

Résumé

Les auteurs ont trouvé que le glycérol active la biosynthèse de la benzylpénicilline obtenue par des cellules lavées de *P. chrysogenum* suspendues dans un tampon de phosphate et d'acétate de phényle. Le lactate, le pyruvate, le citrate, le malate et le succinate n'ont été d'aucun effet. Le dinitrophénol, le cyanide et l'arsénite inhibent la biosynthèse de la pénicilline à un degré variable dans le milieu PA plus glycérol, aux concentrations de 0,0006 M, 0,005 M et 0,005 M respectivement.

Hydrolyse enzymatique de la propionylcholine, de l'acétylthiocholine et de la butyrylthiocholine par le rectus de grenouille

Dans une note antérieure¹, nous avons montré que le rectus de grenouille contient non seulement une acétylcholinestérase (AcChE) mais aussi une pseudocholinestérase (XChE), ces enzymes hydrolysant respectivement l'acétylcholine et la butyrylcholine.

Dans ce travail, nous avons recherché quelles étaient les interventions de ces enzymes dans l'hydrolyse d'autres esters présentant un intérêt physiologique, à savoir, la propionylcholine (PrCh), dont la nature biologique a été démontrée par BANNISTER *et al.*², GARDINER *et al.*³ et les esters acétique (AcThCh) et butyrique (BuThCh) de la thiocholine, largement utilisés, depuis KOELLE et FRIEDENWALD⁴, pour la détection histochimique des «vraies» et «pseudo» cholinestérases.

Nos essais ont été réalisés, avec la méthode manométrique classique de Warburg-Ammon. La technique d'obtention des broyats de rectus, les conditions expérimentales sont celles qui ont été décrites antérieurement. Les concentrations terminales des PrCh, AcThCh et BuThCh étaient de 0,01 M, celle du muscle de 0,2 g par cupule. En raison de la lenteur des hydrolyses, les résultats ont, dans tous les cas, été relevés 120 min après la mise en contact de l'enzyme (inhibé ou non) avec le substrat: on s'est assuré, par des lectures régulières réalisées entre-temps, que le substrat ne s'épuisait dans aucun cas.

Les anticholinestérasiques utilisés sont, comme antérieurement, le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.), inhibiteur sélectif de la XChE et le diiodométhylate de la bis(pipéridinométhyl-coumaranyl-5)cétone (3318 CT), inhibiteur sélectif de l'AcChE.

Les vitesses des hydrolyses enzymatiques sont rapportées dans le Tableau I. La propionylcholine occupe, sous cet aspect, une position intermédiaire entre l'acétylcholine et la butyrylcholine; les esters de thiocholine sont hydrolysés plus rapidement que les esters correspondants de la choline.

Ce même tableau montre que les C I 50 obtenues pour le D.F.P. et le 3318 CT permettent de rapprocher d'une part la PrCh et l'AcThCh de l'AcCh, et d'autre part, la BuThCh de la BuCh. Il apparaît ainsi que la PrCh et l'AcThCh sont, de façon prédominante tout au moins, hydrolysées par l'acétylcholinestérase et la BuThCh par la X cholinestérase.

Tableau I

Inhibitions des hydrolyses enzymatiques d'esters de la choline et de la thiocholine par le DFP et le 3318 CT

Esters		Hydrolyses enzymatiques*	Concentrations (M) inhibitrices 50%	
Nature	Concentrations		D. F. P.	3318 CT
AcCh . .	0,01 M	48,1 ± 16,2**	1,3 · 10 ⁻⁵	3 · 10 ⁻⁷
PrCh . .	0,01 M	24,1 ± 2,6	1,1 · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻⁶
AcThCh .	0,01 M	67,1 ± 10,4	3 · 10 ⁻⁵	2 · 10 ⁻⁶
BuCh . .	0,03 M	13,4 ± 3,2	3 · 10 ⁻⁹	3 · 10 ⁻⁴
BuThCh .	0,01 M	22,3 ± 3,2	6 · 10 ⁻⁹	2 · 10 ⁻³

* En mm³ CO₂ h/0,1 g muscle. ** Déviation standard.

Toutefois, quelques écarts des C I 50 et surtout l'analyse des courbes d'inhibition en fonction de la concentration des inhibiteurs montrent que les hydrolyses de la PrCh, de l'AcThCh et de la BuThCh ne peuvent pas être attribuées à un seul enzyme.

Les courbes d'inhibition par le D.F.P. (Fig. 1) sont les plus démonstratives.

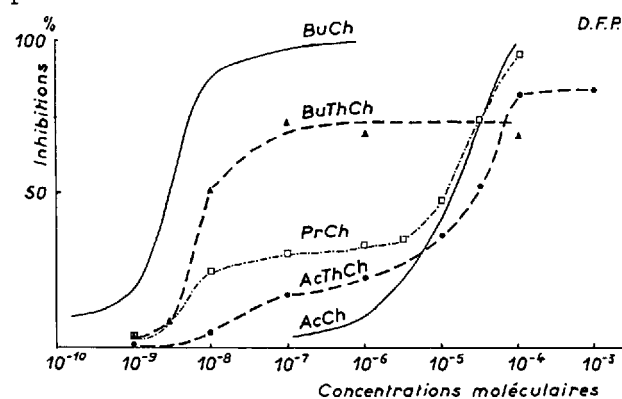


Fig. 1. Inhibition des hydrolyses des esters de choline et de thiocholine par le D.F.P.

En ordonnées: Inhibition en %.

En abscisses: Concentrations moléculaires de D.F.P.

□ --- □ PrCh ● --- ● AcThCh ▲ --- ▲ BuThCh
Chaque point est la moyenne d'au moins deux essais distincts réalisés chaque fois en duplicata. Les courbes de l'AcCh et de la BuCh sont empruntées au travail antérieur.

Pour la propionylcholine, la courbe se décompose très nettement en deux parties séparées par un long palier: dans la première partie, l'inhibition atteint jusqu'à 30% par l'effet de concentrations de D.F.P. ($1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$) qui n'influencent pas l'hydrolyse de l'AcCh mais inhibent celles de la BuCh jusqu'à 95–100%; la seconde partie, commençant pour 1 à $3 \cdot 10^{-6}$, est par contre très voisine de la courbe de l'AcCh; le palier intermédiaire correspond à une zone de concentrations où l'inhibition de la BuCh est maximale et où celle de l'AcCh débute à peine.

On ne peut donc s'empêcher de conclure que 30% de l'hydrolyse enzymatique de la PrCh sont en réalité assurés par la XChE.

Pour l'acétylthiocholine, la courbe se décompose de façon similaire, indiquant que la XChE intervient pour environ 15% de l'hydrolyse de cet ester.

Pour la butyrylthiocholine, aucun accident de la courbe ne permet de penser que l'AcChE interviendrait – en plus de la XChE – dans son hydrolyse.

¹ J. JACOB et M. DECHAVASSINE, Exper. 12, 434 (1956).

² J. BANNISTER, V. P. WHITTAKER et S. WIJESUNDERA, J. Physiol. 121, 55 (1953).

³ J. E. GARDINER et V. P. WHITTAKER, Biochem. J. 58, 24 (1954).

⁴ G. B. KOELLE et J. S. FRIEDENWALD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 70, 617 (1949).

En outre, pour les deux esters de la thiocholine, on constate que les courbes plafonnent pour des inhibitions nettement incomplètes: en d'autres termes les concentrations très élevées de D.F.P. – qui inhibent totalement les hydrolyses des esters correspondants de la choline – laissent persister une activité enzymatique de 15% environ dans le cas de l'AcThCh et de 30% environ dans celui de la BuThCh. Ce phénomène avait été signalé par KOELLE⁵ dans le cas d'autres extraits tissulaires; il est le plus simplement interprété, à la suite de cet auteur et de SACHS⁶, par l'existence de thioestérases, résistantes au D.F.P.

Dans l'ensemble ces diverses conclusions sont confirmées par la contre-épreuve réalisée avec le 3318 CT.

Les courbes d'inhibition obtenues avec le 3318 CT présentent cependant des difficultés d'interprétation liées aux propriétés de cet agent.

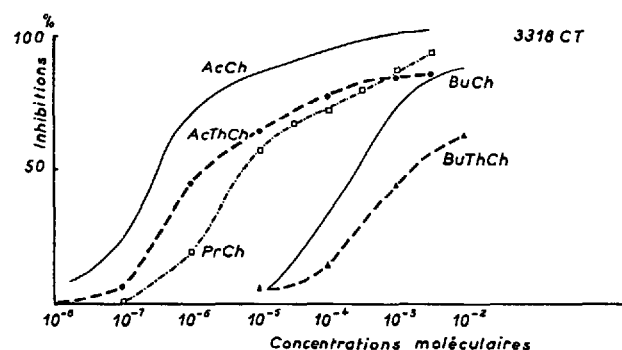


Fig. 2. Inhibition des hydrolyses des esters de choline et de thiocholine par le 3318 CT.

En ordonnées: Inhibition en %.

En abscisses: Concentrations moléculaires de 3318 CT.

□, ---, □ PrCh ● --- ● AcThCh ▲ --- ▲ BuThCh
Chaque point est la moyenne d'au moins deux essais distincts réalisés chaque fois en duplicata. Les courbes de l'AcCh et de la BuCh sont empruntées au travail antérieur.

a) Le 3318 CT a une sélectivité antiAcChE moins développée que la sélectivité antiXChE du D.F.P. (JACOB et DECHAVASSINE¹): les portions de courbes correspondant à l'un et l'autre enzyme sont donc moins distinctes; le palier qui les sépare fait place à une zone d'inflexion encore nette dans le cas de la *propionylcholine* dont on vérifie qu'elle est hydrolysée à raison d'environ 70% par l'AcChE et d'environ 30% par la XChE. Dans le cas de l'AcThCh, cette zone n'apparaît pas clairement, probablement parce que, comme nous l'avons vu, la participation de la XChE est ici de seulement 15%, ce qui serait à la limite du pouvoir de détection d'un tel inhibiteur.

b) Le 3318 CT est un inhibiteur hautement réversible (JACOB⁷): les concentrations inhibitrices sélectives sont donc un guide moins fidèle que dans le cas du D.F.P. car elles sont susceptibles d'être modifiées par l'affinité du substrat considéré pour l'enzyme.

c) Le 3318 CT n'inhibe pas complètement la XChE pour des concentrations de 0,3 à $1 \cdot 10^{-2}$ M qui sont les concentrations maximum solubilisables. Pour ces concentrations, il n'en existe pas moins des activités résiduelles beaucoup plus importantes pour les esters de thiocholine que pour les esters correspondants de la choline; ces activités rési-

duelles sont du même ordre de grandeur que dans le cas du D.F.P. et, à notre avis, elles traduisent aussi l'intervention d'enzymes résistant au 3318 CT comme au D.F.P., enzymes qui ne peuvent, dès lors, être considérés comme des cholinestérases.

En somme, il existe dans le rectus de grenouille, une acétylcholinestérase, une Xcholinestérase et une (ou des) thioestérase(s): ces enzymes interviennent dans l'hydrolyse des esters étudiés dans des proportions variables selon le cas (Tableau II).

Tableau II. Interventions des diverses estérases du rectus de grenouille dans l'hydrolyse des esters de choline et thiocholine.

Esters	Concentrations	Hydrolyse (en % de l'hydrolyse enzymatique totale) assurée par		
		AcChE	XChE	autres estérases
AcCh	0,01 M	95-100	(5)**	—
PrCh	0,01 M	65- 70	30	(5)**
AcThCh*	0,01 M	70	15	15
BuCh	0,03 M	0	100	—
BuThCh*	0,01 M	0	70	30

* Si l'on calcule, à partir de nos deux tableaux, les hydrolyses (en mm³ CO₂/h et pour 0,1 g de muscle) de l'AcThCh par l'AcChE et de la BuThCh par la XChE, on obtient des valeurs qui ne diffèrent pas significativement de celles observées pour les esters correspondants de la choline.

** Les valeurs entre parenthèses sont dans les limites des erreurs expérimentales.

Comme pour l'acétylcholine et la propionylcholine¹, les résultats de notre étude enzymatique peuvent être mis en relations étroites avec les caractéristiques de la sensibilisation du rectus décrites antérieurement⁸. En effet, la potentialisation de la contracture par la PrCh était essentiellement liée à une inhibition de l'AcChE, mais sur un muscle traité par le 3318 CT, à concentration convenable, le D.F.P. ou la néostigmine entraînaient un accroissement de la sensibilisation à la PrCh qui plaiderait pour une intervention secondaire de la XChE. Cette intervention n'apparaissait pas dans les essais où le muscle était traité par le seul D.F.P.; la potentialisation de la PrCh était alors superposable à celle de l'AcCh comme le sont les courbes d'inhibition de ces esters dans la région des fortes concentrations en D.F.P.; comme pour l'acétylcholine, il faut donc qu'environ 30% de l'hydrolyse totale de la propionylcholine soient inhibés pour que débute la potentialisation de la contracture.

D'autre part, les résultats obtenus avec les esters de la thiocholine montrent que l'interprétation des images histologiques obtenues avec ces esters ne peut être réalisée qu'avec le concours d'inhibiteurs spécifiques puisque les enzymes (AcChE avec l'AcThCh, XChE avec la BuThCh) que l'on s'efforce de détecter ne rendent pas compte de la totalité mais seulement de 70% de leur hydrolyse par un broyat de muscle. Les 30% restant ne peuvent pas être négligés car on ignore la concentration *in situ* des enzymes responsables.

J. JACOB et M. PÉCOT-DECHAVASSINE

Laboratoire de Pharmacologie, Service de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur, Paris, le 16 juin 1958.

⁵ G. B. KOELLE, J. Pharm. exp. Ther. 114, 167 (1955).

⁶ H. SACHS, H. J. STRECKER et H. WAELSCH, Science 120, 791 (1954).

⁷ J. JACOB, Arch. int. Pharmacodyn. 101, 446 (1955).

⁸ J. JACOB et M. DECHAVASSINE, Exper. 11, 235 (1955).

Summary

The enzymatic hydrolysis of propionylcholine (PrCh), acetylthiocholine (AcThCh), and butyrylthiocholine (BuThCh), by extracts of the muscle rectus abdominis, was determined. Inhibition of this hydrolysis by D.F.P. and 3318 CT [bis(pipéridinométhylcoumaranyl-5)cétone diméthiodide]—utilized over a range of concentrations covering both specific and non-specific concentrations—showed that PrCh is hydrolyzed by an acetylcholinesterase (70%) and an Xcholinesterase (30%), AcThCh by the AcChE (70%), the XChE (15%) and a thioesterase (15%) and BuThCh by the XChE (70%) and a thioesterase (30%).

A Colorimetric Determination of Aminoxy Acids

In the course of preparative work on canaline¹, $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, it became desirable to develop a method for its quantitative determination.

KITAGAWA² observed that canaline gives an orange-red colour with alkaline picrate. This colour reaction (Jaffe's test) was attributed by him to the presence of the free amino-oxy group in the molecule; it is also given by other free α -hydroxylamino compounds.

This qualitative reaction was applied to develop a colorimetric method for the determination of canaline, of amino-oxy-acetic acid, and of hydroxylamine.

A Fisher electrophotometer (AC model) was used at 525 m μ , and curves showing the relation between optical density and concentration were constructed to serve for the quantitative determination of the amino-oxy acids in question.

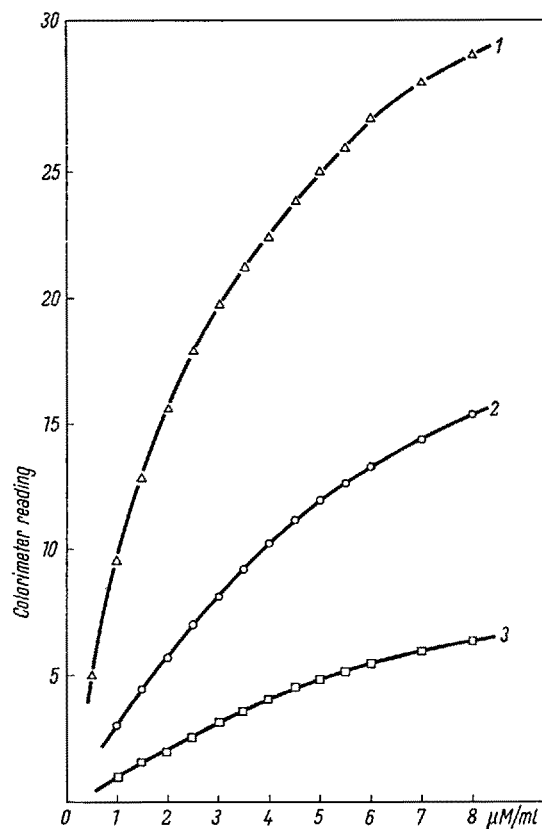
The development of the colour, after addition of saturated aqueous picric acid and 1% sodium hydroxide to the water solution of the amino-oxy compound, is gradual, reaching maximal intensity after 5–10 min. At this point the determination has to be carried out immediately. The best proportionality obtained for canaline was in the range of 1 to 4 micromoles (μM) per ml, for amino-oxy-acetic acid between 1.5 and 5.5 μM per ml, and for hydroxylamine between 0.5 and 3 μM per ml.

Presence of sodium chloride was found to have no appreciable effect on the colorimeter readings, thus allowing estimation of hydrochloric acid salts of the amino-oxy acids. Solutions of the latter, kept for several days, gave very similar curves. The influence of exposure to light was also negligible.

The three curves, showing the relation between optical density of the alkaline picrates of canaline, of amino-oxy-acetic acid, and of hydroxylamine concentrations respectively are given in the Figure.

Calibration.—To 1 ml of the diluted solution containing canaline, amino-oxy acetic acid, or hydroxylamine respectively (final concentration 0.5 to 8 μM per ml) was added 1 ml of saturated aqueous picric acid and then 1 ml of 1% sodium hydroxide and 2 ml of water. After mixing the contents, the tube was allowed to stand for 5 min. After that it was introduced into the Fisher photoelectric colorimeter, equipped with a 525 m μ filter, and compared with the solution which served as the blank control and contained 3 ml of water, 1 ml of saturated aqueous picric acid,

and 1 ml of 1% sodium hydroxide. Further readings were taken after the seventh and ninth minute.



Optical density readings at various concentrations of the amino-oxy compounds.

1: hydroxylamine, 2: canaline, 3: amino-oxy-acetic acid.

Series of colorimeter tubes containing the appropriate amounts of the amino-oxy compound to be determined were set up and compared with the blank control. The average values of the three readings for each concentration, taken at 5, 7, and 9 min respectively, served as basis for the construction of the curves. Crystalline DL-canaline¹ m.p. 190° C, amino-oxy acetic acid hemihydrochloride³ m.p. 154° C, and commercially available pure hydroxylamine hydrochloride (May and Baker, London), were used.

Procedure.—The amino-oxy compound to be determined, diluted to give a final concentration of seven to one half μM , was transferred to the small colorimeter tube, reagent solutions and water were added, and the electrophotometer scale reading determined after comparing with the blank control, all as given under Calibration. The content of the compound was determined by reference to the respective calibration curve.

The authors wish to express their appreciation to Prof. M. FRANKEL for helpful suggestions and advice.

Y. KNOBLER and MARTA WEISS

Department of Organic Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem (Israel), April 30, 1958.

Résumé

Une méthode colorimétrique pour la détermination quantitative des acides oxyaminés basée sur la réaction rouge-orange caractéristique (réaction de Jaffe) a été mise au point.

³ H. S. ANKER and H. T. CLARKE, Org. Synth. col. vol. 3, 172.

¹ Y. KNOBLER and M. FRANKEL, J. chem. Soc. 1958, 1632.

² M. KITAGAWA and A. TAKANI, J. agr. chem. Soc. (Japan) 11, 1077 (1935).