

153. Sur les enzymes amylolytiques XII¹⁾.

Absence d'inositol dans l' α -amylase

par Ed. H. Fischer²⁾ et P. Bernfeld.

(25 III 49)

Au cours d'une précédente communication sur la stabilité et la désactivation de l' α -amylase de pancréas de porc³⁾, nous avons montré que cet enzyme est accompagné, dans l'extrait brut, d'un ferment protéolytique qui le désactive irréversiblement par scission hydrolytique. Il faut au moins recristalliser l'enzyme pour le débarrasser de cette impureté.

Nous avons montré en outre que l' α -amylase de pancréas de porc impure contient une substance stabilisatrice, thermostable et dialysable. Celle-ci n'est pas un co-enzyme, n'étant nullement nécessaire à l'activité amylolytique, mais elle empêche la désactivation provoquée par l'enzyme protéolytique. Ces deux substances sont donc antagonistes.

En 1944, *Williams* et coll.⁴⁾ montrent qu'une préparation partiellement purifiée d'amylase de pancréas de porc contient du méso-inositol en quantité équimoléculaire et admettent que cette substance est un constituant de l'enzyme. Dernièrement, *Lane* et *Williams*⁵⁾ trouvent que l'amylase est désactivée par le γ -hexachlorocyclohexane. Cette désactivation résulterait du déplacement de l'inositol par le γ -hexachlorocyclohexane. Un excès d'inositol empêche cette désactivation en favorisant la réaction inverse: il y aurait donc antagonisme. Ils concluent que l'inositol est nécessaire à l'activité de l' α -amylase de pancréas de porc.

Comme on le sait, des enzymes même cristallisés peuvent encore contenir des impuretés. Nous avons donc jugé nécessaire de reprendre les travaux de *Williams* en les effectuant avec des enzymes purs.

Recherche de l'inositol dans les α -amylases animales.

Les α -amylases de pancréas de porc⁶⁾ et de salive humaine⁷⁾ deux fois recristallisées, ont été hydrolysées par CH selon *Woolley*⁸⁾, puis

¹⁾ XIe communication, Helv. **31**, 2165 (1948).

²⁾ Boursier de la « Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie ».

³⁾ *Ed. H. Fischer* et *P. Bernfeld*, Helv. **31**, 1839 (1948).

⁴⁾ *R. J. Williams*, *F. Schlenk* et *M. A. Eppright*, Am. Soc. **66**, 896 (1944).

⁵⁾ *R. J. Williams* et *R. L. Lane*, Arch. Biochem. **19**, 329 (1948).

⁶⁾ *Ed. H. Fischer* et *P. Bernfeld*, Helv. **31**, 1831 (1948).

⁷⁾ *K. H. Meyer*, *Ed. H. Fischer*, *A. Staub* et *P. Bernfeld*, Helv. **31**, 2158 (1948).

⁸⁾ *D. W. Woolley*, J. Biol. Chem. **140**, 453 (1941).

examinées quant à leur teneur en inositol. Les dosages ont été effectués par voie microbiologique sur un mutant de *Neurospora crassa*¹⁾ par M. W. H. Schopfer²⁾ à l'Institut de Botanique de l'Université de Berne. Aucune trace d'inositol n'a pu être mise en évidence dans des prises de 20 mg de protéine alors que la méthode permet de déceler avec certitude 5 γ de ce facteur. Il en résulte qu'il y a certainement moins d'une mole d'inositol pour 20 moles d'enzyme (p.mol. = 45 000)³⁾: l'inositol ne fait donc pas partie intégrante de ces amylases animales.

Seul le fait d'avoir travaillé avec un enzyme imparfaitement purifié peut expliquer les résultats de *Williams*. Nous avons en effet trouvé de l'inositol dans le pancréas, et nous avons vu qu'il pouvait accompagner l'amylase dans les premiers stades de sa purification.

Influence de l'inositol sur l'activité amylatique.

L'inositol ne possède aucune action sur l'activité de l' α -amylase de pancréas de porc.

Influence de l'inositol sur la stabilité de l' α -amylase.

Comme nous l'avons précédemment écrit, l' α -amylase de pancréas de porc pure est stable, même à la dialyse⁴⁾. Cette stabilité n'est influencée en rien par la présence de méso-inositol.

Nous avons alors examiné l'action de l'inositol sur des préparations d' α -amylase impure, rendues instables par la présence de l'enzyme protéolytique. Or, comme nous l'avons déjà dit⁵⁾, l'inositol *seul* n'a montré aucune action stabilisatrice sur ces préparations et ne peut en conséquence être assimilé à notre stabilisateur. En revanche, il est possible que le stabilisateur contienne de l'inositol mais sous forme liée.

γ -Hexachlorocyclohexane et amylase.

Nous avons répété les essais de *Williams* et *Lane* sur l'influence du γ -hexachloro-1,2,3,4,5,6-cyclohexane sur l'amylase, mais avec de l'enzyme pur. Nous avons travaillé selon la technique de ces auteurs, à des concentrations égales ou supérieures en γ -hexachlorocyclohexane à celles qu'ils ont utilisées. Ces auteurs trouvent que l'amylase est complètement inhibée lorsque la concentration molaire en γ -hexachlorocyclohexane est 50 fois supérieure à celle de l'enzyme. Or nous avons travaillé jusqu'à des concentrations 200 fois plus fortes sans

¹⁾ W. H. Schopfer, Th. Posternak et M. L. Boss, Rev. internat. Vitaminologie **20**, 121 (1948).

²⁾ Nous remercions vivement M. le Prof. W. H. Schopfer d'avoir bien voulu effectuer ces analyses.

³⁾ C. E. Danielsson, Nature **160**, 899 (1947).

⁴⁾ Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Helv. **31**, 1831 (1948).

⁵⁾ Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Helv. **31**, 1839 (1948).

jamais constater aucune inhibition, même après 144 heures à + 20°, au p_H 6,9.

Amylase	Dioxane	Hexachloro- cyclohexane	Inositol	Activité	
				après 0 h	après 144 h
45 γ^* /cm ³	0	0	0	100	97
„	50%	0	0	100	82
„	50%	291 γ^{**} /cm ³	0	100	83
„	50%	„	180 γ^{***} /cm ³	100	83

*) Soit 0,001 micromole.

**) Soit 1 micromole.

***) Soit 1 micromole.

Nous avons refait le même essai à 20 ± 0,01°. A cette température aussi, malgré une forte désactivation de l'enzyme en présence de dioxane, aucune inhibition due à l'hexachlorocyclohexane ne put être constatée.

Amylase	Dioxane	Hexachloro- cyclohexane	Inositol	Activité	
				après 0 h	après 16 h
45 γ /cm ³	0	0	0	100	100
„	50%	0	0	100	52
„	50%	291 γ /cm ³	0	100	52
„	50%	„	180 γ /cm ³	100	52

Des résultats identiques ont été obtenus avec des préparations d'amylase impure, rendues instables par la présence de l'enzyme protéolytique. Aucune accélération de la désactivation ne put être constatée en présence de γ -hexachlorocyclohexane.

Nous pouvons dire en conséquence qu'il n'y a aucune action inhibitrice du γ -hexachlorocyclohexane sur l' α -amylase de pancréas de porc.

Remarquons que c'est à la suite d'une hypothèse émise par *Slade*¹⁾, que *Kirkwood* et *Philips*²⁾ trouvèrent chez le *Saccharomyces cerevisiae* une action anti-inositol du γ -hexachlorocyclohexane et la compétition entre ces deux substances. *Slade* attribuait en effet au hexachlorocyclohexane une configuration spatiale identique à celle de l'*i*-inositol, et sa toxicité particulière au fait qu'il déplacerait cette substance indispensable à de nombreux organismes. Pourtant, si d'autres auteurs remarquèrent une diminution de la toxicité du γ -

¹⁾ R. E. Slade, Chem. and Ind. **64**, 314 (1945).

²⁾ S. Kirkwood et P. H. Philips, J. Biol. Chem. **163**, 251 (1946).

hexachlorocyclohexane en présence de méso-inositol¹⁾, cette observation ne put être confirmée par *Schopfer* et coll.²⁾. *Chaix*, *Lacroix* et *Fromageot*³⁾ mettent nettement en doute cette hypothèse en montrant que, dans bien des cas, l'isomère δ est le plus toxique. Ils n'ont jamais pu diminuer cette toxicité par adjonction d'inositol. Enfin, l'école de *Bijvoet*⁴⁾ vient d'infirmier la théorie de *Slade* en établissant la carte de densité électronique du γ -hexachlorocyclohexane, d'après des diagrammes de *Weissenberg*, et en montrant que cette molécule n'a pas une configuration identique à celle du méso-inositol.

Partie expérimentale.

Enzymes.

α -Amylase de pancréas de porc deux fois recristallisée⁵⁾. Degré de pureté: 4000 mg maltose/mg d'azote *Kjeldahl* ou 630 mg maltose/mg de substance sèche. Teneur en phosphore: < 0,05%.

α -Amylase de salive humaine deux fois recristallisée⁶⁾. Degré de pureté: 6200 mg maltose/mg d'azote *Kjeldahl* ou 990 mg maltose/mg de substance sèche. Teneur en phosphore: < 0,05%.

Les dosages d'activité ont été effectués selon la méthode précédemment décrite⁷⁾.

Hydrolyse des produits selon *Woolley*⁸⁾ en vue de la recherche de l'inositol.

100 mg de poudre sèche d'enzyme obtenue par dessiccation au vide d'une solution congelée sont dissous dans 20 cm³ d'eau et additionnés de 20 cm³ ClH conc. La solution est chauffée pendant 6 heures à reflux dans un courant d'azote puis concentrée au vide. On reprend la substance sèche par un peu d'eau, évapore à nouveau cette solution et répète deux fois encore cette opération pour chasser autant de ClH que possible. La substance sèche est reprise une dernière fois par de l'eau, neutralisée par CO₃HNa et filtrée si nécessaire. Le dosage d'inositol s'effectue sur cette solution, d'une teneur en ClNa inférieure à 1-m. Un témoin contenant une quantité connue d'inositol et traité dans les mêmes conditions donna à l'analyse le résultat attendu.

Les dosages d'inositol⁹⁾ ont été effectués sur un mutant artificiel¹⁰⁾ de *Neurospora Crassa* par *M. Schopfer* à l'Institut de Botanique de l'Université de Berne.

¹⁾ *H. W. Buston, S. E. Jacobs et A. Goldstein*, *Nature* **158**, 22 (1946); *E. Chargaff, R. N. Stewart et B. Magasanik*, *Science* **108**, 556 (1948).

²⁾ *W. H. Schopfer, Th. Posternak et M. L. Boss*, *Schweiz. Z. Pathol. u. Bakt.* **10**, 443 (1947); *W. H. Schopfer et M. L. Bein*, *Exper.* **4**, 147 (1948).

³⁾ *P. Chaix, L. Lacroix et C. Fromageot*, *Biochem. Biophys. Acta* **2**, 57 (1948); *P. Chaix et L. Lacroix*, *Biochem. Biophys. Acta* **2**, 86 (1948); *C. Fromageot et M. Confino*, *ibid.* **2**, 142 (1948).

⁴⁾ *G. W. von Vloten, Ch. A. Kruissink, B. Strijk et J. M. Bijvoet*, *Nature* **162**, 771 (1948).

⁵⁾ *Ed. H. Fischer et P. Bernfeld*, *Helv.* **31**, 1831 (1948).

⁶⁾ *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, A. Staub et P. Bernfeld*, *Helv.* **31**, 2158 (1948).

⁷⁾ *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld*, *Helv.* **30**, 64 (1947); *G. Noelling et P. Bernfeld*, *Helv.* **31**, 286 (1948).

⁸⁾ *D. W. Woolley*, *J. Biol. Chem.* **140**, 453 (1941).

⁹⁾ *W. H. Schopfer, Th. Posternak et M. L. Boss*, *Rev. Internat. Vitaminol.* **20**, 121 (1948).

¹⁰⁾ *G. W. Beadle*, *J. Biol. Chem.* **156**, 683 (1944).

Action du γ -hexachlorocyclohexane.

1 Solution à 450 γ d'amylase par cm^3 , contenant des phosphates 0,1-m. qui tamponnent à p_H 6,9 et du ClNa 0,66-m.

2 Dioxane: puriss. chauffé 8 h à reflux sur KOH puis sur Na métallique et fractionné.

3 γ -hexachlorocyclohexane 4 fois recristallisé dans CHCl_3 , F. 112,5--113° corr.¹⁾. On en fait une solution dans le dioxane titrant 2,96 mg/cm^3 .

4 Méso-inositol *Hoffmann-La Roche*. On en fait une solution aqueuse titrant 1,80 mg/cm^3 .

On prépare deux séries de 5×4 tubes comme suit:

Tubes	cm^3 de 1	cm^3 de 2	cm^3 de 3	cm^3 de 4	cm^3 H_2O
I	1	0	0	0	9
II	1	5	0	0	4
III	1	4	1	0	4
IV	1	4	1	1	3

Une série est mise à la chambre froide à $+2^\circ$, l'autre au thermostat à $20 \pm 0,01^\circ$. Après 1, 2, 4, 8, ... etc. heures, on prélève 1 cm^3 de chaque tube, le dilue à 10 cm^3 avec du tampon aux phosphates 0,02-m. de p_H 6,9 et dose l'activité sur 1 cm^3 de cette solution diluée. Dans ces conditions, le dioxane ne gêne pas le dosage.

Nous exprimons notre sincère reconnaissance à M. le Prof. *K. H. Meyer* pour ses conseils et pour l'intérêt qu'il a témoigné à ces travaux.

L'un de nous (*E. H. F.*) remercie très vivement le Comité de la «Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la Chimie» de l'appui généreux qu'il lui a donné.

Ces recherches ont été encouragées par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

RÉSUMÉ.

Les α -amylases de pancréas de porc et de salive humaine pures ne contiennent pas d'inositol.

L'inositol ne possède aucune action ni sur l'activité ni sur la stabilité de l' α -amylase de pancréas de porc. Cet enzyme n'est pas inhibé par le γ -hexachloro-1,2,3,4,5,6-cyclohexane.

Laboratoires de chimie organique et inorganique de l'Université de Genève.

¹⁾ Nous remercions vivement M. *J. Fillietaz* de nous avoir aimablement fourni ce produit.