

Étude de l'activité de la protocollagène proline hydroxylase de foie d'embryon de Poulet en fonction de l'âge¹

L'hydroxylation enzymatique de la proline peptidique est une étape importante de la synthèse du collagène. Le travail, ici présenté, a été effectué dans le but de suivre l'évolution de la biosynthèse de cette protéine fondamentale au cours du développement embryonnaire. Nous avons mesuré parallèlement l'activité de la GPT dont la concentration hépatique est particulièrement élevée.

Matériel et techniques. L'activité de la protocollagène proline hydroxylase (PPH) est appréciée selon la méthode de HUTTON, TAPPEL et UDENFRIEND² et le protocollagène à proline tritiée utilisé comme substrat est obtenu selon la technique de ces mêmes auteurs avec de la 4 ³H-proline.

Les extraits enzymatiques sont des homogénats de 4 ou 5 foies d'embryons âgés de 10 à 21 jours. L'homogénéisation s'effectue dans un broyeur type Potter-Elvehjem dans du tampon *tris*-maléate 50 mM, KCl 15 mM, Mg Cl₂ 5 mM, pH 7, maintenu à + 4°C.

Le milieu réactionnel d'incubation d'un volume final de 2 ml contient: environ 100 000 dpm ³H; des activateurs en solution dans le tampon *tris*-maléate 50 mM, KCl 15 mM, Mg Cl₂ 5 mM, pH 7 en concentration suivante: Fe⁺⁺ 0,1 mM, acide ascorbique 1 mM, α -cétoglutarate 0,5 mM; de l'homogénat de foie correspondant à 20 mg de tissus frais; dans certaines expériences, du Triton X100 en concentration finale de 10⁻⁴.

L'incubation est poursuivie durant 30 minutes, à 38°C avec agitation constante; des témoins sans enzymes sont traités de la même façon. L'eau tritiée formée, fonction de

l'activité de la PPH, est recueillie par lyophilisation puis mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide et exprimée en dpm par g de tissus frais ou en dpm par mg d'azote.

L'activité de la glutamique pyruvique transaminase (GPT) est mesurée selon la méthode de REITMAN et FRANKEL³ avec et sans Triton X100 (concentration finale 10⁻⁴). Les dosages d'azote ont été effectués selon la méthode colorimétrique de BERTHELOT⁴ après minéralisation et neutralisation.

Résultats et discussion. Le poids du foie évolue au cours du développement embryonnaire; cette variation a été représentée sur le graphique A). Les graphiques B) et C) montrent tout d'abord l'effet du Triton X100 sur l'activité de la PPH (graphique B) et sur l'activité de la GPT (graphique C). Ces résultats mettent en évidence l'influence du Triton X100 sur l'activité de la PPH d'un homogénat de foie. Nous avons vérifié, par ailleurs, que la PPH soluble, présente dans un surnageant d'ultra-centrifugation à 145 000 g, était insensible au Triton dans les conditions d'incubation utilisées. L'augmentation de l'activité enzymatique de l'homogénat en présence de Triton pourrait être due à une homogénéisation insuffisante, mais, à l'encontre de cette hypothèse, il faut remarquer que la GPT est insensible à la présence du Triton. Un détergent comme le Triton semble donc avoir une action sur l'activité de la PPH dans l'homogénat total qui ne se retrouve pas sur l'enzyme soluble ou la transaminase.

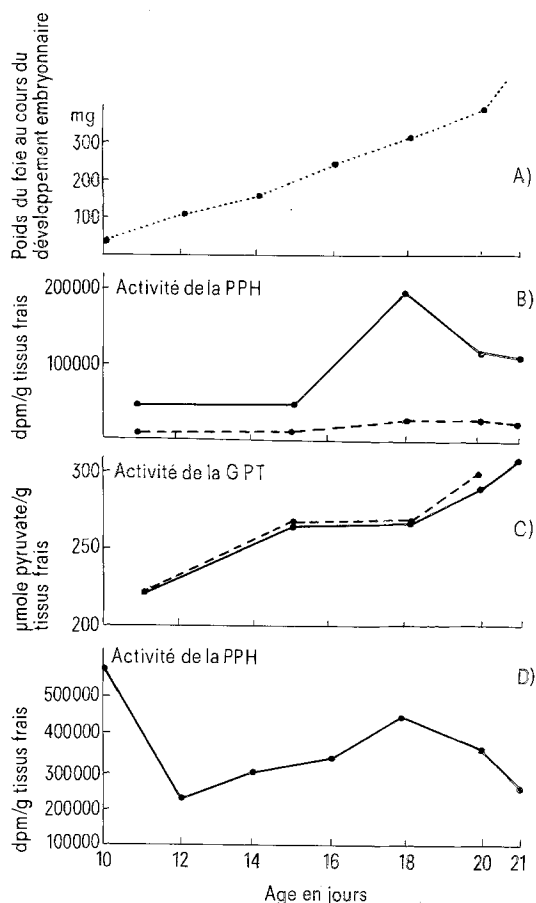
Le quatrième graphique (graphique D) met en évidence un pic d'activité de la PPH au 18^e jour. Cette évolution est comparable à celle publiée par RINAUDO et MARZONA⁵ pour la PPH d'œil et de peau de poulet embryonnaire. On retrouve ce même profil lorsque l'activité est exprimée en dpm par mg d'azote; le taux d'azote par g de tissus frais est, en effet, constant: il est de 34 mg.

Ces données mettent en évidence des résultats suivants: nous pouvons désormais émettre l'hypothèse de la présence, dans le foie, d'une PPH liée à des structures cellulaires; cette enzyme ayant été, jusqu'à présent, considérée comme «soluble»; la présence de la PPH en quantité importante dans le foie nous ouvre des voies intéressantes quant à l'étude du rôle de cette enzyme dans un organe qui contient très peu de collagène; la détermination du pic d'activité spécifique au 18^e jour situe l'âge optimum des embryons pour des études ultérieures.

Summary. In chick embryo liver, there was a peak activity of protocollagen proline hydroxylase (PPH) on the 18th day of the embryonic state. The effect of triton X100 suggested that PPH was a particulate enzyme, in contrary to what has been demonstrated.

GENEVIÈVE HELFRE, J. FARJANEL,
JULIETTE FONVIEILLE et J. FREY

Laboratoire de Biochimie U.E.R. de Médecine,
30, rue Ferdinand Gambon, F-42100 Saint-Etienne
(France), 1 février 1974.



Activité de la PPH et de la GPT. —, en présence de Triton X100; - - -, sans Triton X100.

¹ Travail réalisé grâce à l'aide de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

² J. J. HUTTON, A. L. TAPPEL et S. UDENFRIEND, *Analyt. Biochem.* 76, 384 (1966).

³ S. REITMAN et S. FRANKEL, *Am. J. clin. Path.* 28, 56 (1957).

⁴ M. P. E. BERTHELOT, *Rép. gén. chim. pure appl.* 1, 284 (1859).

⁵ M. T. RINAUDO et M. MARZONA, *Enzymologia* 43, 409 (1972).