

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ESTÉRASES SÉRIQUES ET DE LA FIXATION DU DF^{32}P DANS LE SÉRUM, CHEZ LE LAPIN ET LE COBAYE

par

R. GOUTIER*

*Laboratoire de biologie médicale de l'organisation TNO pour la recherche scientifique appliquée
à la défense nationale, Rijswijk (Hollande)*

On sait que les aliestérases du sérum se distinguent des cholinestérases par leur insensibilité à l'ésérine et par leur faculté d'hydrolyser le plus rapidement les esters (acétates et butyrates, surtout) aliphatiques et phénoliques. Ce n'est cependant pas à l'aide de substrats spécifiques que l'on peut dénombrer les estérases sanguines: MOUNTER ET WHITTAKER¹⁹ ont trouvé que les esters de phényle étaient hydrolysés par cinq estérases différentes (y compris les deux cholinestérases) dans le sang humain. A l'aide d'inhibiteurs organo-phosphorés des cholinestérases, principalement de l'E600 ou paraoxon (diéthyl-*p*-nitrophénylphosphate), ALDRIDGE¹ a pu distinguer deux estérases, A et B, présentes dans le sérum dans des proportions variables d'une espèce animale à l'autre. L'estérase A, fort peu sensible aux inhibiteurs organo-phosphorés, a la propriété d'hydrolyser un de ceux-ci: le E600 (ALDRIDGE²). Dans le sérum de lapin, d'après MOUNTER¹⁸, estérase A et alkylfluorophosphatase, hydrolysant le DFP (diisopropylfluorophosphonate) et le TEPP (tétraéthylpyrophosphate), ne seraient qu'un seul et même enzyme. Quant à l'estérase B, elle est déjà inhibée par des concentrations d'inhibiteurs phosphorés (E600) de l'ordre de $10^{-8}M$, et n'hydrolyse ni le E600 ni les autres composés du même groupe (ALDRIDGE^{1, 2}).

Les observations mentionnées ci-dessus ont été faites sur le sérum, c'est-à-dire sur une préparation complexe. Les essais de séparation des estérases sériques ont échoués, jusqu'à présent. En fractionnant le sérum de lapin par la méthode de COHN et coll.⁸, on retrouve les estérases dans le précipité de globulines; en sulfate ammonique, par contre, elles restent dans le liquide surnageant (ALDRIDGE²). Mais par ces méthodes, on ne sépare nullement les deux estérases A et B. L'électrophorèse dans un appareil de Tiselius, effectuée par MOUNTER¹⁸, n'aboutit à aucune séparation réelle: toutes les fractions pipetées ont une activité estérasique variable de l'une à l'autre.

Par conséquent, il nous a paru utile de recourir à un autre procédé de séparation: l'électrophorèse de zone, sur papier (FLYNN ET DE MAYO¹¹) et sur colonne d'amidon (FLODIN ET PORATH¹⁰), qui est aussi une technique préparative.

La même technique nous permettait d'étudier en même temps la distribution du ^{32}P entre les différentes protéines plasmatiques après injection de DF^{32}P . On

* Chargé de recherches du Fonds National de la Recherche scientifique (Belgique). Adresse actuelle: laboratoire de Pathologie Générale, Université de Liège (Belgique).

sait, en effet, que cet agent anticholinestérasique puissant se fixe sur d'autres enzymes que la cholinestérase (MYERS²⁰; COHEN et coll.⁶) et sur des protéines non enzymatiques (JANDORF ET McNAMARA¹⁵; HOBBIER¹³). La technique d'électrophorèse de zone rend possible l'observation directe de ces faits dont l'existence n'a été prouvée, jusqu'à présent, que par des procédés indirects.

TECHNIQUES

1. *Electrophorèse sur colonne d'amidon* selon la technique de FLODIN ET PORATH¹⁰, sous tension de 600 V. On utilise 2 ml de sérum. Les différents tampons employés ont tous une force ionique de 0.1; le plus employé est le tampon véronal de pH 8.6. Après électrophorèse, on élue la colonne sur un collecteur de fractions (72 fractions de 1 ml); l'éluant est le tampon lui-même. On dose ensuite les protéines de chaque fraction selon la méthode colorimétrique de LOWRY et coll.¹⁶ (sur 0.02 ml de fraction). Après neutralisation des fractions, on mesure manométriquement leur activité estérasique, en prélevant un volume de 0.02 à 0.2 ml de chaque fraction. Pour les animaux injectés de DF³²P, on sèche le volume restant de chaque fraction et on mesure sa radioactivité à l'aide d'un compteur à enregistrement automatique (Tracerlab).

2. *Electrophorèse sur papier* Whatman No. 1 selon la technique de FLYNN ET DE MAYO¹¹, sous tension de 380 V. La force ionique des tampons est de 0.03; le plus employé est le tampon véronal de pH 8.6. Après électrophorèse, chaque bande de papier est coupée longitudinalement en deux:

a. sur une moitié de la bande, séchée à 110° C pendant 30 min, on colore les protéines selon la technique de DURRUM⁹;

b. sur l'autre moitié, non séchée, on révèle les enzymes par la méthode de GIRI ET PRASAD¹², avec quelques modifications apportées par C. VAN DER MEER (inédit). A une solution chaude d'agar à 1 %, on ajoute une solution de substrat et un indicateur dont la zone de virage est un peu en-dessous du pH du tampon. Après refroidissement et gélification de l'agar, on y dépose les bandes de papier; à l'endroit où se trouve l'enzyme, les produits acides d'hydrolyse modifient la couleur de l'indicateur.

Le substrat est, selon les cas, l'acétylcholine $10^{-2} M$ pour révéler la cholinestérase, le DFP $10^{-2} M$ pour la fluorophosphatase, le butyrate ou l'acétate de phényle $2 \cdot 10^{-2} M$ pour les estérases.

3. *Les activités estérasiques* sont mesurées dans l'appareil de Warburg à 37° C, selon AMMON³, en solution de Krebs-Ringer bicarbonatée (0.025 M). Les substrats des estérases — acétate et butyrate d'éthyle, acétate et butyrate de phényle — sont employés à la concentration finale de 0.05 M; leurs solutions sont homogénéisées au mixer. Utilisé comme substrat de la fluorophosphatase, le DFP est à la concentration finale de 0.01 M.

4. *Matériel.* Acétate et butyrate d'éthyle et de phényle ont été synthétisés au laboratoire par le Dr. JANSZ. Un échantillon de E 600 pur nous a été aimablement offert par le Dr. MYERS, du laboratoire pharmaco-thérapeutique de l'Université d'Amsterdam (Hollande).

Le DF³²P est synthétisé par le Dr. OOSTERBAAN selon une méthode à publier prochainement, à partir d'H₃³²PO₄ provenant de l'Atomic Energy Research Establishment à Harwell. Il est injecté dans le muscle sous forme de solution aqueuse isotonique.

RESULTATS

I. Sérum de cobaye

Le sérum de cobaye a une assez forte activité estérasique vis-à-vis de l'acétate de phényle: les dégagements de CO₂, mesurés au Warburg, sont de 20 à 50,000 μ l par heure et par ml de sérum. D'après ALDRIDGE¹, deux estérases se partageraient cette activité. Il existe, dans le sérum de cobaye, une alkylfluorophosphatase hydrolysant le DFP; elle est cependant peu active et ne donne, au Warburg, que des dégagements de 150 à 300 μ l CO₂/h/ml de sérum. Le sérum de cobaye possède aussi une cholinestérase dont l'activité, mesurée au Warburg vis-à-vis de l'acétylcholine, est de l'ordre de 2 à 6000 μ l CO₂/h/ml sérum.

A. Séparation des estérases

Toutes les électrophorèses de sérum de cobaye, tant sur colonne d'amidon que sur papier, se déroulent en tampon véronal de pH 8.6.

Lorsqu'on détermine l'activité estérasique, vis-à-vis de l'acétate de phényle, des fractions obtenues après électrophorèse sur colonne, on décèle la présence de deux estérases (voir Fig. 1): la première est plus rapide que les albumines, la seconde se situe entre les globulines α_1 et α_2 et empiète sur ces deux fractions. Ces deux estérases ont des sensibilités fort différentes aux inhibiteurs organo-phosphorés (Tableau I): elles répondent aux critères proposés par ALDRIDGE¹ pour distinguer les estérases A et B. L'estérase A est, dans le sérum de cobaye, celle qui se meut plus rapidement que les albumines.

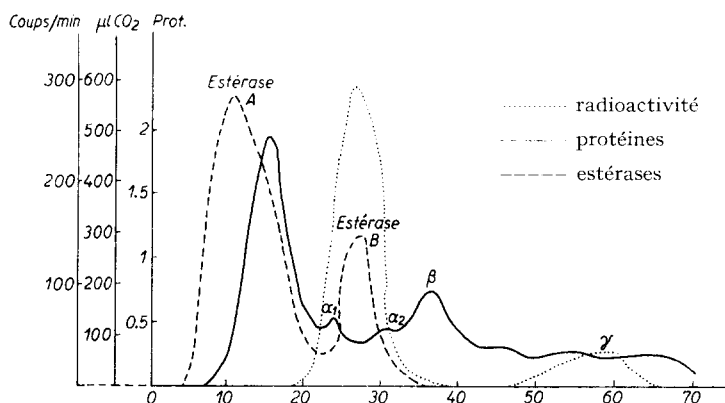


Fig. 1. Electrophorèse de sérum de cobaye sur colonne d'amidon, en tampon véronal de pH 8.6, trois jours après injection intra-musculaire de $100 \mu\text{g/kg}$ de DF^{32}P . En abscisses: numéro des tubes; En ordonnées: de gauche à droite, la radioactivité en coups/minute, l'activité estérasique de 0.2 ml de fraction, exprimée en $\mu\text{l CO}_2$ dégagés en 30 min et enfin la teneur en protéines, en unités arbitraires. En trait plein, les protéines; de gauche à droite, les albumines puis les différentes globulines.

TABLEAU I

SENSIBILITÉ DES DEUX ESTÉRASES DU SÉRUM DE COBAYE,
SÉPARÉES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR COLONNE, AUX INHIBITEURS ORGANO-PHOSPHORÉS
Inhibition exprimée en % de l'activité normale.

	Substrat: ester de phényle	DFP		E 600	
		concentration	inhib.	concentration	inhib.
Estérase A	Acétate	$10^{-4} M$	0	$10^{-3} M$	16
Estérase B	Acétate	$10^{-8} M$	87.6	$10^{-8} M$	100
	Butyrate	$10^{-8} M$	88.6	$10^{-8} M$	100

La séparation ainsi réalisée nous a permis de reconnaître une autre caractéristique de ces estérases: l'estérase B est la seule des deux à hydrolyser le butyrate de phényle. Celui-ci est donc un substrat tout-à-fait spécifique de l'estérase B, chez le cobaye. On s'en aperçoit fort bien aussi, après une électrophorèse sur papier, en déposant la bande de papier sur une plaque d'agar imprégnée de butyrate de phényle (voir technique): seul l'emplacement de l'estérase B se décolore; avec l'acétate de phényle, par contre, les deux estérases apparaissent clairement (Fig. 2a).

La fluorophosphatase, très peu active, est plus difficilement décelable. Après électrophorèse sur papier, on n'observe aucune décoloration de l'indicateur à un niveau quelconque du papier déposé sur une plaque d'agar contenant du DFP. Mais on peut concentrer l'estérase A en rassemblant, après électrophorèse sur colonne, le contenu des tubes qui renferment cette estérase et en les séchant au freeze-dryer. On dissout alors dans très peu de liquide la fine trame sèche d'estérase A: la solution concentrée obtenue hydrolyse lentement le DFP (100 à 150 μ l CO₂/h). Concentrée de la même façon, l'estérase B n'hydrolyse pas du tout le DFP. Dans le sérum de cobaye, par conséquent, estérase A et fluorophosphatase paraissent n'être qu'un seul et même enzyme. La même constatation s'impose pour le sérum de lapin, comme nous le verrons. Nous n'avons pas observé d'hydrolyse du E600 (10^{-2} M) par l'estérase A du cobaye.

Il n'est pas possible de doser manométriquement la cholinestérase des fractions

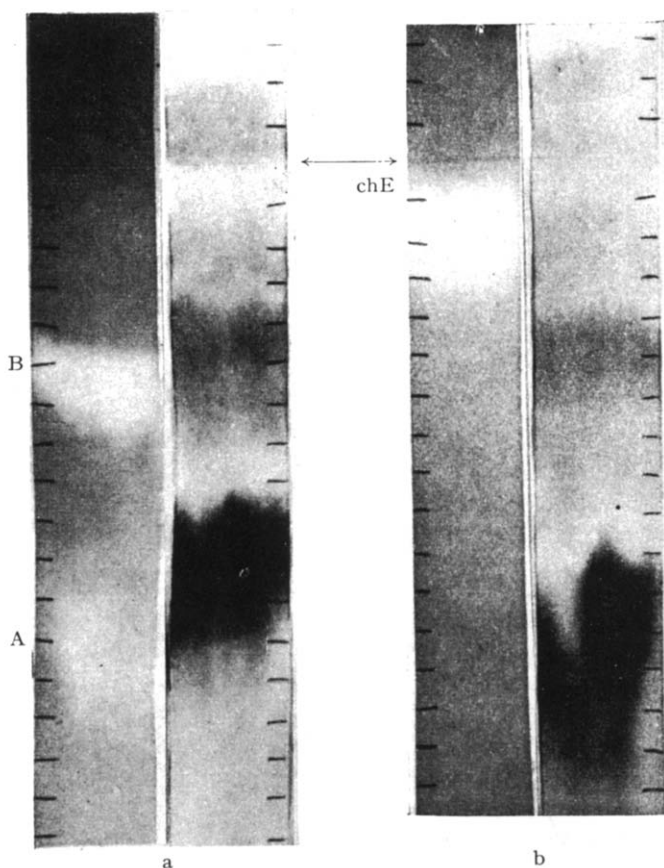


Fig. 2. Electrophorèse sur papier filtre de deux échantillons du même sérum de cobaye, en tampon véronal de pH 8.6. Au niveau de la flèche, départ. Graduation en centimètres. a. La moitié gauche de la bande a été déposée sur une plaque d'agar imprégnée d'acétate de phényle: les deux estérases A et B sont bien visibles. On a coloré les protéines sur la moitié droite: en bas, les albumines. b. La moitié gauche de la bande se trouve sur une plaque d'agar imprégnée d'acétylcholine: la cholinestérase (chE) est à une tout autre place que les estérases. Les protéines sont révélées sur la moitié droite (de bas en haut: les albumines puis les globulines).

issues de la colonne d'amidon: celles-ci, en effet, sont trop diluées. L'électrophorèse sur papier, par contre, permet de localiser clairement la cholinestérase dans le complexe des globulines γ (Fig. 2b): elle est donc nettement séparée des deux autres estérases.

B. Fixation du DF³²P

A un cobaye adulte, on fait une injection intra-musculaire de 100 μ g par kg de DF³²P ayant une activité de 100 μ c/mg au moment de l'injection. Trois jours après, on procède à l'électrophorèse du sérum sur colonne d'amidon et on mesure l'activité estérasique et la radioactivité des fractions. La présence d'un produit de dégradation du DFP ne modifie pas l'emplacement des estérases; l'estérase B n'est que peu inhibée par la faible dose de DFP injectée. On trouve deux zones de radioactivité (Fig. 1): l'une coïncide étroitement avec l'estérase B, l'autre, de moindre activité, est à un niveau très voisin de celui qu'occupe la cholinestérase après électrophorèse sur papier (Fig. 2b). La seule façon d'observer l'emplacement de la seconde zone de radioactivité par rapport à celui de la cholinestérase est de recourir à l'électrophorèse sur papier du sérum de cobaye injecté de DF³²P. En effet, la dose injectée est faible et comme le sang est prélevé trois jours après l'injection, une certaine régénération de l'enzyme se manifeste déjà si bien qu'on peut le localiser sur une moitié de la bande de papier posée sur une plaque d'agar avec acétylcholine. Sur la seconde moitié de la bande, on promène un compteur G.M. mobile qui est celui décrit par COHEN⁵ et on détermine ainsi la position exacte du second pic de radioactivité: il empiète un peu sur la zone d'activité cholinestérasique, mais sa majeure partie se trouve, par rapport à la ligne de départ, en-deçà de la cholinestérase active. Ces essais ne nous indiquent cependant pas si le DFP se fixe sur une fraction autre que la cholinestérase ou si la radioactivité observée correspond à une partie inhibée de la cholinestérase ayant une motilité électrophorétique moindre que la partie non inhibée. Signalons, cependant, que la motilité électrophorétique de l' α -chymotrypsine inhibée par le DFP est la même que celle de l' α -chymotrypsine seule (BALLS ET JANSEN⁴).

II. Sérum de lapin

Le sérum de lapin hydrolyse l'acétate de phényle dix fois plus rapidement que ne le fait le sérum de cobaye. Il hydrolyse beaucoup plus lentement les esters aliphatiques. Si l'on représente par 1 l'activité estérasique vis-à-vis du butyrate d'éthyle, on aura 1.5 pour l'acétate d'éthyle, 50 pour le butyrate de phényle et 500 à 1000 pour l'acétate de phényle. L'alkylfluorophosphatase du sérum de lapin est également dix fois plus active que celle du sérum de cobaye; son activité cholinestérasique, par contre, est 5 à 10 fois plus faible, par rapport au cobaye.

A. Séparation des estérases

En tampon véronal de pH 8.6, l'électrophorèse sur colonne n'aboutit pas, contrairement à ce qui se passe chez le cobaye, à la séparation des deux estérases A et B, présentes toutes deux dans le sérum de lapin, d'après ALDRIDGE¹. On ne trouve qu'un seul pic d'activité estérasique englobant une partie des albumines et les globulines α_1 (Fig. 3), lorsqu'on emploie l'acétate de phényle comme substrat: l'activité renseignée sur la Fig. 3 est très grande puisqu'elle est développée en 10 min

par 0.02 ml de chaque fraction. L'électrophorèse sur papier donne une localisation identique des estérases dans le même tampon. Nous avons fait aussi des électrophorèses dans les tampons suivants: tampon acétate de pH 5, tampon véronal-acétate (tampon de MICHAELIS¹⁷) de pH 7 et 9. Dans aucun cas nous n'avons pu séparer les deux estérases. Or le pic unique d'activité estérasique correspond certainement au mélange des deux estérases, comme le montre le Tableau II. De $10^{-8}M$ à $10^{-4}M$ de DFP, l'inhibition de l'estérase est pratiquement la même. Ces résultats sont fort semblables à ceux qu'a obtenus ALDRIDGE¹ sur le sérum entier et démontrent la présence de deux estérases différentes dans la zone d'activité estérasique vue sur la Fig. 3: l'une est déjà inhibée par $10^{-8}M$ de DFP, c'est l'estérase B; l'autre, l'estérase A, résiste à toutes les concentrations de DFP employées et est responsable d'environ 85 % de l'activité estérasique totale.

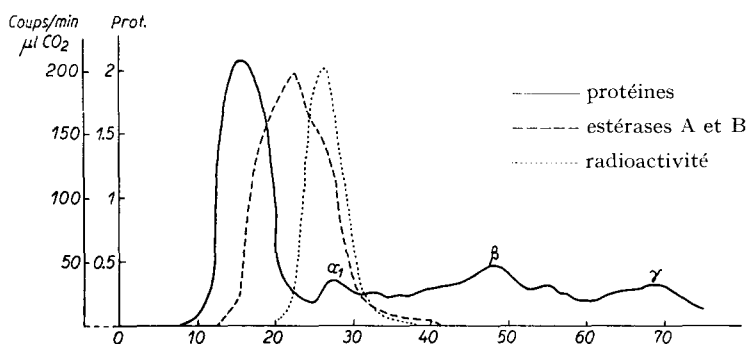


Fig. 3. Electrophorèse de sérum de lapin sur colonne d'amidon, en tampon véronal de pH 8.6, trois jours après injection intra-musculaire de $100 \mu\text{g/kg}$ de DF³²P. En abscisses: numéros des tubes; En ordonnées: de gauche à droite, la radioactivité en coups/min et l'activité estérasique en $\mu\text{l CO}_2$ dégagés en 10 min par 0.02 ml de fraction, à la même échelle; enfin, la teneur en protéines (unités arbitraires). En trait plein, les protéines; de gauche à droite, les albumines puis les différentes globulines.

TABLEAU II

INHIBITION DE LA FRACTION ESTÉRASE OBTENUE APRÈS ÉLECTROPHORÈSE SUR COLONNE DU SÉRUM DE LAPIN, PAR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE DFP

Substrat = acétate de phényle.

Concentration de DFP	Inhibition en %
$10^{-8}M$	14
$10^{-7}M$	10
$10^{-6}M$	8
$10^{-5}M$	9
$10^{-4}M$	12

Chose curieuse, lorsqu'on prend le *butyrate* de phényle comme substrat de chaque fraction après électrophorèse en tampon véronal de pH 8.6, on observe deux pics d'activité estérasique, tous deux inclus dans la zone délimitée au moyen de l'acétate de phényle (Fig. 4). Les résultats de la Fig. 4 ont été vérifiés deux fois; si l'on ne trouve qu'un seul sommet d'activité estérasique avec l'acétate de phényle, c'est peut-être à cause de la trop forte activité des fractions vis-à-vis de ce substrat. Un

substrat beaucoup moins rapidement hydrolysé, comme le butyrate de phényle, révèle la présence de deux estérases qui pourraient coïncider avec les estérases A et B. Nous avons isolé et concentré chacune de ces estérases mais n'avons pas retrouvé, entre elles, des différences aussi frappantes et concluantes que celles qui existent entre les deux estérases du sérum de cobaye (voir plus haut). Le DFP à la concentration de $10^{-5}M$ n'inhibe pas l'estérase portant le no 1 dans la Fig. 4; il abaisse de 10% l'activité de l'estérase no 2. Il n'y a donc certainement pas de séparation totale; tout au plus l'estérase B semble-t-elle prédominer au niveau du sommet no 2 de la courbe

d'hydrolyse du butyrate de phényle par les fractions (Fig. 4). La présence de deux sommets distincts d'activité estérasiq ue suggère que le butyrate de phényle n'est pas un substrat aussi spécifique de l'estérase B chez le lapin, qu'il ne l'est chez le cobaye. On ne peut doser manométriquement ni l'alkylfluorophosphatase ni la cholinestérase des fractions, celles-ci étant trop diluées. Mais on peut les localiser après électrophorèse sur papier: la zone de décoloration de l'indicateur se situe entre les albumines et les globulines α_1 sur une plaque d'agar contenant du DFP, et entre les globulines β et γ sur de l'agar imprégné d'acétylcholine. Bien visible sur la plaque d'agar, cette bande plus claire apparaît cependant mal sur les photographies, par insuffisance de contraste entre elle et le fond coloré; c'est pourquoi nous n'en donnons aucune reproduction. Ici encore, la cholinestérase est bien séparée des estérases.

L'alkylfluorophosphatase est donc située au même niveau que les estérases. D'après MOUNTER¹⁸, elle n'est que l'estérase A elle-même, dans le sérum de lapin. En nous servant de l'estérase isolée par électrophorèse, nous retrouvons des résultats tout-à-fait comparables à ceux que MOUNTER¹⁸ a obtenus sur le sérum entier (Tableau III).

Nous n'avons observé aucun effet de 10^{-4} ml de Lewisite (pour 3 ml de vol. total) sur l'hydrolyse du DFP et de l'acétate de phényle par l'estérase isolée du sérum de lapin. L'inhibition par le *p*-chloromercuribenzoate est totalement réversible par addition de cystéine $10^{-3}M$. Les trois effecteurs, dans le Tableau III, inhibent à des degrés assez semblables l'hydrolyse de l'acétate de phényle et du DFP par l'estérase isolée. Ces arguments renforcent ceux de MOUNTER¹⁸ par le fait qu'ils dérivent d'essais réalisés avec une préparation enzymatique quelque peu purifiée. Jointes au fait que l'estérase A et l'alkylfluorophosphatase ont la même localisation après électrophorèse, ils plaident en faveur de l'identité de ces deux enzymes dans le sérum

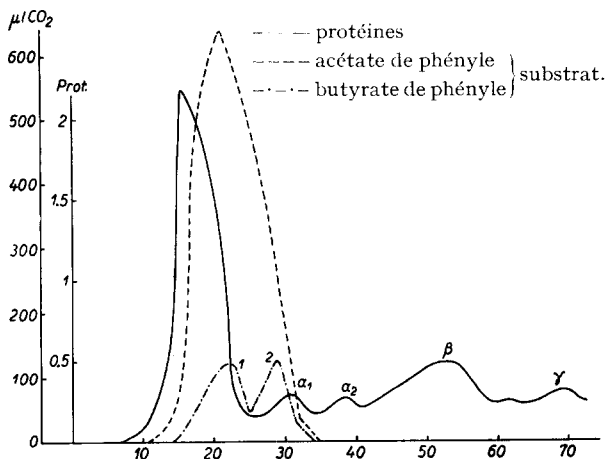


Fig. 4. Electrophorèse de sérum de lapin sur colonne d'amidon, en tampon véronal de pH 8.6. En abscisses: numéros des tubes; En ordonnées, de gauche à droite: l'activité estérasiq ue en μl $CO_2/30$ min, de 0.05 ml de fraction vis-à-vis de l'acétate de phényle, et de 0.3 ml de fraction vis-à-vis du butyrate de phényle; la teneur des fractions en protéines, en unités arbitraires.

TABLEAU III

INHIBITION, PAR QUELQUES EFFECTEURS, DES ACTIVITÉS ESTÉRASIQUE ET FLUOROPHOSPHATASIQUE DE L'ESTÉRISE DU SÉRUM DE LAPIN ISOLÉE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR COLONNE D'AMIDON

Inhibition exprimée en % de l'hydrolyse normale.

Effecteur	Concentr.	Inhib. pour les substrats	
		Acétate de phényle $5 \cdot 10^{-2} M$	DFP $10^{-2} M$
Mn ⁺⁺	$10^{-3} M$	57	49
Mg ⁺⁺	$10^{-2} M$	50	20
<i>p</i> -chloromercuribenzoate	$3 \cdot 10^{-4} M$	100	90

de lapin. Nous avons tiré la même conclusion pour le sérum de cobaye. L'estérase B qui, chez le lapin, contamine l'estérase A dans nos expériences n'intervient certainement pas dans l'hydrolyse du DFP puisqu'elle est déjà inhibée par $10^{-8} M$ de DFP. L'estérase isolée hydrolyse également le *E* 600 ($10^{-2} M$); cela confirme l'opinion d'ALDRIDGE² que l'enzyme qui hydrolyse le *E* 600, dans le sérum de lapin, est l'estérase A.

B. Fixation du $DF^{32}P$

Comme pour le cobaye, on procède à l'injection intra-musculaire, au lapin, de 100 $\mu g/kg$ de $DF^{32}P$ ayant une activité de 100 $\mu c/mg$. Trois jours après, on soumet le sérum à une électrophorèse sur colonne et on détermine l'activité estérasiqne et la radioactivité de chaque fraction. La présence d'un produit de dégradation du DFP ne modifie pas l'emplacement des estérases. On observe une zone unique de radioactivité, incluse dans la zone d'activité estérasiqne; mais les sommets de ces deux zones ne coïncident pas (Fig. 3). La radioactivité est liée à une partie seulement de l'estérase, et précisément avec la portion où, probablement, se trouve l'estérase B, comme nous l'avons vu (Fig. 4). Chez le cobaye, la coïncidence de la radioactivité avec l'estérase B est beaucoup plus nette (Fig. 1).

Contrairement à ce que nous avons observé chez le cobaye, nous ne retrouvons pas de radioactivité au niveau de la cholinestérase, dans le sérum de lapin. On peut en trouver plusieurs raisons. Tout d'abord, le sérum de lapin a une activité cholinestérasiqne dix fois moindre que celle du sérum de cobaye. Ensuite, la dose de DFP injectée est faible, et on sait, d'après les travaux de JANDORF ET McNAMARA¹⁵, que déjà un jour après une injection intra-veineuse de $DF^{32}P$ au lapin, il ne reste qu'une très faible radioactivité dans le plasma.

DISCUSSION

La séparation par électrophorèse des deux estérases du sérum de cobaye et leur correspondance avec les deux types différents d'estérase, A et B, décrits par ALDRIDGE¹ constitue une confirmation certaine des expériences de cet auteur. L'estérase B est inhibée à 90% par des concentrations de $10^{-8} M$ de DFP; l'estérase A résiste à des concentrations dix mille fois plus fortes de DFP. En isolant chaque estérase, on peut aussi leur reconnaître des propriétés qu'il est malaisé de déceler sur le sérum entier. ALDRIDGE¹ avait constaté qu'en général l'estérase A hydrolysait les esters acétates

plus rapidement que les esters butyrates. En isolant l'estérase A du sérum de cobaye, nous avons remarqué qu'elle n'hydrolyse même pas du tout le butyrate de phényle. La cholinestérase est nettement séparée des deux estérases, chez le cobaye comme chez le lapin: on peut donc analyser celles-ci avec la certitude que la première n'intervient pas dans l'hydrolyse observée.

L'électrophorèse sur colonne d'amidon et sur papier nous a fourni un nouvel argument, s'ajoutant à ceux de MOUNTER¹⁸, en faveur de l'identité de l'alkyl-fluorophosphatase et de l'estérase A dans le sérum de lapin: ces deux enzymes ont la même motilité électrophorétique. Faible et, par conséquent, difficile à mettre en évidence, l'activité fluorophosphatasique du sérum de cobaye coïncide également avec l'estérase A.

L'étude rapide de la fixation du DF³²P par le sérum, exposée dans ce travail, est loin d'être une analyse du métabolisme du DFP injecté: celle-ci a été faite chez l'homme par COHEN ET WARRINGA⁷ et chez le lapin par JANDORF ET McNAMARA¹⁵. Elle ne prétend pas non plus éclaircir le mode d'action du DFP dans l'organisme. S'il est vrai, comme nous l'avons montré, que la majeure partie du DF³²P injecté se fixe, dans le sérum de lapin et de cobaye, ailleurs que sur la cholinestérase, cela ne signifie nullement que l'inhibition de la cholinestérase ne puisse pas être le principal responsable de la toxicité du DFP. Mais cela indique l'existence d'une sorte de protection de la cholinestérase par la présence d'autres protéines capables de fixer le DFP. Autre exemple: MYERS²⁰ a trouvé qu'en excluant, par inhibition, l'aliestérase du sérum de rat, on diminue considérablement la concentration de DFP nécessaire pour inhiber la pseudocholinestérase. Chez le cobaye et peut-être aussi chez le lapin, c'est également une aliestérase sérique, l'estérase B, qui fixe la majeure partie du DFP; le reste est attaché très probablement à la cholinestérase chez le cobaye, mais chez le lapin il échappe à l'observation en raison de la faiblesse de l'activité cholinestérasi-que du sérum de cet animal et de la petitesse de la dose de DFP injectée. C'est encore avec une aliestérase plus qu'avec la cholinestérase vraie que se combine le DFP dans le stroma des globules rouges du boeuf (COHEN et coll.⁶). La fixation du DFP sur des protéines aspécifiques a été décrite également par HOBBERGER¹³ et par JANDORF ET McNAMARA¹⁵. Elle a une ampleur telle que, d'après ces deux derniers auteurs, il n'y a aucune relation entre la teneur en cholinestérase des tissus du lapin et leur capacité de fixer le DFP: après injection de DF³²P, on peut trouver une forte radioactivité dans les poumons et les reins du lapin, où la cholinestérase ne joue pas un grand rôle, alors qu'on en trouve très peu dans le cerveau qui ne peut se passer de cholinestérase. Mais il ne suffit pas de rapporter au poids du tissu le DFP fixé, car une constatation bien plus importante, faite d'ailleurs par JANDORF ET McNAMARA¹⁴ eux-mêmes, est que, dans le cerveau de lapin, la cholinestérase est probablement la seule protéine à fixer le DFP, ce qui jette une lumière singulièrement vive sur les mécanismes possibles de la toxicité de ce gaz "nerveux".

Nos expériences ne résolvent pas entièrement la question de l'existence d'une liaison entre le DFP et la fluorophosphatase. En tout cas, trois jours après injection de DF³²P, nous ne retrouvons aucune radioactivité au niveau de l'estérase A — qui est identique à la fluorophosphatase — chez le cobaye ni, très probablement, chez le lapin. Cette liaison, si elle existe, est labile et pourrait être de même nature que celle qui unit un enzyme à son substrat. La fluorophosphatase des reins se comporte souvent d'une autre façon que l'estérase A du sérum (MOUNTER¹⁸) et pourrait se

comporter différemment aussi vis-à-vis du DFP; à notre connaissance, cette question n'a pas encore été résolue.

Le caractère irréversible de la liaison du DFP avec certaines protéines justifie l'emploi du DF^{32}P pour marquer la protéine et déterminer sa durée de vie. COHEN ET WARRINGA⁷ ont pu ainsi mesurer avec précision la demi-vie de la fraction du plasma humain qui contient la pseudocholinestérase (12 à 14 jours), car c'est à cette fraction que se combine la majeure partie du DFP, dans le plasma humain. Mais un pareil essai ne pourrait pas être tenté avec la pseudocholinestérase du sérum de lapin ou de cobaye puisque, dans ces deux sérums, elle ne fixe qu'une petite partie du DFP, comme nous l'avons montré. L'emploi du DF^{32}P a fourni aussi les valeurs les plus précises de la durée de vie des globules rouges humains (116 à 129 jours, d'après COHEN ET WARRINGA⁷): dans ce cas, évidemment, c'est toute une cellule qui est marquée, et il importe peu de connaître la nature exacte des molécules qui y fixent le DFP.

Je remercie vivement Monsieur le Président de l'organisation TNO pour la recherche scientifique appliquée à la défense nationale, de m'avoir permis de séjourner dans le laboratoire de biologie médicale à Rijswijk. Ma gratitude va, tout particulièrement, au Docteur J. A. COHEN pour l'accueil qu'il m'a réservé et les conseils qu'il m'a prodigués.

J'adresse mes remerciements au Docteur MYERS, d'Amsterdam, pour l'aimable envoi d'un échantillon de *E* 600, et à Mademoiselle POSTHUMUS pour son assistance technique.

RÉSUMÉ

1. Les sérums de lapin et de cobaye ont été soumis à l'électrophorèse sur colonne d'amidon et sur papier afin de séparer les estérases et la cholinestérase sériques et de déterminer la nature des protéines sériques sur lesquelles se fixe le ^{32}P après injection intra-musculaire de DF^{32}P . On a utilisé le tampon véronal de pH 8.6.

2. Dans les deux sérums étudiés, la cholinestérase est nettement séparée des estérases et se retrouve au niveau des globulines γ .

3. Chez le cobaye, il existe deux estérases sériques séparées par électrophorèse: l'une est plus rapide que les albumines et correspond à l'estérase A décrite par ALDRIDGE¹; l'autre se trouve entre les globulines α_1 et α_2 et possède les propriétés de l'estérase B.

4. Dans le sérum de lapin, on ne retrouve qu'un seul pic d'activité estérasique correspondant à un mélange des deux estérases A et B.

5. L'estérase A isolée du sérum de cobaye et l'estérase du sérum de lapin hydrolysent le DFP: elles se confondent avec l'alkylfluorophosphatase. Chez le lapin, l'estérase isolée hydrolyse également le *E* 600.

6. Trois jours après injection intra-musculaire de DF^{32}P , la radioactivité se retrouve uniquement au niveau d'une partie de l'activité estérasique (peut-être sur l'estérase B), dans le sérum de lapin. Chez le cobaye, elle se localise en majeure partie sur l'estérase B et, pour une faible part, très probablement sur la cholinestérase.

7. La portée de ces faits est discutée.

SUMMARY

1. Rabbit and guinea-pig sera have been submitted to electrophoresis on starch columns and on filter paper, in order to separate the serum esterases and cholinesterase and to determine the nature of serum proteins which are combined with ^{32}P after intra-muscular injection of DF^{32}P .

2. In both sera, the cholinesterase is completely separated from the esterases and migrates among the γ globulins (in veronal buffer at pH 8.6).

3. In the guinea-pig serum, two esterases are separated on electrophoresis in veronal buffer

at pH 8.6; the first one migrates more rapidly than the albumins and corresponds to the A-esterase described by ALDRIDGE¹; the second one is situated between the α_1 and α_2 globulins and displays the properties of B-esterase.

4. In rabbit serum, only one peak of esterase activity is observed, which consists of a mixture of A and B esterases.

5. The isolated A-esterase of guinea-pig serum and the esterase of rabbit serum hydrolyse DFP and are identical with alkylfluorophosphatase. The isolated esterase of rabbit serum also hydrolyses *E* 600.

6. Three days after intra-muscular injection of DF³²P, the radioactivity is located only in one part of the esterase activity (perhaps on B-esterase) in rabbit serum. In guinea-pig serum, it is located mostly on B-esterase and partly on another protein which is very probably cholinesterase.

7. The implications of these results are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Kaninchen- und Meerschweinchenserum wurden der Elektrophorese auf Stärkekolonnen und auf Papier unterworfen, um die Esterasen und die Cholinesterase des Serums zu trennen und um die Natur der Serumproteine zu bestimmen, in welche ³²P nach intramuskulärer Injektion von DF³²P einverleibt wird. Man benutzte einen Veronalpuffer bei pH 8.6.

2. In beiden untersuchten Serumarten wird die Cholinesterase klar von den Esterasen getrennt und am Niveau der γ -Globuline wiedergefunden.

3. Beim Meerschweinchen kann man durch Elektrophorese zwei Serumesterasen voneinander trennen; die eine ist schneller als die Albumine, entspricht der A-Esterase von ALDRIDGE¹; die andere liegt zwischen den α_1 und α_2 Globulinen und besitzt die Eigenschaften der B-Esterase.

4. Im Kaninchenserum findet man nur einen einzigen Gipfel für die Esteraseaktivität, welcher einer Mischung der beiden Esterasen A und B entspricht.

5. Die aus dem Meerschweinchenserum isolierte A-Esterase und die aus dem Kaninchenserum gewonnene Esterase hydrolysieren DFP: sie fallen mit der Alkylfluorophosphatase zusammen. Die aus Kaninchenserum isolierte Esterase hydrolysiert auch *E* 600.

6. 3 Tage nach der intramuskulären Injektion von DF³²P, findet man die Radioaktivität nur in einem Teil der Esteraseaktivität (vielleicht in der B-Esterase) im Kaninchenserum. Beim Meerschweinchen befindet sich die Radioaktivität hauptsächlich in der B-Esterase und wahrscheinlich, zu einem geringen Teil in der Cholinesterase.

7. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ W. N. ALDRIDGE, *Biochem. J.*, 53 (1953) 110.
- ² W. N. ALDRIDGE, *Biochem. J.*, 53 (1953) 117.
- ³ R. AMMON, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 233 (1933) 486.
- ⁴ H. K. BALLS ET E. F. JANSEN, *Advances in Enzymology*, 13 (1952) 339.
- ⁵ J. A. COHEN, *Chemisch Weekblad*, 49 (1953) 308.
- ⁶ J. A. COHEN, R. A. OOSTERBAAN ET M. G. P. J. WARRINGA, *Arch. intern. physiol.*, 62 (1954) 574.
- ⁷ J. A. COHEN ET M. G. P. J. WARRINGA, *J. Clin. Invest.*, 33 (1954) 459.
- ⁸ E. J. COHN et coll., *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 465.
- ⁹ E. L. DURRUM, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2943.
- ¹⁰ P. FLODIN ET J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 175.
- ¹¹ F. V. FLYNN ET P. DE MAYO, *Lancet*, 161 (1951) 235.
- ¹² K. V. GIRI ET A. L. N. PRASAD, *Nature*, 167 (1951) 859.
- ¹³ F. HOBBIER, *Brit. J. Pharmacol.*, 6 (1951) 21.
- ¹⁴ B. J. JANDORF ET P. D. MCNAMARA, *Federation Proc.*, 8 (1949) 210.
- ¹⁵ B. J. JANDORF ET P. D. MCNAMARA, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 98 (1950) 77.
- ¹⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ¹⁷ L. MICHAELIS, *Biochem. Z.*, 234 (1931) 139.
- ¹⁸ L. A. MOUNTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 813.
- ¹⁹ L. A. MOUNTER ET V. P. WHITTAKER, *Biochem. J.*, 54 (1953) 551.
- ²⁰ D. K. MYERS, *Science*, 115 (1952) 568.

Reçu le 20 juillet 1955