

REFERENCES

- ¹ L. D. WRIGHT, H. R. SKEGGS AND A. D. WELCH, *Arch. Biochem.*, 6 (1945) 15.
- ² M. SILVERMAN, J. C. KERESZTESY AND G. J. KOVAL, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 53.
- ³ J. S. DINNING, J. T. SIME AND P. L. DAY, *Federation Proc.*, 15 (1956) 549.
- ⁴ S. FUTTERMANN, *Federation Proc.*, 15 (1956) 258.
- ⁵ A. C. BRATTON AND E. K. MARSHALL, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 537.
- ⁶ B. M. BRAGANCA AND U. W. KENKARE, *3rd Congr. Intern. Biochem. Research*, 4 (1955) 26.
- ⁷ B. L. HUTCHINGS, E. L. R. STOKSTAD, J. H. BOOTHE, J. H. MOWAT, C. W. WALLER, R. B. ANGIER, J. SEMB AND Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 705.
- ⁸ H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 461.
- ⁹ U. W. KENKARE AND B. M. BRAGANCA, unpublished data.
- ¹⁰ H. M. KALCKAR, N. O. KJELDGAARD AND H. KLENOW, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 586.
- ¹¹ O. H. LOWRY, O. A. BESSEY AND E. J. CRAWFORD, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 389.
- ¹² E. L. R. STOKSTAD, B. L. HUTCHINGS, J. H. MOWAT, J. H. BOOTHE, C. W. WALLER, R. B. ANGIER, J. SEMB AND Y. SUBBAROW, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 5.
- ¹³ B. KAMAN, *Acta Chem. Scand.*, 2 (1948) 383.
- ¹⁴ M. WEBB, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 212.
- ¹⁵ H. A. KREBS, *The Enzymes*, Vol. II, Part I, Academic Press, Inc., New York, 1951, p. 499.
- ¹⁶ H. M. KALCKAR, N. O. KJELDGAARD AND H. KLENOW, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 771.
- ¹⁷ J. C. VAN METER AND J. J. OLESON, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 91.

Received April 13th, 1957.

INFLUENCE DE L'INJECTION DE PYRIDOXINE SUR LA DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE GLUTAMIQUE ET DE L'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE PAR LE CERVEAU CHEZ LE RAT

CARLO DE MARCO*

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Il est maintenant bien établi que la décarboxylation enzymatique, chez les animaux supérieurs, de l'acide cystéinesulfinique^{1,2,3}, de l'acide cystéique⁴ et de l'acide glutamique^{5,6} implique la participation du phosphate de pyridoxal. Des travaux antérieurs ont montré que, chez le rat² et le lapin⁷, l'activité décarboxylante de broyats de foie vis à vis de l'acide cystéinesulfinique et de l'acide cystéique n'est pas sensiblement accrue par addition, *in vitro*, de phosphate de pyridoxal, ce qui indique que, dans le foie, les systèmes enzymatiques responsables de ces décarboxylations sont pratiquement saturés en coenzyme. Ces travaux ont montré d'autre part que, chez les mêmes animaux^{2,7}, l'activité décarboxylante de broyats de cerveau vis à vis de l'acide cystéinesulfinique, de l'acide cystéique et de l'acide glutamique est au contraire fortement accrue par l'addition, *in vitro*, de phosphate de pyridoxal.

Il a paru utile de rechercher à quoi était due une telle différence entre les systèmes décarboxylants du cerveau et ceux du foie. *A priori*, on pouvait faire deux hypothèses:

* Boursier du Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Adresse actuelle: Istituto di Chimica biologica, Università di Roma, Roma, Italia.

on pouvait imaginer que, les apoenzymes du cerveau étant les mêmes que ceux du foie ou différents, la concentration en coenzyme dans le cerveau soit insuffisante pour assurer la saturation des apoenzymes en coenzyme; dans ce cas, le cerveau serait naturellement déficient en coenzyme et il serait intéressant de savoir ce que devient son fonctionnement chez l'animal ayant reçu un apport massif de vitamine B₆. On pouvait également penser que, dans le cerveau, les systèmes enzymatiques ne sont pas les mêmes que dans le foie, les constantes de dissociation des systèmes apoenzyme-coenzyme étant plus élevées dans le cerveau; dans ce cas, ce dernier fonctionnerait au maximum chez l'animal vivant et le ralentissement de l'activité décarboxylante des broyats correspondrait à une dissociation du coenzyme, dissociation provoquée par la destruction des organisations cellulaires et se manifestant au sein des solutions salines utilisées; il s'agirait ainsi d'une action de dilution s'exerçant au cours de la préparation des extraits enzymatiques.

La question a déjà fait l'objet de quelques investigations: d'après WINGO ET AWAPARA⁸, la sensibilité des broyats de cerveau à l'addition de phosphate de pyridoxal s'expliquerait, au moins en partie, par un phénomène de dilution. D'après ROBERTS⁹, au contraire, aucune action de dilution ne pourrait être mise en évidence, ce qui conduit à penser que, normalement, *in vivo*, le cerveau du rat est loin d'être saturé en coenzyme. Roberts a cherché à accroître l'activité décarboxylante du cerveau vis à vis de l'acide glutamique, chez le rat, en faisant ingérer à l'animal, pendant 11 jours, de la pyridoxine, à la dose de 1 mg par jour. Il n'a pas pu constater de résultat significatif chez les animaux ainsi traités.

Etant donné les incertitudes subsistant sur la raison pour laquelle l'activité des broyats de cerveau peut être augmentée par addition de phosphate de pyridoxal, il a paru utile d'établir de façon plus précise si ce phénomène était dû à une non-saturation réelle du cerveau en coenzyme chez l'animal vivant ou si il était dû à une dilution lors de la préparation des broyats. Dans le présent travail, nous avons tout d'abord montré qu'il s'agissait bien d'une non-saturation *in vivo* du cerveau en coenzyme; nous avons ensuite recherché s'il était possible d'accroître l'activité décarboxylante du cerveau vis à vis de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfinique, chez le rat, en *injectant* à cet animal des quantités élevées de pyridoxine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

Les rats utilisés sont des rats mâles Wistar, de 170 à 200 g, soumis à l'alimentation normale du laboratoire. La pyridoxine (chlorhydrate de pyridoxine, Hoffmann La Roche ou "Becilan" Specia) est injectée par voie sous-cutanée ou intraveineuse en une seule fois, sauf indication autre, à raison de 5 mg dans 1 ml de solution physiologique neutralisée. Les animaux sont sacrifiés* à des temps variables après l'injection. Le cerveau, prélevé aussi rapidement que possible, est broyé avec 2 à 3 fois son poids d'eau distillée dans un broyeur de Potter-Elvehjem; la décarboxylation du substrat étudié est suivie par le dégagement du CO₂, à 35° C, selon la technique classique de Warburg. Le temps maximum entre le prélèvement du cerveau et le début des mesures ne dépasse pas 20 minutes.

On utilise des cellules de Warburg à 2 ampoules latérales; chaque cellule contient 2 ml de suspension de broyat de cerveau, 0.8 ml de solution tampon phosphate 0.25 M (pH 6.8), éventuellement 0.1 ml d'une solution de phosphate de pyridoxal, sel de sodium ("Roche Products") à 1 mg

* Sans avoir été préalablement perfusés: une perfusion eut nécessité, en effet, l'anesthésie de l'animal, et il a paru souhaitable d'éviter tout traitement qui eut risqué d'influencer le métabolisme du cerveau.

par ml, et de l'eau de telle sorte que le volume total final du liquide soit de 3.4 ml. Une ampoule latérale renferme 0.2 ml d'une solution du substrat neutralisé $16 \cdot 10^{-3} M$, et l'autre 0.2 ml d'une solution d'acide sulfurique 5 N. Le tout est sous atmosphère d'azote pur.

Les valeurs de Q_{CO_2} sont calculées à partir de la quantité totale de CO_2 dégagé, mesurée après 60 minutes d'incubation, après acidification du milieu réactionnel, et sans tenir compte du faible dégagement de CO_2 observé dans les broyats de cerveau sans introduction de substrat, ceci pour des raisons déjà expliquées par DAVISON⁸ et que nous avons pu confirmer.

Tenant compte de la possibilité envisagée par DAVISON⁸, que les décarboxylases du cerveau sont des enzymes à groupes -SH, nous avons vérifié si l'activité décarboxylante de broyats de cerveau était sensible ou non à l'introduction de thiols, et ceci en présence ou non de phosphate de pyridoxal. Nous avons utilisé comme thiol le BAL (2,3-dimercaptopropanol) (Specia). Cette substance, à la concentration finale: $3 \cdot 10^{-3} M$, entraîne une inhibition importante de la décarboxylation de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfonique par un broyat de cerveau. Ce fait peut être rapproché d'une part d'une observation de ROBERTS *et al.*⁶ d'après laquelle la cystéine ($1 \cdot 10^{-1} M$) inhibe de 50 % la décarboxylation de l'acide glutamique dans le cerveau du rat, et d'autre part des résultats de BERGERET *et al.*⁷ qui ont montré que la cystéine ($5 \cdot 10^{-3} M$) inhibe d'environ 40 % la décarboxylation de l'acide glutamique, de l'acide cystéinesulfonique et de l'acide cystéique dans le cerveau du lapin, sans doute par combinaison de ce composé avec le phosphate de pyridoxal. Il n'était donc pas possible d'employer ni le BAL, ni la cystéine comme activateurs éventuels des décarboxylases dans le cerveau.

RÉSULTATS

Influence de la quantité de broyat sur la vitesse de décarboxylation de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfonique

Les courbes des Figs. 1 et 2 montrent que les vitesses de décarboxylation de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfonique, en présence ou en absence de phosphate de pyridoxal, sont rigoureusement proportionnelles à la quantité de broyat utilisé. Ce résultat, qui confirme les observations de ROBERTS⁹, montre qu'il ne se manifeste ici aucun effet de dilution. On peut en conclure que la quantité de phosphate de pyridoxal disponible dans le cerveau, *in vivo*, pour le fonctionnement des décarboxylases de cet organe est très inférieure à ce qui serait nécessaire pour que ces enzymes puissent exercer leur activité maximum.

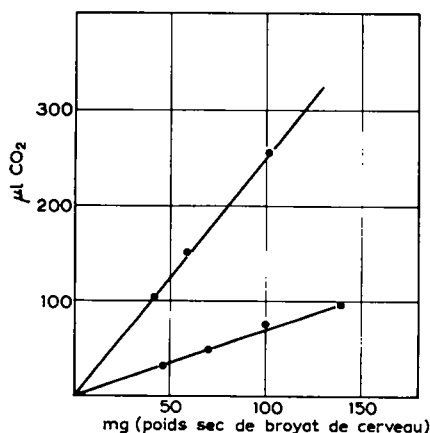


Fig. 1. Influence de la concentration en enzyme sur l'intensité de la décarboxylation de l'acide glutamique.

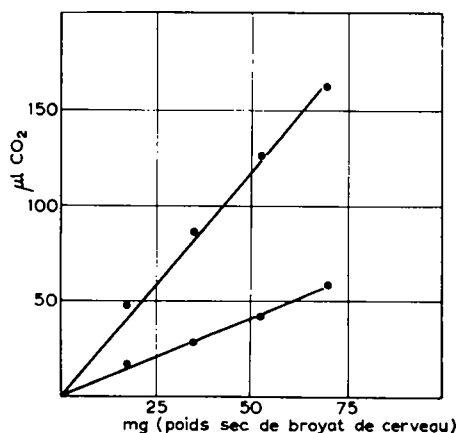


Fig. 2. Influence de la concentration en enzyme sur l'intensité de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfonique.

Influence de l'injection de pyridoxine sur la vitesse de décarboxylation de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfinique

L'influence de l'injection de pyridoxine sur l'activité des décarboxylases du cerveau est étudiée ici en comparant les vitesses de décarboxylation de l'acide glutamique et de l'acide cystéinesulfinique par des broyats de cerveau de rats normaux additionnés ou non *in vitro* de phosphate de pyridoxal, avec les vitesses de décarboxylation des mêmes substrats, dans les mêmes conditions, mais sous l'action de broyats de cerveaux prélevés chez des animaux préalablement injectés de pyridoxine et sacrifiés 2, 6, 24, 48 et 72 heures après cette injection. Les résultats obtenus sont groupés dans les Tableaux I et II.

Les chiffres de ces tableaux permettent de constater qu'il existe des différences significatives entre la vitesse de décarboxylation du cerveau des animaux témoins et des animaux injectés lorsque les animaux sont sacrifiés quelques heures après l'injection; étant donné que les différences obtenues 72 heures après l'injection ne sont plus nettement significatives, nous avons limité nos essais à cette période. Dans tous les cas l'injection intraveineuse conduit à une augmentation de la décarboxylation plus grande et plus rapide; en particulier déjà 2 heures après l'injection intraveineuse, on constate une augmentation de l'ordre de 20 à 30% pour l'un et l'autre substrat. Il n'est pas possible d'obtenir une augmentation plus forte en injectant

TABLEAU I

DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE L-GLUTAMIQUE

RT.1 = Broyat de cerveau de rat témoin + acide glutamique.

RT.2 = Broyat de cerveau de rat témoin + acide glutamique + phosphate de pyridoxal.

A = Broyat de cerveau de rat injecté + acide glutamique.

B = Broyat de cerveau de rat injecté + acide glutamique + phosphate de pyridoxal.

SC = Injection sous-cutanée.

IV = Injection intraveineuse.

T = Temps, en heures, écoulé entre l'injection de pyridoxine et le sacrifice de l'animal.

N = Nombre d'animaux.

Poids sec des broyats de cerveau: 80 à 90 mg.

	RT.1				A				RT.2		B
	5 mg B ₆ SC				5 mg B ₆ IV				5 mg B ₆ SC		
	T	5	22	48	72	2	6	24	48	5	
N	27	16	7	9	6	12	10	5	6	22	16
Q _{CO₂}	0.87	1.11	1.04	1.01	0.97	1.16	1.15	1.12	1.02	2.10	2.20
	± 0.16	± 0.18	± 0.09	± 0.08	± 0.02	± 0.17	± 0.13	± 0.14	± 0.09	± 0.42	± 0.45
t	—	4.68	2.77	2.33	1.53	5.90	5.45	3.80	2.20	—	0.08
g*	—	56	42	44	41	53	48	43	41	—	46
P	—	< 0.01	< 0.01	< 0.02	> 0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	= 0.02	—	> 0.5
% act.	100	127	119	116	111	133	132	129	117	250	251
% act. pot.	39.5	50.5	47.5	46	44	52.7	52	51	46.5	100	100

* Plusieurs essais ont été faits en double.

Bibliographie p. 640.

2 fois 5 mg de pyridoxine à 3 heures d'intervalle et en sacrifiant l'animal 3 heures après la seconde injection. Dans tous les cas, la vitesse de décarboxylation en présence de phosphate de pyridoxal ajouté *in vitro*, est la même pour les animaux normaux et pour les animaux injectés.

TABLEAU II

DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE

RT.1 = Broyat de cerveau de rat témoin + acide cystéinesulfinique.

RT.2 = Broyat de cerveau de rat témoin + acide cystéinesulfinique + phosphate de pyridoxal.

A = Broyat de cerveau de rat injecté + acide cystéinesulfinique.

B = Broyat de cerveau de rat injecté + acide cystéinesulfinique + phosphate de pyridoxal.

(Pour le reste des légendes, cf. Tableau I)

T	RT.1	A							RT.2**	B**
		5 mg B ₆ SC				5 mg B ₆ IV				5 mg B ₆ SC
		5	22	48	72	2	16	48		5
N	15	11	8	9	6	6	4	6	8	10
QCO ₂ *	0.65	0.81	0.82	0.79	0.76	0.79	0.79	0.76	2.41	2.35
	± 0.09	± 0.06	± 0.11	± 0.08	± 0.04	± 0.06	± 0.08	± 0.08	± 0.18	± 0.29
t	—	4.75	3.68	3.68	2.77	3.47	2.65	2.63	—	0.55
g	—	25	22	23	20	21	18	21	—	22
P	—	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.02	< 0.01	< 0.02	< 0.02	—	> 0.5
% act.	100	124	126	122	117	122	122	117		

* Les valeurs de QCO₂ ont été calculées sans soustraire la valeur due à la faible activité propre du cerveau étant donné que, avec du cerveau de rat injecté incubé sans substrat, les rapports restent les mêmes que l'on tienne compte ou non de cette activité propre.

** Les chiffres indiqués dans les colonnes RT.2 et B ont été obtenus avec des animaux n'appartenant pas au même lot que ceux ayant fourni les chiffres indiqués dans le Tableau I et dans les colonnes RT.1 et A du présent tableau.

TABLEAU III

INFLUENCE DU SANG DE RAT INJECTÉ DE VITAMINE B₆ SUR LA DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE GLUTAMIQUE PAR DU BROYAT DE CERVEAU

RT = Broyat de cerveau de rat témoin.

RT + S = Broyat de cerveau de rat témoin + sang du même animal.

RT + Siv. = Broyat de cerveau de rat témoin + sang d'un autre animal ayant reçu par injection intraveineuse 5 mg de vitamine B₆, et sacrifié 2 heures après.

Détails expérimentaux dans le texte.

	RT	RT + S	RT + Siv
QCO ₂	0.64	0.64	0.65

Pour écarter toute possibilité que l'augmentation de la vitesse de décarboxylation mise en évidence n'ait été provoquée par du phosphate de pyridoxal présent initialement dans le sang irrigant le cerveau de l'animal injecté et mis ainsi en contact avec les cellules du cerveau au cours du broyage de cet organe, nous avons recherché si

l'addition du sang d'un rat injecté par voie intraveineuse de pyridoxine ou de phosphate de pyridoxal et sacrifié 2 heures après, augmente la vitesse de décarboxylation de l'acide glutamique. Le volume de sang utilisé a été de 0.02 ml par cellule, ce qui est très supérieur à la quantité de sang présente dans 2 ml de broyat, déterminée par dosage de l'hémoglobine. A titre d'exemple, nous donnons ci-dessous (Tableau III), le résultat d'une expérience. Aucune augmentation de la décarboxylation n'a jamais pu être mise en évidence, ce qui exclut qu'une quantité efficace de phosphate de pyridoxal ait été présente dans le faible volume de sang éventuellement introduit avec le broyat de cerveau.

Remarque

Il n'a pas été possible de constater, par chromatographie sur papier à l'aide du solvant phénol-eau (80:20) de différences appréciables entre les quantités d'acide γ -aminobutyrique contenues dans les filtrats obtenus après déprotéinisation par l'acide trichloracétique des broyats de cerveaux d'animaux témoins et des broyats de cerveaux d'animaux injectés.

CONCLUSIONS

Les résultats du présent travail montrent que dans le cerveau du rat, chez l'animal vivant normal, la quantité de coenzyme (phosphate de pyridoxal) disponible est insuffisante pour que l'activité maximum de l'enzyme ou des enzymes décarboxylant l'acide glutamique et l'acide cystéinesulfinique puisse s'exercer. Après injection chez l'animal, en une seule fois, d'une quantité massive de pyridoxine, on observe une augmentation significative de l'aptitude du cerveau à décarboxyler *in vitro* les acides aminés en question. Toutefois cette augmentation ne dépasse pas 22% de celle obtenue par addition de phosphate de pyridoxal *in vitro*. Il apparaît ainsi que, même en donnant à l'animal des quantités importantes de vitamine B₆, il n'a pas été possible, dans les conditions expérimentales du présent travail, de saturer en coenzyme la ou les apodécarboxylases en jeu.

RÉSUMÉ

La quantité de phosphate de pyridoxal disponible dans le cerveau du rat *in vivo* pour le fonctionnement des décarboxylases de cet organe est très inférieure à ce qui serait nécessaire pour que ces enzymes puissent exercer leur activité maximum. Il est possible d'obtenir une augmentation significative de l'aptitude du cerveau à la décarboxylation en injectant à l'animal une quantité massive de pyridoxine, mais l'augmentation ainsi obtenue n'a pas dépassé, dans les conditions du présent travail, 22 % de celle obtenue par addition de phosphate de pyridoxal *in vitro*.

SUMMARY

The amount of pyridoxal phosphate available in the brain of the rat *in vivo* for the functioning of the decarboxylases of this organ is very much less than that which would be necessary to allow these enzymes to exert their maximum activity. It is possible to obtain a significant increase in the capacity of the brain for decarboxylation by injecting into the animal massive quantities of pyridoxal, but, under the conditions of this work, the increase thus obtained has not exceeded 22 % of that obtained by the addition of pyridoxal phosphate *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. CHATAGNER, H. TABECHIAN ET B. BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 313.
- ² B. BERGERET, F. CHATAGNER ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 128.
- ³ A. N. DAVISON, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 66.
- ⁴ H. BLASCHKO, S. P. DATTA ET H. HARRIS, *Brit. J. Nutrition*, 7 (1953) 364.
- ⁵ E. ROBERTS ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 789.
- ⁶ E. ROBERTS ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 505.
- ⁷ B. BERGERET, F. CHATAGNER ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 329.
- ⁸ W. J. WINGO ET J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 267.
- ⁹ E. ROBERTS, F. YOUNGER ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 277.

Reçu le 12 avril 1957

Short Communications

Some observations on the extra-protein of cross-striated muscle

SZENT-GYÖRGYI *et al.*¹ reported that when glycerated myofibrils are extracted with KCl solutions of high ionic strength with added $MgCl_2$ and ATP or pyrophosphate, myosin passes into solution together with another fraction which is soluble at low ionic strength.

VILLAFRANCA² studied the same fraction further, which he called "Extra-Protein", both in glycerated and fresh myofibrils. He suggested that it is another fibrous protein, which in addition to myosin, actin, and tropomyosin, is leached out of myofibrils when they are treated with any medium suitable for the extraction of myosin. He pointed out that its viscosity is reduced by increasing the ionic strength of the solution, but its intrinsic viscosity is lower than that of tropomyosin under the same conditions. Moreover, it is precipitated almost completely at lower $(NH_4)_2SO_4$ concentrations than tropomyosin.

While studying myofibrillar proteins in vitamin E-deficient rabbits, we also observed that a part of the protein material, which is extracted by concentrated KCl, is soluble at low ionic strength, but our results indicate that it is not a pure protein and that some of its properties differ from those reported by VILLAFRANCA.

The purpose of this note is to give a short account of our observations in normal rabbits, to which the observations in rabbits under pathological conditions will be related.

Myofibrils were prepared from fresh muscle of normal rabbits by the method described by PERRY AND GREY³, slightly modified, and were extracted with high ionic strength buffers (0.5 *M* KCl, 0.04 *M* K phosphate buffer, pH 6.2–8.6; in some cases, 0.01 *M* $Na_2P_2O_7$ and 0.001 *M* $MgCl_2$ were added). The extract was separated by centrifugation at 29000 *g* and dialysed 20–24 hours against 0.0325 *M* KCl containing 0.005 *M* K phosphate buffer pH 7.1; the precipitate was removed by centrifugation, and the supernatant concentrated by suspending it at 0° in a dialysis bag in front of a fan. This protein fraction, which is extracted with myosin and actomyosin and is soluble at low ionic strength, did not exceed 7% of the total myofibrillar protein.

Electrophoresis in the Perkin-Elmer apparatus showed that the extract is a mixture of at least three components (Fig. 1), the relative proportion of which varies according to the conditions of extraction: when the extraction was carried out at lower pH, the fastest component was much increased in relation to the others. This component has the same mobility as tropomyosin; the corresponding peak increases when pure rabbit tropomyosin is added to the solution and no splitting can be detected even after prolonged electrophoresis. The viscosity drop in the mixture, on