

## 154. Sur la biochimie générale des phosphatases<sup>1)</sup>

par Jean Roche.

(17 VI 46)

Un grand intérêt s'attache à l'étude des phosphatases, tant en raison de la multiplicité des combinaisons phosphorées naturelles qu'elles synthétisent et dégradent dans les cellules, que de leur participation aux processus physiologiques les plus divers, depuis le métabolisme intermédiaire des glucides jusqu'à la régulation rénale de l'équilibre acide-base et à l'ossification. On connaît depuis près de quarante ans l'existence d'enzymes hydrolysant les esters orthophosphoriques (*Suzuki, Yoshimura et Takaishi*, 1907), mais leur étude n'a pris un développement important qu'après la démonstration en 1923, par *Robison*<sup>2)</sup>, du rôle joué par une phosphatase dans la calcification des os et, ultérieurement, avec l'identification de nombreuses réactions spécifiques de phosphorylation et de déphosphorylation dans le métabolisme cellulaire. L'ensemble de la biochimie des phosphatases ne saurait plus être présenté utilement que dans des mises au point assez étendues; celles que lui ont consacré *Folley et Kay*<sup>3)</sup>, *Albers*<sup>4)</sup>, *Roche et Courtois*<sup>5)</sup>, répondent à ce but. Je me propose seulement de situer dans son cadre un certain nombre de données d'acquisition récente, permettant de saisir la position des biochimistes devant les principaux problèmes de ce domaine et de montrer l'évolution de ceux-ci au cours des dernières années.

### A. — *L'individualisation et la classification des phosphatases.*

Les phosphatases sont des enzymes dont l'activité donne naissance à de l'acide orthophosphorique ou opère à partir de celui-ci la synthèse de produits divers. Cette définition, très large, englobe la catalyse de réactions multiples: l'hydrolyse et la synthèse des mono- et des diesters orthophosphoriques, des pyrophosphates, des phosphoamides, des anhydrides de l'acide orthophosphorique et d'acides organiques, l'hydratation des métaphosphates. Par ailleurs, certaines réactions cellulaires de phosphorylation ou de transphosphorylation

<sup>1)</sup> Le comité de rédaction des *Helv. chim. acta* a décidé de publier (en partie sous forme de résumés) les conférences et communications présentées aux «Journées biochimiques franco-suisse», organisées à Bâle, du 24 au 27 mai 1946, sous les auspices de la Société de Chimie biologique de France, de la Société suisse de Chimie et de la Société suisse de Physiologie et de Pharmacologie; se référer aux numéros 154—178 de ce fascicule.

<sup>2)</sup> *R. Robison*, *Biochem. J.* **17**, 286 (1923).

<sup>3)</sup> *S. J. Folley et H. D. Kay*, *Ergebn. Enzymforsch.* **5**, 159 (1936).

<sup>4)</sup> *H. Albers*, *Handb. d. Enzymolog.* **1**, 408 (1940).

<sup>5)</sup> *J. Roche et J. Courtois*, *Exposés ann. de Biochim. méd.* **4**, 219 (1943).

n'évoluent pas de manière autonome; elles sont couplées avec d'autres processus et leur étude dépasse le cadre de cet exposé. Aussi a-t-on décrit un nombre considérable d'actions phosphatasiques, en apparence spécifiques, entre lesquelles il a été difficile d'établir un lien, ce qui a longtemps maintenu les recherches consacrées aux phosphatases sur un plan descriptif.

Il convenait tout d'abord d'individualiser et de classer ces enzymes pour les étudier, et le premier critère auquel les biochimistes ont fait appel pour y parvenir est la *spécificité du substrat*. Il a été possible de distinguer ainsi des phosphatases actives sur un type de liaison, quelle que soit la constitution du substrat dans lequel celle-ci est présente, et d'autres de spécificité plus étroite, actives sur un seul substrat ou sur un petit nombre de corps de structure voisine. On trouvera dans le tableau I l'énumération des principales phosphatases ainsi caractérisées.

**Tableau I.**  
Spécificité et principales localisations des divers types de phosphatases

Type d'enzyme	Principales sources
<i>A. Phosphatases spécifiques d'un type de liaison</i>	
Phospho-monoestérases . . .	Os, rein, intestin, graines, levures, champignons supérieurs
Phospho-diestérases . . . .	Foie, rein, levures, venins
Pyrophosphatases . . . . .	Foie, rein, intestin, levures, champignons supérieurs
Phospho-amidases . . . . .	Rein, sons des céréales
Phospho-acylases . . . . .	Muscles, bactéries
<i>B. Phosphatases spécifiques d'un seul ou d'un petit nombre de substrats</i>	
Adényl-pyrophosphatase . . .	Muscle, foie, intestin
Phytase . . . . .	Sons, rein
Polyphosphatase . . . . .	Intestin, levures, moisissures
Cholinephosphatase . . . . .	Intestin, venins
5-Nucléotidase . . . . .	Testicules, venins
Métaphosphatase . . . . .	Levures, moisissures, rein

Les actions enzymatiques correspondantes ont, en général, pu être séparées les unes des autres. Toutefois, ce n'est pas là une preuve absolue de leur individualité, car il peut suffire de détruire un groupement de l'apoenzyme auquel se fixe préférentiellement un substrat pour faire disparaître toute action sur celui-ci sans avoir éliminé un enzyme spécifique. Cette réserve ne s'applique sans doute pas à l'individualité des phosphatases du groupe A (tableau I), dont les apoenzymes paraissent différents. Elle est, par contre, importante dans le cas des enzymes du groupe B, dont je n'ai mentionné que ceux dont l'existence est bien établie, sans faire état d'autres, en parti-

culier d'une amylo-phosphatase et d'une hexose-diphosphatase, insuffisamment caractérisées. Il convient dans ce domaine de ne retenir que les résultats établis sur des enzymes purifiés, car des effecteurs naturels peuvent inhiber l'hydrolyse d'un substrat plus fortement que celle d'un autre et, par là, modifier la spécificité apparente d'une phosphatase brute. Des faits de cet ordre sont probablement à l'origine des discussions sur l'existence présumée des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphatases spécifiques<sup>1</sup>).

La notion d'*isodynamie* des phosphatases, dégagée par *Bamann* et *Diederichs*<sup>2</sup>) de leurs propres observations et de celles faites par *Munemura*<sup>3</sup>), par *Belfanti*, *Contardi* et *Ercoli*<sup>4</sup>) sert de base à une différenciation plus précise de ces enzymes. Les tissus animaux et végétaux renferment en effet presque toujours un mélange de phosphatases actives sur les mêmes substrats et dites pour cette raison isodynames, mais se distinguant les unes des autres par leur  $p_H$  optimum d'action. Ainsi a-t-on pu différencier quatre phospho-monoestérases, trois pyrophosphatases et, avec moins de précision, trois phospho-diestérases isodynames.

Il convient de montrer par quelques exemples les difficultés auxquelles se sont heurtés les biochimistes dans ce domaine, car la présence d'enzymes isodynames est souvent masquée par des inhibiteurs naturels ou par l'inégale stabilité de certaines phosphatases à des  $p_H$  particuliers. Ainsi, comme en rend compte l'examen des figures 1 et 2 empruntées à *Nguyen-van Thoai*<sup>5</sup>), l'extrait aqueux de divers Basidiomycètes hydrolyse les pyrophosphates au  $p_H$  optimum = 3,8—4,0, tandis que le même milieu présente, après agitation au contact de kaolin à  $p_H = 6,0$ , deux  $p_H$  optima d'action, dont celui à  $p_H$  voisin de 6,0 est en général le plus marqué. L'adsorption au kaolin d'un inhibiteur de la pyrophosphatase active au  $p_H$  optimum 6,0, en même temps que celle d'une partie de l'enzyme paraissant seul présent dans l'extrait initial, permet donc de mettre en évidence une seconde pyrophosphatase.

De même, la phospho-monoestérase des hématies de  $p_H$  optimum = 3,5 se différencie des autres enzymes isodynames par son instabilité en milieu neutre, sa destruction entraînant un décalage du  $p_H$  optimum apparent (5,2) d'une phosphatase coexistante, car la cessation de l'activité de la première à ce  $p_H$  permet alors à la seconde

<sup>1</sup>) *E. Bamann* et *W. Salzer*, *Bioch. Z.* **286**, 187 (1936); **288**, 299 (1936); *J. Courtois*, Thèse Doct. Sc. phys., Paris, 1938, 1 vol., 205 p.; *Nguyen-van Thoai*, *Bl. Soc. Chim. biol. (Trav.)* **24**, 1077 (1942); *J. Roche* et *M. Latreille*, *Enzymol.* **3**, 75 (1937); *A. Schöffner* et *E. Bauer*, *Z. physiol. Ch.* **232**, 66 (1935).

<sup>2</sup>) *E. Bamann* et *K. Diederichs*, *B.* **67**, 2019 (1934); **68**, 6 (1935).

<sup>3</sup>) *S. Munemura*, *J. Biochem.* **17**, 343 (1933).

<sup>4</sup>) *S. Belfanti*, *A. Contardi* et *A. Ercoli*, *Biochem. J.* **29**, 517, 842 et 1491 (1935).

<sup>5</sup>) *Nguyen-van Thoai*, *Bl. Soc. Chim. biol. (Trav.)* **23**, 1277 (1941).

d'assurer seule l'hydrolyse du substrat à son  $p_H$  optimum réel de 6,0—6,4<sup>1)</sup>. Ces exemples montrent que la caractérisation d'une phosphatase par un  $p_H$  optimum d'action ne peut être réalisée que sur des enzymes purifiés.

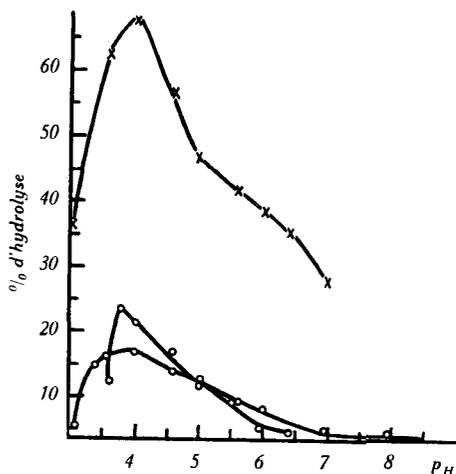


Fig. 1.

Activité pyrophosphatase d'extraits aqueux de divers Basidiomycètes en fonction du  $p_H$  du milieu (Abscisses:  $p_H$ . Ordonnées: % de substrat hydrolysé) (d'après *Nguyen-van Thoai*).

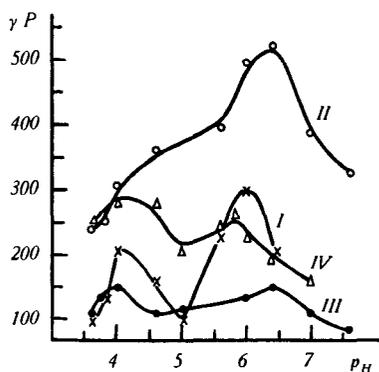


Fig. 2.

Activité pyrophosphatase d'extraits aqueux de divers Basidiomycètes après traitement par le kaolin à  $p_H = 6,0$ , en fonction du  $p_H$  du milieu (Abscisses:  $p_H$ . Ordonnées: gamma P minéral libérés) (d'après *Nguyen-van Thoai*).

Il en est de même des autres caractères mis à profit pour classer les phosphatases, dont le plus important est la *sensibilité aux effecteurs*, élément primordial de la régulation physiologique de l'activité de ces enzymes. La figure 3, empruntée à *Roche et Bullinger*<sup>2)</sup>, illustre le parti que l'on peut tirer à cet égard de l'étude d'un effecteur, en l'espèce l'ion  $Mg^{++}$ , actif sur une seule de deux phospho-monoestérases isodynames simultanément présentes.

De nombreux exemples montrent l'absolue nécessité de purifier les phosphatases pour étudier leur sensibilité aux effecteurs, dont l'action peut être affaiblie, ou même ne pas se manifester, en présence d'inhibiteurs naturels. Ainsi, l'ion  $Mg^{++}$  active très énergiquement la pyrophosphatase de  $p_H$  optimum = 7,6 purifiée par *Bailey et Webb*<sup>3)</sup> à partir des levures, tandis que son effet sur le même enzyme dans les extraits de tissus bruts est si irrégulière qu'elle est niée par de nombreux auteurs. Les multiples contradictions que l'on relève

<sup>1)</sup> *J. Roche, Nguyen-van Thoai et J. Baudouin*, *Bl. Soc. Chim. biol. (Trav.)* **24**, 1247 (1942).

<sup>2)</sup> *J. Roche et E. Bullinger*, *Enzymol.* **7**, 278 (1939).

<sup>3)</sup> *K. Bailey et E. C. Webb*, *Biochem. J.* **38**, 394 (1944).

dans les travaux consacrés aux effecteurs des phosphatases sont souvent dues à l'inégalité dans le degré de purification des enzymes étudiés et à l'existence, pour de nombreux produits actifs, de concentrations optima auxquelles certains auteurs ont négligé d'opérer; je reviendrai plus bas sur ce point.

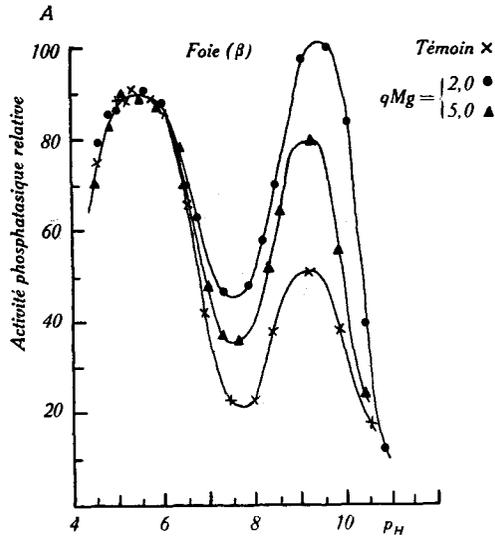


Fig. 3.

Activité phospho-monoestérasique vis-à-vis du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium d'extraits de foie de Porc en la présence ou en l'absence d'ions  $Mg^{++}$  ( $qMg = -\log [Mg]$ ) après 24 heures de dialyse contre eau distillée (Abscisses:  $p_H$ . Ordonnées: activité phosphatase relative) (d'après Roche et Bullinger).

Tenant compte de ces faits généraux et de quelques autres, il a été possible de proposer une classification provisoire des phospho-monoestérasés et des pyrophosphatases isodynames (Munemura, Folley et Kay, Roche et Courtois) que le tableau II reproduit en partie. Bien que constituant seulement une première ébauche, car elle n'a pu être établie que sur des produits d'inégale pureté, cette classification est très utile; elle permet en effet l'étude descriptive des systèmes phosphatasiques naturels. Ceux-ci sont en général complexes, en dehors des cas particuliers de la prostate, riche seulement en phospho-monoestérase II, et des os, renfermant presque exclusivement l'enzyme isodyname I.

Les cellules végétales sont la plupart du temps riches en enzymes (phospho-estérasés et pyrophosphatases) actifs en milieu acide et les cellules animales en phosphatases de  $p_H$  optimum alcalin. Aussi, étant donnée la multiplicité des phosphatases présentes, la caractérisation précise des constituants des mélanges naturels doit-elle toujours précéder la purification de chacun. L'étude sur ce plan des

systèmes phosphatasiques était il y a dix ans le principal objet des recherches. Elle a constitué une étape de la biochimie de ces enzymes aujourd'hui presque achevée et préparé l'étude des phosphatases purifiées.

Tableau II.

Classification des phospho-monoestérases isodynames

Type N°	p <sub>H</sub> opt. d'act.	Principale source	Principaux caractères dans les extraits tissulaires
I	8,6—9,4	Os, rein, Intestin, Gl. mammaire	Activation par Mg <sup>++</sup> ; Inhibition par -SH; Action préfér. sur β-glycéroph.; stabilité maxima p <sub>H</sub> = 7,5—8,5.
II	5,0—5,5	Foie, Graines, Champignonssup., Prostate	Aucune action de Mg <sup>++</sup> ; Inhibition par F <sup>-</sup> ; Action préfér. sur β-glycéroph.; stabilité max. p <sub>H</sub> = 5,0—6,0.
III	3,4—4,2	Foie, Levures hautes	Inhibition par Mg <sup>++</sup> ; Action préfér. sur β-glycéroph.; stabilité max. p <sub>H</sub> = 4,5—5,5.
IV	5,0—6,0	Hématies, Levures basses	Activation par Mg <sup>++</sup> ; Action préfér. sur α-glycéroph.; stabilité max. p <sub>H</sub> = 6,5—7,5.

B. — *Les phosphatases purifiées. Nature et propriétés de la phospho-monoestérase alcaline.*

La préparation et l'étude des enzymes purifiés relève de la chimie des protéines; aussi les méthodes propres à celle-ci ont-elles été mises en œuvre pour isoler et caractériser des phosphatases. Elles n'ont jusqu'ici donné des résultats satisfaisants que dans trois cas: ceux de la phospho-monoestérase acide (type II) de la prostate, de la phospho-monoestérase alcaline (type I) du rein et de l'intestin, et de la pyrophosphatase alcaline des levures, le second enzyme seul ayant été préparé à l'état cristallisé. L'activité des produits les plus purs, exprimée en millimolécules de substrat (β-glycérophosphate de sodium et pyrophosphate de sodium) hydrolysées par gramme d'enzyme et par minute, au p<sub>H</sub> optimum et à 37°, est égale au dédoublement de 170 millimolécules pour la phospho-monoestérase acide de la prostate obtenue par *Kutscher* et *Wörner*<sup>1)</sup>, à 140 millimolécules pour la phospho-monoestérase alcaline du rein ou de l'intestin cristallisée activée au maximum (*Nguyen-van Thoai*, *Roche* et *Sartori*<sup>2)</sup>) et à 70 millimolécules pour la pyrophosphatase alcaline des levures isolée par *Bailey* et *Webb*<sup>3)</sup>. Ces données ne sauraient être tenues pour absolues,

<sup>1)</sup> *W. Kutscher* et *A. Wörner*, *Z. physiol. Ch.* **238**, 275 (1936); **239**, 109 (1936).

<sup>2)</sup> *Nguyen-van Thoai*, *J. Roche* et *L. Sartori*, *C. r. Soc. Biol.* **138**, 47 (1944).

<sup>3)</sup> *K. Bailey* et *E. C. Webb*, *Biochem. J.* **38**, 394 (1944).

car l'activité d'un enzyme est fonction des conditions dans lesquelles elle s'exerce; elles indiquent un ordre de grandeur. Il est remarquable que celui-ci soit très voisin de l'activité d'autres enzymes considérés comme purs et participant au métabolisme des esters phosphoriques, à savoir: l'énolase et les zymohexases<sup>1</sup>).

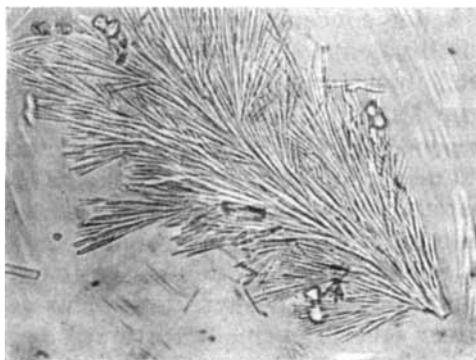


Fig. 4.

Phospho-monoestérase alcaline du rein de Bœuf cristallisée (grossissement  $\times 200$ )  
(d'après *Nguyen-van Thoai, Roche et Sartori.*)

Il n'est pas actuellement possible de préciser le degré de pureté des trois préparations retenues ici et les récents travaux de l'école anglo-américaine sur l'adsorption de l'adényl-pyrophosphatase à la myosine B cristallisée ont apporté une preuve nouvelle du fait que la cristallisation d'un produit doué d'une activité enzymatique élevée ne constitue pas à cet égard un critère absolu. Il est néanmoins probable que ces produits sont en majeure partie constitués par des phosphatases.

La phospho-monoestérase alcaline hautement purifiée ayant seule fait l'objet de travaux étendus, je me bornerai à son étude. Les préparations cristallisées douées d'une activité phospho-estérasique spécifique renferment une protéine contenant en moyenne 0,30 pour 100 de magnésium et 0,05 pour 100 de zinc. Leurs solutions présentent un spectre ultraviolet atypique, analogue à celui de nombreuses protéines; elles sont actives sur de très nombreux esters phosphoriques, mais non sur les pyrophosphates, et hydrolysent l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique plus rapidement que son isomère  $\alpha$ . Il nous est rapidement apparu que l'activité de l'enzyme diminue à la suite de cristal-

<sup>1</sup> Selon *O. Warburg et W. Christian* (Bioch. Z. **310**, 384 (1941); **311**, 208 (1942); **314**, 148 (1943), l'énolase pure des levures transforme par gramme et par minute à 37° 180 millimolécules d'acide 2-phosphoglycérique en acide phosphopyruvique et la zymohexase pure du muscle, dont l'apoenzyme a été cristallisé, dédouble 70 millimolécules d'acide fructose-diphosphorique en acides dioxycétone-phosphorique et glycérine-aldéhyde-phosphorique.

lisations successives et que l'étude de sa constitution ne pourrait être abordée qu'après celle de son activation et de sa réactivation, à laquelle nous nous sommes attachés.

Les recherches d'*Erdtmann*<sup>1)</sup>, de *Jenner* et *Kay*<sup>2)</sup> ont établi que la phospho-monoestérase alcaline de divers organes est activée par l'ion  $Mg^{++}$ , à concentration optima  $5 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-2}$  M, et il en serait de même, à des concentrations en sels métalliques diverses, pour d'autres ions divalents, entre autres  $Mn^{++}$  et  $Zn^{++}$ . Toutefois cette notion a fait l'objet de multiples controverses, particulièrement en ce qui concerne  $Mn^{++3}$ ). En fait, comme l'ont montré *Nguyen-van Thoai* et *Raymond*<sup>4)</sup>, la sensibilité des phosphatases à divers effecteurs est liée à leur degré de purification; de même leur comportement vis-à-vis des formateurs de complexes (cyanures,  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl, diéthyl-dithiocarbamate de sodium, o-phénanthroline). Il était important de préciser si divers métaux sont ou non activateurs de l'enzyme et dans quelle mesure un rôle coenzymatique leur est dévolu. Je ne puis ici que résumer très brièvement certaines des expériences que nous avons poursuivies dans ce but sur l'activation de la phosphatase par les cations divalents et sur l'effet coactivateur des acides aminés.

Après une dialyse de 15 à 20 jours à 37° contre de l'eau bidistillée, l'enzyme a perdu la plus grande partie de son pouvoir hydrolysant. Celui-ci peut alors être restauré par addition de  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$  ou  $Fe^{++}$ , chacun de ces ions présentant une activité maxima pour une concentration optima particulière à chacun, au delà de laquelle il se comporte comme un inhibiteur. En l'absence de cations, l'addition d'acides aminés, dont *Bodansky* avait signalé le faible pouvoir activateur dans les extraits bruts de tissus divers, provoque une très forte activation, variable selon la concentration en acide aminé, mais non spécifique de l'un de ces corps et dévolue également aux peptides. L'examen de la figure 5, empruntée à *Roche*, *Nguyen-van Thoai* et *Roger*<sup>5)</sup>, permet de se rendre compte de ces faits.

Nous avons cherché à inactiver totalement l'enzyme et à le réactiver afin de nous placer dans des conditions où le caractère indispensable d'une substance réactivatrice pourrait être mis en évidence et, par là, apporter d'utiles renseignements sur la nature du groupement actif de la phosphatase. Le couplage des cations divalents et d'un acide aminé, dont *Hove*, *Elvehjem* et *Hart*<sup>6)</sup> avaient signalé

<sup>1)</sup> *H. Erdtmann*, Z. physiol. Ch. **172**, 182 (1927); **177**, 211 et 231 (1928).

<sup>2)</sup> *H. D. Jenner* et *H. D. Kay*, J. Biol. Chem. **93**, 733 (1931).

<sup>3)</sup> *D. Albers*, Z. physiol. Ch. **266**, 1 (1940); *E. Bamann*, *E. Heumüller*, *H. Werner* et *A. Carl*, in Method. d. Enzymforsch. **2**, 1669 (1941); *G. Schmidt* et *S. J. Tannhäuser*, J. Biol. Chem. **149**, 369 (1943).

<sup>4)</sup> *Nguyen-van Thoai* et *J. Raymond*, C. r. Soc. Biol. **139**, 814 (1945).

<sup>5)</sup> *J. Roche*, *Nguyen-van Thoai* et *M. Roger*, Bl. Soc. Chim. biol. (Trav.), **26**, 1047 (1944).

<sup>6)</sup> *E. Hove*, *C. A. Elvehjem* et *E. B. Hart*, J. Biol. Chem. **134**, 425 (1940).

l'effet favorable dans le cas du zinc, a permis d'obtenir des résultats très significatifs, à condition de faire précéder l'addition des sels métalliques, à concentration optimale, d'une incubation de 2 heures à  $p_H = 8,8$  en présence d'un acide aminé. On trouvera un exemple des résultats que nous avons obtenus présenté dans le tableau III<sup>1)</sup>.

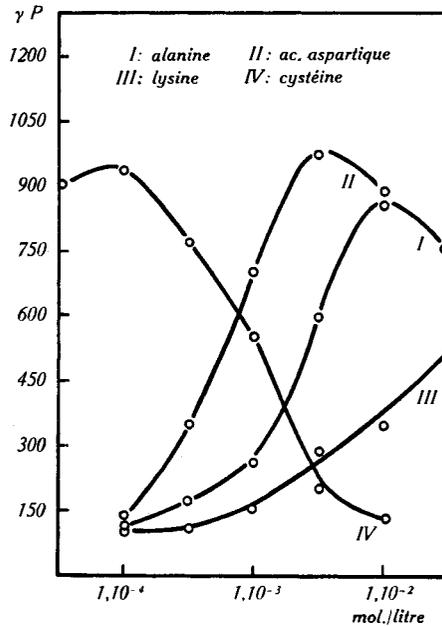


Fig. 5.

Activation de la phospho-monoestérase alcaline purifiée de l'intestin de Chien par divers acides aminés (préparation enzymatique dialysée 15 jours à 37° contre de l'eau bidistillée; substrat:  $\beta$ -glycérophosphate de sodium). (Abscisses: concentration moléculaire en acide aminé. Ordonnées: gamma de P minéral libérés) (d'après Roche, Nguyen-van Thoai et Roger).

La nécessité d'une incubation en présence d'alanine pour que celle-ci exerce son effet maximum de coactivation vis-à-vis du métal relève sans doute de causes multiples, dont les deux plus importantes nous paraissent être la lenteur de la formation des complexes de l'acide aminé et du métal encore fixé à l'apoenzyme malgré la dialyse prolongée (30 à 40 p. 100 environ) et l'action du même corps sur la réversion de la dénaturation de l'apoenzyme. De toute manière, pareil fait n'est pas exceptionnel dans les réactivations enzymatiques, à telle enseigne que les auteurs anglo-saxons désignent des processus de cette nature sous le nom de «time reaction»<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Nguyen-van Thoai, J. Roche et M. Roger, C. r. **222**, 246 (1946).

<sup>2)</sup> La réactivation de la leucylpeptidase intestinale par l'ion  $Mn^{++}$  exige 24 heures d'incubation en présence de celui-ci (E. L. Smith et M. Bergmann, J. Biol. Chem. **153**, 627 (1944)).

Tableau III.

Réactivation de la phosphatase alcaline (intestin de Chien) après inactivation *totale* par dialyse (21 jours à 37°) contre de l'eau bidistillée (Action à  $p_H = 8,8$  et à 37° sur le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium). Effecteurs ajoutés: *d,l*-alanine  $1 \times 10^{-2}$  M (avec ou sans incubation à  $p_H = 8,8$  et à 37° pendant 2 heures) et cations divers.

Résultats exprimés en gamma P libéré/min./mgr. N protéique.

Sel métallique ajouté	Concentration moléculaire en sel	Activité (gamma P) libéré/minute/mgr. N protéique
Série I: en présence d'alanine, mais sans incubation préalable avec celle-ci		
Néant . . . . .	0	0
SO <sub>4</sub> Fe . . . . .	$1 \times 10^{-7}$	0
	$1 \times 10^{-6}$	0
SO <sub>4</sub> Zn . . . . .	$1 \times 10^{-7}$	0
	$1 \times 10^{-6}$	0
SO <sub>4</sub> Mn . . . . .	$1 \times 10^{-3}$	721
	$1 \times 10^{-2}$	981
(CH <sub>3</sub> ·COO) <sub>2</sub> Ca .	$1 \times 10^{-3}$	0
	$1 \times 10^{-2}$	0
(CH <sub>3</sub> ·COO) <sub>2</sub> Mg .	$1 \times 10^{-2}$	288
	$5 \times 10^{-2}$	1.154
	$1 \times 10^{-1}$	1.685
Série II: incubation en présence d'alanine, suivie de l'addition de sels métalliques		
Néant . . . . .	0	5.461
SO <sub>4</sub> Fe . . . . .	$1 \times 10^{-7}$	14.231
	$1 \times 10^{-6}$	13.261
SO <sub>4</sub> Zn . . . . .	$1 \times 10^{-7}$	14.231
	$1 \times 10^{-6}$	13.261
SO <sub>4</sub> Mn . . . . .	$1 \times 10^{-3}$	15.385
	$1 \times 10^{-2}$	13.846
(CH <sub>3</sub> ·COO) <sub>2</sub> Ca .	$1 \times 10^{-3}$	14.231
	$1 \times 10^{-2}$	16.364
(CH <sub>3</sub> ·COO) <sub>2</sub> Mg .	$1 \times 10^{-2}$	18.654
	$5 \times 10^{-2}$	21.154
	$1 \times 10^{-1}$	21.154
Activité de la préparation initiale, sans incubation ni effecteur: 3.326.		
Activité de la préparation dialysée et incubée 2 heures à $p_H = 8,8$ et à 37° sans effecteur: 426.		

On peut, en se basant sur ces observations, essayer de se représenter la constitution du groupement actif de la phosphatase alcaline, ou tout au moins discuter certaines hypothèses faites à son sujet. *Albers* et ses collaborateurs<sup>1)</sup> pensent avoir dissocié les phospho-mono-

<sup>1)</sup> *H. Albers, E. Beyer, A. Bohnenkamp et G. Müller, B. 71, 1913 (1938).*

estérases I et II en un coenzyme organique diffusible et un apoenzyme protéique. L'exactitude de leurs observations est incontestable; nous les avons reproduites et étendues à l'enzyme isodyname du type III. De même les expériences que ces auteurs considèrent comme démontrant le « transport » d'une cophosphatase sur les diverses apophosphatases. Néanmoins, aucune preuve formelle n'a été apportée de la nature coenzymatique des produits actifs, lesquels peuvent n'être que des effecteurs. Ici encore, la nécessité de reprendre les expériences d'*Albers* et de ses collaborateurs sur des produits purifiés s'impose. En l'état actuel des choses, c'est avant tout sur le rôle d'un métal dans la constitution de la phospho-monoestérase alcaline que peut porter la discussion. L'*interchangeabilité des cations réactivateurs* et l'*efficacité de leur couplage avec un acide aminé* sont à cet égard des faits importants.

L'opinion que la phospho-monoestérase alcaline des organes animaux est une métalloprotéine est généralement admise; mais la nature de son constituant inorganique demeure mal définie, l'enzyme renfermant pour les uns du magnésium, pour d'autres du zinc, du cobalt, du manganèse, du fer, du calcium. Une théorie (*Cloetens*<sup>1)</sup>) paraissant reposer sur une interprétation incertaine de résultats expérimentaux (élimination incomplète de formateurs de complexe) prévoit même que la phosphatase alcaline renferme deux constituants métalliques associés. La diversité des caractères de cet enzyme dans les extraits bruts de différents organes a été parfois rattachée à la diversité de son constituant métallique, lequel serait l'un ou l'autre métal divalent dans chaque cas particulier. En fait, il ne paraît pas y avoir de spécificité de l'élément minéral présent; celui-ci est très probablement le magnésium et, accessoirement, le zinc dans la nature<sup>2)</sup>. L'interchangeabilité expérimentale du métal est peu favorable à l'hypothèse lui attribuant un rôle de coferment catalytiquement actif et, par ailleurs, les acides aminés participent aux processus activateurs à l'état de complexes métalliques. Ils paraissent ne pas jouer seulement le rôle de « régulateurs de concentration » du métal actif que leur attribuent *Warburg* et *Christian* dans le cas de la reconstitution de la zymohecase de levure, mais permettre celle du groupement actif de la phospho-monoestérase, soit en orientant le métal vers les radicaux de l'apoenzyme auxquels il s'unit (rôle de « transport »), soit en participant à la formation d'un complexe mixte: apoenzyme-métal-acide aminé.

Malgré l'imprécision dans laquelle il convient encore de demeurer sur bien des points, la phospho-monoestérase alcaline des organes animaux doit dès maintenant être considérée comme un enzyme à

<sup>1)</sup> *R. Cloetens*, *Bioch. Z.* **307**, 352 (1941); **308**, 37 (1941); **310**, 42 (1941).

<sup>2)</sup> *L. Massart* et *L. Vandendriessche*, *Enzymol.* **11**, 261 (1945).

métal dissociable, la plupart du temps magnésien et parfois zincique, dont l'activité n'est liée à la présence d'un métal que dans la mesure où celui-ci est un *élément de structure* du complexe organique porteur du groupement actif. On ne peut donc pas, en l'état actuel de nos connaissances, admettre qu'un métal est le cofacteur de la phosphatase alcaline. Il en est à cet égard de la phospho-monoestérase alcaline comme d'autres enzymes à métal dissociable, tels que la carboxylase (*Kubowitz et Lüttgens; Green, Herbert et Subrahmanyan*), la leucylpeptidase (*Berger et Johnson*) dans lesquels le constituant minéral «serait un pont chimique entre l'apoenzyme et le coenzyme»<sup>1</sup>). Dans le cas particulier, il est possible que la phosphatase ne renferme pas de coenzyme dissociable et que l'activité enzymatique soit liée à la coordination en un complexe métallique de divers radicaux de l'apoenzyme.

C. — *Quelques aspects biologiques de l'activité des phosphatases.*

Le rôle biologique des phosphatases est nécessairement fonction de la régulation cellulaire de leur activité et des conditions dans lesquelles celle-ci s'exerce. Je terminerai cet exposé en résumant quelques résultats obtenus dans l'étude de deux problèmes s'y rattachant, à savoir: la synthèse enzymatique des esters phosphoriques et des pyrophosphates en dehors de réactions couplées et le mécanisme du rôle de la phosphatase des os dans la calcification du squelette.

La réversibilité de l'action des phospho-monoestérases *in vitro* a été depuis longtemps établie par *Kay*<sup>2</sup>) et par *Courtois*<sup>3</sup>). Or, l'étude de la synthèse enzymatique des esters phosphoriques par diverses préparations intestinales ou rénales montre que, dans l'ensemble, la purification des phosphatases diminue leur pouvoir synthétisant, en sorte que l'on devait se demander si celui-ci n'est pas en partie fonction de la présence d'effecteurs. Avec *Nguyen-van Thoai et Danzas*<sup>4</sup>), j'ai pu séparer des «activateurs de synthèse», très labiles et constitués probablement par des peptides, susceptibles d'accélérer la vitesse de la formation des esters beaucoup plus que leur hydrolyse. De tels activateurs sont très rapidement décomposés au cours de l'autolyse des tissus. Leur addition aux préparations enzymatiques qui en sont dépourvues fait réapparaître une intense activité synthétisante, sans modifier l'équilibre final des constituants du système. Nous avons pu séparer celui favorisant la synthèse des monoesters phosphoriques de

<sup>1</sup>) *G. Berger et J. M. Johnson*, *J. Biol. Chem.* **130**, 641 et 645 (1939); **133**, 157 (1940); *D. E. Green, D. Herbert et V. Subrahmanyan*, *J. Biol. Chem.* **135**, 195 (1940); **138**, 327 (1941).

<sup>2</sup>) *H. D. Kay*, *Physiol. Rev.* **12**, 384 (1932).

<sup>3</sup>) *J. Courtois*, Thèse Doct. Sc. phys., Paris, 1938, 1 vol., 205 p.

<sup>4</sup>) *Nguyen-van Thoai, J. Roche et E. Danzas*, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **26**, 1139 (1944); **27**, 599 (1945).

celui actif sur la formation des pyrophosphates et l'on trouvera dans la figure 6 les résultats d'une expérience illustrant les effets du dernier. Comme le montre l'examen de cette figure, la préparation intestinale non dialysée (extraction aqueuse de 15 minutes de muqueuse de chien) renfermant la pyrophosphatase et son activateur naturel, mise en présence d'une solution saturée de phosphate disodique catalyse la formation de pyrophosphates (isolés à l'état pur dans nos essais) jusqu'à atteinte d'un équilibre. Après dialyse, elle devient pratiquement inapte à cette synthèse et l'addition de l'activateur séparé du dialysat par précipitation à l'acétone ou à l'acétate neutre de plomb fait réapparaître l'activité initiale en ce qui concerne la formation des pyrophosphates.

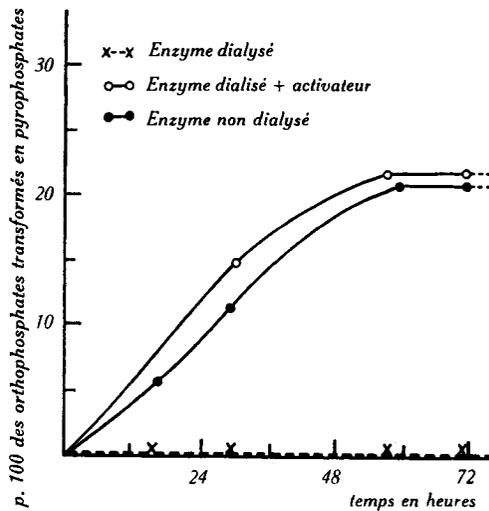


Fig. 6.

Synthèse de pyrophosphates à partir d'orthophosphate disodique par la pyrophosphatase alcaline de l'intestin de Chien brute (•), dialysée 3 jours à 37° (x), ou dialysée et additionnée de l'activateur naturel (o). (Abscisses: temps en heures. Ordonnées: p. 100 des orthophosphates transformés en pyrophosphates) (d'après *Nguyen-van Thoai, Roche et Danzas*).

La préparation d'activateurs de ce type a été mise à profit pour réaliser la phosphorylation de divers corps, en particulier celle de l'amidon et du glycogène, par la phospho-monoestérase alcaline (obtention d'amidons phosphorylés à 1,5 p. 100 P et de glycogène phosphorylé à 2,5 p. 100 P). Ces effecteurs d'un type nouveau sont à coup sûr importants du point de vue physiologique. Leur existence n'est d'ailleurs pas particulière aux phosphatases, car nous avons pu en caractériser un autre propre à la  $\beta$ -glucosidase.

Les incidences biologiques de l'étude des phosphatases s'étendent aussi à d'autres domaines, dans lesquels la mesure précise de leur

activité apporte des données permettant d'expliquer le mécanisme de processus physiologiques divers. Les recherches poursuivies sur l'action d'une phosphatase dans l'ossification sont à cet égard significatives. Un très important ensemble d'observations, faites par *Robison* et ses élèves, indiquait la participation de cet enzyme à la formation du phosphate tricalcique au niveau des os<sup>1)</sup>, mais seule l'étude quantitative de celle-ci sur des coupes d'os en croissance, réalisée par *Roche* et *Deltour*<sup>2)</sup>, a donné une représentation précise de son mode d'action.

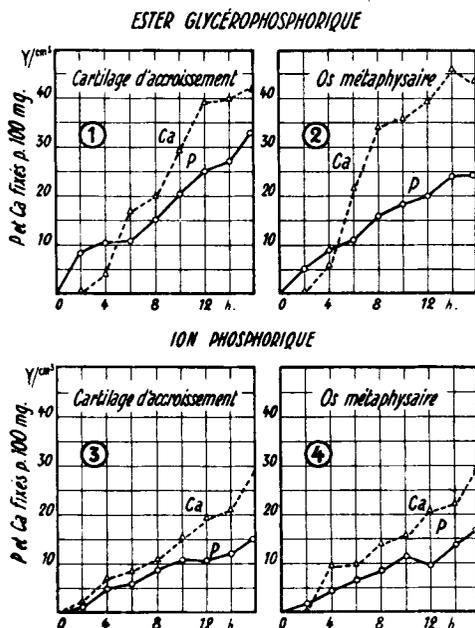


Fig. 7.

Fixation par des coupes de cartilage d'accroissement ou d'os métaphysaire (veau) de Ca et de P apportés par du chlorure de calcium et soit du phosphate disodique, soit du glycérophosphate de sodium ( $\beta$ ) à  $p_H = 7,3$  et à  $37^\circ$ . Quantités d'éléments minéralisateurs présents par 100  $cm^3$  de liquide nutritif: 10 mgr. Ca et 5 mgr. P minéral ou organique. (Abscisses: temps en heures. Ordonnées: gamma P et Ca fixés par  $cm^3$  et par 100 mgr. de tissu) (d'après *Roche* et *Deltour*).

Comme le montre l'examen de la figure 7, la fixation de phosphore par le tissu osseux en voie de formation est notablement plus élevée, à concentrations initiales égales du liquide nutritif en phosphore total, si cet élément est apporté par un ester plutôt que par des phosphates minéraux, donc libéré à l'état d'ions phosphoriques au niveau des ostéoblastes sécrétant la phosphatase. Parallèlement, la fixation du

<sup>1)</sup> *R. Robison*, The significance of phosphoric esters in metabolism, 1 vol., 104 p., New-York, Univ. Press éd. (1933).

<sup>2)</sup> *J. Roche* et *G. H. Deltour*, Bl. Soc. Chim. biol. (Trav.) **25**, 1260 (1943).

calcium est beaucoup plus forte en présence de glycérophosphates que de phosphates. Il en découle que la mise en liberté d'ions phosphoriques au niveau des territoires où évolue la calcification provoque vers ceux-ci un véritable drainage des ions calcium présents dans les humeurs. Dès lors le rôle physiologique de l'enzyme apparaît comme celui d'un agent de concentration locale en ions phosphoriques dans les os, concentration grâce à laquelle s'opère un appel des ions calcium des humeurs et, secondairement, la précipitation d'un phosphate de calcium insoluble, régie par le produit de solubilité de ces ions.

Ce rapide exposé montre la diversité des domaines auxquels s'étend la biochimie des phosphatases et les nombreux problèmes que pose son étude. La description des systèmes phosphatasiques naturels est aujourd'hui très avancée, mais la connaissance des phosphatases en tant que molécules chimiquement définies est à peine ébauchée. C'est dire quelle importance revêt la préparation de phosphatases pures, qui doit être le plus immédiat des buts qu'il convient de chercher à atteindre. Mais l'étude du mécanisme d'action des phosphatases dans de nombreux processus physiologiques conserve aussi un grand intérêt, car elle permettra sans doute d'expliquer les modalités de la formation des phosphates au niveau du rein, de la glande mammaire, et celles de nombreuses réactions phosphorylantes indépendantes de processus couplés (transphosphorylation, actions de la phosphorylase, de la myokinase). Aussi la biochimie des phosphatases se développe-t-elle sans cesse, offrant à la sagacité des chercheurs un champ d'action vaste et fécond.

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine  
et de Pharmacie, 92, Rue Auguste Blanqui, Marseille.

---

### 155. Etude sur le potentiel d'oxydo-réduction.

#### Limite de croissance des bactéries anaérobies

par E. Aubel, A. J. Rosenberg et M. Grünberg.

(25 V 46)

Il a été montré dans une série de travaux<sup>1)</sup> sur *Clostridium Saccharobutyricum* et *Clostridium Sporogenes*, qui sont des anaérobies stricts, que l'oxygène n'entrave pas la dégradation des métabolites, donc que la libération de l'énergie nécessaire à l'entretien de la

---

<sup>1)</sup> E. Aubel et J. Houget, C. r. **209**, 259 (1939), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 488 (1945); E. Aubel et E. Perdigon, C. r. **211**, 439 (1940), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 498 (1945); E. Aubel, A. Rosenberg et N. de Chezelles, Bl. Soc. Chim. biol. (trav.) **25**, 1152 (1943), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 502 (1945).