

RECHERCHES SUR LA PHYTASE

II. CINÉTIQUES COMPARÉES DE L'HYDROLYSE DU GLYCÉROPHOSPHATE
ET DE L'INOSITOHEXAPHOSPHATE PAR LE SON DE BLÉ

par

PAUL FLEURY ET JEAN COURTOIS

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris (France)

La phosphatase qui hydrolyse l'acide inosithexaphosphorique et que l'on dénomme *phytase* n'a été l'objet que d'un petit nombre de recherches (POSTERNAK¹) ; il est assez généralement admis que c'est un enzyme assez spécifique et distinct des autres phosphatasées, mais cette spécificité n'a encore pu être démontrée avec certitude.

Dans notre précédent mémoire sur la phytase² nous avons pu observer, comme différents autres auteurs, que de nombreuses préparations diastasiques, qui hydrolysent facilement les substrats usuels des phosphomonoestérases (β glycériophosphate en particulier), sont inactives ou n'agissent qu'avec une extrême lenteur sur l'inosithexaphosphate de sodium.

Par contre, à notre connaissance, on n'a jamais signalé l'existence d'une préparation diastasique susceptible d'hydrolyser l'inosithexaphosphate de sodium (I) sans agir sur les glycériophosphates de sodium (G).

On pourrait expliquer ce fait en admettant que la phytase serait une sorte de *phytophosphatase* active à la fois sur I et d'autres esters comme G tandis que les phosphatasées banales actives sur les monoesters du type de G ne seraient que peu ou pas actives sur I.

Nous avons d'ailleurs observé² que les esters phosphoriques de l'inositol, moins riches en phosphore que I, et qui se forment au cours de l'hydrolyse sulfurique partielle de ce dernier, sont dédoublés par des préparations diastasiques inactives sur I (émulsine, taka-diastase).

Le son de blé diffère de la plupart des préparations phosphatasiques usuelles par le fait qu'il dédouble I plus rapidement que G. Nous nous sommes proposés de rechercher si le son ne renfermait qu'une phosphatase active à la fois sur I et sur G ou, au contraire, deux enzymes spécifiques de chacun de ces substrats : phytase et phosphomonoestérase. Pour la commodité de l'exposé nous dénommerons d'ailleurs phytase l'enzyme dédoublant I et glycériophosphatase celui transformant G, ceci sans préjuger de l'identité des deux enzymes.

Il existe d'ailleurs d'autres possibilités ; des phosphatasées de spécificité plus ou moins distincte et de propriétés légèrement différentes coexistent presque toujours dans la même préparation fermentaire ; il est même assez rare de rencontrer des tissus ou organes ne renfermant qu'un seul type de phosphatase (ROCHE ET COURTOIS³). Il est ainsi possible que le son renferme une phytase phytophosphatase active à la fois sur I et G et une phosphatase banale dédoublant G et peu active ou inactive sur I.

Nos recherches sur la cinétique des enzymes du son et les essais de fractionnement décrits dans le III^e mémoire sont d'ailleurs en faveur de cette dernière possibilité.

Nous avons donc déterminé les modalités de l'hydrolyse de G et I par le son ; dans ce but nous avons envisagé successivement l'influence sur ces réactions diastasiques du p_H , des proportions respectives d'enzyme et substrat, de l'inactivation des enzymes par les acides ou les alcalis et la chaleur ; nous avons enfin déterminé l'action de quelques effecteurs chimiques sur l'activité des deux enzymes.

PROTOCOLE DES ESSAIS

Nous avons utilisé comme substrats le β -glycérophosphate disodique (G) et l'inositolhexaphosphate duodécisodique (I). La source d'enzyme est une macération de son de Blé effectuée à la glacière, dans de l'eau distillée tolouénée. L'acide phosphorique libéré est dosé par la technique de COPAUX, après isolement sous forme de sel ammoniacomagnésien comme dans nos précédentes recherches ^{4, 5, 6}.

a. *Activité en fonction du p_H* . Nos résultats ont permis de tracer les courbes I, les courbes d'hydrolyse en fonction du p_H ne sont pas absolument similaires pour les deux substrats. L'optimum d'hydrolyse de G est moins saillant et situé dans une zone légèrement plus acide que pour I.

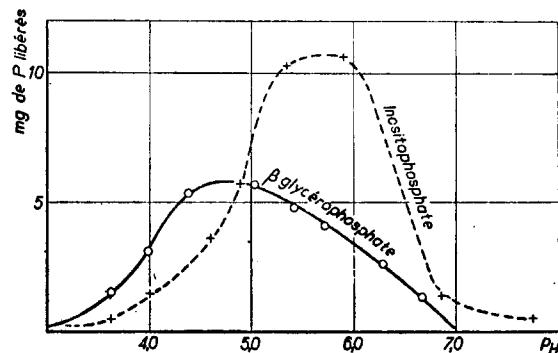


Fig. 1. Activité en fonction du p_H de la macération de son. 10 ml de substrat M/10 en P estérifié; 5 ml macération son à 2 p. 100; eau distillée q.s. p. 50 ml; 48 heures à 40°.

D'autre part, à la même concentration moléculaire en phosphore estérifié, G est dédoublé plus rapidement que I de p_H 3.6 à 5.2 ; par contre vers p_H 5.0—6.0 I est transformé environ deux fois plus rapidement que G.

Ces écarts seraient plutôt en faveur de l'existence de deux enzymes distincts mais demeurent trop peu accentués pour en tirer des conclusions plus précises ; en effet, pour un même enzyme le p_H optimum peut varier avec la nature du substrat (P. FLEURY⁷, J. COURTOIS⁴).

De plus avec le même enzyme, le rapport des vitesses de transformation de deux substrats de cet enzyme peut varier avec le p_H ⁴.

Les p_H optima de la glycérophosphatase et de la phytase sont ceux d'enzymes du type II de la classification des phosphatasées ; les phosphatasées de ce type sont d'ailleurs largement distribuées chez les végétaux supérieurs (ROCHE ET COURTOIS⁸).

b. *Activité en fonction de la concentration en substrat*. Nous avons opposé à une dose constante de préparation diastasique des doses croissantes de substrat tamponné à p_H 5.2 ; la durée de la réaction d'hydrolyse à 37° a été fixée de telle manière que le

pourcentage d'hydrolyse du substrat n'excède pas 20 p. 100, ce qui permet de mesurer simplement la vitesse initiale de réaction (P. FLEURY⁷).

Les résultats obtenus (Courbe II) marquent de nettes divergences entre les comportements des deux substrats. Dans les limites étudiées, la quantité de phosphore libéré de G croît régulièrement avec la concentration de ce substrat.

L'affinité K_M^* est inférieure à 38, valeur du même ordre de grandeur que celles obtenues avec d'autres phosphatases végétales (J. COURTOIS⁴).

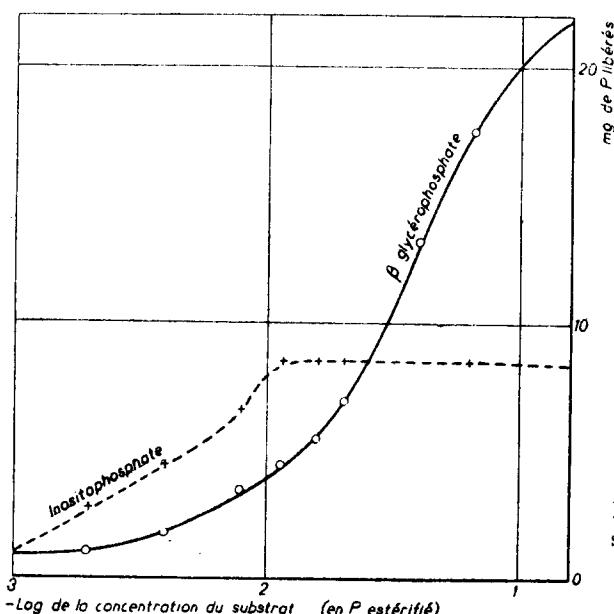


Fig. 2. Activité des enzymes du son en fonction de la concentration du substrat. pH 5.2; temp. 37°.

La phytase est par contre rapidement saturée de substrat et au-dessus d'une concentration M/100 en acide phosphorique estérifié de I la vitesse demeure indépendante de la concentration du substrat ; l'affinité K_M pour I est supérieure à 250 en considérant la concentration en liaisons ester phosphorique, soit $K_M > 1500$ pour l'inositolhexaphosphate **.

Aux faibles concentrations en substrat la plus forte affinité de l'enzyme pour I augmente la proportion de substrat combiné à l'enzyme, c'est-à-dire apte à être transformé, de ce fait I est dédoublé plus rapidement que G. Aux fortes concentrations en substrat l'affinité n'a plus qu'un rôle secondaire et G est transformé plus rapidement que I.

Le fait que les affinités pour G et I soient nettement distinctes n'implique pas forcément l'existence de deux enzymes différents (J. COURTOIS⁴; P. FLEURY ET J. COURTOIS⁸). L'existence de plusieurs liaisons ester dans I ne diminue donc pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat, surtout si l'on tient compte du fait qu'en général les phosphatases ont une plus forte affinité pour G que pour les autres monoesters phosphori-

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

** Cette affinité globale est vraisemblablement la moyenne des affinités de l'enzyme pour les six liaisons ester du substrat.

ques (ROCHE et COURTOIS³; COURTOIS et DENIS^{8, 10, 11}; MME RICAUD-MANOUVRIER¹²).

Dans un précédent mémoire⁵ nous avions émis l'hypothèse que la très lente action des phosphatases sur I pouvait provenir d'une sorte d'empêchement stérique; en effet tous les atomes de carbone de I sont protégés par des radicaux phosphorés. Dans le cas du son, tout au moins, notre hypothèse s'avère inexacte, puisque l'affinité de la phytase pour I est relativement beaucoup plus élevée que pour G où l'encombrement stérique est bien moins important.

c. *Activité en fonction de la concentration en diastase.* La détermination de l'activité diastasique avec une dose constante d'enzyme et des quantités variables de substrat ne permet pas en général de différencier deux enzymes distincts. Il est par contre possible d'atteindre ce but en opposant à une dose constante de substrat des quantités croissantes d'enzyme; les vitesses de transformation de quantités équimoléculaires de deux substrats distincts tributaires du même enzyme deviennent constantes, bien que le plus souvent inégales, à partir d'une certaine concentration de l'enzyme; ces concentrations sont égales pour les deux substrats. Lorsque la concentration de l'enzyme dépasse cette concentration critique que l'on dénomme le pouvoir fixateur, les vitesses de transformation des substrats restent constantes (COLIN¹³; J. COURTOIS⁴; P. FLEURY ET J. COURTOIS⁸).

Nous avons déterminé les pouvoirs fixateurs de la glycérophosphatase et de la phytase du son (Courbe III). Ces pouvoirs fixateurs sont pratiquement égaux et à partir d'une même concentration de l'enzyme les vitesses d'hydrolyse des deux substrats atteignent respectivement leurs zones de constance. Nous n'avons pas observé les nettes différences entre les pouvoirs fixateurs observées avec la glycérophosphatase et la pyrophosphatase de l'émulsine ou de la taka-diastase (P. FLEURY ET J. COURTOIS⁵).

Nos résultats seraient en faveur de l'identité de la glycérophosphatase et de la phytase du son, si une restriction ne s'imposait. Nous avons en effet montré dans le précédent mémoire² que les produits d'hydrolyse partielle de I sont dédoublés par les phosphatases banales inactives sur I. Il est donc possible que le pouvoir fixateur observé avec I ne soit point celui de la phytase agissant sur I, mais celui d'une phosphatase banale transformant les divers inositophosphates provenant de la déphosphorylation plus ou moins poussée de l'inositohexaphosphate.

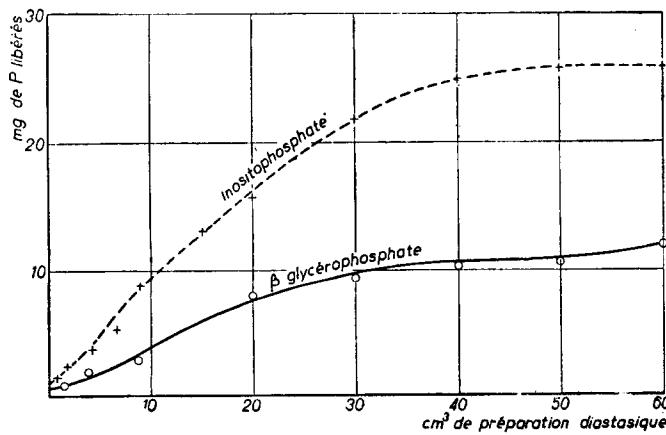


Fig. 3. Influence de la concentration de l'enzyme sur l'hydrolyse de doses constantes des deux substrats. 10 ml substrat M/10 en P estérifié; 10 ml de tampon acétique, pH 5.2; macération de son à 2 p. 100 variable; eau distillée q.s. p. 50 ml; durée d'hydrolyse à 37° variable, résultats calculés pour 24 h d'hydrolyse.

Dans ce cas particulier, si des pouvoirs fixateurs nettement distincts pourraient constituer une preuve de l'existence de deux enzymes, des pouvoirs fixateurs égaux ne fournissent pas la preuve de l'existence d'un seul enzyme.

d. *Hydrolyse par le son d'un mélange de G et I.* VICTOR HENRI ET LARGUIER DES BANCELS ont montré que lorsqu'une préparation diastasique renferme deux enzymes distincts pouvant agir sur deux substrats également distincts, ces substrats sont transformés indépendamment et au même rythme qu'ils soient séparés ou réunis.

Nous avons comparé l'hydrolyse de G et I, isolés ou mélangés en proportions variables. Nous avons apprécié leurs hydrolyses respectives en déterminant : α l'acide phosphorique libéré, β les fonctions α -glycol libérées oxydables par l'acide périodique et γ les fonctions aldéhydiques qui apparaissent au cours de l'oxydation périodique *. Nous avons titré l'acide périodique réduit par la technique à l'anhydride arsénieux-iodure et les aldéhydes par cyanimétrie en ayant recours à notre protocole opératoire habituel (COURTOIS¹⁴).

Nos résultats sont réunis dans le Tableau I.

Examions tout d'abord les comportements des deux substrats isolés : l'hydrolyse de I fournit le premier jour des esters phosphoriques moins riches en phosphore que l'inositolhexaphosphate et oxydables par l'acide périodique en dérivés aldéhydiques.

Le second jour ces composés sont dédoublés, car l'inositol formé n'engendre pas de composés aldéhydiques par oxydation périodique (MME FIÉVET¹⁵).

Il en résulte que tandis qu'entre le premier et le second jour de l'hydrolyse les quantités d'acide phosphorique libéré et d'acide périodique réduit augmentent, par contre la quantité d'aldéhydes engendrés par l'oxydation périodique diminue notablement.

Avec le glycérophosphate, au contraire, le glycérol libéré réduit deux molécules d'acide périodique en donnant naissance à deux molécules d'aldéhyde (formaldéhyde) (MALAPRADE¹⁶; FLEURY et FATOME¹⁷) ; les quantités d'acide périodique N/10 réduit et d'aldéhydes M/10 libérés par oxydation sont, aux erreurs d'expérience près, identiques. Ces quantités, ainsi que celle d'acide phosphorique libéré, augmentent régulièrement au cours de l'hydrolyse.

Examions maintenant les résultats obtenus avec les mélanges des deux substrats.

α . Les quantités d'acide phosphorique libérées sont toujours supérieures à celles libérées de l'un ou l'autre des substrats isolés ; par contre elles sont toujours nettement inférieures à la somme des quantités libérées à partir de chaque substrat seul.

β . Les résultats sont plus irréguliers pour la mise en liberté des fonctions α glycol ; il s'en libère toujours beaucoup moins que la somme des quantités libérées de chaque substrat seul. Après 48 heures de réaction avec 10 ml de G et 10 ml de I comme avec 10 ml de G et 20 ml de I il se libère un peu plus de fonctions α glycol qu'avec G seul. En 24 heures avec ces deux derniers mélanges et en 24 ou 48 heures avec les deux autres mélanges la quantité de fonctions α glycol libérées est nettement inférieure à celle obtenue avec la même dose de G seul. Il est donc indiscutable que la présence de I ralentit l'hydrolyse de G.

* Le glycérol libéré de G réduit 2 molécules d'acide périodique en donnant naissance à deux molécules de formaldéhyde. L'inositol réduit environ 6 molécules d'acide périodique sans donner naissance à des fonctions aldéhydiques. Les inositophosphates formés transitoirement au cours de l'hydrolyse de I réduisent l'acide périodique et sont oxydés en esters phosphoriques à fonction aldéhydique.

TABLEAU I

HYDROLYSE DE L'INOSITOPHOSPHATE ET DU GLYCÉROPHOSPHATE SEULS OU ASSOCIÉS

Solution M/10 de glycérophosphate 0 à 20 ml ; solution M/10 (en phosphore) d'inositophosphate 0 à 20 ml ; tampon acide acétique N/1-acétate de sodium N/1, pH 5.2, 20 ml ; macération de son à 2 % 15 ml ; H₂O q.s.p. 100 ml ; hydrolyse à 40° et pH 5.2.

ml de solution de glycéro-phosphate	ml de solution d'inosito-phosphate	Durée de l'hydrolyse (en heures)	ml de solution de PO ₄ H ₃ M/10 libérés *	ml d'acide periodique N/10 réduits *	ml d'aldéhydes M/10 libérés par oxydation periodique *
0	10	24	7.1	4.0	2.25
		48	8.6	6.75	0.25
0	20	24	9.7	1.75	1.0
		48	11.4	4.25	0.25
10	0	24	3.6	5.0	5.0
		48	4.0	6.0	5.75
10	10	24	8.0	4.5	3.25
		48	9.5	8.5	4.0
10	20	24	11.4	4.0	3.0
		48	13.3	8.0	3.75
20	0	24	5.7	8.5	8.75
		48	6.6	11.0	11.25
20	10	24	9.3	5.25	4.5
		48	10.3	9.75	3.75
20	20	24	13.0	5.25	4.75
		48	14.0	9.25	7.0

* Ces chiffres sont rapportés à la totalité du mélange réactionnel (100 ml).

Par contre, dans tous les mélanges il se libère plus de fonctions α -glycol qu'à partir de la même dose de I seul ; on ne peut qu'en déduire que G se trouve dédoublé en présence de I.

γ. Les précédentes déductions sont confirmées par le dosage des aldéhydes formés après oxydation periodique. Nous avons signalé que les produits d'hydrolyse de I

oxydés engendrent une quantité d'aldéhydes nettement inférieure à celle de formaldéhyde apparaissant après oxydation du glycérol libéré de G.

Dans tous les mélanges des deux substrats nous avons dosé toujours plus d'aldéhydes qu'à partir de la même dose de I seul mais toujours moins qu'après hydrolyse de G seul.

Dans un cas cet écart est particulièrement saillant ; nous avons obtenu 0.25 ml d'aldéhydes M/10 à partir de 10 ml de I, 11.25 ml à partir de 20 ml de G. Dans un mélange de 20 ml de G et 10 ml de I nous n'en trouvons que 3.75 ml, alors que nous aurions eu 11.5 ml si les deux substrats avaient été hydrolysés aussi rapidement mélangés que séparés.

De l'ensemble de nos résultats nous pouvons conclure sans équivoque que dans le mélange des deux substrats l'hydrolyse de G se trouve ralentie ; en se basant sur la quantité d'acide phosphorique libéré dans ces essais l'hydrolyse de I n'apparaît pas être sensiblement réduite. Ces faits seraient en faveur de l'existence d'un seul enzyme ; en effet par suite de l'affinité plus grande de l'enzyme pour I que pour G, l'enzyme doit se fixer de préférence sur I et de ce fait le dédoubler avant G.

Mais dans ces essais nous devons à nouveau tenir compte du fait que les phosphatases banales peuvent s'attaquer aux produits intermédiaires d'hydrolyse de I. D'après la proportion de fonctions α glycol libérées et d'aldéhydes en dérivant c'est surtout dans le second jour que l'hydrolyse de G est retardée ; c'est-à-dire quand la phosphatase banale se trouve en présence de deux substrats qu'elle peut transformer : d'une part G, d'autre part les produits intermédiaires de l'hydrolyse de I. Un fait est en faveur de l'existence de deux enzymes : les quantités d'acide phosphorique libérées dans les mélanges sont supérieures aux quantités libérées par l'un ou l'autre substrat seul. Mais ces quantités sont toujours inférieures à la somme des quantités libérées des substrats isolés. Deux interprétations apparaissent possibles : 1°. phytase spécifique de I et phosphatase distincte dédoublant G et les produits intermédiaires d'hydrolyse de I. 2°. phytase phytophosphatase dédoublant G et I et phosphatase banale dédoublant G et les produits intermédiaires de l'hydrolyse de I.

Nos résultats montrent simplement qu'il y a interdépendance entre l'hydrolyse des deux substrats et que la question est fort complexe.

Nous avons recherché si le ralentissement de l'hydrolyse de G provenait d'une action inhibitrice concurrente de I ; nous nous sommes donc adressés à un enzyme actif sur G et pratiquement inactif sur I : la phosphatase d'Amande. Nos résultats (Tableau II) indiquent que I n'exerce qu'une minime inhibition sur l'hydrolyse de G ; cette inhibition ne paraît pas être une inhibition concurrente, car G demeurant constant, elle est sensiblement indépendante de la concentration de I.

Si dans le son I n'est pas un inhibiteur de l'hydrolyse de G le ralentissement de l'hydrolyse de ce dernier indiquerait que c'est le même enzyme qui se partage entre I et G et du fait de la plus grande affinité pour I fixe et hydrolyse de préférence ce dernier ; le ralentissement de l'hydrolyse de G en présence de I est en faveur de l'existence d'une phytase phytophosphatase active à la fois sur G et I. Cette phytase phytophosphatase serait associée à une phosphatase banale inactive sur I, active sur G et les produits intermédiaires d'hydrolyse de I formés par la phytase phytophosphatase. Cette interprétation est celle qui rend le mieux compte des phénomènes complexes observés dans l'hydrolyse de G et I associés.

TABLEAU II

ACTION DE L'ÉMULSINE D'AMANDES DOUCES SUR LE GLYCÉROPHOSPHATE ET L'INOSITO-
PHOSPHATE

(24 heures à 15° avec 0.05 g d'émulsine précipitée par l'acétone, pH 5.2).
 Ces chiffres représentent le nombre de mmg de P libérés dans ces conditions expérimentales.

ml de glycérophosphate M/10	ml d'inositolphosphate M/10 en phosphore	mg de P libérés
0	5	0.36
0	10	0.9
0	20	1.35
5	0	2.7
5	5	2.15
5	10	2.5
5	20	2.9
10	0	3.6
10	10	3.4
10	20	3.6
20	0	4.5
20	5	3.8
20	10	4.05
20	20	4.7

e. *Inactivation des enzymes en fonction de la réaction de milieu.* Il est fréquent de pouvoir différencier deux enzymes en se basant sur leur plus ou moins rapide inactivation en milieu acide ou alcalin. Nous mélangeons 10 ml de macération de son à 2 % à 10 ml de divers tampons ; le mélange est conservé 24 h à 10°, puis placé 30 min à 40°. La réaction du milieu est alors ajustée à pH 5.2 par addition de solution acide ou alcaline, selon les cas. Nous complétons à 50 ml et déterminons l'activité de 20 ml de préparation diastasique en la faisant réagir 24 h à 37° sur 5 ml de substrat M/10 (en acide phosphorique estérifié). Nous comparons à l'activité d'une préparation témoin : macération de son conservée 24 h à la glacière.

Nos résultats sont groupés dans le Tableau III.

Le séjour de la préparation diastasique dans des milieux de pH différents a modifié inégalement les activités glycérophosphatasique et phytasique. En milieu alcalin les

TABLEAU III

INACTIVATION DE LA PHYTASE ET DE LA GLYCÉROPHOSPHATASE EN FONCTION DU PH

pH où a été placé l'enzyme	3.6	4.1	4.5	5.1	8.5	10.0
G	116	166	180	233	0	0
activité *						
I	63	66	85	105	0	0
rapport des deux activités	1.84	2.5	2.1	2.2		

* Activité calculée par rapport à celle de l'essai témoin qui a libéré 1.35 mg de P à partir de G et 8.1 à partir de I (Témoin activité 100).

deux enzymes ont perdu toute activité; par contre, en milieu acide la glycérophosphatase est activée, peut être par suite de la destruction d'un inhibiteur naturel. NGUYEN VAN THOAI^{18, 19} a en effet mis en évidence la présence d'inhibiteurs naturels dans diverses préparations phosphatasiques d'origine végétale, après autolyse ou adsorption, il a pu activer les enzymes associés à l'inhibiteur.

A la différence de la glycérophosphatase la phytase est toujours inactivée en milieu acide ; il en résulte que le rapport des deux activités diastasiques varie selon le pH où l'on a conservé la préparation. Ces écarts, et en particulier l'activation de la glycérophosphatase et l'inhibition de la phytase, sont en faveur de l'existence de deux enzymes différents.

f. *Inactivation thermique.* L'inactivation thermique est l'une des plus élégantes méthodes de séparation des enzymes ; en pratique elle est assez rarement applicable par suite de faibles écarts entre les températures mortelles des enzymes que l'on désire séparer.

Nous mesurons 30 ml de macération de son dans un grand tube à essais ; ce dernier est plongé 5 minutes dans une masse de deux litres d'eau chauffée à la température choisie : le tube est alors refroidi rapidement sous un courant d'eau et nous déterminons l'activité de la préparation sur G et sur I.

TABLEAU IV
INACTIVATION THERMIQUE DES ENZYME DU SON
(5 minutes à pH 6.0)

Température de l'essai		60°	69°	71°	72°5	74°	75°	80°	85°
pourcentage d'inactivation *	G	27 16	40 30	66 80	77 92	77 95	80 98	97 100	97 100

* Calculé après détermination de l'activité de la préparation chauffée et d'un échantillon témoin non chauffé (activité = 100).

Les résultats (Tableau IV) indiquent que de 60 à 69° la glycérophosphatase est inactivée plus rapidement que la phytase; par contre, à partir de 71° la phytase se révèle plus thermolabile et elle est complètement inactivée à partir de 80°; la préparation chauffée à cette température conserve une faible mais nette activité glycérophosphatasique. Ces faits indiquent que le son renferme un enzyme actif sur G et inactif sur I, toutefois les écarts obtenus sont trop peu accentués pour que l'on puisse séparer une glycérophosphatase d'activité suffisante après destruction de la phytase associée.

g. *Action de quelques effecteurs chimiques.* Nous avons choisi trois effecteurs possédant une action caractéristique sur les phosphatasées du type II : 1°. le fluorure de sodium, inhibiteur de toutes les phosphatasées étudiées de ce type^{3, 4, 12}. 2°. le molybdate de sodium inhibiteur des phosphatasées actives en milieu acide (COURTOIS ET BOSSARD²⁰). 3°. le sulfocyanate d'ammonium qui active un certain nombre de phosphatasées du type II (COURTOIS ET BOSSARD²¹).

a. *Action de fluorure de sodium.* Nos résultats (Tableau V) indiquent que le fluorure de sodium exerce une action inhibitrice du même ordre de grandeur sur l'hy-

TABLEAU V

ACTION DU FLUORURE DE SODIUM SUR LES ENZYMES DU SON

Concentration moléculaire en FNa dans le milieu	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$
Activité relative *	G . .	96	48	55	37
	I . .	97	33	52	35

* Calculée par rapport à un essai témoin sans fluorure (activité = 100).

drolyse des deux substrats, ces inhibitions augmentent de façon semblable avec la concentration en fluorure.

Nous avons cherché à préciser le mécanisme de cette inhibition. Avec certaines phosphatases II, celle de l'urine en particulier (COURTOIS ET BIGET²²), le fluorure se comporte comme un inhibiteur concurrent: il tend à se fixer sur l'enzyme et à en déplacer le substrat. De ce fait pour des doses constantes d'enzyme et d'effecteur le pourcentage d'inhibition est inversement proportionnel à la concentration du substrat. Avec les phosphatases II d'Amandier et Moutarde blanche l'action du fluorure est très différente (J. COURTOIS⁴): le fluorure accroît l'affinité de l'enzyme pour le substrat, mais inhibe la décomposition de ce substrat par la partie active de l'enzyme; de ce fait le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en substrat.

Nous avons fait réagir pendant 24 h 5 ml de macération de son à 2 % sur des quantités variables des deux substrats, pour une concentration M/100 en fluorure de sodium dans le milieu.

L'inhibition (Tableau VI) s'exerce de façon différente pour les deux substrats. Avec G l'inhibition est pratiquement indépendante de la concentration de ce substrat, le fluorure ne paraît pas modifier l'affinité de la glycérophosphatase pour G. La glycérophosphatase du son se comporte donc différemment des autres phosphatases I étudiées: celle de l'urine d'une part et celles des amandes et de la moutarde, d'autre part.

Avec I l'inhibition fluorée croît tout d'abord avec la concentration en substrat et diminue ensuite, ce comportement irrégulier provient sans doute de la complexité de l'hydrolyse de I.

Avec cette restriction les différences observées entre les comportements des deux substrats sont en faveur de l'existence de deux enzymes distincts.

TABLEAU VI

ACTION INHIBITRICE DU FLUORURE DE SODIUM M/100 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

(24 heures à 45°, pH 5.2, volume du liquide réactionnel 50 ml)

ml de substrat M/10	1	2	4	6	8	10	20	30
activité *	G . .	27	35	25	27	28	37	32
	I . .	84	63	48	30	29	30	47

* Calculée par rapport à un essai témoin similaire en l'absence de fluorure (activité = 100).

β. Action du molybdate de sodium. Nous avons déterminé l'activité diastasique en présence de diverses doses de molybdate de sodium (Tableau VII). L'inhibition est

TABLEAU VII

ACTION INHIBITRICE DU MOLYBDATE DE SODIUM SUR LES ENZYMES DU SON
(24 heures à 37°, pH 5.2, volume du liquide réactionnel 50 ml)

Concentration moléculaire en molybdate dans le milieu réactionnel	$12 \cdot 10^{-6}$	$25 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$
Activité G . . .	12.0	2.5	infime	infime	nulle
relative * I . . .	35.0	18.0	9.0	9.0	1.0

* Calculée par rapport à un essai témoin en l'absence de molybdate (activité 100).

plus accentuée avec G qu'avec I, les écarts sont cependant minimes. Avec M. BOSSARD²⁰ nous avons observé que l'inhibition de la phosphatase d'Amande par le molybdate est en relation avec la présence dans le milieu de substances pouvant former des complexes molybdiques ; c'est ainsi que de fortes doses de ces substances (citrate-glycérophosphate) réduisent considérablement l'inhibition molybdique. Les deux substrats G et I peuvent former des complexes molybdiques et il est possible que I restreigne plus fortement l'action inhibitrice du molybdate que G. Il nous a cependant été possible de mettre en évidence une concentration en molybdate permettant une lente hydrolyse de I tandis que G n'est pratiquement pas dédoublé.

Nous mettons en contact 5 ml de macération de son à 1 % et 5 ml de substrat M/10 en phosphore estérifié, à une concentration $2 \cdot 10^{-5}$ M en molybdate dans le milieu il se libère en 3 jours 5 milligrammes de phosphore à partir de I et 0.15 mg à partir de G ; pour une concentration $3.75 \cdot 10^{-5}$ M en molybdate il se libère 3.5 mg de phosphore à partir de I, tandis que G n'est pas hydrolysé.

Nous n'avons pas recherché si dans un mélange de G et I, ce dernier serait seul hydrolysé ; en effet l'acide phosphorique libéré agit comme tous les corps susceptibles de former des complexes molybdiques en réactivant l'enzyme inhibé (COURTOIS ET BOSSARD²⁰).

TABLEAU VIII

ACTION DU SULFOCYANATE D'AMMONIUM SUR LES ENZYMES DU SON
(24 heures à 37°, pH 5.2, macération de son à 1 % ; 10 ml essai a ; 3 ml essai b ; 6 ml essai c).

Concentration moléculaire en sulfocyanate dans le milieu	$4 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$
Activité G a	118	118	109
I b	100	100	80
relative * I c	94	82	82

* Calculée par rapport à un essai témoin similaire en l'absence de fluorure (activité 100).

γ. Action du sulfocyanate d'ammonium. Nos résultats (Tableau VIII) indiquent que le sulfocyanate accélère faiblement l'hydrolyse de G, celle de I n'est jamais accrue et est parfois ralentie. Cette différence d'action est en faveur de l'existence de deux enzymes distincts.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats est assez délicate, presque tous les résultats indiquent que G et I ne sont pas dédoublés par le même enzyme. S'il existe une glycéro-phosphatase et une phytase spécifique, chacun des enzymes étant inactif sur l'autre substrat les propriétés de ces deux enzymes semblent cependant très voisines et cette analogie de comportement apparaît assez troublante.

Une interprétation plus nuancée pourrait être la suivante : le son renferme une *phytase phytoprophosphatase* active à la fois sur G et I, cet enzyme est associé à une phosphatase banale inactive sur I mais active sur G et les produits intermédiaires de l'hydrolyse de I.

Nous avons indiqué que l'hydrolyse de mélanges de G et I était en faveur de cette conception ; il est certain que G peut être hydrolysé par un enzyme inactif sur I : la préparation chauffée à 80° est peu active sur G et inactive sur I, le sulfocyanate sans action sur I, accélère faiblement l'hydrolyse de G.

Ceci n'a rien de surprenant puisque la plupart des préparations phosphatasiques actives sur G sont inactives sur I.

Par contre aucun fait ne montre que le son renferme un enzyme actif sur I et inactif sur G.

Tous les résultats montrent que l'on est en présence d'activités diastasiques voisines, ceci se comprend aisément avec notre interprétation, puisque chaque enzyme peut agir non seulement sur son substrat, mais intervenir dans l'hydrolyse de l'autre substrat : phytase phytoprophosphatase dédoublant G, phosphatase banale dédoublant les inositophosphates apparaissant au cours de l'hydrolyse de I.

Les méthodes d'étude de la cinétique des enzymes ne permettant pas de conclure à l'existence d'enzymes distincts, nous avons appliqué au son les techniques de purification et séparation des enzymes.

Ces recherches exposées dans le 3^e mémoire ont fourni des résultats en faveur de l'existence d'une phytase phytoprophosphatase associée à une phosphatase banale.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'action du son sur le β glycérophosphate et l'inositolhexaphosphate :

1. Le pH optimum d'hydrolyse des deux substrats est situé vers pH 5.0 — 5.6.
2. La préparation diastasique a une plus grande affinité pour l'inositolhexaphosphate que pour le glycérophosphate.
3. Les pouvoirs fixateurs pour les deux substrats sont sensiblement égaux.
4. Dans un mélange des deux esters l'hydrolyse du glycérophosphate est ralenti par l'inositolhexaphosphate.
5. Les activités sur les deux substrats disparaissent après séjour de la préparation en milieu alcalin ; elles sont modifiées inégalement après séjour en milieu acide.
6. Par chauffage, on peut conserver une très faible activité sur le glycérophosphate, tandis que l'inositolhexaphosphate n'est plus transformé.

7. Le fluorure de sodium inhibe selon des modalités différentes l'hydrolyse des deux esters.

8. Le molybdate de sodium inhibe plus fortement l'hydrolyse du glycérophosphate que celle de l'inositophosphate.

9. Le sulfocyanate d'ammonium accélère l'hydrolyse du glycérophosphate et n'accélère pas celle de l'inositophosphate.

Nous proposons une interprétation qui tend à concilier ces diverses données : le son renfermerait une phytase phytophosphatase active sur les deux substrats, associée à une phosphatase banale inactive sur l'inositohexaphosphate mais active sur le glycérophosphate et certains des inositophosphates moins riches en phosphore que l'inositohexaphosphate.

CONCLUSIONS

We have studied the action of bran on β -glycerophosphate and inositohexaphosphate

1. The pH optimum of hydrolysis of the two substrates lies about pH 5.0—5.6.

2. The diastase preparation has a greater affinity for inositophosphate than for glycerophosphate.

3. The fixation capacities for the two substrates are approximately the same.

4. In a mixture of the two esters the hydrolysis of the glycerophosphate is slowed down by the inositophosphate.

5. The actions on the two substrates disappear on leaving the preparation in an alkaline medium ; they are modified to unequal extents on standing in an acid medium.

6. On heating there remains a very weak action on the glycerophosphate, while the inositophosphate ceases to be transformed.

7. Sodium fluoride inhibits the hydrolysis of the two esters, but in different manners.

8. Sodium molybdate inhibits the hydrolysis of glycerophosphate more strongly than that of inositophosphate.

9. Ammonium thiocyanate accelerates the hydrolysis of glycerophosphate, but not that of inositophosphate.

We suggest an interpretation to reconcile these different facts : bran contains a phytasephytophosphate active on both substrates, associated with a common phosphatase inactive on inositophosphate but active on glycerophosphate and certain inositophosphates that are richer in phosphorus than inositohexaphosphate.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben die Wirkung von Kleie auf Glyzerophosphat und Inositohexaphosphat untersucht.

1. Das optimale Hydrolyse-pH der beiden Substrate liegt bei ca. pH 5.0—5.6.

2. Das Diastase-Präparat hat eine grössere Affinität für das Inositophosphat als für das Glyzerophosphat.

3. Das Fixierungsvermögen ist ungefähr das gleiche für die beiden Substrate.

4. In einer Mischung der Estern wird die Hydrolyse des Glyzerophosphats durch das Inositophosphat gehemmt.

5. Die Einwirkungen auf beiden Substraten verschwinden nach Liegen des Präparates in alkalischem Medium ; sie werden ungleichmässig verändert nach Liegen in säurehaltigem Medium.

6. Durch Heizung kann man eine sehr schwache Aktivität auf dem Glyzerophosphat behalten, während das Inositophosphat keine weitere Veränderung aufweist.

7. Das Natriumfluorid hemmt auf verschiedene Weisen die Hydrolyse der beiden Estern.

8. Das Natriummolybdat hemmt die Hydrolyse des Glyzerophosphats viel stärker als die des Inositophosphats.

9. Das Ammoniumsulfocyanat beschleunigt die Hydrolyse des Glyzerophosphats, aber nicht die des Inositophosphats.

Wir schlagen eine Auslegung vor, die darauf zielt, diese verschiedenen Daten in Übereinstimmung zu bringen : Die Kleie enthält wahrscheinlich eine Phytase Phytophosphatase, welche auf den beiden Substraten aktiv, und an irgendeiner Phosphatase gebunden ist, welche inaktiv auf dem Inosithexaphosphat, aber aktiv auf dem Glyzerophosphat und gewissen Inositophosphaten ist, welche minder reich an Phosphor sind als das Inositophosphat.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ T. POSTERNAK, *Die Methoden der Fermentforschung*, **2** (1941) 944.
- ² J. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **27** (1945) 411.
- ³ J. ROCHE ET J. COURTOIS, *Les phosphatasées, Exposés annuels Biochimie médicale*, **4** (1944) 259.
- ⁴ J. COURTOIS, *Th. Doct. Sc. phys.*, Paris 1938.
- ⁵ P. FLEURY ET J. COURTOIS, *Enzymologia*, **1** (1937) 377.
- ⁶ P. FLEURY ET J. COURTOIS, *Enzymologia*, **5** (1938) 254.
- ⁷ P. FLEURY, *Th. Doct. Sc.*, Paris 1924.
- ⁸ P. FLEURY ET J. COURTOIS, *Les diastases*, Paris (à l'impression).
- ⁹ J. COURTOIS ET P. DENIS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **19** (1937) 496.
- ¹⁰ J. COURTOIS ET P. DENIS, *Enzymologia*, **5** (1938) 288.
- ¹¹ J. COURTOIS ET P. DENIS, *Enzymologia*, **6** (1939) 325.
- ¹² MME J. RICAUD-MANOUVRIER, *Th. Doct. Univ. pharm.*, Paris 1943.
- ¹³ H. COLIN, *Les diastases*, Paris 1931.
- ¹⁴ J. COURTOIS, *Ann. chim. anal.*, **25** (1943) 2.
- ¹⁵ MME Y. FIEVET, *Th. Doct. Univ. pharm.*, Paris 1945.
- ¹⁶ L. MALAPRADE, *Bull. Soc. Chim. France*, **53** (1938) 683.
- ¹⁷ P. FLEURY ET P. FATOME, *J. pharmac. Chim.*, **21** (1935) 247.
- ¹⁸ NGUYEN VAN THOAI, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **23** (1941) 1183 et 1277.
- ¹⁹ NGUYEN VAN THOAI, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **24** (1942) 1077.
- ²⁰ J. COURTOIS ET M. BOSSARD, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **26** (1944) 464.
- ²¹ J. COURTOIS ET M. BOSSARD, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **27** (1945) 406.
- ²² J. COURTOIS ET P. BIGET, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **25** (1943) 103.

Reçu le 20 avril 1946.