

Instituto de Fisiología
Facultad de Medicina — Barcelona
(Prof. J. Jiménez-Vargas)

Sur quelques facteurs de phosphatasémie apparente du serum sanguin

J. Monche, J. Jiménez-Vargas et M. Ferrer-Arenillas

(Recibido para publicar el 16 de septiembre de 1955)

Les méthodes de dosage des phosphomonoestérases présentent l'inconvénient bien connu, d'être basées sur l'emploi comme substrat d'esters orthophosphoriques de types distincts, dont leur comportement à l'hydrolyse est pourtant différent et caractéristique de l'ester utilisé. Il y a donc lieu d'admettre des différences dans les données obtenues, selon la méthode de dosage des phosphomonoestérases et les conditions opératoires de réalisation des processus phosphomonoestérasi-ques, correspondantes à chaque méthode.

Nous avons étudié comparativement le comportement hydrolytique du phénylphosphate de sodium, du phénolphtaléin-phosphate de sodium et de l'ester 2,4' -carboxyl-azobenzène-phosphorique, base des méthodes de King (4), de Huggins et Talalay (3) et de celle proposée par Monche (5).

Comme source de phosphomonoestérases nous avons utilisé des échantillons de sérum normal humain ou d'animaux d'expérimentation, mais préalablement traités, de façon à avoir lieu d'attendre une altération plus ou moins accusée du taux en enzyme correspondant au sérum selon le traitement du même, afin de vérifier comparativement si les données obtenues au moyen de chaque méthode étaient concordantes, ou bien s'il fallait s'attendre à des variations dans les données.

Partie expérimentale

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous avons utilisé quarante huit Rats mâles ou femelles pesant en moyenne 200 grammes. Tous les animaux ont été mis au même régime alimentaire. On a séparé les animaux en quatre groupes de douze Rats pour administrer aux Rats de trois de ces groupes, pendant quinze jours, des doses orales massives des acides p-aminobenzoïque, nicotinique et salicilique, respectivement. Le quatrième groupe d'animaux étant utilisé comme contrôle.

Tous les animaux ont été sacrifiés au même temps par saignée jugulaire. Le sang prélevé de chaque groupe de Rats fut mélangé de façon à obtenir quatre échantillons de sang différents et ensuite les sérums correspondants. Toutes ces opérations ont été rapidement accomplies afin de doser immédiatement le taux de phosphatase sérique alcaline correspondant à chaque échantillon.

Nous nous sommes bornés à la phosphatase sérique alcaline tenant compte du fait que le phénolphtaléinphosphate se comporte à l'hydrolyse alcaline, comme un substrat directement chromogène et que pourtant les résultats obtenus au moyen de la méthode de Huggins et Talalay, peuvent être directement exprimés en densités optiques, ce qui permet de les comparer proportionnellement avec les densités optiques directes résultantes d'après la méthode de Monche.

Nous avons donc utilisé le sérum contrôle comme source patron pour le dosage de la phosphatase alcaline au moyen des trois méthodes indiquées plus haut, afin d'obtenir l'équivalence en unités King de phosphatase, des densités optiques résultantes pour le même échantillon de sérum patron, d'après les méthodes de Huggins et Talalay et de Monche. Cela permet d'exprimer en unités King toutes les variations de la phosphatasémie sérique alcaline, observées au moyen des trois méthodes dans les trois restants échantillons de sérum.

Pour l'étude de l'influence des acides p-aminobenzoïque, nicotinique et salicilique directement ajoutés sur le sérum sanguin humain, nous les avons employés à la concentration de 0,1 mmol. d'acide pour 100 cm.³ de sérum. L'activité phospho-monoestérasique des échantillons ainsi préparés, a été respectivement comparée avec celle des échantillons correspondants du sérum original normal dans des essais qualitatifs, ayant comme but exclusif le contrôle préalable des réactifs et des conditions opératoires de chaque méthode, afin de nous placer,

pour la réalisation des expériences «in vivo», dans les meilleures conditions de comparabilité. Nous continuons donc ces expériences.

RESULTATS EN UNITES KING

Sérum des rats	Méthodes		
	King	Huggins	Monche
Patron	5,6	5,6	5,6
Après administration de doses orales massives de l'acide:			
Aminobénzoïque (para)	2,5	6,0	6,3
Nicotinique	7,4	6,2	6,7
Salicilique	1,3	4,9	5,2

Discussion et conclusions

L'action exercée sur la phosphatasémie du sérum sanguin par diverses substances comme suite de leur administration orale à des animaux fut étudiée il-y-a longtemps par Bodansky (1). Cet auteur fut amené à admettre la possibilité d'une superproduction de phosphatase intestinale et suggéra l'idée de l'origine divers de la phosphatase sérique normale.

Blume et ses collaborateurs (2), ont signalé que l'acide salicilique passe en deux minutes du tube digestif dans le sang. En plus, les acides *para*-aminobenzoïque et nicotinique constituent des métabolites normalement présents dans les aliments. Il est donc à remarquer la similitude entre les résultats obtenus au moyen des deux substrats directement chromogènes par rapport aux différences correspondantes à la méthode de King. Ces différences obéissent, à notre avis, au fait que les acides aminobénzoïque (*para*) et salicilique, donnent des colorations particulièrement intenses avec le réactif de Folin et Ciocalteu, tandis que l'acide nicotinique ne donne pas de coloration. Mais, même les solutions du chlorhydrate d'aniline se colorent en bleu intense, exactement comme le phénol. Par contre, celles qui fournissent les acides aminobenzoïque et salicilique sont vertes. Pourtant le réactif de Folin et Ciocal-

teau, base de la méthode de King pour le dosage colorimétrique du phénol libéré dans l'hydrolyse diastasique du phénylphosphate de sodium, n'est pas spécifique du phénol.

Ce fait expliquerait que la sensibilité des méthodes non spécifiques de dosage colorimétrique du phénol, serait sérieusement troublée en cas de présence dans le sang de concentrations excessives de substances capables de donner des réactions fortement colorées avec les réactifs employés. Cela se traduirait dans les résultats analytiques, en des chiffres trop bas pour les valeurs des données obtenues, spécialement dans le cas que nous étudions dans ce Mémoire, à cause de la non comparabilité colorimétrique des couleurs bleu et verte et des mélanges variables de ces deux couleurs. Des cas semblables, peuvent se présenter dans la pratique courante des analyses cliniques, par exemple dans des échantillons de sérum de malades soumis à des fortes doses thérapeutiques de médicaments salicyliques. En plus, l'acide salicylique est un inhibiteur bien connu des processus enzymatiques, facilement éliminé par l'organisme animal au fur et à mesure qu'il passe du tube digestif dans le sang. Cela expliquerait le faible bas taux en enzyme résultant des deux méthodes se basant sur l'emploi des deux substrats directement chromogènes par rapport à la forte diminution apparente du taux trouvé au moyen de la méthode de King.

L'examen de nos résultats analytiques montre aussi que le sérum sanguin des Rats qui ont été soumis au traitement par les acides nicotinique et aminobénoïque (*para*), exerce une action hydrolytique légèrement plus intense que le sérum des Rats patron, sans que cela nous permette d'affirmer que leur richesse en phosphomonoestérase soit plus grande, car ces deux acides peuvent se montrer par eux mêmes, comme des activateurs faibles de l'hydrolyse chimique (6).

Comme suite de la différence de comportement à l'hydrolyse des substrats qui constituent la base des trois méthodes employées pour cette étude, il est donc pratiquement difficile de se placer dans des conditions opératoires absolument comparables. Les données en unités King des résultats que nous avons obtenus, sont pourtant toujours relatives, mais suffisantes pour nous, en accord avec le but de cette première phase de nos expériences.

Un résumé de ce mémoire a été déjà publié (7).

Bibliographie

- (1) BODANSKY, A. : *Journ. Biol. Chem.*; **104**, 473, 1934.
- (2) BLUME, W., FISCHER, V., et PLUM, K. : *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*; **179**, 646 et 655, 1935.
- (3) HUGGINS, C., et TALALAY, P. : *Journ. Biol. Chem.*; **159**, 401-410, 1945.
- (4) KING, E. J. : «Micro-Analysis in Medical Biochemistry», 56 et 61 (Churchill Ltd., London, 1946).
- (5) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*; **37**, 317 et 323, 1955 ; *Rev. Esp. Fisiol.*, **11**, 1955 (sous presse).
- (6) LORA TAMAYO, M., et MARTÍN MUNICIO, A. : *Anal. R. Acad. Esp. Fis. Quím.*; B-**46** et **47**, 55 et 143, 1950 et 1951.
- (7) MONCHE, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J., et FERRER-ARENILLAS, M. : Résumés des Communications du III Congrès International de Biochimie, page 146 (Bruxelles, 1955).