

**Inhibition de la décarboxylation in vitro de la phosphatidylsérine par l'acide 2-aminoéthylphosphonique**

L'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP) a été étudié surtout dans les invertébrés marins et dans les microorganismes<sup>1</sup>. Sa présence dans les lipides cérébraux de bœuf<sup>2</sup> et d'homme<sup>3</sup> et dans les lipides de foie de chien<sup>4</sup> suggère un rôle éventuel de ce composé dans le métabolisme des mammifères. C'est ainsi que l'AEP ajouté au milieu de biosynthèse des phospholipides en présence de coupes de cerveau et de <sup>32</sup>P-orthophosphate n'est pas incorporé sous forme de phosphonolipides, empêche l'utilisation du <sup>32</sup>P dans la synthèse des acides phosphatidiques<sup>5</sup> et accélère l'incorporation de <sup>32</sup>P dans les phosphatidylsérines<sup>6</sup>. Dans le présent travail, nous nous sommes attachés à élucider le mécanisme de l'augmentation de l'activité spécifique des phosphatidylsérines, en étudiant la décarboxylation de la phosphatidylsérine en fonction de la concentration du milieu d'incubation en AEP.

**Matériel et méthodes.** Préparation de la fraction mitochondriale. Un rat Wistar (de 200 à 300 g) est sacrifié par section des vertèbres cervicales; son foie aussitôt prélevé, lavé par du sérum physiologique est découpé en fines lamelles et homogénéisé au Potter dans du saccharose 0,25 M (pH 7,4) à raison de 9 ml/g de tissu frais. Un volume de cet homogénat est mélangé à un volume égal de saccharose 0,34 M (pH 7,4).

On élimine les noyaux et les débris cellulaires par centrifugation à 700 g pendant 10 min. Le surnageant est centrifugé à 5000 g pendant 10 min. Le culot suspendu dans 5 ml de saccharose 0,25 M est centrifugé à 20 000 g pendant 10 min. Cette opération est effectuée une seconde fois. Le culot en suspension dans du saccharose 0,25 M (entre 2,5 et 5 ml) constitue la fraction mitochondriale.

**Préparation des substrats marqués.** <sup>32</sup>P-Phosphatidylsérine: Un rat de 250 à 300 g reçoit une injection s.c. d'une solution isotonique de <sup>32</sup>P-orthophosphate disodique (4 mCi); le rat est sacrifié 15 h plus tard et son foie aussitôt prélevé et homogénéisé à l'ultra Turrax. Après extraction et lavage les lipides sont fractionnés sur colonne d'acide silicique. La fraction CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH:7:3 v/v contenant les lécithines et les céphalines est à nouveau chromatographiée sur colonne d'alumine basique<sup>7</sup>. Les céphalines (fraction CHCl<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH-eau 2:5:2 v/v) sont ensuite séparées sur couche épaisse (2 mm) de silica-gel G<sup>8</sup>. On révèle les composés par autoradiographie. La phosphatidylsérine <sup>32</sup>P est récupérée et éluee par CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 2:1 v/v.

<sup>14</sup>C-Phosphatidylsérine: La <sup>14</sup>C-phosphatidylsérine est marquée in vitro par incubation d'une fraction mitochondriale de foie de rat avec de la L-sérine <sup>14</sup>C (activité spécifique 59 mCi/mM), en présence des cofacteurs suivants<sup>9</sup> tampon *tris* pH 7,4:10<sup>-2</sup>M; tampon phosphate pH 7,4:6,25 × 10<sup>-3</sup>M; α glycérophosphate: 10<sup>-3</sup>M; ATP: 2,5 × 10<sup>-3</sup>M; CMP: 2,5 × 10<sup>-3</sup>M; CaCl<sub>2</sub>: 7,5 × 10<sup>-4</sup>M; MgCl<sub>2</sub>: 10<sup>-3</sup>M; CoASH: 6 × 10<sup>-4</sup>M; glutathion: 2,5 × 10<sup>-3</sup>M. Le volume total est de 4 ml pour une fraction mitochondriale correspondant à 3,4 g de tissu frais. L'incubation dure 30 min sous agitation permanente après laquelle les lipides sont extraits, lavés et séparés sur couche mince (700 μm) de silica-gel H basique<sup>8</sup>.

Après l'identification, la phosphatidylsérine <sup>14</sup>C est récupérée et éluee par CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 2:1 v/v.

**Incubation.** La solution chloroformique de phosphatidylsérine est évaporée à sec sous azote; la phosphatidylsérine est ensuite solubilisée dans 0,2 ml de toluène sous forte agitation et incubée dans le milieu suivant<sup>10</sup>: pyridoxal-phosphate 2 × 10<sup>-3</sup>M; EDTA: 4 × 10<sup>-3</sup>M; AEP: concentration variable selon les essais; la fraction mitochondriale correspond à 0,24 g (expériences avec <sup>32</sup>P-phosphatidylsérine) ou 0,16 g (<sup>14</sup>C-phosphatidylsérine) de

tissu frais pour un volume total de 1 ml. L'incubation dure 60 min (expériences avec <sup>32</sup>P-phosphatidylsérine) et 110 min (<sup>14</sup>C-phosphatidylsérine) sous agitation à 37°C. Dans l'expérience avec la <sup>14</sup>C-phosphatidylsérine, le gaz carbonique formé est entraîné par un courant d'azote et piégé par 1 ml d'une solution éthanol-éthanolamine 1:2 v/v fraîchement préparée<sup>11</sup>. L'ensemble du dispositif utilisé est voisin de celui décrit par BAGGIOLINI et BICKEL<sup>12</sup>.

Tableau I. Incubation de mitochondries de foie de rat en présence de 0,8 μM de <sup>32</sup>P-phosphatidylsérines et de 1,8 et 6,35 μM/ml d'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP)

Concentration en AEP	0	1,8 × 10 <sup>-3</sup> M	6,35 × 10 <sup>-3</sup> M
Phosphatidyléthanolamine	1785	1660	1400
Phosphatidylcholine	95	80	74

Activités spécifiques, exprimées en cpm/μgP.

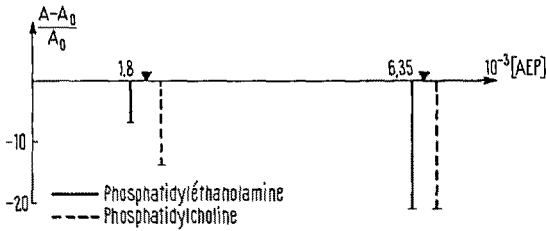


Fig. 1. Variations relatives des activités spécifiques de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine, en fonction de la concentration en AEP.

Tableau II. Décarboxylation de la <sup>14</sup>C phosphatidylsérine

AEP	0	2,5 × 10 <sup>-3</sup> M	5 × 10 <sup>-3</sup> M	7,5 × 10 <sup>-3</sup> M
<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	170	129	96	115

Activité du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dégagé exprimée en cpm.

<sup>1</sup> J. S. KITTREDGE et S. E. ROBERT, *Science* 164, 37 (1969).  
<sup>2</sup> H. SHIMIZU, Y. KAKIMOTO, T. NAKAJIMA, A. KANAZAWA et T. SANO, *Nature*, Lond. 207, 1197 (1965).  
<sup>3</sup> J. A. ALHADEFF et G. D. DAVES JR., *Biochemistry* 9, 4866 (1970).  
<sup>4</sup> M. KANDATSU et M. HORIGUCHI, *Agric. biol. Chem.* 29, 781 (1965).  
<sup>5</sup> R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY, *C. r. Acad. Sci., Paris* 268, 185 (1969).  
<sup>6</sup> R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY, *Bull. Soc. Chim. biol.* 52, 405 (1970).  
<sup>7</sup> J. LLOVERAS et L. DOUSTE-BLAZY, *Bull. Soc. Chim. biol.* 50, 157 (1968).  
<sup>8</sup> V. P. SKIPSKY, R. F. PETERSON et M. BARCLAY, *Biochem. J.* 80, 374 (1964).  
<sup>9</sup> C. HUBSCHER, R. R. DILS et W. F. R. POVER, *Biochim. biophys. Acta* 36, 518, (1965).  
<sup>10</sup> L. F. BORKENHAGEN, E. P. KENNEDY et L. FIELDING, *J. biol. Chem.* 236, PC 28 (1961).  
<sup>11</sup> C. H. WANG, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK; Interscience, New York 1967) 15, p. 311.  
<sup>12</sup> M. BAGGIOLINI et M. H. BICKEL, *Analyt. Biochem.* 14, 290 (1966).

Les lipides sont extraits par la méthode de PAYSANT et al.<sup>13</sup> et lavés par la méthode de Folch-Pi. Les lipides sont chromatographiés sur couche mince (500  $\mu\text{m}$ )<sup>8</sup>. Chaque classe de phospholipides est élue par  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  2:1 v/v. On détermine l'activité par comptage en scintillation sur une partie aliquote et on dose le phosphore sur une autre partie aliquote par la méthode de CHEN<sup>14</sup>.

**Résultats et discussion.** La décarboxylation de la phosphatidylsérine en présence de mitochondries de foie de rat est étudiée par deux séries d'expériences: par détermination de l'activité spécifique de la phosphatidyléthanolamine formée en utilisant un substrat marqué au  $^{32}\text{P}$ , et par mesure de  $^{14}\text{CO}_2$  après incubation de substrat marqué au  $^{14}\text{C}$ .

a) Activité spécifique de la  $^{32}\text{P}$ -phosphatidyléthanolamine formée. L'activité spécifique de la  $^{32}\text{P}$ -phosphatidylsérine mise en réaction est 2760 cpm/ $\mu\text{gP}$ , compte tenu de la phosphatidylsérine propre à la fraction mitochondriale. Les résultats de nos essais sont consignés dans le Tableau I.

Il ressort de l'examen de nos résultats que les teneurs en  $^{32}\text{P}$ -phosphatidyléthanolamine et en  $^{32}\text{P}$ -phosphatidylcholine des milieux d'incubation diminuent en présence d'AEP. Il n'est pas surprenant que l'action de l'AEP s'exerce à la fois sur la biosynthèse de la phosphatidyléthanolamine et sur celle de la phosphatidylcholine, puisqu'au cours de la synthèse des lécithines, la méthylation affecte la molécule de phosphatidyléthanolamine.

Le calcul des variations relatives des activités spécifiques (Figure 1) fait apparaître une diminution de la  $^{32}\text{P}$ -phosphatidyléthanolamine formée, respectivement de 7% et de 21% en présence de 1,8 mM et de 6,3 mM d'AEP. L'apparition de la  $^{32}\text{P}$ -phosphatidylcholine diminue de 14% et de 21%.

b) Mesure de la radioactivité du  $^{14}\text{CO}_2$  formé. L'activité spécifique de la  $^{14}\text{C}$ -phosphatidylsérine (0,4  $\mu\text{M}$ ) mise en

réaction est 27600 cpm/ $\mu\text{M}$ . Nous avons fait 4 essais dont les concentrations en AEP sont de 0–2,5  $\times 10^{-3}\text{M}$ , 5  $\times 10^{-3}\text{M}$  et 7,5  $\times 10^{-3}\text{M}$ . Les chiffres consignés dans le Tableau II rapportent l'activité totale du gaz carbonique dégagé au cours de l'incubation.

Le calcul des variations relatives des formations de  $^{14}\text{CO}_2$  (Figure 2) montre une importante diminution de la décarboxylation en présence d'AEP. Le phénomène atteint un maximum (abaissement de 43%) pour une concentration de 5 mM d'AEP dans le milieu d'incubation. A une concentration de 7,5 mM d'AEP la décarboxylation est diminuée de 32%.

Nos résultats montrent l'inhibition par l'AEP de la réaction de décarboxylation de la phosphatidylsérine en phosphatidyléthanolamine: Phosphatidylsérine  $\rightarrow$  Phosphatidyléthanolamine +  $\text{CO}_2$ . Ils confirment les travaux concernant l'effet de ce composé sur la biosynthèse des phospholipides cérébraux<sup>6</sup>; des incubations de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate en présence de coupes de cerveaux de souris et d'AEP aboutissaient, pour des concentrations en AEP inférieures à 5  $\times 10^{-3}\text{M}$ , à une accumulation de  $^{32}\text{P}$ -phosphatidylsérine et à une diminution des autres phospholipides. Dans l'état actuel de ce travail, il n'est pas possible de préciser le mécanisme de l'inhibition exercée par l'AEP. On peut cependant rapprocher ces phénomènes de l'effet inhibiteur exercé par des phospholipides synthétiques sur les phospholipases A<sup>15</sup> et C<sup>16</sup> et qui démontre l'intervention de ces composés dans le métabolisme des phospholipides.

**Summary.** Diminution of in vitro phosphatidylserine decarboxylation by adding 2 aminoethylphosphonic acid to a mitochondrial suspension of rat liver was observed. When  $^{32}\text{P}$ -phosphatidylserine is used as the labelled substrate, there is a noticeable decrease in the specific activity of  $^{32}\text{P}$ -phosphatidyl-ethanolamine formed; when the labelled substrate is  $^{14}\text{C}$ -phosphatidylserine there is a similar reduction of the amount of  $^{14}\text{CO}_2$  recovered.

R. MAGET-DANA et L. DOUSTE-BLAZY

Laboratoire de Biochimie, Centre Anticancéreux, F-31 Toulouse (France), 8 March 1971.

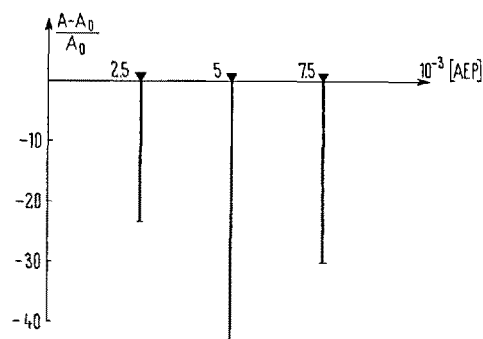


Fig. 2. Variations relatives de l'activité du  $^{14}\text{CO}_2$  formé en fonction de la concentration en AEP.

<sup>13</sup> M. PAYSANT, R. WALD et J. POLONOVSKI, Bull. Soc. Chim. biol. 47, 621 (1965).

<sup>14</sup> P. S. CHEN JR., T. Y. TORIBA et H. WARNER, Analyt. Chem. 28, 1756 (1956).

<sup>15</sup> A. F. ROSENTHAL et S. CHING-HISIEN HAN, Biochim. biophys. Acta 218, 213 (1970).

<sup>16</sup> A. F. ROSENTHAL et M. POUSADA, Biochim. biophys. Acta 164, 226 (1968).

## Inhibition of Angiotensin I Converting Enzyme and Kininase in Rabbit Plasma by Bradykinin Potentiating Peptide B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro)

Several bradykinin potentiating factors have been reported by some investigators<sup>1-10</sup>, and some of these potentiating factors have been shown to have an inhibitory activity on converting enzyme and kininase activity. Recently a new bradykinin potentiating peptide B (BPP), Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro, was isolated from the venom of Agkistrodon, and the amino acid sequence of the peptide was determined by KATO and SUZUKI<sup>11,12</sup>. These reports stimulated us to

investigate the effect of this BPP on kininase and converting enzyme activities in plasma.

**Materials and methods.** The enzyme material was prepared from rabbit plasma by means of ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration according to the purification method of converting enzyme as reported previously<sup>13</sup>. The enzyme preparation had a kininase activity as well as a converting enzyme activity. For