divers auteurs ont exploré des séries chimiques plus ou moins voisines de celle de la coumarine, en quête de la même propriété hypoprothrombinémiante. Citons en particulier *Jansen* et *Jensen*²⁾ qui étudièrent sans succès divers composés monocycliques lactoniques sous la forme symétrique bis-méthylénique, *N. von Kaulla*³⁾ qui essaya des coumarines diversement substituées mais non hydroxylées en 4, *J. Lehmann*⁴⁾ qui rechercha les groupes actifs du «dicoumarol» et enfin l'équipe américaine de *Link*⁵⁾ qui prépara et essaya plus de cent corps.

Dans ces mémoires se trouvent mentionnés un certain nombre des 70 dérivés de la série coumarinique que nous avons nous-mêmes déjà préparés et essayés. Dans l'ensemble, sauf pour les corps VII et VIII (voir plus bas), il y a concordance entre leurs résultats et les nôtres. Nous ne citerons ici que des composés nouveaux (sauf les corps VII et VIII), qui nous permettront de montrer que des substitutions relativement simples R et R' sur la molécule primitive de coumarine elle-même inactive⁴⁾⁵⁾ confèrent déjà à cette dernière une notable activité hémorragique.



Au début de nos recherches, nous avons fait une curieuse constatation relativement à l'un des plus simples de ces dérivés, la méthyle-3-oxy-4-coumarine (VII).

Ce corps, qui s'était montré inactif comme agent hémorragique, même à la dose de 30 mg chez le lapin de 2 kg (cf. ²⁾ et ³⁾) s'était révélé au contraire capable dès la dose de 7—10 mg d'atténuer les

¹⁾ *R. Kuhn* et coll., B. **76**, 1044 (1943).

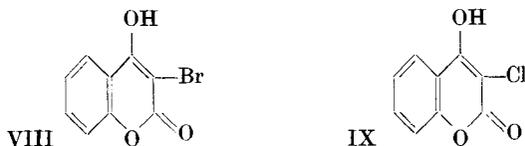
²⁾ *Jansen* et *Jensen*, Z. physiol. Ch. **277**, 66—73 (1942).

³⁾ *N. von Kaulla*, Klin. Wschr. **22**, 205 (1943).

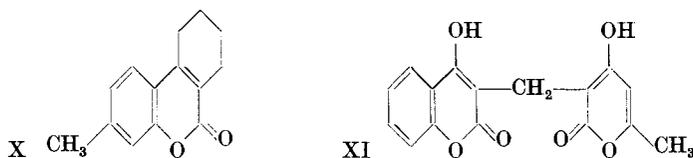
⁴⁾ *J. Lehmann*, Acta Physiol. Scand. **6**, fasc. 1 (1943).

⁵⁾ *Overman, Stahman, Hübner, Sullivan, Spero, Doherty, Ikawa, Graf, Roseman* et *Link*, J. Biol. Chem. **153**, 5—24 (1944).

effets hémorragiques de 1 mg de dicoumarol¹). Il se comportait donc à la façon d'une vitamine K. Nous avons considéré ce dérivé comme tel, sans avoir pu vérifier encore qu'il possédait une action vitaminique réelle vis-à-vis du poulet carencé. Et nous lui avons fait subir la même altération chimique qui, dans la série naphthoquinonique, nous avait conduit à un renversement de l'action physiologique, c'est-à-dire le remplacement du méthyle par un halogène²).



Nous avons ainsi constaté que cette transformation, qui, selon *Grimm* (voir *Létré*³), conserve l'isomorphisme, faisait bien apparaître la propriété hypoprothrombinémiante. Dès la dose de 15 mg/kg chez le lapin pour le dérivé bromé VIII et de 10 mg/kg pour le corps chloré, que nous croyons malheureusement incomplètement séparé de son précurseur inactif, la prothrombine s'abaisse à 50 % environ 1 ou 2 jours après l'ingestion (voir tableau des expériences). Le corps VIII a été trouvé inactif par les auteurs américains⁴), peut-être faute d'une méthode assez sensible (cf. ⁵). Nous avons ensuite, engageant les carbones 3 et 4 de VII dans un cycle hexénique, obtenu le dérivé X, surchargé d'un CH₃ supplémentaire en 7, mais presque aussi actif que les précédents comme antivitamine K.



Mentionnons enfin la molécule dissymétrique XI où le méthyle de VII est remplacé par un reste plus important, la méthylènehydroxy-4-méthyle-6- α -pyrone.

Un tel corps est à peine plus actif que le précédent comme hémorragique. Pas plus donc que les auteurs précédents nous n'avons pu approcher de l'activité considérable du composé naturel, le dicoumarol qui, à la dose de 1 mg/kg chez le lapin, abaisse la prothrombine à 10 % de sa valeur normale. La symétrie de la molécule joue un rôle privilégié dans cette action comme nous l'avons déjà constaté dans la série naphthoquinonique, le corps III s'étant montré beaucoup plus

¹) P. Meunier et Ch. Mentzer, Bull. Soc. Chim. biol. **24**, 371 (1942).

²) P. Meunier, Ch. Mentzer et Buu-Hoi, Bull. Soc. Chim. biol. **27**, 191—194 (1945).

³) Létré, Ergebn. Enzymf. **9**, 1—13 (1943).

⁴) Overman, Stahman, Hübner, Sullivan, Spero, Doherty, Ikawa, Graf, Roseman et Link, J. Biol. Chem. **153**, 5—24 (1944).

⁵) A. J. Quick, J. Biol. Chem. **161**, 33—44 (1945).

actif que la chloro-oxy-naphtoquinone VI¹). Mais il est non moins incontestable que le noyau hydroxy-coumarinique, sensiblement de même dimension que celui de la naphtoquinone, représente déjà lui-même un édifice atomique plus favorable à l'activité hémorragique.

Rappelons que nous avons déjà éprouvé à cet égard d'autres cycles «analogues», l'un hydroxythiocoumarinique et l'autre oxy-quinoléique que nous avons trouvés, sous la forme symétrique bis-méthylénique, également moins actifs (surtout le second) que le *dicoumarol*²).

Détails expérimentaux.

1° Préparation des dérivés coumariniques.

Le corps VIII, bromo-3-hydroxy-4-coumarine, a été obtenu par action d'une molécule de brome en solution acétique sur une molécule d'acide benzotétronique (hydroxy-4-coumarine). La réaction s'effectue à froid en quelques heures lorsque l'on expose le mélange à la lumière solaire. L'acide acétique est ensuite évaporé aux $\frac{4}{5}$ sous vide et le résidu versé sur de la glace. On essore et recristallise dans l'alcool, puis dans l'eau chaude.

Point de fusion 183°. C₉H₅O₃Br Br trouvé 32,58 Br calculé 33,15%.

Absorption ultra-violette: Max. à 313 μ ; E (1%) = 550; ϵ = 13250.

L'hydrolyse alcaline fournit de l'acide salicylique, l'halogène était donc bien fixé sur le noyau pyronique et non sur le cycle aromatique. L'analyse thermique, selon la technique de *Rheinboldt et Kircheisen*³) confirme l'isomorphisme avec la méthyl-3-hydroxy-4-coumarine (VII).

Nous avons essayé de préparer le corps IX en remplaçant dans l'opération précédente le brome par le chlore en quantité équimoléculaire. Mais le produit obtenu n'a pas une constitution encore clairement établie, comme le montre la teneur en chlore.

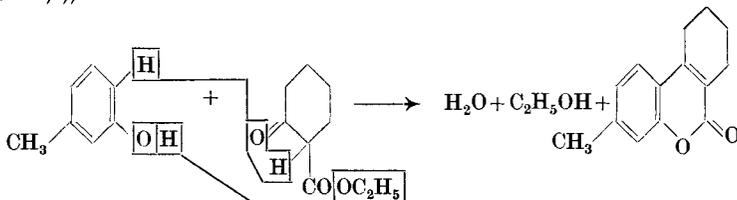
Point de fusion 175°. C₉H₅O₃Cl Cl trouvé 9,15 Cl calculé 18,1%.

Absorption ultra-violette: Spectre à 2 max. 305 et 278 μ .

Poids moléculaire trouvé 187 (micro-Rast), calculé 196. L'hydrolyse alcaline fournit également de l'acide salicylique.

Nous pensons qu'il s'agit là d'un mélange équimoléculaire du corps IX et d'acide benzotétronique non attaqué, de solubilités très voisines, que nous n'avons pas pu encore séparer par cristallisations fractionnées. Des essais avec un excès de chlore déterminent la rupture du noyau pyronique avec formation de corps polychlorés qui feront l'objet d'une communication spéciale.

Le corps X, cycléno-3,4-méthyl-7-coumarine, est obtenu par condensation d'une molécule de méta-crésol avec une molécule de cyclohexanone-carbonate d'éthyle en présence d'un excès d'acide sulfurique, conformément à la réaction de *Pechmann* (cf. préparations antérieures⁴⁾⁵).



¹) *R. Kuhn* et coll., B. **76**, 1044 (1943).

²) *Ch. Mentzer* et *P. Meunier*, Bull. Soc. Chim. biol. **25**, 379 (1943).

³) *Rheinboldt* et *Kircheisen*, J. pr. [2] **113**, 348 (1926).

⁴) *Dieckmann*, A. **317**, 27 (1901).

⁵) *Sen* et *Basu*, J. Indian Chem. Soc. **5**, 467—476 (1927) et C. **1928**, II, 2242.

Point de fusion 117°. Absorption ultra-violette: max. à 275 m μ (E 1% = 665) et à 315 m μ (E 1% = 425).

Le corps XI, dissymétrique, résulte de la condensation d'une molécule d'acide benzotétronique et d'hydroxy-4-méthyl-6- α -pyrone sous l'action de l'aldéhyde formique. Le précipité qui se forme immédiatement dans l'eau bouillante est un mélange de XI avec les deux composés symétriques à pont méthylène, formés avec les deux corps primitifs, le dicoumarol lui-même (I) et le méthylène-bis-oxy-4,4'-méthyl-6,6'- α -pyrone, déjà préparé et trouvé inactif par *Jansen et Jensen*¹). Ces deux derniers corps sont beaucoup moins solubles dans l'eau et l'alcool que XI lui-même, que l'on recristallise aisément dans ce dernier.

Point de fusion (après plusieurs recristallisations) 194°.

Absorption ultra-violette avec max. large et arrondi autour de 280 m μ (E 1% = 650).

2° Conduite des essais physiologiques.

Dans tous nos essais, nous avons utilisé des lapins jeunes de 1,5 kg à 2,5 kg, nourris principalement d'avoine et de son, sans verdure. Les produits expérimentés sont administrés avant le repas du soir, *per os*, en solution dans 1 à 2 cm³ d'huile de germe de maïs décolorée. Le sang est prélevé par ponction cardiaque le matin, à raison de 2,5 cm³ par jour et immédiatement mélangé à 0,25 cm³ de solution de citrate de sodium à 4%. Après centrifugation de 5 minutes, la teneur en prothrombine du plasma citraté est déterminée à la fois par la méthode primitive de *A. J. Quick*^{2,3}) et par la méthode photométrique⁴).

La première, effectuée sur 0,1 cm³ de plasma citraté, sans dilution préalable, à l'aide de thromboplastine de cervelle de lapin, a l'avantage de fournir des résultats plus nets. Grâce au taux relativement élevé de fibrine en jeu, l'instant d'apparition du « caillot solide » est aisé à saisir (cf. ³). Chaque jour d'expériences, un ou deux lapins non traités fournissent le plasma normal, servant à étalonner la préparation de thromboplastine. En comparant le temps de *Quick* « normal », qui varie de 7 à 10 secondes, avec celui des lapins traités, nous calculons la teneur en prothrombine du plasma de ces derniers, en utilisant la représentation logarithmique de *Legler*⁵). Cela revient à utiliser des courbes $t = kc^a$ où t est le « temps de *Quick* », c la concentration en prothrombine, k et a deux constantes. (Dans nos essais, nous trouvons $a = 0,4$.) Cette représentation montre bien que la méthode de *Quick* est peu sensible entre 100 et 50% du taux de prothrombine normal, différence qui se traduit par un allongement de t de 2 à 3 secondes seulement.

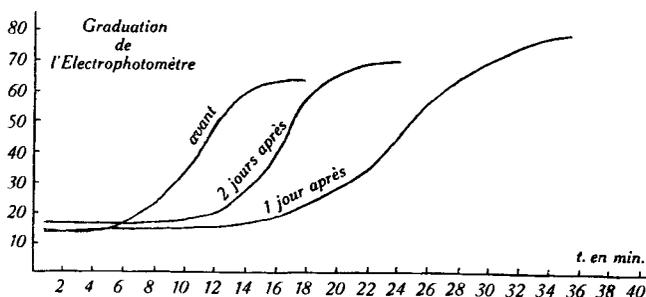


Fig. 1.

Lapin n° 197 (2 kg).

Dérivé chloré de la 4-hydroxy-coumarine (20 mg).

¹) *Jansen et Jensen*, Z. physiol. Ch. **277**, 66—73 (1942).

²) *A. J. Quick*, Am. J. Physiol. **118**, 260 (1937).

³) *A. J. Quick*, J. Biol. Chem. **161**, 33—44 (1945).

⁴) *P. Meunier*, C. r. **211**, 668 (1940).

⁵) *Legler*, Helv. **26**, 1512 (1943).

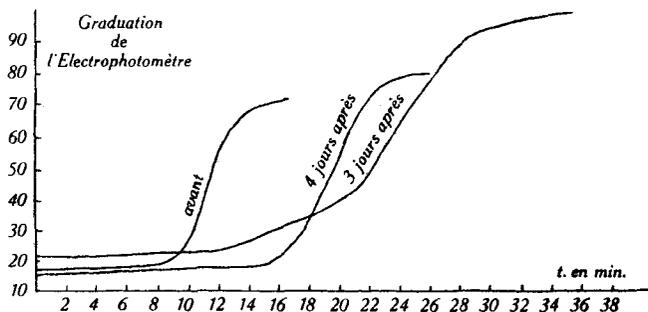
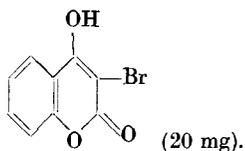


Fig. 2.



Lapin n° 197 (2 kg).

3° Tableau des expériences.

Lapins N°	Poids kg	Doses ingérées en mg	Taux de prothrombine plasmatique après					
			avant	18 h.	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours
197	2	1 mg de corps I (pour comparaison)	100%	45%		70%		100%
197	2	30 mg de VII	100%	100%	100%	pas d'action		
100	2	10 mg de VIII (bromé)	100%	90%	100%			
197	2	20 mg de VIII (bromé)	100%	80%	80%	70%	(fig. 1)	
189	1,3	30 mg de VIII (bromé)	100%	80%	50%	70%		
197	2	120 mg de VIII (bromé)		50%	80%			
94	2,3	10 mg du dérivé chloré	100%	80%	70%	50%		
108	2,1	10 mg du dérivé chloré	100%	50%	80%	100%		
109	2,2	10 mg du dérivé chloré	100%	90%	85%	80%	95%	
197	2	20 mg du dérivé chloré	100%	50%	80%	(fig. 2)		
151	1,5	10 mg de X	100%	95%	50%	50%	100%	
205	1,75	15 mg de X	100%	80%	50%	50%		
147	1,75	10 mg de XI	100%	action très faible				
150	1,15	10 mg de XI	100%	?	50%	80%		
205	1,75	15 mg de XI	100%	50%	40%	100%		
207	1,75	15 mg de XI	100%	80%	80%	80%		

Lorsque un même lapin est repris pour un autre essai, ce n'est qu'après une semaine de repos au moins.

Dans ce cas, la méthode photométrique manifeste un avantage indéniable. En effet, l'opacification du plasma du lapin normal citraté, puis recalcié à l'instant origine commence entre la 6^e et la 8^e minute et cesse de croître entre la 14^e et la 20^e minute, si les mesures sont effectuées, comme nous l'avons déjà préconisé, à $20^{\circ} \pm 2^{\circ}$ et sur du plasma dilué finalement à 1/5¹). Pratiquement, les mesures sont prises de 30 en 30 secondes à l'électrophotomètre de l'un de nous (P.M.) en lumière orangée, dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, plongée elle-même dans une grande cuve à courant d'eau assurant la constance de la température. Dans les mêmes conditions, l'opacification s'échelonne entre 20 et 40 min. environ, pour une teneur en prothrombine de 50 à 60% de la normale. Voir les courbes représentatives (figures 1 et 2).

Laboratoires de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris et de Recherches des *Etablissements Roussel* à Paris.

160. Recherches sur la phytase

par Paul Fleury et Jean Courtois.

(12 VI 46)

C'est en utilisant la phytine comme substrat que *Suzuki-Yoshimura* et *Takaishi*²⁾ décelèrent pour la première fois une activité phosphatasique. Il est à ce propos curieux de constater que la phytine est sans doute l'ester phosphorique naturel le plus difficilement hydrolysable par les phosphatases.

L'enzyme qui dédouble les inositolhexaphosphates a été dénommé phytase; c'est la moins répandue et la plus mal connue des diverses phosphatases plus ou moins spécifiques.

Dans l'ouvrage général d'enzymologie: *Die Methoden der Fermentforschung*, l'article consacré à la phytase est l'un des chapitres les plus courts de cet ouvrage; il fut confié au chimiste suisse *T. Posternak*³⁾ qui concluait ainsi «Das heutige Wissen über die Phytase ist ziemlich beschränkt und kann nicht mit dem verglichen werden, was man über andere Fermente gesammelt hat» et «Eine eingehende Untersuchung dieser Frage wäre sehr zu wünschen».

Les recherches sur la phytase sont en effet assez disparates; le plus souvent cet enzyme a été étudié incidemment au cours de recherches générales sur les phosphatases. Quelques faits caractéristiques se dégagent cependant de ces divers résultats: en premier lieu il n'existe pas de parallélisme entre les activités glycérophosphatasique et pyrophosphatasique d'une part et l'activité phytasique d'autre part. C'est ce que l'on observe en particulier avec de nom-

¹) cf. ⁴) p. 1295.

²) *V. Suzuki, K. Yoshimura, et M. Takaishi*, Tokio Imp. Univ. Coll. Agric. Bull. 7, 503 (1907).

³) *T. Posternak*, Phytase, p. 1681—1684, in «*Die Methoden der Fermentforschung*», Leipzig 1941.