

SUMMARY.

The nitration of scopolamine under various conditions has been studied. The compounds derived from this nitration give perfectly well formed polarographic waves the height of which is directly proportional to the concentrations of the corresponding solutions. This allows the establishment of a standardization graphic. The behaviour of these nitrated derivatives at various pH has also been studied. There exist in equilibrium two tautomeric forms: the "nitro"- and the "aci"-form; at pH = 12, after 12 hours, only one form (the "aci"-form) subsists.

The smallest amount of substance that can be estimated in this way is 50 γ , with a precision of $\pm 10\%$. For an amount of 200 γ the error is decreased to $\pm 6\%$.

Laboratoire de Chimie analytique et de Microchimie de
l'Université de Genève.

147. Phosphorylation biologique de la thiamine¹⁾

par F. Leuthardt et H. Nielsen.

(7 IV 52)

La levure, les bactéries et les tissus animaux contiennent des enzymes capables de phosphoryler la thiamine. *Euler & Vestin*²⁾ ont observé que le pouvoir de décarboxylation, vis-à-vis de l'acide pyruvique, d'une poudre de levure de bière, augmente lorsque cette dernière est incubée en présence de thiamine, de phosphate minéral et d'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.). *Goodhart & Sinclair*³⁾, *Tauber*⁴⁾ et *Ochoa & Peters*⁵⁾ ont étudié le mécanisme de la phosphorylation dans les tissus d'animaux. *Ochoa*⁶⁾ a trouvé que le foie, ainsi que la muqueuse intestinale et le cerveau contiennent un système phosphorylant actif.

Les interprétations données aux résultats obtenus ont soulevé un certain nombre d'objections. Différents auteurs ont travaillé avec des concentrations en thiamine assez considérables. Dans ces conditions, l'augmentation de la décarboxylation que l'on observe en

¹⁾ Ce travail a été réalisé avec l'aide de la *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz*.

²⁾ *H. V. Euler & R. Vestin*, *Naturwiss.* **25**, 416 (1937).

³⁾ *R. S. Goodhart & H. M. Sinclair*, *Biochem. J.* **23**, 1099 (1939).

⁴⁾ *H. Tauber*, *J. Biol. Chem.* **123**, 499 (1938).

⁵⁾ *S. Ochoa & R. A. Peters*, *Nature* **142**, 356 (1942).

⁶⁾ *S. Ochoa*, *Biochem. J.* **33**, 1262 (1939).

ajoutant à l'étiozymase de levure, la solution incubée peut être due à l'inhibition de certaines phosphatases hydrolysant le pyrophosphate d'aneurine («effet d'Ochoa»; *Lipton & Elvehjem*¹⁾, *Westenbrink* et coll.²⁾).

La phosphorylation de la thiamine dépend de l'A.T.P. *Ochoa*³⁾ a montré que les extraits exempts de cellules (foie, muqueuse intestinale, cerveau) n'étaient pas actifs. Par contre, les pulpes d'organes ne réalisent la phosphorylation qu'au cours d'une respiration active. *Weil-Malherbe*⁴⁾ réussit à extraire d'une poudre acétonique de levure de bière, par précipitations fractionnées, une protéine active capable de phosphoryler la thiamine. Cette phosphorylation s'effectue en dehors de tout processus d'oxydation, et l'A.T.P. se trouve être le donateur de pyrophosphate. *Nguyen van Thoai & Chevillard*⁵⁾ décrivent une méthode de purification des protéines phosphorylant la thiamine. Par précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium, ces auteurs ont extrait d'un homogénat de foie de chien, une fraction active capable de phosphoryler la thiamine.

Dans ce travail, nous décrivons la préparation d'une fraction protéinique purifiée à partir de foie de rat, fraction qui transforme, en présence de l'acide adénosine-triphosphorique, la thiamine en cocarboxylase.

Méthodes.

a) Matériel et conditions d'expériences.

Animaux: Nous avons utilisé des rats albinos adultes de 150—200 g. Ils ont reçu pendant environ 10 jours une nourriture optimale contenant de la viande.

Substrats: La thiamine, la cocarboxylase, l'acide glutamique ainsi que le pyruvate de Na sont des produits *Hoffmann-La Roche*. L'A.T.P. est préparé par nous selon les méthodes combinées de *Needham, Kerr* et *Le Page*⁶⁾. L'acide adénosine-monophosphorique est un produit de *Bischoff*, U.S.A. L'acide adénosine-diphosphorique a été obtenu à partir de l'A.T.P. et de myosine. La levure de bière a été mise obligeamment à notre disposition par la brasserie *Hürliemann* à Zürich.

Conditions d'expériences: La phase gazeuse est de l'air. Après 20 minutes d'incubation à 38°, la réaction est arrêtée par déprotéinisation à chaud pendant 1 min. au bain-marie. Après centrifugation une partie aliquote est prélevée pour le dosage de la cocarboxylase.

b) Dosage enzymatique de la cocarboxylase.

La plupart des auteurs ont utilisé, comme apoférmont, de la levure lavée en milieu alcalin (*Auhagen*⁷⁾, *Westenbrink* et coll.²⁾). Par plusieurs lavages d'une poudre de levure de bière avec des tampons phosphates alcalins, ces auteurs éliminent le coférmont. Pour supprimer l'«effet d'Ochoa», *Westenbrink* et coll. proposent d'ajouter à la préparation en-

¹⁾ *M. A. Lipton & C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **136**, 637 (1940).

²⁾ *H. G. K. Westenbrink, P. E. Steym-Parvé, A. C. van der Linden & W. A. van der Brock*, *Z. f. Vitaminschg.* **13**, 218 (1943).

³⁾ *S. Ochoa*, *Biochem. J.* **33**, 1262 (1939).

⁴⁾ *M. Weil-Malherbe*, *Biochem. J.* **33**, 1997 (1939).

⁵⁾ *Nguyen van Thoai & L. Chevillard*, *Bl. Soc. Chim. Biol.* **31**, 204 (1949).

⁶⁾ *D. M. Needham*, *Biochem. J.* **36**, 113 (1942); *S. E. Kerr*, *J. Biol. Chem.* **139**, 121 (1941); *G. A. Le Page*, dans *W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer*, *Manometric techniques and related methods*, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

⁷⁾ *E. Auhagen*, *Naturwiss.* **19**, 916 (1931).

zymatique un grand excès de thiamine. Dans ces conditions, la cocarboxylase préformée montre son activité maximum et n'est plus activée par la thiamine contenue dans les solutions dont on veut doser la teneur en cocarboxylase. *Weil-Malherbe*¹⁾, en se basant sur les données d'*Axmacher & Bergstermann*²⁾, a préparé à partir d'une poudre de levure une fraction protéinique contenant la carboxylase. Pour enlever le cofacteur, il s'est servi de la méthode que *Warburg & Christian*³⁾ ont utilisée pour scinder la D-aminoacido-désaminase (addition de HCl dilué en présence de sulfate d'ammonium). Cette préparation était surtout destinée à étudier le mécanisme de la phosphorylation de la thiamine. *Green* et coll.⁴⁾ ont préparé à partir de la levure de bière, par des précipitations au sulfate d'ammonium, une décarboxylase très active. *Kubowitz & Lüttgens*⁵⁾ ont également préparé une carboxylase très pure, sans donner cependant des détails concernant la préparation.

La préparation de l'apoferment selon la méthode de *Westenbrink* et coll.⁶⁾, n'a pas donné des résultats satisfaisants avec la levure mise à notre disposition. Il n'a pas été possible d'obtenir une étiozymase suffisamment privée de cocarboxylase à partir de chaque préparation de levure séchée. La quantité de cocarboxylase présente dans nos préparations, après le lavage alcalin, s'élevait souvent à $\frac{1}{4}$ de la quantité à doser ensuite. La préparation de l'apoferment selon les modalités de *Weil-Malherbe*¹⁾ nous donna la méthode la plus sensible. La fraction protéinique que l'on obtient est cependant capable de phosphoryler la thiamine en présence d'A.T.P. Du fait que nos solutions à doser contiennent encore de l'A.T.P. et de la thiamine, il peut se produire en présence de l'enzyme de la levure une synthèse de cocarboxylase qui fausse les résultats. En évitant dans les essais un grand excès de thiamine, il est cependant possible d'utiliser l'enzyme de *Weil-Malherbe* sans introduire une erreur notable. Mais par fractionnement au sulfate d'ammonium, nous avons réussi à éliminer complètement l'enzyme phosphorylant. Cette préparation ne forme aucune cocarboxylase, même en présence d'un excès considérable de thiamine et d'A.T.P.

1. *Préparation de la solution de décarboxylase.* La levure de bière fraîchement pressée est lavée 72 h. à l'eau courante, pressée à nouveau et séchée en fines couches à température ordinaire. Une poudre sèche, gardée à 0°, reste active pendant plusieurs mois. La préparation de la poudre acétonique de la levure se fait selon les indications de *Weil-Malherbe*¹⁾. Gardée au vide dans un dessiccateur, la poudre reste active pendant plusieurs semaines.

1 g de la poudre acétonique est pétri dans un mortier en présence de 30 cm³ d'eau. On refroidit à 0° et on ajoute 1 cm³ d'acide acétique 2-n. Le précipité est séparé par centrifugation. A la solution, 15 cm³ de (NH₄)₂SO₄ saturés ($\frac{1}{3}$ saturation finale) sont ajoutés et le précipité obtenu éloigné par centrifugation. A nouveau 15 cm³ de (NH₄)₂SO₄ sat. ($\frac{1}{2}$ saturation finale) sont ajoutés. Après centrifugation le précipité est dissout dans 10 cm³ de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2. On ajoute 50 cm³ d'eau et 30 cm³ de (NH₄)₂SO₄ sat. ($\frac{2}{3}$ saturation finale). Après avoir refroidi la solution à -5°, 30 cm³ de HCl 0,1-n. (contenant assez de (NH₄)₂SO₄ pour donner une concentration finale de $\frac{1}{3}$ saturation) sont ajoutés rapidement en agitant la solution. Il se forme un précipité. Il est centrifugé à -5° et lavé avec 20 cm³ de (NH₄)₂SO₄ $\frac{3}{4}$ sat. (A ce stade, la fraction enzymatique peut être gardée comme suspension dans une solution de (NH₄)₂SO₄ $\frac{3}{4}$ sat. pendant plusieurs heures sans perdre d'activité.) Le précipité est dissout dans 45 cm³ de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2. Des protéines dénaturées sont éliminées par centrifugation. Toutes les opérations ainsi que les centrifugations s'effectuent à 0°. La solution enzymatique est préparée avant chaque dosage à partir de la poudre acétonique.

1) *M. Weil-Malherbe*, *Biochem. J.* **33**, 1997 (1939).

2) *Fr. Axmacher & H. Bergsterman*, *Bioch. Z.* **272**, 259 (1934).

3) *O. Warburg & W. Christian*, *Bioch. Z.* **298**, 368 (1938).

4) *D. E. Green, D. Herbert & V. Subramanyan*, *J. Biol. Chem.* **138**, 327 (1941).

5) *F. Kubowitz & N. Lüttgens*, *Bioch. Z.* **307**, 170 (1941).

6) *H. G. K. Westenbrink, P. E. Steyn-Parvé, A. C. van der Linden & W. A. van der Brock*, *Z. f. Vitaminschg.* **13**, 218 (1943).

2. *Dosage manométrique.* Les fioles contiennent 1 cm³ d'enzyme de levure, 1 cm³ de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2, 0,1 cm³ d'une solution de Mn⁺⁺ et Mg⁺⁺ contenant 1 mg de chacun des ions métalliques par cm³, et une partie aliquote de la solution de cocarboxylase inconnue. Le volume final est de 3 cm³. Pour établir une courbe de référence, on remplace la solution inconnue par des quantités connues de cocarboxylase (en général 0,05 γ , 0,10 γ , 0,20 γ). L'appendice contient 0,5 cm³ d'une solution de pyruvate 0,2-m. La phase gazeuse est de l'air. La température du thermostat est de 27°. Après 20 min. d'équilibration, le pyruvate est versé de l'appendice dans la fiole. Dès ce moment, la quantité de CO₂ dégagé est mesurée toutes les 10 min. pendant une heure. Dans ces conditions la quantité de CO₂ libéré est proportionnelle à la quantité de cocarboxylase présente. Nous comparons les valeurs de CO₂ obtenu après 30 min. Comme nous l'avons dit plus haut, notre préparation protéique contient une quantité variable d'un enzyme catalysant la synthèse de la cocarboxylase en présence de thiamine et d'A.T.P. La courbe (thiamine + A.T.P.) de la figure 1 montre une telle synthèse de la cocarboxylase. La thiamine ainsi que l'A.T.P. seuls donnent des valeurs identiques au blanc.

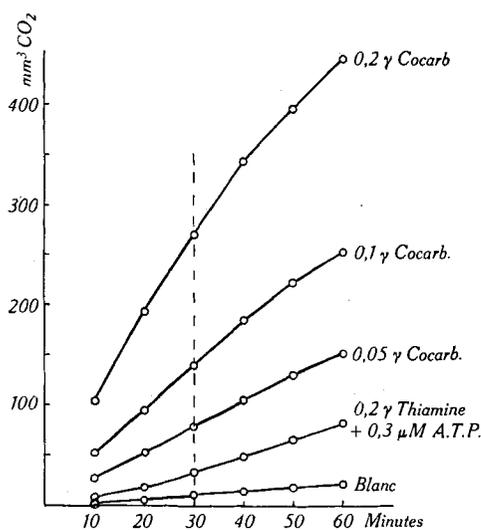


Fig. 1.

Marche horaire de la décarboxylation du pyruvate par la décarboxylase de levure. (Abscisse: mm³ CO₂ dégagés. Ordonnée: temps.)

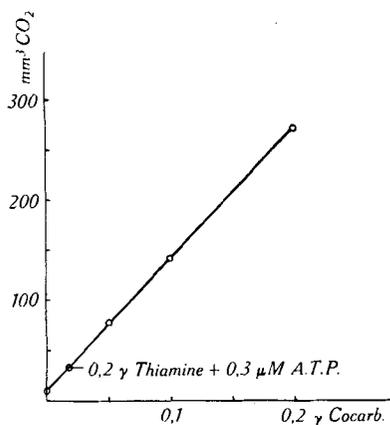


Fig. 2.

Courbe étalon du dosage de la cocarboxylase. Valeurs à 30 min.

Dans nos expériences, la phosphorylation de la thiamine, en présence d'A.T.P. et de l'enzyme hépatique, est incomplète. De ce fait, il nous reste après la période d'incubation, un excès de thiamine et d'A.T.P. Dans ces conditions la quantité de cocarboxylase peut augmenter au cours du dosage manométrique. En général l'erreur est négligeable, mais nous avons toujours complété chaque série de dosages par un essai qui sert à fixer la limite supérieure de l'erreur. A cet effet, nous ajoutons à la solution enzymatique les quantités maxima de thiamine et d'A.T.P. pouvant être introduites avec la solution inconnue.

La figure 2 montre une courbe de référence. La quantité de CO₂ libérée après 30 min. est généralement une fonction linéaire de la quantité de cocarboxylase, jusqu'à une concentration d'environ 0,2 γ de cocarboxylase. La solution enzymatique préparée selon la méthode que nous venons de décrire ne contient que des traces de cocarboxylase préformée. La valeur de CO₂ dégagé en présence de l'enzyme seul ne représente en moyenne que les 3% de la valeur obtenue pour 0,2 γ de cocarboxylase.

3. *Purification de l'apoferment de la décarboxylase.* La solution enzymatique obtenue selon les modalités de *Weil-Malherbe*¹⁾ contient, entre autres protéines, une transphosphorylase très active. Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit une méthode de préparation d'une solution enzymatique ne contenant qu'une faible quantité de transphosphorylase. Nous avons néanmoins constaté que, pour pouvoir étudier la synthèse de la cocarboxylase à partir de plus grandes concentrations (5 à 10 γ) de thiamine et (5 à 10 μ M.) d'A.T.P., il était nécessaire, pour des raisons que nous avons indiquées dans le paragraphe susmentionné, d'éliminer complètement cette transphosphorylase. Nous avons encore apporté les modifications suivantes à la méthode de préparation de l'apoferment.

Le précipité obtenu par acidification à -5° en un milieu de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de $\frac{1}{3}$ de saturation finale, est récolté par centrifugation et lavé avec 20 cm^3 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $\frac{3}{4}$ saturé. On centrifuge. Au culot, on ajoute, tout en le triturant, 10 cm^3 d'une solution de NH_4OH 0,01-n. Le résidu protéique ne se dissout que partiellement et le pH de la suspension se trouve être de 7,0. On ajoute à cette suspension 30 cm^3 de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2. Une petite quantité de protéines dénaturées sont écartées par centrifugation. Au surnageant on ajoute 30 cm^3 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sat. (saturation finale de 43%). Après centrifugation, le culot est redissout dans 20 cm^3 de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2 et reprécipité à 43% de saturation finale en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. On centrifuge et redissout le culot dans 15 cm^3 du même tampon phosphates. La solution est utilisée comme telle. Elle contient 65 à 80 γ de «tyrosine» par cm^3 .

Le tableau 1 montre quelques caractéristiques de notre solution enzymatique. Il en ressort que la décarboxylase est très active et que la transphosphorylase a été complètement éliminée. Même en présence de 10 γ de thiamine et de 2 mg d'A.T.P. nous n'obtenons pas, ou tout au plus dans les limites d'erreur de la méthode, de formation de cocarboxylase. La valeur la plus élevée de 6,4 mm^3 de CO_2 après 30 et même 60 min. ne représente qu'environ 0,01 γ de cocarboxylase. Il est à remarquer que, contrairement aux résultats de *Weil-Malherbe*¹⁾, nous n'obtenons avec l'A.T.P. aucun effet de cocarboxylase, ceci même avec les concentrations de 2 mg d'A.T.P. utilisées par cet auteur. Nous n'avons observé cet effet qu'en employant un produit obtenu des *Schwarz Laboratories, Inc.*, New-York, préparé à partir de la levure, et non pas à partir du muscle de lapin comme le nôtre ainsi que celui utilisé par *Weil-Malherbe*. Une telle préparation contient encore des traces de cocarboxylase (environ 8/100 de γ par μ M d'A.T.P.). L'effet de

Tableau 1.

Les récipients de *Warburg* contiennent 1,0 cm^3 de la solution de décarboxylase (environ 0,5 mg de protéines); 1,0 cm^3 de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2; 0,1 cm^3 d'une solution contenant 1 mg/ cm^3 de Mn^{++} et de Mg^{++} ; une partie aliquotée de la solution à doser; dans l'appendice 0,5 cm^3 d'une solution de pyruvate de Na 0,2-m. Le volume est complété à 3,0 cm^3 avec H_2O bidistillée.

Additions	$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ en 30 min.
blanc	1,5
0,05 γ cocarboxylase	97,7
0,10 γ cocarboxylase	158,5
10 γ thiamine + 2 mg A.T.P.	4,4
0,5 γ thiamine + 0,05 mg A.T.P.	3,2
10 γ thiamine	6,4
0,5 γ thiamine	1,0
2 mg A.T.P.	1,0
0,005 mg A.T.P.	2,1

1) *M. Weil-Malherbe, Biochem. J. 33, 1997 (1939).*

l'A.T.P. observé par *Weil-Malherbe* est probablement un effet secondaire dont il est difficile de donner une explication. Il nous semble peu probable qu'il y ait formation, entre l'A.T.P. et l'enzyme actif, d'une «pseudo-décarboxylase» de faible activité.

4. *Dosage des protéines.* Le dosage de l'azote protéique des homogénats, des suspensions de mitochondries et des surnageants a été fait selon *Kjeldahl*.

Pour les fractions contenant encore du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nous avons utilisé la méthode de *Folin-Ciocalteu*¹), basée sur la réaction de coloration donnée par la tyrosine et le tryptophane. Les extinctions sont lues au spectrophotomètre de *Beckman*. L'activité de la synthèse de la cocarboxylase est exprimée par le rapport cocarboxylase formée/mg N par essai. Pour calculer la teneur en N protéique, nous nous sommes basés sur des comparaisons entre la méthode de *Kjeldahl* et la méthode colorimétrique. La coloration que nous avons obtenue avec les préparations les plus pures de l'enzyme hépatique équivalait à 8% environ de «tyrosine». Nous avons adopté ce rapport, ce qui est une valeur plus basse que celle indiquée par *Weil-Malherbe* (12,6% de tyrosine).

Résultats et discussion.

a) *Conditions de la synthèse dans le tissu hépatique.* Nous utilisons un homogénat de foie de rat de 10% préparé dans une solution de KCl isotonique au moyen de l'appareil de *Potter & Elvehjem*²). Une telle préparation contient un enzyme capable de synthétiser de la cocarboxylase à partir de la thiamine en présence d'A.T.P., d'ions Mg^{++} et d'un substrat oxydable tel que l'acide glutamique (tableau 2). Le substrat oxydable est nécessaire pour maintenir la resynthèse oxydative de l'A.T.P., car les extraits bruts contiennent des enzymes qui hydrolysent l'A.T.P. Le tissu homogénéisé contient une certaine quantité, variant d'un animal à l'autre, de cocarboxylase préformée.

Tableau 2.

Le milieu d'incubation contient: 0,5 cm³ d'homogénat de foie; A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; acide glutamique 0,0066-m.; thiamine 2 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. L'isotonicité du milieu est obtenue avec une solution de KCl. Volume final 3 cm³. Incubation 20 min. à 38°.

Additions	γ cocarboxylase formée par essai
Homogénat seul	0,8
Homogénat + ac. glutamique + A.T.P.	1,0
Homogénat + ac. glutamique + thiamine	0,8
Homogénat + ac. glutamique + thiamine + A.T.P.	1,8

b) *Localisation de la synthèse.* Par centrifugation nous avons séparé des homogénats de foie deux fractions: une suspension de granules cytoplasmiques (mitochondries) et le liquide surnageant. La préparation de ces fractions est décrite dans un travail précédent³). L'étude de la phosphorylation de la thiamine dans l'une ou l'autre des fractions susmentionnées nous montre qu'il faut la somme des systèmes enzymatiques pour obtenir une synthèse (tableau 3, exp. III).

¹) O. Folin & V. Ciocalteu, J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927).

²) R. van Potter & A. Elvehjem, J. Biol. Chem. **114**, 195 (1936).

³) F. Leuthardt & H. Nielsen, Helv. **34**, 1618 (1951).

Pour purifier l'enzyme phosphorylant la thiamine, nous avons centrifugé un homogénat de 10% 30 min. à 18000 t.p.m. (25000 g). Toutes les opérations s'effectuent à 0°. Au liquide surnageant, qui est tout à fait limpide, nous ajoutons un volume égal d'acétone. Le précipité est lavé avec de l'acétone et séché au vide. Une poudre acétonique gardée au froid dans un dessiccateur ne perd pas son activité pendant deux semaines.

200 mg de poudre sèche sont suspendus au moyen de l'appareil de *Potter & Elvehjem* dans 5 cm³ de KCl isotonique. On centrifuge afin d'écartier les particules insolubles. Dans un tel extrait, on constate la formation d'une faible quantité de cocarboxylase à partir de la thiamine et de l'A.T.P. (tableau 3, exp. V), en l'absence de mitochondries et du substrat oxydable. L'extrait contient encore une quantité considérable de cocarboxylase préformée, exprimée dans le tableau par l'essai «extrait seul».

Tableau 3.

Le milieu d'incubation contient: suspension enzymatique; A.T.P. 0,001-m.; Mg⁺⁺ 0,0033-m.; acide glutamique 0,0066-m.; thiamine 2 γ par essai, tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. L'isotonie du milieu est obtenue par une solution de KCl. Volume final 3 cm³. Incubation 20 min. à 38°.

Exp.	Additions	γ cocarboxylase formée par essai
I	Mitochondries seules	0,5
	Mitochondries + thiamine	0,6
II	Surnageant seul	0,25
	Surnageant + thiamine	0,55
III	Mitochondries + surnageant	0,9
	Mitochondries + surnageant + thiamine	1,7
IV	Extrait + mitochondries	1,0
	Extrait + mitochondries + thiamine . .	2,75
V	Extrait seul	1,8
	Extrait + thiamine	2,2

Ces expériences montrent que le liquide surnageant, résultant de la centrifugation de l'homogénat complet, nécessite la présence du système phosphorylant des mitochondries. Ces dernières par contre ne participent pas directement à la phosphorylation de la thiamine. Par une série de travaux¹⁾, il a été prouvé que les granules cytoplasmiques sont le siège du cycle des acides tricarboxyliques et de la phosphorylation oxydative de l'acide adénylique ou de l'acide adénosine-diphosphorique. Dans l'essai «surnageant + thiamine», l'apyrase est très active et la faible activité obtenue est probablement due à la présence de mitochondries restées en suspension qui suffisent à maintenir une faible resynthèse de l'A.T.P. Le fractionnement à l'acétone élimine la plus grande partie de l'apyrase présente sans, pour autant, diminuer la teneur en cocarboxylase préformée. C'est seulement après la séparation de la transphosphorylase de l'apyrase que la synthèse devient indépendante du système phosphorylant des

¹⁾ A. F. Müller & F. Leuthardt, *Helv.* **32**, 2349 (1949).

mitochondries et du substrat oxydable. Ces constatations montrent que l'enzyme qui produit la phosphorylation de la thiamine est une protéine soluble, contenue dans le liquide surnageant, et que l'A.T.P. est nécessaire comme donneur de phosphate.

c) *Elimination de la cocarboxylase préformée.* Pour séparer la cocarboxylase de la poudre acétonique, nous avons utilisé la méthode que Warburg & Christian¹⁾ avaient employée pour la séparation du groupe prosthétique de la D-aminoacidodésaminase de son apoferment. En présence de sulfate d'ammonium, ayant une action protectrice, le groupe prosthétique peut être séparé du ferment par l'acide chlorhydrique dilué.

400 mg de poudre acétonique sont suspendus dans 10 cm³ de tampon phosphates 0,04-m. de pH 7,5. On centrifuge après 2 h. d'extraction. A l'extrait dont le volume mesure environ 9,7 cm³, on ajoute 10 cm³ de tampon phosphates 0,05-m. de pH 6,2. 37,5 cm³ d'eau froide et 28,5 cm³ de (NH₄)₂SO₄ sat. (saturation finale en (NH₄)₂SO₄ = 1/3). Le mélange est refroidi à -5°. Puis on ajoute en remuant 28,5 cm³ d'HCl 0,1-n., 1/3 saturé en (NH₄)₂SO₄. Le résidu de la centrifugation est lavé avec 20 cm³ d'une solution (NH₄)₂SO₄ 3/4 saturée, puis dissous dans 7 cm³ de tampon phosphates 0,04-m. de pH 7,5. On centrifuge les protéines dénaturées et la solution est employée comme telle. Nous appelons cette fraction «précipité HCl».

La phosphorylation de la thiamine avec cette fraction enzymatique est très active. La valeur à blanc est nulle, ce qui signifie que la cocarboxylase préformée a été éliminée (tableau 4, exp. I).

Tableau 4.

Le milieu d'incubation contient: solution enzymatique; A.T.P. 0,001-m.; Mg⁺⁺ 0,0033-m.; thiamine 2 γ par essai; tampon phosphate de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm³.

Incubation 20 min. à 38°. «Ppté HCl» = solution enzymatique (voir texte).

Exp.	Additions	γ cocarboxylase formée par essai
I	Ppté HCl seul	0,0
	Ppté HCl + thiamine	1,6
II	Ppté HCl + thiamine	2,2
	Ppté HCl + thiamine + 5 μM ac. glutamique .	2,1
	Ppté HCl + thiamine + 10 μM ac. glutamique .	1,9
	Ppté HCl + thiamine + 40 μM ac. glutamique .	1,85
III	Ppté HCl frais seul	0,0
	Ppté HCl frais + thiamine	2,3
	Ppté HCl après 5 jours + thiamine	2,2

Nous avons vu dans un chapitre précédent que le fractionnement du liquide surnageant par l'acétone avait pour effet d'éliminer la plus grande partie de l'apyrase. Cette dernière a été totalement écartée par la seconde précipitation en milieu acide. De ce fait, le système

¹⁾ O. Warburg & W. Christian, Bioch. Z. 298, 368 (1938).

phosphorylant des mitochondries ainsi que l'acide glutamique comme substrat oxydable servant à la resynthèse de l'A.T.P. peuvent être supprimés. Nous observons même une faible inhibition de la synthèse en présence d'acide glutamique (tableau 4, exp. II). La stabilité de l'enzyme a également augmenté. Une solution enzymatique gardée à 0° pendant 5 jours ne perd que 5% de son activité initiale (tableau 4, exp. III).

d) *Influence de l'A.T.P. et des ions Mg^{++} .* L'activité de la synthèse de la cocarboxylase est fonction de la concentration en A.T.P. (fig. 3). La phosphorylation est également fonction des ions Mg^{++} (fig. 4). La concentration optimale se trouve entre 15 et 20 μM de Mg par essai. 30 μM ont une action légèrement inhibitrice. Le rôle des ions Mg^{++} lors de la transphosphorylation est encore peu clair. Le Mg semble être indispensable pour toutes les réactions nécessitant l'A.T.P.

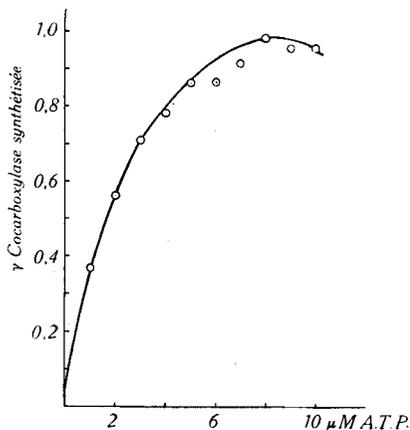


Fig. 3.

Influence de la concentration en A.T.P.

Le milieu contient: solution enzymatique (ppté HCl); Mg^{++} 0,0033-m.; thiamine 3 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm^3 . Incubation 20 min. à 38°.

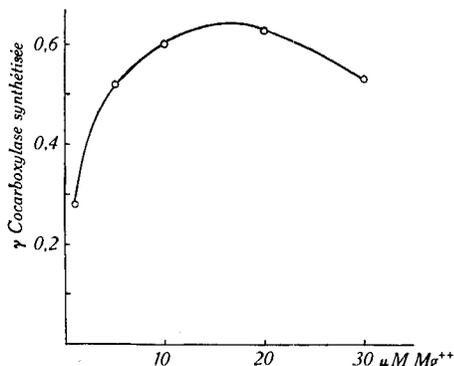


Fig. 4.

Influence de la concentration des ions Mg^{++} .

Le milieu d'incubation contient: solution enzymatique (ppté HCl); A.T.P. 0,001-m.; thiamine 2 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm^3 . Incubation 20 min. à 38°.

e) *Effet du pH du milieu et du temps d'incubation.* La figure 5 montre l'activité de la synthèse en fonction du pH du milieu d'incubation. Ce dernier a été mesuré au moyen de l'électrode de verre avant et après l'incubation. L'activité de la synthèse est optimale à un pH de 6,8 à 6,9.

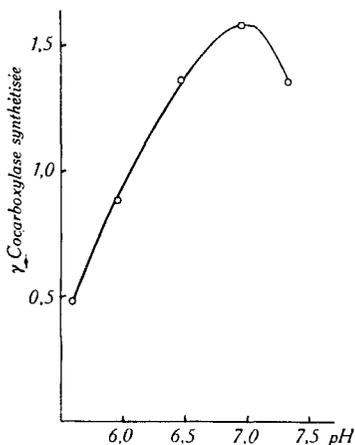
Dans nos conditions d'expériences, c.-à-d. pour 2 γ de thiamine, la formation de la cocarboxylase est en général achevée après 20 min. d'incubation. Ce temps augmente considérablement si la quantité de thiamine est augmentée à 5 γ (tableau 5). La présence de cystéine

(60 μM par essai) ou de NaCN (160 μM par essai) dans le milieu d'incubation n'a aucun effet stimulateur ou inhibiteur sur l'activité de l'enzyme.

Tableau 5.

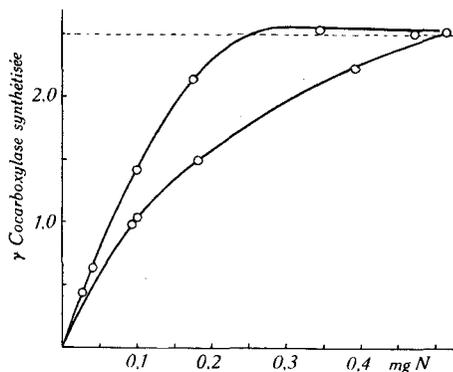
Le milieu contient: solution enzymatique (ppté HCl); A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; 5 γ de thiamine par essai; tampon phosphates de K de pH 7,4 0,0066-m.; Volume final 3 cm^3 . Incubation à 38°.

Temps d'incubation (min.): . .	20	40	60	90	120
Coccarboxylase formée (γ): . .	1,3	2,2	2,8	3,3	5,4

**Fig. 5.**

Effet du pH.

Le milieu d'incubation contient: solution enzymatique (ppté HCl neutralisé); A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; thiamine 2 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH différents. Volume final 3 cm^3 . Incubation 20 min. à 38°.

**Fig. 6.**

Concentrations variables de la solution enzymatique.

Le milieu d'incubation contient: quantités variables de la solution enzymatique (ppté HCl); A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; thiamine 2 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm^3 . Incubation 20 min. à 38°. La courbe supérieure correspond à une solution enzymatique plus pure (0,210 mg N/ cm^3) que la courbe inférieure (0,420 mg N/ cm^3).

f) *Variation de la concentration de l'enzyme.* La figure 6 montre la phosphorylation de la thiamine en fonction de la concentration de l'enzyme. La quantité de coccarboxylase formée augmente jusqu'à ce que la quantité de thiamine présente devienne le facteur limitant de la réaction. Dans l'expérience représentée par la courbe supérieure, la phosphorylation complète de la thiamine est atteinte avec une concentration de 0,210 mg N (dosage selon *Folin*) par essai. La courbe inférieure est obtenue avec une solution enzymatique un peu moins active.

g) *Mécanisme de la synthèse.* Nous supposons que la phosphorylation enzymatique de la thiamine en présence de l'A.T.P. s'effectue par transport d'un groupe pyrophosphate de l'A.T.P. sur la thiamine, et non par addition successive de deux restes phosphorylés:

A.T.P. + thiamine \rightarrow cocarboxylase + A.M.P. En effet l'A.D.P. qui possède un reste phosphoryle labile ne fonctionne pas comme donateur de phosphate. Il a au contraire une action inhibitrice (tableau 6, exp. I). Il s'agit très probablement d'une substitution dans le complexe enzymatique de l'A.D.P. à l'A.T.P. («competitive inhibition»), car la structure de l'A.D.P. est très semblable à celle de l'A.T.P. Cette inhibition est fonction de la quantité d'A.D.P. présente.

Tableau 6.

Le milieu contient: solution enzymatique (ppté HCl); Mg^{++} 0,0033-m.; 5 γ de thiamine par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm³. Les quantités d'A.T.P., d'A.D.P. et d'A.M.P. indiquées dans le tableau sont celles contenues dans le volume final de 3 cm³. Incubation 20 min. à 38°. La pureté de l'A.T.P. et de l'A.D.P. utilisés dans ces expériences a été vérifiée par chromatographie selon la méthode modifiée de *Cohn & Carter*, que nous avons décrite ailleurs¹⁾.

Exp.	Additions	γ cocarboxylase formée
I	5 μ M A.T.P.	2,4
	2 μ M A.T.P.	1,6
	5 μ M A.T.P. + 2 μ M A.D.P.	2,0
	5 μ M A.T.P. + 5 μ M A.D.P.	1,7
	5 μ M A.D.P.	0,8
	2 μ M A.D.P.	0,4
II	4 μ M A.T.P.	2,0
	4 μ M A.T.P. + 0,5 μ M A.M.P.	1,8
	4 μ M A.T.P. + 2 μ M A.M.P.	1,5
	6 μ M A.T.P.	2,2
	6 μ M A.T.P. + 2 μ M A.M.P.	1,7

En remplaçant l'A.T.P. par l'A.D.P., nous obtenons une certaine formation de cocarboxylase (tableau 6, exp. I). Nous avons montré que celle-ci est due à la présence, dans notre préparation d'enzyme hépatique, d'une myokinase¹⁾ qui, à partir d'A.D.P., donne de l'A.T.P. et de l'A.M.P. L'A.T.P. formé fonctionne comme donateur de phosphate, et nous constatons une synthèse de cocarboxylase. Nous avons tenté d'inhiber l'action de la myokinase en travaillant en présence de NaF, mais le fluorure inhibe également, et dans les mêmes proportions, la phosphorylation de la thiamine.

L'A.M.P. ne contenant aucun P labile a également un effet inhibiteur sur la phosphorylation de la thiamine (tableau 6, exp. II).

D'autre part, si le monophosphate de thiamine était un produit intermédiaire dans la formation de la cocarboxylase, il devrait pouvoir remplacer la thiamine. On devrait s'attendre aussi dans ce cas, à ce que le monophosphate fût transformé en cocarboxylase avec la même

¹⁾ *F. Leuthardt & H. Bruttin, Helv. 35, 464 (1952).*

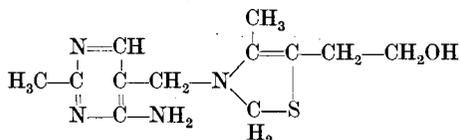
vitesse que la thiamine. Le tableau 7 montre que si nous substituons le monophosphate de thiamine¹⁾ à la thiamine, on n'observe qu'une faible synthèse de cocarboxylase. Elle peut être due à une hydrolyse partielle du monophosphate de thiamine, donnant de la thiamine. *Weil-Malherbe*²⁾, dans ses expériences avec l'enzyme de levure, avait trouvé une période d'induction plus longue, c.-à-d. une vitesse de synthèse plus faible, en substituant le monophosphate de thiamine à la thiamine. De plus, la formation de la cocarboxylase est légèrement inhibée par l'addition de monophosphate de thiamine. Nous concluons que la phosphorylation de la thiamine s'effectue par le transport d'une molécule de pyrophosphate.

Tableau 7.

Les conditions sont celles indiquées au tableau 6. T.M.P. = monophosphate de thiamine.

Additions	γ cocarboxylase formée
5 γ T.M.P.	0,2
5 γ T.M.P. + 5 μ M A.T.P.	0,55
5 γ T.M.P. + 5 μ M A.T.P. + 5 γ thiamine.	1,5
5 γ thiamine + 5 μ M A.T.P.	2,3

h) *Phosphorylation de la dihydro-thiamine*. Nous avons étudié la phosphorylation de la dihydro-thiamine, qui a été récemment synthétisée par *Karrer & Krishna*³⁾:



En prenant comme système enzymatique l'extrait de la poudre acétonique, nous obtenons une faible synthèse de cocarboxylase à partir de la dihydro-thiamine en présence d'A.T.P. et d'ions Mg^{++} (tableau 8, exp. I). Elle représente environ le 40% de la synthèse obtenue avec la même concentration de thiamine. Avec une solution enzymatique telle que le «précipité HCl», nous obtenons une synthèse variant de 40 à 60%, comparée à celle de la thiamine (tableau 8, exp. II).

Une certaine quantité de dihydro-thiamine est probablement toujours oxydée en milieu aqueux. La quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation de cette petite quantité de dihydro-thiamine est très faible (pour 1 γ il faut $4 \cdot 10^{-8}$ cm³ O₂). Il est évidemment impossible d'avoir des conditions anaérobies suffisamment rigoureuses pour éviter toute oxydation de la substance.

¹⁾ Substance obligeamment mise à notre disposition par le prof. *M. Viscontini*.

²⁾ *M. Weil-Malherbe*, *Biochem. J.* **33**, 1997 (1939).

³⁾ *P. Karrer & H. Krishna*, *Helv.* **33**, 555 (1950). — Substance obligeamment mise à notre disposition par le prof. *P. Karrer*.

Tableau 8.

Le milieu contient: solution enzymatique; A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; 2 γ de dihydro-thiamine ou de thiamine par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm³. Incubation 20 min. à 38°.

Exp.	Additions	γ cocarboxylase formée
I	Extrait seul	0,9
	Extrait + dihydrothiamine	1,3
	Extrait + thiamine	1,9
II	Ppté HCl + dihydrothiamine	0,5
	Ppté HCl + dihydrothiamine sans A.T.P.	0,0
	Ppté HCl + thiamine	1,0
III	0,5 cm ³ ppté HCl + dihydrothiamine	0,5
	1,0 cm ³ ppté HCl + dihydrothiamine	0,6
	1,5 cm ³ ppté HCl + dihydrothiamine	0,8
	1,0 cm ³ ppté HCl + thiamine	1,1

i) *Purification de l'enzyme hépatique.* Afin d'obtenir une solution enzymatique plus pure, nous avons fractionné la solution protéique «précipité HCl» par des précipitations successives avec une solution de $(NH_4)_2SO_4$ saturée à 0°.

A 17 cm³ de la solution «précipité HCl» on ajoute 12,8 cm³ de $(NH_4)_2SO_4$ sat. (saturation finale 43%). Ce précipité est inactif et nous l'éloignons par centrifugation. Au surnageant nous ajoutons 26,9 cm³ de $(NH_4)_2SO_4$ sat., ce qui porte la saturation finale à 70%. Le précipité est centrifugé et dissout dans 10 cm³ de tampon phosphates 0,004-m. de pH 7,4. Cette solution enzymatique est active et nous l'appelons «précipité 43—70% I». A 7,5 cm³ de cette solution protéique nous ajoutons 10 cm³ de $(NH_4)_2SO_4$ sat. (saturation finale de 57%). Le précipité est éloigné par centrifugation. Au surnageant on ajoute de nouveau 10 cm³ de $(NH_4)_2SO_4$ sat. (saturation finale 73%). Après centrifugation, le précipité est dissout dans 3 cm³ de tampon phosphates 0,004-m. de pH 7,4. Nous appelons cette fraction «précipité 57—73% II».

Tableau 9.

Le milieu d'incubation contient: solution enzymatique; A.T.P. 0,001-m.; Mg^{++} 0,0033-m.; thiamine 5 γ par essai; tampon phosphates de K 0,0066-m. de pH 7,4. Volume final 3 cm³. Incubation 20 min. à 38°.

Additions	γ cocarboxylase formée par essai	Activité
Ppté HCl seul	0,0	—
Ppté HCl + thiamine	2,2	12
Ppté 43—70° I seul	0,0	—
Ppté 43—70° I + thiamine	2,3	25
Ppté 57—73% II seul	0,0	—
Ppté 57—73% II + thiamine	2,9	38

Le tableau 9 montre l'activité des différentes solutions enzymatiques. L'activité moyenne de synthèse du «précipité 57—73% II»

est de 18 à 23 γ de cocarboxylase par mg N protéique. Cette fraction enzymatique est la plus pure que nous ayons obtenue. Nous avons un enrichissement de l'activité enzymatique de 50 à 60 fois comparée à celle de l'homogénat complet.

SUMMARY.

1. A purified protein fraction which catalyses the formation of cocarboxylase from thiamine in the presence of A.T.P. has been isolated from rat liver.

2. The enzyme has been obtained from the «soluble» fraction of cell protein (fraction not sedimented at 25000 g).

3. In liver homogenate an active phosphorylating system (mitochondria + oxydable substrat) is necessary in order to maintain a sufficiently high level of A.T.P.

4. The synthesis of cocarboxylase depends on the presence of Mg^{++} . The optimal pH value is 6,8—6,9. The reaction necessitates a large excess of A.T.P. compared with the amount of thiamine.

5. The synthesis of cocarboxylase is inhibited by A.M.P. and A.D.P.

6. In the presence of A.D.P. some cocarboxylase is formed from thiamine. This is due to the presence of myokinase in our protein fraction.

7. Only a small quantity of cocarboxylase is formed when thiamine is replaced by its monophosphate.

8. We suppose that cocarboxylase is formed by the transfer of a pyrophosphate group from A.T.P. to thiamine.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

148. Die Kinetik der Kupplungsreaktion: Diskussion und Anwendungen der kinetischen Reaktionsgleichung¹⁾

von Hch. Zollinger und C. Wittwer.

(10. IV. 52.)

1. Die kinetische Reaktionsgleichung der Kupplung.

Die Kupplung ist eine der relativ wenigen Substitutionsreaktionen der aromatischen Chemie, die bei äquimolarem Verhältnis der Partner — Diazo- und Kupplungskomponente — in den meisten

¹⁾ Nach einem Vortrag von H. Z. am 21. Dezember 1951 im physikalisch-organischen Kolloquium der Harvard-Universität in Cambridge (USA.). Den Herren Prof. Dr. P. D. Bartlett (Harvard-Universität) und J. D. Roberts (Massachusetts Institute of Technology) sei für anregende Diskussionen gedankt.