

Action de quelques catéchines sur l'activité d'un enzyme (la cytochrome-oxydase) de la chaîne respiratoire

Les flavonoïdes se caractérisent à la fois par la multiplicité des effets pharmacologiques et cliniques revendiqués et par un nombre tout aussi important de mécanismes d'action proposés.

Pour cette recherche, nous sommes partis de l'hypothèse que les flavonoïdes participent aux mécanismes de la respiration cellulaire. Les travaux de JENNEY et al.¹, de COTEREAU et al.², et plus récemment de BLANC et al.³ et de DEMOLE et al.⁴ donnaient déjà de premières confirmations.

Dans le désir de disposer d'un modèle de respiration cellulaire plus précis pour suivre l'effet des flavonoïdes sur les enzymes respiratoires, certains auteurs ont utilisé les mitochondries ou les homogénats de foie de rat: BEREZOVSKAIA⁵, OZAWA et al.⁶ et TERAS⁷, et enfin FRITZ-NIGGLI⁸.

Le but de la présente étude est de comparer l'influence sur la cytochrome-oxydase d'un homogénat de foie de rat de deux catéchines et d'un dérivé soluble de l'une d'elles. De plus, comme le plus souvent dans la littérature, nous avons inclus dans cet essai la rutine à titre de flavonoïde témoin.

Matériel et méthode. Pour la détermination de l'activité enzymatique des homogénats de foie, la technique expérimentale de BEREZOVSKAIA⁵ et de UMBREIT⁹ a été suivie.

Nous avons utilisé des rats albinos d'un poids moyen de 250 g, sacrifiés par décapitation. L'homogénéisation du tissu hépatique s'opère à zéro degré, dans du tampon phosphate M/15 pH 7,4, et à l'aide d'un homogénéisateur de Potter-Elvehjem à piston en téflon.

L'activité de la cytochrome-oxydase est déterminée par la méthode manométrique de Warburg⁹. Cette activité est exprimée en μl oxygène consommé en 30 min, pour 0,4 ml d'homogénat à 10%, correspondant à 40 mg de tissu hépatique frais. La période de 30 min choisie se situe toujours entre la 45ème et la 75ème min d'incubation¹⁰.

Composition du milieu d'incubation pour un volume total de 3 ml: 100 μM NaH₂PO₄ ajusté à pH 7,4 par NaOH 2,4 \times 10⁻² M cytochrome c; 1,2 μM AlCl₃; 22,8 μM ascorbate de sodium à pH 7,4 (obtenu en dissolvant 100 mg acide ascorbique dans 5 ml NaOH 0,1148 N). Les flavonoïdes¹¹ à étudier sont ajoutés soit en solutions, soit par pesée directe dans la fiole, à des doses variant de 0,05 mg à 80 mg par fiole.

Résultats. Le Tableau indique pour chaque flavonoïde: a) la valeur de l'activité enzymatique témoin en l'absence de tout produit additionnel; b) les valeurs de l'activité enzymatique pour les différentes concentrations du flavonoïde; c) l'apparition d'un pigment coloré dans certaines fioles d'incubation au moyen de signes conventionnels.

Sur la Figure, on trouve les courbes d'activité des flavonoïdes étudiés sur l'enzyme respiratoire choisi. Afin de rendre ces différentes courbes comparables d'une expérience à l'autre, le témoin a été arbitrairement et uniformément ramené à 100, en lui appliquant un coefficient approprié. Chacune des autres valeurs, obtenues au cours d'une même expérience, est affectée du même coefficient que le témoin correspondant.

Il ressort du Tableau et de la Figure que les 4 flavonoïdes examinés *in vitro* dans ce modèle respiratoire ont une activité distincte sur la cytochrome-oxydase d'un homogénat de foie de rat. Aux doses faibles (jusqu'à 5 mg/ml) les trois catéchines provoquent une forte augmentation de l'activité enzymatique, nettement supérieure à celle enregistrée pour la rutine.

L'augmentation de la dose ne provoque aucun changement notable de l'activité pour la rutine et la (–)-épicatechine. Par contre il y a encore un net accroissement avec

le dérivé soluble avant d'atteindre un palier, tandis que pour la (+)-catéchine il y a une baisse régulière de l'activité enzymatique. A ces doses élevées on ne peut exclure l'influence éventuelle de la solubilité spécifique de chaque produit.

Discussion. Reproductibilité de la méthode. Les flavonoïdes à tester ont été fournis codés. De cette manière, l'un des flavonoïdes a été étudié à trois reprises sous des numéros codes différents. La reproductibilité, d'un essai à l'autre, a été bonne (variation < 5%).

Sensibilité de la méthode. L'examen des résultats montre que les 4 flavonoïdes étudiés ont manifesté à des degrés divers une activité parfois très marquée. Dans le cas le plus favorable la consommation d'oxygène a été augmentée jusqu'à 4 fois.

Classification des différents produits. Il apparaît que chaque flavonoïde peut être défini par deux critères: a) l'allure générale de la courbe, représentative de l'activité enzymatique en fonction de la dose de flavonoïde ajoutée au milieu d'incubation; b) l'activité maximum obtenue pour la dose la plus favorable.

Concentration du flavonoïde en mg/fiole	Consummation d'oxygène en μl pendant 30 min	Rutine 2-sulfonate-Na	
	(+)-catéchine	(+)-épicatechine	(–)-épicatechine
Témoin (sans flavonoïde)	68,2	62,8	65,5
0,05	67,7	64,1	65,0
0,1	66,4	67,4	65,7
0,5	73,9	69,5	70,8
1	90,5 ○	80,8	87,8 ○
5	153,4 ○	150,4 +	130,4 ○
10	190,0 ○	168,6 +	169,1 ○
15	215,2 ○	209,0 +	199,3 ○
20	201,0 ○	244,2 +	181,3 ○
40	114,0 □	260,2 +	174,4 ○
80	70,0	268,3 +	167,9 ○

○, pigment rouge; +, pigment noir; □, pigment orange.

¹ A. V. JENNEY et T. VÁLYI-NAGY, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 191, 423 (1938).

² H. COTEREAU, M. GABE, E. GÉRO et J.-L. PARROT, Nature, Lond. 161, 557 (1948).

³ B. BLANC et M. VONDER MÜHLL, Int. Z. Vitaminf. 37, 156 (1967).

⁴ M. DEMOLE, R. HORN et M. VONDER MÜHLL, Int. Zschr. Vitaminforsch. 37, 496 (1967).

⁵ N. N. BEREZOVSKAIA, Biochemistry 29, 25 (1964).

⁶ H. OZAWA, S. NATORI et K. MOMOSE, Chem. pharm. Bull., Tokyo 13, 1029 (1965).

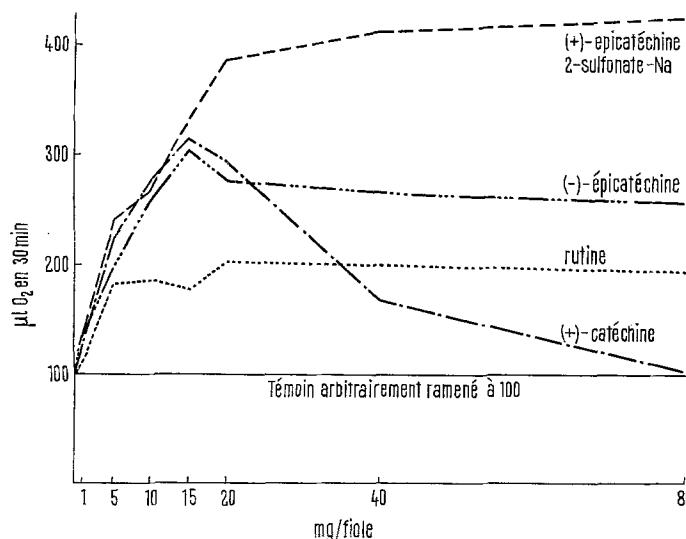
⁷ L. TERAS, Eesti NSV Tead. Akad. Toim. 14, 135 (1965). Estonian.

⁸ H. FRITZ-NIGGLI, Praxis 57, 180 (1968).

⁹ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques*, 4e édn (Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA 1964).

¹⁰ Nous remercions M. J.-P. FLATT, de l'Institut de Biochimie de Lausanne (Prof. H. ISLIKER), pour les précieux conseils lors de la mise en train de la méthode.

¹¹ Les 4 flavonoïdes ont été fournis par Zyma SA, Nyon (CH).



Activité des flavonoïdes étudiés sur l'enzyme respiratoire.

Il est intéressant de noter, en outre, que l'augmentation d'activité enzymatique constatée pour certains produits semble liée à l'apparition d'un pigment coloré, plus ou moins abondant suivant les cas.

Conclusion. Les faits expérimentaux ainsi mis en évidence nous semblent justifier un prolongement de cette étude orienté dans deux directions principales:

1. Tenter d'élucider *in vitro* la relation existante entre le flavonoïde et l'activité enzymatique mitochondriale, et notamment préciser la structure et le rôle du pigment coloré mis en évidence.

2. Confirmer *in vivo* les résultats obtenus en administrant à l'animal les substances à étudier.

Summary. The effect of 4 different flavonoids on the respiratory activity of cytochrome oxidase in rat liver homogenate was measured *in vitro* using the Warburg apparatus. The results show that 3 compounds of the catechin group are especially active.

R. HORN, M. VONDER MÜHLL,
M. COMTE et C. GRANDROQUES

Laboratoire de Pharmacognosie et de
Pharmacie galénique de l'Université,
CH-1211 Genève 4, et Département Science,
Zyma SA, Nyon (Suisse), 14 mai 1970.

Intracellular Localization and Heterogeneity of Alkaline Phosphatase of Yoshida Ascites Sarcoma

Multiplicity in size has been shown for alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase EC 3.1.3.1) from human placenta¹, human serum², rat liver³ and a myeloblastic tumour⁴. A large alkaline phosphatase (excluded from Sephadex G-200) has been reported in serum², and in an animal tumour⁴. This association was further examined in the animal tumour Yoshida ascites sarcoma and the present paper reports the findings of this study.

The tumour, obtained from the Chester Beatty Institute, London, was kept in continuous passage in random bred Wistar rats by the injection of 1.0 ml of ascitic fluid i.p. Rats were sacrificed 7 days after implant, when they yielded 10–20 ml of ascitic fluid, containing 2–4 g of cells (wet weight), per rat. The cells were washed in normal saline, and homogenized in an all glass homogenizer (Potter-Elvehjem) in hypotonic buffer (*Tris* HCl 10 mM pH 7.7). For differential centrifugation the cells were similarly ruptured in normal saline (SCHNEIDER and HOGEBOOM⁵). Then the precipitates were solubilized as follows: a) The nuclear fraction by homogenizing in hypotonic *Tris* HCl (preceded by 2 isotonic saline washes); b) and c) mitochondria and microsome as above; d) the soluble supernatant was left in normal saline.

Gel filtration profiles of the cell fractions were obtained using a 50 × 2 cm column of Sephadex G-200. Alkaline

phosphatase activity was measured using the method described by DUNNE et al.² and is expressed in IU: cytochrome oxidase activity, used as a marker for the differential centrifugation procedure, was measured by the manometric assay of SCHNEIDER and POTTER⁶ and total nitrogen was determined by the micro-Kjeldahl method modified by CONWAY⁷.

Yoshida ascites sarcoma has low alkaline phosphatase activity, 0.01 IU/mg N, as compared with 0.41 IU/mg N for another animal tumour, Shay Chloroma (DUNNE et al.⁴). The cell-free ascitic fluid contained a relatively large amount of enzyme.

¹ N. K. GHOSH and W. H. FISHMAN, Biochem. J. 108, 779 (1968).

² J. DUNNE, J. J. FENNELLY and K. F. McGEENEY, Cancer Philad. 20, 71 (1967).

³ R. KOSCHNITZ, J. PATSCH and M. PETERLIK, Eur. J. Biochem. 5, 51 (1968).

⁴ J. DUNNE, J. J. FENNELLY and K. F. McGEENEY, Biochem. J. 110, 12p (1968).

⁵ W. C. SCHNEIDER and G. H. HOGEBOOM, J. biol. Chem. 183, 123 (1950).

⁶ W. C. SCHNEIDER and V. R. POTTER, J. biol. Chem. 149, 317 (1943).

⁷ E. J. CONWAY, in *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error* (Crosby, Lockwood & Son Ltd., London 1957).