



HAL
open science

Les phosphatases alcalines du testicule de *Lebistes reticulatus* : mise au point d'une microméthode de détermination quantitative

Bernard Breton, Guy Bonnot, Paul Nardon, Pierre Laviolette

► **To cite this version:**

Bernard Breton, Guy Bonnot, Paul Nardon, Pierre Laviolette. Les phosphatases alcalines du testicule de *Lebistes reticulatus* : mise au point d'une microméthode de détermination quantitative. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles, 1967, 265, pp.161-164. hal-01601247

HAL Id: hal-01601247

<https://hal.science/hal-01601247>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ENZYMOLOGIE. — *Les phosphatases alcalines du testicule de Lebistes reticulatus : mise au point d'une microméthode de détermination quantitative.*

Note (*) de MM. **BERNARD BRETON**, **GUY BONNOT**, **PAUL NARDON** et **PIERRE LAVIOLETTE**, présentée par M. Étienne Wolff.

L'utilisation de substrats chromogènes appropriés permet l'étude qualitative de l'équipement enzymatique des microorganismes. Nous avons appliqué cette méthode à la détermination quantitative des phosphatases alcalines du testicule de *Lebistes reticulatus* (poids moyen de l'organe : 2,5 mg). Cette microméthode de dosage enzymatique pourrait être généralisable à toute enzyme développant une coloration spontanée en présence d'un substrat approprié.

La détermination individuelle des phosphatases alcalines dans le testicule de *Lebistes reticulatus* est rendue difficile par la quantité de tissu disponible (2,5 mg en moyenne). La méthode que nous avons mise au point répond parfaitement à cette exigence car elle ne nécessite que très peu de tissu frais.

Cette méthode constitue une adaptation de celle décrite par Buissière et coll. (1967), adaptation qui permet de passer d'une détection qualitative à une détermination quantitative. Les auteurs précités réalisent la mise en évidence d'activités enzymatiques, chez différentes souches de Bactéries, dans un dispositif à « capillaires » plastiques disposés en série de 10 sur une plaquette.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les animaux proviennent d'un élevage de masse à $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Immédiatement après sacrifice de l'animal, le testicule est pesé et broyé à froid, à l'aide d'un potter de verre, dans du tampon Tris-maléate 0,2 M. L'activité enzymatique est déterminée à partir de cet extrait brut.

Les capillaires de la plaquette sont imprégnés de substrat par instillation dans chacun d'eux de $30 \pm 1 \text{ mm}^3$ d'une solution de paranitrophénylphosphate N. B. C. (pNPP). Les plaquettes sont alors séchées à l'air 12 h à 4°C et 3 h sous vide à température ambiante.

Réaction enzymatique. — 100 mm^3 d'extrait testiculaire sont introduits dans chaque capillaire. Les orifices des capillaires sont obturés par un ruban adhésif afin d'éviter la dessiccation. Chaque essai est constitué de cinq répétitions. Les plaquettes sont introduites dans un densitomètre Chromoscan (Joyce-Lœbl) fonctionnant en réflexion, à 4000 \AA . Cet appareil est réglé pour que le pinceau lumineux de mesure parcoure les capillaires transversalement au niveau du réservoir circulaire. La densité optique le long de la plaquette est enregistrée toutes les 2 mn, l'intensité de l'hydrolyse enzymatique étant exprimée par la surface des pics correspondant à chaque capillaire, surface mesurée directement par l'appareil.

Expression des résultats. — Les valeurs d'intégration sont converties en quantités de paranitrophénol (pNP) libéré par la réaction, à l'aide d'une courbe témoin. La pente à l'origine de la courbe traduisant la quantité de pNP libéré en fonction du temps, exprime la vitesse initiale d'hydrolyse.

Les vitesses initiales sont données en micromoles pNP libéré dans 1 l de milieu en 1 h d'incubation.

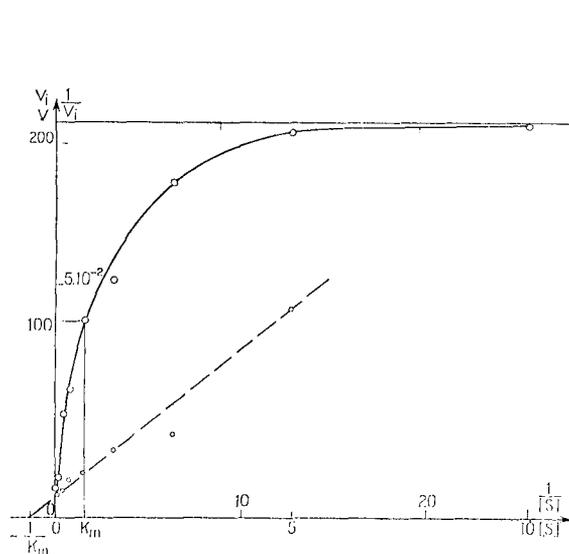


Fig. 1.

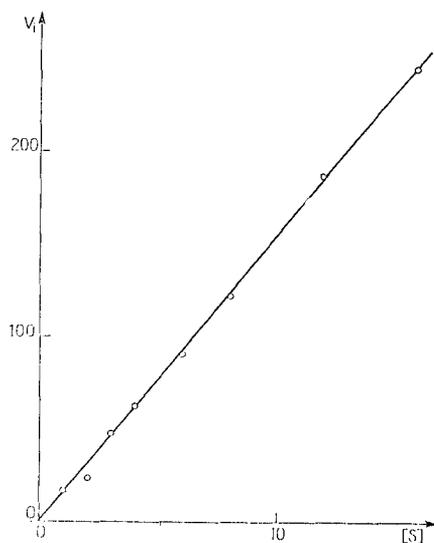


Fig. 2.

Fig. 1. — Traits pleins : variation de la vitesse initiale de la réaction, exprimée en micromoles de pNP libéré dans 1 l de milieu en 1 h, en fonction de la concentration en substrats, en milligrammes par millilitre.

Traits interrompus : variations des inverses de ces deux grandeurs.

V est la vitesse initiale maximale de l'hydrolyse qu'on peut obtenir dans ces conditions.

Fig. 2. — Variations de la vitesse initiale de la réaction, exprimée en micromoles de pNP libéré dans 1 l de milieu en 1 h, en fonction de la concentration en enzyme, exprimée en milligrammes de tissu frais par millilitre de milieu.

RÉSULTATS. — Après avoir vérifié que la méthode donnait des résultats reproductibles, nous avons étudié l'influence sur l'activité enzymatique des facteurs suivants :

- pH;
- concentration en substrat;
- concentration en enzyme.

L'influence de la température n'a pas été déterminée. L'incubation se fait dans l'appareil de mesure dont la température interne se maintient à $28 \pm 1^\circ\text{C}$, la température ambiante étant elle-même réglée à $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Influence du pH. — L'influence du pH sur l'activité de la phosphatase alcaline de *Lebistes reticulatus* a été déterminée avec des concentrations

en substrats de 5 mg de pNPP par millilitre et en enzyme de 4 mg de tissu frais par millilitre.

Pour chaque pH étudié, les vitesses initiales de réaction sont les suivantes :

pH.....	6	7	8	8,5	9
V_i (M.l ⁻¹ .h ⁻¹ .10 ⁻⁶ pNP).....	61,3	54,7	65,9	78,4	124,8
pH.....	9,3	9,4	9,5	9,7	10
V_i (M.l ⁻¹ .h ⁻¹ .10 ⁻⁶ pNP).....	156,2	216,9	212,5	189,7	148,4

Le pH optimal d'action se situe entre 9,3 et 9,5.

Influence de la concentration en substrat. — Les essais ont été effectués à pH 9,4 avec une concentration en enzyme de 4 mg de tissu frais par millilitre.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I et permettent de construire les courbes de la figure 1.

TABLEAU I.

Vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique du pNPP, exprimée en micromoles de pNP libéré dans 1 l de milieu en 1 h, en fonction de la concentration en substrats, exprimés en milligrammes par millilitre.

Les inverses de ces deux grandeurs sont également portées sur ce tableau.

(S).....	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039
V_i	208,5	206,6	179,8	127,3	105,5	69,0	55,8	21,9	15,25
$\frac{1}{S}$	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8	25,6
$\frac{1}{V_i} \cdot 10^3$...	0,479	0,48	0,56	0,78	0,95	0,44	1,79	4,56	6,55

Les courbes de la figure 1 nous permettent de calculer la constante de Michaelis de la phosphatase alcaline du testicule de *Lebistes reticulatus*.

Les valeurs trouvées par les deux méthodes diffèrent légèrement, soit $K_m = 2,3 \cdot 10^{-3}$ et $K_m = 2,0 \cdot 10^{-3}$ M/1 pNPP.

Influence de la quantité d'enzyme. — Pour cette étude, nous avons opéré à pH 9,4 et avec 5 mg de pNPP par millilitre. Les résultats ci-dessous sont explicités par la courbe de la figure 2.

Concentration en enzyme

(mg/ml tissu frais).....	16	12	8	6	4	3	2
V_i (M.l ⁻¹ .h ⁻¹ .10 ⁻⁶ pNP)....	242,5	182,7	121,5	89,9	61,2	47,0	24,5

DISCUSSION. — La proportionnalité entre vitesse de réaction et quantité d'enzyme montre que cette microméthode peut être utilisée pour le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline. Par contre, elle ne peut être envisagée directement pour une étude enzymatique à pH acide, le *p*-nitro-phénol dans ces conditions, n'étant pas coloré.

Par ailleurs, ce travail nous a permis de définir certains paramètres caractéristiques de la phosphatase alcaline de testicule de *Lebistes*. Ainsi,

cette enzyme présente un pH optimal situé entre 9,3 et 9,5 et une constante de Michaelis vis-à-vis du pNPP de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$.

Nos essais préliminaires utilisant des préparations de testicules issus d'animaux adultes, mais d'âge et de poids différents, le poids de la gonade s'étalant de 1 à 3,5 mg pour des poids corporels compris entre 50 et 110 mg, ont montré une même activité spécifique pour tous ces organes. Il apparaît donc que l'activité phosphatasique dans le testicule de *Lebistes* demeure constante au cours de la vie adulte. On sait par ailleurs que l'activité phosphatasique histochimiquement décelable dans la gonade est accrue après injection de gonadotropines (²); la sensibilité de notre méthode nous permet d'envisager la détermination quantitative de cette enzyme et, par là, pourrait nous amener à la définition d'un test de dosage biologique des hormones gonadotropes chez les Poissons.

(*) Séance du 19 juin 1967.

(¹) J. BUISSIÈRE, A. FOURCARD et L. COLOBERT, *Comptes rendus*, 264, série D, 1967, p. 415.

(²) J. G. D. LAMBERT et P. G. W. J. VAN OORDT, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5, 1965, p. 693-694.

(*Institut National des Sciences appliquées,
Laboratoire de Biologie,
20, avenue Einstein, Villeurbanne, Rhône.*)