

MANIÈRE DE SE COMPORTER DE L'ARSENIC, DE L'ANTIMOINE ET DU BISMUTH SOUS FORME D'ÉLÉMENTS DANS LES MILIEUX PROTÉIQUES (\*).

**P. MASCHERPA et L. CALLEGARI**

(Institut de Pharmacologie et Thérapie de la R. Université de Genova dirigé par le Prof. A. BENEDECENTI)

RÉSUMÉ DES AA.

*Introduction.* — Quoique de nombreuses théories, plus ou moins fondées sur des expériences, cherchent à expliquer le mécanisme d'action de l'arsenic, il faut toutefois reconnaître que les recherches qui tendent à éclaircir les liens qui s'établissent entre ce métalloïde et la matière vivante sont encore insuffisants. On peut dire la même chose pour l'antimoine.

Quant au bismuth on sait que les études de l'école de LEVADITI cherchent à expliquer l'action des composés insolubles de bismuth en admettant qu'il se reforme des combinaisons protéo-bismuthiques assez complexes et que, sous cette forme, le bismuth circule dans l'organisme et exerce son action.

Ces considérations, et la manière de se comporter de l'As, qui s'arrête longtemps dans les organes dans lesquels l'analyse chimique le met en évidence, parfois en des quantités considérables, nous ont induits à porter une contribution à la connaissance des combinaisons que les trois métalloïdes susdits peuvent éventuellement former avec la molécule protéique.

Pour prouver l'existence de ces liens et pour les reproduire expérimentalement nous avons fait des expériences "*in vitro*.. Nous avons mis des solutions protéiques différentes en contact avec l'As, le Sb et le Bi, non sous forme de sels ou d'anhydrides ou d'oxydes, mais en forme élémentaire. En procédant ainsi nous avons cru nous mettre dans les conditions les plus simples pour les expériences, conditions qui, d'ailleurs, sont celles qui ont été choisies, pour leurs recherches,

---

(\*) *Archivio di Scienze Biologiche*, XVIII, 438-451. — Pour la Bibliographie voir la note complète.

par de nombreux AA. qui se sont occupés de la nature et de la formation des métalloprotéines.

À ces recherches "*in vitro*," nous avons fait suivre des expériences "*in vivo*," pour voir la toxicité de l'As, administré par différentes voies en forme d'élément. Pour ce qui regarde ce dernier point, plusieurs AA. avaient déjà constaté en précédence que l'As amorphe ou cristallin est puissamment toxique par voie hypodermique, tandis qu'il ne l'est presque pas si on l'introduit "*per os*,".

Pour le Sb et pour le Bi on reconnaît aussi l'absorption et l'efficacité thérapeutique des composés insolubles et à l'état colloïdal. Il nous semble que nos recherches apportent une contribution à la meilleure connaissance de ces phénomènes.

*Technique expérimentale et méthodes d'analyse.* - Dans nos expér. nous nous sommes servis de As, Sb, Bi, sous la forme de poudres très fines, obtenues en précipitant les métalloïdes susdits de leur oxydes. Et précisément l'As a été précipité d'une sol. de  $As_2O_3$  en HCl, moyennant  $SnCl_2$ . L'As soigneusement lavé, séché d'abord à l'air, puis à la  $t^0$  de  $250^0$  en un courant d'hydrogène, a été conservé dans un tube fermé à la lampe et rempli d'azote. D'opportunes recherches ont démontré l'absence, même de traces, de composés oxygénés d'As dans la poudre noire, amorphe, impalpable.

Le Sb a été précipité dans une sol. chlorhydrique de  $Sb_2O_3$ ; il était sous forme de poudre très fine qui, soigneusement lavée et séchée dans un courant d'hydrogène, était conservée à l'abri de tout contact avec l'air.

Pour le Bi, on est parti du  $Bi_2O_3$ , dissout en HCl dilué; puis on a procédé comme pour l'antimoine.

La recherche chimique quantitative des métalloïdes dans les sol. protéiques a été faite en détruisant la substance organique par  $HNO_3$  concentré à chaud avec adjonction de  $KClO_3$  en substance; après avoir éliminé l'excès de Cl, on réduit à petit volume, on reprend avec HCl dilué et l'on filtre. On traite longuement le filtrat avec  $H_2S$ , qui précipite l'As, le Sb et le Bi sous forme de sulfures. On dissout le sulfure d'As dans l'eau oxygénée ammoniacale; on précipite l'arséniate ammonico-magnésique et, après l'avoir chauffé au rouge, on dose l'As, sous forme de pyroarséniate.

Dans un courant de  $CO_2$ , à la  $t^0$  de  $150^0$ , on sèche le sulfure de Sb, après l'avoir lavé successivement à l'eau, à l'alcool absolu, à l'éther et au sulfure de C et puis on le pèse. Les analyses de contrôle nous



ont démontré que ce dosage est préférable à celui qu'on fait sous forme de tétra-oxyde ( $\text{Sb}_2\text{O}_4$ ).

Le sulfure de Bi était toujours en de si faibles doses dans nos solutions qu'on ne pouvait le doser par pesée.

Nous nous réservons d'appliquer, dans nos prochaines expér. pour la recherche de ce métalloïde, les méthodes plus précises de microdosage que beaucoup d'AA. ont proposées tout récemment.

*Expériences avec ovalbumine. - Arsenic.* - On fait une sol. filtrée d'ovalbumine dans l'eau distillée, bouillie et saturée de hydrogène pendant qu'elle se refroidit. Cette sol. contient 4 % de résidu sec. En un gros tube on ajoute à 25 cc de sol. d'ovalbumine gr 0,50 d'As métallique, préparé en suivant la méthode que nous venons de décrire. On remplit d'N l'espace au-dessus du liquide et l'on bouche avec un bouchon de gomme paraffinée. Le contact de l'As avec la sol. protéique dure 24 hh. et il est facilité en agitant fréquemment. La  $t^0$  de la chambre est de  $30^0$ . On filtre, on centrifuge longuement et on s'assure au microscope qu'aucune parcelle d'As ne reste encore en suspension dans la sol. d'ovalbumine. On procède ensuite à la recherche de l'As.

On trouve :

$$\begin{array}{l} \text{Mg}_2\text{As}_2\text{O}_7 \text{ \% gr } 0,105 \\ \text{As \% gr } 0,0514118. \end{array}$$

*Antimoine.* - On emploie la même sol. protéique qui a servi pour l'expér. précédente. A 25 cc de sol. on ajoute gr 0,50 de Sb métallique. Durée du traitement et autres conditions expérimentales égales à celles qu'on avait pour l'As.

Résultats:

$$\begin{array}{l} \text{Sb}_2\text{S}_3 \text{ \% gr } 0,016 \\ \text{Sb \% gr } 0,01248. \end{array}$$

*Bismuth.* - On procède comme dans les expériences faites avec l'As et l'Sb.

La recherche analytique du Bi a révélé dans la sol. protéique une quantité insignifiante de ce métal, quantité qu'on ne pouvait pas doser avec les méthodes d'analyse chimique habituelles.

*Expériences avec du sérum de sang. - Arsenic.* - On emploie le sérum de sang de bœuf.

À 30 cc de sérum non dilué on ajoute gr 0,50 d'As métallique. On prend toutes les précautions qu'on a adoptées dans les expér. précédentes de manière à empêcher l'action de l'air sur le métalloïde qui se transforme facilement, en partie, en  $As_2O_3$ , lorsqu'il se trouve, à l'état d'élément, dans un milieu humide.

Après 24 hh de contact du sérum avec la poudre d'As on remarque dans le sérum, après filtrage et centrifugation, une coloration jaune-orangé très intense.

L'analyse quantitative donne les résultats suivants :

$$\begin{aligned} Mg_2As_2O_7 & \% \text{ gr } 0,080 \\ As & \% \text{ gr } 0,038616. \end{aligned}$$

*Antimoine.* - On procède comme pour l'As. Après filtration et centrifugation, on remarque que le sérum a pris une coloration jaune-verdâtre. L'analyse quantitative donne les résultats suivants :

$$\begin{aligned} Sb_2S_3 & \% \text{ gr } 0,0195 \\ Sb & \% \text{ gr } 0,014005 \end{aligned}$$

*Bismuth.* - La sol. protéique, traitée avec le Bi, ne présente, après filtration et centrifugation, aucune coloration spéciale. Toutes les expériences capables de mettre en évidence et de doser le Bi, en le précipitant à l'état de sulfure, ne révèlent que des traces de ce métal dans le sérum.

*Expériences avec de la gélatine.* - On emploie la gélatine marque or, très pure, qu'on lave et qu'on dissout à chaud à 1 % dans l'eau distillée, bouillie et saturée de hydrogène, pendant le refroidissement. On filtre et on dialyse pendant 24 hh.. A 10 cc de gélatine on ajoute gr 0,50 de As, Sb Bi à l'état d'élément. On prend les mêmes précautions qu'on a prises pour les expériences précédentes.

Le traitement dure 24 hh.. La  $t^0$  de la chambre est de  $35^0$ . La recherche quantitative de l'As, Sb, Bi a été faite après une filtration et une centrifugation très prolongées.

On eut les résultats suivants :

$$\begin{aligned} As & \% \text{ gr } 0,077 \\ Sb & \% \text{ gr } 0,0218 \\ Bi & \text{ — traces.} \end{aligned}$$



De nos expériences ressortent deux faits qui nous semblent intéressants, c'est-à-dire que As, Sb et Bi, absolument exemptes de produits d'oxydation, lorsque en forme d'éléments ils sont mis en contact avec des protéines différentes et pendant 24 hh., peuvent être retrouvés dans les sol. protéiques en quantité dosable pour ce qui regarde l'As et le Sb; pour le Bi seulement en traces.

En outre l'As se trouve dans les protéines en plus grandes quantités que le Sb.

Parvenus à ces résultats nous avons fait quelques expér. pour voir sous quelle forme l'As, le Sb et le Bi se trouvent dans les sol. protéiques qui ont été traitées avec eux.

Nous avons concentré notre attention sur l'As et nous nous sommes posé ce problème: si la protéine agit sur l'As en l'oxydant (transformation en ac. arsénieux), et si, sous cette forme, on retrouve le métalloïde dans la solution protéique.

Dans le cours de nos expér. nous avons constaté plusieurs fois que les protéines, contenant de l'As, changent quelques-unes de leurs propriétés: elles changent souvent de couleur (comme on l'a déjà fait remarquer), se coagulent à la chaleur beaucoup plus facilement que les protéines normales, et, en outre, leur pH diminue de beaucoup.

Ce dernier fait, p.ex., est démontré par l'expér. suivante, pour laquelle nous avons procédé comme pour toutes les autres qui ont été faites avec de l'ovalbumine et dans laquelle on a évalué par voie électrométrique le pH avant et après le traitement.

On a obtenu les résultats suivants :

pH de l'ovalbumine normale	8,50
„ après traitement pendant 24 hh.	
avec As	6,22

Cette diminution remarquable du pH, pouvant exclure qu'elle provienne de l'anhydride arsénieux qui se trouve dans la poudre d'As, fait penser, par hypothèse, que la protéine, pour ses propriétés oxydantes, agisse sur l'As élémentaire en le transformant, partiellement, en  $As_2O_3$  et, ensuite, en ac. arsénieux. Dans ce cas cet acide pourrait se trouver à l'état libre dans la solution protéique.

Nous avons fait alors l'expér. suivante: 20 cc de sol. aqueuse d'ovalbumine sont traités, en suivant les modalités habituelles, avec gr 0,50

d'As pendant 26 hh. à la t° de 25. On filtre, on centrifuge, on dialyse à travers parchemin naturel pendant 16 hh. On fait agir un courant de H<sub>2</sub>S sur le liquide dialysé, rendu alcalin par NaOH, concentré à petit volume et acidifié par HCl. On ne remarque aucun précipité caractéristique de sulfure d'As.

Toute présence d'acide arsénieux libre dans la sol. protéique étant exclue, il ne nous reste qu'à admettre que, s'il se forme réellement de l'ac. arsénieux, il entre facilement et immédiatement en combinaison avec la molécule protéique par des liens particuliers.

Qu'il en soit ainsi le démontre l'expér. suivante, par laquelle nous avons pu démontrer que, dans une sol. protéique traitée par As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, on trouve une quantité d'As bien supérieure à celle qui se dissout normalement dans l'eau. En effet, si nous traitons, pendant 24 hh. et à 37°, avec g 0,50 d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, nous obtenons, après centrifugation et filtration, les résultats suivants:

Mg <sub>2</sub> As <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	% g	0,0834
As	% g	0,57
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	% g	3,5

Etant connu que l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se dissout dans l'eau, selon son coefficient de solubilité, dans la proportion de 1,6 %, il est logique d'admettre non seulement que la protéine est nécessaire pour l'oxydation probable de l'As métallique à ac. arsénieux, mais aussi que ce dernier réagit avec la molécule protéique, et forme des composés particuliers.

Toutefois il n'est pas nécessaire d'admettre, pour la formation de ces composés, le passage à travers le stade d'ac. arsénieux (ce qui d'ailleurs n'est pas prouvé par nos expériences), puisque ces composés peuvent également se former par fixation directe de l'As à la protéine, comme il se vérifie pour les métaux (Co, Fe, Cu), étudiés dans les nombreuses recherches faites dans cet Institut. Cette fixation directe donne origine à des composés à type salino-protéique semblables à ceux qu'on obtient (BONINO et GRANDI) avec Co et protéines ayant un pH de 3 à 7.

*Expériences "in vivo",* — Dans ces expér. nous nous sommes efforcés de reproduire, dans l'animal, les mêmes conditions expérimentales dans lesquelles nous avons opéré "*in vitro*", pour voir par des



recherches toxicologiques si As, Sb, Bi en forme d'éléments, introduits par voie hypodermique, c'est-à-dire à contact direct avec les protéines des tissus, devenaient pour cela solubles et toxiques comme il arrive " *in vitro* „.

Nous nous sommes servis de cobayes, auxquels nous avons inoculé par voie hypodermique chacun de ces trois éléments en suspension aqueuse. Les résultats de plusieurs de ces expériences sont très probatoires, comme il résulte des données suivantes que nous rapportons ici comme un exemple.

	As	Sb	Bi
Poids de l'animal	430	460	440
Poudre introduite g	0,30	0,30	0,30
Mort de l'animal après hh.	24	50	—

Il résulte une parfaite analogie entre les résultats obtenus dans les expér. " *in vivo* „ et ceux qu'on a obtenus en expérimentant " *in vitro* „.

Même en opérant sur les grenouilles on a, en général, des faits analogues à ceux qu'on a remarqués sur les cobayes; nous avons pourtant remarqué que, parfois, dans la grenouille, l'As est moins toxique que le Sb.

Nos recherches ultérieures sur la toxicité ont été faites en nous servant uniquement de l'As. Par ces expér. nous avons voulu constater ce que les AA. avaient déjà remarqué, c'est-à-dire que l'As élémentaire introduit " *per os* „ n'est pas toxique, ne trouvant pas dans l'estomac des conditions favorables à son oxydation.

Dans des cobayes de 400 g environ, on introduisit, avec la sonde, g 0,50 d'As métallique parfaitement exempte de  $As_2O_3$ . Tous les animaux survécurent longtemps et ne présentèrent aucun phénomène morbeux. Les expér. " *in vivo* „ confirment donc les expér. " *in vitro* „.

Il résulte que l'As, introduit sous la peau, est vénéneux, puisqu'il trouve dans les tissus les protéines capables de l'accueillir en combi-

raison avec leur molécule, tandis que, si on l'administre "*per os.*", faute de protéines, l'As métallique ne se modifie pas et il est expulsé tel quel. Les petites quantités d'As qui entrent en circulation ne peuvent pas causer de phénomènes toxiques.

Les différences que les AA. précédents ont remarquées sur le différent pouvoir toxique de l'As, selon qu'il est introduit "*per os.*", ou par voie hypodermique, sont partiellement expliquées par les résultats de nos expériences, desquels nous pouvons tirer les conclusions suivantes.

I. - L'As, le Sb et le Bi en forme d'éléments et absolument exemptes de tout produit d'oxydation, mis en contact avec des protéines diverses (ovalbumine, sérumalbumine et gélatine) hors du contact de l'air, se retrouvent dans les solutions protéiques en quantités différentes qu'on peut indiquer avec l'échelle suivante:



II. - Pour ce qui concerne l'As, on remarque que le pH des protéines, traitées avec ce métalloïde, diminue considérablement.

III. - Il est probable qu'il se forme un composé à type salino-protéique, soit que l'As passe à l'état d'ac. arsénieux avant d'être fixé par les protéines, soit qu'il soit directement fixé par les substances protéiques, comme As élémentaire.

IV. - Les expériences "*in vitro.*", sont confirmées par les expériences "*in vivo.*", qui démontrent comme quoi les métalloïdes, que les protéines fixent le plus, sont aussi les plus toxiques et prouvent encore que l'As administré "*per os.*", n'est pas toxique, tandis que il le devient seulement lorsqu'il est inoculé sous le derme, c'est-à-dire lorsqu'on le met dans le milieu protéique nécessaire pour qu'il se combine et pour qu'il soit absorbé.

---