

LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES CHOLINESTÉRASES

I. FOIE DE QUELQUES MAMMIFÈRES*

par

R. GOUTIER ** ET M. GOUTIER-PIROTTE

*Institut Léon Fredericq, Physiologie, et Laboratoire de Pathologie Générale,
Université de Liège (Belgique)*

INTRODUCTION

On connaît depuis longtemps l'importance physiologique de l'acétylcholinestérase, ou cholinestérase vraie de MENDEL et coll.^{22,23}, dans la transmission de l'influx nerveux à la plaque motrice des muscles striés et dans le fonctionnement du système nerveux autonome cholinergique. Le rôle de la cholinestérase non spécifique, ou pseudo-cholinestérase, était demeuré plus obscur.

Toutefois, cet enzyme connaît un regain d'intérêt depuis qu'on lui a découvert une sensibilité plus grande que l'acétylcholinestérase vis-à-vis de certains inhibiteurs organo-phosphorés^{14,29} et des rayons X⁷.

La présente étude de la distribution intracellulaire des cholinestérases nous a paru la première étape nécessaire à la connaissance du mécanisme d'inhibition des cholinestérases à l'échelle intracellulaire, par les inhibiteurs organo-phosphorés. ZACKS ET WELSH³⁰, par la technique de centrifugations fractionnées sur le foie de rat, ont trouvé une forte activité cholinestérasique spécifique des mitochondries. Contrairement à ces auteurs, nous avons suivi la technique classique de fractionnement (SCHNEIDER²⁷) et nous avons mis au point une méthode de calcul des activités enzymatiques qui permet de chiffrer le contenu enzymatique de chaque fraction en pour cent du tissu de départ. Les résultats obtenus s'écartent de ceux de ZACKS ET WELSH, car nous localisons la majeure partie des cholinestérases au niveau des microsomes chez le foie de rat, de cobaye et de lapin.

TECHNIQUE

1. *Fractionnement de tissu.* Nous avons utilisé des rats albinos femelles, dont le foie renferme plus de cholinestérase que celui du mâle²⁶, des cobayes et des lapins, tous adultes. Les animaux sont nourris jusqu'à la dernière heure, car un jeûne, même de courte durée, provoque une chute rapide du taux de cholinestérase hépatique (HARRISON ET BROWN¹⁸). Quelques minutes avant d'être sacrifiés, les lapins seuls ont reçu une injection d'héparine pour faciliter la perfusion du foie. Les animaux sont tués par un coup sur la nuque et saignés par section des gros vaisseaux du cou. Le foie est totalement excisé et perfusé sous pression par le hile sus-hépatique à l'aide du solvant qui servira au fractionnement (sucrose 0.25 M ou NaCl 0.15 M), préalablement refroidi en glacière. L'homogénéisation est faite en chambre froide, selon la technique de BERTHET ET DE DUVE⁶, en sucrose 0.25 M ou 0.88 M, ou en NaCl 0.15 M. Les temps de broyage du tissu varient d'un animal à l'autre: 3 fois 2 minutes pour le rat et le cobaye, 4 fois 4 à 8 min pour le lapin. L'homogénat ainsi obtenu contient 10 à 20 % de cellules entières qui précipitent avec les noyaux; sa concentration est de 1 g de foie pour 5 à 10 ml d'homogénat.

* Note préliminaire: R. GOUTIER ET M. GOUTIER-PIROTTE¹².

** Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

Les schémas de fractionnement sont celui de SCHNEIDER²⁷ pour les milieux isotoniques, et celui de HOGEBOOM, SCHNEIDER ET PALLADE¹⁶ pour le milieu hypertonique (sucrose 0.88 M), avec cette différence que dans les deux milieux, les microsomes ont été sédimenstés à 104,000 g pendant 90 min, et que les mitochondries ont été préparées selon la technique de JACKSON *et coll.*¹⁹. Les noyaux sont centrifugés dans une Sorvall placée en chambre froide; mitochondries et microsomes sont préparés dans une Spinco préparative réfrigérée.

2. *Tests enzymatiques.* L'activité cholinestérasique de l'homogénat et des fractions est mesurée manométriquement dans l'appareil de Warburg à 37 °C, selon la technique d'AMMON¹, modifiée par AUGUSTINSSON^{2,3}. Voici les substrats employés et les concentrations finales réalisées dans le godet de Warburg:

Acétyl- β -méthylcholine (Mécholyl: Sanders, Bruxelles) 0.03 M pour la recherche de l'acétyl-cholinestérase;

Benzoylcholine (Roche, Bâle) 0.006 M et 0.024 M pour la recherche de la cholinestérase non spécifique.

Acétylcholine (Lab. Biergon, Liège) 0.025 M.

Le substrat est dissous dans le milieu d'homogénéisation renfermant 0.03 M NaHCO₃; la solution de substrat est saturée en CO₂ par barbotage du mélange 95 % N₂-5 % CO₂, ayant d'être introduite dans le godet de réaction; le pH, au pHmètre BECKMANN est de 7.35.

Les fractions d'organes riches en cholinestérase (foie de cobaye), dont on introduit moins de 0.4 ml sur un total de 2 ml, sont simplement ajustées à pH 7.35, sans tampon; un manomètre témoin contenant la fraction et le solvant, sans substrat, montre que l'absence de tamponnement de la fraction ne provoque que de faibles absorptions ou dégagements de CO₂, dont nous tenons compte, cependant.

Les fractions d'organes pauvres en cholinestérase (foie de rat et de lapin), dont il faut employer de 0.4 à 1.6 ml, sont tamponnées par addition de NaHCO₃ (0.03 M de concentration finale) et saturation en CO₂ par barbotage (N₂-CO₂) rendu possible grâce à une graisse antimousse sans action sur la cholinestérase (émulsion silicone Dow Corning "Antifoam AF"); le pH est de 7.35. Les manomètres sont gazés par le mélange N₂-CO₂ avant d'être placés dans le thermostat.

L'activité enzymatique est définie par le dégagement de CO₂ en 30 min, lu sur la pente du dégagement initial en fonction du temps, pour le foie de cobaye et le lapin, ou sur le tracé même du dégagement si celui-ci est une ligne droite (foie de rat). En soustrayant de cette valeur celle de l'hydrolyse non enzymatique en 30 min et celle que donne dans le même temps le manomètre témoin contenant la fraction et le solvant, sans substrat, on obtient la valeur du dégagement enzymatique en 30 min (b 30).

3. *Courbes d'étalonnages.* Les b 30 ne peuvent servir tels quels à l'établissement du bilan enzymatique, car la relation entre l'activité cholinestérasique et la concentration en cholinestérase n'est pas linéaire. Nous avons donc, pour chaque espèce de tissu employé, étalonné l'enzyme en mesurant les b 30 de quantités croissantes d'homogénats. Les b 30 sont portés en ordonnées et la quantité pipetée d'homogénat, en abscisses. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue pour un substrat à une concentration donnée est une courbe valable non seulement pour tous les homogénats du même organe d'une espèce animale, mais aussi pour toutes les fractions obtenues à partir d'un homogénat de cet organe.

En prenant comme unité arbitraire, sur l'axe des abscisses, une quantité d'enzyme donnant un petit dégagement de CO₂, nous pouvons traduire en unités de cholinestérase le b 30 trouvé pour chaque quantité de fraction pipetée dans le godet de Warburg. On calcule ensuite par règle de trois le nombre d'unités de cholinestérase contenues dans l'homogénat et les fractions d'un certain poids de tissu frais (1 g): la teneur en cholinestérase des fractions peut alors être exprimée en % de celle de l'homogénat (c'est ce que renseignent nos tableaux).

Simple outil de calcul, l'unité de cholinestérase correspond à un certain nombre de μ l de CO₂ dégagés en 30 min; pour chiffrer la teneur en cholinestérase des homogénats, nous remplacerons simplement le nombre d'unités arbitraires de cholinestérase par le nombre théorique de μ l de CO₂ auquel il correspond.

4. *Dosages chimiques.* Après minéralisation lente à l'acide sulfurique sélenié, dosages d'azote au Kjeldahl et dosages de P total selon MACHEBOEUF ET DELSAL²¹.

RESULTATS

1. Foie de rat

Le foie de rat renferme les deux types classiques de cholinestérase avec prédominance de cholinestérase non spécifique (SAWYER ET EVERETT²⁶).

L'activité d'un homogénat de foie de rat est assez faible: elle n'est que de 100 à 300 μ l CO₂ en 30 min par g de foie frais pour la cholinestérase non spécifique, et de 50 à 120

μl pour l'acétylcholinestérase. De là découlent la médiocre précision des mesures et la reproductibilité peu régulière des résultats. Trois fractionnements complets sont exposés dans le Tableau I.

TABLEAU I

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES CHOLINESTÉRASES DU FOIE DE RAT FEMELLE, EN SUCROSE 0.88 M

Contenu enzymatique des fractions en % de celui de l'homogénat.

Rat	Substrat	1		2		3	
		Ach.	Bzch.	Mech.	Bzch.	Mech.	Bzch.
Noyaux	17.5	18	0	18.6	13	30	
Mitochondries	21.5	22.5	4.3	9	14.8	8.5	
Microsomes	47.5	43.7	56	64	37	31.5	
Surnageant	0	9	0	0	22	14.3	
Bilan	86.5	93.2	60.3	91.6	86.8	84.3	

(a) Récupération enzymatique

D'après le Tableau I, la récupération enzymatique après le fractionnement est moins bonne pour l'acétylcholinestérase que pour la cholinestérase non spécifique. C'est avec certaines réserves que nous consignons les résultats obtenus sur l'acétylméthylcholine (Mech.): les dégagements lus aux manomètres sont très faibles, et les b 30 déterminés avec une erreur de 5 à 10%. L'erreur s'accroît encore lorsqu'on calcule, par l'intermédiaire des courbes d'étalonnage, le nombre d'unités d'acétylcholinestérase des fractions. Disons, à notre décharge, que les méthodes histochimiques ne sont pas assez sensibles pour déceler les cholinestérases du foie de rat (GEREBTZOFF¹¹).

La cholinestérase non spécifique développe une activité à peine deux fois plus forte que celle de l'acétylcholinestérase; ni RAVIN et coll.²⁴ ni GEREBTZOFF¹¹ ne sont parvenus à la mettre en évidence histochimiquement dans le foie de rat.

Le bilan déficitaire ne peut être expliqué par une inactivation au cours du temps, bien que les mesures durent souvent plus de deux jours: après trois jours de conservation en glacière, les fractions ont gardé toute leur activité. La plus grande part de responsabilité incombe, en réalité, aux pertes de matières au cours du fractionnement: celles-ci se montent, d'après les dosages d'azote et de phosphore total, à 10% au moins.

D'après les Tableaux I et II, en exprimant par rapport à l'N ou au P total le bilan des cholinestérases, nous récupérons la presque totalité de l'enzyme de l'homogénat.

(b) Activité des fractions

1. *Noyaux.* La fraction noyaux renferme en moyenne 22% de la cholinestérase non spécifique. La valeur élevée de 30% trouvée chez le rat n° 3 (Tableau I), coïncide avec une teneur en N anormalement forte de la fraction (rat n° 3, Tableau II): sans doute cette fraction contient-elle un nombre de cellules entières et de mitochondries agglutinées plus élevé que d'habitude. Lorsqu'on mesure l'activité cholinestérasique du culot de cellules entières sédiménté après 5 min à 500 RPM à la centrifugeuse Sorvall, à partir d'un homogénat de foie de rat, on s'aperçoit que la part prise par les cellules non broyées dans l'activité de la fraction noyaux est de 10 à 15% (de l'activité totale de l'homogénat). Si les homogénats sont toujours préparés de la même façon, ce pour-

centage reste assez constant. Par contre, la contamination des noyaux par les mitochondries varie certainement d'un fractionnement à l'autre, en fonction notamment, de la durée de la perfusion du foie; il est impossible de l'apprécier quantitativement. Comme l'ont constaté HERS et coll.¹⁵, elle est très peu réversible. Le Tableau III montre que, malgré 4 lavages, le taux de cholinestérase de la fraction noyaux diminue peu.

TABLEAU II
DOSAGES D'AZOTE ET DE PHOSPHORE TOTAL DU FOIE DE RAT
Résultats exprimés en mg par g de foie frais.

Rat	1		2		3
	N	N	N	P	P/N
Homogénat	19.9	18.9	23.25	2.15	0.092
Noyaux	4.55	4.6	8.75	0.74	0.085
Mitochondries	2.63	1.88	3.65	0.35	0.095
Microsomes	3.05	3.4	3.10	0.40	0.130
Surnageant	6.88	7.62	4.65	0.47	0.100
Bilan					
	17.11 (85.5 %)	17.5 (92.6 %)	20.15 (87 %)	1.96 (91 %)	—

(A noter le rapport P/N élevé caractéristique de la fraction microsomes).

TABLEAU III
EFFET DES LAVAGES DE LA FRACTION NOYAUX DU FOIE DE RAT SUR LA TENEUR EN CHOLINESTÉRASE
Teneur enzymatique en % de celle de l'homogénat.

Substrat	Mch.	Bch.
Noyaux lavés 2 fois	8.7	13
Noyaux lavés 4 fois	6	11

A l'examen microscopique, il reste encore de nombreuses mitochondries agglutinées parmi les noyaux lavés 4 fois. Nous ne pouvons conclure ici à la présence ou à l'absence de cholinestérase sur les noyaux. Les techniques histochimiques ne sont malheureusement pas assez sensibles pour déceler les cholinestérases du foie de rat. Sur d'autres tissus et d'autres animaux, cependant, elles n'ont jamais révélé la présence d'estérase ou de cholinestérase au niveau des noyaux (pour les estérases: HOLT ET WITHERS¹⁷, BARRNETT ET SELIGMAN⁵, BARRNETT⁴; pour les cholinestérases: KOELLE²⁰, RAVIN et coll.²⁴, GEREBTZOFF^{10,11}).

2. *Mitochondries et microsomes.* En 1951, ZACKS ET WELSH³⁰ ont localisé principalement sur les mitochondries, les cholinestérases du foie de rat. Le désaccord entre leurs résultats et les nôtres réside, croyons-nous, dans les différences entre les techniques de fractionnement employées. En centrifugeant pendant 15 min à 16,000 g l'homogénat en sucre 0.25 M débarrassé des noyaux, ZACKS ET WELSH entraînent une partie des microsomes avec les mitochondries: le fait qu'ils ne trouvent aucune activité acétyl-cholinestérasique dans les microsomes en est une preuve (nous y trouvons de 30 à 56% de l'acétylcholinestérase de l'homogénat). En sucre 0.25 M, la vitesse préconisée par

SCHNEIDER²⁷ et adoptée par beaucoup d'auteurs (et par nous), est de 8,500 g pendant 10 min. C'est aussi à 16,000 g mais pendant 90 min que ZACKS ET WELSH précipitent les microsomes: il reste très probablement des microsomes dans leur fraction soluble, car il en reste encore après une centrifugation de 90 min à 20,000 g (CHANTRENNE⁸, HUSEBY ET BARNUM¹⁸). D'après le Tableau I, c'est au niveau des microsomes et non des mitochondries que l'on retrouve la majeure partie des cholinestérases du foie de rat. Les chiffres donnés pour les trois dernières fractions dans le Tableau I concernent granules et surnageant de l'ensemble des cellules *broyées*: il s'agit là de valeurs minimales, car 10 à 15% des cellules échappent au broyage (voir plus haut) et sédimentent avec les noyaux. La teneur relative en cholinestérase des fractions autres que la fraction noyaux en sera rehaussée d'autant, à condition que les esters de choline (substrats employés) pénètrent à l'intérieur des cellules entières. C'est ce qui arrive, ainsi qu'on peut s'en rendre compte, en préparant un homogénat à l'aide d'un broyeur en Teflon, matière plastique moins dure que le verre et laissant une majorité de cellules non broyées: l'activité cholinestérasique d'un tel homogénat, dilué dans du sucre isotonique, est identique à celle d'un homogénat dilué dans de l'eau distillée et où, par plasmolyse, toutes les membranes cellulaires sont rompues.

3. *Surnageant*. Le taux de cholinestérase de la fraction soluble du foie de rat est, en réalité, difficile à déterminer exactement. Son activité est très faible, surtout vis-à-vis de l'acétyl- β -méthylcholine. Une façon de résoudre le problème consiste à sédimentier toutes les fractions en un seul culot, en centrifugeant l'homogénat pendant 2 h à 104,000 g: on obtient ainsi un surnageant non dilué par les lavages, d'activité plus grande et, donc, plus facile à mesurer, renfermant 7% (\pm 2) de la cholinestérase non spécifique.

(c) *Etat actif ou latent des cholinestérases*

Nous avons étudié l'influence du pH et de la pression osmotique sur des homogénats de foie de rat.

1. *Pression osmotique*. Nous homogénéisons 4 g de foie de rat dans 12 ml seulement d'eau bidistillée; en guise de témoins, 4 g de foie sont homogénéisés dans 12 ml de sucre 0.88 M. Les deux homogénats sont laissés 24 h en glacière. Au moment des mesures, on ajoute à chaque homogénat 12 ml d'une solution de sucre de concentration telle que la concentration finale de sucre soit 0.88 M dans les deux cas. Alors que les granules sont désagrégés après un séjour de 24 h en eau bidistillée, on ne constate aucune modification de l'activité acétylcholinestérasique et non spécifique.

2. *Le pH*. — deux échantillons d'un même homogénat sont conservés en glacière, l'un à pH 7.35, l'autre à pH 5, pendant 24 h. Au moment des mesures, les deux pH sont rajustés à 7.35. Les résultats obtenus pour les deux homogénats sont identiques.

Ni la fragilisation des granules à pH 5, ni leur éclatement en eau bidistillée, n'activent ou ne libèrent des cholinestérases. Il n'existe donc probablement pas de cholinestérase à l'état inactif dans le foie de rat.

Les expériences ci-dessus ont été faites sur des homogénats de foie et non sur les fractions isolées: elles ne nous renseignent donc pas sur la solidité du lien unissant l'enzyme aux granules. Le foie de cobaye nous donnera cependant une indication à ce sujet: en NaCl, la cholinestérase n'est pas détachée des granules et la teneur en enzyme du surnageant n'est pas augmentée; cela implique une certaine cohésion entre enzyme et granules.

2. *Foie de cobaye*

Le foie de cobaye ne renferme pas d'acétylcholinestérase. Par contre, sa benzoylcholinestérase (SAWYER²⁵) est très active et provoque des dégagements de l'ordre de 2,000 à 20,000 μ l CO₂ en 30 min par g de foie frais. C'est toujours sous l'aspect d'une courbe que se présente le tracé graphique des dégagements de CO₂ en fonction du temps.

Le Tableau IV donne les résultats des fractionnements complets opérés dans trois solvants différents. Au cours du fractionnement en sucrose 0,88 M, on a préparé une fraction intermédiaire entre mitochondries et microsomes: le surnageant des mitochondries a été centrifugé pendant 10 min à 29,000 g; le décantat de cette centrifugation a été ensuite soumis à 104,000 g pendant 2 h pour obtenir les microsomes.

TABLEAU IV

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA BENZOYLCHOLINESTÉRASE DU FOIE DE COBAYE

Contenu enzymatique des fractions en % de celui de l'homogénat.

Solvant Substrat (Bzch.)	sucrose 0,88 M 0,06 M	sucrose 0,25 M 0,024 M	NaCl 0,15 M 0,024 M
Noyaux	5,2	10	5,2
Mitochondries	2,2	18	17
Fraction intermédiaire	10	—	—
Microsomes	37	58	20,5
Surnageant	5	1	3,8
 Bilan:	79,2	87	93,3

La teneur de la fraction noyaux en cholinestérase varie de 5 à 10%, en solvant sucrose. Les cellules entières, relativement peu nombreuses ici, n'interviennent pas beaucoup dans le pourcentage observé. Par contre, la contamination par les mitochondries, inévitable et irréversible (voir foie de rat), est assez importante, comme l'ont montré les contrôles microscopiques. L'agglutination des granules est maximale en NaCl, et c'est certainement à une large contamination par les mitochondries et surtout par les microsomes agglomérés qu'il faut attribuer le chiffre de 52% trouvé pour la fraction noyaux en NaCl. La technique de fractionnement ne nous permet pas de conclure à la présence de cholinestérase sur les noyaux. Rappelons seulement la négativité des réactions histochimiques au niveau des noyaux (voir foie de rat).

Les microsomes possèdent la majeure partie de la benzoylcholinestérase. La fraction intermédiaire, isolée dans la première expérience du Tableau IV, correspond à ce sédiment non tassé qui recouvre lâchement le culot de mitochondries et que JACKSON et coll.¹⁹ ont dit être de nature microsomiale. Dans les deux fractionnements en sucrose, les microsomes renfermeraient donc de 47 à 58% de la cholinestérase totale. En NaCl, par contre, une grande partie des microsomes, agglutinés aux noyaux, ont sédimenté avec ceux-ci.

On ne peut attribuer à une simple contamination la teneur en cholinestérase des mitochondries: d'après certains auteurs, des taux de 10 à 12% trouvés sur les mitochondries sont assez faibles pour relever d'une contamination (DE DUVE⁹ pour la glucose-6-phosphatase; SCHNEIDER ET HOGEBOOM²⁸ pour la déshydrogénase isocitrique); mais nous trouvons une moyenne de 19% de cholinestérase sur les mitochondries; celles-ci en contiennent donc un peu également.

De ses études histochimiques précises, GEREBTZOFF¹¹ conclut récemment que la benzoylcholinestérase du foie de cobaye se localise "dans le cytoplasme même des cellules parenchymateuses, sans qu'on puisse la rattacher à des organites tels que le chondriome ou l'appareil de Golgi". Ainsi est établie, par deux techniques différentes, la localisation majeure de la benzoylcholinestérase sur les microsomes du foie, chez le cobaye.

Le surnageant ne contient que 4% environ de la benzoylcholinestérase totale. Il n'est pas exclu que de petits microsomes échappent à la dernière centrifugation de 90 min à 104.000 g et qu'ils soient responsables de l'activité mesurée. Il est peu probable que celle-ci provienne de molécules d'enzyme arrachées des granules au cours du fractionnement, car en NaCl, contrairement à ce qui se passe pour d'autres enzymes sans doute moins fortement fixés à leur support (BERTHET ET DE DUVE⁶), la quantité de cholinestérase présente dans le surnageant est la même qu'en sucre.

Comme dans le cas du foie de rat, le déficit de 8 à 20% trouvé sur le bilan enzymatique n'est pas dû à une inactivation au cours du temps, car l'activité cholinestérasique des fractions ne baisse pratiquement pas après deux ou trois jours de séjour en glacière. La perte de matières en est responsable, pour la plus grande part.

3. Foie de lapin

La cholinestérase non spécifique du foie de lapin serait, en réalité, d'après SAWYER²⁵, une benzoylcholinestérase. Quoique son activité soit un peu plus forte dans le foie de lapin que dans le foie de rat, elle ne dépasse pas 500 à 600 μ l CO₂ en 30 min par g de foie frais. Contrairement au foie et au plasma de rat, c'est l'acétylcholinestérase qui prédomine dans le foie et le plasma de lapin; elle provoque des dégagements de l'ordre de 800 à 1000 μ l CO₂ en 30 min par g de foie frais. Pour les deux cholinestérasées du foie de lapin, les dégagements de CO₂ en fonction du temps s'inscrivent sur une courbe et non sur une droite comme chez le rat. Le pourcentage de cellules non broyées s'est chiffré à 15 et 18% pour deux homogénats différents. C'est en adoptant un taux minimum de 15% de cellules entières, et en le retranchant donc de la fraction noyaux et de l'homogénat, que nous obtenons les valeurs du Tableau V.

Comme chez le rat, les deux types de cholinestérase se distribuent d'une façon assez semblable.

C'est bien encore au niveau des microsomes que se retrouve la majeure partie (plus de 50%) des cholinestérasées du foie de lapin.

TABLEAU V

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES CHOLINESTÉRASES DU FOIE DE LAPIN, EN SUCROSE 0.25 M.

Teneur enzymatique des fractions en % de celle de l'homogénat.

Lapin	1		2		
	Substrat	Bzch.	Mech.	Bzch.	Mech.
Noyaux	13.3	13.2	13.6	4.8	
Mitochondries	34.1	17.5	14.9	17.1	
Microsomes	55.3	63.8	53.2	52.3	
Surnageant	0	0	19.3	18.6	
Bilan:	102.7	94.5	101	92.8	

La valeur moyenne de 17 à 20% trouvée sur les mitochondries est trop élevée pour être attribuée à une contamination (cfr. cobaye).

Le surnageant du deuxième fractionnement est plus riche en cholinestérase que celui du premier. Comme le premier homogénat a été préparé par 4 broyages de 4 min et le second, par 4 broyages de 10 min chacun, nous nous sommes demandé si les mitochondries n'avaient pas été lésées en beaucoup plus grand nombre dans le second cas, et perdu ainsi leurs cholinestérases au profit de la fraction soluble. Nous avons alors procédé à l'expérience suivante: 5 g de tissu (foie de lapin) sont broyés en une seule fois pendant 5 min au tube de Potter en sucrose 0.25 M, et étendus à 50 ml, comme d'habitude; on sémente noyaux et débris cellulaires en centrifugeant l'homogénat pendant 10 min à 600 g et on écarte le culot. La moitié du surnageant est broyée au Potter pendant 15 min; l'autre moitié sert de témoin. Toutes deux sont alors centrifugées à 104,000 g pendant 90 min: on constate que l'activité des deux fractions solubles est la même. Par conséquent, le broyage au Potter ne semble pas détacher la cholinestérase des mitochondries par désintégration de celles-ci, contrairement à ce que BERTHET ET DE DUVE ont observé à propos de la phosphatase acide. Il est possible que la cholinestérase de la fraction soluble du deuxième fractionnement (Tableau V) ait été arrachée aux granules par les lavages.

CONCLUSIONS

Nos résultats montrent que la distribution intracellulaire des cholinestérases dans le tissu hépatique est la même chez le rat, le cobaye et le lapin: un faible pourcentage d'enzyme est fixé sur les mitochondries, la majeure partie se retrouve sur les microsomes. L'activité de la fraction noyaux provient en réalité des cellules non broyées qui s'y trouvent, et des mitochondries agglutinées aux noyaux d'une façon peu réversible.

Les trois types de cholinestérase étudiés présentent la même distribution.

Ces résultats sont en accord avec ceux que donnent les méthodes histochimiques précises. On peut se demander si les cholinestérases ne s'adsorbent pas sur les microsomes et si la distribution observée ne résulte pas d'un artefact. Deux arguments cependant, tendent à prouver qu'il s'agit bien d'une fixation primaire, et non d'une adsorption secondaire des cholinestérases sur les granules:

1) malgré les lavages nombreux qu'exige un fractionnement complet, les cholinestérases ne se retrouvent qu'en très faible proportion dans le surnageant final;

2) Nous montrons, dans le travail suivant, que la distribution de la cholinestérase non spécifique est toute différente dans le pancréas du chien: là, l'enzyme ne s'adsorbe certainement pas aux granules puisque la plus grande partie en est localisée dans le surnageant. On peut, par analogie, penser qu'il ne s'agit pas d'adsorption dans le cas du foie.

La médiocre précision de nos résultats sur le foie de rat provient de sa très faible activité. Il nous a toutefois été possible d'y déterminer quantitativement la répartition intracellulaire des cholinestérases, alors que les images histochimiques n'y décelaient aucune activité cholinestérasique.

RÉSUMÉ

1. La distribution intracellulaire des cholinestérases du foie de rat, de cobaye et de lapin, a été étudiée par la technique des centrifugations fractionnées.

Bibliographie p. 369.

2. Dans le foie de ces trois mammifères, les cholinestérases se retrouvent en majeure partie sur les microsomes (40 à 60 %) et en moindre proportion sur les mitochondries (15 à 25 %); les noyaux en sont dépourvus. L'acétylcholinestérase et la cholinestérase non spécifique présentent la même répartition, dans le foie de rat et de lapin.

3. Nos résultats concordent avec les observations récentes des histo chimistes.

SUMMARY

1. By means of the tissue fractionation technique, the intracellular distribution of cholinesterases has been determined in rat, guinea-pig and rabbit liver.

2. In the liver of these three mammals, cholinesterases are concentrated on microsomes (40 to 60 %) and, in smaller amount, on mitochondria (15 to 25 %); they seem to be lacking on the nuclei. Acetylcholinesterase and non specific cholinesterase display the same distribution in rat and rabbit liver.

3. Our results are in agreement with recent histochemical observations.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch fraktioniertes Zentrifugieren wurde, in Meerschweinchens-, Ratten- und Kaninchenleber die intracellulare Verteilung der Cholinesterasen festgestellt.

2. In Säugetierleber befinden sich die Cholinesterasen meistens auf den Mikrosomen (40 bis 60 %), in geringerer Masse auf den Mitochondrien (15 bis 25 %); auf den Kernen sind sie nicht zu finden. Azetylcholinesterase und unspezifische Cholinesterase verteilen sich in Ratten- und Kaninchenleber gleichfalls.

3. Unsere Ergebnisse stimmen mit den histochemischen Beobachtungen überein.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. AMMON, *Pflüger's Arch. ges. Physiol.*, 233 (1933) 486.
- 2 K. B. AUGUSTINSSON, *Ark. Kemi. Mineral. Geol.*, 18A (1944) no. 24.
- 3 K. B. AUGUSTINSSON, *Acta Physiol. Scand.*, 15 (1948) suppl. 52.
- 4 R. J. BARRNETT, *Anat. Rec.*, 114 (1952) 577.
- 5 R. J. BARRNETT ET A. M. SELIGMAN, *Science*, 114 (1951) 579.
- 6 J. BERTHET ET C. DE DUVE, *Biochem. J.*, 50 (1951) 174.
- 7 J. H. BURN, P. KORDIK ET R. H. MOLE, *Brit. J. Pharmacol.*, 7 (1952) 58.
- 8 H. CHANTRENNÉ, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 437.
- 9 C. DE DUVE, *Exposés annuels de Biochimie, Masson et Cie, Paris. 14ème série* (1952) 47.
- 10 M. A. GEREBTZOFF, *Acta Anat.*, 19 (1953) 366.
- 11 M. A. GEREBTZOFF, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 397.
- 12 R. GOUTIER ET M. GOUTIER-PIROTTE, *Arch. Internat. Physiol.*, 62 (1954) 151.
- 13 M. F. HARRISON ET L. M. BROWN, *Biochem. J.*, 48 (1951) 151.
- 14 R. D. HAWKINS ET B. MENDEL, *Brit. J. Pharmacol.*, 2 (1947) 173.
- 15 H. G. HERZ, J. BERTHET, L. BERTHET ET C. DE DUVE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 21.
- 16 G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER ET G. E. PALLADE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 619.
- 17 S. J. HOLT ET R. F. J. WITHERS, *Nature*, 170 (1952) 1012.
- 18 R. A. HUSEBY ET C. P. BARNUM, *Arch. Biochem.*, 26 (1950) 187.
- 19 K. L. JACKSON, E. L. WALKER ET N. PACE, *Science*, 118 (1953) 136.
- 20 G. B. KOELLE, *J. Pharmac. Exper. Ther.*, 103 (1951) 153.
- 21 M. MACHEBOEUF ET J. DELSAL, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 116.
- 22 B. MENDEL ET D. B. MUNDELL, *Biochem. J.*, 37 (1943) 64.
- 23 B. MENDEL, D. B. MUNDELL ET H. RUDNEY, *Biochem. J.*, 37 (1943) 473.
- 24 H. A. RAVIN, KWAN CHUNG TSOU ET A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 843.
- 25 C. H. SAWYER, *Science*, 101 (1945) 385.
- 26 C. H. SAWYER ET J. W. EVERETT, *Amer. J. Physiol.*, 148 (1947) 675.
- 27 W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 259.
- 28 W. C. SCHNEIDER ET G. H. HOGEBOOM, *Cancer Research*, 11 (1951) 1.
- 29 E. C. WEBB, *Biochem. J.*, 42 (1948) 96.
- 30 S. I. ZACKS ET J. H. WELSH, *Amer. J. Physiol.*, 165 (1951) 620.

Reçu le 6 octobre 1954