

## La N-acétylhistidine comme donneur d'acétyl dans la biosynthèse de l'acétylcholine du cerveau de Poisson

ARNE HANSON

*Laboratoire Central de Chimie Clinique, Hôpital Municipal, Malmö, Suède*

La N-acétylhistidine, qui se trouve en concentrations très élevées dans le cerveau de certains Vertébrés poikilothermes, peut fonctionner comme donneur d'acétyl dans la synthèse de l'acétylcholine du cerveau de Poisson.

Il est constaté que des préparations brutes de cerveau de Labre (*Labrus berggylta*) et de Flet (*Pleuronectes flesus*) peuvent catalyser in vitro la formation de l'acétylcholine à partir de la N-acétylhistidine, ainsi que l'activation séparée de cette dernière.

Le pH optimum de cette réaction est voisin de 7.

La courbe d'activité en fonction de la température de la formation d'acétylcholine au moyen d'un extrait enzymatique de cerveau de Labre et de Flet présente son maximum à environ 25°C qui diffère nettement de celles obtenues au moyen d'extraits de cerveau de Mammifères.

Deux acides aminés N-acétylés ont été trouvés en concentrations très élevées dans le cerveau: l'acide N-acétylaspartique dans le cerveau des Mammifères, des Oiseaux<sup>1,2</sup> et des Poissons<sup>3</sup> et la N-acétylhistidine dans le cerveau de certains Vertébrés poikilothermes (Batraciens, Reptiles et Poissons).<sup>4</sup>

La biosynthèse de l'acide N-acétylaspartique dans le cerveau du rat a été étudiée par Goldstein<sup>5</sup> et celle de la N-acétylhistidine dans le cerveau des Poissons et des Batraciens par Hanson.<sup>6</sup> Ces deux synthèses sont catalysées par des acétylases ayant une spécificité très étroite pour l'acétylcoenzyme A et l'acide aminé.

Le rôle de ces acides aminés N-acétylés dans le métabolisme du système nerveux central n'est pas connu. Il leur a été proposé un rôle de donneurs d'acétyles (Tallan<sup>2</sup> et Anastasi *et al.*<sup>4</sup>). Cette hypothèse est supportée par l'observation de Korey *et al.*,<sup>7</sup> qui ont montré qu'une préparation de choline-acétylase provenant des ganglions cérébroïdes des Cephalopodes peut utiliser les dérivés N-acétylés de la glycine, de l'alanine et de la lysine au lieu de l'acétate en vue de la formation d'acétylcholine. Ces substances ne se présentent cependant pas comme telles dans la nature, du moins pas dans le tissu nerveux, et on n'a pas recherché si des préparations de choline-acétylase provenant d'autres espèces pourraient les utiliser comme substrats.

Il est un fait bien établi que la synthèse de l'acétylcholine à partir de l'acétate et de la choline dans le tissu nerveux se fait en deux étapes: d'abord, activation de l'acétate par l'acétatethiokinase en présence d'adénosinetriphosphate et de coenzyme A pour former l'acétyl-coenzyme A; ensuite, transfert du groupe acétyle du coenzyme A à la choline par la choline-acétylase (Nachmansohn<sup>8</sup>).

Le présent travail concerne l'étude de la N-acétylhistidine comme donneur d'acétyle dans la synthèse in vitro de l'acétylcholine du cerveau de poisson. Il est constaté que la formation d'acétylcholine à partir de la N-acétylhistidine ainsi que l'activation séparée de cette dernière sont catalysées par une préparation brute de cerveau de poisson.

### MATERIEL ET METHODES

**Réactifs.** Le coenzyme A provenait de Sigma Chemical Co. et de Calbiochem, l'adénosine-triphosphate, sel de sodium, de Pabst Laboratories, le chlorure de choline et le sulfate d'éserine de E. Merck et le chlorure d'acétylcholine de Hoffmann-La Roche.

La N-acétylhistidine nous fut d'abord gracieusement offerte par le Professeur V. Erspamer de l'Université de Parme (Italie); par la suite, elle nous a été fournie par Nutritional Biochemical Corp.

Les autres réactifs utilisés dans ce travail étaient de la qualité "pur pour analyse".

**Préparation de l'enzyme.** Des spécimens de Labre (*Labrus berggylta*) et de Flet (*Pleuronectes flesus*) fraîchement pêchés furent employés. Les animaux furent tués par décapitation et les cerveaux furent immédiatement enlevés et homogénéisés dans l'acétone sèche à  $-15^{\circ}\text{C}$  ( $10 \times$  volume du tissu). L'homogénat fut filtré dans un entonnoir de Büchner, lavé à l'acétone froid et mis à sécher dans un dessiccateur sous vide. Il a été constaté que lorsque cette poudre est maintenue à la température de  $-15^{\circ}\text{C}$ , elle conserve son activité pendant plusieurs semaines.

Pour l'extraction de la poudre, on a employé la solution-tampon de Korey *et al.*: KCl 0,17 M, MgCl<sub>2</sub> 0,00125 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,006 M, ajustée à pH 7,0. L'extraction se fit à  $10^{\circ}\text{C}$  pendant une heure (50 mg de poudre par ml de solution-tampon). Le liquide surnageant, séparé par centrifugation à 1200 g pendant 3 à 5 minutes, fut employé pour les essais.

**Mélanges réactionnels et dosage de l'activité enzymatique.** En vue de l'étude de la synthèse de l'acétylcholine, on a employé un mélange réactionnel ayant la composition suivante: KCl 30  $\mu\text{moles/ml}$ , MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu\text{moles/ml}$ , Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5  $\mu\text{moles}$ , KBH<sub>4</sub> 0,5  $\mu\text{mole/ml}$ , sulfate d'éserine 0,1  $\mu\text{mole/ml}$ , N-acétylhistidine 100  $\mu\text{moles/ml}$  ou acétate de sodium 20  $\mu\text{moles/ml}$ , adénosine-triphosphate 5  $\mu\text{moles/ml}$ , coenzyme A 0,1  $\mu\text{mole/ml}$ , chlorure de choline 10  $\mu\text{moles/ml}$  et solution enzymatique 0,2 à 0,5 ml. Le pH du mélange était ajusté à 7,0 avant l'addition de l'enzyme. Le volume final était généralement de 3 ml et l'incubation se fit à  $25^{\circ}\text{C}$ .

L'acétylcholine formée pendant l'incubation a été dosée par la méthode de Hestrin<sup>9</sup> après réaction avec l'hydroxylamine.

Lorsque la phase d'activation de la réaction était étudiée séparément, le mélange réactionnel était celui décrit ci-dessus à l'exception du fait que l'éserine était exclue et que l'hydroxylamine (chlorhydrate) 250  $\mu\text{M/ml}$  remplaçait la choline comme accepteur du groupe acyle. L'acide acéthydroxamique formé a été dosé dans le mélange réactionnel par la méthode de Beinert *et al.*<sup>10</sup>

**Chromatographie et électrophorèse.** L'acétylcholine formée dans le système a été identifiée par chromatographie sur papier selon la technique de Whittaker et Wijesundera<sup>11</sup> et de Augustinsson et Grahn.<sup>12</sup>

La présence d'histidine dans les mélanges réactionnels à la fin des périodes d'incubation a été démontrée par électrophorèse sur papier à haute tension en employant l'appareil de Wieland et Pfeleiderer.<sup>13</sup> L'histidine et la N-acétylhistidine se séparent bien dans un mélange-tampon d'acide formique, d'acide acétique et d'eau (15:10:75, pH final 1,2) à l'issue d'une période d'électrophorèse de deux heures et sous une tension de 1700 volts.<sup>6</sup>

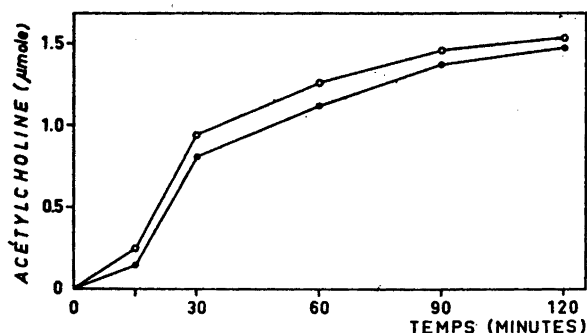


Fig. 1. Formation de l'acétylcholine avec la N-acétylhistidine (●) et l'acétate de sodium (○) comme donneur d'acétyle.

Les deux substances furent révélées par pulvérisation avec le réactif de Pauly (l'acide sulfanilique diazoté) ou une solution du tétrafluorborate de *p*-nitrobenzènediazonium;<sup>4</sup> pour l'histidine, nous avons en outre utilisé le réactif à la ninhydrine.

L'identité de l'acide hydroxamique formé au cours des essais d'activation a été vérifiée par chromatographie sur papier selon la méthode de Stadtman et Barker.<sup>14</sup>

*Dosage des protéines.* Les protéines dans les solutions enzymatiques ont été dosées par le réactif de biuret.<sup>15</sup>

## RESULTATS

*Formation de l'acétylcholine.* L'addition de N-acétylhistidine comme donneur d'acétyle au mélange réactionnel entraîne la formation d'acétylcholine (Fig. 1). La vitesse de cette formation montre une période d'induction bien définie. Après avoir ajouté l'enzyme au mélange d'incubation on observe d'abord une vitesse faible au cours des 15 premières minutes. Ensuite, la vitesse de synthèse augmente fortement au cours des 15 minutes suivantes et est suivie d'une phase où la vitesse de formation décroît graduellement. Lorsqu'on utilise de l'acétate de sodium dans les mélanges réactionnels, on observe une courbe de vitesse de réaction du même genre (Fig. 1).

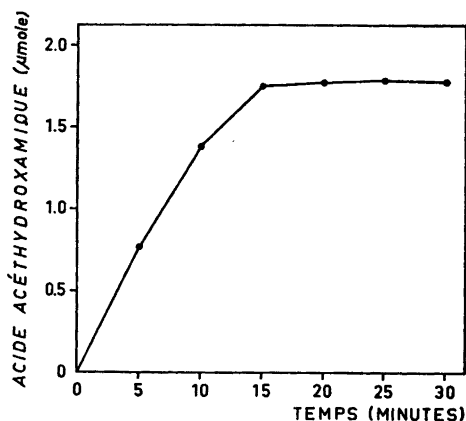


Fig. 2. Activation de l'acétate avec la N-acétylhistidine.

Le rendement maximum de la formation d'acétylcholine est de 1,1  $\mu$ mole/mg de protéines/heure avec la N-acétylhistidine et de 1,2  $\mu$ mole/mg de protéines/heure avec l'acétate de sodium lorsqu'il est calculé sur la base de la quantité formée au cours de la première heure. Calculé sur la base de la période de la vitesse de synthèse la plus élevée, le rendement maximum est environ double.

*Activation de l'acétate.* La Fig. 2 montre la vitesse d'activation de l'acétate avec la N-acétylhistidine exprimée par la formation d'acide acéthydroxamique. Le maximum est atteint après 15 à 20 minutes. Cette durée coïncide bien avec la période d'induction observée dans la réaction d'acétylation décrite ci-dessus.

*Identification des produits de la réaction par chromatographie et électrophorèse.* Dans les mélanges d'incubation provenant des réactions complètes, une substance a été décelée, qui se comporte en chromatographie sur papier comme l'acétylcholine; p.ex. dans un solvant composé de butanol, d'éthanol, d'acide acétique et d'eau (8:2:1:3), la substance a une valeur  $R_F$  de 0,47. L'acétylcholine examinée dans le même solvant a aussi un  $R_F$  de 0,47.

Dans les mêmes mélanges réactionnels, une substance ayant les mêmes propriétés que l'histidine a été trouvée; sa migration électrophorétique dans le système décrit ci-dessus est identique à celle de l'histidine (19 cm vers la cathode) et elle réagit positivement avec la ninhydrine.

L'acide hydroxamique formé dans les réactions d'activation a été identifié comme l'acide acéthydroxamique. Son  $R_F$  dans un solvant de butanol saturé d'eau est 0,50 et celui de l'acide acéthydroxamique synthétique est de 0,52.

*Influence du pH.* L'influence du pH sur l'acétylation de la choline est montrée à la Fig. 3. Le pH optimum est voisin de 7 tant avec la N-acétylhistidine qu'avec l'acétate de sodium comme donneur d'acétyle.

*Influence de la température.* Influence de la température sur la formation de l'acétylcholine avec la N-acétylhistidine est montrée dans la Fig. 4. La courbe obtenue en portant l'activité en fonction de la température indique un maximum d'environ 25°C. En dessous de cette température, l'activité reste assez élevée (à 5°C cette activité est encore égale à 30 pour cent environ de l'activité

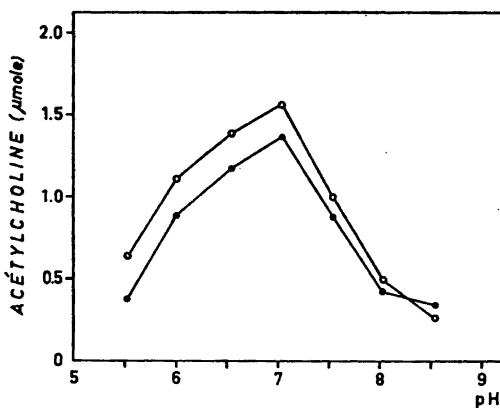


Fig. 3. Influence du pH sur l'acétylation de la choline avec la N-acétylhistidine (●) et l'acétate de sodium (○) comme donneur d'acétyle.

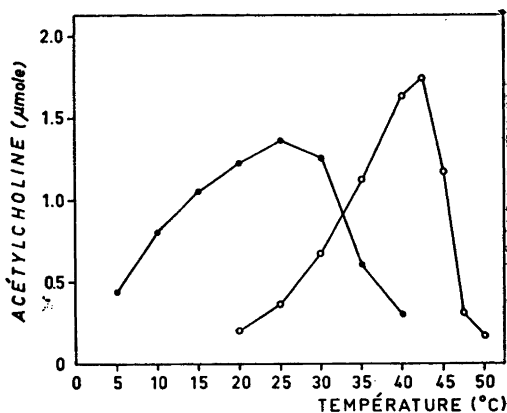
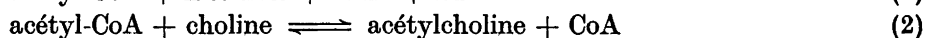
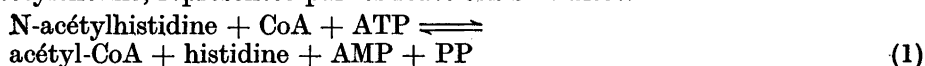


Fig. 4. Influence de la température sur la formation de l'acétylcholine du cerveau de Labre (●) et du cerveau de Lapin (○). La dernière courbe est construite avec les valeurs données par Milton.<sup>18</sup>

enregistrée à 25°C), tandis qu'à des températures plus élevées, l'activité présente une chute très abrupte. Lorsqu'on compare cette courbe avec celles obtenues de la même façon avec la choline-acétylase d'un Mammifère, p.ex. du Lapin, des différences marquées se présentent. Dans cette dernière courbe, l'activité indique un maximum à une température plus élevée, entre 40 et 45°C et présente une chute abrupte des deux cotés de ce maximum dès que la température change.

#### DISCUSSION

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que la N-acétylhistidine peut fonctionner comme donneur d'acétyle dans la synthèse de l'acétylcholine, représentée par les réactions suivantes:



La réaction (1) représente l'activation de l'acétate et la réaction (2) représente le transfert du groupe acétyle à la choline. La préparation enzymatique brute du cerveau de Labre et de Flet présente donc à la fois une activité du type acétyl-thiokinase et une activité du type choline-acétylase.

Le rôle des acides aminés N-acétylés dans le cerveau n'est pas encore connu. Un rôle éventuel comme donneur d'acétyle dans des systèmes d'acétylation a été proposé tant pour l'acide N-acétylaspartique<sup>2</sup> que pour la N-acétylhistidine.<sup>4</sup> Cette hypothèse n'avait cependant pas encore été confirmée expérimentalement. Les résultats présentés ici sont donc intéressants du fait qu'ils montrent que le système synthétisant l'acétylcholine dans le cerveau de Labre et de Flet peut utiliser aussi bien la N-acétylhistidine que l'acétate comme donneur d'acétyle. Ces résultats, qui à notre avis constituent la première démonstration d'une fonction métabolique d'un acide aminé N-acétylé dans le cerveau, ont été obtenus par des essais *in vitro*, mais ils peuvent indiquer le rôle *in vivo* de la N-acétylhistidine dans le cerveau de Poisson.

L'action de la choline-acétylase du cerveau de Labre et de Flet est d'un intérêt particulier étant donné qu'elle ne catalyse pas seulement la transacétylation mais aussi la rupture d'une liaison C—N. Une activité semblable a été observé avec le système cholineacétylase des ganglions cérébroïdes des Cephalopodes étudié par Korey *et al.*<sup>7</sup> lorsque la N-acétylglycine, la N-acétylalanine et la N-acétyllysine remplacent l'acétate comme substrat. Sous ce rapport, le système d'acétylation contraste avec l'estérification catalysée par l'acétylcholinestérase qui ne peut utiliser des dérivés N-acétylés.<sup>16</sup>

La courbe d'activité en fonction de la température de la formation d'acétylcholine au moyen d'un extrait enzymatique de cerveau de Labre et de Flet présente un certain intérêt vu qu'elle diffère nettement de celles obtenues au moyen d'extraits de cerveaux de Mammifères. On a cru assez long-temps que les enzymes des poikilothermes et des homéothermes devaient présenter des différences au point de vue de leur température optimum (Barrington<sup>17</sup>). Toutefois, jusqu'à présent, il n'y a qu'un nombre restreint d'essais qui ont été faits dans le but de jeter une lumière sur cette question. La courbe d'activité obtenue dans ce travail pour le Labre et le Flet présente une température optimum beaucoup plus basse que celle obtenue pour le Lapin. Des résultats similaires ont été obtenus par Milton<sup>18</sup> dans une étude sur l'influence de la température sur la vitesse de synthèse de l'acétylcholine par la cholineacétylase de Labre (*Labrus viridis*) et de Lapin. Dans cette étude, la courbe du Labre est plus large que celle du Lapin et l'activité maximum se présente à environ 25°C. La préparation enzymatique de Labre a aussi une thermolabilité semblable à celle observée dans ce travail.

Une partie de ce travail a été effectuée au Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France à Concarneau (Finistère). Je suis heureux de remercier le Professeur Jean Roche et le Docteur Nguyen van Thoai pour l'intérêt qu'ils ont apporté à mon travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Tallan, H. H., Moore, S. et Stein, W. H. *J. Biol. Chem.* **219** (1956) 257.
2. Tallan, H. H. *J. Biol. Chem.* **224** (1957) 41.
3. Hanson, A. à paraître.
4. Anastasi, A., Correale, P. et Erspamer, V. *J. Neurochem.* **11** (1964) 63.
5. Goldstein, F. B. *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 2702.
6. Hanson, A. à paraître.
7. Korey, S. R., de Braganza, B. et Nachmansohn, D. *J. Biol. Chem.* **189** (1951) 705.
8. Nachmansohn, D. *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*, Academic Press, New York 1959.
9. Hestrin, S. *J. Biol. Chem.* **180** (1949) 249.
10. Beinert, J., Green, D. E., Hele, P., Hift, H., von Korff, R. W. et Ramakrishnan, C. V. *J. Biol. Chem.* **203** (1955) 35.
11. Whittaker, V. P. et Wijesundera, S. *Biochem. J.* **51** (1952) 348.
12. Augustinsson, K.-B. et Grahn, M. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 906.
13. Wieland, T. et Pfleiderer, G. *Angew. Chem.* **67** (1955) 257.
14. Stadtman, E. R. et Barker, H. A. *J. Biol. Chem.* **184** (1950) 769.
15. Layne, E., dans Colowick, S. P. et Kaplan, N. O. *Methods in Enzymology*, New York 1957, tome 3, p. 450.
16. Wilson, I. B., Bergmann, P. et Nachmansohn, D. *J. Biol. Chem.* **186** (1950) 781.
17. Barrington, E. J. W., dans Brown, M. *The Physiology of Fishes*, New York 1957, tome 1, p. 109.
18. Milton, A. S. *J. Physiol.* **142** (1958) 25P.

Manuscrit reçu le 28 septembre 1965.