

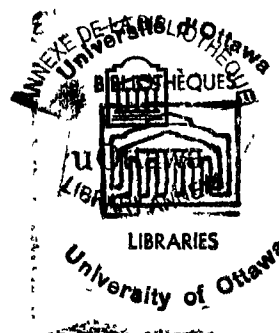
VNR

BIOCHEMICAL AND HISTOCHEMICAL STUDY OF METALASES: MODIFICATION
OF ORGANIC PHOSPHATE TOXICITY BY CHLORINATED HYDROCARBONS

By

Marc CHEVIER

SUMMARY



UMI Number: DC54033

INFORMATION TO USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleed-through, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI Microform DC54033
Copyright 2011 by ProQuest LLC
All rights reserved. This microform edition is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

SUMMARY

Biochemical and histochemical studies of esterases: modification of organic phosphate toxicity by chlorinated hydrocarbons.

Introduction.

The theory that conduction along nerve and muscle fiber is associated with electric currents and the role of acetylcholine in depolarizing the membrane are summarized. The importance of acetylcholine in generating a new motor endplate potential is emphasized.

The inactivation of acetylcholine by acetylcholinesterase is a very important aspect to be considered. In order to prove that acetylcholine could play a role in conduction, it is necessary to show that the chemical mediator may be destroyed very rapidly by acetylcholine esterase. The very high turnover number of the enzyme fulfills this prerequisite, and the amount of ester which may be split during one millisecond at a single motor endplate in a frog sartorius is about 1.6×10^9 molecules.

PART ONE: BIOCHEMICAL RESEARCH

CHAPTER ONE

The Esterase Group

Among the esterases of physiological significance are the cholinesterases, the choline acetylase, the common esterases and the lipases.

The cholinesterases can be distinguished from the other esterases by their sensitivity toward eserine at low concentrations (10^{-7} to 10^{-6}).

Two enzymes have been shown to hydrolyse specifically acetylcholine,

via. cholinesterase and acetylcholinesterase. The two enzymes may be distinguished by their behavior in the presence of substrate concentration; acetylcholinesterase shows an optimum of substrate concentration while cholinesterase follows the Michaelis-Menten law which governs other enzymic activities. The cholinesterase, contrary to acetylcholinesterase, hydrolyses its substrate more rapidly with an increase in the length of the acyl chain. It is possible to distinguish between both enzymes by the use of specific inhibitors such as di-isopropyl fluorophosphate and Iu 683. In vivo inhibition of acetylcholinesterase is always fatal, while inhibition of serum cholinesterase is not of much significance.

It has been proved that the hydrolysis of acetylcholine by acetylcholinesterase is a reversible process. However, Nachmansohn and Machado have isolated a different enzyme extracted from the brain which they named choline acetylase. This is able to catalyse the reaction of esterification in presence of adenosine triphosphate. Choline acetylase is present in every tissue concerned with conduction.

A third group includes the eserine non-sensitive enzymes, namely the common esterases, capable of hydrolysing the esters of a low molecular weight, and the lipases capable of splitting the fats.

Leucylglycylglycine activates the pancreatic lipase but not the common esterase; moreover, the sensitivity of esterases and lipases toward atoxyl and quinine is entirely different. Lipase is atoxyl resistant and quinine sensitive, and conversely, esterase is atoxyl sensitive and quinine resistant, although these distinctions are very relative.

A separate enzyme preferentially splitting the acetic esters has also been described.

CHAPTER TWO

Pharmacological action of chlorinated hydrocarbons and organic phosphates.

Chlorinated hydrocarbons give the classical symptoms of neuromuscular poisons: hyperextension of legs, postural instability, tremors, convulsions and coma. The convulsions seem to be the direct result of an action at the neuromuscular junction, but without any apparent morphological disturbances.

Eserine increases the toxicity of DDT, but the anticholinesterase property of the latter has not been shown.

Aldrin and dieldrin cause about the same effect in mammals. Moreover, bradycardia, vasodepression, miosis and vagotonic effects have been observed. Synergic effects of acetylcholine injection on the secretory and neuromuscular systems have been described.

As well as the neurotonic effect, it is known that chlorinated hydrocarbons may cause hepatic necrosis, adrenal cortex and kidney atrophy.

Chlorinated hydrocarbon metabolism is not well known. Dehydrohalogenation of aliphatic compounds has been proved, while the same is not true for aromatic compounds.

Chlorinated hydrocarbons inhibit some enzymatic systems, such as succinioxidase, carbonic anhydrase and succinic dehydrogenase.

The pharmacological effects of organic phosphates are shown. It is established that these compounds are eserine-like toxics, exerting

mainly their action at the synapses. In extreme cases of poisoning, free acetylcholine appears in the blood. In every case, organic phosphates inhibit the acetylcholinesterase activity.

The real site of action of organic phosphates seems to be peripheral, mainly at the level of the muscle acetylcholinesterase, leading to respiratory paralysis and asoxia. The fatal outcome of peripheral inhibition of cholinesterase may be accompanied by different degrees of brain cholinesterase activity, varying between 5 and 100 percent according to the organic phosphate administered.

Organic phosphates are characterized by their property of inhibiting acetylcholinesterase activity. Some of them do it in vitro without further transformation, while some others have to be metabolically transformed before exerting such an action. The inhibitor action of organic phosphates against esterase, including acetylcholinesterase, cholinesterase and aliesterase, is highly selective.

Organic phosphates inhibit cholinesterases by forming a complex with the enzyme. This theory implies that the basic group in the esteratic site of the enzyme surface is phosphorylated, and that this phosphorylated enzyme could react with nucleophilic reagents and thereby regenerate the enzyme. It has been demonstrated that the enzyme inhibited by tetraethylpyrophosphate may be slowly reactivated by reaction with water, or rapidly by choline or hydroxylamine.

CHAPTER THREE

Research on the chlorinated hydrocarbons action on esterase activity

Chlorinated hydrocarbons, like DDT, aldrin and some related

compounds have the characteristics of neurotic poisons. Therefore it was interesting to test the anticholinesterase properties of aldrin at the level of red blood cells.

A reduction in serum esterase activity following exposure to simple chlorinated hydrocarbons associated with a necrosis of hepatic parenchyme has been reported. As aldrin is known to cause the same effect on the liver, it was of interest to study its action on serum esterase, since liver necrosis and reduction in esterase activity are always found together.

The Gomori method with the use of phenyl benzoate substrate was employed. The hydrolysis of phenyl benzoate has been shown to be eserine non-sensitive (Table I). The reaction was found to be proportional to time (Fig. 2), amount of enzyme (Fig. 3), and concentration of substrate (Fig. 4).

A single oral dose (30 mg/kg) of aldrin increases the serum esterase, with a maximum at the 4th day following administration (fig. 5). This increase of activity is directly proportional to the logarithm of the dose injected (fig. 6). With continuous aldrin administration, the increase in serum activity reaches a plateau (fig. 7 and 8). It is likely that rats become adapted to the toxic. With multiple administration of the toxic, in the few hours preceding death, the serum esterase activity increases very abruptly (fig. 9).

Related chlorinated hydrocarbons, including chlordane, dieldrin and DDT increase the serum activity the fourth day following their administration. Heptachlor, hexachlorobenzene and lindane do the same, but to a very slight degree (Table II).

In rats having a low esterase activity following thyroxine administration, aldrin accelerates the recovery of this enzyme, and conversely, thyroxine sensibilizes the rats to aldrin effect (Table III).

Aldrin does not modify the red blood cell acetylcholinesterase activity following a single dose or a continuous exposure in the diet as far as this activity is determined in presence of acetylcholine or acetyl - β -methylcholine (Tables IV and V).

The influence of thyroid on serum cholinesterase is well known. On the other hand, we have been able to demonstrate that thyroxine decreases the rate of phenyl benzoate hydrolysis, and that aldrin accelerates the recovery of the same. It was of interest though to see if, by any means aldrin would influence the cholinesterase activity. It has been shown (Table VI) that aldrin does not exert any influence on cholinesterase activity.

On the other hand, aldrin increases the serum esterase activity when this activity is determined in presence of triacetin (Table VII).

Serum esterases and α -globulin fraction have been shown to be influenced by thyroid. On the other hand the α -globulin fraction level is determined by the same factor, while the common esterase is a component of the same fraction. As aldrin accelerates the recovery of serum esterase level following thyroxine administration, it was of interest to see if the same toxic was exerting any influence on the α -globulin level of the serum.

It has been shown that aldrin does not exert any effect on the α -globulin fraction level (fig. 12 and 13).

Aldrin increases the activity of serum common esterases. This

increase may be detected following a single or continuous administration of the toxic. This increase is not associated with a concomitant increase in the α -globulin fraction of the serum despite the fact that both components are associated in the serum.

On the other hand, aldrin does not exert any effect on the acetylcholinesterase of the red cells or on the cholinesterase of the serum.

CHAPTER FOUR

Modification of organic phosphate toxicity by pretreatment with chlorinated hydrocarbons.

It has been demonstrated in chapter three that chlorinated hydrocarbons caused an increase in esterase levels of serum when administered in vivo. Moreover, Albridge considers that an esterase may destroy the anticholinesterase agents in vivo, abolishing though their pharmacological effect.

First of all, the toxicity of aldrin and parathion has been established when administered simultaneously as well as the toxicity of different mixtures of both in varying centesimal composition (Table VIII and IX). In each case, the toxicity of these compounds remains roughly the same.

Aldrin administered four days ahead (20mg/kg or 1/2 LD₅₀) protects rats against toxic action of parathion (Table X) in a ratio of 7. At the rate of 1/4 of a LD₅₀, in male, the degree of protection is roughly proportional (Table XI).

Chlordane and lindane exert a similar action against parathion, but the latter to a smaller extent. (Table XII).

Parathion exerts its toxic action in the organism after a metabolic transformation in the liver. Then the protective action of aldrin could be ascribed to a blockade of this transformation, but aldrin administered 4 days ahead protects as well against another anticholinesterase agent, tetraethylpyrophosphate (TEPP) acting in vitro. The protective action cannot be explained on this basis, it is certainly a more general phenomenon.

Contrary to its action against organic phosphate, aldrin does not protect against the toxic action of eserine.

If we determined the serum esterase activity in protected and non-protected rats after parathion administration, we can see an increase in the protected group but this is certainly without any physiological significance (Table XIII).

Aldrin exerts a protective action against parathion poisoning provided it is administered four days ahead. If administered at the same time, it exerts no action at all. This time relationship coincides with the maximum obtained in the increase of serum esterase activity by aldrin. Chlordane and lindane share this property.

As aldrin protects against TEPP which is not metabolized in vivo, we can conclude that this is a very general mechanism and not a peculiar one resting on the inhibition of the transformation of parathion in an active compound in the liver.

One must admit then that the protective action is exerted through the destruction of the inhibitor before it reaches the cholinergic center or through some sort of modification in permeability. The first hypothesis seems to be highly probable.

In order to test the validity of this hypothesis that in the reported case of protection the organic phosphate does not reach the cholinergic center responsible for the toxic action, we decided to study the acetylcholinesterase activity at the level of the motor endplate of the striated muscle.

To do so, we made use of the rather new technique of microscopic enzymology. This constitutes part two of this work.

PART TWO: HISTOCHEMICAL RESEARCH

CHAPTER FIVE

Histochemical demonstration of esterase activity.

In histochemical demonstration of enzymic activity, tissue fixation must be avoided as far as possible, since it is known that the milder fixation denatures the enzymes; so it is desirable to make use of the freezing microtome in order to prepare tissue section.

The specificity of the reactions is a very important factor since, in microscopic enzymology, most of the time it is impossible to make use of the physiological substrate. Indeed, following hydrolysis, a moiety of the molecule must precipitate within tissue structure. Artificial substrate must be used, and the specificity of the reaction studied accordingly. This study can be done in vitro, and results confirmed by the use of specific inhibitions.

At the present time, it is possible to demonstrate lipase activity histochemically, using Tweens as substrate, and common esterase, using β -naphthylacetate, O-acetylindoxyl and butyrylindoxyl as substrate.

Finally, the cholinesterase activity might be demonstrated using

higher fatty acid esters of choline, O-acetylindoxyl, β -naphthylacetate and acetylthiocholine as substrates. By these techniques, it has been possible to demonstrate activity at the level of the motor endplate, in some sites of the central nervous system and in the peripheral system.

CHAPTER SIX

Development of a simple method for detection of esterase activity.

The mechanism of enzymic hydrolysis catalized by acetylcholinesterase has been studied by Wilson and co-workers. The enzyme molecule has been shown to contain an anionic site and also an esterase site upon which the enzymic activity is directly dependent. The theory involves an acetylated enzyme as intermediate. On this basis, it has been demonstrated that acetylcholinesterase catalyses the hydrolysis of thiocholine with liberation of acetic acid and hydrogen sulfide. The H_2S evolved can be trapped in situ by either lead nitrate or acetate, thus forming a precipitate in areas of enzymic activity.

By this new method we have been able to demonstrate a very constant activity at the level of the motor endplate (fig. 13). The reticular appearance of the individual plate and its clear central channel reported by Conteaux after staining with Janus Green B has been reproduced by this histochemical procedure (fig. 14). The superficial arborization of the frog muscle has been demonstrated also in the formalin fixed central nervous system of the rat (fig. 16). The histochemical study has revealed that the precipitate occurred regularly along certain fiber tracts but especially over the neurones (fig. 17 and 18). These were grouped into four categories with regard to intensity: the least intense includes the pyramidal cells of the cerebral cortex; the Purkinje cells of the cerebellum; the motor neurones of the spinal cord; and the most

intensely reactive, the dentate nucleus of the cerebellum; the red nucleus; the motor nucleus of the fifth nerve; and the diffuse nucleus of the pons.

In the individual cells exclusive of the nucleus, the precipitate occurred in the cytoplasm and along the proximal processes. Perinuclear localization of greater intensity was recorded often (Fig. 19).

Formalin fixation as applied, did not seem to decrease the intensity of the reaction in the rat tongue but produced granulation and changes in the morphology of the motor endplate as compared to unfixed specimen. No image was obtained in frog muscle after a fixation, only diffuse precipitate.

Preincubation in prostigmine bromide at $10^{-6}M$ and also in tetraethylpyrophosphate at $10^{-7}M$ have inhibited completely the reaction at the motor endplate in the rat tongue while an unspecific esterase reactive site in the surface epithelium was still present after treatment of 15 minutes with either one of these inhibitors (Fig. 20, 21 and 22).

As far as the specificity is concerned, the thioacetate acid is not hydrolysed only by acetylcholinesterase, as originally described by Wilson with a purified preparation from *Electrophorus electricus*. We have been able to demonstrate that the esterases of the epithelium of the tongue give a fairly intense reaction and that this reaction is more resistant towards inhibitory action of prostigmine and T.P.P. A test must be tried with these inhibitors at low concentration before concluding a cholinesterase activity. Moreover, the activity might be due either to acetylcholinesterase or cholinesterase. A test with

DFP, the latter being more sensitive, should be tried before deciding on the type of activity since both enzymes have been shown to have the same esterase site responsible for the hydrolysis of thioacetic acid.

In the present chapter a very simple, constant and histologically accurate procedure has been described for the histochemical investigations of cholinesterase localization. This method is specific for cholinesterase provided the proper inhibitors are used.

CHAPTER SEVEN

Quantitative "in situ" determination of acetylcholinesterase activity at the level of motor endplate by means of histophotometry.

Histophotometry, being a method based on microscopic observation is a first choice in "in situ" analysis of enzymic activity.

The reaction used in histophotometry must not lead to an opaque precipitate, otherwise the accuracy of the reaction is very poor. Moreover, fixation must be avoided in such a quantitative research and the pH of the reaction must be in a good range for normal enzymic activity. For all these reasons we have chosen the β -naphthylacetate method, operating at pH 7.8, and leading to a final product, the molecular coefficient absorption of light of which being suitable with histophotometrical determination.

The function responsible for measurements is defined as follows:

$$T = I/I_0$$

where I_0 stands for light transmission across a blank area and I for light transmission across the substance to be studied.

We can say that the extinction D is defined by:

$$D = -\log T$$

and according to the Beer Law

$$D = CLE$$

where C = concentration, L = thickness of the specimen and E, the molecular coefficient of absorption.

In relative determinations, L and E can be neglected, so that C remains the only variable factor.

So:

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{D_1}{D_2}$$

The enzymic activity, determined in relative amount of β -naphthol deposited, will be expressed in units of optical density.

For histochemical determination, we used a very simple histophotometer assembled in our laboratory (Fig. 23). This consists in a source of light, a microscope, a photographic chamber, a photoelectric cell with an iris (4 mm.) and a photometer.

We chose to work with cross sections of the rat tongue, because, with these sections we can have together the cholinesterase of the motor endplate and the common esterase of the epithelium. This fortunate distribution of the enzyme will be very useful for enzymic identification. All sections have been cut at 15 μ by the freezing technique.

The histochemical localization by the β -naphthylacetate method is rather poor (fig. 24 and 25). The reticular appearance of the plate is not evident and there are secondary reactions at the level of muscle fibers and epithelium. With the use of β -carbonaphthoxycholine as

substrate, the reaction is restricted to the motor endplate while the muscle fibers and the epithelium do not give this reaction.

To measure the esterase activity at the level of all the plates histophotometrically, would have been a tedious and pointless task. Plates grouped in a cluster (fig. 27) give a surprisingly constant value. Moreover, it is not possible to measure activity at all the plates because they are not always centered on a fiber. In these conditions, it is impossible to detect activity with accuracy. The reason is that a blank value must be chosen in the vicinity of the plate and that the iris of the photoelectric cell must be applied exactly on the plate without touching the surrounding connective tissue. The appreciation of a mean value is presented in table XIV.

Isaline at a concentration of $10^{-7}M$ inhibits greatly the esterase activity at the level of the motor endplate while the same activity is not inhibited at the level of the epithelium and the muscle fiber (fig. 28 and 29) (Table XV).

At the concentration of $10^{-6}M$, all the activity disappears on the motor endplate, both for β -naphthylacetate and β -carbonaphthoxycholine. For the epithelium and the muscle fiber, the same is true at a concentration of $10^{-4}M$.

Then we can say that acetylcholinesterase and cholinesterase are present at the motor endplate and that both can be revealed in presence of β -naphthylacetate and β -carbonaphthoxycholine.

The cholinesterase reaction of the motor endplate, when measured histophotometrically is proportional to the time of the reaction (fig. 30), temperature (fig. 31) and substrate concentration (fig. 32).

The study of inhibition of the reaction of β -naphthylacetate and β -carbonaphthoxycholine hydrolysis in presence of acetylcholine at increasing concentrations has indicated that the former is hydrolysed by acetylcholinesterase while the second is hydrolysed by cholinesterase (fig. 33). This is based on the differential affinity of both enzymes at low concentration of acetylcholine.

In order to test the validity of the histophotometrical determination of cholinesterase activity, we have injected increasing doses of eserine intramuscularly and determined the residual activity of the motor endplate. Results are expressed in Table XVI.

We can see that there is a strict relation between the evolution of a pharmacological phenomenon and the acetylcholinesterase activity of the motor endplate of the tongue.

It is possible to determine quantitatively the esterase activity of the motor endplate. By eserine experiment it was shown that this activity is due to a cholinesterase. By acetylcholine inhibition it was proved that this activity was split between acetylcholinesterase hydrolysing β -naphthylacetate and cholinesterase hydrolysing β -carbonaphthoxycholine.

It was demonstrated as well that this technique may be used for studying the evolution of the pharmacological action of eserine.

CHAPTER EIGHT

action of aldrin on the cholinesterase activity of the motor endplate

Aldrin has been reported as having the properties of a neuromuscular poison despite the fact that its anticholinesterase action has never been studied directly. By the present method this possibility was

definitely eliminated (Table XVII). The neurotoxic property of aldrin must be explained on a different basis.

CHAPTER NINE

Study of the modification of parathion toxicity by aldrin at the level of the motor endplate

We have been able to demonstrate (Chapter Four) that chlorinated hydrocarbons can greatly modify the toxicity of organic phosphate provided that the chlorinated hydrocarbons are injected four days ahead.

We have made the hypothesis that the cholinesterase inhibition does not exert its usual toxic action because it is destroyed before reaching the cholinergic centers, the motor endplate.

By histophotometry we have been able to prove that such was the case (Table XVIII), that is to say in protected rats, the acetylcholinesterase activity of the motor endplate was higher and the rate of hydrolysis compatible with a minimum residual activity for maintenance of life.

GENERAL CONCLUSIONS

The very rapid turnover number of acetylcholinesterase distinguishes this enzyme from all others and is high enough to account for the velocity of conduction.

On the other hand, the mechanism of toxic action of chlorinated hydrocarbons is still an open question. They share the properties of neurotic substances although their anticholinesterase actions have never been demonstrated.

°
° °

In the biochemical part of this work it has been shown that chlorinated hydrocarbons increase the activity of the serum cholinesterase. Moreover, the same compounds accelerate the recovery of serum esterases following a decrease induced by thyroxine.

There is no concomitant variation between serum esterase and γ -globulin fraction although both factors are controlled by thyroid and esterase is associated with γ -globulin in the serum.

On the other hand, it was established that aldrin causes no variation in the activity of red blood cell acetylcholinesterase activity.

°
° °

Chlorinated hydrocarbons modify the toxic action of organic phosphate provided that the former are administered four days ahead. On the basis of a preferential action between cholinesterase, or another protein of the serum, no explanation of the phenomenon could be given.

The activity at the real site of a cholinergic receptor (the motor endplate), was studied by microscopic enzymology methods.

° °
° °

Recent researches have established that an acetylated enzyme is the prerequisite intermediate in the process of hydrolysis of acetylcholine. On this basis it was proved that acetylcholinesterase can catalyse the hydrolysis of thioacetic acid, with liberation of acetic acid and hydrogen sulfide.

Using this reaction, we have been able to work out a new simple method for cholinesterase activity determination. The Hg^{2+} evolved is precipitated in presence of lead nitrate or lead acetate.

This new method is suitable for the detection of cholinesterase activity in the motor endplate and the central nervous system. The reaction is not limited to this enzyme. The common esterase can also hydrolyse this substrate.

•
• •

Using the β -naphthylacetate method, we have been able to study quantitatively by histophotometry the cholinesterase activity of the motor endplate and to apply this method to the evolution of a pharmacological phenomenon.

•
• •

By this method it has been possible to rule out the anticholinesterase property of aldrin.

•
• •

By the same method, it has been possible to demonstrate that the modification of toxicity of organic phosphate by chlorinated hydrocarbons takes place at the level of the motor endplate.

CONTRIBUTION A L'ETUDE BIOCHIMIQUE ET HISTOCHEMIQUE DES ESTERASES:
DESCRIPTION D'UN ANTAGONISME D'ACTION ENTRE LES HYDROCARBURES CHLORES
ET LES PHOSPHATES ORGANIQUES.

par Marc GREVIER, M. Sc.

Thèse présentée à l'Ecole des
Gradués de l'Université d'Ottawa
en vue de l'obtention du doctorat
en philosophie.



Ottawa, avril 1955.



Marc Grevier 1969

REMERCIEMENTS.

Mon travail est achevé. Je désire exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé dans la poursuite de ces recherches, et tout particulièrement:

A monsieur le Professeur Léonard-F. Bélanger, qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a constamment encouragé par son enthousiasme pour la recherche scientifique et a dirigé la plus grande partie de ces travaux.

Au Docteur K. Kay et au Docteur W.L. Ball, qui m'ont incité à entreprendre ces recherches et ont généreusement contribué à l'exécution de la première partie de ce travail.

A monsieur J. Sinclair qui, à divers titres, a bien voulu m'offrir sa collaboration.

A monsieur E. Bélanger et à mesdames D. Sims, M. Kelher et G. Bélanger qui m'ont prêté concours et assistance.

A monsieur R. Laframboise qui a exécuté les microphotographies.

Je voudrais également remercier les autorités du Ministère de la Santé nationale et du Bien-être social qui ont bien voulu subventionner ces recherches.

ERRATA

Dans la légende des figures 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 30, 31, 32, 33, lire: En abscisses et En ordonnées au lieu de En abscisse et En ordonnée.

REMERCIEMENTS.

Mon travail est achevé. Je désire exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé dans la poursuite de ces recherches, et tout particulièrement:

A monsieur le Professeur Léonard-F. Bélanger, qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a constamment encouragé par son enthousiasme pour la recherche scientifique et a dirigé la plus grande partie de ces travaux.

Au Docteur K. Kay et au Docteur W.L. Ball, qui m'ont incité à entreprendre ces recherches et ont généreusement contribué à l'exécution de la première partie de ce travail.

A monsieur J. Sinclair qui, à divers titres, a bien voulu m'offrir sa collaboration.

A monsieur E. Bélanger et à mesdames D. Simms, M. Keliber et C. Bélanger qui m'ont prêté concours et assistance.

Je voudrais également remercier les autorités du Ministère de la Santé nationale et du Bien-être social qui ont bien voulu subventionner ces recherches.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Introduction.....	1
PREMIERE PARTIE: RECHERCHES BIOCHIMIQUES.	
Chapitre premier: Classification des estérases.....	9
A.- Le groupe des cholinestérases sensibles à l'action de l'ésérine.....	9
B.- La choline acétylase.....	14
C.- Le groupe des estérases non spécifiques.....	15
Chapitre deuxième: Données récentes sur les effets pharmacologiques des hydrocarbures chlorés et des phosphates organiques.....	18
A.- Des hydrocarbures chlorés.....	18
B.- Des phosphates organiques.....	24
Chapitre troisième: Recherches à propos de l'action des hydrocarbures chlorés sur l'activité estérasique.....	33
A.- Action de l'aldrine sur l'activité estérasique du sérum.....	33
B.- Action d'autres hydrocarbures chlorés apparentés à l'aldrine sur l'activité estérasique du sérum.....	44
C.- Effet de l'aldrine sur le taux de régénération de l'activité estérasique chez des rats thyroxinés.....	45
D.- Action de l'aldrine sur l'acétylcholinestérase des globules rouges.....	47
E.- Action de l'aldrine sur la cholinestérase du sérum....	51
F.- Action de l'aldrine sur l'aliestérase du sérum.....	52
G.- Etude des protéines du sérum par la méthode d'électrophorèse sur papier chez les animaux traités à l'aldrine.....	53

H.- Conclusion du présent chapitre.....	Pages 58
 Chapitre quatrième: Recherche sur l'antagonisme d'action entre les hydrocarbures chlorés et les phosphates organiques..	
A.- Détermination de la dose LD ₅₀ des mélanges de parathion et d'aldrine.....	61
B.- Action protectrice de l'aldrine vis-à-vis du parathion..	62
C.- Action protectrice du chlordan et du lindane vis-à-vis du parathion.....	64
D.- Action protectrice de l'aldrine vis-à-vis du tétraéthyl- pyrophosphate.....	65
E.- Etude de la toxicité de l'ésérine après administration de l'aldrine.....	66
F.- Etude comparée de l'activité estérasique chez les rats intoxiqués au parathion avec et sans traitement à l'al- drine.....	66
G.- Discussion des résultats exposés au cours du présent chapitre.....	67
 DEUXIEME PARTIE: RECHERCHES HISTOCHIMIQUES.	
 Chapitre cinquième: Acquisitions des dernières années sur la dé- monstration à l'échelle microscopique des activités es- térasiques.....	
A.- Exposé de quelques principes.....	72
B.- Démonstration des lipases.....	76
C.- Démonstration des estérases non spécifiques.....	77
D.- Démonstration des cholinestérases.....	79
 Chapitre sixième: Mise au point d'une nouvelle méthode pour la détection histochemique des activités estérasiques.....	
	92

	Pages
A.- Principe de la méthode: hydrolyse de l'acide thiolacé- tique.....	92
B.- Détail expérimental.....	94
C.- Etude de l'activité estérasique au niveau de la plaque motrice de la fibre musculaire et au niveau de l'épithé- lium de la langue.....	95
D.- Etude de l'activité estérasique au niveau de la synapse myoneurale du gastrocnémien chez la grenouille.....	98
E.- Etude de l'activité estérasique au niveau du système nerveux central chez le rat.....	99
F.- Etude de l'inhibition de la réaction par la prostigmine et le tétraéthylpyrophosphate.....	102
G.- Conclusion: nature de l'activité estérasique mise en évidence à l'aide de cette nouvelle méthode et li ite de la spécificité.....	105
 Chapitre septième: Détermination quantitative in situ de l'acti- vité acétylcholinestérasique au niveau de la plaque mo- trice par voie d'histophotométrie.....	 108
A.- Choix d'une réaction et principe des mesures histopho- tométriques.....	108
B.- Description de l'histophotomètre utilisé.....	112
C.- Préparation du matériel à l'étude et méthode.....	114
D.- Description sommaire de la plaque motrice colorée par la méthode au β -naphtylacétate et à la β -carbonaphtoxy- choline.....	115
E.- Mesure de l'activité estérasique au niveau de la plaque motrice par histophotométrie.....	118
F.- Conclusion du présent chapitre.....	124
 Chapitre huitième: Effet de l'aldrine sur l'activité cholinesté- rasique au niveau de la plaque motrice de la fibre mus- culaire de la langue.....	 126

	Pages
Chapitre neuvième: Etude de l'antagonisme d'action entre les hydrocarbures chlorés et les phosphates organiques au niveau de la plaque motrice.....	138
Conclusions générales.....	141
Bibliographie.....	146

INTRODUCTION

Avant de passer à l'étude des hydrocarbures chlorés et des phosphates organiques, deux classes de composés possédant les propriétés des poisons névrotiques, il est bon de définir le mode de transmission de l'influx nerveux à la synapse myoneurale et le rôle de l'acétylcholine à cet endroit.

L'analyse de la transmission au niveau de la synapse myoneurale ou plaque motrice chez les mammifères, révèle quatre stades successifs, à savoir: a) le mode d'action par lequel l'influx nerveux donne naissance à l'agent médiateur, b) la nature du médiateur, son mode d'action et son inactivation subséquente, c) les variations locales de potentiel électrique à la région de la synapse myoneurale, d) le point de départ de l'influx vers le muscle provenant de ces changements locaux à la synapse.

A la suite des travaux de DuBois-Reymond, publiés en 1843, les biologistes ont associé le phénomène de la conductibilité chez les êtres vivants au concept de courant électrique. A la fin du siècle dernier, on a prouvé de façon définitive l'existence d'une membrane semi-perméable entourant les cellules. Le rôle d'une telle membrane délimitant les cellules nerveuses et musculaires prend une grande importance dans la genèse des potentiels d'action. Selon cette théorie, le nerf ou le muscle est enfermé à l'intérieur d'une membrane polarisée portant une charge positive à l'extérieur et une charge négative à l'intérieur. Si un stimulus quelconque parvient en un point donné de la membrane, la résistance diminue à ce point et la perméabilité augmente. Un mouvement d'ions s'accomplit conduisant à

une dépolarisation du point stimulé. Grâce à cette différence de potentiel entre le point stimulé et le point encore au repos, de faibles courants électriques prennent naissance stimulant la région voisine et ainsi de suite.

À la suite des travaux de Curtis et Cole (31) et Hodgkin et Huxley (77), nous connaissons beaucoup mieux la nature des courants d'action. Utilisant le cylindre-axe géant de Calmar, ces chercheurs ont constaté que durant le passage de l'influx, la charge électrique de chaque côté de la membrane est inversée. De négative, elle devient positive quand une électrode est implantée à l'intérieur de l'axoplasme. Le voltage du potentiel d'action est égal au double de celui du potentiel au repos. (Fig. 1)

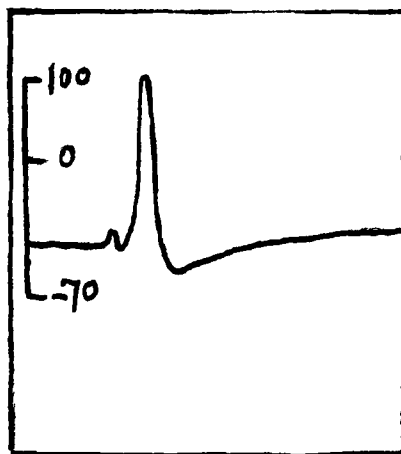


Figure 1

Potentiel d'action entre l'intérieur et l'extérieur de l'axoplasme de Calmar. L'échelle indique le potentiel de l'électrode à l'intérieur de la fibre, l'eau de mer dans laquelle baigne cette fibre représentant le potentiel zéro. (77)

Cette découverte semblait difficile à expliquer. Cependant, il était déjà connu que les cellules musculaires et nerveuses peuvent contrôler thermodynamiquement le passage des ions K^+ et Na^+ , l'ion K^+ étant plus concentré à l'intérieur de la cellule et l'ion Na^+ à l'extérieur. (154a) (107) (157)

A partir de ces données, Hodgkin et Katz (78) ont récemment proposé une explication très satisfaisante. L'amplitude du courant d'action dépend de la concentration extérieure de sodium tandis que le potentiel au repos n'est que peu ou pas sous sa dépendance. Inversement, la concentration environnante de potassium influence fortement le potentiel de la membrane au repos mais très peu l'amplitude du courant d'action. Donc, au repos, la membrane est beaucoup plus perméable à l'ion K^+ qu'à l'ion Na^+ tandis que durant la phase d'activité la perméabilité à l'égard de l'ion Na^+ augmente de beaucoup et devient environ vingt fois plus grande que la perméabilité initiale. Au repos, la membrane joue le rôle d'une électrode au potassium et rend l'intérieur négatif par rapport à l'extérieur. Durant la phase d'activité, la membrane a les caractéristiques d'une électrode au sodium rendant ainsi l'intérieur positif par rapport à l'extérieur. Utilisant le sodium radio-actif, Grundfest et Nachmansohn (60) ont démontré une addition de sodium à l'intérieur de la cellule et ce, de façon proportionnelle au taux de la stimulation.

On admet en général qu'à l'entrée d'un certain nombre d'ions Na^+ à l'intérieur de la cellule correspond la sortie d'un nombre équivalent d'ions K^+ . Ainsi est maintenu constant l'équilibre osmotique et électrostatique. (147) (90). Il est intéressant de souligner à ce point que depuis les travaux d'Overton, publiés en 1902, on savait que le nerf devenait

inexcitable en l'absence de sodium. Ce fait a été vérifié depuis par Kato (37) et Erlanger et Blair (47).

Le second problème qui se pose se résume ainsi: comment le courant d'action se transmet-il du nerf à la plaque motrice ou autre synapse? Il semble y avoir une discontinuité morphologique en cet endroit et la membrane semi-perméable vient à jouer un rôle très important. Pour confirmer cette théorie de la genèse des courants d'action et de leur transmission, il fallait admettre la nécessité de réactions chimiques capables de changer les propriétés de cette membrane et de la rendre soudainement perméable aux ions. Entre autres substances, Meyer (117) a déjà proposé l'acétylcholine comme étant capable de remplir ce rôle. Dale, Feldberg et Vogt (32) ont finalement mis en évidence le rôle de l'acétylcholine à la plaque motrice. La situation peut se résumer ainsi: l'acétylcholine est sécrétée sous l'influence des terminaisons nerveuses de la plaque motrice, à la suite du passage de l'influx. L'acétylcholine qui joue un rôle de médiateur, produit une dépolarisation à la plaque, créant ainsi un potentiel d'action local.

Les études poursuivies à l'aide du curare ont précisé la nature du rôle de l'acétylcholine à la plaque motrice. Il a été prouvé en effet que le curare prévient ou diminue l'action dépolarisante de l'acétylcholine appliquée localement. Apparemment les deux molécules se combinent avec les mêmes centres récepteurs sur la protéine de la membrane, le curare ayant toutefois une plus grande affinité pour ces centres (96). De plus, l'étude de l'excitabilité électrique chez l'animal curarisé a prouvé l'importance du rôle du médiateur chimique, l'acétylcholine. En dépit du fait que l'action de l'acétylcholine se trouve bloquée par la curarisation, la région de la plaque motrice peut encore répondre à un courant électrique appliqué

localement. (97). Ce qui revient à dire que passé le stade directement influencé par l'acétylcholine, la plaque motrice fonctionne normalement en dépit de l'effet curarisant. Car si les courants d'action étaient eux-mêmes les agents excitateurs primordiaux de la plaque motrice, alors dans le cas d'inhibition dû au curare, celle-ci devrait devenir plus résistante à l'action dépolarisante du courant électrique appliqué localement. La nicotine et une variété d'autres substances, (sans parenté de configuration moléculaire entre eux ou avec l'acétylcholine) dépolarisent spécifiquement la plaque motrice. Le curare agit de la même façon vis-à-vis de leur action dépolarisante. Ainsi donc, l'antagonisme d'action entre l'acétylcholine et le curare ne s'expliquerait pas uniquement sur la base d'une concurrence pour le même groupe récepteur. Par ailleurs, l'ion K^+ dépolarise et stimule la fibre musculaire quelque soit l'endroit de son application, et cette action stimulatrice n'est en rien prévenue par le curare (97).

Ainsi se pose la question de l'endroit où le médiateur est sécrété. Selon l'hypothèse la plus probable, il semble bien que l'acétylcholine soit libéré à la plaque motrice elle-même.(128). Il n'en existe pas de preuve directe. Cependant, l'acétylcholinestérase qui hydrolyse l'acétylcholine se trouve localisé à la plaque motrice même (27). Ce fait a été corroboré par Gouteaux (24) et Koelle et Friedenvald (92).

Selon toute évidence, le rôle de l'acétylcholine à la plaque motrice serait de provoquer la naissance d'un courant d'action local. (44). Eccles, Katz et Kuffler ont pu mettre en évidence et préciser la nature du potentiel d'action de la plaque motrice, qui se distingue du "spike" musculaire en ce qu'il s'abaisse ou s'affaiblit plus lentement. Pour établir clairement le rôle de l'acétylcholine dans la genèse du potentiel d'action de la plaque

motrice, il fallait que les inhibiteurs de la cholinestérase affectent également le potentiel d'action. Au moins trois inhibiteurs bien connus de l'acétylcholinestérase, l'ésérine, la prostigmine et le di-isopropyl-fluorophosphate diminuent ou abolissent le potentiel d'action de la plaque. (45).

Par ailleurs, on a pu démontrer qu'il existe un parallélisme strict entre la concentration d'acétylcholinestérase, le voltage et le nombre de plaques électriques par centimètre carré chez le poisson électrique *Electrophorus electricus*. (180).

La proportion linéaire qui existe entre les phénomènes de transmission d'ordre physique et ceux d'ordre chimique suggère la relation directe qui existerait entre eux. Il est bien connu que les organes électriques de ces animaux (*Electrophorus electricus*, *Torpedo marmorata*) présentent des analogies avec le muscle strié et ont une origine phylogénétique commune. Bien plus, l'électrolème entourant les terminaisons nerveuses dans l'appareil électrique présente une structure en bâtonnets appelée la palissade de Remak. Gouteux, ainsi que nous l'exposerons plus loin, a souligné la présence d'une membrane semblable entourant les terminaisons nerveuses de la plaque motrice (24). Il se trouve donc en plus de l'analogie physiologique une homologie de structure.

Il existait cependant un dernier point à éclaircir pour bien prouver la thèse de la médiation chimique de l'acétylcholine au cours de la genèse du potentiel d'action local. C'est que le médiateur doit être détruit très rapidement, étant donné la vitesse des réactions qui caractérise le passage de l'influx nerveux. L'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase a précisément une vitesse de renouvellement de vingt

millions par minute. L'enzyme purifié provenant de l'organe électrique de *Electrophorus electricus* a un poids moléculaire connu et il a été démontré qu'une molécule d'enzyme peut hydrolyser une molécule d'acétylcholine dans environ trois à quatre microsecondes. (148). Ce taux remarquablement élevé de l'hydrolyse de l'acétylcholine permet d'associer ce composé aux manifestations électriques qui caractérisent le passage de l'influx nerveux. En effet, il a été calculé que toutes réactions chimiques pouvant jouer un rôle dans la transmission de l'influx nerveux devaient s'accomplir dans les limites de cent microsecondes. La très grande vitesse de renouvellement de l'acétylcholinestérase remplit ces conditions. (127).

Nous étudierons dans la seconde partie de ce travail le problème de la localisation histologique de l'acétylcholinestérase. Qu'il suffise de dire pour le moment qu'une très forte concentration d'enzyme a toujours été retrouvée dans les endroits où était secrétée l'acétylcholine, et plus particulièrement dans les régions où abondent les corps cellulaires et les synapses. Dans les fibres préganglionnaires du sympathique de la région cervicale du chat, une quantité de 50 à 70 mg d'acétylcholine peut être hydrolysée par heure tandis que dans la région ganglionnaire, cette même quantité peut atteindre de 400 à 600 mg. De la même façon, la substance grise du cerveau des mammifères peut hydrolyser jusqu'à 400 mg d'acétylcholine tandis qu'en présence de la substance blanche on obtient des valeurs ordinairement inférieures à 10 mg. (126). Enfin, Marnay et Nachmansohn (108)(109) (110) ont démontré qu'il existait une très forte concentration d'enzyme à la plaque motrice. De ces études, ils ont pu conclure que durant une milliseconde, une seule plaque motrice du sartorius de la grenouille peut hydrolyser environ 1.6×10^9 molécules d'acétylcholine.

PREMIERE PARTIE

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

CHAPITRE PREMIER

CLASSIFICATION DES ESTERASES

Parmi les estérases d'importance physiologique capitale se rangent les cholinestérases, la choline acétylase, les estérases non spécifiques et les lipases. Aucun groupe d'enzymes n'a peut-être été plus étudié que les estérases, tant d'un point de vue biochimique que d'un point de vue physiologique.

A.- LE GROUPE DES CHOLINESTERASES SENSIBLES A L'ACTION DE L'ESERINE.

Le groupe des cholinestérases se distingue des autres estérases par leur sensibilité vis-à-vis de l'ésérine ou physostigmine à faibles concentrations. Dans des conditions expérimentales bien définies (114), l'ésérine à une concentration allant de 10^{-7} à 10^{-6} M peut provoquer une inhibition d'activité variant entre 90 et 100 pour cent. Au contraire, la même drogue n'inactive les autres estérases qu'à des concentrations approchant 10^{-3} M. (61) (124). L'action de la prostigmine se compare à celle de l'ésérine bien que le mécanisme de l'inhibition soit sensiblement différent.(69).

Donc, les cholinestérases se distinguent des autres estérases par leur sensibilité à l'égard de l'ésérine et de la prostigmine. Cependant, il a été démontré que deux enzymes différents peuvent hydrolyser préférentiellement l'acétylcholine, tout en étant sensibles à l'action de l'ésérine. Ces deux enzymes sont ordinairement décrites dans la littérature scientifique sous les noms d'acétylcholinestérase et cholinestérase ainsi que l'ont proposé Augustinsson et Nachmansohn. Un très grand nombre de synonymes d'acé-

tylcholinestérase peut se rencontrer à travers les publications, entre autres, cholinestérase vraie ou cholinestérase spécifique et cholinestérase du système nerveux ou musculaire. Par ailleurs, butyrylcholinestérase, pseudocholinestérase, cholinestérase du sérum s'emploient indifféremment au lieu de cholinestérase. Au cours du présent travail, nous adopterons la terminologie qu'ont proposée Augustinsson et Nachmansohn, à savoir acétylcholinestérase et cholinestérase.

Il existe plusieurs critères qui permettent de distinguer entre une activité enzymatique due à l'acétylcholinestérase ou à la cholinestérase. L'acétylcholinestérase hydrolyse l'acétylcholine à un taux plus élevé quand le substrat est à faible concentration, manifestant un maximum d'activité qui, par la suite, décroît avec une augmentation de la concentration du substrat. Ainsi, l'activité enzymatique étudiée en fonction de la concentration de l'acétylcholine se traduit par une courbe en forme de cloche très caractéristique. (5). De plus, le taux d'hydrolyse de l'ester décroît avec un accroissement du nombre d'atomes de carbone du résidu acide de la molécule. En effet, la propionylcholine est hydrolysée à un faible taux, la butyrylcholine très lentement ou pas du tout. Enfin, l'acétyl- β -méthylcholine est attaquée par l'acétylcholinestérase et peu ou pas par la cholinestérase.

Par ailleurs, la cholinestérase, hydrolysant les esters de la choline tout en étant sensible à l'action de l'ésérine, n'est pas caractérisée par un taux d'hydrolyse optimum en fonction de la concentration du substrat. Au contraire, cette courbe d'activité passe par un maximum reproduisant ainsi la courbe classique déjà décrite par Michaelis et Menten pour la plupart des enzymes. (118). De plus, contrairement à l'acétylcholinestérase, la choli-

nestérase hydrolyse plus rapidement les esters de la choline quand le nombre d'atomes de carbone du résidu acide passe de deux à quatre. Cet enzyme n'hydrolyse pas l'acétyl- β -méthylcholine mais un autre substrat que par opposition l'acétylcholinestérase n'hydrolyse pas, la benzoylcholine. Enfin, Seligman et ses collaborateurs ont proposé l'emploi d'un autre substrat spécifique pour la cholinestérase, la β -carbonaphtoxycholine. (139). Le di-isopropylfluorophosphate permet également d'établir une distinction entre une activité due à l'acétylcholinestérase ou à la cholinestérase. En effet, Koelle a démontré que ce toxique inhibe l'activité de la seconde à une concentration de $10^{-7}M$, tandis qu'à la même concentration, l'activité de l'acétylcholinestérase demeure normale. (94). Le Nu 683 (diméthylcarbamate de bromure de 2-hydroxyphényl-benzyl-triméthylammonium) permet également d'établir une distinction entre l'acétylcholinestérase et les autres enzymes qui hydrolysent la butyrylcholine (123). Par contre, il n'est pas possible de caractériser les deux enzymes en regard de la température optimum d'activité. Les deux manifestent un maximum d'activité entre 37° et 40° . (51).

L'étude des différents tissus de l'organisme a révélé que le lieu d'extraction de l'enzyme pouvait jusqu'à un certain point laisser prévoir la nature de cet enzyme. (3A). Ainsi le tissu nerveux chez la plupart des vertébrés et des invertébrés est caractérisé par une haute teneur en acétylcholinestérase. Cette remarque s'applique tant au système nerveux central qu'au système nerveux périphérique. Les muscles renferment surtout de l'acétylcholinestérase, notamment au niveau des plaques motrices. L'appareil électrique qui, chez certains Poissons, a évolué phylogénétiquement à partir du muscle strié est également caractérisé par la présence du même enzyme.

Il en va ainsi des érythrocytes chez presque tous les animaux, sauf chez les Oiseaux et les Poissons où il en est peu tandis que le plasma en est riche. D'importantes sources d'acétylcholinestérase se retrouvent également dans le thymus, la rate, la moelle rouge, les nodules lymphatiques et le cortex surrénalien. On peut faire la même remarque à l'égard du venin des Colubridés. Par ailleurs, le venin des Vipéridés en est pauvre ou dépourvu.

En parallèle, on peut dire que certains autres organes, tissus ou liquides biologiques, sont caractérisés par une prédominance de la cholinestérase. Ainsi, par exemple, le plasma sanguin chez la plupart des espèces animales, notamment chez le cheval, est reconnu pour sa haute teneur en cholinestérase. Chez l'homme, le taux de l'enzyme sérique varie beaucoup d'un individu à l'autre et il est à peu près impossible d'établir une moyenne probable, mais la plus grande partie de l'activité enzymatique est due à la cholinestérase. La même cholinestérase se retrouve dans le pancréas, l'ovaire, la graisse brune, l'utérus, le foie, les testicules et le coeur, notamment chez le rat. Il en va de même de l'enzyme que l'on peut extraire des glandes salivaires d'un grand nombre d'animaux. Cependant, la présence de la cholinestérase n'a jamais été mise en évidence dans les tissus des Ruminants. Bien que l'on puisse prédire quelle sera la nature de l'enzyme en se basant sur son origine tissulaire, il serait illusoire d'accorder trop d'importance à ce critère. En effet, Myers (122) a attiré l'attention sur le fait que d'une espèce animale à l'autre, la nature de l'enzyme variait pour un même tissu. Il est donc impossible de définir la nature des cholinestérases, se basant uniquement sur leur lieu d'extraction.

Si l'importance du rôle de l'acétylcholinestérase au cours de la

transmission de l'influx nerveux apparaît évidente, il n'en va pas de même du rôle de la cholinestérase non spécifique. Dans le premier cas, ainsi que nous le verrons plus loin au cours de l'exposé sur les effets pharmacologiques des phosphates organiques, l'inhibition totale de l'activité acétylcholinestérasique s'avère toujours fatale. L'inhibition de la cholinestérase du sérum ne produit pas les mêmes effets. L'enzyme complètement inactivé, il ne se manifeste aucun symptôme d'accumulation d'acétylcholine au sein des tissus et l'issue n'est pas mortelle. (68)(70). De plus, l'acétylcholinestérase a été retrouvée chez toutes les espèces animales. Mais la cholinestérase n'a jamais été mise en évidence chez les Bovidés. (61) (115) Par ailleurs, la cholinestérase du cœur chez le rat est très active tandis qu'elle est très peu active chez le hamster et pas du tout chez l'écureuil. (134)

Tout récemment, on a démontré que la propionylcholine pouvait jouer le rôle de médiateur neuro-humoral. (7). A cause de la présence de cet ester dans les tissus, on serait porté à attribuer un rôle prépondérant à la cholinestérase puisque cet enzyme hydrolyse la propionylcholine plus rapidement que l'acétylcholine et puisque de plus il manifeste une plus grande affinité pour le premier de ces esters que l'acétylcholinestérase.

Par ailleurs, chez des sujets normaux ou atteints⁵ de myasthenia gravis, le di-isopropylfluorophosphate exerce un effet sur le système nerveux central et la musculature gastro-intestinale à des concentrations trop faibles pour modifier la transmission neuro-musculaire. (22). Récemment, Koelle et ses collaborateurs ont démontré que le di-isopropylfluorophosphate entre des concentrations de 10^{-8} et 10^{-6} M n'inactive pas l'acétylcholinestérase, mais que par ailleurs, il inhibe fortement la cholinestérase de l'iléon. Dans ces

conditions, le tonus musculaire s'accroît et occasionnellement l'amplitude des contractions augmente. (94). A la lumière de cette expérience, on serait tenté d'attribuer un rôle auxiliaire à la cholinestérase, hydrolysant l'acétylcholine libérée sur place au niveau des ganglions ou de certains autres organes dont le muscle longitudinal de l'iléon.

B.- LA CHOLINE ACÉTYLASE.

Il a déjà été trouvé que l'acétylcholinestérase peut non seulement catalyser l'hydrolyse de l'acétylcholine, mais également la réaction d'estérification. (76). Cependant, en 1943, Nachmansohn et Machado ont préparé un extrait de cerveau débarrassé de tout élément cellulaire et pouvant catalyser la réaction d'estérification en présence d'adénosine triphosphate (ATP). L'addition de fluorure favorise la réaction de synthèse en protégeant l'ATP contre l'action de l'adénosinetriphosphatase. (133). La réaction de synthèse est inactivée rapidement par dialyse. Le co-enzyme s'apparente au co-enzyme A. (105) (103) (129). Une étude plus détaillée de Lipmann et ses collaborateurs a révélé que le co-enzyme contient de l'acide pantothénique. (104).

La choline acétylase a été retrouvée dans tous les tissus spécialisés en vue de la conductibilité, tant chez les vertébrés que chez les invertébrés. L'enzyme se retrouve dans les nerfs moteurs et sensoriels. Quand ces derniers entrent en dégénérescence après section, l'enzyme disparaît et la chute d'activité s'accomplit de façon parallèle aux changements morphologiques. (131). Nous ne savons pas encore de façon précise comment l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase et la choline acétylase s'intègrent dans le cycle métabolique de la cellule nerveuse. On admet

hypothétiquement que l'ester, au repos, est présent dans les tissus sous forme inactive probablement lié à une protéine ou une lipoprotéine et protégé ainsi contre l'action de l'acétylcholinestérase. S'il advient qu'un stimulus quelconque détruise le complexe acétylcholine-protéine, l'ester est libéré. Après avoir joué son rôle de médiateur chimique, il est hydrolysé par l'acétylcholinestérase et la membrane protéinique retourne à son état initial. Durant la phase de recouvrement, ou la phase de repos, la choline acétylase continue à synthétiser l'acétylcholine. Ainsi que nous l'avons déjà souligné, l'hydrolyse de l'acétylcholine s'accomplit à un taux très rapide, ce qui cadre bien avec la vitesse de l'influx nerveux. Par ailleurs, le processus de synthèse est beaucoup plus lent, mais probablement continu.

C.- LE GROUPE DES ESTERASES NON SPECIFIQUES.

Le second groupe d'estérases d'importance physiologique notable comprend les enzymes qui ne sont pas sensibles à l'action de l'ésérine. Ils peuvent être groupés sous deux chefs, les estérases proprement dites qui hydrolysent préférentiellement les esters à faible poids moléculaire, comme le méthylbutyrate, l'éthylbutyrate, la tributyrine et la triacétine, et les lipases qui hydrolysent préférentiellement les graisses. Richter et Croft (143) ont proposé le nom d'aliestérase pour les enzymes hydrolysant les esters aliphatiques à faible poids moléculaire et les glycérides. Cette distinction n'est que relative car il a été établi que l'affinité des lipases pour les glycérides augmente en fonction du nombre de résidus d'acide gras sur le glycérol ou encore avec le nombre d'atomes de carbone du

résidu acide. (151). L'affinité des lipases et des estérases pour l'huile d'olive, la tributyrine et le méthylbutyrate est fort différente. Ainsi, un gramme de poudre pancréatique hydrolyse l'huile d'olive à un taux correspondant au taux d'hydrolyse que provoquent 10600 grammes d'une même poudre extraite du foie, La tributyrine, a un taux correspondant à celui de 100 grammes d'une poudre hépatique et le méthylbutyrate, à un taux correspondant à celui de 0.4 gramme de la même poudre. (173).

La leucylglycylglycine active la lipase pancréatique dans un rapport de plusieurs centaines de fois pourcent, tandis que l'estérase hépatique n'est pas activée par ce tripeptide. (173) (34). La sensibilité des estérases et des lipases à l'égard de l'atoxyl et de la quinine permet d'établir une distinction entre elles. (146). En effet, la lipase pancréatique est résistante à l'action de l'atoxyl mais sensible à celle de la quinine, tandis qu'inversement l'estérase hépatique est sensible à l'action de l'atoxyl mais résistante à celle de la quinine. Enfin, on peut ajouter que chez les animaux normaux, il n'y a pas de quantité appréciable de lipase dans le sang. (161) (52). Zumoo (180) et Gytoku (62) ont démontré qu'après purification, la lipase pancréatique devenait moins sensible à l'action de la quinine. De la même façon la lipase de la peau normalement insensible à l'action de l'atoxyl et de la quinine, peut le devenir après dialyse. (178). Il semble y avoir une grande similitude entre l'estérase du foie et la lipase pancréatique. Si l'on injecte un lapin avec une préparation de lipase pancréatique, on retrouve une très grande activité estérasique au niveau du foie. (170). L'estérase hépatique récupérée possède les mêmes propriétés que l'estérase provenant de l'animal normal: inactivation

par l'atoxyl et résistance vis-à-vis de la quinine ainsi que faible activité en présence d'huile d'olive. Au contraire, la préparation pancréatique injectée possédait toutes les propriétés caractéristiques des lipases. On avait cru que la lipase pouvait être transformée métaboliquement en estérases. Kraut et Pantschenko-Jurewicz (95) ont pu démontrer que les enzymes du pancréas et du foie sont caractérisés par le même co-enzyme et diffèrent seulement entre eux par leur apo-enzyme. Si une préparation d'estérase hépatique manifestant une faible activité est combinée à une préparation de lipase pancréatique riche en co-enzyme, il y a formation d'un nouveau système estérase possédant une plus grande activité. Au sein du groupe des estérases, on a tenté de définir un enzyme qui hydrolyse préférentiellement les esters dont le résidu acide est l'acide acétique. Cet enzyme se retrouve plus fréquemment chez les plantes que chez les animaux. (82) (83). La nature de l'alcool ne semble exercer aucune influence sur le taux d'hydrolyse. Si le résidu acide est autre que l'acide acétique, alors le taux d'hydrolyse diminue très rapidement. Cet enzyme attaque également l'acétylcholine. Cependant, il s'agit bien de deux enzymes différents puisque l'acétylestérase n'est pas inhibée par l'ésérine à faible concentration contrairement à l'acétylcholinestérase. Par ailleurs, les deux enzymes sont inhibés par les phosphates organiques ce qui indiquerait un mécanisme enzymatique semblable. Parmi les phosphates étudiés, se rangent le di-isopropylfluorophosphate, le tétraéthylpyrophosphate et l'hexaéthyltétraposphate. Dans le cas de l'inhibition au di-isopropylfluorophosphate, le complexe enzyme-inhibiteur est irréversible, tandis que dans les deux derniers cas, on a noté une faible réversibilité.

CHAPITRE DEUXIEME

DONNEES RECENTES SUR LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES DES HYDROCARBURES CHLORES ET DES PHOSPHATES ORGANIQUES.

A.- DES HYDROCARBURES CHLORES.

La découverte des propriétés insecticides des hydrocarbures chlorés a renouvelé l'intérêt des organiciens en leur synthèse et un grand nombre de nouveaux composés s'ajoutent constamment à une liste déjà longue, principalement depuis 1937.

Le dichloro-diphényl-trichlore-éthane (DDT) est le plus connu et certainement le plus ancien parmi les hydrocarbures chlorés jouissant de propriétés insecticides. Ce composé a déjà rendu de grands services à la médecine. En effet, lorsque se déclara l'épidémie de typhus à Naples en 1944, un million trois cent mille personnes furent traitées au DDT, grâce aux soins des autorités militaires américaines. En trois semaines, l'épidémie fut jugulée, ce qui constitue un fait sans précédent dans les annales médicales.

Les hydrocarbures chlorés aromatiques et polycycliques possèdent les propriétés des toxiques neuromusculaires. Le DDT notamment présente des analogies avec les poisons névrotiques déjà connus. La plupart de nos connaissances à ce sujet proviennent d'études poursuivies chez l'insecte. Tobias et Kollros (164) ont pu démontrer la symptomatologie suivante chez *Periplaneta americana*: extension des membres, perte du réflexe de posture, tremblements, convulsions et coma, tandis que le coeur peut continuer de battre durant un jour et même plus. La décapitation ne semble en rien affecter les manifestations décrites ci-haut; indiquant que le DDT a peu ou pas d'action sur le

système nerveux central. Cependant, l'ablation du ganglion qui contrôle les membres postérieurs abolit les manifestations névrotiques au niveau des membres correspondants. Que le DDT agisse surtout sur le système nerveux périphérique a été prouvé de façon encore plus élégante par Roeder et Weiant (145) chez *Periplaneta americana*. Une émulsion de DDT à raison de deux pour cent ou encore des cristaux appliqués directement sur le nerf isolé est sans effet et ne cause aucun changement de l'activité électrique. Par ailleurs, une émulsion contenant 1,600 p.p.m. appliquée directement sur le muscle produit des contractions et des convulsions, ce qui indiquerait une action directe sur la fibre musculaire ou la synapse myoneurale.

Chez les mammifères, les premières manifestations sont caractérisées par des convulsions musculaires dans la région du cou progressant vers la partie postérieure de l'animal. Avec l'intoxication progressive apparaît une dépression profonde qui se termine par un arrêt respiratoire survenant entre deux et vingt-quatre heures après le début des convulsions. (137). Il est bien probable que chez l'homme, l'empoisonnement au DDT s'accompagne des mêmes symptômes bien qu'aucune étude approfondie n'ait été publiée.

Les convulsions que provoque le DDT semblent être le résultat direct d'une action sur la synapse myoneurale (179) quand par ailleurs, les nerfs moteurs affichent une plus grande sensibilité que les nerfs sensoriels. Carey et ses collaborateurs (20) ont cru décerner une lésion au niveau de la plaque motrice chez les rats exposés au DDT. L'action toxique se manifeste par une dégénérescence de la plaque elle-même et une atrophie des fibres musculaires. Eu égard à la symptomatologie, cette thèse apparaissait bien séduisante. Il semblerait cependant, que les critères expérimentaux de Carey et de ses collaborateurs étaient erronés et que leurs conclusions étaient vraisemblablement

entachées d'erreur.

Par ailleurs, l'ésérine augmente la toxicité du DDT. (16). Cette observation indiquerait que celui-ci inhibe l'acétylcholinestérase. Cependant, il n'en est pas ainsi. (142) 169). Ce fait est d'autant plus surprenant qu'à la suite d'injections de DDT, l'acétylcholine libre augmente dans l'organisme. Mais l'ion potassium cause la même augmentation et ne possède aucune propriété anticholinestérasique. Dans les deux cas, il s'agirait probablement d'une libération d'acétylcholine à partir du complexe acétylcholine-lipoprotéine. (165).

Le DDT exerce également une action marquée sur la rythmicité cardiaque. Il est bien connu en effet que le DDT provoque une surexcitabilité du myocarde. Chez l'animal intoxiqué, une excitation du système sympathique cause une fibrillation ventriculaire. (138). Ce phénomène peut être mis en évidence à la suite d'une injection d'adrénaline. L'excitabilité du myocarde devient assez aigüe pour provoquer une mort subite.

Enfin, le DDT augmente l'activité du cortex cérébral et l'enregistrement des ondes produites se compare à celles qui sont reproduites au cours de l'épilepsie. Il en va de même de l'activité électrique du cervelet qui augmente de cinq à six fois. (30).

L'intoxication par un autre hydrocarbure chloré apparenté au DDT, l'aldrine, est caractérisée par des symptômes de même nature, notamment par des troubles gastro-intestinaux et des vomissements, ainsi que par une surexcitabilité et des convulsions. Chez la grenouille, (171) l'administration d'aldrine cause des contractions musculaires intenses suivies de convulsions. La section du sciatique prévient ces mouvements convulsifs au niveau du mem-

bre correspondant. A la suite d'application cutanée du toxique chez le rat, les mêmes manifestations se retrouvent. Suivant l'ingestion de fortes doses, l'issue est généralement fatale, la mort étant causée par l'arrêt du coeur ou de la respiration. L'incoordination musculaire et les convulsions ont également été notées par Hayes et ses collaborateurs (73). De plus, l'aldrine provoque une bradycardie, une vasodépression et une miosis intense. Ce même composé augmente les effets d'une stimulation du vague sur le coeur ainsi que les effets sécrétoires et vasodilatateurs faisant suite à une stimulation de la chorde tympani. Tout aussi bien le toxique accentue les effets d'une injection d'acétylcholine sur les glandes salivaires et sur la transmission neuromusculaire de la préparation sciatique-gastrocnémien chez le rat. L'excitabilité réflexe de la moelle épinière se trouve généralement augmentée, mais à la suite d'injections répétées cette même excitabilité diminue. (59).

Le dieldrine en injection intraveineuse ou intra-artérielle augmente l'excitabilité du système central accompagnée d'une excitabilité réflexe accrue, de convulsions, d'une bradycardie et d'une légère vasodépression. Le même composé accentue les effets de l'acétylcholine sur le système nerveux central, le système circulatoire et la mobilité intestinale. Par ailleurs, il exerce une action parasympathicomimétique, vraisemblablement à la suite d'une stimulation des centres plutôt qu'à la suite d'une action directe sur le système nerveux périphérique. (58). La plupart de ces effets sont minimisés à la suite d'une injection de nembutal. (137).

En dehors du système nerveux, les hydrocarbures chlorés peuvent causer de sérieux dommages à l'organisme. Ainsi, le DDD (dichloro-diphényl-dichloro-éthane) provoque une atrophie du cortex surrénalien. (168) (17).

Le chlordan cause une nécrose hépatique et une dégénérescence des tubes corticaux du rein, accompagnées de congestion et d'œdème pulmonaire. Dans ces cas, on a pu retrouver du chlore sous forme organique dans l'urine. (159).

Le métabolisme des hydrocarbures chlorés est peu connu. On sait que le DDT peut se transformer en DDD, son dérivé dichloroéthylène, et finalement en acide di-chlorophénylacétique qui est excrété dans l'urine. (174). La libération enzymatique de chlore à partir de composés organiques a été mise en évidence dans les tissus des animaux. (75). Cependant, cette libération enzymatique s'accomplit à partir de composés chlorés aliphatiques tandis qu'elle ne s'accomplit pas à partir de composés aromatiques. (15). Il est intéressant de souligner que lors de la dégradation du DDT, seuls les atomes de chlore fixés sur la chaîne aliphatique sont libérés tandis que ceux qui sont attachés aux noyaux benzéniques demeurent liés à la molécule. Il n'y a rien de connu sur le métabolisme des autres hydrocarbures chlorés.

Le mécanisme de l'action toxique des hydrocarbures chlorés est à peu près inconnu. Martin et Wain (111) ont proposé l'explication suivante: dans le cas du DDT, la déhydrohalogénéation donne naissance à de l'acide chlorhydrique qui altère la structure des centres vitaux. Mais il faut admettre qu'on ne connaît rien de la concentration d'acide chlorhydrique libéré au niveau des tissus. De plus, un grand nombre d'hydrocarbures chlorés exercent une action toxique comparable à celle du DDT, sans que pour cela il ait été possible de démontrer la présence d'une réaction de déhydrohalogénéation.

La déposition des hydrocarbures chlorés dans l'organisme semble s'établir préférentiellement au niveau du tissu adipeux. Il en est ainsi du méthoxychlore (99), du DDT (81), qui peut également se fixer dans les ovaires, et de l'aldrine. (162). Dans ce dernier cas toutefois, d'appréciables quantités ont été retrouvées dans le foie et dans les reins.

L'étude de l'action des hydrocarbures chlorés sur les différents systèmes enzymatiques n'est pas très poussée. On sait toutefois que le DDT inhibe l'activité de l'anhydrase carbonique à des concentrations s'échelonnant entre 10^{-4} et 10^{-6} M. (89) (166). Par ailleurs, le même composé augmente l'activité du cytochrome oxydase. (167). Le même insecticide n'exerce aucune action sur les systèmes enzymatiques suivants: aldolase, adénosinetriphosphatase, déshydrogénase glutamique, choline oxydase, hexokinase, succinoxydase. (66). Au cours d'un travail publié plus récemment, il a cependant été prouvé que le DDT à des concentrations variant entre 10^{-4} et 10^{-5} M inhibait très fortement la succinoxydase extraite du coeur de rat. La même inhibition a été retrouvée vis-à-vis de la cytochrome oxydase, mais non vis-à-vis de la déshydrogénase succinique. Pour que le DDT exerce une action inhibitrice sur le système enzymatique, il devait être ajouté en solution alcoolique, tandis que sous forme d'émulsion, il causait une très légère inhibition du système succinoxydase, même à des concentrations dix fois plus élevées. Le DDA (acide di-chlorophénylacétique), produit de la dégradation métabolique du DDT, provoque une bien plus faible inhibition que celui-ci vis-à-vis des systèmes succinoxydase et cytochrome oxydase, même à une concentration de 5×10^{-4} M. (85a).

B.- DES PHOSPHATES ORGANIQUES.

Durant les quelques années qui ont précédé la dernière guerre, et notamment en Allemagne, les organiciens ont réalisé la synthèse d'un grand nombre de phosphates organiques, ou organophosphates, caractérisés par une très grande toxicité pour l'organisme animal. Au tout début d'une liste déjà longue se trouve le di-isopropylfluorophosphate (DFP) synthétisé par Lange et Krüger. (100). Puis Schrader (153) a rapporté la synthèse de l'hexaéthyltétraphosphate (HETP) qui est un liquide brun se décomposant entre 145 et 150 degrés. Par la suite, on a réussi la synthèse d'un grand nombre d'esters, entre autres le tétraéthylpyrophosphate (TEPP) qui est un corps miscible à l'eau et qui s'hydrolyse spontanément pour donner naissance à de l'acide di-éthyl-ortho-phosphorique (65), et le di-éthyl-paranitrophénylthiophosphate (parathion). Ce dernier se comporte comme une substance peu soluble dans l'eau et qui s'hydrolyse lentement en milieu alcalin pour donner naissance à du paranitrophénol et de l'acide di-ortho-phosphorique. (152).

Au cours du présent travail, il ne saurait être question d'énumérer tous les phosphates organiques dont la synthèse a été rapportée dans la littérature scientifique. Nous nous bornerons à étudier les propriétés pharmacologiques qu'ils partagent et le mécanisme par lequel s'exerce leur action toxique. Les phosphates organiques déjà décrits peuvent être divisés en trois classes: les phosphates organiques simples, les phosphates organiques complexes contenant du soufre ou du fluor dans leurs molécules et les phosphoramides. En règle générale, les propriétés pharmacologiques de tous ces esters se comparent à celles de l'ésérine. Chadwick et Hill (21)

ont justement fait remarquer que le HETP et le DFP provoquent l'apparition de symptômes en tout comparables à ceux qui font suite à l'injection d'ésérine chez l'insecte (*Periplaneta americana*). Roeder et Weiant (145) ont pu démontrer qu'à la suite d'application de DFP ($6 \times 10^{-4}M$) sur la corde nerveuse ventrale de *P. americana*, un stimulus préganglionnaire provoquait une réponse qui durait de 15 à 30 secondes ordinairement suivie d'une inhibition de 30 à 60 secondes. Le DFP n'occasionne pas un blocage permanent de la transmission nerveuse au niveau de la synapse, et son effet peut être aboli à la suite de lavages. Par ailleurs, la transmission nerveuse le long du cylindre-axe des fibres géantes de Calmar n'est pas troublée par le DFP à des concentrations atteignant $5 \times 10^{-3}M$. L'HETP à des concentrations entre $2,5 \times 10^{-7}$ et $7,5 \times 10^{-7}M$ inhibe la transmission de l'influx au niveau de la synapse, tandis qu'à une concentration de $7,5 \times 10^{-3}M$, il ne se manifeste aucun trouble de la conductibilité le long du cylindre-axe. (21). Il semblerait donc, qu'en règle générale, le toxique inhibe plus facilement la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses qu'au niveau des fibres.

Dans tous les cas d'empoisonnement fatal au TEPP, au DFP et au paraoxone, le taux d'acétylcholine augmente dans le cerveau chez le rat et même, dans les cas extrêmes d'intoxication, l'acétylcholine va jusqu'à apparaître dans le sang. Cette situation est tout à fait comparable à ce qui se passe dans les cas d'empoisonnement à l'ésérine. (158). En s'approchant des doses léthales, il se développe une bradycardie suivie d'une paralysie respiratoire apparaissant quelques minutes avant l'arrêt du cœur. (39) (150). Bien souvent ces manifestations toxiques s'accompagnent même de cyanose et d'œdème. (85). De tels symptômes sont caractéristiques d'une hyperactivité des récep-

teurs cholinergiques et ont attiré l'attention des chercheurs vers les propriétés anti-cholinestérasiques probables des phosphates organiques. En effet, dans tous les cas d'intoxication étudiés, on a retrouvé une inhibition de la cholinestérase et de l'acétylcholinestérase. (41) (43) (48) (63) (64) (74) (113) (149).

Restait à préciser quel était le récepteur ou les récepteurs cholinergiques dont l'hyperactivité entraînait la mort de l'animal. Il ne fait pas de doute que les phosphates organiques exercent une action anticholinestérasique au niveau des centres nerveux. (11) (154). Mais la mort de l'animal semble vraiment être due à un arrêt respiratoire. (63). Ceci a pu être mis en évidence grâce à l'étude comparée de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par un grand nombre de phosphates organiques. Tandis que l'inhibition de la cholinestérase du cerveau peut varier entre 5 et 100 pour cent selon le phosphate organique injecté, la mort résulte toujours d'une inhibition de l'acétylcholinestérase des muscles, conduisant à la paralysie respiratoire et à l'anoxie. Cette observation prend d'autant plus de valeur que la constitution chimique des six phosphates organiques injectés variait de l'un à l'autre: DFP, parathion, TEPP, éthyl-para-nitrophénylthionobenzène-phosphate (EPH), octanéthylpyrophosphoramide (OCPA), et enfin l'acide diéthoxythiophosphorique de 7-hydroxy-4-méthyl coumarin (E838) (49). Cependant, il ne fait pas de doute que les convulsions peuvent provenir d'une stimulation centrale secondaire causée par une paralysie respiratoire. En effet, à la suite de l'inactivation de l'acétylcholinestérase des muscles produisant une paralysie respiratoire, l'anoxie résultante induit des changements biochimiques dans le sang qui sont de nature à provoquer une stimu-

lation des centres nerveux. Dans cette ligne de pensée, il est intéressant de souligner que les phosphoramides se distinguent des autres phosphates organiques en exerçant une action presque sélective sur les récepteurs cholinergiques périphériques. (40). Enfin, l'atropine constitue un excellent contre-poison dans les cas d'empoisonnement dûs aux phosphates organiques, HETP, TEPP et parathion, pourvu que la dose administrée de phosphate n'excede pas la dose létale de plus de quarante pour cent. (35). Fawley et ses collaborateurs ont observé le même phénomène avec les phosphates organiques ci-haut cités et de plus avec le DFP, le E-838, l'EPN et l'OMPA. (49). De plus, dans le cas d'empoisonnement à l'EPN, la coramine augmente l'effet protecteur de l'atropine. (38).

Tous les phosphates organiques étudiés jusqu'à présent exercent une action inhibitrice sur l'acétylcholinestérase in-vitro. Dans le cas du TEPP, du HETP ou du paraoxone, le phosphate organique inhibe l'activité de l'enzyme directement, c'est-à-dire sans transformation métabolique. Dans d'autres cas, le phosphate organique doit subir une transformation avant de devenir un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. C'est le cas du parathion qui subit une transformation, soit sous l'influence des rayons ultra-violet (135), soit en présence d'un broyat de foie. (37). Dans les deux cas, la transformation chimique en fait un inhibiteur in-vitro de l'acétylcholinestérase. C'est également le cas de l'OMPA qui doit subir une dégradation métabolique avant de devenir un inhibiteur des cholinestérases in-vitro. (41). Cependant, le degré d'inhibition de l'activité cholinestérasique in-vitro, est souvent difficile à apprécier avec précision. Ceci est dû aux impuretés qui accompagnent les différentes préparations de phosphates organiques. Au premier rang se trouve le TEPP qui prend naissance par combinaison de deux molécules de diéthylphosphorylchlorure qui est le produit de dé-

part de toutes ces réactions de synthèse. (8).

De plus, certains inhibiteurs n'inactivent les cholinestérases qu'après une transformation dans l'organisme, ainsi que nous venons de le souligner. Il en résulte que les rats femelles sont beaucoup plus sensibles à l'action du parathion ou du E-658 que les rats mâles. Cette différence proviendrait de ce que les rats femelles transforment l'inhibiteur inactif en son isomère actif à un taux beaucoup plus rapide que les rats mâles. (59).

Les phosphates organiques n'inhibent pas uniquement l'acétylcholinestérase. Ils exercent la même action sur la cholinestérase, notamment la cholinestérase du sérum et l'aliestérase. Mendel et Meyers (116), ont démontré que l'ordre de sensibilité des estérases vis-à-vis du tri-ortho-crésylphosphate et de façon générale vis-à-vis des autres phosphates organiques, était le suivant: ali-estérase, cholinestérase et acétylcholinestérase. Mais encore une fois, il ne s'agit que d'une règle générale, et de grandes variations de sensibilité peuvent se retrouver en passant d'un phosphate organique à un autre.

Avant de passer à l'étude du complexe enzyme-inhibiteur, il est bon de souligner que l'action des phosphates organiques vis-à-vis des estérases est hautement sélective. Par exemple, le DFP est sans effet sur les enzymes suivantes: choline-déhydrogénase, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase, succinodéhydrogénase, acide lactique-déhydrogénase, alcool-déhydrogénase, hexokinase, amylase, diaphorase, anhydrase carbonique, et de façon générale, tout le système glycolytique du muscle (172). Par contre, on a signalé l'action inhibitrice du DFP sur la phosphatase alcaline du sérum, la pyrophosphatase de la levure, la lipase du lait (172), et l'acétylase de certaines plantes (84). Cependant, afin d'exercer une action inhibitrice

sur des systèmes enzymatiques autres que les cholinestérases, la concentration du DFP doit être de beaucoup plus élevée. Les phosphates organiques inhibent l'acétylcholinestérase, la cholinestérase et l'aliestérase quelque soit le lieu d'extraction de ces différents enzymes, système nerveux central ou périphérique, muscles, globules rouges, sérum, foie, et un grand nombre de glandes.

Le métabolisme des phosphates organiques n'est pas très bien connu. Mazur (112) a pu démontrer l'existence d'un enzyme qui hydrolyse le DFP dans les tissus des mammifères. Par ailleurs, Brauer (12) a fait réagir l'estérase du plasma humain avec l'HETP contenant du radio-phosphore. Il n'a pu retrouver de phosphore radioactif dans la protéine précipitée par l'alcool éthylique ou dans le dialysat. Il en a donc conclu qu'il ne semblait pas y avoir de combinaison stable entre l'estérase et le phosphore de l'HETP. Ces résultats sont en contradiction avec ceux que présentèrent Michel et Krop. (119). Dans les conditions expérimentales qu'adoptèrent ces chercheurs, l'acétylcholinestérase provenant de l'organe électrique de gymnote, réagit avec le DFP pour former un composé stable et non dissocié en présence d'acide trichloroacétique. De plus, l'acétylcholinestérase réagit avec le toxique selon une proportion définie, soit 2×10^{-10} molécules de DFP par unité arbitraire d'enzyme.

Cependant, la nature de l'inhibition due aux phosphates organiques n'a pu être élucidée clairement qu'à la lumière d'une meilleure connaissance de la molécule de l'enzyme. Grâce aux brillantes recherches d'Augustinsson, de Nachmansohn, de Bergman et de Wilson, nous savons un peu plus maintenant de la nature du phénomène d'hydrolyse que catalysent les cholinestérases.

(14) (9). Ces études ont révélé la présence de deux centres actifs à la sur-

face de l'enzyme. (18). L'un, le centre anionique réagit avec l'azote quaternaire de l'acétylcholine, tandis que le second appelé centre estérasique, contient lui deux groupes, l'un basique et l'autre acide. Le groupe basique réagit avec le carbone du groupe carbonyle, tandis que le groupe acide réagit avec l'oxygène du groupe carbonyle ou hydroxyle. C'est le second centre ou centre estérasique qui est responsable de la formation du complexe enzyme-substrat et partant, de la vitesse d'hydrolyse. Nous verrons plus loin comment la présence de ce centre estérasique a été mise en évidence.

L'existence du centre anionique a été étudiée à l'aide de l'ésérine. Ce composé inhibe l'hydrolyse de l'acétylcholine du fait que l'azote quaternaire formant la partie cationique de cette molécule entre en concurrence avec l'acétylcholine pour le groupement anionique de l'enzyme, provoquant ainsi l'inhibition. Ce mécanisme d'action a été élucidé à la suite d'une étude comparée de l'inhibition à différents pH en présence d'ésérine et de prostigmine. L'ésérine est complètement dissociée à pH 6 tandis qu'à pH 10, elle se comporte comme une base. Ainsi donc, son effet inhibiteur est particulièrement marqué aux environs de pH 6 ou 7, bien qu'il subsiste encore quand l'ésérine se trouve en présence de l'enzyme à un pH plus alcalin. La prostigmine qui est un sel d'ammonium quaternaire ne voit pas son action inhibitrice varier en fonction du pH.

Lors de l'hydrolyse enzymatique, Wilson et Nachmansohn (177) ont proposé une série de réactions intermédiaires, principalement la formation d'un enzyme acylé. Une brillante preuve expérimentale de cette hypothèse repose sur la démonstration d'un dégagement d'hydrogène sulfuré en présence d'acide thiolacétique. (176).

En présence de phosphates organiques au lieu d'avoir la formation d'un enzyme acylé, il y a formation d'un enzyme phosphorylé. Ceux-ci réagissent avec le groupe basique du centre estérasique pour donner naissance à un enzyme inactif. L'enzyme inactivé cependant réagit lentement avec l'eau, la choline ou l'hydroxylamine. Seul la lenteur de la réaction de l'enzyme avec l'eau fait passer le TEPP du rang de substrat à celui d'inhibiteur. La réaction avec la choline ou l'hydroxylamine est plus rapide. Bien que l'activité de l'enzyme ne puisse être restaurée par dilution ou dialyse, l'inhibition n'en demeure pas moins du type réversible. La réactivation à l'aide de l'hydroxylamine repose sur une heureuse différence entre le taux auquel est enzyme est inactivé par celle-ci et le taux auquel l'enzyme phosphorylé est transformé en un enzyme actif. L'existence d'un centre anionique sur la molécule de l'enzyme facilite la réactivation due à la choline. C'est d'ailleurs avec ce dernier réactif que l'on obtient les meilleures réactivations. (174a).

Le problème de la réversibilité de l'inhibition soulève la question suivante: quand une dose sub-léthale de phosphate organique est injectée à l'animal, doit-on attribuer le retour de l'activité cholinestérasique à la réactivation de l'enzyme ou à la synthèse de nouvelles molécules? Chez l'animal intact, si le retour à la normale de l'activité enzymatique s'établissait toujours à un même taux à la suite d'une inhibition, quelque soit l'agent inhibiteur injecté, on pourrait conclure que le facteur limitant serait exclusivement la synthèse de nouvelles molécules d'enzyme. Cependant, il n'en est pas ainsi. Le taux normal d'activité prend un temps différent à se rétablir suivant le phosphate organique injecté. (19) (43). Par ailleurs,

Koelle et Gilman (93) ont prouvé que la régénération de la cholinestérase du sérum chez l'homme s'accomplit en dix jours à la suite d'une inhibition au DFP. Dans le cas de l'inhibition au di-éthyl-para-nitrophénylphosphate (E600) le retour à la normale s'accomplit en un jour tant in vivo qu'in vitro, chez le rat. Le retour à la normale de l'acétylcholinestérase, par contre, s'accomplit en quatre jours. (33). Or, Sprinson et Rittenberg (156) ont établi expérimentalement que le demi-temps de synthèse des protéines du sérum chez le rat est d'environ sept jours. Dans le cas de l'inhibition au DFP, on peut penser que la synthèse de nouvelles molécules d'enzyme ne joue pas un rôle négligeable. Dans le cas de l'inhibition à E-600, on doit admettre que le retour à la normale est trop rapide pour être dû à la synthèse de nouvelles molécules, surtout quand il s'agit de la cholinestérase du sérum. Dans le cas de l'inhibition due au TEPP, le phénomène de la réversibilité a d'ailleurs été confirmé par Aldridge (2).

CHAPITRE TROISIEME

RECHERCHES A PROPOS DE L'ACTION DES HYDROCARBURES CHLORÉS SUR L'ACTIVITE ESTERASIQUE

Nous avons vu au cours du chapitre précédent qu'à la suite d'injection d'hydrocarbures chlorés aromatiques, dont le DDT et l'aldrine, la symptomatologie qui apparaît se compare à celle que provoquent les poisons névrotiques. A cause de ce parallélisme, il était intéressant d'étudier l'action de l'aldrine sur l'acétylcholinestérase des globules rouges, tant il est vrai que l'enzyme de ces cellules se comparent à celui du système nerveux central ou périphérique.

Par ailleurs, Ellis, Sanders et Bodansky (46) ainsi que Brauer et Root (13)(14) ont démontré que les hydrocarbures chlorés aliphatiques, tels que le tétrachlorure de carbone et le chloroforme, diminuent le taux d'activité des estérases sériques chez la plupart des espèces animales. L'aldrine et certains autres composés chimiques apparentés possèdent les propriétés toxiques usuelles des hydrocarbures chlorés, comme par exemple, la propriété de causer des lésions hépatiques chez les mammifères. (14). En plus de l'action anti-cholinestérasique possible des hydrocarbures chlorés, il devenait donc intéressant de vérifier l'effet de ces composés sur l'activité estérasique du sérum. En effet, de nombreuses expériences ont prouvé qu'il s'établissait un parallélisme entre une chute de l'activité estérasique et la présence à divers degrés de lésions hépatiques.

A.- ACTION DE L'ALDRINE SUR L'ACTIVITE ESTERASIQUE DU SERUM.

1.- Etude de la réaction de Gomori appliquée à la mesure de l'activité estérasique du sérum chez le rat.

Au cours de nos recherches à propos de l'action des hydrocarbures chlorés sur l'activité estérasique du sérum, nous avons déterminé les taux d'activité à l'aide de la méthode de Gomori (54). Le principe de cette méthode repose sur la détermination du phénol libéré à la suite de l'hydrolyse du benzoate de phényl qui sert de substrat. Le phénol libéré est mesuré par colorimétrie en présence d'un sel de diazonium (1). La coloration qui se développe est stable pour plusieurs heures à la température du laboratoire.

En coupant le bout de la queue du rat, il est possible de recueillir directement le sang dans un tube capillaire de 10 cm de long et d'un diamètre intérieur de 1.5 mm. Après centrifugation, nous avons soutiré 3.0 μ l de sérum à l'aide d'une micropipette. Pour chaque détermination, nous avons apporté une correction intégrant à la fois la valeur du phénol libéré par hydrolyse spontanée aussi bien que celle du phénol libre ou autres composés phénoliques présents dans le sang.

TABLÉAU I

Effet de l'ésérine sur l'hydrolyse du phénylbenzoate par l'estérase sérique.

Concentration de l'ésérine (logarithme négatif de la concentration)	Pourcentage d'inhibition
3	0
6	2
8	59
4	100

(1) "DuPont Red B Salt, diazotized-5-nitro-2-amino anizole".

L'activité enzymatique déterminée à l'aide de cette méthode révèle la présence des estérases non spécifiques et de la lipase, bien que dans le sang, l'activité due à cet enzyme soit négligeable. (52)(161).

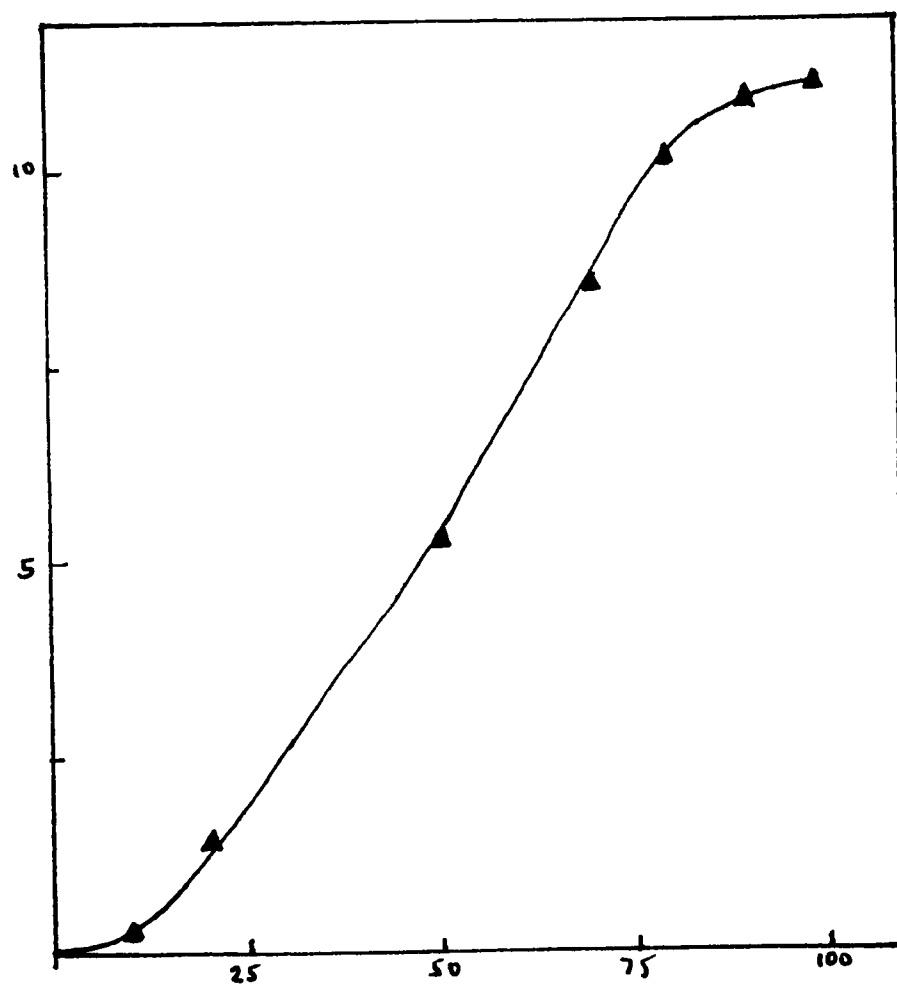


Figure 8

Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique. En abscisse: pourcentage de la solution saturée. En ordonnée: activité enzymatique (μ g de phénol libéré par heure).

La méthode de Gomori n'avait jamais été employée pour mesurer l'activité estérasique du sérum chez le rat. Au départ, nous avons donc

tenu à vérifier si l'ésérine à faible concentration pouvait inhiber l'activité enzymatique. A l'examen du tableau I, on peut constater que l'ésérine incubée en présence de l'enzyme durant quinze minutes à la température du laboratoire ne parvient à diminuer le taux de la réaction de façon sensible qu'à une concentration de 10^{-5} M. On peut donc conclure que la cholinestérase du sérum ne joue aucun rôle lors de l'hydrolyse enzymatique du benzoate de phényl chez le rat, celle-ci étant déjà inhibée à une concentration de 10^{-7} M.

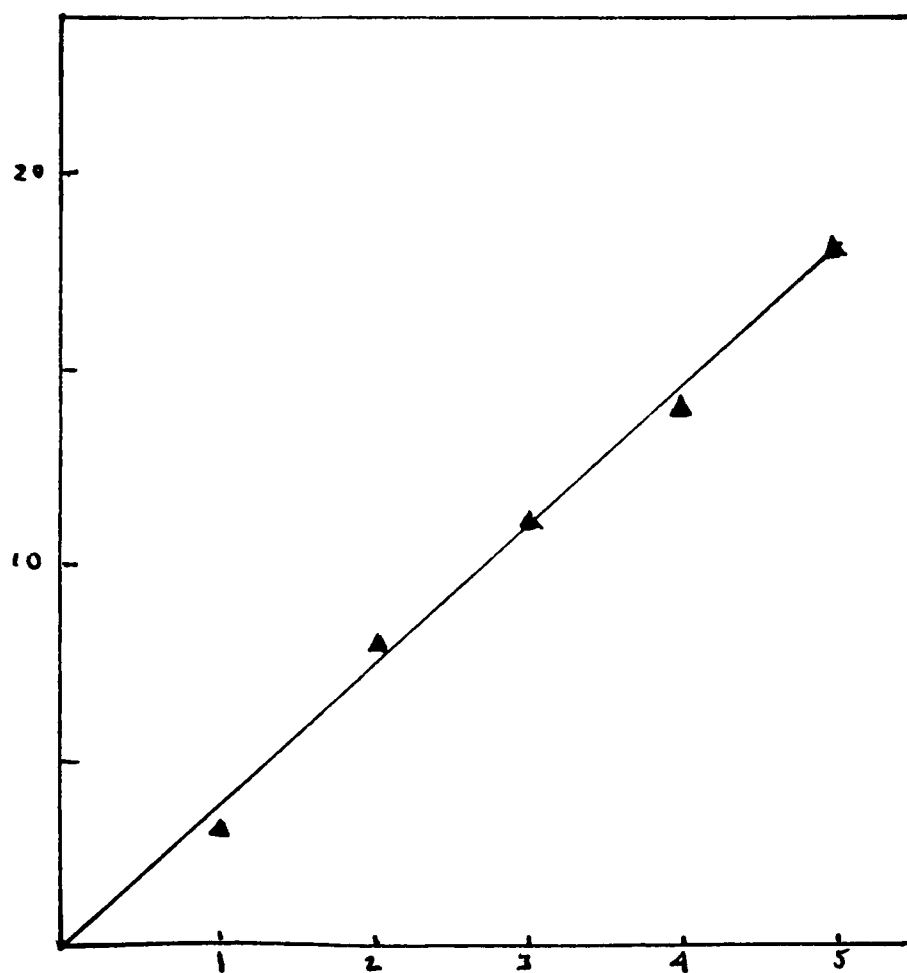


Figure 3

Effet de la quantité d'enzyme ajoutée au liquide réactionnel sur l'activité estérasique. En abscisse: microlitres de sérum ajoutés au milieu réactionnel. En ordonnée: activité enzymatique (μ g de phénol libéré par heure).

Le phénylbenzoate qui sert de substrat est un composé très insoluble. A la concentration indiquée par Gomori, il se produit un précipité dans le liquide d'incubation. Nous avons donc dû établir un protocole strict afin d'obtenir une solution saturée de phénylbenzoate au pH de la solution d'incubation. Il est possible d'arriver à un tel résultat en dissolvant au préalable le phénylbenzoate dans l'alcool méthylique et en ajoutant goutte à goutte le phénylbenzoate dans le liquide d'incubation. Après filtration, le liquide demeure stable pour une heure à 37°, ce qui représente le temps et la température d'incubation.

Par la suite, nous avons dilué successivement la solution-mère de façon à obtenir différentes concentrations de phénylbenzoate, et nous avons étudié l'activité enzymatique en fonction de la concentration du substrat. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 2 où la concentration du substrat est exprimée en pourcentage de dilution de la solution-mère. On peut constater qu'entre 80 et 100 pourcent de saturation, l'activité enzymatique prend à peu près la même valeur, mais que pour des valeurs au-dessous, elle diminue très rapidement.

Nous avons également vérifié de quelle façon la quantité d'enzyme mise en oeuvre influençait le taux de la réaction. Nous pouvons constater (Fig. 3) que la proportionnalité de la réaction est linéaire.

Enfin, nous avons déterminé le taux de la réaction en fonction du temps. Jusqu'à 60 minutes, le taux de la réaction demeure linéaire (Fig.4) au moins dans les limites expérimentales décrites. Il nous a donc semblé que le temps de la réaction pouvait être arrêté à 60 minutes.

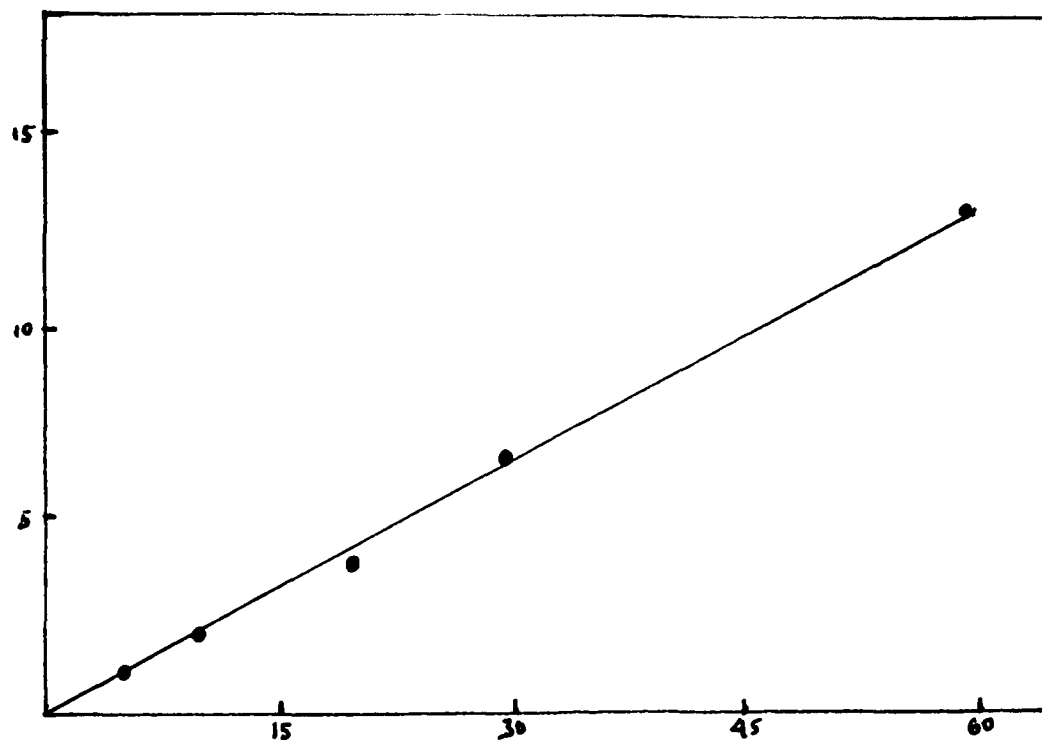


Figure 4

Taux d'hydrolyse du phénylbenzoate en fonction du temps, à 37°.
en abscisse: temps de la réaction en minutes. En ordonnée:
activité enzymatique (µg de phénol libéré par heure).

2.- Effet de l'administration d'une dose orale d'aldrine⁽¹⁾ sur l'activité estérasique.

A dix rats mâles, nous avons administré par voie orale, 20 mg d'aldrine par kilogramme de poids à l'aide d'un tube stomacal. Tous les groupes étudiés comprenaient dix animaux d'environ 300 grammes. A moins d'indication contraire, il en sera ainsi tout au long de ces expériences.

(1)

1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,6,8a-hexahydro-1,4,5,8-diméthanonaphtalène.

L'hydrocarbure chloré ne provoque pas la diminution d'activité estérasique caractéristique des hydrocarbures chlorés aliphatiques, mais bien au contraire une augmentation atteignant un maximum de 120 pourcent par rapport aux témoins, à la cinquième journée (Fig. 5). Le retour à la

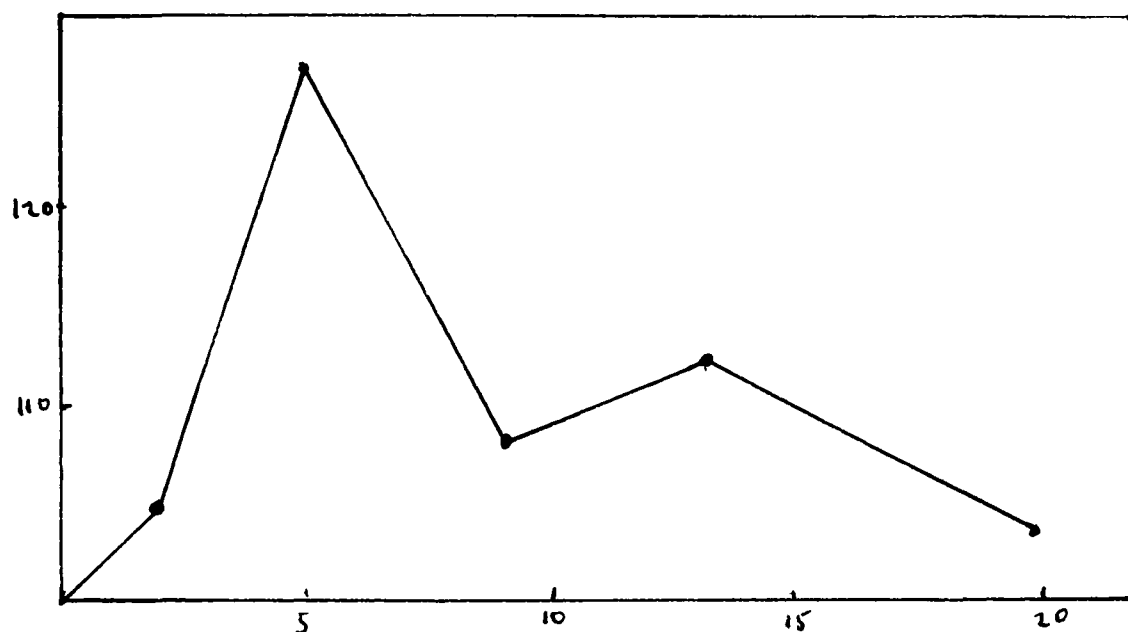


Figure 5

Effet de l'administration d'une dose orale d'aldrine sur l'activité estérasique. En abscisse: nombre de jours qui font suite à l'administration de l'aldrine. En ordonnée: activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins.

normale de l'activité estérasique s'établit après environ vingt jours. Il est bon de noter que chez un second groupe de témoins recevant uniquement de l'huile de maïs dans laquelle l'aldrine est dissoute, aucune variation d'activité enzymatique ne peut être décelée.

3.- effet de doses croissantes d'aldrine injectées par voie sous-cutanée.

Afin de vérifier si l'augmentation relativement faible de l'activité estérasique à la suite d'une injection d'aldrine est proportionnelle à la dose du toxique administrée, l'expérience suivante a été entreprise: à quatre groupes de dix rats, des doses croissantes d'aldrine ont été injectées par voie sous-cutanée.

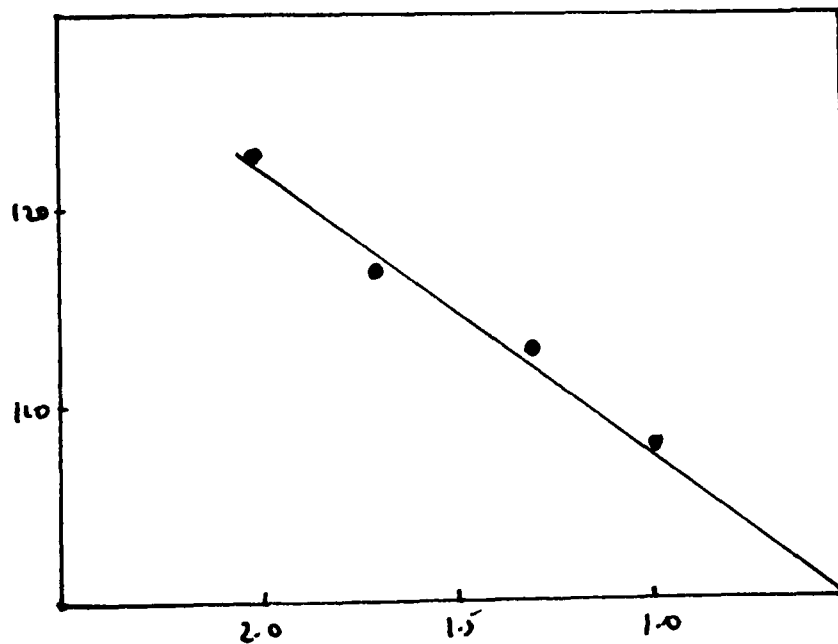


Figure 6

Taux d'augmentation de l'activité estérasique en fonction de la dose d'aldrine injectée. L'abscisse: logarithme de la dose injectée. L'ordonnée: activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins.

A l'examen des résultats (Figure 6), on peut conclure que le taux d'augmentation de l'activité estérasique est linéaire par rapport au

logarithme de la dose injectée, à tout le moins, entre 10 et 63 mg par kilogramme de poids. Le taux d'augmentation mesuré est celui qui se manifeste à la troisième journée, maximum atteint à la suite d'une injection sous-cutanée.

4.- Effet d'injections successives d'aldrine.

Au cours de cette expérience, dix rats mâles ont reçu 10 mg d'aldrine par kilogramme de poids en injection intramusculaire à tous les deux jours durant cinquante-huit jours. L'aldrine administrée a été dissoute dans l'huile de saïs et un second groupe de rats témoins ont reçu un volume équivalent d'huile à tous les deux jours. Chez ces derniers, nous n'avons pu observer la moindre variation d'activité estérasiqne. (Fig. 7)

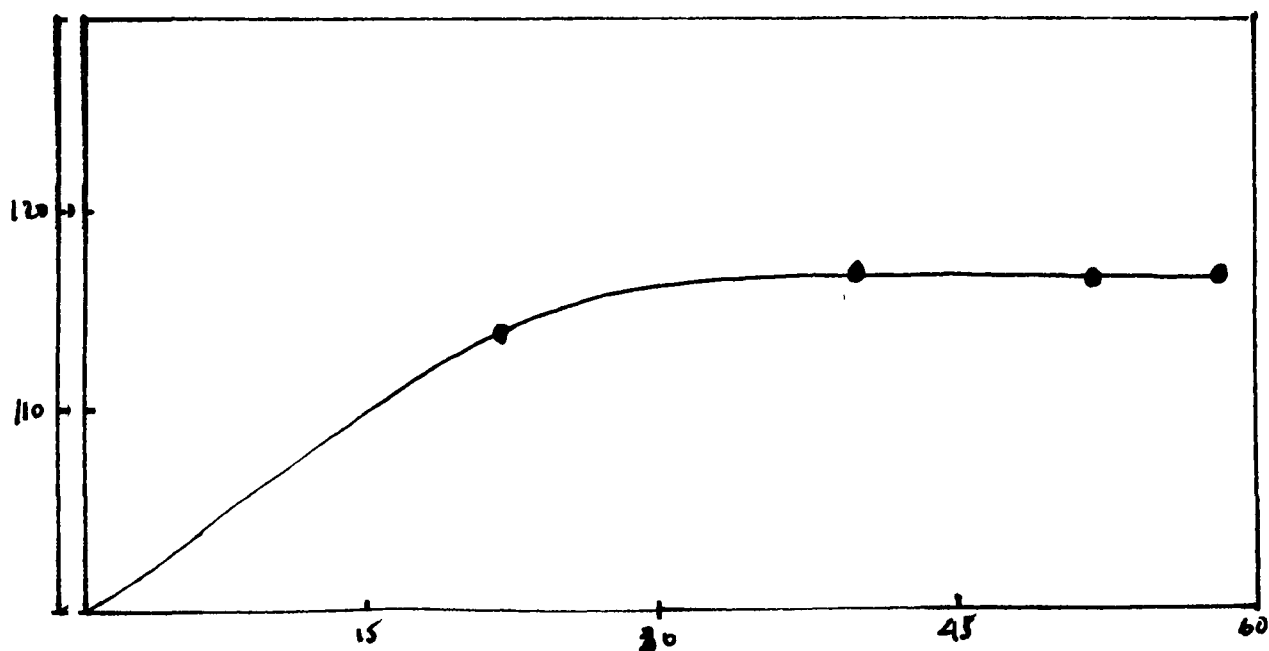


Figure 7

Effet d'injections successives d'aldrine, par voie intramusculaire, sur l'activité estérasiqne. En abscisse: nombre de jours qu'a duré le traitement. En ordonnée: activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins.

Chez les rats traités, l'activité estérasique a augmenté jusqu'à la trentième journée et, passé ce jour, a atteint un palier. Il semble bien que l'animal s'adapte à de faibles doses successives par voie intramusculaire.

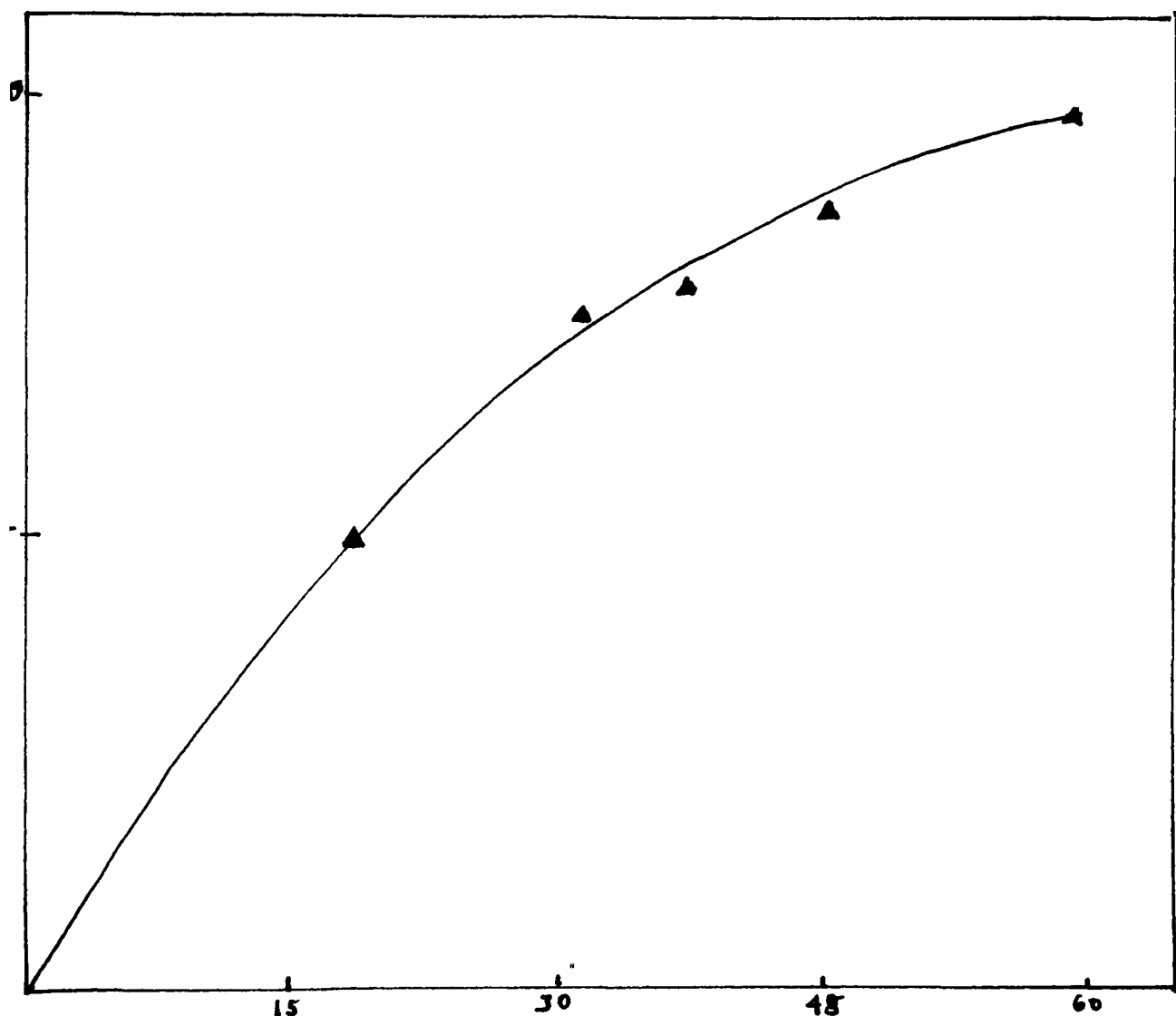


Figure 8

Effet de l'aldrine incorporée dans la diète sur l'activité estérasique. En abscisse: nombre de jours qu'a duré le traitement. En ordonnée: activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins.

D'ailleurs, l'augmentation d'activité est moins élevée si on la compare à celle qui résulte d'une injection unique massive.

5.- Effet de l'aldrine incorporée dans la diète.

Dans une autre série d'expériences, nous avons déterminé quelle était l'allure de la courbe d'activité estérasique chez les animaux soumis à une diète comprenant de l'aldrine à raison de dix parties par million. Dix animaux ont reçu cette diète durant 58 jours. Un second groupe comprenant autant d'animaux a servi de témoin. Chez les animaux soumis à la diète toxique, l'activité estérasique augmente, d'abord assez rapidement, puis le taux d'augmentation diminue, l'allure de la courbe étant exponentielle (Fig. 8).

Il semble bien que dans ce cas-ci également, l'animal s'adapte à sa diète. Il a d'ailleurs été prouvé que dans des conditions expérimentales semblables, le taux de croissance des traités était supérieur à celui des témoins (6).

6.- Effet additif d'administrations massives d'aldrine à intervalles rapprochés.

Au cours de ces expériences, nous avons déterminé l'effet additif d'administrations massives d'aldrine à intervalles rapprochés. Au départ, une dose de 45 mg par kilogramme fut administrée par voie orale, suivie d'une seconde dose de 30 mg par kilogramme à la vingt-quatrième heure et d'une troisième à la quarante-huitième heure, égale à la seconde. Vingt animaux ont été mis en expérience, qui survécurent tous à la première administration du toxique. A la seconde administration, six moururent et il

en fut ainsi à la suite de la troisième.

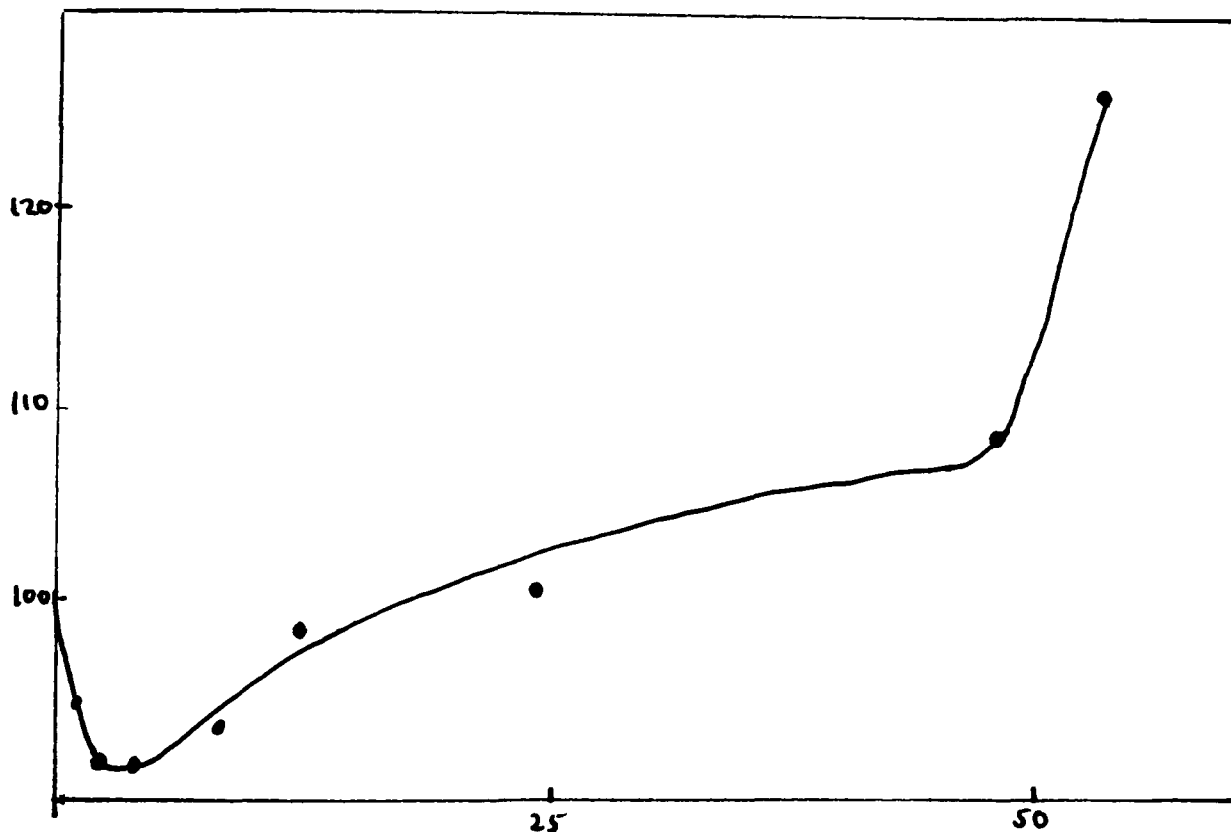


Figure 9

Effet additif d'administrations massives d'aldrine à intervalles rapprochés. En abscisse: nombre d'heures qu'a duré le traitement. En ordonnée: activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins.

L'examen de la figure 9 révèle que, durant les premières heures qui suivent la dose initiale du toxique, l'activité estérasique diminue faiblement, avec un minimum à la troisième heure, pour ensuite retourner à une valeur normale aux environs de la vingt-quatrième heure. A la suite de la seconde administration, l'activité augmente encore davantage pour ensuite monter en flèche à la suite de la troisième administration chez des animaux mourants.

Cette augmentation finale d'activité estérasique, bien que très rapide, n'indique certainement pas une relation directe entre ce taux d'activité élevé et la mort qui survient. En effet, un grand nombre d'agents peuvent augmenter l'activité estérasique à ce niveau sans même causer de phénomène toxique apparent. Encore une fois, il ne s'agit là que d'un parallélisme de situation.

Quant à la diminution initiale que nous avons pu mettre en évidence, nous ne pouvons apporter aucune explication à ce phénomène. La diminution d'activité est d'ailleurs minime.

B.- ACTION D'UNES HYDROCARBURES CHLORÉS APPARENTÉS À L'ALDRINE
SUR L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE DU SÉRUM.

Au cours de ces expériences, nous avons déterminé l'effet de certains hydrocarbures chlorés chimiquement apparentés à l'aldrine sur l'activité

TABLEAU II

Effet de quelques hydrocarbures chlorés chimiquement apparentés à l'aldrine sur l'activité estérasique.

Hydrocarbures chlorés	Dose administrée (1/2 LD ₅₀ , mg/kg)	activité enzymatique pourcent par rapport aux témoins
chlordan	225	130
dieldrine	30	120
DDT	125	116
heptachlore	45	110
hexachlorobenzène	1800	110
lindane	65	105

estérasique du sérum. Tous les toxiques ont été administrés par voie orale à raison d'une demi dose LD₅₀. Chacun des groupes mis en expérience comprenait

dix rats.

Tous les composés étudiés ont provoqué une augmentation du taux de l'activité sérique, caractérisée par un maximum qui se manifeste à la quatrième journée tout comme dans le cas de l'aldrine.

Le chlordane (1,2,4,5,6,7,8,8-octachloro-2,3,8a,4,7,7a-hexahydro-4,7-méthanoindène), le dieldrine (1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-époxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4,5,8-diméthanonaphtalène) et le DDT (2,2-bis-parachloro-phényl-1,1,1-trichloréthane) sont assez actifs à ce point de vue. Cependant, l'heptachlore (1,4,5,6,7,8,8-heptachloro-3a,4,7,7a-tétrahydro-4,7-méthanoindène) l'hexachlorobenzène (1,2,3,4,5,6-hexachlorobenzène) et le lindane (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) sont très peu actifs à ce point de vue.

C.- EFFET DE L'ALDRINE SUR LE TAUX DE RÉGÉNÉRATION DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE CHEZ DES RATS THYROXINÉS.

Hawkins, Mendel et Mishikawara (71) ainsi que Mühlbock et Kaufmann (121) ont démontré que le taux d'activité des estérases sériques diminue à la suite d'administration de thyroxine. Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'effet de l'aldrine sur le taux de recouvrement de l'activité estérasique chez les rats thyroxinés.

Deux groupes d'animaux composés de dix individus chacun, ont reçu 0.4 mg par kilogramme de poids de thyroxine en injection sous-cutanée durant trois jours. À ce troisième jour, nous avons administré 80 mg d'aldrine par kilogramme de poids par voie orale aux animaux l'un de ces groupes.

L'analyse du tableau III démontre que l'aldrine augmente le taux de régénération de l'estérase sérique chez les animaux thyroxinés manifestant

TABLeAU III

Effet de l'aldrine sur le taux de régénération de l'activité estérasique à la suite d'un traitement à la thyroxine.

Groupes	Pourcentage de l'activité estérasique par rapport aux témoins			
	Première journée		Troisième journée	
rats thyroxinés seulement	76	± 2.7	95	± 3.1
rats thyroxinés traités à l'aldrine	89	± 3.2	104	± 3.1
rats normaux traités à l'aldrine	104	± 3.5	110	± 2.4

une activité estérasique réduite à la suite de ce traitement. Au départ, à la suite du traitement à la thyroxine, le taux d'activité a passé à soixante-dix pourcent. A la première journée faisant suite à l'administration d'aldrine, le pourcentage d'activité estérasique était remonté à soixante-seize pourcent chez les thyroxinés seulement, tandis que chez les animaux traités à la thyroxine et à l'aldrine, il était passé à quatre-vingt neuf. Le même décalage s'observe à la troisième journée. De plus, on peut ajouter que le taux d'augmentation d'estérases sériques est beaucoup plus rapide chez les animaux thyroxinés que chez les animaux normaux à la suite d'une injection d'aldrine. Il semble donc que la thyroxine sensibilise les rats à l'action de l'aldrine du moins tant qu'à la propriété que possède ce toxique d'augmenter le taux des estérases sériques.

D.- ACTION DE L'ALDRINE SUR L'ACÉTYLCHOLINE INTERPOSÉE DES GLOBULES ROUGES.

Nous avons vu que l'aldrine et les hydrocarbures chlorés chimiquement apparentés possèdent certaines propriétés caractéristiques des poisons névrotiques. Il a déjà été prouvé que le DDT n'inhibe pas l'activité de l'acétylcholinestérase. Cependant, la même recherche n'avait pas été effectuée dans le cas de l'aldrine.

Au cours de ces expériences, nous avons déterminé l'activité acétylcholinestérasiq ue des globules rouges à l'aide de la méthode manométrique de Warburg. Les mesures ont été conduites en présence de tampon bicarbonate 0.024M à pH 7.4, auquel nous avons ajouté du chlorure de sodium et du chlorure de magnésium en concentrations finales de 0.15M et 0.35M respectivement. Dans tous les cas, le volume final du liquide réactionnel a été porté à 4 ml. La concentration des substrats, acétylcholine et acétyl β -méthylcholine, a été arrêtée à 0.03M.

Le sang des animaux a été recueilli par ponction cardiaque. Après centrifugation, les cellules ont été lavées trois fois en présence de solution saline physiologique, puis suspendues dans deux fois leur volume initial. Au cours de toutes les expériences subséquentes, 0.8 ml de cette suspension de globules rouges a été mis en oeuvre.

Comme les globules rouges sont capables d'adsorber le CO₂ libéré, nous avons calculé le facteur de rétention du gaz carbonique sur les globules rouges. Pour ce faire, nous avons ajouté des quantités croissantes d'acide chlorhydrique 0.01N dans des flacons de Warburg qui, dans une série d'expériences, contenaient 0.8 ml de la suspension de globules rouges et dans l'autre série, pas.

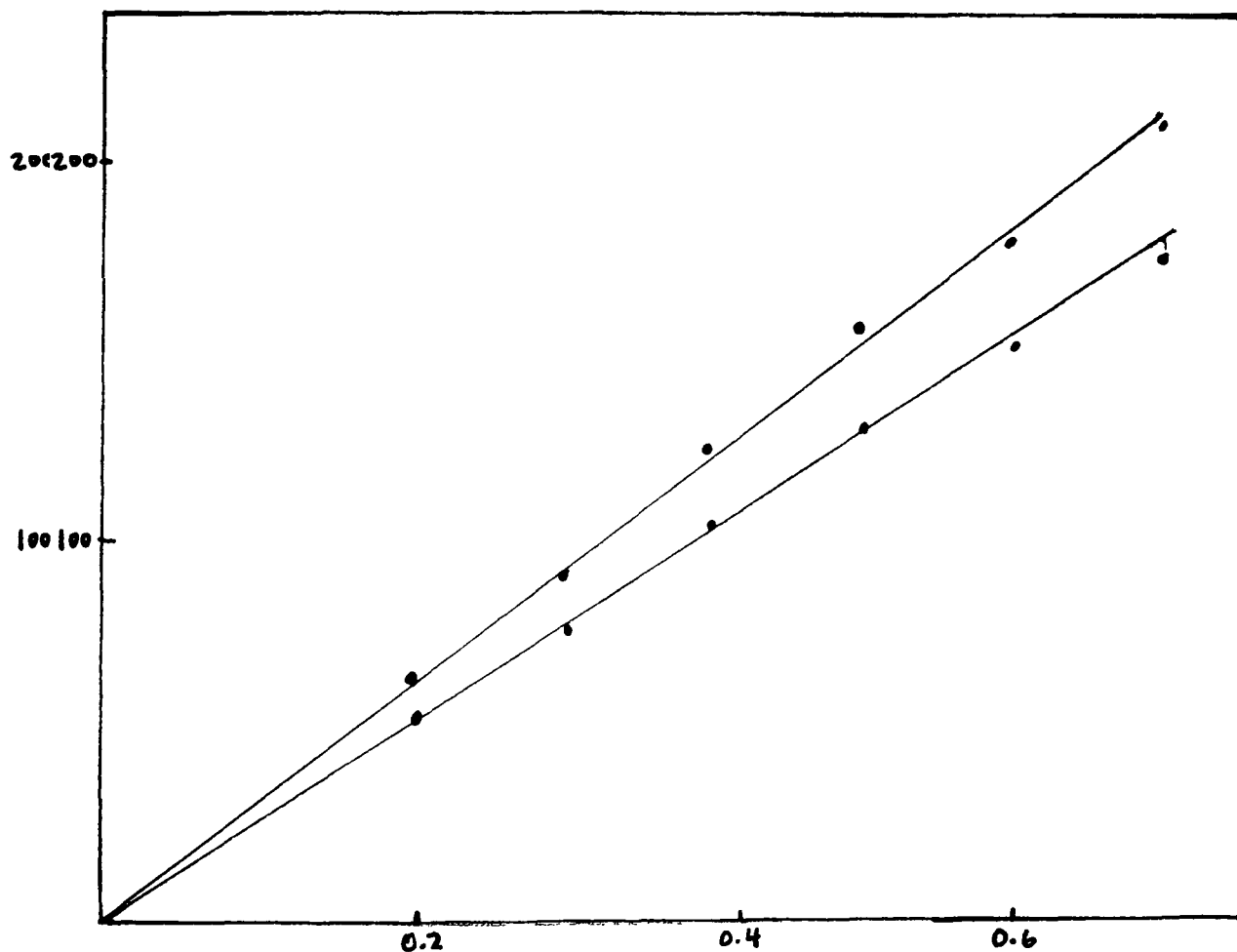


Figure 10

Adsorption du gaz carbonique sur les globules rouges en fonction du volume d'HCl 0.01N ajouté. En abscisse: volumes d'acide ajoutés. En ordonnée, μ l de CO₂ libérés. Courbe 1, sans globules rouges. Courbe 2, avec globules rouges.

A l'examen de la figure 10, on peut constater que la courbe d'adsorption du gaz carbonique sur les globules rouges est linéaire et que le même facteur de correction peut être introduit dans les calculs, quelque

soit la quantité de gaz libéré. En présence de 0.8 ml d'une suspension de globules rouges, le pourcentage moyen de rétention est de 17.7 pourcent. Nous avons donc corrigé toutes les valeurs subséquentes à l'aide de ce facteur.

La réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine et de l'acétyl β -méthylcholine dans nos conditions expérimentales est directement proportionnelle au temps et à la quantité d'enzyme mis en oeuvre, et ce, dans d'assez larges limites.

1.- Effet d'une dose unique d'aldrine administrée par voie orale sur l'activité acétylcholinestérasique des globules rouges.

Afin de vérifier l'effet de l'aldrine sur l'activité acétylcholinestérasique des globules rouges, nous avons administré 30 mg par kilo de ce toxique par voie orale à six animaux, tandis que six autres ont servi de témoins.

TABLEAU IV

Effet d'une dose unique d'aldrine administrée par voie orale sur l'activité acétylcholinestérasique des globules rouges.

Groupes	activité enzymatique	
	acétylcholine CO ₂ libéré (μ l)	acétyl β -méthylcholine CO ₂ libéré (μ l)
témoins	112.7	85.7
traités	120.7	91.0

L'activité acétylcholinestérasique a été déterminée à ce niveau quatre jours plus tard en présence d'acétylcholine et d'acétyl β -méthylcholine.

Comme on peut le constater à l'examen du tableau IV, l'aldrine n'exerce sûrement pas une action inhibitrice sur l'activité acétylcholinestérasiq ue des globules rouges. Bien au contraire, le toxique augmente faiblement le taux d'activité. Comme il ne s'agit là que d'une augmentation très minime, entre 106 et 107 pourcent selon le substrat, elle est certainement dénuée de toute importance physiologique.

2.- Effet de l'aldrine incorporée dans la diète à raison de 75 parties par million sur l'activité acétylcholinestérasiq ue des globules rouges.

Nous avons étudié l'action de l'aldrine incorporée dans la diète à raison de 75 parties par million sur l'activité acétylcholinestérasiq ue des globules rouges, déterminée en présence d'acétylcholine et d'acétyl- β -méthylcholine. Six animaux ont été soumis à ce régime durant deux cent dix jours. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau V.

TAB LEAU V

Effet de l'aldrine incorporée dans la diète à raison de 75 parties par million sur l'activité acétylcholinestérasiq ue des globules rouges.

Groupes	activité enzymatique	
	acétylcholine CO ₂ libéré (μ l)	acétyl β -méthylcholine CO ₂ libéré (μ l)
témoins	110.2	89.1
traités	107.4	87.1

La très faible augmentation d'activité que nous avions pu croire décalée au cours de l'expérience précédente n'a pas été retrouvée chez les

animaux soumis à une lente intoxication. Cependant, il est certainement permis de conclure que l'aldrine n'exerce aucune influence profonde sur l'activité acétylcholinestérasique des globules rouges chez le rat.

E.- ACTION DE L'ALDRINE SUR LA CHOLINESTERASE DU SERUM.

Ainsi que nous l'avons vu plus tôt, Hawkins, Meniel et Nishikawara (72) ainsi que Mühlbock et Kaufmann (121) ont démontré que les estérases du sérum pouvaient varier sous l'influence thyroïdienne. D'un autre côté, nous avons vu que l'aldrine accélère le taux de régénération de l'enzyme sérique à la suite d'injections de thyroxine. Il nous a donc semblé intéressant de vérifier si l'aldrine modifiait le taux d'activité de la cholinestérase du sérum. L'activité enzymatique a été mesurée manométriquement en présence de benzoylcholine à concentration de 0.006M en solution tamponnée au bicarbonate à pH 7.4 et à concentration de 0.024M. Le volume réactionnel a été arrêté à 4 ml et le temps de la réaction à 60 minutes. Le sang a été recueilli par ponction cardiaque et après centrifugation, 0.6 ml de sérum a été mis en oeuvre. Dans ces conditions expérimentales, la réaction d'hydrolyse de la benzoylcholine était directement proportionnelle au temps, entre 10 et 90 minutes, et à la quantité d'enzyme entre 0.2 et 1.0 ml de plasma.

TABEAU VI

Action de l'aldrine sur la cholinestérase du sérum.

Groupes	activité enzymatique CO ₂ libéré (μ l par heure)
témoins	78.9
traités	76.5

A six rats, nous avons injecté 30 mg par kilogramme de poids d'aldrine par voie orale, tandis que six autres animaux ont constitué le groupe de témoins. A la quatrième journée, nous avons mesuré l'activité cholinestérasiq ue chez les deux groupes d'animaux. A l'examen du tableau VI, nous pouvons constater que l'aldrine ne modifie en rien l'activité cholinestérasiq ue du sérum chez le rat. La faible réduction d'activité de trois pour-cent s'est avérée sans valeur significative à l'analyse statistique.

De plus, à la suite d'une injection d'aldrine de 30 mg par kilogramme, nous avons déterminé l'activité enzymatique de la première à la quatrième journée inclusivement. Durant cette période, le pouvoir cholinestérasiq ue du sérum est demeuré constant. Il est donc permis de conclure que l'aldrine n'exerce aucun effet sur la cholinestérase sérique.

F.- ACTION DE L'ALDRINE SUR L'ALCALIESTÉRIE DU SÉRUM.

Le sérum des rats contient une estérase capable d'hydrolyser les glycérides. Il devenait intéressant d'étudier l'action de l'aldrine sur cette aliestérase, en présence de triacétine. La mesure de l'activité enzymatique fut déterminée dans l'appareil de Warburg en solution tamponnée au bicarbonate à pH 7.4. La concentration finale du substrat a été arrêtée à 0.005M et le volume réactionnel à 4 ml. Le volume de sérum mis en oeuvre a été de 0.02 ml. Cette réaction est directement proportionnelle au temps dans les limites de 90 minutes et à la quantité d'enzyme entre 0.01 et 0.08 ml de sérum.

A six animaux, nous avons administré 30 mg par kilogramme de poids par voie orale, tandis qu'un nombre égal d'animaux constituaient le groupe de témoins. L'activité enzymatique a été déterminée à la quatrième journée suivant l'administration.

TABLERAU VII

Action de l'aldrine sur l'aliestérase du sérum

Groupes	Activité enzymatique CO ₂ libéré (μl par heure)	
	Première expérience	Deuxième expérience
témoins	64.4 ± 2.4	65.5 ± 7.4
traités	91.6 ± 4.5	84.6 ± 7.5

Dans les deux cas, l'aldrine augmente le taux d'activité de l'aliestérase du sérum à la quatrième journée qui suit son administration. L'augmentation d'activité décelée en présence de triacétine est d'un ordre de grandeur en tout comparable à celle qui se retrouve en présence de phénylbenzoate.

G.- ETUDE DES PROTEINES DU SÉRUM PAR LA MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER CHEZ LES ANIMAUX TRAITÉS A L'ALDRINE.

Hawkins, Mendel et Mizukawara (71) ont démontré que la diminution du taux de thyroxine qui résulte d'une thyroïdectomie ou de l'administration de thiouracil est accompagnée d'une augmentation de l'activité cholinestérasique du plasma. Inversement, l'injection de thyroxine réduit la même activité. Nous avons constaté également que la thyroxine diminue tout aussi bien le taux d'activité de l'estérase non spécifique du plasma. A la suite d'une hypophysectomie, le taux des cholinestérases sériques augmente, mais chez les ani-
aux ainsi traités, l'injection de thyroxine diminue cette activité sérique à un taux plus bas que la normale. Ainsi, l'hypophyse ne jouerait pas un rôle

essentiel mais bien la thyroïde.(72).

Levin et Leatham (101) ont démontré que l'hypophysectomie abaisse la teneur du sérum en sa fraction albumine et augmente la quantité de globuline. Tout comme dans le cas de la cholinestérase, l'administration de thyroxine chez les animaux ainsi traités prévient l'augmentation du taux de globuline. Enfin, la thyroïdectomie augmente la teneur du sérum en globuline.

Il a été démontré que la cholinestérase du sérum est contenue dans la fraction globuline alpha (160). Ces résultats ont été confirmés par Kakwick et ses collaborateurs (86) tout aussi bien pour la cholinestérase que pour l'estérase non spécifique. Enfin, nous avons vu précédemment que l'aldrine augmente le taux de régénération de l'enzyme qui a été au préalable abaissé par la thyroxine. Il se pouvait donc que l'augmentation des activités estérasiques due à l'aldrine s'accompagne ou soit le résultat d'une augmentation de la globuline alpha dans le sérum puisque les deux phénomènes, augmentation d'activité estérasique et augmentation de l'alpha globuline, semblent devoir être contrôlés par les mêmes facteurs. Nous avons donc vérifié si, à la suite d'une administration d'aldrine, l'élévation du taux d'activité était accompagnée d'une même élévation du taux des globulines alpha.

A cette fin, la proportion relative des différentes fractions protéiques du sérum a été déterminée par la méthode d'électrophorèse sur papier selon la méthode décrite par Kunkel et Tiselius.(98). Les analyses électrophorétiques ont été conduites durant dix-huit heures en tampon véronal à pH 8.6 à l'aide d'un appareil Elphor H. Aucune correction n'a été apportée pour les déplacements des fractions dus à l'électro-osmose. Les papiers ont été colorés à l'Amidoschwartz 10 B et l'excès de colorant a été lavé dans un

mélange d'alcool méthylique-acide acétique glacial à 9 pour 1, puis, la densité optique des différentes fractions protéiniques réparties sur le papier a été déterminée selon la méthode de Grassman et Hannig. (57).

Afin de diminuer l'indice de réfraction, les papiers ont été trempés dans de l'huile à immersion puis placés entre deux lamelles de polyéthylène.

L'électrophotomètre servant aux mesures de densité optique est surmonté d'un vernier avec cran d'arrêt avançant de 1 mm à la fois, si bien qu'une lecture de densité optique a été prise à tous ces intervalles.

Afin d'apprécier quantitativement les variations possibles chez les animaux traités à l'aldrine, nous avons d'abord recherché la densité optique des différentes fractions d'un même sérum quand celui-ci est appliqué sur le papier filtre en quantités croissantes, soit 6, 8, et 10 microlitres. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (Fig. 11).

Nous pouvons constater qu'il est possible d'apprécier, avec une certaine précision, la teneur en protéines du sérum aussi bien que la teneur relative des différentes fractions entre elles, à l'exception de la globuline gamma. Ceci est en accord avec d'autres travaux, à savoir que cette dernière fraction est la plus difficile à évaluer. Cependant, la loi de Beer ne s'applique pas intégralement dans la mesure de la densité optique des autres fractions ainsi que l'ont démontré Crook et ses collaborateurs. (30A). Une correction doit être apportée. Dans le cas de mesures relatives, comme c'est le cas ici, la densité optique peut être rapportée directement sur le graphique sans correction subséquente. En effet, il est possible d'évaluer les différences entre les volumes appliqués sur le papier filtre de 6 à 10 microlitres. (Fig. 11).

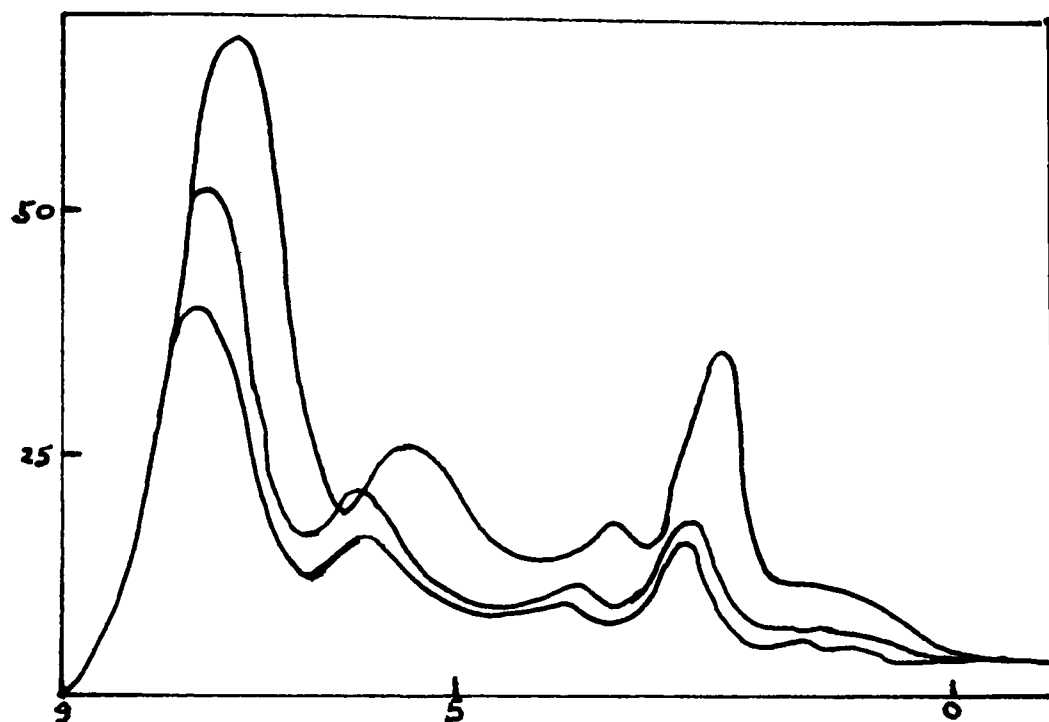


Figure 11

Détermination de la densité optique des différentes fractions du sérum déposées sur le papier en quantités croissantes, de haut en bas sur la figure, 10, 8 et 6 microlitres. En abscisse: déplacement des fractions sur le papier (mm). En ordonnée: densité optique X 100.

A l'aide de cette méthode, nous avons étudié le sérum chez les rats traités à l'aldrine quatre jours après l'administration du toxique à raison de 45 mg par kilogramme de poids. Les résultats de cette analyse sont représentés dans la figure 12. Nous pouvons constater que le traitement à l'aldrine ne modifie en rien le dessin électrophorétique du sérum, à tout le moins à la quatrième journée qui suit le traitement. Il en va de même

à la troisième journée. De plus, chez des rats qui ont reçu de l'aldrine dans la diète à raison de 75 p.p.m. depuis l'âge de 28 jours jusqu'à la trente-huitième semaine, aucun changement n'a également pu être décelé.

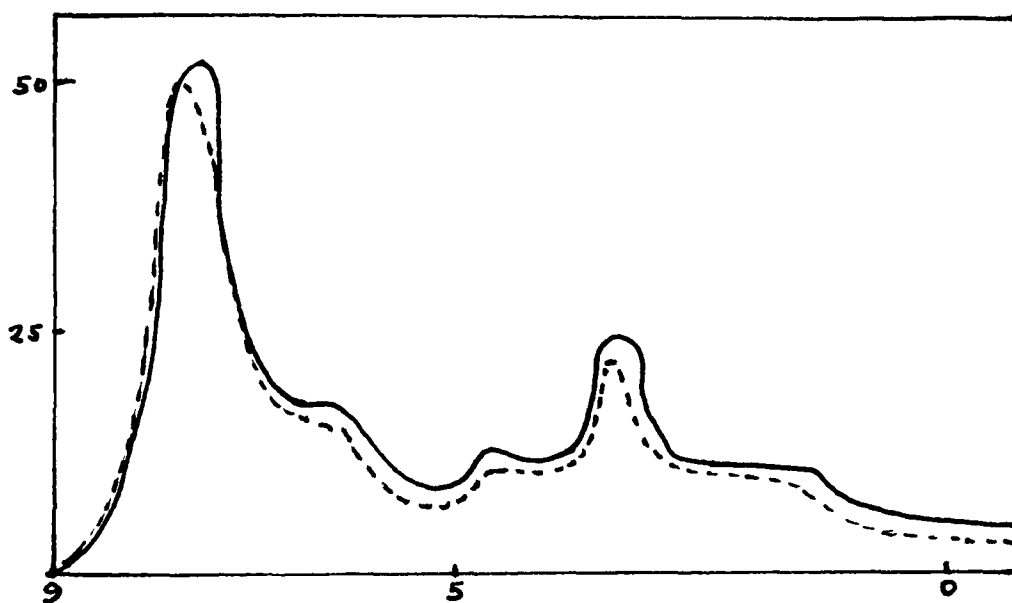


Figure 12

Analyse électrophorétique du sérum chez des rats normaux (en ligne continue) et chez des rats traités à l'aldrine (en ligne pointillée) à raison de 45 mg par kilogramme de poids par voie orale. En abscisse: déplacements des fractions sur le papier (mm). En ordonnée: densité optique $\times 100$.

Ainsi donc, l'augmentation du taux d'activité des estérases sériques consécutif à l'administration de l'aldrine ne semble pas liée à une augmentation parallèle de la teneur en globuline alpha ni aucune des autres fractions, bien que l'enzyme soit contenu dans la fraction globuline alpha.

H.- CONCLUSION DU PRESENT CHAPITRE.

AU cours du présent chapitre, il a pu être démontré que l'aldrine et autres hydrocarbures chlorés chimiquement apparentés provoquaient une augmentation du taux d'activité de l'estérase sérique non spécifique. Ce phénomène peut être provoqué par administration d'une dose unique ou par administration continue du toxique. Dans ce dernier cas, la courbe d'augmentation atteint assez rapidement un palier. Tout se passe donc comme si l'animal s'adaptait au toxique. Si l'on injecte des doses léthales d'aldrine, dans l'heure qui précède la mort, la courbe d'activité augmente en flèche. Il n'y a cependant aucune relation directe entre les deux phénomènes.

L'aldrine exerce une action marquée sur le taux de régénération des estérases sériques à la suite d'un abaissement de ce dernier par la thyroxine, et inversement, la thyroxine sensibilise l'animal à l'action de l'aldrine, eu égard à la propriété que possède ce dernier composé d'augmenter le taux des estérases sériques.

Cependant, malgré la relation qui existe entre les teneurs sériques en estérase et en globuline alpha, les deux étant sous le contrôle de la thyroïde, il n'y a pas de variation parallèle des deux composants à la suite d'administration d'aldrine.

Par ailleurs, l'aldrine n'exerce pas d'effet inhibiteur sur l'acétylcholinestérase des globules rouges. Bien que la fonction de l'enzyme à ce niveau ne soit pas clairement établie, cette constatation permet d'écarter provisoirement la possibilité d'une action anti-cholinestérasique de l'aldrine. De plus, ce composé n'influence en rien la cholinestérase du sérum.

CHAPITRE QUATRIEME

RECHERCHE SUR L'ANTAGONISME D'ACTION ENTRE LES HYDROCARBURES CHLORES ET LES PHOSPHATES ORGANIQUES

Au cours du chapitre précédent, nous avons pu démontrer que certains hydrocarbures chlorés provoquent une augmentation d'activité des estérases sériques en présence de triacétine et de phénylbenzoate. Par ailleurs, il a été mis en évidence que les phosphates organiques peuvent se combiner avec des protéines du sérum formant ainsi un complexe qui les empêche de réagir subséquemment avec les cholinestérases. De plus, Aldridge (1) a soupçonné l'existence d'une estérase capable d'hydrolyser les phosphates organiques à un taux relativement élevé. A cause de ces différentes raisons, il nous a semblé intéressant de rechercher si l'aldrine pouvait modifier de quelque façon l'action toxique des phosphates organiques, lorsque le premier composé était administré quatre jours à l'avance.

La toxicité des composés à l'étude a été définie selon leur dose LD₅₀. Au cours de ces expériences, les rats ont été répartis en groupes de cinquante, répartition faite au hasard selon le critère de poids. Les rats, tant mâles que femelles, n'ont été soumis à aucun jeûne et les toxiques en solution dans l'huile de maïs leur ont été administrés par voie orale. Le critère de survie après six jours nous a permis d'établir la dose LD₅₀ selon la méthode de Miller et Tainter.(120).

Au départ, il s'agissait de déterminer la dose LD₅₀ de chacun des toxiques administrés séparément. Ainsi fut fait pour l'aldrine, deux variétés de parathion (variété dite technique contenant 98 pourcent de parathion

et la variété commerciale vendue sous le nom d'émulsion contenant 25.9 pourcent de parathion, 10 pourcent d'atlon e-1256 et 64.1 pourcent d'Peico Hi-solo.) La variété de parathion sous forme d'émulsion s'est avérée d'usage plus facile et moins dangereux. Ainsi, l'avons-nous employée avec avantage au cours de ces recherches puisque par ailleurs, ses effets toxiques sont basiquement les mêmes que ceux que provoque le parathion à 98 pourcent.

TABLIU VIII

Détermination des doses LD₅₀ de l'aldrine recristallisée et du parathion administrés par voie orale chez le rat.

Toxiques	LD ₅₀ (mg/kg)	
	Mâles	Femelles
Aldrine recristallisée	60.0 ± 2.4	59.8 ± 5.0
Parathion à 98 pourcent	9.0 ± 0.7	3.6 ± 0.2
Parathion-émulsion	6.4 ± 0.4	2.6 ± 0.2

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau VIII. Nous pouvons constater que l'aldrine offre la même toxicité tant chez le mâle que chez la femelle. Par ailleurs, le parathion est beaucoup plus toxique pour la femelle que pour le mâle. Nous avons vu que cette différence tenait en ce que chez la femelle le parathion est transformé plus rapidement en un composé anticholinestérasique au niveau du foie. De plus, chez les deux sexes, le parathion est beaucoup plus toxique sous forme d'émulsion, probablement parce qu'il est absorbé plus facilement.

1.- DETERMINATION DE LA DOSE LD₅₀ DE MÉLANGES DE PARATHION ET D'ALDRINE.

Avant de passer à l'étude de la toxicité du parathion à la suite d'un traitement à l'aldrine, il convenait de vérifier si les deux toxiques administrés simultanément conservaient leurs propriétés usuelles. L'aldrine n'exerce aucun effet protecteur lorsqu'il est administré à l'animal en même temps que le parathion. La recherche de la toxicité des deux toxiques mélangés en proportion variable présentait un certain intérêt. Nous avons donc préparé ces mélanges de composition variable et les avons administrés par voie orale. Si l'on compare les résultats obtenus avec ceux

TABLÉAU IX

Détermination de la dose LD₅₀ des mélanges d'aldrine et de parathion de composition centésimale variable. Comparaison entre la valeur calculée et la valeur trouvée expérimentalement.

Composition des mélanges		LD ₅₀ des mélanges (mg/kg)	
Pourcent de parathion	Pourcent d'aldrine	Valeur calculée	Valeur trouvée
100	0	--	2.6 ± 0.1
80	20	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2
60	40	4.2 ± 0.2	4.6 ± 0.2
40	60	6.1 ± 0.2	7.6 ± 0.5
20	80	11.0 ± 0.4	14.2 ± 0.5
0	100	--	58.8 ± 2.4

que l'on peut prédire par le calcul théorique de la toxicité des mélanges, on peut constater que la différence entre la dose LD₅₀ calculée et déterminée expérimentalement est très petite. A l'examen du tableau IX, ce fait

apparaît évident. En effet, en variant le pourcentage du mélange toxique aldrine-parathion, nous n'avons pu détecter de grandes variations entre la dose LD₅₀ des mélanges, calculée selon Smith (155) et la dose LD₅₀ trouvée expérimentalement. Nous pouvons donc conclure que l'administration simultanée des toxiques à l'animal ne change pas de façon significative leurs propriétés pharmacologiques fondamentales; une faible différence significative à l'analyse statistique n'a été trouvée qu'entre les deux derniers mélanges (tableau IX).

B.- ACTION PROTECTRICE DE L'ALDRINE VIS-À-VIS DU PARATHION.

Certains hydrocarbures chlorés causent une augmentation du taux d'activité des estérases sériques, notamment de l'aliestérase, ainsi que nous l'avons démontré au chapitre précédent. Cette augmentation est caractérisée par un maximum d'activité qui est atteint aux environs de la quatrième journée suivant l'administration d'une dose unique du toxique. Nous avons choisi d'administrer le parathion à la quatrième journée qui suivait l'administration de l'aldrine afin de rechercher l'action protectrice possible de ce dernier composé. Par la suite, nous avons comparé la valeur de la dose LD₅₀ chez les animaux témoins et chez les animaux qui avaient reçu la moitié d'une dose LD₅₀ d'aldrine, soit 50 mg par kilogramme de poids, quatre jours plus tôt. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau X.

Il est évident que la moitié d'une dose LD₅₀ administrée quatre jours au préalable protège l'animal d'une façon très nette vis-à-vis de l'action toxique du parathion. Cette action protectrice se manifeste tant chez le mâle que chez la femelle et le rapport de la toxicité du traité au

témoin avoisine 7 dans tous les cas.

TABLÉAU X

Action protectrice de l'aldrine vis-à-vis du parathion.

Groupes	LD ₅₀ parathion seul <u>A</u>	LD ₅₀ parathion + aldrine 4 jours au préalable <u>B</u>	Rapport B/A
<u>Mâles</u>			
détermination 1	5.1 ± 0.4	35.9 ± 1.9	7.0
détermination 2	6.4 ± 0.4	43.9 ± 2.1	6.7
<u>Femelles</u>			
détermination 1	2.8 ± 0.3	19.0 ± 1.2	7.3
détermination 2	3.0 ± 0.3	22.5 ± 1.2	7.5

Nous avons répété ces expériences en administrant cette fois le parathion sous forme de parathion dit technique à 98 pourcent. Tant chez le mâle que chez la femelle, le rapport de la toxicité du traité au témoin s'est avéré le même, c'est-à-dire très voisin de 7. De plus, nous avons retrouvé la même action protectrice si le parathion est administré par voie intrapéritonéale et le rapport de la toxicité du traité au témoin était de 7.

TABLÉAU XI

Action protectrice de l'aldrine à raison de un quart de la dose LD₅₀ vis-à-vis du parathion.

Groupes	LD ₅₀ parathion seul <u>A</u>	LD ₅₀ parathion + aldrine 4 jours au préalable <u>B</u>	Rapport B/A
<u>Mâles</u>	5.1 ± 0.4	20.6 ± 2.1	4.0
<u>Femelles</u>	3.0 ± 0.3	7.1 ± 0.5	2.4

En second lieu, nous avons recherché la même action protectrice de l'aldrine, mais au lieu d'administrer 30 mg par kilogramme de poids du toxique

Nous avons cette fois administré 15 mg par voie orale, ce qui constitue le quart d'une dose LD₅₀.

Nous pouvons constater (tableau XI) que l'aldrine injectée à raison de 15 mg par kilogramme de poids, soit un quart de la dose LD₅₀, protège encore l'animal contre les effets toxiques du parathion. Cependant, le degré de protection offert est moindre surtout chez la femelle. Nous ne saurions expliquer présentement cette différence. Cependant, chez le mâle, nous pouvons dire que le degré de protection est grossièrement proportionnel à la dose d'aldrine injectée quatre jours au préalable.

C.- ACTION PROTECTRICE DE CHLORDANE ET DE LINDANE VIS-À-VIS DU PARATHION.

Au cours de ces expériences, nous avons voulu vérifier si l'action protectrice de l'aldrine était un phénomène limité à ce dernier composé ou bien si d'autres hydrocarbures chlorés pouvaient exercer une action similaire.

TABEAU XII

Action protectrice du chlordané et du lindane vis-à-vis du parathion.

Groupes	LD ₅₀ parathion seul	LD ₅₀ parathion agent protecteur 4 jours au préalable	Rapport B/A
	<u>A</u>	<u>B</u>	
Chlordané	3.7 ± 0.4	20.1 ± 1.6	5.5
Lindane	3.1 ± 0.4	8.0 ± 1.1	2.5

Nous nous sommes donc adressés à deux composés, l'un le chlordané qui cause une augmentation du taux d'activité des estérases sériques en tout comparable à celle que provoque l'aldrine, l'autre, le lindane, qui est très peu actif

à ce point de vue. Les deux composés ont été administrés quatre jours avant le traitement au parathion à raison d'une demi dose LD₅₀, soit respectivement 200 mg et 30 mg par kilogramme de poids.

Il ressort de ces expériences que le chlordan et le lindane partagent avec l'aldrine la propriété de protéger les rats contre l'action toxique du parathion, et ce, uniquement à la quatrième journée qui suit leur administration (tableau (II)). Cependant, il est bon de souligner que le lindane ne protège pas tout aussi bien contre une dose toxique du phosphate organique que l'aldrine et le chlordan.

D.- ACTION PROTECTRICE DE L'ALDRINE VIS-À-VIS DU TÉTRAÉTHYL-PYRO-PHOSPHATE.

Le parathion n'est pas un inhibiteur des cholinestérases in vivo mais le devient après transformation au niveau du foie.(50). Vis-à-vis du parathion, l'aldrine aurait donc pu exercer une action protectrice en bloquant sa transformation en un inhibiteur actif au niveau du foie. Nous avons donc étudié l'action protectrice de l'aldrine vis-à-vis du tétraéthylpyrophosphate qui, lui, inhibe l'acétylcholinestérase in vitro et dont l'action toxique ne dépend d'aucune transformation métabolique.

Opérant dans des conditions en tout semblables à celles décrites ci-haut, nous avons pu démontrer qu'après traitement à l'aldrine quatre jours au préalable, le rapport de la dose LD₅₀ chez les traités à celle des témoins est égale à 5.0. Le degré de protection qu'offre l'aldrine vis-à-vis du tétraéthylpyrophosphate se compare donc à celui trouvé vis-à-vis du parathion.

Ainsi, un inhibiteur de la cholinestérase in vitro perd de sa toxicité in vivo quand il est administré quatre jours après l'aldrine. L'effet protecteur des hydrocarbures chlorés ne repose donc pas sur l'inhibition d'une réaction métabolique comme la transformation du parathion en un inhibiteur actif. Il s'agit bien au contraire d'un mécanisme plus général, intéressant un inhibiteur in vitro de l'acétylcholinestérase, comme par exemple, le tétra-éthylpyrophosphate.

E.- ETUDE DE LA TOXICITÉ DE L'ÉSÉRINE APRÈS ADMINISTRATION DE L'ALDRINE.

L'ésérine, qui est un inhibiteur bien connu des cholinestérases in vitro, exerce une action toxique violente chez les mammifères. Il devenait donc intéressant de vérifier si l'aldrine pouvait protéger l'animal contre l'action toxique de l'ésérine. Suivant le protocole d'expérience déjà décrit, nous avons injecté l'aldrine quatre jours avant l'ésérine. Contrairement à ce qui a déjà été trouvé dans le cas des phosphates organiques, le traitement prophylactique à l'aldrine ne modifie en rien la toxicité de l'ésérine chez le rat.

F.- ETUDE COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE CHEZ LES RATS INTOXIQUÉS AU PARATHION AVEC ET SANS TRAITEMENT À L'ALDRINE.

Bien qu'il n'y ait qu'un parallélisme entre le taux élevé des estérases sériques et l'effet protecteur dû à l'aldrine, il nous a semblé intéressant de déterminer le taux d'activité estérasique chez les rats intoxiqués au parathion avec et sans protection à l'aldrine. Le parathion et l'aldrine ont été administrés aux animaux par voie orale à raison d'une demi dose LD₅₀

et l'activité estérasique du sérum a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique de Gomori.

TABLÉAU XIII

Etude comparée de l'activité estérasique chez les rats intoxiqués au parathion avec et sans traitement à l'aldrine.

Rats	Pourcentage de l'activité estérasique résiduelle	
	parathion seul	parathion + aldrine
Mâles	26.3	36.3
Femelles	36.9	47.6

Les résultats que nous avons obtenus apparaissent dans le tableau XIII. Chez les rats qui ont subi un traitement à l'aldrine quatre jours au préalable, l'activité estérasique est relativement plus élevée, et ce, de façon significative à l'analyse statistique. Cependant, cette faible différence ne saurait expliquer l'effet protecteur du à l'aldrine.

C.- DISCUSSION DES RÉSULTATS EXPOSÉS AU COURS DU PRÉSENT CHAPITRE.

Nous avons pu établir que l'aldrine exerce une action protectrice dans le cas d'empoisonnement au parathion, la toxicité de ce dernier composé pour l'organisme animal décroissant d'environ sept fois. Cependant, l'action protectrice qu'exerce l'aldrine ne se manifeste qu'entre la troisième et la quatrième journée, ce qui coïncide avec l'augmentation maximum du taux des estérases sériques que provoque cet hydrocarbure chloré. Quand l'aldrine et le parathion sont administrés simultanément, l'aldrine n'exerce plus son effet protecteur. De plus, il n'existe qu'une faible différence

entre les valeurs des doses LD₅₀ calculées et trouvées expérimentalement pour des mélanges de proportion variable d'aldrine et de parathion. Tout se passe comme si les deux composés exerçaient leur action toxique indépendamment l'un de l'autre.

Il est intéressant de comparer le degré de protection que nous rapportons ici avec quelques autres déjà connus. L'atropine augmente de deux à trois fois la tolérance de l'organisme à l'égard du parathion (43), le buscopan, de deux fois à l'égard du parathion et du TEPP. (35). Un traitement combiné à la scopolamine et au chlorure de mytolon offre le même résultat à l'égard du TEPP. (102). Enfin, DuBois et ses collaborateurs (41) (42) ont pu démontrer que l'ésérine diminue la toxicité des phosphates organiques en se combinant préférentiellement avec les cholinestérases. Le complexe enzyme-ésérine ainsi formé se dissocie plus rapidement que le complexe enzyme-phosphate organique, créant ainsi une protection contre un inhibiteur plus puissant.

L'action protectrice de l'aldrine à l'égard des effets toxiques du parathion pouvait fort bien être due à une inhibition de la transformation du parathion en un inhibiteur actif au niveau du foie puisque c'est ce dernier qui, en dernière analyse, inactive les cholinestérases. Ainsi se serait expliquée l'action protectrice, mais l'aldrine protège également l'organisme contre une dose toxique de TEPP égale à cinq fois sa dose LD₅₀. Or, il est bien connu que le TEPP inhibe l'activité cholinestérasique in vitro et qu'il exerce ses propriétés toxiques in vivo sur cette base sans subir de transformation métabolique. Il est donc évident que le cas de protection rapporté ici repose sur l'inactivation de l'inhibiteur, laissant l'acétylcholinestérase libre d'accomplir son rôle physiologique.

Comment les hydrocarbures chlorés peuvent-ils protéger l'organisme

animal contre un poison anticholinestérasique? Ce ne semble pas en augmentant le taux d'activité de l'acétylcholinestérase. En effet, à la suite d'une injection d'aldrine, la vitesse d'hydrolyse de l'acétylcholine ou de l'acétyl β -méthylcholine ne varie pas en présence d'érythrocytes provenant d'animaux traités à l'aldrine. D'ailleurs, s'il en était ainsi, l'aldrine protégerait l'animal contre des doses d'ésérine dépassant sa dose LD₅₀. Nous avons vu qu'il n'en était pas ainsi, l'hydrocarbure chloré ne modifiant en rien la toxicité de ce poison anticholinestérasique.

Le rôle physiologique des estérases sériques n'est pas clairement établi. Cependant, eu égard à la faible augmentation de leur taux d'activité à la suite d'une injection d'aldrine, il est peu probable que l'augmentation d'enzyme circulant protège l'organisme en formant un complexe avec l'inhibiteur libérant ainsi l'acétylcholinestérase.

Reste donc la possibilité que les phosphates organiques chez les animaux traités à l'aldrine parviennent plus difficilement au niveau des cholinestérases tissulaires, l'inhibiteur étant détruit avant d'y parvenir, ou bien à cause de certaines modifications de perméabilité. A cette alternative, la première hypothèse semble plus probable. En effet, Aldridge a déjà soupçonné l'existence d'une estérase capable d'hydrolyser les phosphates organiques, abolissant ainsi les propriétés anticholinestérasiques de ces composés. Un tel enzyme peut fort bien se retrouver dans le sérum des animaux traités à l'aldrine.

Afin de vérifier cette hypothèse, à savoir que l'inhibiteur soit hydrolysé ou de toute façon inactivé avant de parvenir en présence de l'acétylcholinestérase, nous avons décidé d'étudier l'activité acétylcholinestérasique au niveau des plaques motrices des muscles striés. Une

étude à ce niveau présente un intérêt renouvelé car l'action pharmacologique des phosphates organiques s'explique principalement par leur action sur l'acétylcholinestérase du système nerveux périphérique. Il est vrai que l'étude de l'acétylcholinestérase des globules rouges aurait pu apporter quelques lumières sur le mécanisme de protection. Mais les effets physiologiques de l'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau des globules rouges ne sont pas très clairs et une réduction d'activité à ce niveau ne correspond pas nécessairement à des troubles neuromusculaires.

Nous avons donc décidé d'étudier l'antagonisme d'action entre les hydrocarbures colorés et les phosphates organiques au niveau de la plaque motrice elle-même à l'aide des méthodes d'enzymologie microscopique. Ces recherches feront l'objet de la deuxième partie de ce travail.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES HISTOCHIMIQUES

CHAPITRE CINQUIEME

ACQUISITIONS DES DERNIERES ANNEES SUR LA DEGRADATION A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE DES ACTIVITES ESTERASIQUES.

A.- ENONCE DE QUELQUES PRINCIPES.

Avant de passer à l'étude critique des différentes méthodes mettant en évidence les activités estérasiques à l'échelle microscopique, il semblerait bon d'énoncer rapidement quelques principes qui ont servi de guide à toute recherche histochimique en ce domaine. Puis nous considérerons successivement les différentes méthodes connues et les résultats que l'on a obtenus à l'aide de ces méthodes.

La préparation du matériel sur lequel une activité estérasique doit être recherchée est de toute première importance. Il a été prouvé que l'acétone, l'alcool éthylique et l'alcool méthylique, in vitro, dénaturent irréversiblement l'acétylcholinestérase du tissu nerveux.(132). ainsi, doit-on préciser les effets de la fixation et des autres étapes de la méthode histologique courante sur cette activité estérasique puisque les moins énergiques des fixateurs dénaturent irréversiblement l'enzyme. Lorsque la dénaturation est incomplète, le mal n'est pas irrémédiable, s'il s'agit de travaux qualitatifs. Une faible activité résiduelle est souvent suffisante pour localiser avec certitude une activité enzymatique. Mais il n'en est pas toujours ainsi, au niveau de certaines structures, la fixation peut détruire toute activité enzymatique, soit que l'enzyme soit peu protégé, soit qu'il y en ait peu. Par exemple, comme nous le verrons plus loin, la plaque motrice du muscle strié ne donne pas

de réaction en présence des esters à poids moléculaire élevé de la choline après fixation. Sans fixation initiale, la même structure donne un résultat positif.

De façon générale, on peut affirmer que pour poursuivre des travaux d'enzymologie à l'échelle microscopique, il est beaucoup mieux d'éviter la fixation, si douce soit-elle, quand c'est possible. Entre des mains expérimentées, la technique des coupes à congélation donne de bons résultats. Il est évident que l'on ne peut s'attendre à étudier de fins détails histologiques puisqu'il est très difficile de préparer des coupes plus minces que 10 microns. De plus, la formation de cristaux au sein des structures peut conduire à la formation d'artefacts qui gênent considérablement l'analyse microscopique, tout particulièrement au niveau du muscle. (29). La production de cristaux sera d'autant plus grande que la pièce à congeler le sera lentement.

La spécificité des actions enzymatiques joue également un rôle de premier plan dans leur détection à l'échelle microscopique. En règle générale, il n'est pas possible d'utiliser les substrats attaqués selon les voies métaboliques normales. En effet, un des produits d'hydrolyse, comme nous le verrons plus loin, doit être insoluble ou le devenir à la suite d'une réaction d'addition avec un réactif quelconque. Dans ces conditions, il est donc souhaitable d'utiliser un substrat qui se rapproche le plus possible du substrat physiologique. Ce choix n'est pas toujours facile à faire car le concept de spécificité enzymatique est souvent difficile à établir. Mais, de toute façon, il faut évidemment se garder autant que possible d'utiliser un substrat qui serait hydrolysé par deux enzymes à la fois au sein d'une même structure microscopique. De plus, le substrat

utilisé doit être largement soluble et pénétrer facilement jusqu'à la structure où se loge l'enzyme.

La formation d'un produit insoluble à la suite d'une action enzymatique est évidemment de la plus haute importance. Ce caractère d'insolubilité doit se rapporter aussi bien à l'eau qu'aux lipides qui représentent les éléments dispersants par excellence des milieux biologiques. Il est très rare qu'un des produits d'hydrolyse soit par lui-même insoluble. Il faut ordinairement lui ajouter un réactif qui le précipite in situ. De plus, il n'est pas rare qu'il soit nécessaire de transformer un premier précipité en un second qui soit plus coloré et ainsi décelable à l'analyse chromatique. Il est évident qu'au cours de ces opérations il est souvent très difficile d'éviter les phénomènes de diffusion qui conduisent à des images imprécises, ou même, ce qui est plus grave, à des localisations secondaires artificielles.

Chaque fois qu'il est possible, il est toujours intéressant d'étudier in vitro l'action enzymatique décelée in situ et de comparer ainsi avec les résultats déjà connus par voie biochimique. Ainsi, par exemple, les actions enzymatiques sont toujours caractérisées par un pH optimum qu'il est très facile de préciser in vitro. Malheureusement, on ne peut pas en conclure que ce soit toujours le même pH optimum qui caractérise la réaction histochimique. En effet, il peut fort bien arriver qu'à ce pH caractérisé par une très grande activité enzymatique, le précipité formé ne soit pas entièrement insoluble. Il faut donc souvent établir un compromis entre le pH optimum d'activité enzymatique et le pH optimum de précipitation d'un des produits d'hydrolyse. Il en va de même du temps d'incubation et de la température contrôlant le taux d'hydrolyse. De façon

générale, on peut certainement affirmer que les conditions de travail optimum in vitro ne correspondent pas nécessairement aux conditions de travail optimum in situ. Le but d'une recherche conduite concurremment in vitro et in situ a plutôt trait à la spécificité de la réaction elle-même, où elle peut être définie de façon plus précise.

L'étude de l'action inhibitrice de certaines substances sur l'activité enzymatique a apporté beaucoup de précision sur la spécificité des réactions. L'emploi des inhibiteurs a largement trouvé sa place dans les études enzymologiques à l'échelle microscopique et a également permis de définir la spécificité de certains substrats utilisés. Le grand avantage de cette méthode réside en ce qu'on peut comparer à peu près strictement les résultats obtenus in vitro et in situ. Il est encore nécessaire toutefois d'établir quelques réserves. En travaillant avec des broyats tissulaires, il est évident que l'inhibiteur parvient facilement jusqu'à l'enzyme et réagit avec lui. Au sein d'une coupe de tissu, l'inhibiteur pourrait parvenir plus difficilement jusqu'à l'enzyme parce qu'il pourrait être insoluble dans un des produits qui entourent la structure, comme par exemple la gaine de myéline. De plus, l'action inhibitrice de la plupart des substances est fonction du pH du milieu. En profondeur d'une coupe de 10 microns par exemple, il peut arriver que le pH soit sensiblement différent du pH ambiant de la solution, ce qui ferait varier l'action inhibitrice.

En guise de conclusion, on peut affirmer que le choix d'une réaction devant déceler une activité enzymatique est chose relative. Le but que l'on se propose doit avant tout servir à guider ce choix et servir également à préciser les conditions dans lesquelles s'effectuera cette

réaction. Guidés par ces quelques principes que nous venons d'énoncer, nous entreprendrons une étude critique des différentes méthodes connues pour la mise en évidence in situ des lipases, estérases et cholinestérases.

B.- DEMONSTRATION DES LIPASES.

Ouvrant la voie à ces recherches, Gomori a travaillé à la mise au point d'une méthode capable de déceler les lipases au sein des tissus. (55). La méthode comprend une fixation au préalable dans l'acétone absolu de douze à vingt-quatre heures à une température comprise entre 0° et 5°. Puis les coupes de tissus sont préparées à la paraffine selon la méthode usuelle. Les substrats utilisés sont des esters palmitiques et stéariques de polymères de glycols, d'hexitols et de mannitanes connus généralement sous le nom de Tweens. A l'hydrolyse, les acides gras sont libérés pour donner naissance à leurs sels de calcium insolubles qui précipitent au lieu de l'activité enzymatique et qui deviennent décelables au microscope par transformation en sel de plomb et finalement en sulfure de plomb.

L'activité de la lipase est liée à des granules cytoplasmiques, tandis que le noyau ne donne jamais la réaction. D'une façon générale, le pancréas et le foie donnent toujours une réaction intensément positive. Il en va de même des cellules zymogènes de l'estomac et de certaines cellules de la muqueuse intestinale. Gomori (56) a précisé qu'il est possible d'établir une distinction entre la lipase et les estérases non spécifiques, encore que les résultats soient parfois chaotiques. Il a ainsi pu démontrer que la lipase pancréatique serait le seul enzyme qu'activent les acides biliaires et peut-être la lipase des cellules zymogènes de l'estomac dans une

sont limitées de la glande. La quinine qui inactive spécifiquement la lipase inhibe fortement l'activité enzymatique au niveau du pancréas et de l'estomac, mais, de façon contradictoire, son effet sur l'enzyme de l'intestin possédant les caractéristiques d'une estérase est encore plus marqué. L'arsanilate est à peu près dénué de toute action sur la lipase. Ainsi, cet inhibiteur ne modifie pas du tout l'activité des lipases pancréatique et stomacale chez la souris. Finalement, Gomori (55) a précisé que la lipase vraie peut hydrolyser les esters des acides gras non saturés très rapidement contrairement à l'estérase non spécifique, étant du même coup activée par le taurocholate. Bien que la ligne de démarcation ne soit pas très nette, il semble bien que la méthode aux Tweens permet de déceler une action lipasique dans la plupart des cas à l'exclusion d'une action estérasique.

C.- DEMONSTRATION DES ESTERASES NON SPECIFIQUES.

Barnett et Seligman (8) et Holt et Withers (56), indépendamment les uns des autres, ont mis au point une méthode de détection des activités estérasiques non spécifiques en utilisant l'O-acétylindoxyl et l'O-butyryl-indoxyl en qualité de substrats. Comme nous le verrons plus loin, ces substrats ne sont pas hydrolysés uniquement par les estérases non spécifiques mais aussi par les cholinestérases. Nous discuterons plus loin cette dernière action enzymatique. Le principe de la méthode repose sur la libération d'indoxyl libre rapidement oxydé par l'oxygène atmosphérique en un pigment insoluble de bleu indigo. Le dérivé 5-bromoindoxylacétate conduit à la formation d'un pigment 5:5'-di-bromoindigo d'un bleu intense très

insoluble qui précipite de façon homogène au sein des structures tissulaires. Enlt et Withers (80) ont démontré que l'addition d'ions cuivriques à la solution d'incubation rendait les localisations plus précises. Le cuivre à la concentration de $10^{-4}M$ exerce son effet en accélérant catalytiquement l'oxydation de l'indoxyl libéré. Un autre agent oxydant joue le même rôle; le ferricyanure de potassium. L'addition de ferrocyanure en proportion équimoléculaire favorise la réaction en prévenant l'oxydation subséquente de l'indigo en déhydroindigo. Le catalyseur exerce une action profitable jusqu'à la concentration de $5 \times 10^{-3}M$. A l'aide de cette méthode, on a pu déceler une activité estérasique non spécifique au niveau de l'épithélium tubulaire du rein. La précipitation intra-cellulaire apparaissait sous forme de corps sphériques d'un diamètre de 1 à 3 microns. Au niveau du foie, il y avait également une déposition intracellulaire sous forme de particules rappelant l'aspect des mitochondries, groupées du côté des canalicules biliaires. L'aide de coupes témoins, il a pu être établi que la coloration ne provenait pas d'une précipitation de bleu de Prusse due à la présence de fer.

Nachlas et Beligian (125) ont proposé l'emploi du β -naphtylacétate pour la détection de l'estérase non spécifique. Le β -naphтол libéré sous l'action de l'enzyme réagit avec un sel de diazonium de façon à donner naissance à un pigment insoluble rouge pourpre. A l'aide de cette méthode, les structures suivantes ont donné une forte activité estérasique: l'épithélium bronchique, les cellules du parenchyme hépatique, les cellules glandulaires du pancréas, les cellules des tubes corticaux du rein, la muqueuse de l'intestin, de l'uretère, de la vessie, de la prostate et de la vésicule biliaire ainsi que les cellules interstitielles du testicule.

Dans une étude publiée plus tard (140), on a pu démontrer que le pigment résultant de la réaction du β -naphтол avec un sel de diazonium était insoluble dans l'eau, mais toutefois soluble dans les lipides. Afin de diminuer cette solubilité dans les lipides, on a préparé des dérivés amidés du β -naphthylacétate. Le pigment obtenu à la suite de la réaction avec le sel de diazonium était beaucoup moins soluble dans les lipides, mais cependant hydrolysé beaucoup plus lentement. Javin et ses collaborateurs (140) ont alors eu l'idée d'introduire le groupement amidé dans le sel de diazonium. La solubilité du produit correspondant après réaction avec le β -naphтол s'en est trouvée considérablement réduite, tout particulièrement la solubilité dans la myéline. L'arsanilate inhibe l'estérase au niveau du foie, du rein et de l'intestin, tandis que les lipases du pancréas et de l'estomac voient leur activité à peine modifiée. (56)

D.- DÉMONSTRATION DES CHOLINESTÉRASES.

Plusieurs méthodes ont été mises au point en vue de démontrer les activités cholinestérasiques au sein des tissus. Deux d'entre elles, la méthode au naphthylacétate et la méthode à l'indoxylacétate ne sont pas spécifiques des cholinestérases, comme nous venons de le voir puisqu'elles peuvent servir à révéler la présence de l'estérase non spécifique. Nous verrons que, dans des conditions précises d'expérience, la spécificité de la réaction s'en trouve augmentée.

Gomori (53) a proposé une des premières méthodes pour la mise en évidence des cholinestérases, employant en qualité de substrats les esters de la choline à poids moléculaire élevé, notamment, les esters de l'acide

palmitique, stéarique, laurique et myristique. Au milieu d'incubation est ajouté un sel de cobalt. L'acide gras libéré sous l'action de l'enzyme précipite, sous forme de sel de cobalt insoluble. Ce dernier est mis secondairement en évidence par transformation en sulfure de cobalt noir. La réaction est complètement inhibée par la prostigmine à une concentration de 10^{-4} M. Cette activité ne semblerait pas due toutefois à l'acétylcholinestérase mais bien à la cholinestérase puisque le premier de ces enzymes provenant des globules rouges ou de l'organe électrique de la Torpille n'hydrolyse pas les esters myristique, palmitique ou stéarique de la choline. Hard et Peterson (66) ont étudié la distribution de l'enzyme dans le tissu nerveux du chien. Malheureusement, la réaction n'est pas toujours constante et les résultats sont parfois chaotiques. De toute façon, ils ont pu démontrer une activité réduite au niveau des fibres nerveuses du système nerveux central tandis que les cellules ont donné une faible réaction avec un noyau et un nucléole parfois colorés. Au niveau du système nerveux périphérique, la réaction a été très intense, particulièrement au sein des ganglions spinaux et sympathiques. La prostigmine (10^{-5} M) et un excès de substrat ont inhibé la réaction, ce qui fit croire à ces auteurs que, par cette méthode, ils avaient mis en évidence l'activité acétylcholinestérasique. Dans un travail publié subéquentement, on a pu démontrer (67) qu'après section de la moelle épinière, la réaction histochimique disparaît au niveau des ganglions sympathiques parallèlement à l'abolition de l'activité acétylcholinestérasique telle que mesurée par des moyens biochimiques. Ceci ferait croire que l'enzyme mis en évidence était vraiment l'acétylcholinestérase. De plus, une activité acétylcholinestérasique a été mise en évidence au niveau de la plaque motrice du diaphragme non fixé chez le rat, en présence de myristylcholine (196).

En résumé, on peut dire qu'à l'aide de la méthode de Gomori, on peut mettre en évidence, à la fois, l'acétylcholinestérase et la cholinestérase. Les résultats contradictoires obtenus proviennent le plus souvent des effets nocifs de la fixation. En effet, il est bien connu que l'acétylcholinestérase est beaucoup plus sensible que la cholinestérase à l'action des fixateurs, notamment de l'acétone. Ceci prouve l'importance d'une préparation adéquate des spécimens biologiques.

Il a également été possible de démontrer l'activité cholinestérasique en employant l'indoxylacétate et le 5-bromoindoxylacétate en qualité de substrats. A l'aide de ces substrats, une activité estérasique a été démontrée au niveau de la plaque motrice ainsi que dans les cellules de la corne antérieure de la moelle épinière chez le rat (80). De plus, la même activité a été mise en évidence au niveau des globules rouges et ceci est un bon exemple de la précaution qu'il faut apporter dans l'interprétation des résultats histochimiques. En effet, nous avons vu qu'on ajoute du cuivre pour catalyser la transformation de l'indoxyl en indigo. Or, en présence du cuivre, la perméabilité de la membrane du globule rouge à l'égard du 5-bromo-indoxylacétate est détruite et la réaction devient négative.

L'activité acétylcholinestérasique à l'égard de l'indoxylacétate repose, d'une part, sur la parenté de configuration moléculaire entre l'acétylcholine et l'O-acétylindoxyl, et d'autre part, ainsi que nous l'avons déjà vu, sur l'affinité de l'acétylcholinestérase pour un ester dont le résidu acide est l'acide acétique. De plus, il a été prouvé que l'hydrolyse enzymatique des dérivés de l'indoxyl en présence d'acétylcholinestérase diminue avec une augmentation du nombre d'atomes de carbone du résidu acide, l'O-butyrylindoxyl étant hydrolysé très lentement et l'O-benzoyl-

indoxyl, pas du tout (79).

Une troisième méthode a été proposée par Havin, Zacks et Seligman (140) pouvant servir à la mise en évidence des cholinestérases au niveau du système nerveux. Cette méthode est également basée sur la capacité qu'a l'acétylcholinestérase d'hydrolyser les esters acétiques. De plus, la méthode est améliorée du fait qu'un sel de diazonium avec un groupement amide substitué donne naissance à un pigment insoluble dans les graisses après réaction avec le β -naphтол. Le substrat employé est le β -naphtylacétate, mais on peut également employer l' α -naphtylacétate et le 6-bromo-2-naphtylacétate. Avec le premier substrat, la diffusion semble moindre et avec le second substrat, le pigment formé plus brillant mais dans les deux cas, l'hydrolyse enzymatique est plus lente.

Cette méthode peut être utilisée en présence de coupes de tissus frais. Une activité a été démontrée dans les cellules nerveuses du cerveau, de la moelle, des ganglions ainsi qu'au niveau de la plaque motrice. La plus forte partie de l'activité était située sur la membrane des cellules et les noyaux étaient négatifs. Les cellules de Purkinje du cervelet étaient également actives ainsi que les cellules des ganglions sympathiques et les cellules des plexus d'Auerbach et Meissner.

Dans les régions caractérisées par une forte activité acétylcholinestérasique, comme par exemple les cellules nerveuses du cerveau, de la moelle et des ganglions ainsi qu'au niveau des plaques motrices, le pigment précipite sous forme de granules ou encore affiche une distribution ponctuelle. A la suite d'une incubation prolongée, les granules du pigment deviennent coalescents, jusqu'à masquer entièrement la structure cellulaire.

Ravin et ses collaborateurs (140) ont étudié l'effet de l'ésérine sur l'acétylcholinestérase du tissu nerveux. Les préparations microscopiques ont été plongées dans un bain contenant de l'ésérine à la concentration de $5 \times 10^{-5} M$ en tampon véronal à pH 7.8 durant trente minutes à la température du laboratoire. Cette préincubation était suivie d'une incubation en présence de substrat auquel l'ésérine à la même concentration était ajouté. Dans ces conditions, on a détruit l'activité enzymatique. Des coupes de foie ou de rein dans les mêmes conditions expérimentales et en présence du même inhibiteur à la même concentration, n'affichaient aucune diminution d'activité enzymatique. Ravin et ses collaborateurs en ont conclu qu'au niveau du tissu nerveux, le β -naphthylacétate était hydrolysé par l'acétylcholinestérase tandis qu'au niveau du rein et du foie le même substrat était hydrolysé par une estérase non spécifique.

Cette méthode de détection des activités acétylcholinestérasiques présente sûrement de grands avantages. Tout d'abord, il est possible de travailler à un pH de 7.8 qui est sûrement très voisin du pH optimum de l'enzyme tel que déterminé in vitro. L'expérience d'inhibition par l'ésérine prouve qu'au niveau du système nerveux, les cholinestérases sont responsables de l'hydrolyse du β -naphthylacétate. De plus, comme ce taux d'hydrolyse diminue rapidement avec une augmentation du nombre d'atomes de carbone du résidu acide, il semble bien qu'à ce niveau ce soit la fonction acétylestérase de l'enzyme qui prédomine. Enfin, certaines remarques accessoires peuvent être ajoutées: l'acétylcholine et l'acétyl β -méthylcholine inhibent l'hydrolyse du β -naphthylacétate en présence de tissu nerveux mais non en présence d'autres tissus qui contiennent une estérase non spécifique. Donc, on peut dire que

le même substrat est hydrolysé par les deux enzymes, cholinestérase et estérase non spécifique.

On a proposé l'emploi d'un autre substrat naphtolique, qui serait hydrolysé préférentiellement par la cholinestérase non spécifique, la β -carbonaphtoxycholine (139). A l'hydrolyse, il y a libération de β -naphtol à la suite d'une décarboxylation non-enzymatique. Ce dernier précipite après réaction avec un sel de diazenium, tout comme dans la méthode au β -naphtyl-acétate. Il a été démontré que ce substrat est hydrolysé préférentiellement par la cholinestérase non spécifique du sérum, tandis que l'acétylcholinestérase du système nerveux l'hydrolyse à peine in vitro. A notre connaissance, il n'a pas été publié de travaux où soient exposés complètement les résultats que l'on puisse obtenir à l'aide de cette technique. Mais, on a démontré toutefois que la cholinestérase non spécifique donnait une réaction positive au niveau des ganglions d'Auerbach et de Meissner du tube digestif.

Enfin, une dernière méthode a été proposée pour la mise en évidence des activités cholinestérasique et acétylcholinestérasique. Cette méthode proposée originalement par Koelle et Friedenwald (92) repose sur l'emploi de l'acétylthiocholine en qualité de substrat, ou de dérivés apparentés comme la propionylthiocholine, la butyrylthiocholine, l'acétyl β -méthylthiocholine et la benzoylthiocholine. Il peut être ajouté que l'acétylthiocholine produit les mêmes effets pharmacologiques que l'acétylcholine bien qu'il soit reconnu qu'en général ses effets soient de plus courte durée et que l'hydrolyse en soit plus rapide (141).

Le principe de la méthode repose sur la précipitation de la thiocholine cuivrique provenant de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine en présence de glycinate de cuivre. De plus, la solution d'incubation est saturée au

préalable en thiocholine cuivrique, afin de diminuer la diffusion du produit de la réaction histochimique et afin de contrôler du même coup la présence de phénomènes non spécifiques de coloration ou d'adsorption. Passé ce stade, les spécimens microscopiques sont placés en présence de sulfure d'ammonium qui transforme le précipité blanc de thiocholine en un précipité brun très foncé de sulfure de cuivre.

La supériorité de cette méthode sur les autres précédemment décrites réside en ce que les substrats mis en oeuvre ont à peu près les mêmes propriétés chimiques que les substrats qui ont servi à caractériser les cholinestérases par voie biochimique. Nous avons vu que la spécificité de ces derniers vis-à-vis de leurs substrats était chose relative mais que de façon générale l'acétyl β -méthylcholine était le substrat de l'acétylcholinestérase et la benzoylcholine celui de la cholinestérase. Les mêmes homologues soufrés peuvent être utilisés en histochimie.

Dans la méthode originale, Koelle et Friedenwald avait ajouté la thiocholine de cuivre à la solution d'incubation jusqu'à saturation dans l'espoir de précipiter celle qui serait libérée enzymatiquement in situ. De plus, ils avaient arrêté le pH à 8.06, ce qui est le pH optimum de l'enzyme. Cependant, ce n'était pas là le pH optimum de précipitation de la thiocholine de cuivre qui, se situe au contraire à pH 6.4. Il s'agissait donc d'établir un compromis entre le pH optimum d'activité de l'enzyme et le pH optimum de précipitation. De plus, il semble bien que le tampon au maléate ait quelque avantage sur le tampon au phosphate. Dans l'ensemble, avec la méthode modifiée, la diffusion des produits de la réaction devint moindre et partant, les localisations beaucoup plus précises (94).

Par ailleurs, malgré ces modifications, il semblait bien qu'il y avait encore diffusion du produit de la réaction. Koelle lui-même (91) a comparé la localisation des activités enzymatiques par sa méthode d'analyse *in situ* avec celles que l'on obtient par une analyse *extra situm*. Ainsi, par exemple, la cholinestérase non spécifique du foie apparaît localisée dans les noyaux des cellules parenchymateuses, à l'aide d'une méthode d'enzymologie *in situ*. Si, par ailleurs, on prépare un broyat de foie et on isole les noyaux, à peine un quart de l'activité cholinestérasique totale est retrouvé dans ces derniers. Il faut donc admettre ou bien que l'enzyme a diffusé du cytoplasme vers les noyaux au cours de la technique histochimique, ou bien, au contraire, a diffusé dans le liquide de suspension lors de l'isolement des noyaux. En cette alternative, et quelque soit la direction de la diffusion, il est évident que ce phénomène existe et qu'il faut en tenir compte dans l'étude des préparations.

Koelle (91) a démontré qu'en ajoutant du sulfate de sodium en concentration de 24 et 20 pourcent selon qu'il s'agissait de l'acétylcholinestérase ou de la cholinestérase, la localisation intra cellulaire de l'enzyme devient plus précise. Ainsi, par exemple, l'enzyme a été retrouvé uniquement dans le cytoplasme des cellules bordant les sinusoides du foie. De la même façon, en absence de sulfate de sodium les cholinestérases spécifiques et non spécifiques sont situées dans les noyaux des cellules gliales tout aussi bien que dans le cytoplasme et le noyau des cellules ganglionnaires. En présence de sulfate de sodium, la réaction au niveau du noyau devient entièrement négative. Koelle explique ainsi le phénomène de diffusion: l'enzyme est fixé sur son support cytoplasmique à la suite d'une précipitation au sulfate de sodium et ne peut plus diffuser lors des manipulations

histochimiques. Pour séduisante que soit cette hypothèse, il ne semble pas qu'elle soit entièrement conforme aux faits. A l'aide d'autres méthodes où le traitement histochimique est semblable, l'enzyme ne diffuse pas vers le noyau: méthodes au naphtylacétate et à l'indoxylacétate par exemple. La précipitation de la thiocholine se ferait électivement sur le noyau à cause de sa forte charge positive, caractéristique d'un ion ammonium quaternaire. Mais quelqu'en soit la cause, il est évident que l'addition de sulfate d'ammonium, selon les prescriptions de Koelle, rend les localisations plus précises. Cependant, la concentration de l'enzyme d'une cellule à l'autre varie beaucoup lorsque déterminée à l'aide de cette méthode.

En résumé, on peut décrire ainsi les différentes localisations enzymatiques que Koelle et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence:

acétylcholinestérase: les cellules de la corne antérieure et latérale de la moelle épinière, les fibres des nerfs moteurs, la plaque motrice du muscle squelettique, les fibres autonomiques préganglionnaires, les neurones du système parasympathique, certains neurones du système sympathique (les ganglions étoilé et cervical supérieur), certaines fibres post-ganglionnaires (de la glande parotide) et certains neurones sensoriels (racine dorsale de la moelle). De façon générale, on peut dire que l'acétylcholinestérase est présente en concentration relativement élevée au niveau des corps cellulaires, dendrites et cylindres-axes qui, de façon générale donnent naissance à des fibres cholinergiques.

cholinestérase: les cellules névrogliques du sympathique, du parasympathique et des ganglions sensoriels, les cellules de la gaine de Schwann,

les cellules bordant les sinusoides hépatiques, les fibres musculaires lisses, le cytoplasme des cellules du ganglion étoilé et certains autres ganglions de l'intestin grêle ainsi que les fibres associées du corps carotidien.

Grâce aux admirables recherches de Gouteaux et ses collaborateurs, nous pouvons dire que le problème de la localisation histochimique des cholinestérases au niveau de la synapse myoneurale est en voie d'être résolu. (23)(25)(26)(27)(28)(29). Au cours de ces recherches, la méthode à l'acétylthiocholine a été employée. En tout premier lieu, il a été précisé qu'il n'existe pas un pH optimum pour toutes les localisations enzymatiques, mais que celui-ci diffère selon la nature des tissus où siège l'activité. De la même façon, le choix convenable d'un tampon permet dans bien des cas de supprimer de fausses localisations nucléaires. Ainsi, par exemple, il a été précisé que l'emploi du mélange biphosphatique de Sörensen conduit à de fausses localisations sur le noyau. Dans le cas de la synapse myoneurale, le mélange tamponné à l'acide acétique et à l'acétate de sodium donne de bons résultats. Il semblerait toutefois qu'il puisse être remplacé par le mélange au véronal sodique-acétate de sodium-acide chlorhydrique.

La fixation joue un grand rôle dans la nature de l'activité enzymatique décelée. Quand une fixation a dû être pratiquée, ce fut au formol à 10 pourcent qui semble moins dommageable pour l'enzyme que l'acétone. L'acétylcholinestérase s'est révélée plus sensible que la cholinestérase à l'acétone (163). Le temps d'incubation a été arrêté entre 10 et 60 minutes selon les cas, celui-ci ne dépassant 30 minutes qu'avec du matériel fixé. La spécificité de la réaction a été précisée à l'aide des inhibiteurs suivants, DFP, éserine et prostigmine.

L'activité acétylcholinestérasique au niveau de la synapse myoneurale se trouve située en deux régions: l'appareil sous-neural et l'arborisation nerveuse terminale. Rappelons ici les brillantes recherches histologiques qui ont conduit à la description presque complète de la plaque motrice des mammifères, grâce principalement aux travaux de Couteaux lui-même qui a exposé l'état de la question dans un long travail publié en 1947. (24). Pour résumer brièvement la question, on peut dire que chez les mammifères, les rameaux de l'arborisation nerveuse terminale accompagnés d'éléments satellites (téloglie) d'origine schwannienne sont logés à l'intérieur de gouttières creusées dans la substance granuleuse de la sole, au fond desquelles s'effectue la jonction du sarcoplasme et de l'arborisation nerveuse terminale. A la face profonde de ces gouttières synaptiques, on a décrit, sous le nom d'appareil sous-neural, un ensemble d'organites allongés, doués d'une vive affinité pour le vert Janus B en coloration post-vitale. Ces organites en forme de lamelles minces, longues et étroites, paraissent s'attacher par leur bord et sur toute leur longueur à la membrane qui délimite le sarcoplasme. Ils suivent la courbure de chacune des gouttières et affleurent à la surface de la sole où leur ensemble affecte, sur une plaque motrice vue de face, un aspect palissadique. Entre les gouttières synaptiques et autour d'elles se distribuent les noyaux de la sole et de nombreuses granulations, que leur affinité pour certains colorants, et parfois aussi leur forme, permettent de rattacher avec vraisemblance au chondriome.

Pour bien mettre en évidence l'appareil sous-neural coloré par la méthode histochimique à l'acétylthiocholine, Couteaux et Taxi (29) n'ont pas travaillé au pH de 6.4 recommandé par Koelle, mais à un pH nettement inférieur, c'est-à-dire 4.7 ou 4.8. Il est possible de détecter l'acétylcholi-

nestérasique à ce niveau sur des muscles frais de souris ou des muscles fixés au préalable par un contact direct avec le formol à 10 pourcent et à 18° pendant vingt-quatre heures. L'activité acétylcholinestérasique à ce niveau est inhibée totalement par un traitement au DFP à la concentration de $2 \times 10^{-7}M$ ou encore à l'ésérine ou à la prestigmine à la concentration de $5 \times 10^{-6}M$.

L'appareil sous-neural, sur des plaques motrices vues de face, se présente comme un liséré sombre se détachant bien sur un muscle incolore et dont le centre, contenant l'arborisation nerveuse, demeure négatif. A la suite d'une étude attentive, il est possible d'apercevoir l'aspect palissadique caractéristique que présente l'appareil à la surface de la sole. Sur une coupe pratiquée transversalement par rapport à l'un des rameaux de l'arborisation terminale, l'appareil sous-neural se reconnaît facilement par son aspect d'un fer à cheval à concavité tournée vers la surface de la sole.

L'appareil sous-neural du buisson de Kühne chez la grenouille a également pu être mis en évidence sur du matériel frais. Sur du matériel fixé au formol, toute activité acétylcholinestérasique disparaît. La gouttière synaptique chez la grenouille présente un très faible rayon de courbure. Mettant au point sur le fond de la gouttière, on peut aisément observer les lamelles sur toute leur étendue.

L'arborisation nerveuse terminale, comme nous l'avons vu, est logée dans la surface profonde de l'appareil sous-neural. Il a été possible de mettre en évidence une seconde localisation cholinestérasique à ce niveau bien que celle-ci ne s'accomplisse intensément et électivement qu'après fixation au formol à 18° durant vingt-quatre heures. De plus, le pH d'incubation a été élevé à une valeur comprise entre 5.3 et 5.6. Les inhibiteurs précités,

aux mêmes concentrations, exercent un effet identique. L'observation des plaques motrices vues de face, ou des coupes transversales de fibre musculaire passant par la plaque motrice, montre que la coloration s'étend à tout le contenu de la gouttière synaptique. Sur une coupe transversale, ce n'est plus cette fois l'appareil sous-neural qui apparaît coloré, mais seulement la portion comprise à l'intérieur de ce que Couteaux et Taxi ont appelé "fer à cheval". Enfin, seule se colore la portion proprement synaptique de l'arborisation nerveuse logée à l'intérieur des gouttières de la sole. Même la portion préterminale amyélinique du neurite ne se colore pratiquement pas.

CHAPITRE SIXIEME

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE METHODE POUR LA DETECTION HISTOCHIMIQUE DES ACTIVITES ESTERASIQUES.

Nous avons vu au cours du chapitre cinquième que quatre méthodes différentes conduisent à déceler les activités acétylcholinestérasiques au sein des tissus, à savoir, les méthodes utilisant en qualité de substrat les esters de la choline à haut poids moléculaire, l'indoxylacétate, le β -naphtylacétate et la β -carbonaphtoxycholine et finalement l'acétylthiocholine et autres homologues soufrés. Les méthodes qui ont pour base l'emploi de l'indoxylacétate et du β -naphtylacétate font appel à la fonction acétylestérase de l'acétylcholinestérase.

A.- PRINCIPE DE LA METHODE: HYDROLYSE DE L'ACIDE THIOLACETIQUE.

Nous avons déjà considéré le mécanisme d'action par lequel l'acétylcholinestérase catalyse la réaction d'hydrolyse. Qu'il suffise de rappeler qu'à la surface de l'enzyme se trouvent deux centres actifs, l'un anionoïde qui peut réagir avec la partie cationique de l'acétylcholine et autres molécules semblables, l'autre estérasiqye comprenant deux groupes, l'un basique, l'autre acide. C'est sur ce dernier centre que repose le mécanisme de la catalyse. Le premier stade de la formation du complexe enzyme-substrat comprend une réaction entre le groupe basique du centre estérasiqye à la surface de l'enzyme. Le groupe acide est essentiel pour le processus d'hydrolyse qui suit la formation du complexe enzyme-substrat. C'est par des mesures de l'inhibition sans concurrence de l'acétylcholi-

nestérase par la prostigmine en fonction du pH qu'il a été prouvé que le groupe basique est responsable de la formation du complexe enzyme-substrat. Par ailleurs, c'est le groupe acide qui est responsable de la formation d'un enzyme acylé, l'intermédiaire contrôlant le taux de la réaction.(175).

Si le mécanisme proposé d'hydrolyse est vrai, l'acétylcholinestérase devrait catalyser l'hydrolyse de l'acide thiolacétique. En effet, Wilson (176) a été capable de démontrer que l'enzyme pouvait provoquer cette réaction, avec libération d'acide acétique et d'hydrogène sulfuré. Ceci constitue un puissant argument en faveur de l'idée que l'enzyme catalyse l'échange d'oxygène entre des acides et l'eau, condition nécessaire pour la justesse de la théorie proposée de l'activité enzymatique qui fait intervenir un enzyme acylé comme intermédiaire. Ce sont les molécules d'acide non dissocié qui entrent directement en réaction. La prostigmine qui réagit avec les deux centres de l'enzyme inhibe complètement l'hydrolyse de l'acide thiolacétique. Cette réaction a été étudiée en présence d'un extrait purifié d'acétylcholinestérase provenant de l'organe électrique de *Electrophorus electricus*.

L'hydrolyse de l'acide thiolacétique s'accompagne d'une libération de H_2S . Le sulfure d'hydrogène libéré au niveau des structures contenant l'acétylcholinestérase, ou peut-être une autre estérase, est un composé facile à précipiter in situ, pouvant donner naissance à un sulfure métallique fortement insoluble.

Pour mettre au point une méthode histochimique pouvant servir à la démonstration in situ des activités cholinestérasiques, il ne s'agissait donc que de trouver un agent capable de précipiter in situ l'hydrogène sulfuré provenant de la réaction.

B.- DETAIL EXPERIMENTAL.

La solution d'incubation pour la démonstration de l'activité estérasi-
que était de la composition suivante:

acide thiolacétique, à concentration finale de 0.12M dissout dans 83 ml
de Na_2HPO_4 , 0.2M; Mélange de McIlvaine à l'acide citrique et au phos-
phate disodique, à pH 6.2, 16 ml; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.1M, 1 ml, pour atteindre
la concentration finale de 0.001M. Volume final, à pH 6.2, 100 ml.

Le nitrate de plomb est ajouté à la solution d'incubation afin de précipiter
le H_2S libéré sous forme d'un précipité brun insoluble. L'acétate de plomb
à la même concentration produit le même effet. Cependant, si le nitrate de
plomb est ajouté à la solution d'incubation à la concentration de 10^{-4}M , le
précipité qui en résulte au sein des structures tissulaires n'est pas claire-
ment défini. L'addition du sel de plomb en milieu tamponné au phosphate fait
apparaître un léger nuage dans la solution, mais en agitant, celle-ci devient
à peu près limpide à ce pH. Au cours de toutes les expériences ici décrites,
nous avons arrêté le pH à 6.2 parce que, dans cette zone, l'enzyme est encore
actif d'une part, et que, d'autre part, le taux de la réaction d'hydrolyse de
l'acide thiolacétique est suffisamment élevé. A la fin de la période d'in-
cubation, variant entre 45 et 60 minutes, le pH demeure inchangé mais il ap-
paraît un précipité brunâtre dans la solution d'incubation.

Les coupes de tissus ont été préparées par la méthode de congélation
sur du matériel non fixé ou bien sur du matériel fixé durant environ vingt
heures dans le formol neutralisé à 4 pourcent et à une température de 4°.
Les coupes de tissus ont été retenues sur les lames en appliquant sur celles-
ci un film d'albumine à 1 pourcent. Par la suite, les préparations ont été

séchées durant deux heures dans un courant d'air ou encore sous vide à 4° durant toute la nuit. A la suite de ces opérations, les coupes adhéraient suffisamment à la lame pour supporter les manipulations histochimiques et les manipulations de coloration. Dans tous les cas, les coupes ont été incubées à la température du laboratoire durant des périodes de temps variant de 30 à 60 minutes. Lorsqu'une coloration était nécessaire, elle a été faite à la fuch sine de base à la concentration de 0.02 pourcent durant deux minutes. Puis, nous avons successivement fait passer les préparations dans un bain d'alcool à 95 pourcent et dans deux bains d'alcool absolu et finalement dans trois autres bains de xylol. Quand aucune coloration de fond n'a été pratiquée, les préparations ont d'abord été passées à l'alcool à 80 pourcent. Enfin, celles-ci ont été montées dans le liquide de Permont (Fisher). Dans certains cas, pour un examen microscopique rapide, nous avons fait quelques montages au mélange glycérogel. Nous tenons à ajouter que l'emploi de la safranine est contre-indiqué parce que ce composé redissout le précipité de sulfure de plomb ou détruit la structure tissulaire qui le supporte.

C.- ETUDE DE L'ACTIVITE ESTERADIQUE AU NIVEAU DE LA PLAQUE MOTRICE DE LA FIBRE MUSCULAIRE ET AU NIVEAU DE L'EPITHELIUM DE LA LANGUE.

A l'aide de cette nouvelle méthode, nous avons étudié la localisation de l'acétylcholinestérase au niveau de la plaque motrice des fibres musculaires de la langue coupée transversalement, sans fixation initiale. Dans la figure 13, se trouve représenté un groupe de plaques motrices, les unes apparaissant de profil, les autres vues de face. On peut y constater la régularité de la réaction sur un grand nombre de plaques. (X200).



Figure 13

Vue d'un groupe de plaques motrices à la surface des fibres musculaires de la langue. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X200

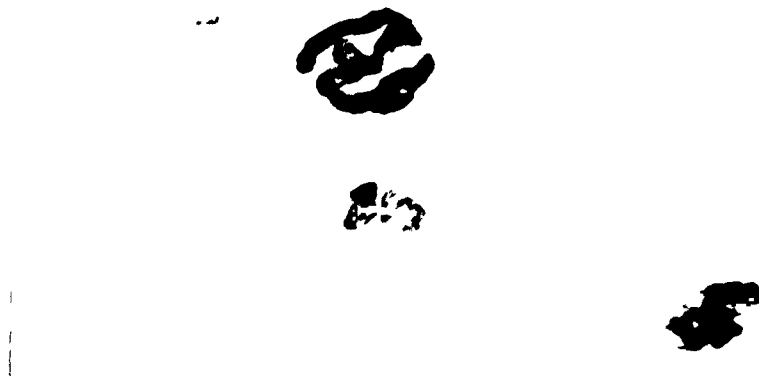


Figure 14

Vue de quelques plaques motrices à la surface des fibres musculaires de la langue démontrant l'aspect réticulaire des plaques. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X700.

La coloration de fond est à la fuchsine de base. A l'extrême droite de la microphotographie on peut apercevoir quelques héparinocytes qui prennent très fortement le colorant.

Dans la figure 14 apparaissent deux de ces plaques motrices à un grossissement de X700. La structure réticulaire de la plaque se distingue nettement avec des centres clairs à l'intérieur. De plus, si le temps d'incubation est arrêté à 30 minutes au lieu de 60 comme dans les deux cas précédents, l'appareil sous-neural apparaît comme un liséré sombre dont le centre demeure clair, ainsi que l'a décrit Couteaux. Au cours de ces études, nous avons pratiqué des coupes à congélation d'une épaisseur de 10 microns après fixation initiale au formol à 4 pourcent durant 20 heures à 4°.



Figure 15

Vue de quelques plaques motrices à la surface des fibres musculaires de la langue après fixation au formol. A noter l'aspect granuleux du précipité. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X710.

Le fin détail histologique de la plaque motrice disparaît. La réaction est encore très évidente sous forme d'un précipité granuleux, mais la structure réticulaire est détruite. (Figure 15).

D.- ETUDE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE AU NIVEAU DE LA SYNAPSE MYONEURALE DU GASTROCNEMIEN CHEZ LA GRENOUILLE.

L'activité estérasique au niveau de la synapse myoneurale a également été étudiée. Les coupes ont été préparées par congélation et coupées à 10 microns d'épaisseur. La fixation au formol, au niveau du gastrocnémien, non seulement rend la réaction diffuse mais l'abolit complètement.

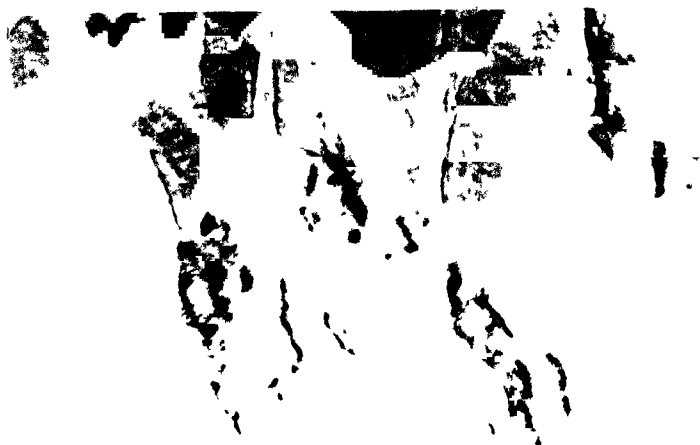


Figure 16

Vue de l'arborisation nerveuse terminale ou buisson de Kühne à la surface de la fibre musculaire du gastrocnémien chez la grenouille. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X 234

Chez ce vertébré inférieur, la synapse myoneurale ne prend pas l'aspect d'une plaque motrice complètement développée avec sole, comme chez

les mammifères. Il s'agit plutôt d'une ramification de la terminaison nerveuse connue sous le nom de buisson de Kühne, contenue dans une gouttière sous-neurale très peu profonde à la surface du muscle. Nous pouvons constater qu'à l'aide de la méthode à l'acide thiolacétique, seule l'arborisation nerveuse terminale donne la réaction (Fig. 16). De plus, nous pouvons ajouter que la fibre nerveuse donnant naissance à l'arborisation terminale demeure négative dans son parcours à la surface de la section. Il n'est pas possible de l'apercevoir toutefois sur la figure 16.

E.- ETUDE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE AU NIVEAU DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ LE RAT.

A l'aide de la présente méthode, nous avons étudié l'activité cholinestérasique au niveau du système nerveux central chez le rat. Au cours de cette étude, le cerveau et la moelle épinière ont été fixés dans le formol neutralisé à 4 pourcent durant vingt heures et à 4°. Puis les coupes ont été préparées par congélation à une épaisseur de 10 microns. Sans fixation au formol, il a été impossible d'obtenir des coupes propres à une étude histologique fine.

Une forte réaction a été retrouvée au niveau du noyau dentelé du cervelet, du noyau rouge, du noyau moteur de la V^e paire et du noyau diffus. (a) Dans un ordre décroissant d'activité, la même réaction s'est manifestée au niveau des cellules motrices de la corne antérieure de la moelle, des cellules de Purkinje du cervelet et des cellules pyramidales du cortex cérébral.

(a) L'auteur remercie bien sincèrement monsieur le Professeur auer, directeur du laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine, qui a bien voulu le guider au cours de l'identification de ces différents noyaux cérébraux.

Dans ce dernier cas, la réaction était très faible.

Dans la figure 17 est représenté un groupe de cellules nerveuses du noyau dentelé du cervelet.

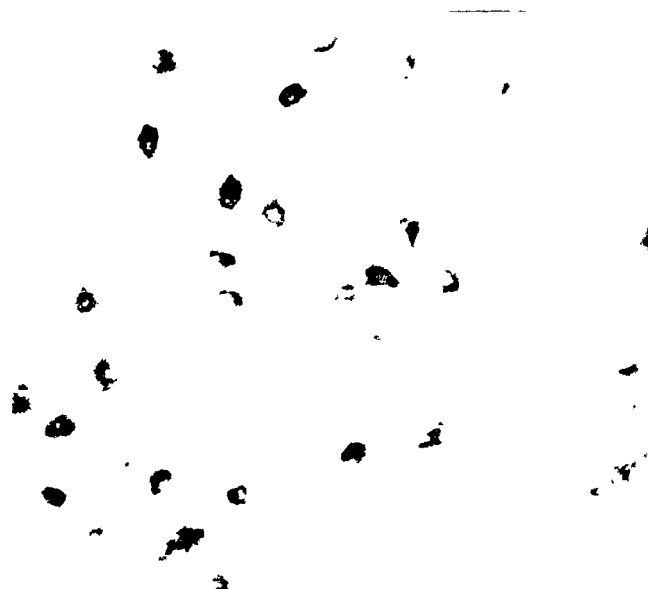


Figure 17

Vue d'un groupe de neurones du noyau dentelé du cervelet du rat. Substrat: acide thiolacétique.
Gross. X 200

A ce faible grossissement, on peut voir que le corps cellulaire est intensément positif tandis que le noyau de toutes les cellules est négatif. Nous tenons à souligner combien la réaction est régulière dans son intensité au niveau des différentes cellules, tandis que le fond apparaît à peu près négatif, à une faible coloration fibrillaire près.

La figure 18 représente quelques cellules à un grossissement de x500. Sur cette microphotographie, on peut apercevoir le corps cellulaire



Figure 18

Vue de quelques cellules nerveuses du noyau dentelé du cervelet montrant le corps cellulaire intensément coloré ainsi que la partie proximale de ses prolongements.
Substrat: acide thiolacétique. Gross. X500.



Figure 19

Vue de deux cellules nerveuses du noyau dentelé du cervelet montrant l'aspect granuleux du précipité distribué en anneau autour du noyau qui demeure négatif. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X700

intensément coloré ainsi que la partie proximale de ces prolongements. La figure 19 représente deux cellules du même noyau à un plus fort grossissement ($\times 700$). On peut y noter l'aspect granuleux du précipité distribué à la surface de la cellule avec un anneau de plus forte concentration autour du noyau qui demeure négatif. On peut affirmer que cette distribution en anneau correspond à la position de l'appareil de Golgi, sans savoir toutefois s'il ne s'agit que d'un parallélisme. Cependant, cette distribution particulière apparaît évidente dans toutes les cellules.

F.- ETUDE DE L'INHIBITION DE LA REACTION PAR LA PROSTIGMINE ET LE TETRAETHYLPYROPHOSPHATE.

De plus, nous avons étudié l'inhibition de l'hydrolyse de l'acide thiolacétique en présence de prostigmine et de tétraéthylpyrophosphate (TEPP).

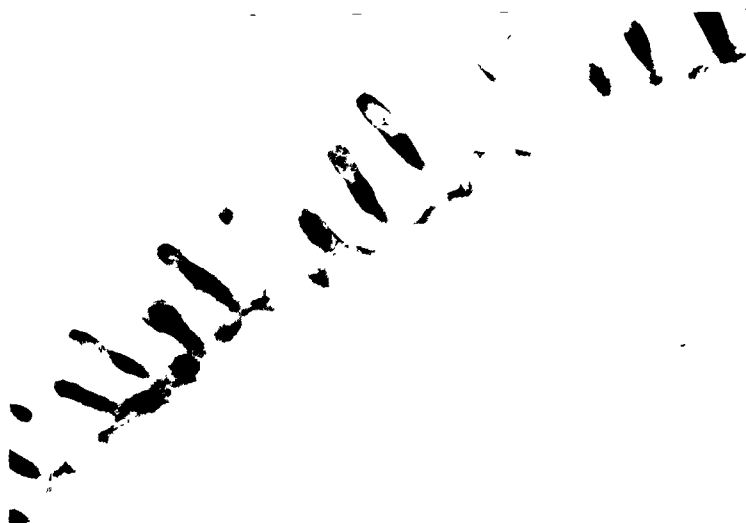


Figure 20

Inhibition de l'activité enzymatique au niveau de la plaque motrice par la prostigmine à la concentration de 10^{-6} M.
Substrat: acide thiolacétique. Gross. $\times 65$.

La prostigmine abolit complètement la réaction au niveau de la plaque motrice des fibres de la langue lorsque les coupes sont pré-incubées en présence d'une solution de l'inhibiteur à la concentration de 10^{-6} durant 15 minutes à la température du laboratoire. Sur la même préparation, on peut constater (figure 20) que contrairement à la réaction au niveau de la plaque motrice, la réaction estérasique au niveau de l'épithélium est encore active à cette concentration de l'inhibiteur (10^{-6} M) mais qu'elle disparaît à peu près totalement à une concentration de 10^{-5} M si ce n'est à la base de certaines papilles. (Figure 21).



Figure 21

Inhibition de l'activité enzymatique au niveau de la plaque motrice et au niveau de l'épithélium par la prostigmine à la concentration de 10^{-5} M. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X65.

De la même façon, nous avons étudié l'action du TEPP sur l'activité estérasique d'une coupe transversale de la langue du rat. Les préparations microscopiques ont été incubées en présence de l'inhibiteur à une concentration de $10^{-7}M$ durant 15 minutes à la température du laboratoire puis ré-incubées en présence du substrat. Nous devons toutefois attirer l'attention sur le fait que nous n'avons pas employé une solution purifiée de TEPP et il se peut fort bien que d'autres phosphates organiques accompagnant celui-ci exercent à leur tour une action inhibitrice.



Figure 22

Inhibition de l'activité enzymatique au niveau des plaques motrices et au niveau de l'épithélium par le TEPP à la concentration de $10^{-7}M$. Substrat: acide thiolacétique. Gross. X65.

On peut constater (figure 22) que le TEPP inhibe complètement l'activité enzymatique au niveau de la plaque motrice tandis que l'estérase

au niveau de l'épithélium continue à donner une très faible réaction à la base des papilles. Il semble bien qu'à une même concentration moléculaire le TEPI soit plus actif que la prostigmine.

G.- CONCLUSION: NATURE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE MISE EN EVIDENCE A L'AIDE DE CETTE NOUVELLE METHODE ET LIMITE DE LA SPECIFICITE.

A l'aide de cette nouvelle méthode à l'acide thioacétique, il est possible d'obtenir de très bonnes localisations des activités estérases in situ. Nous croyons qu'il s'agit là d'une méthode très simple et très rapide. Tous les réactifs sont présents à la fois dans le milieu d'incubation et la précipitation du produit final, le sulfure de plomb prend naissance instantanément au fur et à mesure de l'hydrolyse du substrat. Il est possible qu'à la concentration employée, l'agent détecteur, le nitrate de plomb, exerce une action inhibitrice sur l'enzyme. Nous n'avons pas fait de détermination en parallèle in vitro pour éclaircir ce point.

Résultant de l'activité enzymatique, la plaque motrice du muscle strié prend son aspect bien connu de structure réticulaire avec des espaces clairs entre les circonvolutions du serpent. Ceci répond assez bien à la description de Couteaux à la suite d'une coloration au vert Janus B, colorant électif de cette structure, et à la suite d'un test en présence d'acétylthiocholine. Nous avons tout lieu de croire que dans le cas présent ce serpent représente tout aussi bien l'appareil sous-neural décrit par Couteaux. Cependant, dans le cas présent, l'appareil sous-neural n'apparaît pas clairement. Il est bien possible qu'au pH où nous travaillons, nous n'étions pas dans les conditions les plus propices pour bien démontrer ce dernier détail. Couteaux a en effet indiqué qu'il fallait opérer au très bas pH de 5 et même

moins pour démontrer l'aspect canaliculaire de l'appareil sous-neural. À pH 6.2 et après une incubation de 30 minutes seulement, il est possible d'apercevoir cet aspect canaliculaire au niveau de certaines plaques avec un grossissement de X1200.

Au niveau du système nerveux central, la méthode de détection des activités estérasiques à l'acide thiolacétique nous a permis de constater que les enzymes sont localisées dans le cytoplasme, tandis que dans le noyau la réaction est franchement négative. Ceci est contraire à ce qu'a trouvé Koelle à l'aide de sa méthode originale. Par la suite, il a pu corriger cette fausse localisation en ajoutant de fortes concentrations de sulfate de sodium, ainsi que nous l'avons déjà vu, dans le but de prévenir une translocation des enzymes du cytoplasme vers le noyau. À l'aide de la présente méthode, nous avons pu constater que rien de tel ne se passe au cours des manipulations histochimiques. Il n'y a aucune translocation de l'enzyme et le noyau demeure négatif dans tous les cas.

Autour du noyau, nous avons pu mettre en évidence une plus forte concentration d'enzyme distribuée selon un plan qui rappelle la forme de l'appareil de Golgi. Nous ne pouvons dire s'il ne s'agit là que d'un heureux parallélisme mais de toute façon cette distribution est évidente dans la majorité des cas où le noyau est visible.

La spécificité de la réaction de l'hydrolyse de l'acide thiolacétique n'est certainement pas limitée à l'acétylcholinestérase, même si cette réaction a été décrite pour la première fois par Wilson comme étant le résultat de l'activité d'une préparation purifiée provenant de l'organe électrique de *Electrophorus electricus*. Nous avons pu constater que l'estérase

de l'épithélium de la langue donne une réaction suffisamment intense et que de plus l'enzyme à ce niveau est plus résistant à l'action inhibitrice de la prostigmine et du TKPP que l'enzyme de la plaque motrice. Cette sensibilité à la prostigmine permet de conclure à une activité cholinestérasi- que au niveau de la plaque motrice. De plus, l'activité des enzymes très sensibles à l'action de ces deux inhibiteurs peut être partagée par la cho- linestérase et l'acétylcholinestérase. Un essai en présence de DFP devrait être fait afin de délimiter la part qui revient à chacun de ces enzymes, puisque nous avons vu que le premier de ceux-ci est plus sensible que le second à une faible concentration de DFP. Cet essai prend d'autant plus d'importance qu'il a été démontré que la cholinestérase porte à la surface de sa molécule un centre estérasique responsable de l'hydrolyse de l'acide thiolacétique tout comme l'acétylcholinestérase.

En résumé, nous avons exposé au cours du présent chapitre une mé- thode simple de détection des activités estérasiques basée sur l'hydrolyse de l'acide thiolacétique. Tous les réactifs sont présents à la fois dans le liquide d'incubation et le produit final de la réaction, le sulfure de plomb précipite extemporanément, sans qu'il soit nécessaire d'introduire une seconde réaction. A l'aide de cette méthode, nous avons pu démontrer une activité cholinestérasi- que au niveau de la plaque motrice et au niveau du système nerveux central, principalement dans les neurones moteurs. Ce- pendant, la réaction n'est pas spécifique pour les cholinestérases puisque l'estérase contenu dans l'épithélium de la langue donne une réaction suffi- samment intense. Nous avons vu toutefois qu'à l'aide de la prostigmine, il est possible de faire la distinction entre les deux groupes d'enzymes, les cholinestérases étant plus sensibles que l'estérase non spécifique.

CHAPITRE SEPTIEME

DETERMINATION QUANTITATIVE "IN SITU" DE L'ACTIVITE ACETYLCHOLINESTERASIQUE AU NIVEAU DE LA PLAQUE MOTRICE PAR VOIE D'HISTOPHOTOMETRIE.

L'analyse quantitative "in situ" se distingue de l'analyse quantitative "extra situm" en ce que la structure tissulaire est respectée. De plus, dans des conditions idéales, l'intensité de la réaction est mesurée au sein de la cellule ou du groupement cellulaire où celle-ci s'est effectuée. L'analyse in situ s'est révélée la méthode de choix des histochimistes puisqu'elle permet d'établir des différences qualitatives et quantitatives entre les différents éléments des tissus à l'égard d'une réaction donnée.

Ce but est bien contraire à celui atteint par analyse extra situm où par définition, la structure tissulaire est détruite. Cependant, à l'aide de cette méthode, et dans des conditions de travail bien déterminées, on a pu mettre en évidence d'une façon très précise la localisation de certaines substances chimiques. Mais il faut toujours demeurer prudent dans l'interprétation des résultats, puisqu'il y manque toujours la confirmation qu'apporte un examen au microscope. Ainsi, l'analyse extra situm a-t-elle permis les études les plus poussées à l'échelle de la cellule et s'est-elle révélée la méthode de choix des cytochimistes.

A.- CHOIX D'UNE REACTION ET PRINCIPE DES MESURES HISTOPHOTOMETRIQUES.

L'analyse quantitative in situ a donné des résultats d'une très grande précision pourvu que certaines conditions soient observées avec rigueur.

En tout premier lieu, la réaction doit être spécifique, ce qui va sans dire. De plus, le produit de la réaction ne doit pas diffuser à travers les structures voisines puisque dans la majorité des cas il ne s'agit pas de mesurer la quantité absolue d'une substance mais bien au contraire sa concentration en une surface donnée. La substance doit donc être distribuée également et n'avoir aucune tendance à s'agglomérer en grumeaux, autrement les mesures seraient loin d'être uniformes et reproductibles. Enfin, le produit de la réaction ne doit pas être trop opaque au sein des structures tissulaires, car les mesures d'opacimétrie sont les plus difficiles à effectuer et deviennent très imprécises avec un accroissement du précipité.

Ces différentes considérations nous ont guidés dans le choix d'une réaction qui puisse détecter l'activité acétylcholinestérasique au niveau de la plaque motrice. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre précédent, les réactions de Gomori et de Koelle conduisent à un produit final opaque très difficile à mesurer par histophotométrie. Il en va de même de la méthode à l'acide thiolacétique que nous venons de décrire. Restait donc la méthode au β -naphthylacétate. Le β -naphthol libéré, après réaction avec un sel de diazonium, donne naissance à un pigment pourpre dont le coefficient moléculaire d'absorption peut être mesuré in vitro, si nécessaire, et dont la déposition tissulaire n'est pas opaque.

Il a été démontré que l'acétylcholinestérase pouvait catalyser l'hydrolyse du β -naphthylacétate (139) tout comme celle d'un grand nombre d'esters dont le résidu acide est l'acide acétique. Parmi ceux-ci se trouvent la triacétine (10), l'éthylchloroacétate (124) et l'indoxylacétate (8). L'attaque préférentielle de la β -carbonaphtoxycholine par la cholinestérase non spécifique a été démontrée par Ravin et ses collaborateurs (139).

De plus, il est bon d'ajouter que le pH de la réaction, 7.8, est très voisin du pH optimum des cholinestérases, ce qui est très important pour des études quantitatives. Dans certains cas l'activité enzymatique a été étudiée en présence de β -carbonaphtoxycholine spécifique de la cholinestérase.

L'intensité de la réaction a été mesurée par histophotométrie, l'une des méthodes de choix en histochimie quantitative. Le principe de ces estimations repose sur l'absorption de la lumière par l'objet microscopique. Ainsi que le souligne Lison (106), la nécessité de travailler à fort grossissement du microscope et sur des aires extrêmement réduites rend obligatoire l'utilisation d'instruments extrêmement sensibles. On réussit maintenant à opérer sur des volumes de substance de l'ordre de 10^{-10} mm^3 et à déceler des quantités de l'ordre de $10^{-7} \mu\text{g}$. La détermination photométrique consiste en la mesure de l'absorption de la lumière par la substance à étudier au sein de la préparation microscopique.

Soit I_0 , l'intensité lumineuse avant passage à travers la substance et soit I , l'intensité lumineuse après passage, la transmission T est alors définie par l'expression

$$T = I / I_0$$

En pratique, I_0 représente la transmission à travers la préparation microscopique dans une région voisine et très semblable à la structure à mesurer sauf que la substance à l'étude y est absente. Nous discuterons plus loin le choix de cette région qui est très important et qui constitue le "blanc". I représente la transmission de la lumière à travers la substance à l'étude qui est logée dans une structure donnée, cellule ou groupement cellulaire. Chaque détermination histophotométrique comporte donc deux mesures

d'intensité lumineuse, la première à travers un blanc, la seconde à travers la substance localisée en un point du spécimen. Si on appelle extinction, D, la valeur:

$$D = -\log T,$$

on a, si la loi de Beer s'applique,

$$D = ELE$$

où C représente la concentration de la substance, L, l'épaisseur de l'objet et E le coefficient moléculaire d'absorption, dont la valeur est constante pour une substance donnée, à une longueur d'onde déterminée.

Pour les déterminations en valeur absolue, le coefficient moléculaire d'absorption, E, doit être mesuré au moyen de solutions de concentration connue. Cette détermination peut être effectuée pour une substance à étudier selon les voies ordinaires de la biochimie. Cependant, Lison a décrit un instrument qui permet d'effectuer cette mesure de coefficient moléculaire d'absorption dans les conditions mêmes où la détermination histophotométrique sera faite.

Dans le cas qui nous occupe présentement, il ne s'agit que de déterminer la teneur relative des plaques matrices en β -naphtol. La détermination du coefficient moléculaire d'absorption n'est donc pas nécessaire. En effet, E et L sont deux valeurs constantes représentant respectivement le coefficient moléculaire d'absorption du β -naphtol et l'épaisseur de la préparation qu'en pratique on peut supposer toujours semblable à elle-même. Il en reste donc qu'on peut écrire

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{D_1}{D_2}$$

où C_1 et C_2 sont exprimés en unités arbitraires. Ainsi, dans la suite de ce travail, l'activité enzymatique sera exprimée en unités de densité optique. Il est évident que le point critique au cours de nos mesures sera l'épaisseur de l'objet. Cependant, l'analyse statistique des résultats obtenus nous prouve que l'erreur introduite par ce facteur, bien que probablement existante, peut être négligée.

B.- DESCRIPTION DE L'HISTOPHOTOMETRE UTILISE.

Les mesures de l'activité acétylcholinestérasique ont été effectuées à l'aide d'un histophotomètre très simple, mis au point dans notre laboratoire. (Fig. 23).

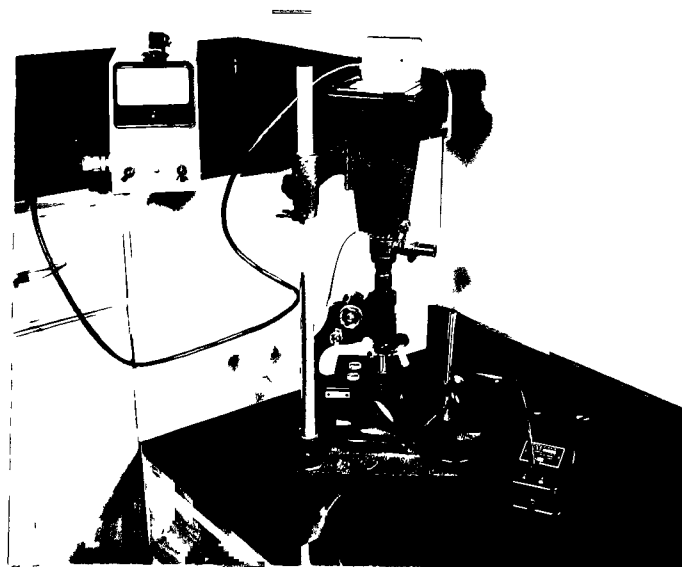


Figure 23

Histophotomètre pouvant servir à la mesure de l'activité enzymatique. Description dans le texte.

Cet appareil consiste d'abord en une source d'éclairage à voltage constant. Avec l'appareil présentement décrit, une différence de potentiel de six volts produit un éclairage suffisant pour travailler à l'échelle la plus sensible de l'électro-photomètre. Le faisceau lumineux, après passage à travers un filtre bleu est dirigé sur le miroir du microscope. L'image microscopique est projetée sur un écran de verre dépoli mesurant 11.0 X 8.4 cm, à travers une chambre photographique. Avant d'effectuer toute mesure photométrique, le faisceau lumineux est dirigé exactement sur le centre géométrique de l'écran. La partie optique de l'appareil est au point pour effectuer les mesures photométriques.

La cellule photo-électrique est apportée au centre géométrique de l'écran et raccordée à l'électrophotomètre. Cette cellule porte un iris de diamètre variable. Dans le cas qui nous occupe présentement, nous avons arrêté notre choix à un iris d'un diamètre de 4 mm, ce qui est légèrement inférieur au diamètre moyen des plaques motrices colorées par la méthode au β -naphtylacétate et agrandies 240 fois. Cette précaution est de la plus grande importance car si l'iris de la cellule photoélectrique débordait la plaque motrice, la transmission de la lumière augmenterait de beaucoup, et d'une façon incontrôlable, ce qui ruinerait tout espoir d'arriver à des résultats quantitatifs. Il ne reste plus alors qu'à apporter l'image de la préparation microscopique au centre de l'écran en manoeuvrant le charriot du microscope. Celle-ci est tout d'abord projetée à faible grossissement afin de repérer les plaques, puis à un plus fort grossissement (X240) afin d'effectuer les mesures selon la méthode décrite par Dempsey, Wislocki et Singer. (36).

C.- PREPARATION DU MATERIEL A L'ETUDE ET METHODE.

L'étude quantitative des activités enzymatiques à l'échelle microscopique ne saurait s'accomplir sur des spécimens biologiques qui ont été fixés. Il est bien connu en effet que les moins violents des fixateurs, par exemple le formol neutre à 4 pourcent, dénaturent l'enzyme, abolissant ainsi une grande partie de son action catalytique. Au cours de ce travail, nous avons choisi d'opérer sur la langue du rat coupée en section transversale. En effet, celle-ci contient un grand nombre de fibres musculaires orientées en toutes directions. Les chances sont donc bonnes de sectionner une grande partie des plaques motrices en un plan favorable à leur étude. L'importance de l'orientation des fibres musculaires sur la préparation microscopique sera discutée plus loin.

De plus, les estérases contenues dans l'épithélium de la langue accompagnent sur la même section les cholinestérases de la plaque motrice, ce qui est très favorable pour une étude comparée des deux enzymes. Nous verrons que cette heureuse distribution des deux ferments nous a permis de préciser la nature de l'enzyme au niveau de la plaque motrice telle qu'elle est révélée à l'aide de la technique au β -naphthylacétate. Dans certains cas, nous avons étudié l'activité enzymatique au niveau de la plaque motrice des muscles intercostaux et du diaphragme. Toutes les caractéristiques que nous décrivons plus bas s'appliquent aussi bien aux enzymes de la plaque motrice de la langue qu'à celles des muscles intercostaux et du diaphragme. Nous avons donc préparé des sections en coupe transversale de la langue du rat par congélation à l'aide du gaz carbonique liquéfié. Les sections ont été coupées à 15 microns d'épaisseur et appliquées directement sur la lame sans ajouter aucun agent pour les y retenir. Manipulés avec soin, ces préparations

microscopiques étaient assez solides pour supporter toutes les opérations subséquentes.

La solution d'incubation pour le β -naphtylacétate était de la composition suivante au litre:

β -naphtylacétate, 100 mg; di-ortho-anisidine tétrazoté 400 mg;
NaCl 0.03M, en tampon au véronal à pH 7.8.

Le β -naphtylacétate a d'abord été dissout dans 5 ml d'acétone puis ajouté lentement au liquide d'incubation immédiatement avant usage et en agitant. Dans ces conditions, la solution demeure limpide et il n'est pas nécessaire de la filtrer.

La solution d'incubation pour la β -naphtoxycholine contenait les ingrédients suivants au litre:

β -carbonaphtoxycholine, 200 mg; di-ortho-anisidine tétrazoté 400 mg;
CaCl₂ 0.3M, en tampon au véronal à pH 7.4.

A moins d'indication contraire, le temps d'incubation en présence de β -naphtylacétate a été de quinze minutes à la température du laboratoire tandis qu'en présence de β -naphtoxycholine, il a été de trente minutes à 35°. Pour les examens au microscope, les préparations ont été montées dans le mélange glycérogel. Ces préparations microscopiques sont très stables et peuvent être conservées plusieurs mois sans détérioration apparente.

D.- DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA PLAQUE NOTRICH COLORÉE PAR LA METHODE AU β -NAPHTYLACÉTATE ET A LA β -CARBONAPHTOXYCHOLINE.

A l'aide de ces deux réactions, il est impossible d'obtenir de fines localisations histochimiques à un grossissement poussé. Mais là n'était pas le but.

La figure 24 représente quelques plaques motrices vues de face à la surface des fibres musculaires à un grossissement de X207. Celles-ci se détachent en zones d'un bleu pourpre intense sur un fond rose.

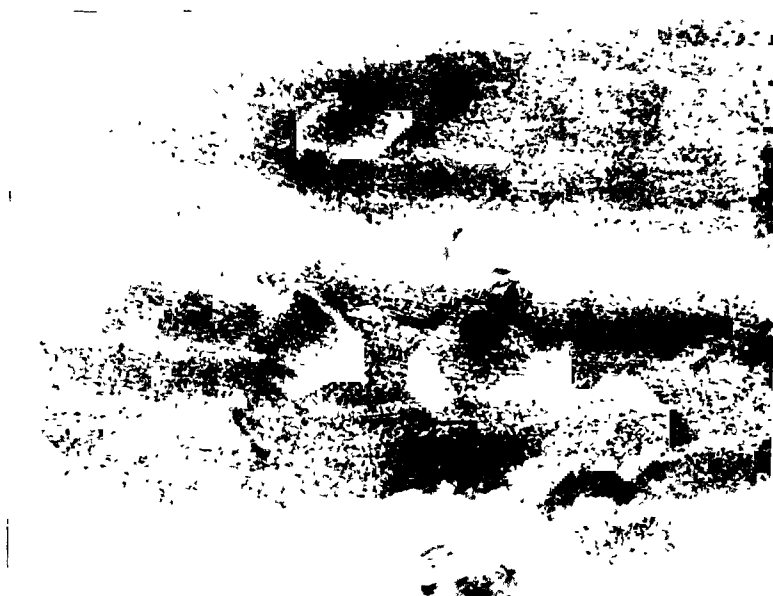


Figure 24

Plaques motrices vues de face à la surface des fibres musculaires de la langue coupée transversalement. Substrat: β -naphtylacétate. Grosse. X207.

La figure 25 représente quelques plaques vues à un grossissement de X413. Les plaques, à un tel grossissement, sont loin d'être clairement délimitées et il est impossible de discerner la structure réticulaire qui les caractérise à la suite d'une coloration au vert Janus ou à l'acétylthiocholine.

De plus, la réaction au β -naphtylacétate n'est pas limitée à la région de la plaque motrice. On peut en effet noter une réaction diffuse sur toutes les fibres, quoique de moindre intensité. Il est à noter également

que le précipité apparaît sous forme de points diffus. Nous verrons plus loin que cette déposition du précipité n'a rien à voir avec l'activité acétylcholinestérasique et est due au contraire à l'activité de l'estérase non spécifique.

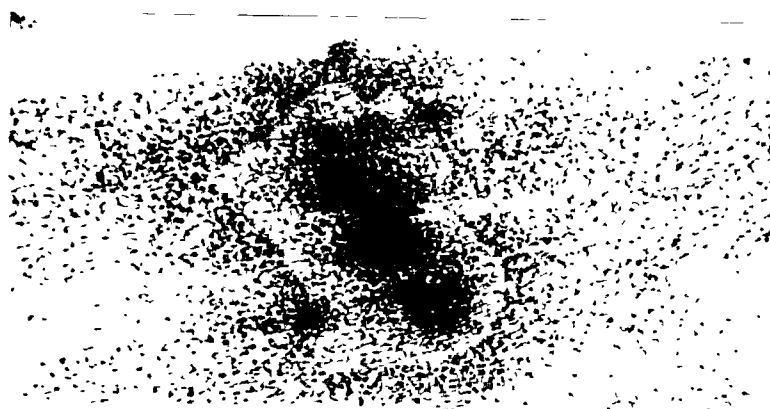


Figure 25

Vue de trois plaques motrices à la surface de la fibre musculaire de la langue coupée transversalement. Substrat: β -naphtylacétate. Gross. X415.

La figure 26 représente quelques plaques motrices à la surface de la fibre musculaire et provenant de l'activité cholinestérasique en présence de β -carbonaphtoxycholine.

Même pour un temps d'incubation de 20 minutes à 33°, la réaction est beaucoup moins intense en présence de β -carbonaphtoxycholine qu'en présence de β -naphtylacétate. De plus, la réaction est limitée à la région de la plaque motrice tandis qu'ailleurs à la surface de la fibre, l'activité

enzymatique est nulle. Nous pouvons admettre provisoirement qu'en présence



Figure 26

Vue de quelques plaques motrices à la surface de la fibre musculaire de la langue coupée transversalement. Substrat: β -carbonaphthoxycholine. Gross.X207.

de β -carbonaphthoxycholine, la réaction est due à l'activité non spécifique ainsi que Gavin et ses collaborateurs (139) l'ont démontré pour la cholinestérase du sérum. Nous verrons plus loin que par histophotométrie quelque éclaircissement peut être apporté à ce problème.

E.- MESURE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE AU NIVEAU DE LA PLAQUE MOTRICE PAR HISTOPHOTOMETRIE.

Avant de passer à l'étude quantitative de l'activité estérasique au niveau de la plaque motrice, il est bon de préciser davantage certains points de la méthode histophotométrique. Il est évident qu'il ne saurait être ques-

tion de mesurer l'activité cholinestérasique de toutes les plaques motrices visibles à la surface des fibres musculaires d'une coupe transversale de la langue.

1.- Valeur moyenne de l'activité estérasique de la plaque motrice chez des rats témoins.

La figure 27 représente l'aspect d'une partie de la langue avec ses nombreuses plaques motrices à un faible grossissement (X32). Sur cette partie représentant environ le quart de la surface totale de la langue, on peut compter un très grand nombre de plaques motrices bien individualisées. Mesurer



Figure 27

Vue de nombreuses plaques motrices réunies en groupes à la surface des fibres musculaires de la langue coupée transversalement. Substrat: β -naphtylacétate. Gross. X32.

l'activité au niveau de toutes les plaques aurait été un travail fastidieux

et d'ailleurs inutile. Nous avons constaté que l'activité enzymatique était constante, à un degré surprenant, pour toutes les plaques réunies en groupe.

Nous avons donc décidé de mesurer l'activité d'une seule plaque par groupe. A ceci, il n'y avait pas que la raison de simplifier le travail bien qu'il faille reconnaître, qu'en pratique, il aurait été excessivement long de déterminer l'activité de toutes les plaques. Bien plus, il n'est pas possible de déterminer avec précision l'activité de chacune des plaques. L'examen de la figure 27 nous en fera voir la raison. Certaines plaques apparaissent de profil, à la marge ou encore en terminaison de la fibre musculaire. Dans ces conditions, il est à peu près impossible d'appliquer exactement l'iris de la cellule photoélectrique sur la plaque. La moindre erreur de position entraînerait des erreurs considérables dans la mesure de la transmission de la lumière puisque le tissu conjonctif environnant est beaucoup plus transparent que la fibre musculaire. Nous avons donc décidé que, de façon générale, nous ne mesurerions l'activité enzymatique qu'au niveau d'une plaque bien centrée sur la fibre musculaire, et présentant autour d'elle un lieu propice à la détermination du blanc I_0 qui intervient dans la fonction:

$$T = I/I_0$$

La détermination du blanc mérite une attention toute particulière et la justesse des résultats dépend de beaucoup de cette mesure. Lison (106) a attiré l'attention sur le fait que le blanc devait être tel que la perte d'intensité lumineuse due à des causes non spécifiques comme par exemple, perte par diffraction, réflexion interne ou réflexion de surface y soit exactement la même que dans l'objet à mesurer. A vrai dire, il n'existe pas de règle

générale qui permette de diriger la recherche du blanc. Dans certains cas, on établit ce dernier sur des préparations témoins de même épaisseur en opérant dans des conditions identiques à celles où s'effectue la réaction, mais en omettant un réactif qui permet à la coloration de se développer. Par exemple, dans la réaction de Feulgen, on omettrait soit l'hydrolyse, soit le traitement par le réactif de Schiff. Il va sans dire que pour établir un blanc de cette façon, il faut opérer sur des coupes d'une épaisseur très constante et d'une structure strictement comparable.

Dans le cas qui nous occupe présentement, nous avons recherché le blanc sur un point de structure et de densité à peu près comparable à celui où s'établit la réaction colorée. Le blanc idéal nous a donc semblé la fibre musculaire non autrement colorée que par la réaction estérasiqne diffuse à sa surface. Dans ces conditions, nous pouvions croire que nous avions un blanc s'approchant des conditions idéales pour une plaque donnée. En effet, si l'on recherche la valeur I_0 en quelques endroits, autour d'une plaque, on peut constater que cette valeur ne varie que très peu d'un endroit à l'autre. Enfin, il faut ajouter qu'avant toute mesure d'activité d'une plaque motrice nous avons réajusté la valeur du blanc au zéro de l'appareil. Pour une même préparation, en règle générale ces réajustements sont minimes. D'une préparation à l'autre, les variations sont plus grandes, et enfin, d'une expérience à l'autre, ces variations s'accroissent encore. Mais en dernière analyse, on peut croire que la détermination du blanc, si elle est faite avec soin, n'introduit qu'une erreur négligeable à la condition que cette valeur soit déterminée en un endroit voisin de la plaque motrice à l'étude.

La plus grande partie des résultats que nous exposerons plus loin ont été analysés par méthode statistique. A titre d'exemple, dans le tableau

XIV sont comparées les différentes moyennes que nous pouvons obtenir en additionnant les résultats de l'activité estérasique des plaques motrices chez des rats normaux, moyennes obtenues soit pour une préparation donnée, comprenant toujours 10 déterminations, pour cinq préparations provenant d'un seul animal ou vingt-cinq préparations provenant de cinq animaux différents.

TABLeAU XIV

Evaluation statistique de la valeur moyenne de l'activité estérasique au niveau de la plaque motrice.

Provenance de la valeur moyenne	Nombre de déterminations	Valeur moyenne densité optique X100	Erreur standard de la moyenne
une seule prépara- tion microscopique	10	21.3	± 2.6
5 préparations pro- venant d'un rat	50	20.6	± 2.1
25 préparations pro- venant de 5 rats	250	22.8	± 1.9
moyenne de toutes les déterminations	310	22.1	± 1.9

Nous pouvons constater que la valeur moyenne de l'activité acétylcholinestérasique varie très peu d'une préparation microscopique à l'autre et que l'erreur standard de la valeur moyenne est minime et d'une valeur à peu près constante. De plus, entre les valeurs moyennes de chacune des préparations prises deux à deux, ou entre les valeurs moyennes de l'activité estérasique chez deux animaux différents, nous n'avons jamais constaté de différences significatives à l'analyse statistique.

Donc, de façon générale, dans la suite de ce travail, la valeur moyenne de l'activité estérasique d'une préparation microscopique donnée proviendra de dix déterminations faites au niveau de plaques bien centrées sur la fibre musculaire.

Toutes ces caractéristiques nous inclinent à croire que la méthode histophotométrique peut servir à déterminer avec précision l'activité enzymatique in situ au niveau de la plaque motrice du muscle strié. L'étude des paramètres de cette activité enzymatique, comme le temps d'incubation, la température ou la concentration du substrat viendra d'ailleurs corroborer les résultats que nous exposons plus haut.

2.- Etude de l'inhibition in vitro de l'activité estérasique par l'ésérine.

En second lieu, l'effet de l'ésérine sur l'activité estérasique au niveau des différentes structures de la langue a été étudiée. Le but de cette expérience était de distinguer entre l'activité enzymatique de l'épithélium et celle de la plaque motrice et aussi d'établir la sensibilité des enzymes en ces deux régions à des concentrations croissantes d'ésérine. En effet, la cholinestérase est très sensible à l'action de l'ésérine qui, à une concentration de $10^{-7}M$ peut abolir la majeure partie de son activité enzymatique (61). Par ailleurs, les estérases, comme nous l'avons déjà vu précédemment, sont beaucoup moins sensibles à cette action inhibitrice. Les préparations microscopiques ont été incubées en présence de sulfate d'ésérine à des concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , $10^{-4}M$, durant trente minutes, puis incubées à nouveau en présence de β -naphtylacétate et



Figure 28

Effet de l'ésérine ($10^{-7}M$) sur l'activité cholinestérasique de la plaque motrice et sur l'activité estérasique de l'épithélium de la langue du rat. Substrat: β -naphtylacétate. Gross. X32.

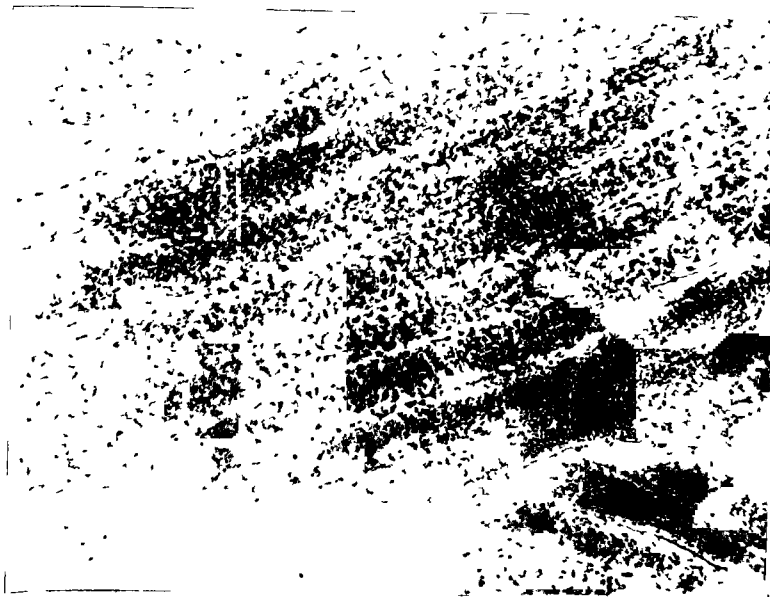


Figure 29

Vue de quelques plaques motrices à la surface des fibres musculaires de la langue à la suite d'une inhibition due à l'ésérine ($10^{-7}M$). Substrat: β -naphtylacétate. Gross. X250.

de β -carbonaphtoxycholine durant respectivement quinze minutes à la température du laboratoire et trente minutes à 33°.

A l'examen de la figure 28, on peut constater que l'ésérine à une concentration de $10^{-7}M$ inhibe à peine l'activité estérasique au niveau de l'épithélium, tandis que la réaction au niveau de la plaque motrice demeure à peine visible. La figure 29 illustre encore mieux ce phénomène d'inhibition au niveau de la plaque motrice.

Il est à noter de plus que la réaction diffuse ne disparaît pas à la surface de la fibre musculaire. Les réactions estérasiques au niveau de l'épithélium et à la surface de la fibre ne sont inhibées qu'à une concentration d'ésérine égale à $10^{-4}M$, ce qui indique que l'activité à ces niveaux est due à une estérase non spécifique.

En présence de β -carbonaphtoxycholine, l'ésérine inhibe tout aussi bien la réaction estérasique au niveau de la plaque motrice, seul site actif sur la préparation, l'épithélium et la fibre musculaire étant toujours négatifs à ce point de vue.

Enfin, l'activité estérasique au niveau de la plaque motrice a été mesurée par histophotométrie. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XV. On peut constater que l'ésérine à une concentration de $10^{-7}M$ inhibe très fortement l'hydrolyse du β -naphtylacétate et de la β -carbonaphtoxycholine. Dans ce dernier cas, la réaction était trop faible pour être appréciée à l'histophotomètre. Dans les deux cas, la réaction était totalement inhibée à une concentration de $10^{-6}M$.

Cette expérience prouve très clairement que le même substrat, le β -naphtylacétate, n'est pas hydrolysé par le même enzyme sur une même

préparation microscopique. au niveau de la plaque motrice, il est hydrolysé par une cholinestérase, au niveau de la fibre musculaire et au niveau de l'épithélium par une estérase.

TABLÉAU XV

Influence de l'ésérine in vitro sur l'activité estérasique de la plaque motrice de la fibre musculaire de la langue.

Substrats	Activité enzymatique (densité optique X100)		
	Témoins	Esérine	
		$10^{-7}M$	$10^{-6}M$
β -naphtyl acétate	22.8	8.1	0
β -carbonaphtho- xycholine	12.2	très faible réaction	0

De plus, le fait que l'ésérine inhibe l'hydrolyse de la β -carbonaphthoxycholine à une faible concentration ($10^{-7}M$) prouve que ce substrat est hydrolysé par une cholinestérase. Comme par ailleurs, il a été prouvé que la cholinestérase non spécifique hydrolyse ce substrat à l'exclusion de l'acétylcholinestérase, on peut conclure que ce dernier enzyme est présent au niveau de la plaque motrice.

3.- Etude du taux de la réaction cholinestérasique au niveau de la plaque motrice en fonction du temps.

Dans le but de vérifier la précision de notre méthode histophotométrique, nous avons étudié le taux de la réaction acétylcholinestérasique en fonction du temps à des intervalles de 5, 10, 15, 20 et 25 minutes en présence de β -naphtylacétate.

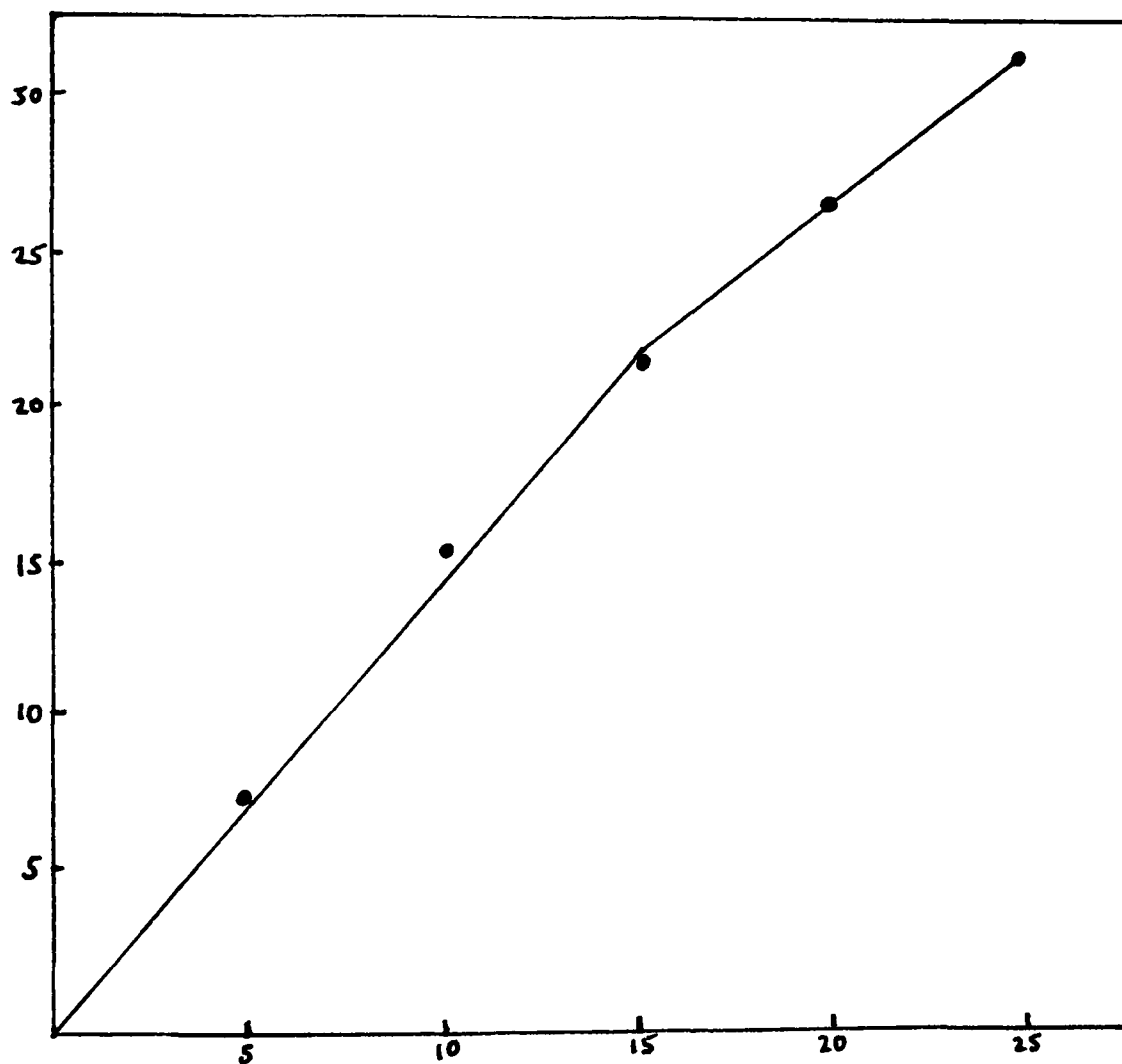


Figure 30

Taux de la réaction cholinestérasique au niveau de la plaque
metrice en fonction du temps. En abscisse: temps en minutes.
En ordonnée: activité enzymatique (densité optique X100).

Nous pouvons constater, d'après la figure 20, que l'activité enzymatique en fonction du temps est représentée par une fonction linéaire dans sa phase initiale, mais qu'après environ quinze minutes, le taux de la réaction tend à diminuer légèrement. Nous avons donc décidé d'arrêter

le temps de la réaction à quinze minutes, à la température du laboratoire, pour toutes les expériences subséquentes.

4.- Étude du taux de la réaction cholinestérasique au niveau de la plaque motrice en fonction de la température.

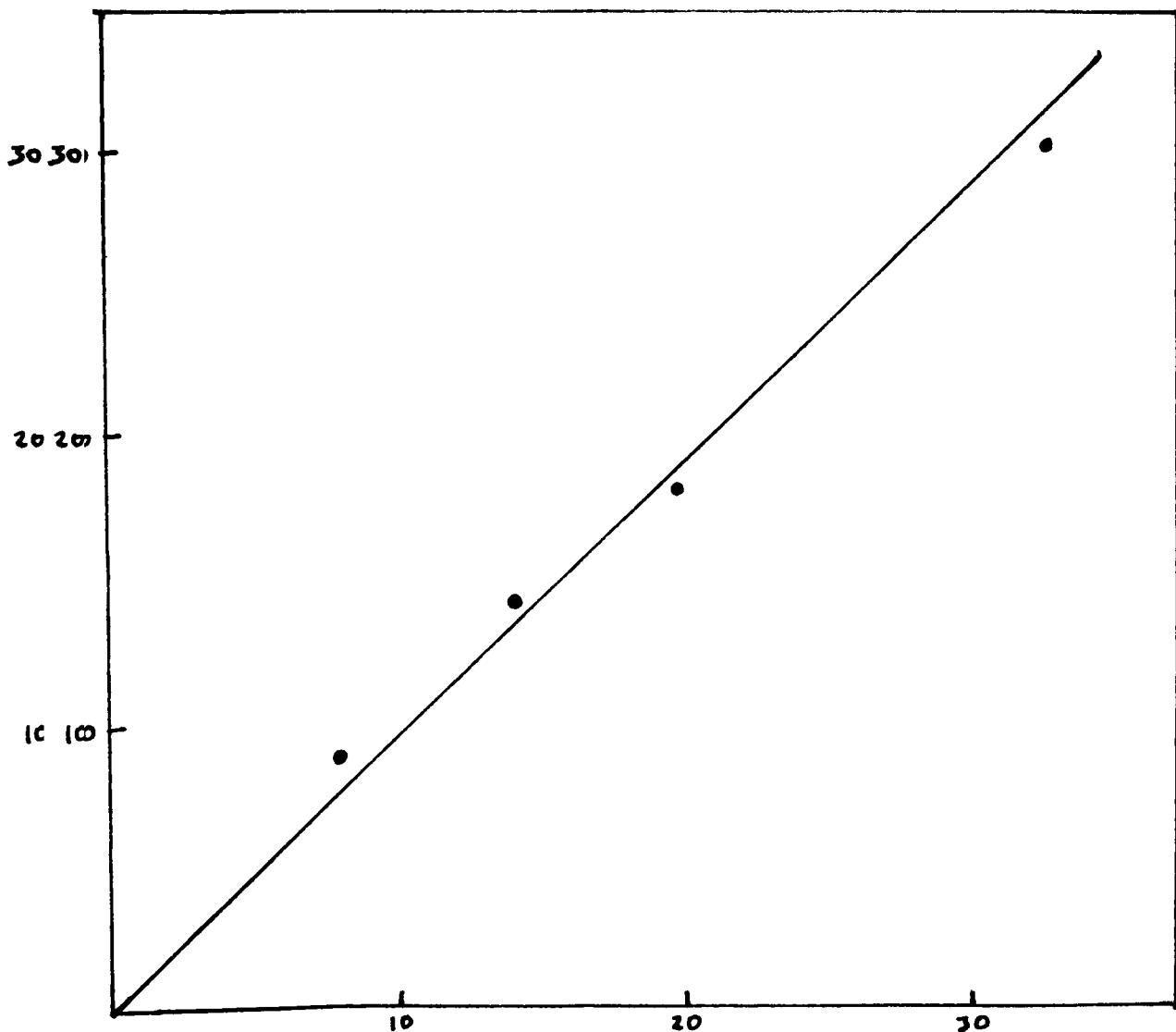


Figure 31

Effet de la température sur l'activité cholinestérasique de la plaque motrice. En abscisse: température. En ordonnée: activité enzymatique (Densité optique X100).

Le second paramètre étudié a été l'effet de la température sur le taux de la réaction. Nous avons déterminé l'activité enzymatique à 2°, 8°, 14°, 20° et 33°. Comme on pouvait prévoir une forte activité enzymatique à 33°, nous avons arrêté le temps de la réaction à dix minutes afin de demeurer dans la partie linéaire de la courbe d'activité enzymatique, et aussi, afin d'éviter une diffusion possible du pigment. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 31. Encore une fois, nous avons pu constater que l'activité enzymatique en fonction de la température est représentée par une fonction linéaire entre 8° et 33°. A 2°, nous n'avons pu déceler de réaction, tant au niveau de la plaque motrice qu'au niveau de l'épithélium.

5.- Etude du taux de la réaction cholinestérasique en fonction de la concentration du substrat.

Le troisième paramètre que nous avons étudié a été l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique. L'échelle de concentration étudiée variait entre 0.6, 1.2, 2.5, 3.75 et 5×10^{-4} M. A cette dernière concentration nous touchons la limite de solubilité du β -naphtylacétate à ce pH et à la température du laboratoire. Les résultats que nous avons obtenus sont représentés par la figure 32.

A la plus faible concentration, c'est-à-dire 0.6×10^{-4} M, il était possible de déceler une réaction au niveau de la plaque, mais trop faible pour être appréciée quantitativement. Aux autres concentrations, le taux d'activité augmente d'abord assez rapidement puis plus lentement jusqu'à la concentration de 5×10^{-4} M, limite de solubilité du β -naphtylacétate dans les conditions présentement décrites.

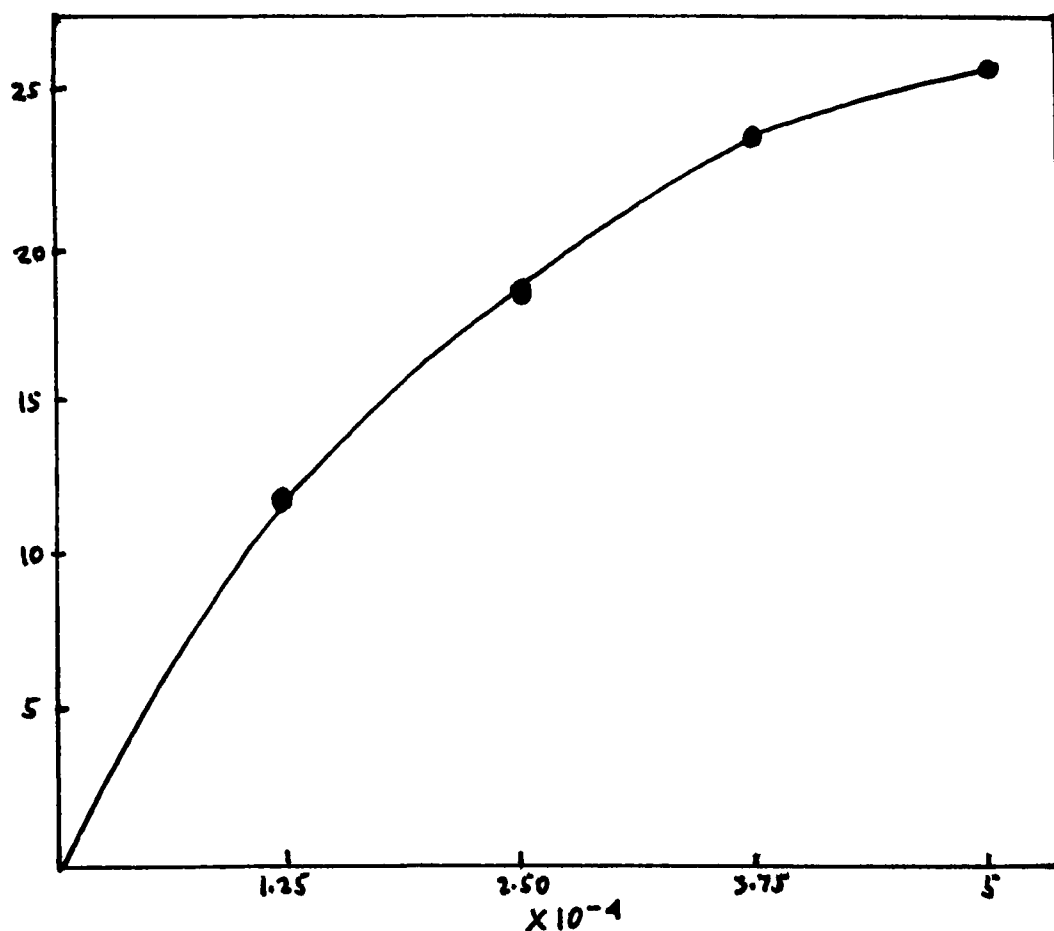


Figure 32

Effet de la concentration du substrat sur l'activité cholinestérasiqne de la plaque motrice. En abscisse: concentration du substrat. En ordonnée: activité enzymatique (densité optique 1100).

6.- Etude de l'inhibition in vitro de l'hydrolyse du β -naphtylacétate et de la β -carbonaphtoxycholine en présence d'acétylcholine.

Il a été démontré que l'acétylcholinestérase pouvait hydrolyser le β -naphtylacétate et la cholinestérase, la β -carbonaphtoxycholine. Cependant, l'affinité de ces enzymes pour chacun de leur substrat est moindre que

pour l'acétylcholine. (139). Nous avons donc étudié le taux d'hydrolyse de ces substrats quand l'acétylcholine, à des concentrations croissantes, est ajoutée à la solution d'incubation.

Il a déjà été prouvé que l'affinité de l'acétylcholinestérase pour l'acétylcholine est plus grande quand le substrat est à faible concentration. (5). Par ailleurs, la cholinestérase manifeste une plus grande affinité pour l'acétylcholine avec une augmentation de la concentration du substrat. (5). Si l'acétylcholinestérase est l'enzyme responsable pour l'hydrolyse de la β -carbonaphtoxycholine, la présence de l'acétylcholine en concentrations croissantes dans les solutions d'incubation devrait se manifester plus rapidement en inhibant l'hydrolyse du β -naphtylacétate qu'en inhibant l'hydrolyse de la β -carbonaphtoxycholine. En effet, le mécanisme d'inhibition ne peut s'expliquer que par une plus grande affinité des enzymes pour l'acétylcholine que pour leur substrat respectif.

La figure 33 représente les courbes d'inhibition de l'hydrolyse du β -naphtylacétate (courbe 1) et de la β -carbonaphtoxycholine (courbe 2). Nous pouvons constater que, dans les deux cas, la réaction est inhibée progressivement avec des concentrations d'acétylcholine passant de $10^{-5}M$ à $10^{-2}M$, tandis qu'à $10^{-1}M$, elle est totalement inactivée. Cependant, il est clair que l'inhibition de l'hydrolyse du β -naphtylacétate apparaît plus rapidement que celle de la β -carbonaphtoxycholine en présence de concentrations croissantes d'acétylcholine. Il nous semble qu'à la suite de cette expérience on puisse affirmer que la cholinestérase non spécifique est présente au niveau de la plaque motrice et peut jouer un rôle physiologique. De plus, on peut également affirmer que l'acétylcholinestérase est l'enzyme principalement responsable de l'hydrolyse du β -naphtylacétate puisque d'une part, son

taux d'activité est déjà réduit en présence d'acétylcholine à une concentration de 10^{-4} M, tandis que d'autre part à la même concentration, la cholinestérase non spécifique n'est pas inhibée.

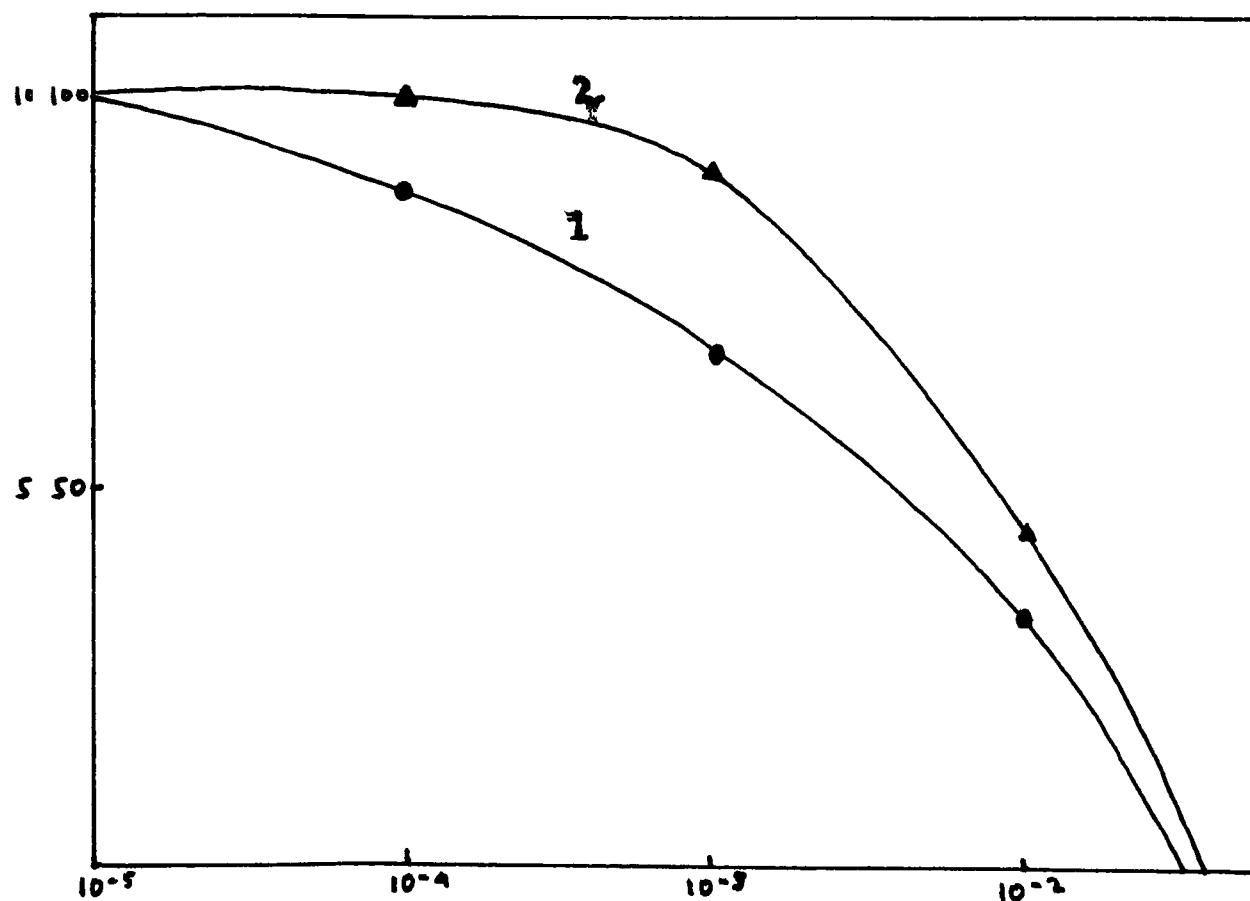


Figure 33

Effet de l'acétylcholine sur l'hydrolyse du β -naphtylacétate (courbe 1) et de la β -carbonaphtoxycholine (courbe 2). En abscisse: concentration molaire d'acétylcholine dans la solution d'incubation. En ordonnée: activité enzymatique. (Densité optique $\times 100$).

Enfin, l'acétylcholine à une concentration de 10^{-4} M n'inhibe en rien l'activité estérasique au niveau de l'épithélium tandis que toute activité est abolie au niveau de la plaque. C'est une preuve de plus que l'enzyme de

l'épithélium est fort différent de l'enzyme des plaques bien que tous deux hydrolysent le même substrat, le β -naphtylacétate.

7.- Etude de l'inhibition in vivo de l'activité cholinestérasique par l'ésérine.

On sait que l'ésérine exerce son action toxique en inhibant l'activité de la cholinestérase au niveau des récepteurs cholinergiques. Afin de vérifier la validité de la mesure histophotométrique de l'activité cholinestérasique, l'ésérine a été injectée par voie intramusculaire et l'activité enzymatique déterminée au niveau de la plaque motrice des fibres musculaires de la langue. Les rats furent divisés en quatre groupes de quatre individus dont trois reçurent respectivement 1 mg, 0.75 mg et 0.5 mg d'ésérine par kilogramme de poids. Tous furent sacrifiés trois heures après les injections. Les animaux du dernier groupe (1.0 mg/kg) étaient sur le point de mourir à la fin de l'expérience tandis que ceux du premier groupe (0.5 mg/kg) déve-

TABLÉAU XVI

Influence de l'ésérine injectée par voie intramusculaire sur l'activité cholinestérasique de la plaque motrice de la fibre musculaire de la langue.
Substrat: β -naphtylacétate.

Groupes	Activité enzymatique (densité optique X100)
Témoins	20.6
Esérine 0.5 mg/kg	16.6
Esérine 0.75 mg/kg	13.8
Esérine 1.0 mg/kg	9.6

loppaient de légères convulsions.

L'activité cholinestérasique de la plaque motrice de la fibre musculaire chez les animaux des différents groupes est exprimée dans le tableau XVI.

Nous pouvons constater que l'ésérine inactive l'acétylcholinestérase au niveau de la plaque motrice. De plus, le degré d'inhibition que nous avons obtenu en présence d'ésérine à raison de 1 mg par kilogramme rend compte parfaitement des phénomènes toxiques que nous avons observés chez les animaux. Il est en effet connu qu'au delà de 50 pour 100 d'inhibition au niveau du système nerveux périphérique, l'issue peut devenir fatale.

F.- CONCLUSION DU PRÉSENT CHAPITRE.

Au cours du présent chapitre, nous avons vu qu'il est possible d'étudier quantitativement l'activité cholinestérasique au niveau de la plaque motrice de la fibre musculaire de la langue. Les critères ordinairement acceptés en enzymologie se trouvent vérifiés à l'aide de la méthode histophotométrique. Ainsi, par exemple, le taux de la réaction en fonction du temps et de la température suit une proportion linéaire dans des limites suffisamment larges. Nous avons pu constater également que l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration du substrat. La réaction d'hydrolyse du β -naphthylacétate et de la β -carbonaphtoxycholine est inhibée en présence d'acétylcholine et d'ésérine. Dans le cas de l'inhibition à l'ésérine, il en ressort clairement que l'activité enzymatique au niveau de la plaque est due à l'acétylcholinestérase et à la cholinestérase, tandis que les estérases non spécifiques ne jouent aucun rôle. Par ailleurs, ce dernier enzyme localisé au niveau de l'épithélium de la langue joue un rôle prépondérant dans l'hydrolyse du β -naphthylacétate, et n'est pas sensible à l'action de l'ésérine à faible concentration.

Au cours de l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique à l'aide de l'acétylcholine, il a pu être démontré que l'acétylcholinestérase localisée au niveau de la plaque motrice est l'enzyme principalement intéressé lors de l'hydrolyse du β -naphtylacétate. Cependant, l'hydrolyse de la β -carbonaphtoxycholine à peine inhibée par l'acétylcholine à faible concentration apporte une preuve de plus que ce dernier substrat est attaqué par la cholinestérase non spécifique à ce niveau.

L'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau de la plaque motrice à la suite d'injection d'ésérine par voie intra-musculaire démontrée par cette méthode histophotométrique, prouve qu'il est possible de suivre l'évolution d'un phénomène pharmacologique à ce niveau. En effet, le degré d'inhibition, tel que nous avons pu le mesurer, allait de pair avec la symptomatologie bien connue d'une hyperactivité des récepteurs cholinergiques.

CHAPITRE HUITIEME

EFFET DE L'ALDRINE SUR L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE AU NIVEAU DE LA PLAQUE MOTRICE DE LA FIBRE MUSCULAIRE DE LA LANGUE.

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu démontrer que l'aldrine n'exerçait aucun effet sur l'activité acétylcholinestérasique des globules rouges ou sur l'activité cholinestérasique du sérum. Par ailleurs, l'analyse pharmacologique des effets de l'aldrine semble indiquer que ce composé exerce une action neurotoxique.

A l'aide de la méthode d'histophotométrie quantitative décrite plus haut, nous avons entrepris d'étudier l'effet de l'aldrine sur l'activité acétylcholinestérasique de la plaque motrice. Il nous a semblé intéressant de vérifier ce point principalement à cause des convulsions qui suivent l'administration du toxique indiquant peut-être une action périphérique.

Les animaux reçurent l'aldrine dissoute dans l'huile de maïs par voie intrapéritonéale à raison de 30 mg, 45 mg, 60 mg et 120 mg par kilogramme. Après quarante-huit heures, les animaux ayant reçu 120 mg par kilogramme moururent. Les rats des autres groupes furent sacrifiés à la fin de la troisième journée. Ceux qui avaient reçu 60 mg par kilogramme de poids d'aldrine survécurent, mais au moment où ils furent sacrifiés, ils avaient développé les très graves symptômes qui font suite à l'administration d'un poison neurotoxique administré à une dose massive. L'activité cholinestérasique a été déterminée en présence de β -naphtylacétate selon notre technique usuelle.

TABLEAU XVII

Effet de l'aldrine injectée par voie intramusculaire sur l'activité acétylcholinestérasique de la plaque motrice de la fibre musculaire de la langue.
Substrat: β -naphtylacétate.

Groupes	Activité enzymatique (densité optique X100)
témoins	25.3
aldrine 60 mg/kg	23.8
aldrine 45 mg/kg	25.1
aldrine 30 mg/kg	22.4

A l'examen de ce tableau, on peut conclure que l'aldrine n'exerce aucune activité inhibitrice sur l'activité acétylcholinestérasique de la plaque motrice. Les propriétés neurotoxiques de ce poison ne peuvent s'expliquer sur cette base.

CHAPITRE NEUVIEME

ETUDE DE L'ANTAGONISME D'ACTION ENTRE LES HYDROCARBURES CHLORES ET LES PHOSPHATES ORGANIQUES AU NIVEAU DE LA PLAQUE MOTRICE

Nous avons vu au cours du chapitre quatrième que les hydrocarbures chlorés diminuent de beaucoup la toxicité des phosphates organiques pour l'organisme animal pourvu que les premiers soient administrés trois ou quatre jours avant les seconds. Nous avons vu également que l'activité estérasique du sérum ne pouvait expliquer l'action protectrice des hydrocarbures chlorés. En effet, au cours de dosages effectués chez des animaux protégés et non protégés, nous avons pu constater que l'activité estérasique du sérum suivait, dans chacun des cas, des courbes à peu près parallèles. L'action protectrice ne peut vraisemblablement être due à la faible augmentation d'activité estérasique du sérum chez les animaux protégés à l'aldrine. D'ailleurs, le lindane, qui cause une très faible augmentation de l'activité estérasique, offre un certain degré de protection bien qu'il n'augmente pas autant l'activité estérasique que l'aldrine ou le chlordan.

La protection ne saurait également être due à une augmentation de la protéine-enzyme ou une autre protéine du sérum, pouvant réagir avec le phosphate organique protégeant ainsi les centres cholinergiques. En effet, à l'analyse électrophorétique du sérum, aucune variation des différentes fractions qui le compose n'a pu être démontrée. Restait donc l'hypothèse suivante que le phosphate organique était détruit ou inactivé avant d'atteindre les plaques motrices du muscle, les phosphates organiques causant la mort par une inhibition périphérique de l'acétylcholinestérase.

Nous avons donc décidé d'étudier l'activité acétylcholinestérasique au niveau des plaques motrices de la langue à la suite d'injection intra-péritonéale de tétraéthylpyrophosphate (TEPP) chez des animaux normaux et chez des animaux ayant reçu une dose prophylactique d'aldrine à raison de 30 mg par kilogramme de poids également par voie intra-péritonéale. Trois jours plus tard, nous avons donc administré le TEPP⁽¹⁾ également par voie intra-péritonéale à raison de 1.0 mg et 4.0 mg par kilogramme de poids. Les quatre groupes d'animaux comprenaient six individus chacun.

TABLERAU XVIII

Effet protecteur de l'aldrine vis-à-vis de l'action anticholinestérasique du TEPP au niveau de la plaque motrice. Substrat: β -naphtylacétate.

TEPP injecté mg/kg	Activité enzymatique (pourcentage des témoins)	
	Rats non protégés	Rats protégés à l'aldrine
1.0	58	97
4.0	0	71

A la plus forte dose de TEPP, tous les animaux du groupe n'ayant pas reçu d'aldrine sont morts dans les cinq minutes. Cinq des six animaux protégés survivaient encore à l'injection du phosphate organique après trois heures. A ce point, tous les animaux furent sacrifiés. A la plus faible dose, les animaux non protégés survécurent durant trois heures, mais développèrent des convulsions, tandis que les animaux protégés ne manifestèrent

(1) La solution de TEPP injectée n'a pas été purifiée au préalable et contenait fort probablement d'autres phosphates organiques.

aucun symptôme névrotique. L'activité acétylcholinestérasique fut déterminée au niveau de la plaque motrice en présence de β -naphtylacétate tant chez les animaux sacrifiés que chez les animaux morts à la suite des injections. (Rats non protégés ayant reçu 4 mg de TEPP par kilogramme de poids).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XVIII. A l'examen de ce tableau, il semble évident que la protection que procurent les hydrocarbures chlorés s'exerce au niveau des plaques motrices. Après injection d'une dose massive et mortelle de TEPP chez les animaux non protégés, l'activité cholinestérasique est égale à zéro. Chez les animaux protégés, l'activité cholinestérasique s'exprime à raison de 71 pourcent des témoins et est largement compatible avec l'activité cholinestérasique minimum pour l'entretien de la vie. A la suite d'une injection non létale, l'activité cholinestérasique chez les animaux non protégés diminue de beaucoup, tandis que chez les animaux protégés, la même activité est normale.

Il est donc logique de conclure que la protection apportée par les hydrocarbures chlorés s'exerce au niveau des plaques motrices. C'est bien connu que les phosphates organiques exercent leur action toxique en inhibant l'acétylcholinestérasique musculaire. Il faut admettre que d'une façon ou d'une autre, le toxique ne parvient plus sous forme active au niveau des récepteurs cholinergiques, là où il exerce son action nocive.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les recherches des dernières années ont établi très clairement que l'acétylcholinestérase se distingue des autres enzymes par sa très grande vitesse de renouvellement. Sur cette base peut s'expliquer le rôle que l'enzyme joue dans la transmission de l'influx nerveux en détruisant extemporanément le médiateur chimique, l'acétylcholine. Les inhibiteurs de l'enzyme, comme les phosphates organiques ou l'ésérine, causent une hyperactivité des centres cholinergiques, entraînant fatalement la mort de l'animal.

Par ailleurs, le mécanisme de l'action toxique des hydrocarbures chlorés aromatiques demeure un sujet fort controversé. Certains symptômes névrotiques font certainement suite à l'administration de ces poisons. Mais leur action sur l'acétylcholinestérase n'a pu encore être démontrée.

" "
" "

Dans la partie biochimique de ce travail, nous avons pu démontrer que l'aldrine et plusieurs autres hydrocarbures chlorés provoquaient une augmentation du taux de l'activité de l'estérase sérique non spécifique. Ce phénomène peut être mis en évidence à la suite d'une administration unique du toxique ou à la suite d'une administration continue. Dans ce dernier cas, il semble bien que l'animal s'adapte au toxique: la courbe d'augmentation de l'activité sérique atteint un palier. Si l'on injecte des doses successives d'aldrine, dans l'heure qui précède la mort, la courbe d'activité augmente en flèche. Il n'y a cependant aucune relation directe entre les deux phénomènes. De plus, l'aldrine exerce une action marquée sur le taux de régénération de l'estérase sérique à la suite d'un abaissement de ce dernier par

la thyroxine et inversement la thyroxine sensibilise l'animal à l'action de l'aldrine.

Cependant, malgré la relation certaine qui existe entre les teneurs sériques en estérases et en globulines alpha, les deux étant sous le contrôle de la thyroïde, la teneur en globulines alpha ne varie pas à la suite d'une injection d'aldrine.

Par ailleurs, l'aldrine n'exerce pas d'effet inhibiteur sur l'acétylcholinestérase des globules rouges. Bien que la fonction de l'enzyme à ce niveau ne soit pas clairement établie, cette constatation permet d'écarter provisoirement la possibilité d'une action anticholinestérasique de l'aldrine.

~ ~

Par ailleurs, fait assez surprenant, l'aldrine protège l'organisme animal contre des doses mortelles de parathion et de tétraéthylpyrophosphate, deux composés jouissant de propriétés anticholinestérasiques. Le lindane et le chlordane, deux autres hydrocarbures chlorés, partagent cette propriété. Bien qu'il ne semble y avoir aucune relation directe entre le taux d'élévation de l'estérase sérique que provoquent les hydrocarbures chlorés et la protection qu'ils apportent à l'égard des deux phosphates organiques, il y a un parallélisme dans le temps: les deux phénomènes se superposent entre la troisième ou la quatrième journée qui fait suite à l'administration de l'hydrocarbure chloré.

Le phénomène de protection ne saurait s'expliquer par une réaction préférentielle entre le phosphate organique et l'estérase non spécifique du sérum, le taux d'augmentation de ce dernier enzyme étant très faible. De la même façon, même si le phosphate organique peut réagir avec d'autres protéines non spécifiques du sérum, le mécanisme de protection ne saurait s'établir

sur cette base puisque la teneur du sérum en ses différentes fractions protéiniques ne varie pas à la suite d'une administration d'aldrine.

Restait donc la possibilité de poursuivre une étude au niveau des centres cholinergiques eux-mêmes, notamment au niveau de la plaque motrice du muscle strié. Il a été établi, en effet, que les phosphates organiques exercent leur action toxique en inhibant l'activité acétylcholinestérasique au niveau des récepteurs périphériques. Pour poursuivre cette étude au niveau d'une structure aussi fine que la plaque motrice, il nous a semblé tout indiqué de s'adresser aux méthodes relativement nouvelles de l'enzymologie microscopique.

.. ..

A la suite des recherches des dernières années sur le mécanisme des actions estérasiques, il est maintenant connu que l'acétylcholinestérase réagit avec l'acétylcholine, avec formation d'un enzyme acylé au cours des réactions intermédiaires. Sur cette base, il avait été démontré que l'acétylcholinestérase peut catalyser l'hydrolyse de l'acide thiolacétique, avec libération d'acide acétique et d'hydrogène sulfuré.

A l'aide de cette réaction, il nous a été possible de mettre au point une nouvelle méthode histochimique de détection des activités estérasiques au sein des structures tissulaires. Il ne restait qu'à ajouter un sel de plomb à la solution d'incubation afin de précipiter in situ l'hydrogène sulfuré sous forme de sulfure de plomb.

A l'aide de cette nouvelle méthode, nous avons pu démontrer une réaction au niveau des structures suivantes, dans un ordre décroissant d'intensité: la plaque motrice, les cellules de certains noyaux moteurs du cerveau et du cervelet, les cellules de la corne antérieure de la moelle épinière

les cellules de Purkinje du cervelet et les cellules pyramidales du cortex cérébral, chez le rat. Chez la grenouille, l'arborisation nerveuse terminale à la surface du muscle strié a également donné une réaction positive.

Par la méthode à l'acide thiolacétique, il a été possible de mettre en évidence certains détails histologiques fins: par exemple, la structure réticulaire de la plaque motrice et la localisation cytoplasmique de l'enzyme au niveau du neurone, avec une réaction de moindre intensité dans la partie proximale de ses prolongements, et réaction nucléaire négative.

Par l'étude de l'inhibition de la réaction en présence de prostigmine et de tétraéthylpyrophosphate, il a été possible de démontrer que l'hydrolyse de l'acide thiolacétique est catalysée à la fois par la cholinestérase et l'estérase non spécifique.

" "

Malheureusement, cette nouvelle méthode, tout comme celle à l'acétylthiocholine, ne peut être utilisée pour des déterminations histophotométriques quantitatives puisque le produit final est opaque et que l'opacimétrie conduit facilement à des résultats entachés d'erreurs. Comme le but de nos recherches histochimiques étaient d'étudier quantitativement l'activité cholinestéranique au niveau de la plaque motrice, nous nous sommes adressés à la méthode au β -naphthylacétate, et ce, pour deux raisons principales: la réaction conduit à la déposition au sein des tissus d'un précipité final dont le coefficient moléculaire d'absorption est compatible avec une mesure photométrique, et de plus, le pH de la réaction est très voisin du pH optimum de l'enzyme. A l'aide de cette méthode, il nous a été possible d'étudier quantitativement l'activité acétylcholinestéran-

sique au niveau de la plaque motrice et de corroborer la validité des résultats en variant certains paramètres de cette activité et en étudiant quantitativement l'effet inhibiteur de l'ésérine in vitro et in vivo.

.. ..

A l'aide de cette méthode quantitative, nous avons pu écarter définitivement l'hypothèse d'une action anticholinestérasique possible de l'aldrine au niveau de la plaque motrice.

.. ..

Finalement, toujours avec la même méthode, nous avons été capables de démontrer que l'effet protecteur des hydrocarbures chlorés vis-à-vis de l'action toxique des phosphates organiques s'exerce au niveau de la plaque motrice, l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase ne parvenant plus jusqu'au centre cholinergique, à tout le moins sous une forme active.

BIBLIOGRAPHIE

- 1.- Aldridge, W.N., *Biochem. J.*, 53:110, 1953.
- 2.- Aldridge, W.N., *Biochem. J.*, 54:442, 1953.
- 3.- Aldridge, W.N. et J.M. Narnes, *Nature*, 169:345, 1952.
- 3a. Augustinsson, K.B., dans *The Enzymes*, Vol. I, Part I, p. 443, Academic Press, New York, 1950.
- 4.- Augustinsson, K.B. et D. Nachmansohn, *J. Biol. Chem.*, 179:543, 1949.
- 5.- Augustinsson, K.B. et D. Nachmansohn, *Science*, 110:98, 1949.
- 6.- Ball, W.L., K. Kay et J. Sinclair, *A.M.A. Arch. Indust. Hyg.*, 7:292, 1953.
- 7.- Banister, J., V.P. Whittaker et S.J. Wijesundara, *J. Physiol.*, 115:55P, 1951.
- 8.- Barnett, R.J. et A.M. Seligman, *Science*, 114:576, 1951.
- 9.- Bergmann, F., I.B. Wilson et D. Nachmansohn, *Biochim. Biophys. Acta*, 6:217, 1950.
- 10.- Bodansky, O., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 47:521, 1946.
- 11.- Bouzarth, R.F. et H.E. Himwich, *Fed. Proc.*, 10:18, 1951.
- 12.- Brauer, R., *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 92:162, 1948.
- 13.- Brauer, R. et M.A. Root, *Fed. Proc.*, 5:168, 1946.
- 14.- Brauer, R. et M.A. Root, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 88:109, 1946.
- 15.- Bray, H.O., A.V. Thorpe et D.K. Vallance, *Biochem. J.*, 51:193, 1952.
- 16.- Brown, A.W., *Insect Control by Chemicals*, John Wiley & Sons, N.Y., 1951.
- 17.- Brown, J., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 85:59, 1953.
- 18.- Bullock, T.H., H. Grundfest, D. Nachmansohn et M.A. Rothenberg, *J. Neurophysiol.*, 10:63, 1947.
- 19.- Callaway, S., D.R. Davies et J.E. Risley, *Biochem. J.*, 50:xxx, 1952.
- 20.- Carey, E.J., E.M. Downer, F.B. Toomey et E. Haushalter, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 62:76, 1946.
- 21.- Chadwick, L. et D. Hill, *J. Neurophysiol.*, 10:235, 1947.
- 22.- Coarce, J.H., J. Todd et G.B. Koelle, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 87:281, 1946.
- 23.- Couteaux, R., *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 76:14, 1942.
- 24.- Couteaux, R., *Rev. can. biol.*, 6:563, 1947.
- 25.- Couteaux, R., *Arch. Inter. Physiol.*, 59:52, 1951.
- 26.- Couteaux, R., *C.R. Acad. Sc.*, 235:434, 1952.
- 27.- Couteaux, R. et D. Nachmansohn, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 43:177, 1940.
- 28.- Couteaux, R. et J. Taxi, *C.R. Ass. Anat.*, 70:1030, 1951.
- 29.- Couteaux, R. et J. Taxi, *Arch. Anat. Micros. Morph. Exper.*, 41:352, 1952.
- 30.- Crescitelli, F. et A. Gilman, *Am. J. Physiol.*, 147:127, 1946.
- 30a. Crook, E.M., H. Harris, F. Hassan et F.L. Warren, *Biochem. J.*, 56:424, 1954.
- 31.- Curtis, H.J. et K.S. Cole, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 19:135, 1942.
- 32.- Dale, H.H., W. Feldberg et M. Vogt, *J. Physiol.*, 86:352, 1936.
- 33.- Davison, A.N., *Biochem. J.*, 54:583, 1953.
- 34.- Dawson, E.R., *Biochem. J.*, 21:598, 1927.
- 35.- Deichmann, W.H. et W. Rakoczy, *A.M.A. Arch. Indust. Hyg.*, 7:152, 1953.
- 36.- Dempsey, E.G. Wislocki et M. Singer, *Anat. Rec.*, 96:221, 1946.
- 37.- Diggle, W.M. et J.C. Gage, *Nature*, 168:998, 1951.
- 38.- DiStefano, V., L. Burwitz, W.F. Neuman et H.C. Hodge, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 78:712, 1951.
- 39.- DuBois, K.B., *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 95:79, 1949.
- 40.- DuBois, K.P. et J.M. Coon, *A.M.A. Arch. Indust. Hyg.*, 6:281, 1952.

- 41.- DuBois, K.P., J. Doull et J.M. Coon, J. Pharmacol. Exper. Therap., 99:376, 1950.
- 42.- DuBois, K.P., J. Doull, A.J. Okinaka et J.M. Coon, J. Pharmacol. Exper. Therap., 107:464, 1953.
- 43.- DuBois, K.P., J. Doull, P.R. Salerno et J.M. Coon, J. Pharmacol. Exper. Therap., 95:79, 1949.
- 44.- Eccles, J.C., B. Katz et S.W. Kuffler, J. Neurophysiol., 4:362, 1941.
- 45.- Eccles, J.C. et W.V. MacFarlane, J. Neurophysiol., 12:59, 1949.
- 46.- Ellis, S., S. Manders et O. Bodansky, J. Pharmacol. Exper. Therap., 91:255, 1947.
- 47.- Erlanger, J. et E.A. Blair, Am. J. Physiol., 124:341, 1938.
- 48.- Frawley, J.P. et E.C. Hagan, Fed. Proc., 10:297, 1951.
- 49.- Frawley, J.P., E.C. Hagan et O.G. Fitzhugh, J. Pharmacol. Exper. Therap., 105:157, 1952.
- 50.- Gage, J.G., Biochem. J., 54:526, 1953.
- 51.- Glick, D., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 40:140, 1959.
- 52.- Goldstein, N.P. et J.H. Roe, J. Lab. Clin. Med., 28:1368, 1943.
- 53.- Gomori, G., Proc. Soc. Exper. Biol., 68:354, 1948.
- 54.- Gomori, G., J. Lab. Clin. Med., 34:275, 1949.
- 55.- Gomori, G., Proc. Soc. Exper. Biol., 72:697, 1949.
- 56.- Gomori, G., Inter. Rev. Cytology, 1:223, 1952.
- 57.- Grassman, W. et K. Hannig, Naturwissenschaften, 37:496, 1950.
- 58.- Gowdey, C.W., A.R. Graham, J.J. Seguin et G.W. Stavratsky, Can. J. Biochem. Physiol., 32:498, 1954.
- 59.- Gowdey, C.W., A.R. Graham, J.J. Seguin, G.W. Stavratsky et R.A. Waud, Can. J. Med. Sci., 50:520, 1952.
- 60.- Grundfest, H. et D. Nachmansohn, Fed. Proc., 9:1, 1950.
- 61.- Gunter, J.M., Nature, 157:369, 1946.
- 62.- Gytoku, K., Biochem. Z., 217:279, 1930.
- 63.- Hagan, E.C. et J.P. Frawley, Fed. Proc., 10:304, 1951.
- 64.- Hagan, E.C. et G. Woodard, Fed. Proc., 7:224, 1948.
- 65.- Hall, S. et M. Jackson, Ind. Eng. Chem., 40:694, 1948.
- 66.- Hard, W.L. et A.C. Peterson, Anat. Rec., 108:57, 1950.
- 67.- Hard, W.L., A.C. Peterson et M.D. Fox, J. Neuropath. Exper. Neurol., 10:48, 1951.
- 68.- Hawkins, R.D. et J.M. Gunter, Biochem. J., 40:192, 1946.
- 69.- Hawkins, R.D. et B. Mendel, J. Cell. Comp. Physiol., 27:69, 1946.
- 70.- Hawkins, R.D. et B. Mendel, Brit. J. Pharmacol., 2:173, 1947.
- 71.- Hawkins, R.D., B. Mendel et H. Nishikawara, Nature, 161:659, 1948.
- 72.- Hawkins, R.D. et H. Nishikawara, Endocrinology, 45:108, 1949.
- 73.- Hayes, W.J., P.F. Ferguson et J.S. Coss, Food and Drug Admin. Hearings on Residue Tolerances, Exhibit, 1211, 1950.
- 74.- Hazelton, L.W. et E.J. Holland, Adv. in Chem. Ser., 1:31, 1950.
- 75.- Heppel, L.A. et V.T. Porterfield, J. Biol. Chem., 176:763, 1948.
- 76.- Hestrin, S., Biochim. Biophys. Acta, 4:310, 1950.
- 77.- Hodgkin, A.L. et A.F. Huxley, J. Physiol., 104:176, 1945.
- 78.- Hodgkin, A.L. et B. Katz, J. Physiol., 108:37, 1949.
- 79.- Holt, S.J., Nature, 169:271, 1952.
- 80.- Holt, S.J. et R.S.J. Withers, Nature, 170:1012, 1952.
- 81.- Howell, D.E., Proc. Okla. Acad. Sci., 29:31, 1950.

- 82.- Jansen, E.F., R. Jang et L.R. MacDonnell, Arch. Biochem., 15:415, 1947.
- 83.- Jansen, E.F., M.D.F. Natting et A.K. Balls, J. Biol. Chem., 170:417, 1947.
- 84.- Jansen, E.F., M.D.F. Natting et A.K. Balls, J. Biol. Chem., 175:975, 1948.
- 85.- Jantzen, G., Deut. Med. Wochschr., 76:1601, 1951.
- 85a. Johnston, C.D. Arch. Biochem. Biophys., 51:375, 1951.
- 86.- Judah, J.D., Brit. J. Pharmacol., 4:180, 1949.
- 87.- Kato, G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 4:202, 1938.
- 88.- Kekwick, R.G.O., M.E. MacKay et N.H. Martin, Biochem. J., 53:36, 1953.
- 89.- Keller, H., Naturwissenschaften, 39:109, 1952.
- 90.- Keynes, R.D., Arch. Sci. Physiol., 3:165, 1949.
- 91.- Koelle, G.B., J. Pharmacol. Exper. Therap., 105:153, 1951.
- 92.- Koelle, G.B. et J.S. Friedenwald, Proc. Soc. Exper. Biol., 70:617, 1949.
- 93.- Koelle, G.B. et A. Gilman, J. Pharmacol. Exper., 87:421, 1946.
- 94.- Koelle, G.B., E.S. Koelle et J.S. Friedenwald, J. Pharmacol. Exper. Therap. 100:180, 1950.
- 95.- Kraut, H. et W. von Pantschenko-Jurewicz, Biochem. Z., 275:114, 1935.
- 96.- Kuffler, W., J. Neurophysiol., 6:99, 1943.
- 97.- Kuffler, W., J. Neurophysiol., 8:77, 1945.
- 98.- Kunkel, H.G. et A. Tiselius, J. Gen. Physiol., 35:89, 1951.
- 99.- Kunze, F.M., E.P. Laug et C.S. Prickett, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 75:420, 1950.
- 100.- Lange, W. et G. Kreuger, Ber., 65:1598, 1932.
- 101.- Levin, L. et J.H. Leatham, Am. J. Physiol., 126:306, 1942.
- 102.- Lewis, J.R. et W.B. McKeon, Jr., Fed. Proc., 12:342, 1953.
- 103.- Lipmann, F. et N.O. Kaplan, J. Biol. Chem., 162:745, 1946.
- 104.- Lipmann, F., N.O. Kaplan, G.D. Novelli, L.C. Tuttle et Guirard B.M., J. Biol. Chem., 167:869, 1947.
- 105.- Lipton, M.A., Fed. Proc., 5:145, 1946.
- 106.- Lison, L., Histochemie et cytochemie animales, Gauthier-Villars, Paris, 1953.
- 107.- Manery, J.F., J. Cell. Comp. Physiol., 14:365, 1939.
- 108.- Marnay, A. et D. Nachmansohn, Comp. rend. soc. biol., 124:942, 1937.
- 109.- Marnay, A. et D. Nachmansohn, Comp. rend. soc. biol., 125:41, 1937.
- 110.- Marnay, A. et D. Nachmansohn, J. Physiol., 92:37, 1938.
- 111.- Martin, H. et R.L. Wain, Nature, 154:512, 1944.
- 112.- Mazur, A., J. Biol. Chem., 164:271, 1946.
- 113.- Mazur, A. et Bodansky, O., J. Biol. Chem., 163:261, 1946.
- 114.- Mendel, B. et R.D. Hawkins, "Methods in Medical Research" publié sous la direction de R.W. Gerard, Vol. 3, p. 107, The Year Book Publishers, Chicago, 1950.
- 115.- Mendel, B., D.B. Mundell et H. Rudney, Biochem. J., 37:473, 1943.
- 116.- Mendel, B. et D.K. Myers, Biochem. J., 53:XVI, 1953.
- 117.- Meyer, K.H., Schweiz Med. Wochschr., 67:826, 1937.
- 118.- Michaelis, L. et M.L. Menten, Biochem. Z., 49:333, 1913.
- 119.- Michel, H.O. et C. Krop, J. Biol. Chem., 190:119, 1951.
- 120.- Miller, L.C. et N.L. Tainter, Proc. Exper. Biol. Med., 57:261, 1944.
- 121.- Mühlbock, O. et C. Kaufmann, Biochem. Z., 258:377, 1931.
- 122.- Myers, D.K., Biochem. J., 55:67, 1953.
- 123.- Myers, D.K., Biochem. J., 55:671, 1953.
- 124.- Myers, D.K. et B. Mendel, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 71:357, 1949.
- 125.- Nachlas, H.M. et A.M. Seligman, J. Nat. Cancer Inst., 9:415, 1949.

- 126.- Nachmansohn, D., Bull. Soc. Chim. Biol., 21:761, 1939.
- 127.- Nachmansohn, D., Chemical Mechanism of Nerve Activity, p. 240, Modern Trends in Physiology and Biochemistry, Academic Press, New York, 1952.
- 128.- Nachmansohn, D., Metabolism and Function, Elsevier, 1950.
- 129.- Nachmansohn, D. et M. Bergmann, J. Biol. Chem., 165:551, 1946.
- 130.- Nachmansohn, D., R.T. Cox, C.W. Coates et A.L. Machado, J. Neurophysiol., 5:499, 1942.
- 131.- Nachmansohn, D., H.M. John et M. Bergmann, J. Biol. Chem., 163:475, 1946.
- 132.- Nachmansohn, D. et M. Lederer, Bull. Soc. Chim. Biol., 21:797, 1949.
- 133.- Nachmansohn, D. et A.L. Machado, J. Neurophysiol., 6:597, 1943.
- 134.- Ord, M.G. et R.H.S. Thompson, Biochem. J., 46:346, 1950.
- 135.- Payton, T., Nature, 171:355, 1953.
- 136.- Pearse, A.G.E., Histochemistry, Theoretical and Applied, J.A. Churchill, London, p.274, 1953.
- 137.- Philips, F.S. et A. Gilman, J. Pharmacol. Exper. Therap., 86:213, 1946.
- 138.- Philips, F.S., A. Gilman et F.N. Crescitelli, J. Pharmacol. Exper. Therap., 86:222, 1946.
- 139.- Ravin, H.A., Tsou K-C. et Seligman, A.M., J. Biol. Chem., 191:843, 1951.
- 140.- Ravin, H.A., E.S.I. Zacks et A.M. Seligman, J. Pharmacol. Exper. Therap., 107:37, 1953.
- 141.- Renshaw, R.R., P.F. Dreisbach, M. Ziff et D. Green, J. Am. Chem. Soc., 60:1765, 1938.
- 142.- Richards, A.G. et L.J. Cutkrop, J. Cell. Comp. Physiol., 26:57, 1945.
- 143.- Richter, D. et P.G. Croft, Biochem. J., 36:746, 1942.
- 144.- Roeder, K. cité par Chadwick, L. et D. Hill, J. Neurophysiol., 10:225, 1947.
- 145.- Roeder, K. et Weiant, E., Science, 103:304, 1946.
- 146.- Rona, P. et H. Petow, Biochem. Z., 146:144, 1924.
- 147.- Rothenberg, M.A., Biochim. Biophys. Acta., 4:96, 1950.
- 148.- Rothenberg, M.A. et D. Nachmansohn, J. Biol. Chem., 168:223, 1947.
- 149.- Salerno, P.R. et J.M. Coon, J. Pharmacol. Exper. Therap., 95:240, 1949.
- 150.- Salerno, P.R. et J.M. Coon, Arch. inter. Pharmacodyn. Thérap., 84:227, 1950.
- 151.- Schönheyder, F. et K. Volqvartz, Enzymologie, 11:178, 1943-45.
- 152.- Schrader, G., British Intelligence Objective Sub-Committee Final Report, No. 714, Item No. 8, London 1947.
- 153.- Schrader, G., German Patent 720,577; U.S. Patent 2,336,302.
- 154.- Schweitzer, A., A. Stedman et L. Gright, J. Physiol., 95:302, 1939.
- 155.- Smith, D.E., History of Mathematics, Vol. 2, p. 588, Boston 1925.
- 156.- Sprinson, D.B. et D. Rittenberg, J. Biol. Chem., 180:415, 1949.
- 157.- Steinback, H.B., Ann. N.Y. Acad. Sci., 47:849, 1947.
- 158.- Stewart, W.C., Brit. J. Pharmacol., 7:270, 1952.
- 159.- Stohlman, E.F., J.T.M. Thorp et M.I. Smith, A.M.A. Arch. Indust. Hyg., 1:13, 1950.
- 160.- Surgenor, D.M., J. Amer. Chem. Soc., 71:1225, 1949.
- 161.- Takahashi, Y., Arch. ges. Physiol. (Pflügers) 215:42, 1930.
- 162.- Tauber, O.E. et A.B. Hughes, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 75:415, 1950.
- 163.- Taxi, J., J. Physiol., 44:595, 1952.
- 164.- Tobias, J. et J. Kollros, Biol. Bull., 91:247, 1946.
- 164a. Tobias, J., J. Cell. Comp. Physiol., 31:125, 1948.

- 165.- Tobias, J., J. Kollros et J. Davit, J. Cell. Comp. Physiol., 28:159, 1946.
- 166.- Torda, C. et H.G. Solff, J. Pharmacol. Exper. Therap., 95:444, 1949.
- 167.- Torda, C. et H.G. Solff, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 74:744, 1950.
- 168.- Verne, J. et P. Hegmann, Comptes rend. Soc. Biol., 146:1042, 1952.
- 169.- Vincent, I., P. Truhart et A. Abadie, Comptes rend. Soc. Biol., 148:1500, 1948.
- 170.- Virtanen, A.I. et Suomalainen, , Z. Physiol. Chem., 219:1, 1937.
- 171.- Waud, R., J. Pharmacol., 106:423, 1952.
- 172.- Webb, E.C., Biochem. J., 43:97, 1948.
- 173.- Willstätter, R. et P. Memmen, Z. Physiol. Chem., 138:216, 1924.
- 174.- White, W.G. et E.F. Sweeney, U.S. Pub. Health Rept., 60:66, 1948.
- 174a. Wilson, I.B., J. Biol. Chem., 190:111, 1951.
- 175.- Wilson, I.B., Biochim. Biophys. Acta., 7:466, 1951.
- 176.- Wilson, I.B., Biochim. Biophys. Acta., 7:520, 1951.
- 177.- Wilson, I.B. et D. Bachmannsohn, J. Biol. Chem., 186:781, 1950.
- 178.- Wohlgenuth, J. et Y. Nakamura, Biochem. Z., 175:216, 1926.
- 179.- Yeager, J.P. et S.C. Munson, Science, 102:305, 1945.
- 180.- Zummo, A., Biochem. Z., 193:39, 1928.