

Les lipides sont extraits par la méthode de PAYSANT et al.¹³ et lavés par la méthode de Folch-Pi. Les lipides sont chromatographiés sur couche mince (500 μm)⁸. 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 CHEN¹⁴.

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}P , et par mesure de $^{14}\text{CO}_2$ après incubation de substrat marqué au ^{14}C .

a) Activité spécifique de la ^{32}P -phosphatidyléthanolamine formée. L'activité spécifique de la ^{32}P -phosphatidylsérine mise en réaction est 2760 cpm/ μgP , 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}P -phosphatidyléthanolamine et en ^{32}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}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}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}C -phosphatidylsérine (0,4 μM) mise en

réaction est 27600 cpm/ μM . 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 + CO_2 . Ils confirment les travaux concernant l'effet de ce composé sur la biosynthèse des phospholipides cérébraux⁶; des incubations de ^{32}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}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 A¹⁵ et C¹⁶ 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}P -phosphatidylserine is used as the labelled substrate, there is a noticeable decrease in the specific activity of ^{32}P -phosphatidyl-ethanolamine formed; when the labelled substrate is ^{14}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.

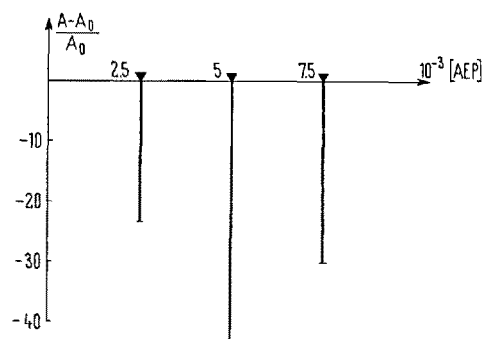


Fig. 2. Variations relatives de l'activité du $^{14}\text{CO}_2$ formé en fonction de la concentration en AEP.

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

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

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

¹⁶ 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 investigators¹⁻¹⁰, 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-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^{11,12}. These reports stimulated us to

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

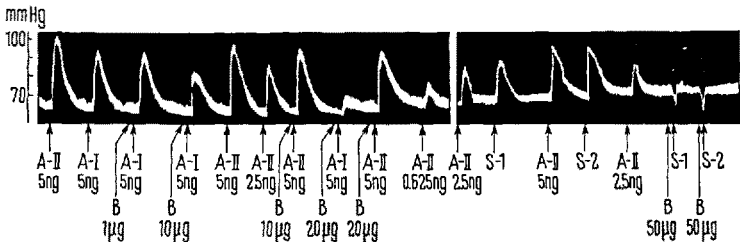
Materials and methods. The enzyme material was prepared from rabbit plasma by means of ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration according to the purification method of converting enzyme as reported previously¹³. The enzyme preparation had a kininase activity as well as a converting enzyme activity. For

the determination of the converting enzyme activity, 6×10^2 pM of synthetic angiotensin I (from the Institute for Protein Research, Osaka University) was incubated for 15 min with 1.3 mg (protein amount) of the enzyme in final volume of 1.2 ml in the presence of 0.9% of NaCl in 0.001 M of phosphate buffer, pH 7.2. The amount of angiotensin II formed was determined by rat uterus assay¹³. For the determination of kininase activity, 6×10^2 pM of synthetic bradykinin (Sandoz) was incubated in the same way as that of converting enzyme.

For the in vivo experiment, the response of the blood pressure in the carotid artery of an anesthetized, pentri-

In vivo experiment. 1 µg of BPP did not change the elevation of blood pressure by a 5 ng angiotensin I injection, 10 µg of BPP diminished the elevation of blood pressure in 50%, 20 µg of BPP almost abolished the elevation of blood pressure, and 50 µg of BPP abolished completely the elevation of blood pressure by angiotensin I injection. The data of bioassay are illustrated in the Figure. These facts suggested that in vivo inhibition of converting enzyme is also shown by BPP.

The final incubation product for human renin activity according to PICKENS et al.¹⁴ was injected to the rat before and after 50 µg of BPP injection, and the pressor



Effects of bradykinin potentiating peptide B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) on rat blood pressure response to angiotensin I and II. A-I, angiotensin I; A-II, angiotensin II; B, bradykinin potentiating peptide; S, samples for human plasma renin activity according to PICKENS' method.

nium-treated and vagotomized Wistar rat was recorded on a kymograph. The response of the blood pressure for angiotensin I was compared before and after the BPP injections (1 µg, 10 µg, 20 µg and 50 µg in 0.1 ml of saline) through the femoral vein.

Results. BPP at a concentration of 10^5 pM did not show any contractile activity on rat uterus and did not show any pressor or depressor activity on rat blood pressure. BPP did not change the sensitivity nor the contractile activity of the uterus for angiotensin I and II, and bradykinin. 50 µg of BPP did not change the pressor response to angiotensin II. 5 µg of BPP potentiated the depressor action of bradykinin.

In vitro experiment. The inhibitory activities of BPP on converting enzyme and kininase in vitro are shown in the Table. BPP at a concentration of 10^5 pM caused a complete inhibition of converting enzyme activity and 80% inhibition of kininase activity. BPP at a concentration of 10^3 pM caused 50% inhibition of converting enzyme activity and 30% inhibition of kininase activity. As regards the behaviour of the enzyme preparation against BPP, no positive results were found for the difference between converting enzyme and kininase.

Inhibitory potencies of bradykinin potentiating peptide B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) on plasma converting enzyme and kininase

Concentration of BPP (pM)	Inhibitory percent of	
	Converting enzyme (%)	Kininase (%)
10^5	95-100	70-80
10^4	80	50-60
10^3	50	20-30
10^2	0-10	0
10^1	0	0

Incubation: angiotensin I (6×10^2 pM), enzyme (1.3 mg of protein) and BPP was incubated in 1.2 ml of 0.001 M phosphate buffer-saline pH 7.2, for 15 min at 37°C.

action of the solution was abolished completely after BPP injection. This fact suggested that the product of renin assay of PICKENS' method was angiotensin I.

Zusammenfassung. Das Bradykinin-potenzierende Peptid B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) verhindert in vitro und in vivo die Aktivität der Plasmakininase und des «converting»-Enzyms.

E. UEDA¹⁵, T. KOKUBU,
H. AKUTSU and Y. YAMAMURA

The Third Department of Medicine,
Osaka University Hospital, Fukushima-ku,
Osaka (Japan), 26 March 1971.

¹ S. H. FERREIRA and M. ROCHA E SILVA, *Biochem. Pharmac.* **11**, 1123 (1962).
² A. J. OSBAHR, J. A. GLADNER and K. LAKI, *Biochim. biophys. Acta* **86**, 535 (1964).
³ J. A. GLADNER, P. A. MURTAUGH, J. E. FOLK and K. LAKI, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 47 (1963).
⁴ P. N. AARSEN, *Br. J. Pharmac.* **32**, 453 (1968).
⁵ U. HAMBERG, P. ELY and P. STELWAGEN, *Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins* (Plenum Press, New York 1968), p. 626.
⁶ K. BULUK and M. MALOFIEJEV, *Br. J. Pharmac.* **35**, 79 (1969).
⁷ S. H. FERREIRA, *Br. J. Pharmac.* **24**, 163 (1965).
⁸ S. H. FERREIRA, L. J. GREENE, V. A. ALABASTER, Y. S. BAKHLE and J. R. VANE, *Nature* **225**, 379 (1970).
⁹ J. W. ALKEN and J. R. VANE, *Nature, Lond.* **228**, 30 (1970).
¹⁰ J. M. STEWART, S. H. FERREIRA and L. J. GREENE, *Biochem. Pharmac.*, in press (1971).
¹¹ H. KATO and T. SUZUKI, *Proc. Japan Acad.* **46**, 176 (1970).
¹² H. KATO and T. SUZUKI, *Experientia* **26**, 1205 (1970).
¹³ E. UEDA, H. AKUTSU, T. KOKUBU and Y. YAMAMURA, *Jap. Circulation J.*, in press (1971).
¹⁴ P. T. PICKENS, F. M. BUMPUS, A. M. LLOYD, R. R. SNEYBY and L. H. PAGE, *Circulation Res.* **17**, 438 (1965).
¹⁵ Acknowledgment. The authors wish to thank Dr. H. KATO of Institute for Protein Research, Osaka University, for his kind supply of BPP. Thanks also Dr. S. SAKAKIBARA of Institute for Protein Research, Osaka University, for his kind supply of synthetic angiotensin I and bradykinin.