

BBA 67213

LA FONCTION METABOLIQUE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE

M. D. MEZINCESCO et STELA GHETIE

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, 8 Bd. Dr. Petru Groza, Bucarest (Roumania)

(Reçu le 6 février, 1974)

SUMMARY

The metabolic function of butylcholinesterase

The effects of feeding butyric acid or tributyrin on the activities of hepatic carboxylic ester hydrolases and on the toxicity of DFP were studied in mice. Diets containing 5 or 7% butyric acid increase the butyrylcholinesterase activity to about 1.2 times the normal. A diet containing 12% tributyrin increases the butyrylcholinesterase activity to about 2.4 times the normal and reduces the acetylcholinesterase activity to about 0.55 times the normal. These changes intervene between the third and the 9th day of regimen. The lipase and aliesterase activities are not modified. After 36 h of tributyrin feeding the DFP toxicity is 1.7 times normal and after 14 days of tributyrin regimen it is only 1.15 times normal. These results are consistent with the concept that butyrylcholinesterase would have the role of hydrolysing butyrylcholine ester, which would be synthesized by choline acetyltransferase concurrently with acetylcholine.

INTRODUCTION

On a suggéré que les tissus qui ont une activité butyrylcholinestérasique synthétiseraient la butyrylcholine et l'enzyme (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8) accomplirait la fonction d'hydrolyser cet ester [1, 2] qui exerce une action nicotinique délétère [3]. Ces tissus formeraient de la butyrylcholine parce que leur choline acetyltransferase (acetyl-CoA:choline *O*-acetyltransferase, EC 2.3.1.6), pas très spécifique [4, 5], activerait non seulement l'acetyl-SCoA mais aussi le butyryl-SCoA qui seraient en compétition pour l'enzyme [1].

La butyrylcholinestérase a une activité catalytique maximum sur la butyrylcholine [6] et certains extraits enzymatiques qui synthétisent l'acetylcholine ont la capacité de synthétiser aussi la butyrylcholine [5]. Cependant la présence de butyrylcholine dans les tissus est problématique [5, 7–11]. En fait, on n'a pas encore essayé d'évaluer ces hypothèses à l'aide d'expériences pertinentes, quoique d'autres hypothèses à ce sujet [5, 12–14] semblent moins plausibles.

Nos expériences concernent les effets de l'administration d'acide butyrique ou de tributyrine sur les activités butyrylcholinestérasique, acetylcholinestérasique et carboxylester-hydrolasique globale du foie, ainsi que sur la toxicité du DFP. Les

expériences ont été faites sur la souris dont la cholinestérase hépatique est une butyrylcholinestérase (Mezincesco, M. D. et Ghetie, S., expériences non publiées). Les résultats sont discutés dans le contexte de l'hypothèse que la résorption d'acide butyrique favoriserait la synthèse de butyrylcholine par le hépatocyte et influencerait ainsi les activités butyrylcholinestérasique et acétylcholinestérasique.

METHODES

On a utilisé des souris mâles de souche suisse. La ration de base comprenait: farine intégrale de blé 38 %, amidon 31 %, caséine 19 %, poudre de lait dégraissée 7 %, son de blé 4 %, mélange salin [15] 1 % et supplément de vitamines [15] 1 g pour 1 kg ration. Dans deux expériences les témoins ont reçu une ration semblable mais qui contenait 8 % citrate sec. d'ammonium. On a administré deux rations comprenant de l'acide butyrique: l'une 5 et l'autre 7 %. L'acide était ajouté après neutralisation avec ammoniaque. La ration avec tributyrine comprenait 12 % de triglycéride. Tous ces ajouts remplaçaient dans la ration de base des quantités égales d'amidon. Les animaux se nourrissaient à volonté.

Au terme d'une expérience le foie de chaque animal était homogénéisé dans 9 vol. (ml/g tissu) d'eau bidistillée. Avant d'être utilisé, l'homogénat était congelé et décongelé trois fois, puis gardé 24 h à +4 °C.

Les activités enzymatiques ont été déterminées par la méthode au hydroxamate [16]. On a utilisé comme substrats: pour la butyrylcholinestérase, la benzoylcholine; et pour l'acétylcholinestérase, l'acétyl- β -méthylcholine. Pour les dosages parallèles d'activité carboxylester-hydrolasique globale et d'activité butyrylcholinestérasique on a utilisé comme substrat la tributyrine et comme inhibiteur de l'activité butyrylcholinestérasique l'ésérine.

Les protéines ont été dosées par la méthode du biuret [17].

On a suivi les variations de la toxicité du DFP en déterminant la DL₅₀ (réf. 18).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau I montre que l'ingestion de rations comprenant 5 ou 7 % d'acide butyrique détermine une augmentation de l'activité butyrylcholinestérasique du foie d'environ 20 %. L'activité de l'acétylcholinestérase n'est pas modifiée. L'augmentation de l'activité butyrylcholinestérasique intervient avant le 10ième jour de régime. La prolongation du régime jusqu'à 20 jours n'entraîne plus de modification. L'ingestion de citrate d'ammonium et (implicitement) celle de NH₄⁺ n'ont aucune influence sur l'activité des deux enzymes.

Les données concernant l'Expérience 4 (Tableau I) et la Fig. 1 montrent que l'ingestion de la ration avec 12 % tributyrine provoque une augmentation d'environ 140 % de l'activité butyrylcholinestérasique et une diminution d'environ 45 % de l'activité acétylcholinestérasique. Ces modifications s'installent graduellement du 4ième au 8ième jour de régime.

Dans toutes les expériences, on n'a pas constaté de différences significatives quant au poids du corps et du foie, et à la teneur du foie en protéines entre les témoins et les animaux des lots expérimentaux. Il s'ensuit que les variations relatives des

TABLEAU I

EFFETS DE L'INGESTION D'ACIDE BUTYRIQUE OU DE TRIBUTYRINE SUR LES ACTIVITES DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE (SUBSTRAT BENZOYLCHOLINE) ET DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (SUBSTRAT ACETYL- β -METHYLCHOLINE) DU FOIE

Excepté celle présentée dans le Tableau III, les expériences ont été conduites comme suit: Des souris mâles de même âge sont nourries avec la ration de base pour adaptation. Après la période d'adaptation les animaux sont répartis en deux lots égaux. Les témoins continuent à recevoir la ration de base. Le lot expérimental reçoit la ration avec acide butyrique ou avec tributyryne. Généralement, les animaux d'un lot témoin provenaient des mêmes portées que ceux du lot expérimental. Nombre des animaux dans chaque lot entre parenthèses. Age initial des animaux: dans Exps 1-3, 28 jours; dans Exp. 4, 35 jours. Période d'adaptation: dans Exps 1-3, 7 jours; dans Exp. 4, 18 jours. Dans Exps 2 et 3 la ration de base contenait du citrate. Durée du régime expérimental: dans Exp. 1 de 10 à 20 jours (après 10 jours de régime on sacrifice chaque jour un animal de chaque lot); dans Exps 2 et 4, 10 jours; dans Exp. 3, 20 jours. Les activités enzymatiques (moyenne \pm E.S.) sont exprimées en μ moles substrat hydrolysé par mg protéines par h.

Exp. No.	Régime	Activité enzymatique	
		Sur benzoylcholine	Sur acetyl- β -méthylcholine
1 (10)	Ration de base	1.62 \pm 0.07	2.61 \pm 0.06
	Ration avec 5% acide butyrique	1.96 \pm 0.09*	2.59 \pm 0.17
2 (12)	Ration de base	1.86 \pm 0.03	2.99 \pm 0.05
	Ration avec 7% acide butyrique	2.18 \pm 0.04**	2.85 \pm 0.07
3 (12)	Ration de base	1.77 \pm 0.04	2.86 \pm 0.06
	Ration avec 7% acide butyrique	2.10 \pm 0.05**	2.76 \pm 0.08
4 (10)	Ration de base	2.01 \pm 0.04	3.78 \pm 0.09
	Ration avec 12% tributyryne	4.81 \pm 0.16**	2.13 \pm 0.08**

* $P < 0.005$.

** $P < 0.0005$.

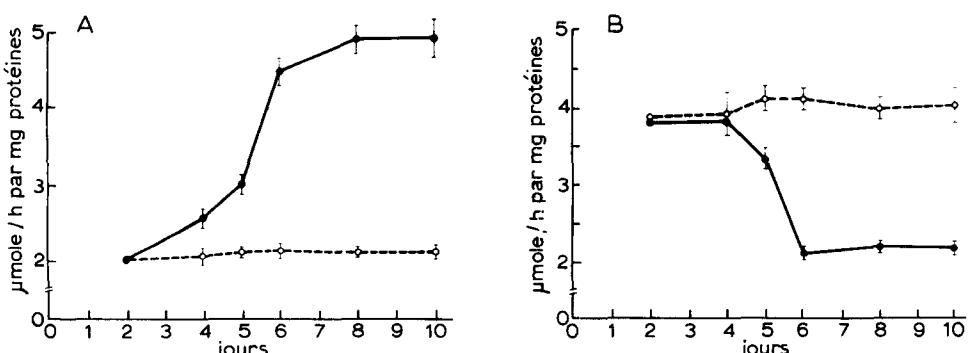


Fig. 1. Evolution des activités butyrylcholinestérasique et acetylcholinestérasique par suite de l'ingestion de tributyryne. Age initial des animaux 35 jours. Durée de l'adaptation 18 jours. Après 2, 4, 5, 6, 8 et 10 jours de régime on sacrifice (chaque fois) 8 souris de chaque lot. ○---○, activités chez les groupes de témoins; ●—●, activités chez les souris au régime avec tributyryne. Barres verticales, E.S. sur les moyennes. A, évolution de l'activité butyrylcholinestérasique. B, évolution de l'activité acetylcholinestérasique.

activités enzymatiques ne changent guère quand on change le terme de référence (tissu frais ou foie total au lieu de protéines).

Des recherches concernant la digestion des lipides chez les mammifères (voir notamment réf. 19) il résulte que la tributyrine est hydrolysée complètement dans le jéjunum, que l'acide butyrique apparu dans la lumière de l'intestin n'est pas estérifié dans les cellules de la muqueuse et que, dans la mesure où celles-ci ne le dégradent pas, l'acide butyrique est transporté par le système porte vers le foie. Dans ces conditions, il paraît indubitable que les variations des activités butyrylcholinestérasique et acétylcholinestérasique sont en relation avec l'accroissement du taux de l'acide butyrique dans les hépatocytes. Or, d'une part, il semble loisible d'admettre que l'augmentation de l'activité butyrylcholinestérasique et la diminution de l'activité acétylcholinestérasique dénotent, respectivement, un accroissement de la synthèse du substrat de la butyrylcholinestérase et une dépression de celle du substrat de l'acétylcholinestérase; d'autre part, les hypothèses que nous nous sommes proposés d'évaluer conduisent à admettre que l'augmentation du taux de l'acide butyrique dans les cellules devrait favoriser la synthèse de butyrylcholine au dépens de celle d'acétylcholine. Par conséquent, les résultats des expériences sont compatibles avec ces hypothèses, à savoir: que le substrat naturel de la butyrylcholinestérase est la butyrylcholine et que celle-ci est synthétisée par suite de la compétition entre le butyryl-SCoA et l'acétyl-SCoA pour la choline acétyltransférase.

Il y a lieu de commenter l'écart entre les effets des régimes avec acide butyrique et avec tributyrine. Il paraît tenir surtout au fait que l'acide butyrique est dégradé considérablement dans la muqueuse [19]. La proportion dans laquelle l'acide est dégradé dépend de sa concentration. Dans un certain domaine elle doit croître exponentiellement avec la concentration. D'autre part la concentration qu'atteint l'acide dépend de la vitesse avec laquelle il est absorbé. D'où l'on déduit que, probablement, l'acide administré sous forme de tributyrine est dégradé dans une moindre proportion que celui ingéré tel quel.

L'utilisation de la tributyrine comme véhicule de l'acide butyrique soulève une difficulté; en effet, le triglycéride est hydrolysé par la butyrylcholinestérase. Certes, l'activité de l'enzyme sur la tributyrine paraît fortuite car elle est négligeable en comparaison avec celle sur la butyrylcholine [20, 21]. D'autre part rien n'autorise à supposer que la tributyrine arriverait au foie. Néanmoins on pourrait croire, à la première vue, que l'administration de tributyrine provoque l'augmentation de l'activité butyrylcholinestérasique parce que la tributyrine est un substrat de l'enzyme.

Les données présentées dans le Tableau II montrent que ce point de vue n'est pas acceptable. On y voit que les lipases et aliestérases du foie sont beaucoup plus actives sur la tributyrine que la butyrylcholinestérase, et que le régime avec tributyrine augmente exclusivement l'activité butyrylcholinestérasique—constatations dont on déduit que l'ingestion de tributyrine ne provoque pas un besoin supplémentaire de capacité hydrolasique sur ce triglycéride.

Le Tableau III concerne les effets du régime avec tributyrine sur la toxicité du DFP, anticholinestérasique qui inhibe surtout la butyrylcholinestérase. (La I_{50} pour la butyrylcholinestérase est inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle pour l'acétylcholinestérase.) Après 36 h de régime avec tributyrine la toxicité du DFP (mesurée par la réciproque de la DL_{50}) est supérieure de 70% à celle pour les témoins; d'autre part le 14ième jour de régime la toxicité ne dépasse plus celle pour les témoins

TABLEAU II

EFFETS DE L'INGESTION DE TRIBUTYRINE SUR L'ACTIVITE CARBOXYLESTER-HYDROLASIQUE GLOBALE ET L'ACTIVITE BUTYRYLCHOLINESTERASIQUE DU FOIE VIS-A-VIS LA TRIBUTYRINE

Age et traitement des animaux comme dans Exp. 4 du Tableau I. Chaque lot comprend 12 souris. La concentration du substrat est $1.62 \cdot 10^{-2}$ M, suffisante pour que les lipases manifestent leur activité maximum. La concentration de lésérine est 10^{-5} M. Activités exprimées comme précédemment.

Régime	Activité enzymatique		
	Globale	En présence de 10^{-5} M ésérine	Inhibée par lésérine*
Ration de base	4.13 ± 0.08	3.47 ± 0.08	0.66 ± 0.04
Ration avec 12% tributyrine	$5.25 \pm 0.11^{**}$	3.66 ± 0.08	$1.59 \pm 0.03^{**}$

* Pratiquement, activité butyrylcholinestérasique.

** $P < 0.0005$.

que d'environ 15%. Au régime avec tributyrine l'augmentation de l'activité butyrylcholinestérasique commence après une période de latence de 2-3 jours et l'activité atteint son niveau maximum (d'état) dans la 8ième journée (Fig. 1). Par conséquent la toxicité du DFP est fortement augmentée quand l'activité butyrylcholinestérasique n'a pas encore commencé à croître et elle est presque normale lorsque l'activité s'est accrue. Dans ces conditions on peut supposer: (1) que les variations de la toxicité sont dues à un déficit initial de butyrylcholinestérase et à sa compensation ultérieure; et (2) que le déficit de butyrylcholinestérase aussi bien que l'augmentation de l'activité de l'enzyme sont dus à la synthèse accrue de butyrylcholine provoquée par la résorption d'acide butyrique.

TABLEAU III

INFLUENCE DE L'INGESTION DE TRIBUTYRINE SUR LA TOXICITE DU DFP

On a utilisé pour chaque expérience 4 lots (A, B, C, D) de 10 souris âgées de 50 à 60 jours et pesant de 18 à 20 g. Une semaine après sevrage les animaux avaient été mis au régime de base. Le premier jour de l'expérience les lots B et D sont mis au régime avec tributyrine. Les lots A et C restent au régime de base. On détermine les DL_{50} de DFP comme suit: pour les lots A et B 36 h, et pour les lots C et D 14 jours après le début de l'expérience. La signification des différences entre les DL_{50} est appréciée à l'aide du test de Wilcoxon appliqué aux séquences de doses qui définissent les DL_{50} .

Exp. No.	DL ₅₀ pour les différents lots d'animaux			
	36 h après le début de l'expérience		14 jours après le début de l'expérience	
	Lot A au régime de base	Lot B au régime avec tributyrine	Lot C au régime de base	Lot D au régime avec tributyrine
1	1.90	1.15*	1.98	1.74**
2	1.90	1.10	1.98	1.66***

* Pour les différences 1.90-1.15 et 1.66-1.15, $P < 0.005$.

** Pour la différence 1.98-1.74, $P > 0.05$.

*** Pour la différence 1.98-1.66, $0.01 < P < 0.05$.

En conclusion, nous retiendrons que les résultats discutés ci-dessus sont cohérents et qu'ils s'accordent avec la conception selon laquelle la butyrylcholinestérase aurait le rôle d'hydrolyser la butyrylcholine que synthétiserait, concurremment avec l'acétylcholine, la choline acétyltransférase. Ces constatations paraissent dignes d'attention. Mais pour qu'elles aient une signification certaine il faudrait que la présence de la butyrylcholine dans l'organisme soit indubitable, ce qui n'est pas le cas. Dans le plus significatif des travaux concernant ce problème [8], on a identifié avec certitude la butyrylcholine dans un homogénat de cerveau où les cholinestérases avaient été inhibées avec éserine et qui avait été gardé 2 h à 37 °C, mais d'un homogénat qu'on n'avait pas éserinisé on n'a pas réussi à isoler l'ester. Ces résultats se prêtent à des interprétations variées. Cependant, de quelque manière qu'ils soient compris, ils suggèrent comme une probabilité sérieuse la présence de butyrylcholine dans l'organisme. Actuellement, à l'aide de méthodes spéciales récentes [22, 23], celle-ci pourrait être reconnue de façon indiscutable, le cas échéant.

RESUME

On a étudié chez la souris les effets de l'ingestion d'acide butyrique ou de tributyrine sur l'activité de carboxyl ester-hydrolases du foie et sur la toxicité du DFP. Des régimes avec 5 ou 7 % acide butyrique augmentent d'environ 20 % l'activité butyrylcholinestérasique. Un régime avec 12 % tributyrine augmente d'environ 140 % l'activité butyrylcholinestérasique et diminue d'environ 45 % l'activité acétylcholinestérasique. Ces modifications s'installent du 4^{ème} au 8^{ème} jour de régime. L'activité des aliestérases et des lipases n'est pas affectée. Après 36 h de régime avec tributyrine la toxicité du DFP est augmentée d'environ 70 % et après 14 jours de régime elle ne dépasse plus que d'environ 15 % sa valeur normale. Ces constatations s'accordent avec la conception suivant laquelle la butyrylcholinestérase aurait le rôle d'hydrolyser la butyrylcholine, ester que la choline acétyltransférase synthétiserait concurremment avec l'acétylcholine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Clitherow, J. W., Mitchard, M. et Harper, N. J. (1963) *Nature* 199, 1000
- 2 Goedde, H. W. et Altland, K. (1967) in *Pseudocholinesterasen: Pharmacogenetik, Biochemie, Klinik* (Goedde, H. W., Doenicke, A. et Altland, K., eds), pp. 1-127, Springer-Verlag, Berlin
- 3 Chang, C. H. et Gaddum, J. H. (1933) *J. Physiol. (London)* 79, 255-285
- 4 Jencks, W. P. (1962) in *The Enzymes*, 2nd edn (Boyer, P. D., Lardy, H. et Myrbäck, K., eds), Vol. 6, pp. 339-361, Academic Press, New York
- 5 Hebb, C. et Morris, D. (1969) in *The Structure and Function of Nervous Tissue* (Bourne, G. H., ed.), Vol. 3, pp. 25-60, Academic Press, New York
- 6 Whittaker, V. P. (1963) in *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie. Ergänzungswerk* (Eichler, O. et Farah, H., eds), Vol. 15, pp. 1-39, Springer-Verlag, Berlin
- 7 Holtz, P. et Schümann, H. J. (1954) *Naturwissenschaften* 41, 306
- 8 Henschler, D. (1956) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 305, 97-104
- 9 Keyl, M. J. (1957) *Thèse de Doctorat*, Université de Cincinnati; d'après réf. 6
- 10 Hosein, E. A., Proulx, P. et Ara, R. (1962) *Biochem. J.* 88, 341-346
- 11 Popov, S. M. et Kovalenko, S. G. (1970) *Vestn. Leningrad Univ., Biol.* 4, 104-111
- 12 Hebb, C. O. et Krnjević, K. (1962) in *Neurochemistry* (Elliot, K. A. C., Page, I. H. et Quastel, J. H., eds) 2nd edn, pp. 452-521, C. C. Thomas, Springfield, Ill.

- 13 Cullumbine, H. (1963) in *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie. Ergänzungswerk* (Eichler, O. et Farah, H., eds), Vol. 15, pp. 505–529, Springer-Verlag, Berlin
- 14 Funnell, H. S. et Oliver, W. T. (1965) *Nature* 208, 689–690
- 15 Mezincesco, M. D. et Popescu-Stefanescu, A. (1962) *Arch. Sci. Physiol.* 16, 245–254
- 16 Augustinsson, K. B. (1957) in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D., ed.), Vol. 5, pp. 1–63, Interscience, New York
- 17 Aldridge, W. N. (1957) *Biochem. J.* 67, 423–430
- 18 Kimball, A. W., Burnett, W. T., Jr. et Doherty, D. G. (1957) *Radiat. Res.* 7, 1–11
- 19 Clément, G. (1964) *J. Physiol. (Paris)* 56, 111–192
- 20 Jansz, H. S. et Cohen, J. A. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 56, 531–537
- 21 Szafran, H. et Szafran, Z. (1963) *Acta Biochim. Pol.* 10, 141–150
- 22 Schmidt, D. E., Szilagyi, P. I. A., Alkon, D. L. et Green, J. P. (1970) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174, 337–345
- 23 Szilagyi, P. I. A., Green, J. P., Brown, O. M. et Margolis, S. (1972) *J. Neurochem.* 19, 2555–2566