

COMPORTEMENT DE DEUX ENZYMES LYSOSOMIAUX (LA DESOXYRIBONUCLEASE ACIDE ET LA β -GALACTOSIDASE) DANS LE FOIE, LA RATE ET LE SANG DE RAT, APRES INJECTION DE CYSTAMINE

ROSE GOL-WINKLER et ROLAND GOUTIER

Laboratoires de Radiobiologie, Université de Liège, Belgique

(Received 26 May 1972; accepted 6 December 1972)

Abstract—Cystamine when given intraperitoneally to rats at a dose of 150 mg/kg, produces an increase of acid-DNase and β -galactosidase activity in the plasma, with the appearance of two peaks of maximal activity at 30 min and 2 hr after injection. Each wave of increased activity in the plasma is preceded by changes in the intracellular distribution of both enzymes in liver and spleen, consisting in a drop of soluble enzymic activity, as early as 5 min after injection, except for spleen β -galactosidase which displays an enhanced soluble activity 15 min after injection. The minor differences observed in the behaviour of both enzymes are discussed in connection with the described phenomenon.

LA CYSTÉAMINE et son dérivé disulfure, la cystamine, produisent, après injection chez le rat, des effets pharmacologiques et biochimiques typiques d'un état de choc.¹ Pour de multiples raisons, ce "choc biochimique" doit jouer un rôle important dans le développement de la radiorésistance.² L'état de radioprotection débute déjà 2 min après l'injection de cystamine et diminue au-delà de 10 min; chez certaines races de rats, un second pic de radioprotection est observé après 45 min.³ C'est donc dans cet intervalle de temps qu'il est intéressant de rechercher des altérations biochimiques. Or les augmentations d'activité de certains enzymes (mitochondriaux et lysosomiaux) observés dans le plasma du rat après injection d'une dose protectrice de cystéamine atteignent généralement leur maximum 2 hr après, bien qu'elles soient déjà décelables au bout de 25 min.⁴ Il nous a paru intéressant de rechercher, au niveau des tissus, le moment auquel, après l'injection d'une dose protectrice de cystamine, certains enzymes quittent les lysosomes pour passer successivement dans la fraction soluble du cytoplasme puis dans le plasma. Nous avons choisi deux enzymes lysosomiaux dont l'un, la β -galactosidase, semble, *in vitro*, tout au moins, plus aisément détachable des membranes lysosomiales que l'autre, la désoxyribonucléase acide.⁵ Outre le plasma, deux organes ont retenu notre attention: le foie, à cause de sa richesse en lysosomes, et la rate à cause des altérations des structures subcellulaires qu'elle présente après injection de cystamine.⁶

TECHNIQUES

Animaux. Rats, Wistar femelles pesant 200 à 250 g, à jeun 18 hr avant l'expérience. Cystamine (HCl)₂ (Labaz), dissoute extemporanément en NaCl 0,15 M et amenée à pH 7, en injection intraperitoneale, à la dose de 150 mg/kg pour le dichlorhydrate. Les rats témoins reçoivent une injection intraperitoneale de NaCl 0,15 M pH 7. Les

rats sont sacrifiés 5, 15, 30, 60 ou 120 min après l'injection, par ouverture thoracique, sous anesthésie à l'éther, au cours de laquelle le sang est prélevé par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue héparinée, et le foie et la rate rapidement excisés et perfusés avec une solution glacée de saccharose 0,25 M pH 7. Pour chaque temps, 5 à 8 groupes de deux rats ont été utilisés.

Traitements des organes. Le sang est centrifugé à froid, à 3000 g pour 30 min, le plasma est décanté et congelé à -20° jusqu'au moment des dosages enzymatiques. Deux grammes de foie (provenant de deux rats) sont homogénéisés dans 10 vol d'eau bidistillée à l'aide d'un tube de Potter muni d'un piston en teflon et conservés à -20° pour les mesures d'activités enzymatiques totales. Une autre partie des foies prélevés (5 g) est homogénéisée dans 5 vol de saccharose 0,25 M pH 7. Les rates provenant des deux mêmes rats sont homogénéisées en saccharose 0,25 M pH 7 dans un volume final de 15 ml. Toutes ces manipulations sont effectuées dans un bain de glace fondante.

Dix ml des deux homogénats sont centrifugés à 125,000 g pour 60 min à 4° dans le rotor 50 d'une centrifugeuse Spinco L50. Le surnageant est décanté et conservé à -20° jusqu'au moment des dosages.

Dosages enzymatiques. Pour mesurer l'activité enzymatique totale des homogénats, on utilise l'homogénat en eau bidistillée pour le foie (voir ci-dessus) et on emploie l'homogénat de rate en saccharose 0,25 M pH 7, après lui avoir faire subir 3 à 5 alternances de dégel et congélation (la quantité de rate disponible, de 1,5 à 2 g, était trop faible pour réaliser deux homogénats différents comme dans le cas du foie). De plus, du Triton X-100 est ajouté aux deux homogénats, aux concentrations finales indiquées.

DNase acide. L'activité de la DNase acide est mesurée dans un viscosimètre d'Oswald⁷ plongé dans un bain thermostatisé à 37° (le temps d'écoulement de l'eau est, dans ces conditions, de 23,5 sec). Toutes les solutions employées sont à 37°, sauf les échantillons à mesurer qui sont maintenus à 0° jusqu'au moment de la mesure. On introduit dans un tube de Potter des volumes fixes d'une solution de DNA (concentration finale de 0,4 mg/ml) et de citrate de sodium (concentration finale de 0,02 M), des volumes variables (de 0,05 à 0,8 ml) de l'échantillon à mesurer et des volumes adéquats de tampon acétate 0,2 M de pH 5,2 de façon à réaliser un volume total de 3 ml. On mélange rapidement, on ajoute ensuite un petit volume d'une solution de Triton X-100 à la concentration finale de 7 mg/ml et on introduit 2 ml du mélange dans le viscosimètre. L'activité enzymatique est exprimée par la baisse en 10 min du log de la viscosité spécifique⁷ (le temps d'écoulement du mélange testé et celui de l'eau représentant les deux valeurs de viscosité nécessaires au calcul). Dans nos conditions expérimentales, cette baisse est toujours linéaire pendant plus de 10 min.

β-Galactosidase. Selon la technique modifiée de Sellinger *et al.*,⁸ des quantités variables d'échantillon sont incubées et agitées à 37°, pendant 30 min, dans un volume final de 2 ml comprenant 0,5 ml tampon acétate 0,2 M pH 5, du *p*-nitrophényl-β-D-galactosidase 2,5 mM, et du saccharose 0,25 M pour amener à 2 ml. Pour les homogénats, on ajoute du Triton X-100 à la concentration finale de 5 g/l. Après 30 min d'incubation, la réaction est arrêtée par refroidissement et addition de 3 ml d'acide trichloracétique glacé 0,17 M (concentration finale 0,1 M). On centrifuge à 4000 tours/min pendant 20 min et à 2 ml du surnageant obtenu, on ajoute 0,75 ml NaOH 0,5 N et 1,25 ml de tampon carbonate 0,2 M pH 10. Le maximum d'absorption se situe à 394 nm.

Dosages de protéines et de DNA. Les protéines sont dosées par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la technique de Lowry *et al.*,⁹ avec la serumalbumine comme étalon. L'extraction du DNA est effectuée selon la méthode de Schneider,¹⁰ sur 1,5 et 2,5 ml d'homogénat. Le DNA est précipité par addition à froid de PCA 0,6 N de concentration finale. Après deux lavages en acide perchlorique 0,6 N, les lipides sont extraits par centrifugations successives en éthanol 95°, éthanol-éther (1/1, v/v) et éther. Le culot, séché, est resuspendu en acide perchlorique 0,6 N et le DNA est hydrolysé par chauffage à 80° pendant 20 min; on effectue une deuxième extraction identique et on dose le DNA sur les deux extraits mélangés, par la méthode de Dische à la diphenylamine, avec addition d'acétaldéhyde selon Burton.¹¹

Produits chimiques. DNA de thymus de veau, type V; *p*-nitrophényl- β -D-galactoside Sigma. Réactif de Folin-Ciocalteu et diphenylamine Merck.

RÉSULTATS

Le plasma. L'augmentation de l'activité de la DNase acide dans le plasma présente deux maxima, pendant l'intervalle de temps observé ici: l'un 30 min, l'autre 120 min après l'injection (Tableau 1). Il ne s'agit pas d'une hausse relative d'activité enzymatique par suite de la baisse du taux de protéines sériques,¹¹ mais bien d'un accroissement de la teneur absolue en DNase acide puisque l'activité par ml de plasma augmente. Les modifications d'activité de la β -galactosidase sont moins prononcées (Tableau 1). Exprimée par g de protéine, l'activité atteint deux valeurs maximales situées à la 15e et à la 120e min après l'injection.

TABLEAU 1. ACTIVITÉ DE LA DNASE ACIDE ET DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LE PLASMA DE RAT APRÈS INJECTION DE CYSTAMINE

Temps après l'injection	DNase acide		β -Galactosidase	
	Activité par g de protéines	Activité par ml	Activité par g de protéines	Activité par ml
Témoins	2,3 \pm 0,2*	0,160 \pm 0,010	1,63 \pm 0,10	0,129 \pm 0,016
5 min	2,1 \pm 0,3	0,160 \pm 0,020	1,80 \pm 0,30	0,136 \pm 0,033
15 min	3,0 \pm 0,8	0,210 \pm 0,030	2,21 \pm 0,11	0,157 \pm 0,007
30 min	4,9 \pm 0,9	0,290 \pm 0,044	1,92 \pm 0,13	0,168 \pm 0,007
60 min	1,8 \pm 0,2	0,130 \pm 0,006	1,98 \pm 0,14	0,147 \pm 0,007
120 min	6,4 \pm 0,9	0,340 \pm 0,050	2,54 \pm 0,40	0,194 \pm 0,023

* Valeur moyenne \pm erreur standard de la moyenne.

Le foie. L'injection de cystamine provoque une déplétion rapide et précoce de l'activité enzymatique totale de la DNase acide. On voit, dans le Tableau 2, que déjà 5 min après l'injection, l'activité enzymatique spécifique est abaissée de 20 pour cent par rapport aux protéines, ou de 35 pour cent par rapport au DNA. La cellule hépatique retrouve une activité enzymatique normale dès la 15e min après l'injection. La distribution de l'activité DNasique présente des perturbations caractéristiques: la proportion d'enzyme soluble tombe à 52 pour cent puis à 25 pour cent des témoins respectivement 5 et 15 min après l'injection, retourne à une valeur normale à la 30e minute puis redescend à 66 pour cent des témoins au bout d'une heure.

TABLEAU 2. ACTIVITÉ DE LA DNASE ACIDE DANS LE FOIE DE RAT APRÈS INJECTION DE CYSTAMINE

Temps après l'injection	Activité de l'homogénat par mg de protéines	Activité de l'homogénat par mg de DNA	Pourcentage d'activité dans la fraction surnageante
Témoins	0,51 ± 0,05	40,7 ± 6,2	6,4 ± 2,0
5 min	0,41 ± 0,06	26,1 ± 1,0	3,1 ± 1,1
15 min	0,58 ± 0,06	37,0 ± 3,5	1,5 ± 0,2
30 min	0,51 ± 0,02	43,3 ± 7,0	6,6 ± 1,5
60 min	0,49 ± 0,08	50,6 ± 7,6	3,3 ± 0,4
120 min	0,45 ± 0,03	43,6 ± 1,0	4,0 ± 0,2

Dans le foie comme dans le plasma, l'activité de la β -galactosidase est moins modifiée que celle de la DNase acide (Tableau 3). La proportion d'enzyme soluble atteint une valeur minimale (72 pour cent des témoins) déjà 5 min après l'injection et retrouve une valeur normale à la 60e min. Soulignons toutefois la hausse assez forte d'activité spécifique par mg de protéine observée à la 5e min.

TABLEAU 3. ACTIVITÉ DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LE FOIE DE RAT APRÈS INJECTION DE CYSTAMINE

Temps après l'injection	Activité de l'homogénat par mg de protéines	Activité de l'homogénat par mg de DNA	Pourcentage d'activité dans la fraction surnageante
Témoins	0,10 ± 0,010	9,2 ± 1,00	9,2 ± 1,40
5 min	0,17 ± 0,014	10,2 ± 0,96	6,6 ± 0,40
15 min	0,11 ± 0,010	7,0 ± 0,83	7,0 ± 0,68
30 min	0,11 ± 0,010	9,5 ± 1,00	7,6 ± 1,10
60 min	0,12 ± 0,020	8,1 ± 0,89	12,1 ± 3,00
120 min	0,11 ± 0,015	8,7 ± 1,20	11,3 ± 2,60

La rate. La perte de DNase acide par les cellules spléniques (Tableau 4) se manifeste par une baisse de 34 pour cent de l'activité spécifique par mg de protéines, 5 et 15 min après l'injection, et par une diminution progressive, aux mêmes temps, de la proportion d'enzyme soluble (respectivement de 19 et de 33 pour cent par rapport aux témoins). Un retour aux valeurs normales s'observe déjà à la 30e min. Le taux d'enzyme soluble baisse à nouveau (69 pour cent des témoins à la 60e min), avant la seconde vague d'augmentation de l'activité enzymatique dans le plasma.

Pour la β -galactosidase (Tableau 5), les modifications ne s'observent qu'à la 15e min après l'injection, mais elles sont alors particulièrement prononcées et consistent en une baisse considérable de l'activité enzymatique, tant par mg de DNA que par mg de protéines, pendant que la proportion d'enzyme soluble passe de 27 à plus de 40 pour cent. Aux autres temps observés, ces valeurs sont pratiquement normales.

TABLEAU 4. ACTIVITÉ DE LA DNASE ACIDE DANS LA RATE DE RAT APRÈS INJECTION DE CYSTAMINE

Temps après l'injection	Activité de l'homogénat par mg de protéines	Activité de l'homogénat par mg de DNA	Pourcentage d'activité dans la fraction surnageante
Témoins	2,13 ± 0,18	25,0 ± 4,0	19,1 ± 1,40
5 min	1,40 ± 0,09	31,7 ± 2,9	15,8 ± 1,10
15 min	1,37 ± 0,20	23,1 ± 3,9	13,3 ± 1,9
30 min	2,89 ± 0,56	25,7 ± 1,9	26,6 ± 4,9
60 min	2,23 ± 0,50	23,6 ± 2,3	13,3 ± 1,6
120 min	2,52 ± 0,44	24,7 ± 1,7	23,3 ± 5,8

TABLEAU 5. ACTIVITÉ DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LA RATE DE RAT APRÈS INJECTION DE CYSTAMINE

Temps après l'injection	Activité de l'homogénat par mg de protéines	Activité de l'homogénat par mg de DNA	Pourcentage d'activité dans la fraction surnageante
Témoins	0,27 ± 0,030	5,6 ± 0,70	27,6 ± 2,5
5 min	0,27 ± 0,020	7,5 ± 0,41	28,1 ± 0,6
15 min	0,15 ± 0,020	2,8 ± 0,56	43,4 ± 2,4
30 min	0,31 ± 0,039	7,3 ± 1,50	23,6 ± 2,4
60 min	0,28 ± 0,042	5,4 ± 0,90	26,4 ± 1,9
120 min	0,25 ± 0,052	4,2 ± 0,90	27,6 ± 3,2

DISCUSSION

Nous retrouvons, à propos de la DNase acide et de la β -galactosidase, un phénomène identique à celui qu'ont décrit Plomteux *et al.*⁴ pour d'autres enzymes, à savoir une nette augmentation d'activité dans le plasma du rat après injection d'une dose protectrice de cystamine. L'augmentation d'activité de la DNase acide dans le plasma est biphasique. En ce qui concerne la β -galactosidase, la légère baisse d'activité observée 60 min après l'injection ne paraît pas significative. Chaque phase d'augmentation dans le plasma est précédée d'un abaissement de l'activité de la DNase acide dans la fraction surnageante du foie (Tableau 2) et de la rate (Tableau 4).

La détection d'hydrolases lysosomiales dans la fraction surnageante d'un homogénat ne signifie pas nécessairement leur présence dans le cytoplasme soluble *in vivo*. Le pourcentage d'enzyme, "soluble" dépend largement des conditions d'homogénéisation et, dans des conditions d'homogénéisation identiques, serait alors un indice du degré de fragilité relative des lysosomes. A cet égard, il est intéressant de remarquer que, tant dans le foie que dans la rate, la proportion d'enzyme soluble—ou, plus exactement, solubilisée—est plus élevée pour la β -galactosidase que pour la DNase acide. Cette observation suggère que la plus grande facilité de solubilisation de la β -galactosidase, observée *in vitro* par Baccino *et al.*,⁵ pourrait exister également *in vivo*, les homogénéisations ayant toujours été effectuées, dans nos expériences, par la même personne et dans les mêmes conditions.

Aucune étude cytologique ne nous renseigne sur d'éventuelles lésions lysosomiales dans le foie et la rate après injection de cystamine. On sait, cependant, que d'importantes lésions "mitochondriales" s'observent dans la rate déjà 10 min après une injection de cystamine chez le rat, alors que le foie ne présente aucune lésion des mitochondries.⁶ Firket et Lelièvre⁶ concluent que la rate est plus sensible que le foie à l'action de la cystamine. Le comportement de la β -galactosidase dans nos expériences nous amène également à formuler une conclusion semblable (Tableaux 3 et 5).

La presque totalité de la cystamine est liée aux protéines sanguines et tissulaires 2 min après l'injection¹² et les protecteurs à SH se fixent, de façon labile, sur toutes les structures subcellulaires.^{13,14} Une suspension de lysosomes hépatiques traitée *in vitro* par différentes substances sulfhydrylées telles que la cystéamine (la cystamine étant réduite en cystéamine chez le mammifère), perd moins de cathepsine dans le milieu d'incubation qu'une suspension non traitée.¹⁵ Il semble bien qu'un phénomène analogue se produise après injection de cystamine, car nous observons 5 et 15 min après l'injection, une diminution du pourcentage d'activité de la DNase acide dans le surnageant de foie (Tableau 2) et de rate (Tableau 4). Mais la cystamine produit en quelques minutes, chez le mammifère, un état de choc prononcé.¹⁶ L'hypoxie qui en résulte est susceptible de fragiliser les lysosomes comme l'ont remarqué Bitensky *et al.*¹⁷ au cours du choc hémorragique, et d'être ainsi à l'origine de l'augmentation d'activité DNasique soluble observée à la 30e min après l'injection.

Remerciement—Ce travail a bénéficié des subsides du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (convention no. 20.128). Nous remercions également Mademoiselle R. Lemestré pour son aide technique.

Résumé—La cystamine en injection intrapéritonéale à la dose de 150 mg/kg provoque, chez le rat, une hausse d'activité de la DNase acide et de la β -galactosidase dans le plasma. Deux maxima sont observés, respectivement 30 min et 2 hr après l'injection. Chaque phase d'augmentation dans le plasma est précédée de modifications de distribution intracellulaire des deux enzymes au niveau du foie et de la rate, consistant en un appauvrissement de la fraction soluble en enzyme dès la 5e min après l'injection, à l'exception de la β -galactosidase de la rate dont l'activité soluble augmente 15 min après l'injection.

BIBLIOGRAPHIE

- Z. M. BACQ, *Chemical Protection against Ionizing Radiation*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1965).
- Z. M. BACQ et R. GOUTIER, *Recovery and Repair Mechanisms in Radiobiology*, Brookhaven Symposia in Biology, **20**, 241 (1967).
- M.-L. BEAUMARIAGE, V. SMOLIAR, Z. M. BACQ et E. H. BETZ, *Int. J. Radiat. Biol.* **10**, 295 (1966).
- G. PLOMTEUX, M.-L. BEAUMARIAGE, Z. M. BACQ et C. HEUSGHEN, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1601 (1967).
- F. M. BACCINO, G. A. RITA et M. F. ZURETTI, *Biochem. J.* **122**, 363 (1971).
- H. FIRKET et P. LELIEVRE, *Int. J. Radiat. Biol.* **10**, 403 (1965).
- M. LASKOWSKI et M. K. SEIDEL, *Archs. Biochem.* **7**, 465 (1945).
- O. Z. SELLINGER, H. BEAUFAY, P. JACQUES, A. DOYEN et C. DE DUVE, *Biochem. J.* **74**, 450 (1960).
- O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **161**, 293 (1945).
- K. BURTON, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
- E. H. BETZ, D. MEWISSEN et P. LELIEVRE, *Int. J. Radiat. Biol.* **4**, 231 (1962).
- B. MONDOVI, L. TENTORI, C. DE MARCO et D. CAVALLINI, *Int. J. Radiat. Biol.* **4**, 371 (1962).
- J. R. MAISIN, A. LEONARD et J. HUGON, *J. natn. Cancer Inst.* **35**, 103 (1965).
- P. VAN CANEGHEM, *Biochem. Pharmac.* **21**, 2417 (1972).
- J. LECOMTE, A. CESSIEN-FOSSION, J. C. LIBON et Z. M. BACQ, *Archs. Int. Pharmacodyn. exp. Ther.* **148**, 487 (1964).
- L. BITENSKY, J. CHAYEN et G. J. CUNNINGHAM, *Nature, Lond.* **199**, 493 (1963).