

Séparation sur séphadex G 100 de facteurs mucicriniques et mucimitiginiques à partir d'un extrait de muqueuse duodénale

Sephadex G 100-Separation of the Mucicrinic and the Mucimitiginic Factors from an Extract of Duodenal Mucosa

A. SVATOS, M. CHASSAING et L. DUSSOURD D'HINTERLAND

Centre de Recherches Pierre Fabre, avenue Jean Moulin 17, F-81106 Castres (France), 11 septembre 1975.

Summary. The mucicrin stimulating the hexosamine gastrointestinal secretion and extracted from porcine duodenum, was concentrated in the zone 7 using sephadex G 100. The molecular weight of 4000–5000 corresponds to this zone. An opposite activity was detected in zone 3. The factor from digestive mucous origin being able to diminish the hexosamine gastric secretion and not influencing the arterial pressure was called mucimitigin. The molecular weight of about 35000 corresponds to this factor.

BERNARD¹ fut le premier à révéler l'important rôle protecteur du mucus gastrique. Pour USAKOV², de l'école pavlovienne de St. Petersburg, la sécrétion du mucus gastrique est stimulée par les fibres du vague. Selon BABKIN³, l'excitation du vague, provoquée électriquement chez le chien, stimule d'abord les fibres qui in-

nervent les cellules mucoidales, puis celles qui innervent les cellules productrices d'acide. En 1971, on a pu montrer qu'il existait un facteur hormonal capable de stimuler la sécrétion dans le tract gastrointestinal⁴.

Nous avons essayé d'isoler cette hormone. En même temps nous avons pu observer une autre activité qui réagit de façon inverse sur la sécrétion.

Isolement des fractions actives. Un extrait brut suffisamment actif a pu être obtenu à partir d'une poudre acétonique d'extraits duodénaux du porc par solubilisation dans un alcool acidifié, suivie d'une précipitation à un pH voisin de 7.

Fractionnement par filtration sur sephadex G 100. On utilise une colonne de diamètre 1,5 cm et hauteur de lit 65 cm. Pour chaque fractionnement, on dépose 100 mg de produit en solution dans 1,0 ml d'acide acétique 0,2 M. On élue par l'acide acétique 0,2 M. La densité optique de l'éluat à 280 nm est enregistrée sur un appareil Gilson puis l'éluat est fractionné et collecté dans une série de tubes à raison de 75 gouttes/Tube. Les tubes 11 à 46 sont rassemblés en 9 zones de 4 tubes consécutifs. Chaque zone est lyophilisée et on dose son activité sur la sécrétion gastrointestinale après injection i.v. sur le rat à jeûn.

Evaluation des poids moléculaires. La colonne utilisée pour la séparation a été préalablement étalonnée à l'aide des produits de référence suivants: Dextran bleu, cytochrome C, glucagon, bacitracine, tryptophane. La courbe reliant le logarithme du poids moléculaire au volume d'élution nous permet d'évaluer les poids moléculaires de nos fractions.

Détermination du caractère protéique. Le caractère protéique est déterminé d'une part par l'apparition d'un maximum d'absorption à 280 nm lors de l'enregistrement du spectre UV entre 250 nm d'une solution aqueuse du produit, d'autre part par l'apparition d'une coloration bleue quand on mélange volume à volume une solution du produit dans la soude N/10 et le réactif du biuret.

Dosage biologique de l'activité. Les essais ont été conduits sur des rats Wistar mâles, alimentés en eau ad libitum après une jeûne de 24 h⁴. On détermine le taux en hexosamines dans le suc gastrique des rats par la méthode d'ELSON-MORGAN⁵, 1 h avant et 1 h après l'administration du lyophilisat par voie i.v. Le fractionnement a été répété 10 fois pour la filtration sur Séphadex G 100 et toujours 9 fractions ont été récupérées. Ainsi on a effectué 90 déterminations biologiques sur 90 Rats.

La sécrétion des hexosamines gastriques chez le rat à jeûn existe même en l'absence d'excitation. Cette sécrétion basale est régulière. Nous avons observé dans la

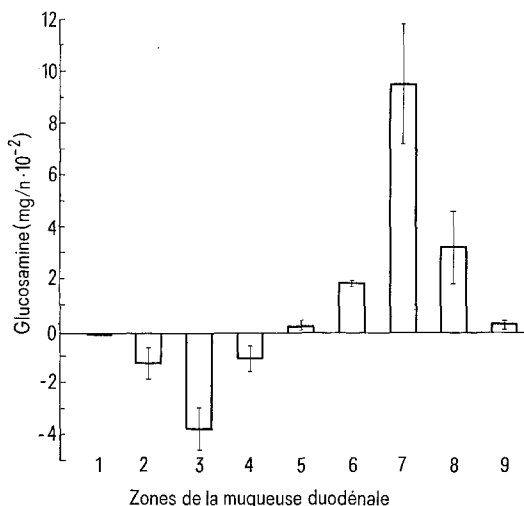


Fig. 1. Changements de la sécrétion d'hexosamine gastrique chez le rat après administration i.v. des fractions lyophilisées de la muqueuse duodénale, qui ont subi la séparation par filtration sur Séphadex G 100. Les zones 2, 3, 4 provoquent une diminution de la sécrétion d'hexosamine, zone 3, qui baisse la sécrétion le plus fort et diffère statistiquement des zones 2 et 4 ($p < 0,05$). Les zones 6, 7, 8 stimulent la sécrétion d'hexosamine gastrique et la zone 7 qui est le plus fort stimulateur diffère statistiquement de façon très significative de la zone 6 ($p < 0,01$) et de la zone 8 ($p < 0,05$).

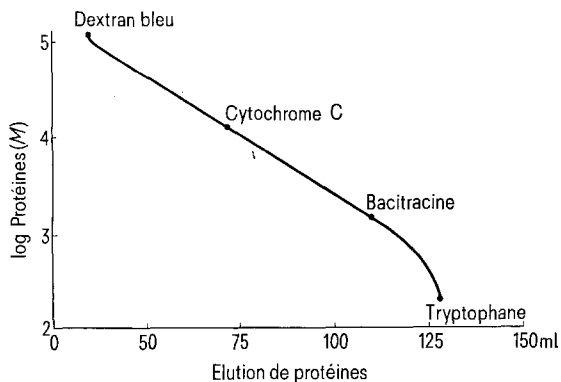


Fig. 2. Etalonnage de la colonne en masse moléculaire. Logarithme de la masse moléculaire des protéines étalons passées sur la colonne. Volume d'élution de ces protéines exprimé en ml.

¹ CL. BERNARD, *Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médecine* (J. B. Baillière et Fils, Paris 1856), vol. 2, p. 406.

² V. G. USAKOV, *Arch. Biol. Nauk* 4, 425 (1896).

³ B. P. BABKIN, *Am. J. Surg.* 7, 498 (1929).

⁴ A. SVATOS et J. CAROLI, *C. r. Acad. Sci.*, Paris 272, 1130 (1971).

⁵ L. A. ELSON et W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* 27, 1824 (1960).

plupart des cas que l'élévation de la sécrétion en hexosamines gastriques se produit après injection i.v. des zones 7 et à un degré moindre des zones 8 (Figure 1). Ces zones correspondent à un poids moléculaire de l'ordre de 4 à 5000 (Figure 2). Dans la plupart des cas la zone 9 est inactive. De même, les zones 1, 4, 5 et 6 n'ont pas d'influence sur la sécrétion basale. Nous avons pu observer une diminution de la sécrétion basale en hexosamines après administration des zones 3. La zone 2 provoque aussi une diminution partielle. Le facteur présent dans ces zones est responsable de cette diminution, présente un poids moléculaire de l'ordre de 35 000. D'après la courbe d'absorption U.V. qui présente un maximum à 280 nm et la réaction positive avec le réactif du Biuret, ce facteur est vraisemblablement de nature protéique.

La reproductibilité de l'activité mucicrine dans les zones 7 ou éventuellement 8 nous permet de supposer que nous avons concentré la mucicrine dans cette zone. Les décalages observés dans les essais No. 3 et 4, peuvent s'expliquer par les erreurs de comptage des tubes dues à un fractionnement défectueux du fractionneur utilisé et par les variations de débit dues au tassement du gel dans la colonne après une certaine période d'utilisation.

Après administration des zones 2 et 3 nous avons observé la diminution de la sécrétion basale d'hexosamines gastriques est essentiellement plus faible que la sécrétion basale. Il ne s'agit pas d'une simple inactivation de la mucicrine, parce que la mucicrine n'est pas présente dans cette zone. Il est possible d'expecter que ce phénomène soit produit par un facteur spécifique. Nous avons choisi le terme de la mucimitigine pour désigner le facteur de la muqueuse du tube digestif capable de diminuer la sécrétion basale des hexosamines gastriques et n'influençant pas la pression artérielle. La présence de la mucimitigine est observée dans 7 cas après injection dans la zone 3, les trois cas restant présentent un décalage vers les zones voisines. Le poids moléculaire de la mucimitigine est d'environ 7 à 8 fois supérieur à celui de la mucicrine. Les deux méthodes utilisées concordent à montrer la nature protéique de ce facteur.

Il est intéressant de noter qu'on peut trouver deux activités symétriques, mais avec l'influence biologique inverse, après séparation par filtration sur gel de Séphadex d'un extrait de la même muqueuse duodénale, cet extrait ne manifestant avant séparation qu'une seule de ces deux activités.

The Orthodox-Paradoxical Sleep Cycle in the Rat

J.-M. GAILLARD and I. TUGLULAR

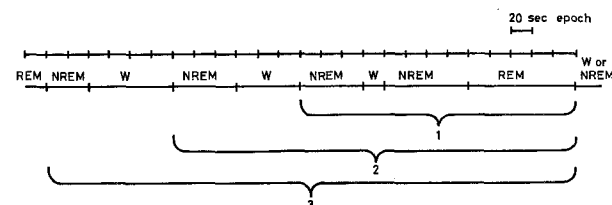
Clinique Psychiatrique de l'Université de Genève, Bel-Air, CH-1225 Chêne-Bourg (Switzerland), 19 December 1975.

Summary. Under the postulated existence of a mechanism regulating the NREM sleep – REM sleep sequence and a reset of this mechanism by long awakenings, the variability of sleep cycle in the rat was studied. Awakenings of various durations were included in the definition of sleep cycle boundaries. Results show that an intervening awakening of 1 min is close to the limit under which the same cycle seems to be resumed after the awakening and above which the previous cycle is abortive and a new cycle will start after the next sleep onset.

One of the most salient features of mammalian sleep is its organization, that is the regular alternation of non-rapid eye movements (NREM) and rapid eye movements (REM) sleep. The former is mainly characterized by slow waves and spindles on the electroencephalogram (EEG), a low but not abolished muscle tone and the absence of rapid eye movements. The latter is recognized by an EEG of low voltage fast activity, the occurrence of bursts of rapid eye movements, an abolition of basal muscle tone and phasic muscular discharges recorded in the neck

muscles. The alternation of these two kinds of sleep allows one to isolate sleep cycles, not without ambiguity however. For some authors, a cycle is comprized between the beginning of a REM phase and the beginning of the next one, whereas for others it extends between the end of two consecutive REM phases. The presence of waking constitutes another difficulty. It may be asked up to what extent an intervening awakening influences the NREM sleep-REM sleep sequence. A response to this question might allow one to determine if waking episodes must be included in the definition of sleep cycles boundaries, and up to what duration.

It seems reasonable to hypothesize the existence of some kind of biological and probably sleep-dependent clock regulating sleep cycles, and more specifically determining the amount of NREM sleep necessary before the appearance of REM sleep. A very short awakening is not likely to reset this mechanism; on the contrary, it is hard to believe that a sleep cycle can resume after a very long awakening. It follows that between these two extremes, there must be some critical value of awakening duration below which the sleep cycle clock is not reset and above which the counting is reset to 0. It has been shown in man that, when a cycle contains waking, its NREM part is lengthened (BREZINOVA¹).



Definition of sleep cycle length. REM: REM sleep; NREM: NREM sleep; W: waking. Notice that, in this example, the 1st waking phase (left) is 4 epochs long, the 2nd (middle) 3 epochs long and the last one (right) 1 epoch long. Under definition 1, sleep cycles may contain waking phases and no more than 1 epoch; under definition 2, they may contain waking phases of no more than 3 consecutive epochs, and under definition 3, they contain all sleep epochs between the end of 2 consecutive REM phases. Waking phases are not included in sleep cycles duration. Thus, this sleep cycle lasts 12 epochs (4 min), 15 epochs (5 min) and 17 epochs (5 min 40 sec) under definition 1, 2 and 3 respectively.

¹ V. BREZINOVA, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 36, 275 (1974).