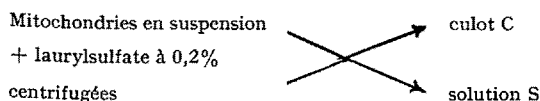


Réactivation des solutions de monoamineoxydase inactivées par dialyse

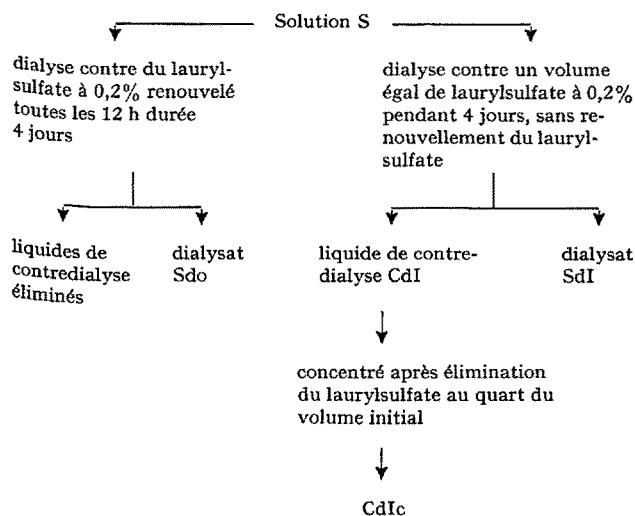
Au cours de travaux précédents, nous avons constaté que des solutions de monoamineoxydase, obtenues par action du laurylsulfate de sodium sur les mitochondries de foie de rat¹, pouvaient être inactivées au moins partiellement, par dialyse. Nous avons donc utilisé cette technique pour essayer de déterminer la nature du métal divalent lié à l'enzyme.

La monoamineoxydase des mitochondries de foie de rat a été solubilisée comme suit:



Les 2 fractions C et S sont toutes deux actives; en comparant les cinétiques des oxydations de la noradrénaline et de la sérotonine catalysées par les mitochondries d'une part, par les fractions C et S d'autre part, on constate (Tableau I) qu'il n'existe aucune différence significative. La composition aminoxydasique de la solution S est donc bien représentative de celle des mitochondries entières.

Influence de la dialyse. La solution S a été dialysée contre une solution de lauryl-sulfate de soude à 0,2%:



Les activités de ces différentes fractions ainsi que de leurs recombinaisons sont rapportées dans le Tableau II.

Bien que le taux de la réactivation obtenue en mélangeant les fractions Sdo et CdIc soit très faible, il est significatif et apporte la preuve de la présence dans le liquide de contredialyse, d'au moins un élément essentiel au fonctionnement de l'enzyme.

Réactivation par des ions métalliques. A une solution inactivée totalement par dialyse, nous avons ajouté les ions métalliques suivants, en effectuant une dialyse inverse: Cu^{++} , Cu^+ , Fe^{+++} , Fe^{++} , Co^{++} , Mn^{++} .

Nous avons dosé la concentration de l'ion métallique à l'équilibre et mesuré l'activité des solutions ainsi traitées (Tableau III). Seul l'ion cuivrique réactive l'enzyme inhibé par dialyse. Il est intéressant de noter que le taux de réactivation est indépendant de la concentration en cuivre, à partir d'une certaine valeur.

Filtration sur tamis moléculaire. Nous avons filtré la solution de monoamineoxydase en laurylsulfate de sodium

sur des colonnes de Séphadex de porosité variable: G 25, G 50, G 75, G 100.

Quelque soit le Séphadex, nous n'avons obtenu qu'une fraction protéique active. Avec les G 25 et G 50, on n'observe aucune perte d'activité. Avec G 75 et G 100, on constate une diminution de l'activité d'environ 50%. Il n'a pas été possible dans ces 2 cas, de restaurer l'activité perdue, ni par addition d'ions cuivriques, ni par addition des diverses fractions d'élution des colonnes: la lenteur de l'élution entraîne vraisemblablement une altération de l'enzyme.

Conclusion. Ces expériences apportent donc bien la preuve que le cuivre est un élément indispensable au

Tableau I. Les mesures de consommation d'oxygène ont été faites par la méthode de CREASY² et le dosage des protéines par la méthode de GORNALL³

Substrat	Sérotonine		Noradrénaline	
	<i>Km</i>	<i>Vm</i>	<i>Km</i>	<i>Vm</i>
Constantes mesurées				
Suspension de mitochondries	5×10^{-4}	0,18	$2,4 \times 10^{-3}$	0,12
Culot C	6×10^{-4}	0,20	$2,5 \times 10^{-3}$	0,12
Solution S	$4,9 \times 10^{-4}$	0,17	2×10^{-3}	0,10

Tableau II. L'activité monoamineoxydasique est exprimée en $\mu\text{l O}_2$ consommé par min et par mg de protéine

Fractions de dialyse	Activité monoamineoxydasique
S	9×10^{-2}
Sdo	0
SdI	$4,75 \times 10^{-2}$
Sdo + CdI	0
SdI + CdI	5×10^{-2}
Sdo + CdIc	1×10^{-2}

Tableau III. L'activité monoamineoxydasique est exprimée en $\mu\text{l O}_2$ consommé par min et par mg de protéine

Concentration de l'ion métallique	Activité amineoxydasique					
	SO_4Mn	SO_4Cu	SO_4Fe	$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	Cl_2Cu_2	SO_4Co
5×10^6	—	$2,5 \times 10^{-2}$	0	—	0	—
$1,8 \times 10^5$	—	$13,25 \times 10^{-2}$	—	0	0	—
$1,1 \times 10^4$	0	12×10^{-2}	0	0	0	0
$2,2 \times 10^4$	0	$11,25 \times 10^{-2}$	—	—	0	0
$3,6 \times 10^4$	—	$12,5 \times 10^{-2}$	—	0	0	—
$1,1 \times 10^3$	0	$12,25 \times 10^{-2}$	0	—	0	0

¹ M. H. COQ et C. BARON, *Experientia* 20, 374 (1964).

² N. H. CREASY, *Biochem. J.* 64, 178 (1956).

³ A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL et N. H. DAVID, *J. biol. Chem.* 177, 751 (1949).

fonctionnement de la monoamineoxydase. Il est indiscutable, en outre, que le cuivre est lié à l'enzyme par des liaisons suffisamment fortes, puisque le métal n'est pas exclus de la lipoprotéine par passage sur Séphadex.

Nos résultats semblent en contradiction avec ceux de NARA⁴ qui indiquait que la dialyse n'inactive pas la monoamineoxydase mitochondriale. Il est vraisemblable que cette contradiction s'explique par le fait que ces auteurs ont utilisé des temps de dialyse trop courts pour permettre une élimination de l'ion métallique.

Summary. The solutions of monoamineoxidase from rat liver mitochondria can be inactivated by a longlasting

dialysis. The addition of cupric ions to these inactive preparations allows a complete reactivation.

H. COQ et C. BARON

Laboratoire de thérapeutique du Centre d'Etudes du Bouchet, Vert-le-Petit (91), et Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Dijon (21), (France), 24 avril 1967.

⁴ S. NARA, B. GOMES et K. T. YASUNOBU, *J. biol. Chem.* **241**, 12 (1966).

The Effect of Uremic Serum on Carbohydrate Metabolism in Rat Diaphragm

There are essential differences of opinions as to whether abnormal carbohydrate metabolism in patients with renal insufficiency is caused by a primary defect of carbohydrate metabolism in the liver or in the peripheral glucose utilization¹⁻⁴. It is evident that liver takes a part¹, but only 1 direct proof of participation of muscle has been presented as yet: the forearm of patients with renal insufficiency takes up glucose to a smaller extent than is the case in healthy persons, if the glucose uptake was stimulated by insulin⁵. Additional data on muscle glucose metabolism and a more convenient model for these studies are presented in this paper.

Methods. Fasting venous blood was obtained from patients with renal insufficiency or from volunteers. After the 30 min standing at room temperature, samples were centrifuged and the sera were immediately used as media for incubation. Under the basal conditions it was not necessary to adjust pH of the serum. In cases, where lactate or α -ketoglutarate were added to the sera, pH was adjusted to 7.4.

Diaphragms: male Wistar rats weighing 150–180 g, last fed 20 h before the experiment, were decapitated, the diaphragm was withdrawn, cut into 4 pieces and randomized with diaphragms of other rats. The samples were immediately put into the cooled serum and incubated in Warburg vessels for 1 h at 37°C in oxygen atmosphere. The diaphragms were weighed after the incubation.

Serum glucose concentrations before and after incubation were determined by the glucose oxidase method, α -ketoglutarate enzymatically both by standard commercial kits (Boehringer). Serum as well as tissue lactate concentrations were determined by the BARKER, SUMMERSON method⁶, glycogen concentration in the diaphragm by the anthrone method⁷ after double precipitation of glycogen by ethanol.

Results. Rat diaphragm incubated in the serum of patients with renal insufficiency utilized in the course of 1 h less glucose than diaphragm incubated in the serum of volunteers (Table). The difference was not conditioned by differences in glycemia which was approximately the same. Oxygen consumption did not change (Table), thus instead of glucose, other metabolic substrates must have been metabolized. Glycogenolysis was therefore measured; while synthesis of glycogen was found in diaphragms incubated in control sera, the diaphragms incubated in uremic sera utilized glycogen (Table). That means that

glycogen served in these conditions as a substrate for energetic metabolism. It should be mentioned that, from the quantitative point of view, glycogen value is low.

Under the conditions mentioned, lactate was released from the diaphragm into the serum. However, the diaphragm released lactate into the uremic serum in a significantly lower amount (Table). If lactate concentration was increased by 20 mE/l, diaphragms incubated in control sera still released lactate, diaphragms incubated in uremic sera took up lactate (Table).

Substrate utilization by diaphragms incubated in serum. Negative values mean synthesis and eventual release of substrate into the serum

Substrate	Added concn- mM/l	Control sera tration	Uremic sera	Difference
Glucose mg/g/h	–	16.7 $\pm$ 6.32 (n = 13)	7.82 $\pm$ 4.25 (n = 13)	P < 0.001
Glycogen mg/g/h	–	–0.310 $\pm$ 0.069 (n = 9)	0.326 $\pm$ 0.035 (n = 8)	P < 0.01
Lactate mg/g/h	–	–2.75 $\pm$ 1.47 (n = 13)	–0.789 $\pm$ 1.45 (n = 17)	P < 0.001
	20	–0.287 $\pm$ 1.60 (n = 10)	1.80 $\pm$ 0.79 (n = 6)	P < 0.05
α -ketoglu- tarate mg/g/h	10	–0.237 $\pm$ 0.138 (n = 6)	0.181 $\pm$ 0.230 (n = 5)	P < 0.01
Oxygen μ l/g d.w./h	–	6.44 $\pm$ 0.54 (n = 15)	6.90 $\pm$ 1.41 (n = 17)	–

¹ B. D. COHEN, *Ann. intern. Med.* **57**, 204 (1962).

² B. F. WESTERVELT JR. and G. E. SCHREINER, *Ann. intern. Med.* **57**, 266 (1962).

³ A. TEUSCHER, *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 69 (1964).

⁴ J. P. O'BRIEN and A. R. SHARPE JR., *Metabolism* **14**, 1294 (1965).

⁵ B. F. WESTERVELT JR., Abstracts, III. Int. Congr. Nephrol., Washington (1966), p. 296.

⁶ S. B. BARKER and W. H. SUMMERSON, *J. biol. Chem.* **138**, 535 (1941).

⁷ D. L. MORRIS, *Science* **107**, 254 (1948).