

## LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES CHOLINESTÉRASES

## II. PANCRÉAS ET SUC PANCRÉATIQUE DE CHIEN

par

R. GOUTIER\* ET M. GOUTIER-PIROTTE

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

## PANCRÉAS DE CHIEN

Nous avons étudié dans un précédent article<sup>8</sup> la distribution intracellulaire des cholinestérases dans le foie de rat, de cobaye et de lapin, et nous avons établi que cette distribution était analogue chez les trois animaux étudiés.

Le foie est très probablement l'organe générateur de la cholinestérase plasmique<sup>22, 23</sup>. Etant donné la lenteur de l'excrétion de la cholinestérase hépatique dans le torrent circulatoire, il était difficile, dans les conditions où nous nous placions, d'observer, au cours de l'excrétion de cholinestérase, d'éventuelles modifications dans la distribution intracellulaire de l'enzyme. Par contre, l'excrétion exocrine de cholinestérase dans le suc pancréatique est très abondante et facile à suivre.

Nous avions la possibilité de comparer nos résultats à ceux que GEREBTZOFF<sup>8</sup> a obtenus par voie histochimique sur le pancréas de cobaye.

Dans ce travail, on trouvera également une étude rapide du sort des cholinestérases du suc pancréatique, après activation de ce dernier dans l'intestin.

## TECHNIQUES

1. *Récolte du suc pancréatique.* Anesthésie du chien adulte par morphine (1/3 cg/kg) puis, Nembutal sodique (24 mg/kg). Canulation du canal pancréatique accessoire (voir dissection dans ABDERHALDEN<sup>1</sup>) après ligature de son abouchement dans le duodénum.

La sécrétion est stimulée par injection intraveineuse (I.V.) de sécrétine commerciale (présentée sous forme de chlorhydrate anhydre dosé à 40 U (?) par ampoule) et de dicarnitine (Bicarnésine Labaz: 2 à 5 mg/kg).

Le suc recueilli développe une très forte activité cholinestérasique; moins forte cependant, que celle du suc obtenu par stimulation vagale ou par injection de pilocarpine (McCANCE *et coll.*<sup>18</sup>). Toutefois, nous n'avons pas eu recours à ces deux derniers modes de stimulation pour la raison qu'après sécrétine, le suc pancréatique est plus alcalin et un peu moins concentré qu'après n'importe quel autre excitant et qu'il a, par conséquent, moins de chances de s'activer spontanément (voir BABKIN<sup>2</sup>, p. 67). On peut ainsi le conserver plusieurs jours en glacière sans constater d'activation notable.

2. *Prélèvement de tissu pancréatique.* Afin de comparer la répartition intracellulaire de la cholinestérase non spécifique avant et après sécrétion, nous prélevons d'abord un morceau de l'extrémité libre de la tête du pancréas (2 g environ) avant de canuler le canal accessoire; le moignon est serré dans une ligature assurant une bonne hémostase. Après avoir stimulé la sécrétion pendant plusieurs

\* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

heures, l'animal est tué par injection intraveineuse d'air, et un second morceau de pancréas est prélevé immédiatement.

Sitôt prélevés, les deux échantillons de pancréas sont refroidis à 5° C dans du NaCl 0.15 M ou du sucre 0.25 M, et disséqués au scalpel pour n'en garder, autant que possible, que les petits lobules glandulaires et en éliminer le sang facilement par quelques rinçages au NaCl ou au sucre isotoniques.

3. *Fractionnement et tests enzymatiques.* La technique a été exposée à propos des foies de mammifères<sup>8</sup>. L'homogénéat de pancréas est obtenu après trois broyages de 3 min chacun, en milieu isotonique (sucre 0.25 M ou NaCl 0.15 M). Les deux échantillons de pancréas sont fractionnés parallèlement et se trouvent dans les mêmes conditions d'un bout à l'autre de l'expérience. Homogénéisation et fractionnement se déroulent en chambre froide.

Mesures d'activité enzymatique dans l'appareil de Warburg (voir foie de mammifères<sup>8</sup>).

## RÉSULTATS

Le pancréas de chien est très riche en cholinestérase non spécifique (MARNAY<sup>19</sup>, MENDEL ET MUNDELL<sup>20</sup>). Les dégagements obtenus par action de l'homogénat de pancréas de chien sur la benzoylcholine sont de l'ordre de 18,000 à 70,000 µl CO<sub>2</sub> en 30 min par g de tissu frais. Cent fois plus forte que celle du foie de rat, cette activité est mesurée avec une meilleure précision. Nous donnons dans le Tableau I les résultats obtenus en sucre et en NaCl isotoniques avec les deux échantillons de pancréas prélevés sur chaque chien, l'un avant, l'autre après plusieurs heures de sécrétion pancréatique provoquée. Nous n'avons pas soustrait, des valeurs de l'homogénat et des noyaux, l'activité cholinestérasique des cellules entières, assez nombreuses à l'examen microscopique : les valeurs des trois autres fractions sont donc des valeurs minimales (les membranes cellulaires sont perméables au substrat : voir nos expériences sur le foie<sup>8</sup>).

TABLEAU I

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA CHOLINESTÉRASE  
NON SPÉCIFIQUE DU PANCRÉAS DE CHIEN, EN SUCROSE 0.25 M ET EN NaCl 0.15 M,  
AVANT ET APRÈS PLUSIEURS HEURES DE SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE PROVOQUÉE

Substrat: Bzch. 0.024 M.  
Teneur enzymatique des fractions en % de celle de l'homogénat.

	Sucrose 0.25 M				NaCl 0.15 M			
	Chienne 1 (7 kg 500)		Chien 2 (25 kg)		Chien 3 (26 kg 500)		Chien 4 (8 kg 500)	
	Avant sécr.	Après sécr.	Avant sécr.	Après sécr.	Avant sécr.	Après sécr.	Avant sécr.	Après sécr.
Noyaux	17±0.9*	17±0.9	22±1	23±1.2	29±1.4	29±1.4	19±0.9	21±1
Mitochondries	11±0.7	17±1	4.1±0.2	6±0.3	7±0.4	14±0.8	21±1.3	28±1.7
Microsomes	17.5±1.6	14.5±1.3	28.5±2.5	26±2.4	9±0.8	7±0.6	12±1.1	12±1.1
Surnageant	42±5	38±4	38.5±5	36±4	53±5.5	47±5	32±4	26±3
Bilan	87.5	86.5	93.5	91	98	97	84	87

\* L'erreur mentionnée dans le Tableau I est l'erreur relative théorique commise lors de la détermination de la teneur en cholinestérase de la fraction et exprimée, comme celle-ci, en pour cent du contenu enzymatique de l'homogénat.

### (a) Répartition de la cholinestérase

D'après le Tableau I, la fraction soluble détient 30 à 50% de la cholinestérase de l'homogénat ; la plupart du temps, elle en contient plus que les granules réunis.

Bibliographie p. 565.

Nous émettons ici, à propos de la fraction noyaux, les mêmes réserves déjà signalées lors de l'étude du foie<sup>8</sup>: agglutination et cellules entières prennent une grande part dans son activité. L'effet agglutinant du NaCl se voit d'ailleurs très bien dans le Tableau I: en milieu salin, la fraction noyaux contient plus de cholinestérase qu'en sucre, aux dépens des granules. La fraction noyaux du chien 3 a été lavée deux fois; celle du chien 4, par contre, l'a été trois fois: sa moindre teneur en cholinestérase montre que l'agglutination des mitochondries aux noyaux est quelque peu réversible par un lavage supplémentaire. Les noyaux isolés en sucre ont subi deux lavages.

L'image histochimique obtenue par GEREBTZOFF<sup>6</sup> sur le pancréas exocrine (les îlots de Langerhans restent négatifs) diffère de celle donnée par le foie de cobaye et de lapin. Alors que dans ces derniers la coloration est très finement granuleuse et répartie dans tout le cytoplasme, elle se concentre, dans le pancréas, en gros grains situés au pôle apical de la cellule exocrine. Il semble bien que ces grains de sécrétion sont détruits par le broyage au tube de Potter: CLAUDE<sup>4</sup> en a mis en évidence dans la fraction mitochondries du foie, mais il broyait ses tissus au mortier et trouvait au moins 40% de cellules intactes. HOGEBOOM et coll.<sup>12</sup>, sur les mêmes foies broyés au Potter, n'ont décelé de grains de sécrétion que dans les cellules intactes. C'est une des raisons qui nous portent à croire que l'activité cholinestérasique de la fraction mitochondries n'est pas due à une contamination par les grains de sécrétion.

Après rupture des grains de sécrétion par le broyage, la cholinestérase qu'ils renferment passerait alors dans la fraction soluble. Les résultats de GEREBTZOFF<sup>6</sup> et les nôtres se confirmeraient ainsi mutuellement, une fois de plus. Toutefois, la technique mise au point par cet auteur perd en sensibilité ce qu'elle gagne en précision, si bien que le faible pourcentage enzymatique des mitochondries lui a échappé.

#### b. *Changements dans la distribution enzymatique, après sécrétion*

Nous sommes autorisés à comparer les deux échantillons de pancréas parce que:

1. Les conditions d'homogénéisation sont identiques en effet, la teneur en cholinestérase de la fraction noyaux est la même après qu'avant la sécrétion; cela indique que le pourcentage de cellules entières (le plus important responsable de l'activité cholinestérasique de la fraction noyaux) est le même dans les deux cas;

2. Les conditions de fractionnement sont les mêmes: dans la limite des erreurs expérimentales, les bilans des deux fractionnements sont identiques dans chaque cas.

On remarque une hausse nette du taux de cholinestérase des mitochondries et une baisse de celui des microsomes et du surnageant, après sécrétion. L'augmentation du taux de cholinestérase des mitochondries (5.5% en moyenne) est constante et significative: elle dépasse de beaucoup l'erreur théorique commise (qui va de  $\pm 0.3$  pour le chien 2 à  $\pm 1.7$  pour le chien 4). La baisse observée 3 fois sur 4 dans les microsomes n'excède la marge d'erreur que pour le 1er et le 3ème chien. Si la diminution de la cholinestérase du surnageant, après sécrétion, rentre 2 fois sur 4 dans la limite d'erreur — plus grande pour cette fraction à cause de sa dilution — nous croyons cependant que sa constance lui confère une signification statistique et reflète le processus d'excrétion de la cholinestérase non spécifique dans le suc pancréatique. Ces observations ont leur pleine valeur par le fait que la cellule pancréatique reste intacte au cours de la sécrétion (type mérocrine).

Quelle peut être la cause de l'augmentation du taux de cholinestérase de la fraction mitochondries, après plusieurs heures de sécrétion? Nous ne l'attribuons pas à la pré-

sence de grains de sécrétion en plus grand nombre dans cette fraction. Bien que nous n'ayons pas fait de tests au Rouge Neutre, il y a de très fortes présomptions que ces grains disparaissent lors de l'homogénéisation au broyeur de Potter (HOGEBOOM et coll.<sup>12</sup>). S'ils restaient intacts dans les cellules broyées, ce serait alors dans la fraction mitochondries et non dans le surnageant que nous devrions retrouver la majeure partie de la cholinestérase. Ensuite, si le broyage respectait une partie seulement des grains de sécrétion, cette proportion devrait être la même dans les deux échantillons de pancréas, puisque les conditions de fractionnement sont identiques, comme nous l'avons prouvé plus haut; nous devrions alors observer des modifications *parallèles* du taux de cholinestérase des mitochondries et du surnageant, après sécrétion, et non une hausse chez les unes et une baisse chez l'autre.

Il existe des modifications du pH cytoplasmique dans une cellule en travail. Comme la sécrétine provoque un grand départ d'eau et de bicarbonate des cellules pancréatiques, on pourrait soupçonner une acidification du cytoplasme et la rendre responsable d'une agglutination des granules et d'une contamination de la fraction mitochondries. Pour que ce facteur intervienne, il faut que le pH descende en dessous de 6, ce qui est peu probable. Remarquons aussi que la fraction noyaux reste inchangée après sécrétion et indique donc que le degré d'agglutination est le même dans les deux cas. De plus, la baisse de l'activité des microsomes est trop faible pour justifier l'augmentation de 50 à 100% observée sur les mitochondries: une contamination plus forte par les microsomes, possible certes, n'est pas une explication suffisante.

A notre avis, deux éventualités se présentent pour expliquer ce phénomène:

1) Une synthèse de la cholinestérase au niveau des mitochondries, ou une activation, au cours de nos manipulations, d'une cholinestérase inactive ou d'un précurseur protéique.

2) Une néoformation des mitochondries elles-mêmes.

Dans un article récent, DALY ET MIRSKY<sup>5</sup> ne constatent aucune modification de la teneur du pancréas de souris en acide nucléique (ARN et ADN; voir aussi HOKIN ET HOKIN<sup>13</sup>), en peptides et en N non protéique après sécrétion stimulée par un repas ou par injection de pilocarpine. Ils en concluent que la synthèse protéique est très active dans le pancréas, et que les ferment excrétés y sont rapidement remplacés. Cela semble vrai aussi pour la cholinestérase, puisque l'activité cholinestérasique globale de l'homogénat est la même avant qu'après sécrétion.

Une cellule n'est pas pourvue d'un stock immuable de mitochondries. Leur nombre et leur forme varient au contraire selon l'activité de la cellule. BENSLEY<sup>3</sup> les a vu disparaître des cellules pancréatiques après une inanition prolongée et conclut, de l'étude histochimique de leur composition, que les mitochondries seraient des agrégats temporaires de composition complexe. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité d'une néoformation de mitochondries au début du cycle sécrétoire.

Quoi qu'il en soit, c'est donc probablement au niveau des mitochondries que commence la sécrétion de cholinestérase dans le pancréas de chien. Nos résultats ne sont pas en contradiction avec les constatations antérieures des cytologistes attribuant aux mitochondries le rôle initial dans la synthèse des produits de sécrétion (LUDFORD<sup>14</sup>, HIRSCH<sup>10, 11</sup>, KIRKMAN ET SEVERINGHAUS<sup>14</sup>).

## SUC PANCRÉATIQUE DE CHIEN

L'activité cholinestérasique du suc pancréatique de chien est au moins 15 fois plus forte que celle du sang (GINSBERG et coll.<sup>7</sup>): les dégagements que nous avons observés sont de l'ordre de 30 à 70,000  $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min/ml}$  de suc pur; l'injection de dicarnitine seule donne un suc plus concentré que ne le fait l'injection de sécrétine seule<sup>9</sup>. Conservé en glacière, le suc non activé, que nous recueillons en quantités très variables d'un chien à l'autre, garde toute son activité cholinestérasique pendant trois ou quatre jours. Nous avons voulu voir si la cholinestérase persistait après activation du pouvoir protéolytique du suc par l'entérokinase.

## TECHNIQUE

L'entérokinase que nous avons utilisée a été préparée à partir de muqueuse duodénale de porc, selon la technique de KUNITZ<sup>15</sup>.

Après des temps d'incubation variables à 37° C, nous mesurons l'activité protéolytique du suc activé vis-à-vis de la caséine par turbidimétrie; la technique est inspirée de celle de KUNITZ<sup>15</sup>. Un échantillon du suc pancréatique, dilué avec du NaCl 0.15 M contenant 0.03 M NaHCO<sub>3</sub> et de pH 7.35 est divisé en deux parties:

à la première partie, on ajoute une certaine quantité d'entérokinase (Tableau II) et on laisse s'activer le mélange à pH 7.35 dans un thermostat à 37° C, pendant des temps variables;

la même activation est effectuée sur la seconde portion du suc, dans la tubulure latérale des godets de Warburg (esters de choline au centre) où on réalise le même pH et la même concentration d'entérokinase que dans la première partie du suc; les godets sont alors rapidement sortis de la glace fondante, attachés aux manomètres et ceux-ci, placés dans la cuve du Warburg à 37° C.

Pour la première moitié du suc, le temps d'incubation est compté à partir de l'instant où l'on ajoute la solution d'entérokinase au suc dilué (tous deux ayant été préalablement réchauffés à 37° C) jusqu'au moment où l'on prélève le suc activé pour le mélanger à la caséine et mesurer ainsi son activité protéolytique.

Pour la seconde moitié, l'incubation commence dès que les manomètres sont plongés dans le thermostat et finit lorsqu'on les renverse pour mettre en contact enzyme et substrat.

Les deux prélèvements du même suc sont donc placés dans les mêmes conditions de dilution, de température, de pH et d'activation.

L'activation terminée, on fait agir la première partie du suc sur une solution de caséine (0.25 % de concentration finale) pendant 5 à 20 min à pH 7.9 (tampon phosphate); on précipite ensuite à l'acide trichloracétique 1.1% la caséine non hydrolysée et on mesure au photomètre l'intensité du trouble obtenu. Pendant ce temps, on procède à la mesure de l'activité cholinestérasique de la seconde moitié du suc.

Pouvoir protéolytique et activité cholinestérasique sont ainsi mesurés sur deux échantillons d'un même suc dans des conditions semblables et après des temps identiques d'activation.

## RESULTATS

La solution d'entérokinase employée est totalement dépourvue de pouvoir protéolytique et ne modifie pas du tout l'activité cholinestérasique du plasma de chien.

Le simple fait de réchauffer pendant 4 h à 37° C le suc pancréatique en l'absence d'entérokinase, suffit à l'activer un peu et à faire baisser de 40% son activité cholinestérasique.

L'absence, dans notre verrerie, de godets de Warburg à deux tubulures latérales, ne nous a pas permis d'essayer des temps d'incubation inférieurs à 1 heure. Au bout d'une heure d'action de l'entérokinase sur le suc, il ne reste que 1.2% de l'activité cholinestérasique initiale; après deux heures, elle a totalement disparu.

ORD ET THOMPSON<sup>21</sup> ont constaté que la cholinestérase d'homogénats de cerveau et de cœur résistait bien à 1 h d'action à 37° C d'une suspension aqueuse de trypsine. Par

TABLEAU II

ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUE ET CHOLINESTÉRASIQUE DU SUC PANCRÉATIQUE PUR  
ET DU SUC ACTIVÉ PAR L'ENTÉROKINASE

Incubation à 37° C pour tous les essais.

Pouvoir protéolytique exprimé en g de caséine hydrolysée en 10 min par ml de suc non dilué.  
Activité cholinestérasique en  $\mu\text{l CO}_2$  dégagés en 30 min par ml de suc non dilué.

	<i>Incubation</i>	<i>Pouvoir protol.</i>	<i>Activ. cholin.</i>	<i>Inhibition cholin. (%)</i>
I. Suc sans entérokinase	30 min * 4 h	0.007 0.042	65.200 38.000	— 42
II. Suc activé				
a. sans entérokinase (témoin)	30 min *	0.031	70.500	—
b. + 60 $\mu\text{g}$ entérokinase	1 h 2 h	3.36 3.55	870 0	98.8 100

\*: cas du suc conservé en glacière jusqu'au moment des mesures, 30 min représentant le temps écoulé pour obtenir l'équilibre thermique entre godets et thermostat.

conséquent, si la cholinestérase non-spécifique du suc pancréatique disparaît après 1 h d'action de l'entérokinase, c'est ou bien que sa résistance à la protéolyse est très inférieure à celle de l'acétylcholinestérase du cerveau, ou bien qu'elle est hydrolysée par la chymotrypsine et non par la trypsine, dans le suc pancréatique activé.

Autre fait curieux: chez le chien nouveau-né, la cholinestérase résisterait à l'action des sucs digestifs (McCANCE et coll.<sup>17</sup>). Chez le chien adulte, par contre, nos expériences révèlent que la cholinestérase excrétée en abondance par le pancréas, doit être rapidement détruite dans l'intestin et ne jouerait, dans la digestion, qu'un rôle éphémère.

## CONCLUSIONS

Dans une précédente étude de la distribution intracellulaire des cholinestérases du tissu hépatique, nous avons montré que les cholinestérases étaient surtout fixées sur les microsomes, un faible pourcentage se trouvant sur les mitochondries; l'activité des noyaux était due à une contamination par les cellules non broyées et par l'agglutination des granules cytoplasmiques; la fraction surnageante ou fraction soluble du cytoplasme ne contenait pratiquement pas de cholinestérases.

L'analyse du tissu pancréatique montre une distribution tout à fait différente des cholinestérases. L'enzyme se trouve surtout dans le surnageant (41% de moyenne), les microsomes et les mitochondries ne possèdent qu'une faible activité (respectivement 22 et 17% de moyenne). L'activité de la fraction noyaux (22%) semble due aux cellules non broyées de l'homogénat. La répartition intracellulaire des cholinestérases est donc caractéristique pour chaque tissu: elle est la même dans le foie de trois mammifères différents<sup>8</sup>, mais varie d'un organe à l'autre. Cela suggère fortement l'existence d'une relation entre la localisation de l'enzyme dans la cellule et sa fonction dans l'organe.

Nous expliquons la présence de cholinestérases dans le surnageant par la destruction des granules de sécrétion lors du broyage du tissu avant son fractionnement. Les histochimistes ont montré l'existence de cholinestérases en forte concentration dans ces granules sécrétoires.

Après une sécrétion abondante provoquée par injection de sécrétine et de dicarnitine, on constate des modifications dans la distribution de l'enzyme.

L'activité de la fraction mitochondries augmente de 30 à 100 % de sa valeur initiale, suivant les cas. On mesure une baisse compensatoire des fractions microsomes et surnageant; l'activité de la fraction noyaux (cellules entières) reste la même. Ces résultats nous paraissent représenter les deux extrémités du cycle sécrétoire: d'une part, la cholinestérase est synthétisée au niveau de mitochondries préexistantes ou par néo-formation de mitochondries; d'autre part, après s'être rassemblée en grains de sécrétion, peut-être en passant par des granules intermédiaires de plus en plus petits, elle est excrétée dans la lumière des canaux pancréatiques.

Les techniques histochimiques n'offrent pas la possibilité de déterminer une activité cholinestérasique des mitochondries et d'en suivre les variations.

Nous nous sommes demandé quel était le sort de la cholinestérase excrétée dans le suc pancréatique lorsque celui-ci passait dans l'intestin où il subit une activation protéolytique. La cholinestérase du suc est rapidement détruite lors de l'activation de celui-ci par addition d'entérokinase: elle ne jouerait donc qu'un rôle très bref dans la digestion.

#### REMERCIEMENTS

Le présent travail, ainsi que l'étude des cholinestérases du foie, publiée dans cette même revue, n'ont pu être réalisés que grâce à l'accueillante hospitalité de plusieurs personnes. Le Professeur V. DESREUX (Chimie-Physique) nous a permis de disposer de la chambre froide et des centrifugeuses de son laboratoire: nous avons grand plaisir à lui adresser ici l'expression de notre très vive gratitude.

L'un d'entre nous (R.G.) est particulièrement reconnaissant au Professeur H. FREDERICQ (Physiologie) d'avoir bien voulu l'héberger dans son service pendant plus d'un an.

Nous adressons aussi tous nos remerciements au Docteur J. M. GHYSEN qui nous a fourni l'entérokinase.

#### RÉSUMÉ

1. Après fractionnement du pancréas du chien par centrifugations différentielles, on a retrouvé la majeure partie de la cholinestérase non-spécifique (35 à 45 %) dans le surnageant final; les granules en renferment moins.

2. Nos résultats concordent avec ceux des histochimistes.

3. En déterminant la distribution intracellulaire dans deux échantillons de pancréas prélevés, l'un avant, l'autre après plusieurs heures de sécrétion provoquée, on constate toujours après sécrétion, une hausse nette du taux de cholinestérase des mitochondries (40 à 100 % de sa valeur initiale) et une baisse de celui des microsomes et du surnageant. Il ressort de la discussion qu'il s'agit probablement d'une synthèse de cholinestérase au niveau de mitochondries préexistantes ou de la néo-formation de mitochondries au début du cycle sécrétoire.

4. La cholinestérase du suc pancréatique est rapidement détruite après activation du suc par l'entérokinase.

#### SUMMARY

1. Dog's pancreas has been fractionated and the cholinesterase content of each fraction measured. The non-specific cholinesterase is mostly located in the supernatant fraction (35 to 45 %) and, in smaller amount, on the granules.

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

3. We determined the intracellular distribution of cholinesterase in two samples of the same pancreatic tissue, the first one being cut out before, the second one after several hours of induced pancreatic secretion. After secretion, we always observed a rather important increase of the cholinesterase content of mitochondria, which sometimes doubled its initial value, and a decrease of the enzymic content of microsomes and supernatant fluid. Discussion leads to the conclusion that this fact is the result either of an enzyme synthesis by mitochondria, or of the appearance of freshly built up mitochondria, at the beginning of the secretory cycle.

4. Activation of pancreatic juice by enterokinase rapidly destroys cholinesterase.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch fraktioniertes Zentrifugieren wurde, im Hundes Pankreas, die unspezifische Cholinesterase meistens in der löslichen Fraktion (35 bis 45 %) in geringerer Masse auf den Teilchen, lokalisiert gefunden.

2. Unsere Ergebnisse stimmen mit den histochemischen Beobachtungen überein.

3. Aus demselben Hund wurde ein Stück des pankreatischen Gewebe vor, und ein zweites Stück nach mehreren Stunden angereizten Pankreassekretion herausgeschnitten. Beim Vergleichen der intracellulären Verteilung der Cholinesterase in diesen zwei Pankreas Stücken, wurden immer, nach Sekretion, eine beträchtliche Vergrößerung (40 bis 100 % seines Anfangswertes) des Cholinesterasen-gehaltes der Mitochondrien und eine Verminderung des Enzymgehaltes der Mikrosomen und der löslichen Fraktion beobachtet. Aus der Erörterung folgt es dass es sich vermutlich entweder um einen Aufbau der Cholinesterase auf den Mitochondrien, oder um eine Entstehung neuer Mitochondrien am Anfang des Sekretionskreis handelt.

4. Hinzufügung von Enterokinase an die pankreatische Absonderung zerstört die Cholinesterase ziemlich geschwind.

### BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. ABDERHALDEN, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Ab/IV, Teil 6, Bd II, 1138. Urban v. Schwarzenberg, Berlin u. Wien (1936).
- 2 B. P. BABKIN, *Secretory Mechanism of the Digestive Glands*. Paul B. Hoeber, Inc., New-York (1950).
- 3 R. R. BENSLEY, *Anat. Record*, 98 (1947) 609.
- 4 A. CLAUDE, *J. Exp. Med.*, 84 (1946) 51 et 61.
- 5 M. M. DALY ET A. R. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1953) 243.
- 6 M. A. GEREBTZOFF, *Acta Anat.*, 19 (1953) 366.
- 7 R. GINSBERG, R. KOHN ET H. NECHELES, *Am. J. Digest. Diseases Nutrition*, 4 (1937) 154.
- 8 R. GOUTIER ET M. GOUTIER-PIROTE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 361.
- 9 R. GOUTIER, *Observations non publiées*.
- 10 G. C. HIRSCH, *Biol. Rev.*, 6 (1931) 88.
- 11 G. C. HIRSCH, *Blätter Untersuch. und Forsch. Instrumente*, Rathenow, 3 (1931).
- 12 G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER ET G. E. PALLADE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 619.
- 13 L. E. HOKIN ET M. R. HOKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 236.
- 14 H. KIRKMAN ET A. E. SEVERINGHAUS, *Anat. Record*, 71 (1938) 79.
- 15 M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1939) 429 et 447.
- 16 R. J. LUDFORD, *Proc. roy. Soc. (London)*, Series B, 103 (1928) 288.
- 17 R. A. McCANCE, A. O. HUTCHINSON, R. F. A. DEAN ET P. E. H. JONES, *Biochem. J.*, 45 (1949) 493.
- 18 R. A. McCANCE, L. M. BROWN, R. S. COMLINE ET D. A. TITCHEN, *Nature*, 168 (1951) 788.
- 19 A. MARNAJ, *Compt. rend. soc. biol.*, 128 (1938) 519.
- 20 B. MENDEL ET D. B. MUNDELL, *Biochem. J.*, 37 (1943) 64.
- 21 M. G. ORD ET R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.*, 49 (1951) 191.
- 22 A. SAWITSKY, M. ROWEN ET L. M. MEYER, *J. Lab. Clin. Med.*, 34 (1949) 178.
- 23 E. A. ZELLER, H. BIRKHÄUSER, H. VON WATTENWYL ET R. WENNER, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1941) 962; 26 (1943) 2063.

Reçu le 6 octobre 1954