

Dans ce cas, la méthode photométrique manifeste un avantage indéniable. En effet, l'opacification du plasma du lapin normal citraté, puis recalifié à l'instant origine commence entre la 6^e et la 8^e minute et cesse de croître entre la 14^e et la 20^e minute, si les mesures sont effectuées, comme nous l'avons déjà préconisé, à $20^{\circ} \pm 2^{\circ}$ et sur du plasma dilué finalement à 1/5¹). Pratiquement, les mesures sont prises de 30 en 30 secondes à l'électrophotomètre de l'un de nous (P.M.) en lumière orangée, dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, plongée elle-même dans une grande cuve à courant d'eau assurant la constance de la température. Dans les mêmes conditions, l'opacification s'échelonne entre 20 et 40 min. environ, pour une teneur en prothrombine de 50 à 60% de la normale. Voir les courbes représentatives (figures 1 et 2).

Laboratoires de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris et de Recherches des *Etablissements Roussel* à Paris.

160. Recherches sur la phytase

par Paul Fleury et Jean Courtois.

(12 VI 46)

C'est en utilisant la phytine comme substrat que *Suzuki-Yoshimura* et *Takaishi*²⁾ décelèrent pour la première fois une activité phosphatasique. Il est à ce propos curieux de constater que la phytine est sans doute l'ester phosphorique naturel le plus difficilement hydrolysable par les phosphatases.

L'enzyme qui dédouble les inositohexaphosphates a été dénommé phytase; c'est la moins répandue et la plus mal connue des diverses phosphatases plus ou moins spécifiques.

Dans l'ouvrage général d'enzymologie: *Die Methoden der Fermentforschung*, l'article consacré à la phytase est l'un des chapitres les plus courts de cet ouvrage; il fut confié au chimiste suisse *T. Posternak*³⁾ qui concluait ainsi «Das heutige Wissen über die Phytase ist ziemlich beschränkt und kann nicht mit dem verglichen werden, was man über andere Fermente gesammelt hat» et «Eine eingehende Untersuchung dieser Frage wäre sehr zu wünschen».

Les recherches sur la phytase sont en effet assez disparates; le plus souvent cet enzyme a été étudié incidemment au cours de recherches générales sur les phosphatases. Quelques faits caractéristiques se dégagent cependant de ces divers résultats: en premier lieu il n'existe pas de parallélisme entre les activités glycérophosphatasique et pyrophosphatasique d'une part et l'activité phytasique d'autre part. C'est ce que l'on observe en particulier avec de nom-

¹⁾ cf. ⁴⁾ p. 1295.

²⁾ *V. Suzuki, K. Yoshimura, et M. Takaishi*, Tokio Imp. Univ. Coll. Agric. Bull. 7, 503 (1907).

³⁾ *T. Posternak*, Phytase, p. 1681—1684, in «*Die Methoden der Fermentforschung*», Leipzig 1941.

breuses préparations fermentaires de graines, *P. Fleury* et *J. Courtois*¹⁾.

En second lieu, toutes les préparations diastasiques étudiées qui dédoublaient les inositohexaphosphates (I) ont également hydrolysé les glycérophosphates (G). Il existe par contre un certain nombre de préparations diastasiques très actives sur G et pratiquement sans action sur I: rein — muscle, *Mac Collum* et *Hart*²⁾; intestin, *Plimmer*³⁾; os, *Patwardhan*⁴⁾; érythrocytes et plasma de Mammifères, *Rapoport*, *Leva* et *Guest*⁵⁾; urine humaine, *Courtois* et *Biget*⁶⁾; phosphatases alcalines I du foie, du rein, de l'os, phosphatases acides II des feuilles et graines d'Amandier, du foie et du rein du Rat, *Courtois*⁷⁾.

Les sons de Céréales et celui du Blé en particulier renferment des phytases très actives; c'est ainsi qu'à p_H 5,2 une macération de son de blé hydrolyse plus rapidement I que G à la même concentration moléculaire en acide phosphorique estérifié.

Nous nous sommes proposés d'étudier l'hydrolyse de ces deux substrats par le son de blé. Pour la clarté de l'exposé nous dénommerons *phytase* l'enzyme hydrolysant l'inositohexaphosphate de sodium (I) et *phosphatase*, l'enzyme dédoublant le β -glycérophosphate de sodium (G); ceci sans préjuger de l'identité ou de la non-identité des deux enzymes.

On peut faire diverses hypothèses pour tenter d'interpréter l'action du son de blé sur ces deux substrats:

1) Le son renfermerait un activateur susceptible de conférer à la phosphatase une activité phytasique. Cette hypothèse semble devoir être écartée. En effet, *J. Courtois* (l. c.) a observé qu'un extrait de son de blé chauffé à 100°, et dont la phytase est inactivée, mélangé à de l'émulsine d'amandes active sur G et inactive sur I ne la rend pas capable de dédoubler I. 20 cm³ de macération de son de blé à 2 pour cent libèrent en 24 heures la même quantité d'acide phosphorique que 20 cm³ de cette même macération additionnée de 15 cm³ de solution d'émulsine à 1 pour cent, dans les mêmes conditions. Les préparations de son ne paraissent donc pas renfermer de substance activatrice susceptible de conférer à une phosphatase une activité phytasique.

2) La phytase serait un enzyme spécifique des inosito-phosphates et par conséquent sans action sur d'autres monoesters phosphoriques.

3) La phytase se comporterait comme une phosphatase à champ d'action très étendu, une sorte de «superphosphatase» que nous proposerons de dénommer *phytophosphatase*; la phytophosphatase dé-

1) *P. Fleury* et *J. Courtois*, *Enzymol.* **1**, 377 (1937).

2) *E. Mac Collum* et *E. Hart*, *J. Biol. Chem.* **4**, 497 (1908).

3) *R. H. Plimmer*, *Biochem. J.* **7**, 43 (1913).

4) *V. N. Patwardhan*, *Biochem. J.* **31**, 560 (1937).

5) *S. Rapoport*, *E. Leva* et *G. Guest*, *J. Biol. Chem.* **139**, 62 (1941).

6) *J. Courtois* et *P. Biget*, *Bl. Soc. Chim. biol.* **25**, 103 (1943).

7) *J. Courtois*, *Bl. Soc. Chim. biol.* **27**, 411 (1945).

doublerait à la fois les inositolphosphates qui ne sont pas attaqués par les phosphatases ordinaires et de plus d'autres monoesters phosphoriques, substrats usuels des phosphatases, G en particulier.

Nos résultats sont en faveur de cette dernière conception. Tous les faits observés, en effet, peuvent s'interpréter comme si le son de blé renfermait en même temps une phytophosphatase très active susceptible d'hydrolyser à la fois G et I et une seconde phosphatase banale, moins active, dédoublant G, mais sans action sur I.

Nous avons tout d'abord étudié les cinétiques d'hydrolyse de G et I¹⁾.

Les p_H optima d'hydrolyse des deux substrats sont placés au voisinage de 5,0—5,5, il est ainsi possible de classer ces phosphatases dans le groupe II, *Roche et Courtois*²⁾.

De p_H 3,6 à 5,2, G est dédoublé plus rapidement que I, de p_H 5,0 à 6,0, I est par contre hydrolysé deux fois plus rapidement que G. Ces faits sont en faveur de l'existence de deux enzymes distincts dans le son.

Si l'on oppose à une dose constante d'enzyme des quantités croissantes de substrat, nous pouvons constater que l'enzyme présente une plus forte affinité pour I que pour G³⁾.

Cette différence d'affinité entraîne comme conséquence, dans le cas où les deux substrats seraient transformés par un seul et même enzyme, que I soit dédoublé de préférence à G.

Par suite, dans un mélange de G et I, I devrait être dédoublé de préférence à G, au cas où le même enzyme transforme ces deux substrats.

Nous avons alors opposé à une dose constante de préparation diastasiqne des proportions variables de G et I soit seuls, soit mélangés; nous avons apprécié l'hydrolyse de chacun des substrats en dosant d'une part l'acide phosphorique libéré et d'autre part les fonctions α glycol libérées par l'hydrolyse et qui sont oxydables en aldéhydes par l'acide periodique. L'hydrolyse de G est nettement ralentie en présence de I, tandis que la présence de G ne provoque qu'une faible diminution de l'hydrolyse de I. Tout se passe donc comme si le son renfermait une phytophosphatase agissant à la fois sur I et G; cependant certaines particularités de la réaction nous ont suggéré l'intervention possible d'un second enzyme: une phosphatase hydrolysant seulement G. Cette suggestion s'est trouvée appuyée par l'étude de l'action de certains effecteurs chimiques. Le fluorure de sodium inhibe très nettement l'hydrolyse de I et G, mais les modalités de l'inhibition sont légèrement distinctes. Le molybdate de sodium, qui est un inhibiteur assez spécifique des phosphatases actives en milieu acide, *Courtois et Bossard*⁴⁾, inhibe d'une façon à peine plus marquée l'hydrolyse de G que celle de I.

1) *P. Fleury et J. Courtois*, Intern. J. Biochem. Biophys. 1 (1946), à l'impression.

2) *J. Roche et J. Courtois*, Exposés annuels de Biochimie Médicale 4, 219 (1943).

3) L'affinité K_M est l'inverse de la constante de dissociation moléculaire K_m de la combinaison enzyme-substrat (constante de *Michaelis*).

4) *J. Courtois et M. Bossard*, Bl. Soc. Chim. biol. 26, 464 (1944).

Enfin le sulfocyanate d'ammonium, activateur de certaines phosphatases, accélère faiblement l'hydrolyse de G en demeurant sans effet sur celle de I, *Courtois et Bossard*¹⁾.

L'inactivation par un milieu fortement acide ou faiblement alcalin provoque des variations des activités phytasique et phosphatasique nettement distinctes. Enfin, nous avons tenté de les séparer par inactivation thermique sélective. La préparation de son chauffée 5 minutes à 75° ne conserve que 2 pour cent de son activité initiale sur I, contre 20 pour 100 de son activité initiale sur G. Après chauffage à 80° elle est sans action sur I et conserve 3 pour cent de son activité initiale, sur G.

Il est vraisemblable d'admettre que la phosphatase est un peu plus thermostable que la phytosphatase associée. Le relargage par le sulfate d'ammonium a permis à l'un de nous d'obtenir à partir du son de blé une préparation fermentaire qui paraît dépourvue de phosphatase active exclusivement sur G. Avec cet échantillon, que nous considérons comme renfermant presque exclusivement la phytosphatase, les activités vis-à-vis de G et I disparaissent simultanément après chauffage de cinq minutes un peu au-dessus de 76°.

Par ailleurs, l'un de nous, en collaboration avec Mlle *Longchamp*²⁾, a étudié l'inactivation thermique de phytases et phosphatases d'autres graines.

Il n'a pas été possible d'inactiver par chauffage la phosphatase du Pavot ou celle de la Moutarde-blanche sans inactiver parallèlement la phytase.

*J. Courtois*³⁾ a appliqué au son de blé les principales méthodes de fractionnement des enzymes en utilisant les techniques de précipitation et d'adsorption.

a) *Relargage par les solutions salines.* Le sulfate d'ammonium à 33 pour cent de saturation ou le sulfate de magnésium à 50 pour cent de saturation précipitent une fraction hydrolysant lentement G et presque dépourvue d'activité sur I. Cette fraction paraît contenir principalement la phosphatase banale.

Après élimination de ces relargats, le sulfate d'ammonium à 66 pour cent de saturation ou le sulfate de magnésium à saturation précipitent un enzyme très actif qui hydrolyse I plus rapidement que G.

Cette préparation a les caractères d'une phytosphatase, des relargages fractionnés par le sulfate d'ammonium ou des précipitations fractionnées par l'acétone n'ont jamais permis d'obtenir d'échantillons actifs sur un seul des deux substrats.

b) *Purification par adsorption.* Certaines des préparations purifiées ainsi obtenues furent soumises à l'action d'adsorbants. La phosphatase et la phytase se sont toujours comportées de la même façon vis-à-vis de ces derniers; elles sont assez facilement fixées sur la terre d'infusoires, plus difficilement retenues par le Kaolin Tonsil, très médiocrement adsorbées sur l'alumine Cy et pas du tout sur l'alumine en poudre pour chromatographie.

Après adsorption, la phytase et la phosphatase sont éluées d'une façon identique soit par une solution d'inositohexaphosphate de sodium soit par une solution ammoniacale de chlorure d'ammonium.

1) *J. Courtois et M. Bossard*, Bl. Soc. Chim. biol. 27, 406 (1945).

2) *J. Courtois et Mlle Longchamp*, Recherches inédites.

3) *J. Courtois*, Intern. Biochem. Biophys. I, (1946), à l'impression.

Des adsorptions et élutions successives n'ont jamais modifié de façon appréciable le rapport des activités vis-à-vis de G et I.

Enfin, au cours de la conservation des solutions de certaines de ces préparations, les activités vis-à-vis de G et I décroissent d'une façon parallèle.

Dans l'ensemble, les 57 préparations diastasiques obtenues par des procédés différents à partir du son ont toujours hydrolysé à la fois G et I. 41 préparations se comportent comme la macération de son et hydrolysent I plus rapidement que G; toutes les préparations à action rapide font partie de ce groupe. 8 préparations hydrolysent les deux substrats à des vitesses sensiblement identiques; 8 autres préparations, d'activité assez faible, hydrolysent G plus rapidement que I.

En résumé, les faits rassemblés ci-dessus nous amènent à conclure que tout se passe comme si le son renfermait à la fois une phytosphatase susceptible d'hydrolyser G et I et une phosphatase banale, moins active, dédoublant G à l'exclusion de I.

Mais, l'étude de la phytase nous a conduit à soulever un autre problème: les préparations phosphatasiques sans action sur l'inositohexaphosphate sont-elles susceptibles d'hydrolyser les inositolphosphates moins riches en phosphore que I?

*Courtois*¹⁾ a observé qu'après hydrolyse sulfurique ou diastatique partielle de I, certaines phosphatases, en particulier l'émulsine d'amandes, deviennent capables d'hydrolyser les esters phosphoriques de l'inositol, étapes intermédiaires de l'hydrolyse de I. L'un de nous avec *Joseph*²⁾ a étudié l'action de diverses préparations fermentaires sur deux inositolphosphates: 1) L'inositopentaphosphate, extrait des germes de blé par la technique de *Posternak*³⁾ est vraisemblablement un mélange équimoléculaire d'inositohexaphosphate et d'inositotétraphosphate. Ce produit est hydrolysé par la macération de son, mais n'est pas attaqué par l'émulsine d'amandes ou la Takadiastase, également inactives sur I. 2) L'inositotriphosphate a été séparé des produits d'hydrolyse phytasique partielle de l'hexaphosphate, *Posternak* (l. c.): Il est dédoublé par l'émulsine et la Takadiastase; par contre, diverses préparations phosphatasiques d'origine animale (os — rein — foie — cœur) demeurent sans action sur l'inositotriphosphate. Cette étude du comportement vis-à-vis des phosphatases de ces divers esters phosphoriques de l'inositol n'est qu'amorcée, mais on peut penser, d'après les premiers résultats, qu'elle permettra d'éclairer la question de la spécificité de la phytosphatase.

Paris, Laboratoire de Chimie biologique
de la Faculté de Pharmacie.

1) *J. Courtois*, Bl. Soc. Chim. biol. **27**, 411 (1945).

2) *J. Courtois* et *G. Joseph*, Recherches inédites.

3) *T. Posternak*, Helv. **12**, 1174 (1929).