

# INACTIVATION ET RÉACTIVATION COMPLÈTES DE LA PHOSPHOMONO-ESTÉRASE ALCALINE ET INTERCHANGEABILITÉ DES MÉTAUX ACTIFS

par

NGUYEN-VAN THOAI, JEAN ROCHE ET MADELEINE ROGER  
*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille (France)*

## I. INTRODUCTION

La phosphomonoestérase alcaline (rein, intestin) perd pratiquement toute activité après dialyse prolongée contre des solutions de  $p_H$  inférieur à 6.0 (H. ALBERS, BEYER, BOHNENKAMP et MÜLLER<sup>1</sup>, D. ALBERS<sup>2</sup>) ou contre des milieux neutres renfermant des formateurs de complexe, tels que les cyanures alcalins, le diéthyldithiocarbamate de sodium, l' $\alpha\alpha$ -dipiridyl (CLOETENS<sup>3</sup>, J. ROCHE ET NGUYEN-VAN THOAI<sup>4</sup>). L'enzyme ainsi traité recouvre une partie de son pouvoir déphosphorylant lorsqu'on le met en présence, dans le premier cas de son dialysat, dans le second de certains cations divalents, entre autres  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  et  $Zn^{++}$ . Les conditions dans lesquelles on observe ces phénomènes ont fait considérer l'inactivation et la réactivation de la phosphatase alcaline comme traduisant la dissociation réversible, soit d'une cophosphatase organique diffusible<sup>1 2 5</sup> soit de métaux jouant le rôle de coenzyme<sup>4, 6</sup>.

Se basant sur ces faits, de nombreux auteurs attribuent une fonction coenzymatique à des cations activateurs. Pour eux, diverses phosphatases alcalines sont des métalloprotéines renfermant spécifiquement, les unes du magnésium, les autres du zinc, du manganèse, du cobalt (CLOETENS<sup>3</sup>, HOVE, ELVEHJEM ET HART<sup>6</sup>, JENNER ET KAY<sup>7</sup>, MASSART ET DUFAIT<sup>8</sup>, MASSART ET VANDENDRIESEN<sup>9</sup>). Selon CLOETENS<sup>3</sup>, la présence de deux métaux, le zinc et le magnésium, serait même indispensable à l'activité de la phosphatase rénale. Toutefois, l'argumentation conférant un rôle spécifique à un ou à deux métaux en raison de leur aptitude à activer des préparations enzymatiques ne présente pas une sécurité absolue, car l'intensité de l'effet exercé par les cations est fonction du degré de pureté de la phosphatase et son sens peut même s'inverser dans certaines conditions (NGUYEN-VAN THOAI<sup>10</sup>, NGUYEN-VAN THOAI ET RAYMOND<sup>11</sup>). Par ailleurs, de nombreux auteurs, entre autres BAMANN, HEUMÜLLER, WERNER et CARL<sup>12</sup>, ROCHE ET NGUYEN-VAN THOAI<sup>(4)</sup> et travaux non publiés), ont observé qu'une série de cations divalents, dont  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ , et  $Zn^{++}$  sont en général les plus actifs, sont aptes à renforcer ou à restaurer l'activité phosphatasique, à des concentrations particulières à chacun. Aussi peut-on se demander si et dans quelle mesure un métal peut présenter une spécificité étroite comme constituant de la phosphatase alcaline d'un organe et d'une humeur déterminés, ou si certains éléments divalents, entre autres, le magnésium, le manganèse, le zinc et, accessoirement, le calcium et le fer ne sont pas à cet égard interchangeables.

L'interprétation des faits observés demeure hypothétique. En effet, d'une part, il n'est pas possible de préciser si les produits réactivant la phosphatase alcaline renferment un coenzyme ou des effecteurs et, d'autre part, la répétition de certains travaux

antérieurs conduit à des résultats parfois contradictoires \*. Il en est sans doute ainsi pour deux raisons, à savoir : l'emploi fréquent de préparations insuffisamment purifiées, non comparables entre elles et renfermant en proportions diverses des constituants susceptibles de former des complexes avec les métaux, et, par ailleurs, la méconnaissance des conditions absolues d'activation et de réactivation de la phosphatase alcaline par des cations, conditions ne pouvant être définies qu'avec des produits purs ou hautement purifiés.

Nous nous sommes proposés d'entreprendre l'étude de la constitution de la phosphomonoestérase alcaline en mettant à profit les résultats de nos recherches antérieures sur la purification de cet enzyme<sup>13</sup> et sur son activation par des cations divalents en présence d'acides aminés<sup>5</sup> ; ce mémoire expose la première partie de notre travail. L'élimination d'impuretés métalliques au cours de la préparation de produits purifiés et l'activation de ceux-ci par des cations à concentration optima couplés à des acides aminés formant avec eux des complexes, nous ont en effet paru être des conditions en dehors desquelles une telle étude ne saurait donner que des résultats incertains. Il convenait en effet, à la fois d'éliminer des impuretés susceptibles de troubler la réactivation et d'assurer celle-ci au degré le plus élevé, ce qui n'est possible qu'en présence de cations et d'un acide aminé. Enfin, il était important de réaliser une inactivation et une réactivation complètes de la phosphatase pour discuter le mécanisme de ces processus, afin de distinguer l'action d'effecteurs et celle de produits susceptibles de participer à la structure de l'enzyme. Or, les recherches antérieures sur la reconstruction de celui-ci à l'aide d'un coenzyme hypothétique, dissociable en milieu faiblement acide, ont montré que l'on ne restaure que 20 à 25 pour 100 de l'activité initiale si la dissociation préalable de la phosphatase a été pratiquement totale, le retour au pouvoir phosphoestérasique primitif n'étant observé que si la dialyse à  $p_H = 6.0$  n'a pas réduit celui-ci de plus de 60 à 70 pour 100 (D. ALBERS<sup>2</sup>). Quant aux réactivations par des cations, elles n'ont en général été précédées que d'une disparition partielle de la propriété déphosphorylante des milieux étudiés, due parfois à la présence de formateurs de complexes jouant le rôle d'inhibiteurs (voir note ci-dessous).

Ceci étant, nous avons considéré que l'on obtiendrait des données utiles sur le rôle et la spécificité des métaux divalents en réalisant l'inactivation complète de la phosphatase par dissociation d'un coenzyme organique hypothétique ou d'un métal et sa réactivation par ceux-ci. Nous nous sommes adressés pour obtenir la première à la dialyse prolongée à 37° contre de l'eau bidistillée, et pour assurer la seconde à l'addition de divers cations en présence d'alanine.

Le but de ce travail est :

1°. de préciser les conditions d'inactivation totale par dialyse prolongée contre

\* Les expériences ayant amené CLOETENS<sup>3</sup> à conclure que la phosphatase alcaline du rein renferme nécessairement du zinc et du magnésium comme métaux actifs sont basées sur le fait qu'après dialyse contre des solutions de cyanure de potassium, puis de bicarbonate de sodium, l'addition d'un sel de magnésium ne réactive l'enzyme que si elle a été précédée de celle d'un sel de zinc. Reprenant ces essais, nous avons constaté qu'il n'en est pas ainsi lorsque des préparations purifiées (fractionnement acétonique des préparations obtenues par la technique de D. ALBERS<sup>14</sup>) de l'enzyme sont inactivées par dialyse prolongée contre des solutions de cyanures alcalins (6 jours à 37°), puis de l'eau bidistillée (15 à 20 jours à 37°). L'addition d'ions  $Mg^{++}$  permet alors à elle seule de réactiver au maximum la phosphatase et il est probable que l'effet de l'ion  $Zn^{++}$  dans les conditions adoptées par CLOETENS est dû à l'élimination incomplète du radical—CN, inhibiteur de l'enzyme,  $Zn^{++}$  intervenant alors comme antiinhibiteur.

de l'eau bidistillée de la phosphatase alcaline de l'intestin purifiée et celles de sa réactivation complète par des cations divalents ;

2°. de démontrer l'interchangeabilité des cations divalents dans cet enzyme ;

3°. de discuter le rôle coenzymatique éventuel d'un métal et le mécanisme de sa participation aux processus d'inactivation et de réactivation étudiés.

## 2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

a. *Matériel d'étude et techniques.* La phosphatase alcaline a été préparée par une technique dérivant de celle permettant d'obtenir l'enzyme cristallisé (NGUYEN-VAN THOAI, ROCHE ET SARTORI<sup>13</sup>), à partir des muqueuses intestinales de Chien, matériel beaucoup plus actif que celui provenant des animaux d'abattoir. 0,5 kilogramme de tissu non autolyisé, prélevé par raclage au scalpel de la surface interne de l'intestin, est mis en suspension dans 1,0 litre d'eau bidistillée renfermant 25 pour 100 d'acétone pure et additionné de 100 cc d'un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de toluène (H. ALBERS ET E. ALBERS). Après deux jours de séjour à température du laboratoire en agitant deux à trois fois par jour, on filtre sur papier et on refroidit progressivement à  $-2^{\circ}$  environ. On ajoute par petites portions de l'acétone pure, fraîchement distillée, refroidie à  $-5^{\circ}$  jusqu'à ce que le milieu en renferme 60 pour 100. Après séjour d'un quart d'heure dans un bain à  $-5^{\circ}$ , on siphonne le liquide au-dessous duquel s'est déposé un précipité blanc, que l'on isole par centrifugation. Ce précipité est lavé trois fois à l'acétone pure, anhydre, refroidie à  $-5^{\circ}$  et séché dans le vide ; il constitue une préparation de phosphatase brute, susceptible d'être conservée plusieurs mois sous vide. Le produit ainsi obtenu est partiellement soluble dans l'eau ; on en prépare un extrait en le trituant au mortier avec 20 fois son poids d'eau bidistillée, puis on complète à 50 volumes de celle-ci. Après filtration du résidu insoluble (mucoprotéines dénaturées), la solution aqueuse est portée à  $0^{\circ}$ , puis fractionnée par addition d'acétone pure refroidie à  $-5^{\circ}$ , introduite dans le milieu par petites portions et en agitant le récipient placé dans un bain à  $-5^{\circ}$ . La fraction protéique précipitant à la concentration de 38 pour 100 en acétone, pauvre en enzyme et riche en impuretés, est rejetée, tandis que l'on conserve celle précipitant aux concentrations comprises entre 38 et 55 pour 100 en acétone \*. Ces dernières sont séparées par centrifugation et l'on chasse l'acétone en faisant passer un courant d'air rapide à la surface des culots protéiques refroidis à  $-5^{\circ}$ , lesquels renferment la plus grande partie de la phosphatase et de petites quantités de mucoprotéine. Au lieu de procéder à la cristallisation de la première, opération qui comporte des pertes d'activité non négligeables à partir de ce matériel, nous avons traité par l'eau bidistillée les précipités obtenus et utilisé leurs solutions aqueuses à 0,5—1,0 pour 100. Nos expériences ont donc été poursuivies sur une phosphatase alcaline d'un assez haut degré de pureté, les fractions du produit brut solubles dans les conditions indiquées étant en général susceptibles de permettre la cristallisation en masse de l'enzyme.

L'activité phosphatasique des solutions non dialysées a été déterminée sur 0,2 cc de celles-ci en présence de 4 cc de solution tampon de MICHAËLIS au véronal sodique de  $\text{pH} = 8,8$ , de 2 cc de solution M/10 de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium et de 3,8 cc d'eau bidistillée, toutes les solutions étant préparées avec cette dernière. L'essai, dont le  $\text{pH}$  est égal à 8,8—8,9, est maintenu à  $37^{\circ}$  pendant 5 minutes, le récipient et les solutions étant portés à cette température avant leur emploi. L'addition d'ions  $\text{Mg}^{++}$  s'est avérée inutile pour activer l'enzyme, probablement en raison de la saturation de celui-ci en métal. L'hydrolyse du substrat est arrêtée au moyen de 0,5 cc d'acide sulfurique à 30 pour 100 et les radicaux phosphoriques libérés sont dorés par colorimétrie (méthode de BRIGGS-ROBISON avec lectures au photomètre de Pulfrich, en utilisant le filtre S<sup>67</sup>).

b. *Inactivation et réactivation complètes de la phosphatase alcaline.* L'inactivation totale de la phosphatase alcaline a été réalisée par dialyse prolongée contre de l'eau

\* Dans les extraits aqueux d'organes frais, la phosphatase alcaline précipite à une teneur sensiblement plus élevée en acétone ; nous reviendrons sur la signification de ce fait.

bidistillée. Cette opération a été poursuivie à 37° en présence de toluène, jusqu'à disparition de tout pouvoir phosphomonoestérasique, ce qui exige environ vingt jours, le liquide dans lequel le sac à dialyse est immergé étant renouvelé tous les deux jours. Il est indispensable de suivre par de fréquents dosages la diminution de l'activité enzymatique, surtout dans la période terminale de l'expérience, car le processus étudié n'est réversible qu'à condition de ne pas opérer sur un produit totalement inactivé depuis plus de 24 heures.

Quant à la réactivation par les métaux divalents en présence d'alanine, elle s'est révélée possible à un degré élevé uniquement après une incubation préalable de l'enzyme additionné de l'acide aminé à  $p_H = 8,8$ , comme tel est également le cas lors du „transport de la cophosphatase”<sup>1</sup> et de la réactivation par l'ion  $Mn^{++}$  de la *l*-leucylpeptidase intestinale (SMITH ET BERGMANN<sup>15</sup>), de l'arginase hépatique (HUNTER ET DOWNS<sup>16</sup>, MOHAMED ET GREENBERG<sup>17</sup>) et de la carboxylase de levure (GREEN, HERBERT ET SUBRAHMANIAN<sup>18</sup>). Les métaux divalents mis en oeuvre dans réaction ont été apportés par des solutions d'acétate de magnésium ou de calcium et de sulfate de fer (ferreux), de manganèse ou de zinc M/10—M/1000 ajoutées à des taux correspondant à ceux indiqués dans les tableaux ci-dessous (concentrations optima ou voisines déterminées au cours de nos recherches antérieures).

Le dosage de l'activité phosphatasique des produits ainsi régénérés a été opéré de la manière suivante : 0,2 cc de solution enzymatique ont été additionnés de 4 cc de solution tampon de MICHAËLIS au véronal sodique de  $p_H = 9,8$  de 0,2 cc de solution M/1 de *dl*-alanine ajustée à  $p_H = 8,8$  et de 2,7 cc d'eau bidistillée et placés pendant deux heures à 37°, puis mélangés à 2 cc de solution m/10 de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium et complétés à 10 cc avec de l'eau bidistillée. Après 5 minutes de séjour à 37°, la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 0,5 cc d'acide sulfurique à 30 pour 100 et les radicaux phosphoriques libérés sont dosés par colorimétrie.

On trouvera ci-dessous les résultats d'une de nos expériences, cités à titre d'exemple et exprimés en gamma de phosphore libérés par minute et par milligramme d'azote protéique présent dans la préparation enzymatique étudiée.

Les faits qui se dégagent des données obtenues sont les suivants : la phosphatase dialysée longuement à 37° contre de l'eau bidistillée n'hydrolyse plus le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium. L'addition d'ions  $Mg^{++}$  et, à un degré moindre, celle d'ions  $Mn^{++}$  en présence d'alanine restaure partiellement l'activité enzymatique initiale,  $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$  et  $Fe^{++}$  étant à cet égard inefficaces. Cette réactivation est plus faible que celle observée dans nos expériences précédentes, faites sur des enzymes moins purifiés et n'ayant pas subi une aussi longue dialyse. Elle est spécifique du pouvoir phosphomonoestérasique, car elle ne va de pair avec l'apparition d'aucune activité pyrophosphatasique. Dans les conditions de nos essais actuels, l'*incubation préalable en présence d'alanine à  $p_H = 8,8$  et à 37° est indispensable pour une réactivation importante de la phosphatase par les cations divalents*. En introduisant ceux-ci immédiatement avant le substrat,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$  sont alors à peu près également activateurs aux concentrations optima indiquées,  $Mg^{++}$  étant à cet égard plus efficace. Il a été possible d'hydrolyser en sa présence jusqu'à 700 millimolécules de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium par gramme d'azote et par minute à  $p_H = 8,8$  et à 37°. Cette activité enzymatique est environ deux fois et demi plus forte que celle de la phosphatase cristal-

TABLEAU I

RÉACTIVATION DE LA PHOSPHOMONOESTÉRASE ALCALINE (intestin de Chien) TOTALEMENT INACTIVÉE PAR DIALYSE PROLONGÉE CONTRE DE L'EAU BIDISTILLÉE, AU MOYEN DE CATIONS DIVALENTS ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  et  $\text{Zn}^{++}$ ) ET EN PRÉSENCE D'ALANINE.

Essais poursuivis avec ou sans incubation de 2 heures à  $37^{\circ}$  en présence de *dl*-alanine avant l'addition des solutions de sels métalliques. Résultats exprimés en gamma de phosphore minéral libérés par minute et par milligramme d'azote protéique à  $\text{pH} = 8,8$  et à  $37^{\circ}$  aux dépens de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium M/50 dans les conditions décrites section a.

Sel métallique ajouté	Concentration moléculaire en sel	Activité (gamma P libérés/minute/mgr. N protéique)
Série I : en présence d'alanine, mais sans incubation préalable avec celle-ci		
Néant	0	0
$\text{SO}_4\text{Fe}$	$1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	0
	$1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	0
$\text{SO}_4\text{Zn}$	$1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	0
	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	0
$\text{SO}_4\text{Mn}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	721
	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	981
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0
	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	0
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	288
	$5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	1.154
	$1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$	1.635
Série II : incubation en présence d'alanine, suivie de l'addition de sels métalliques		
Néant	0	5.461
$\text{SO}_4\text{Fe}$	$1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	14.231
	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	13.261
$\text{SO}_4\text{Zn}$	$1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	14.231
	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	13.261
$\text{SO}_4\text{Mn}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	15.385
	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	13.646
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	14.231
	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	16.364
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$	$1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	18.654
	$5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	21.154
	$1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$	21.154

Activité avant dialyse, sans incubation ni effecteur: 3.336

Activité après dialyse, sans incubation ni effecteur: 0

Activité après dialyse et incubation (2 heures  $\text{pH} = 8,8$ ) sans effecteur: 461

lisée mise en oeuvre en présence de sulfate de magnésium  $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  \* ; elle est du même ordre de grandeur que celles de la zymohexase du muscle (450 millimol gr de substrat/grN/min) et de l'énoïlase de levure ( $1 \cdot 100$  millimol gr de substrat/grN/min) cristallisées par WARBURG ET CHRISTIAN<sup>35, 36</sup>. L'activité la plus élevée des préparations

\* Le produit initial mis en oeuvre dans l'exemple cité (Tableau I) est environ 7 fois moins actif que la préparation réactivée au maximum par Mg. Il est impossible de prendre l'activité d'une phosphatase comme test de sa pureté tant que l'on n'est pas certain d'avoir pu la faire agir dans des conditions où son pouvoir hydrolytique s'exerce au maximum. La définition de ces conditions est l'un des objets même du travail actuel.

de phosphatase alcaline étudiées exprimée en microtitres de gaz (1 mol d'orthophosphate occupant 22,4 l) libérés par mgr de substance et par heure Qp, est égal à 170.000, valeur de Qp très notablement supérieure à celles obtenues jusqu'ici dans le cas du même enzyme purifié par d'autres méthodes<sup>35, 36</sup>.

Les cations activateurs peuvent indifféremment être ajoutés avant ou après incubation en présence d'alanine, à l'exception du manganèse dont l'hydrate précipitant à  $p_H = 8,8$  gêne la réactivation, probablement en dénaturant l'apoenzyme lorsqu'il est maintenu longuement au contact de celui-ci. A cette exception près, l'*action des cations s'exerce aussi bien, que l'enzyme ait subi ou non un contact prolongé avec eux avant addition du substrat*. Dans les conditions adoptées,  $Zn^{++}$  et  $Fe^{++}$  exercent leur effet activateur maximum à l'état de traces ( $1.10^{-7}$ — $1.10^{-6}$  M),  $Mn^{++}$  et  $Ca^{++}$  à des taux plus élevés ( $1.10^{-3}$ — $1.10^{-2}$  M) et  $Mg^{++}$  à forte concentration ( $1.10^{-2}$ — $1.10^{-1}$  M). La nécessité d'une concentration très élevée en magnésium pour réactiver la carboxylase (KUBOWITZ ET LUTTGENS<sup>19</sup>), enzyme renfermant naturellement ce métal à très faible taux, mérite d'être rapprochée de nos observations.

Comme dans le cas de l'énolase (WARBURG ET CHRISTIAN<sup>20</sup>) et des peptidases (MASCHMANN<sup>21</sup>), nous avons observé un *seuil* de concentration du magnésium au delà duquel son efficacité n'augmente plus, tandis que, pour les autres métaux étudiés, en particulier pour le fer et le zinc, fortement inhibiteurs à des taux élevés, il existe une *concentration optima*. Dans l'expérience dont les résultats figurent au Tableau I, la quantité de préparation renfermant 10  $\gamma$  d'azote, soit au plus 60  $\gamma$  de protéine, est réactivée au maximum par 12 mgr de magnésium soit près de 200 fois son poids de celui-ci. Une surcharge double en ce métal, soit 24 mgr, conduit à un résultat identique. L'activité maxima particulière aux autres cations, inférieure à celle obtenue avec  $Mg^{++}$ , est atteinte à des taux beaucoup moindres de ceux-ci, très différents selon le métal mis en oeuvre : 0,065  $\gamma$  de zinc ou de fer, 540  $\gamma$  de manganèse et 4.000  $\gamma$  de calcium. Devant l'existence d'un seuil de concentration pour l'action maxima du magnésium et d'une concentration optima pour celle du zinc et du manganèse, WARBURG ET CHRISTIAN ont admis que le premier est le constituant minéral naturel de l'énolase.

Nous examinerons plus bas s'il y a lieu d'adopter la même manière de voir en ce qui concerne la phosphatase alcaline. Nous analyserons au cours de la discussion des résultats la part que l'on peut attribuer aux cations et à l'acide aminé dans les phénomènes étudiés, mais il y a lieu de faire dès maintenant certaines remarques. L'incubation à  $p_H = 8,8$  de l'enzyme inactivé fait réapparaître à elle seule un faible pouvoir phosphoestérasique (voir Tableau I, témoin 2) et celui-ci est assez important si l'opération a lieu en présence d'alanine (voir Tableau I, témoin 2). Ces faits ne sont pas de nature à rendre trop incertaine l'interprétation de ceux résumés plus haut. En effet, l'analyse des préparations enzymatiques étudiées nous a montré que celles-ci renferment du magnésium à des taux relativement élevés et de petites quantités de zinc, dont une partie seulement est éliminée par dialyse lorsque les préparations sont totalement inactivées. Il suffit que l'incubation à  $p_H = 8,8$  provoque la dissociation d'une faible partie de ces métaux fixés à des impuretés (mucoprotéines) pour que leurs ions réactivent l'enzyme. De même la mise en liberté, à l'état d'ions, de traces indosables de métaux tels que le zinc, dont nous venons de signaler l'élimination incomplète, explique en partie l'effet de l'incubation en présence d'alanine, effet auquel participent également d'autres phénomènes liés à l'état de l'apoenzyme protéique.

c. *Inhibition de la réactivation de la phosphatase alcaline par les fluorures, les phosphates et les pyrophosphates alcalins.* La réactivation de la phosphatase alcaline par les cations en présence d'un acide aminé une fois obtenue, nous avons essayé de mettre en concurrence des effecteurs antagonistes, inhibiteurs, et l'acide aminé associé au cation permettant la réactivation la plus forte, le magnésium. En effet, si ces derniers participent à la reconstruction de l'enzyme ou de son groupement actif, la fixation préalable à l'apoenzyme de radicaux susceptibles de s'unir à l'un ou à l'autre doit gêner la réactivation. C'est ainsi que, pour WARBURG ET CHRISTIAN<sup>20</sup>, l'ion fluor empêcherait l'activation en donnant naissance à un complexe fluoromagnésien inactif de l'enzyme (Mg—F—énolase).

Nous avons été orientés dans le choix des effecteurs par des expériences préliminaires, au cours desquelles nous avons observé que la phosphatase alcaline purifiée est très sensible à la présence de divers anions aptes à donner des complexes avec les métaux, entre autres les ions fluor, orthophosphorique et pyrophosphorique. Le premier inhibe faiblement et irrégulièrement l'enzyme brut dans les extraits des tissus animaux (BELFANTI, CONTARDI ET ERCOLI<sup>22</sup>; ROCHE, DE LAROMIGUIÈRE ET LAURENS<sup>23</sup>), où le second est toujours inhibiteur (ERDTMANN<sup>24</sup>), le troisième n'ayant pas été étudié à cet égard. Tous trois inhibent énergiquement la phosphatase alcaline lorsque celle-ci a été purifiée et débarrassée d'antiinhibiteurs naturels, opération qui exige l'élimination des mucoprotéines présentes dans les préparations enzymatiques pauvres en azote bien qu'assez actives obtenues par SCHMIDT et TANNHAÜSER<sup>35</sup> (10.1% N) et par CAPUTTO ET MARSAL<sup>36</sup> (7-10 % N).

Après dialyse jusqu'à perte pratiquement totale de son pouvoir hydrolytique, la phosphatase est, soit mise pendant 2 heures à l'étuve à 37° et à  $p_H = 8,8$  (solution tampon au véronal de MICHAELIS) en présence de fluorure de sodium ( $1.10^{-3}$ — $5.10^{-2}$  M), de phosphate disodique ( $1.10^{-3}$  M) ou de pyrophosphate de sodium ( $2.10^{-3}$ — $1.10^{-2}$  M), puis additionnée de *dl*-alanine ( $1.10^{-2}$  M), soit soumise aux mêmes opérations en inversant l'ordre des réactifs, l'incubation ayant lieu en présence de l'acide aminé et les formateurs de complexe étant ajoutés par la suite; de l'acétate de magnésium ( $1.10^{-2}$ — $5.10^{-2}$  M) est introduit immédiatement avant le substrat. L'activité de ces milieux vis-à-vis du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium a été déterminée dans les mêmes conditions qu'au cours des expériences décrites dans le paragraphe précédent, chaque essai renfermant 0.2 cc de solution enzymatique, 4 cc de solution tampon au véronal sodique de MICHAELIS de  $p_H = 8,8$  et 2 cc de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium M/10 et 3,8 cc d'eau bidistillée ou des réactifs affecteurs énumérés ci-dessus. On trouvera dans le Tableau II quelques uns de nos résultats.

Les résultats obtenus peuvent être résumés de la manière suivante: L'incubation de la phosphatase alcaline en présence de fluorure de sodium réduit fortement l'effet de l'ion magnésium et cela que de l'alanine, activatrice par elle-même en l'absence de ce sel soit (IIb) ou non (Ib) ajoutée après cette opération. Lorsque du phosphate disodique (IIIb et c) ou du pyrophosphate de sodium (IV a et b) est substitué au fluorure alcalin, l'activation de l'enzyme par l'ion magnésium en présence d'alanine est nulle dans le premier cas et faible dans le second\*. Les anions étudiés empêchent donc à divers degrés

\* Les préparations étudiées étant rigoureusement dépourvues d'activité pyrophosphatasique, il est légitime d'attribuer aux ions pyrophosphoriques — et non à des ions orthophosphoriques provenant de leur hydrolyse éventuelle — les effets observés en leur présence.

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'INCUBATION PRÉALABLE (2 heures à 37° et à pH = 8,8) DE LA PHOSPHATASE ALCALINE (intestin de Chien) EN PRÉSENCE SOIT D'ALANINE, SOIT DE FLUORURE, D'ORTHO-PHOSPHATE OU DE PYROPHOSPHATE DE SODIUM SUR L'ACTION ANTAGONISTE DE CES DIVERS EFFECTEURS VIS-A-VIS DE LA RÉACTIVATION DE L'ENZYME PAR L'ION MAGNÉSIUM APRÈS INACTIVATION PRESQUE COMPLETE PAR DIALYSE (15—20 jours à 37°) CONTRE DE L'EAU BIDISTILLÉE

Résultats exprimés en  $\gamma$ P minéral (orthophosphates) libérés par minute et par milligramme d'azote protéique aux dépens de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium M/50 à 37° et à pH 8,8 dans les conditions expérimentales décrites Section a.

Préparation et série d'essais N°	Effecteurs mis en incubation	Effecteurs ajoutés après l'incubation	Gamma P minéral libérés par min et mgr N prot.
I	néant	$(CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	3.173
	FNa $1.10^{-2} \ M$	$(CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	1.538
	alanine $1.10^{-2} \ M$	$(CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	17.500
	alanine $1.10^{-2} \ M$	FNa $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	16.346
II	alanine $1.10^{-2} \ M$	$(CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	13.796
	FNa $1.10^{-2} \ M$	alanine $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	6.018
	alanine $1.10^{-2} \ M$	FNa $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	14.186
	alanine $1.10^{-2} \ M$	FNa $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-2} \ M$	11.722
III	néant	néant	615
	$PO_4Na_2H \ 1.10^{-2} \ M$	néant	0
	$PO_4Na_2H \ 1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 1.10^{-2} \ M$	néant	1800
	alanine $1.10^{-2} \ M$	néant	3.953
	alanine $1.10^{-2} \ M$	$PO_4Na_2H \ 1.10^{-2} \ M$	3.715
	alanine $1.10^{-2} \ M$	$PO_4Na_2H \ 1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 1.10^{-2} \ M$	7.323
IV	$P_2O_7Na_2 \ 5.10^{-3} \ M$	alanine $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-3} \ M$	2.629
	$P_2O_7Na_2 \ 1.10^{-2} \ M$	alanine $1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 2.10^{-2} \ M$	629
	alanine $1.10^{-2} \ M$	$P_2O_7Na_2 \ 2.10^{-3} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 5.10^{-3} \ M$	15.074
	alanine $1.10^{-2} \ M$	$P_2O_7Na_2 \ 1.10^{-2} \ M + (CH_3.COO)_2Mg \ 2.10^{-2} \ M$	13.703

l'acide aminé et l'ion magnésium de réactiver l'enzyme. L'incubation en présence d'alanine réactive par elle-même la phosphatase (Ic et IIId) et renforce considérablement l'effet de  $Mg^{++}$ , comme on l'a vu plus haut (Tableau I), mais l'addition ultérieure de fluorure (I d), de phosphate (III e et f) ou de pyrophosphate de sodium (IV c et d) ne provoque plus alors qu'une inhibition faible ou nulle et n'empêche pratiquement pas l'activation par le magnésium en présence de l'acide aminé. L'alanine se comporte donc comme un antiinhibiteur car, après incubation en sa présence, l'enzyme devient très peu sensible aux ions fluor, orthophosphorique et pyrophosphorique.

### 3. DISCUSSION

La dialyse prolongée contre de l'eau bidistillée inactive complètement la phosphatase alcaline purifiée. Celle-ci reprend un pouvoir phosphomonoestératique très élevé après incubation en présence d'alanine à  $pH = 8,8$  et addition de cations divalents,

entre autres de  $Mg^{++}$ , et une concurrence se manifeste à cet égard entre l'acide aminé, activateur, et les ions fluor, orthophosphorique ou pyrophosphorique, inhibiteurs. Ces faits établis, il convient de les interpréter et d'en discuter la signification en ce qui concerne, d'une part, le mécanisme général de l'inactivation et de la réactivation de l'enzyme et, d'autre part, l'interchangeabilité des cations mis en oeuvre dans celle-ci.

a. *Mécanisme général de l'inactivation et de la réactivation de la phosphatase alcaline.* L'inactivation par dialyse prolongée contre de l'eau bidistillée peut être due soit à la dissociation du groupement actif de l'holoenzyme, soit à la rupture-ou à la formation-de liaisons analogues à celles maintenant associées les „unités” distinguées par SVEDBERG dans les molécules protéiques. La nécessité absolue de cations divalents pour obtenir la restauration d'un pouvoir phosphatasique très élevé permet de supposer qu'un métal divalent est éliminé au cours de la dialyse ; mais les effets de l'incubation en la présence d'un acide aminé ne sauraient relever de la même explication. *Les phénomènes observés semblent donc être la résultante de plusieurs processus, à savoir : la rétrogradation de modifications de structure de l'apoenzyme et la reconstitution d'un groupement actif métallique ou rattaché à l'apoenzyme par un métal divalent.*

Les molécules protéiques sont susceptibles de se dissocier réversiblement sans rupture de liaisons de valence primaire, mais seulement par celle de liaisons mettant en jeu des valences coordinatives ou des forces de cohésion d'une autre nature (force d'adsorption, forces de VAN DER WAALS en particulier). C'est ainsi que des modifications du  $p_H$  au delà de la zone de stabilité (SVEDBERG<sup>25</sup>), l'addition d'urée (STEINHARDT<sup>26</sup>) ou de salicylate de sodium (ANSON ET MIRSKY<sup>27</sup>) à forte concentration, parfois même de faibles différences de salinité (BROHULT<sup>28</sup>), peuvent entraîner la dissociation de protéines de poids moléculaire élevé et, dans certains cas, leur dénaturation. Cette dernière est réversible dans des conditions particulières ; la réaction, dite réversion (ANSON ET MIRSKY), est alors toujours assez lente et provoque la réapparition de certains caractères particuliers à la protéine naturelle. L'aptitude des globines naturelles à se combiner à la protohémine pour donner naissance aux méthémoglobines, la perte de cette propriété lors de la dénaturation et sa restauration après réversion (ANSON ET MIRSKY<sup>29</sup>, HILL ET HOLDEN<sup>30</sup>, ROCHE ET COMBETTE<sup>31</sup>, ROCHE ET CHOUAÏECH<sup>32</sup>) constituent à cet égard un exemple caractéristique. Or, on peut se demander dans quelle mesure la dénaturation de l'apophosphatase n'est pas responsable de la perte de l'activité enzymatique au cours de nos expériences et si l'effet de l'incubation n'est pas lié à un processus de réversion. La lenteur avec laquelle la réactivation est obtenue rappelle celle de la réversion de la globine à  $p_H = 6,5$  et, par ailleurs, le mode de préparation de l'enzyme, commandé par la nécessité de le séparer d'impuretés multiples, et sa très longue dialyse à 37° sont susceptibles de le dénaturer.

Le caractère non immédiat de la réactivation de la phosphatase alcaline doit être rapproché de celui que présente également sa reconstitution à partir des produits de sa dissociation („cophosphatase” et „apophosphatase”<sup>1, 5</sup>). Pareil fait n'est d'ailleurs pas exceptionnel en enzymologie ; il a été observé par GREEN, HERBERT ET SUBRAHMANYAN<sup>18</sup> lors de la préparation de la carboxylase à partir de son apoenzyme, d'aneurinediphosphate et de cations divalents, au cours de la réactivation de l'apoenzyme de l'arginase hépatique (HUNTER ET DOWNS<sup>16</sup>, MOHAMED ET GREENBERG<sup>17</sup>) et de la *L*-leucylpeptidase intestinale (SMITH ET BERGMANN<sup>15</sup>) par l'ion  $Mn^{++}$ . Dans ce dernier cas, un séjour de 24 heures et plus à 37°, dans des conditions  $p_H$  bien définies, est nécessaire pour obtenir l'activité enzymatique maxima. La part de la réversion de la dénaturation dans cette

„time reaction”, considérée souvent comme particulière à la chimie des enzymes, nous semble importante et des recherches sont actuellement entreprises pour contrôler cette hypothèse. On peut aisément concevoir que la dénaturation ait fait perdre à l'apoenzyme la propriété de fixer un cation indispensable à son activité et que la réversion provoque la mise en liberté des groupements fonctionnels susceptibles de s'unir spécifiquement au métal \*.

Mais, si cette hypothèse de travail mérite d'être retenue, elle ne rend néanmoins compte qu'incomplètement du mécanisme des faits observés. Il est possible que l'acide aminé favorise la réversion en se fixant à certains radicaux de la protéine ou par une réaction d'un autre type, mais le rôle propre des cations et son couplage à celui de l'acide aminé sont, par ailleurs, très importants. L'explication la plus simple que l'on puisse donner des phénomènes auxquels ils participent, inspirée par de multiples observations faites sur d'autres enzymes à métal dissociable, paraît être la suivante. L'inactivation par dialyse prolongée traduirait la perte progressive d'un constituant métallique et il serait alors nécessaire de saturer à nouveau l'enzyme en métal pour qu'il retrouve son activité maxima. L'expérience montre qu'il ne suffit pas pour cela de le mettre en présence de cations ; il convient que ceux-ci soient associés à un acide aminé, divers corps de cette série pouvant être mis en oeuvre dans ce but sans qu'une spécificité se manifeste pour l'un d'entre eux. Pareil rôle coactivateur d'un acide aminé vis-à-vis d'un enzyme purifié a été observé dans d'autres cas, en particulier dans l'activation de l'adénylpyrophosphatase (BAILEY <sup>33</sup>), de diverses peptidases (MASCHMANN <sup>21</sup>) et de la zymohexase de levure (WARBURG ET CHRISTIAN <sup>34</sup>). Son mécanisme a été discuté par ces derniers auteurs, selon lesquels l'acide aminé (cystéine) interviendrait, soit comme régulateur de valence des ions lorsque ceux-ci peuvent exister sous un état di- ou trivalent ( $\text{Fe}^{++} \rightleftharpoons \text{Fe}^{+++} + e^-$ ) un seul de ceux-ci étant actif, soit comme régulateur de concentration des ions avec lesquels ils forment des complexes. La seconde de ces hypothèses a été adoptée par MASSART ET VANDENDRIESSCHE <sup>9</sup>, pour expliquer le rôle du glycocolle dans l'activation de la phosphatase du lait et du rein par l'ion  $\text{Zn}^{++}$  dans un milieu renfermant cet acide aminé. Ce rôle nous paraît être plus complexe.

En effet, d'une part les acides aminés ont une action propre, et d'autre part ils empêchent les fluorures, les phosphates et les orthophosphates d'exercer leur influence inhibitrice. On admet souvent que leur pouvoir activateur est uniquement lié à l'élimination d'inhibiteurs naturels métalliques constituant des impuretés accompagnant l'enzyme et avec lesquels ils formeraient des complexes ; mais ce n'est là sans doute qu'une partie de leur action, car leur antagonisme avec les anions inhibiteurs que nous avons étudié

\* La réversion de la dénaturation peut ne porter spécifiquement que sur une partie de ce processus. Dans le cas particulier des globines on restaure bien l'aptitude des protéines dénaturées à se combiner à l'hématine pour donner des méthémoglobines identiques aux produits naturels par leur spectre, leur solubilité, leur poids moléculaire et par diverses autres propriétés, mais le groupement prosthétique ne s'unit alors à la protéine que d'une façon beaucoup plus labile que dans les chromoprotéides naturels (ROCHE ET CHOUAIECH <sup>32</sup>). S'il en est de même lors de la réversion de la dénaturation des apoenzymes, il est possible que cette réaction ne permette qu'une réactivation incomplète. Le fait que, dans les conditions où nous nous sommes placés, celle-ci conduise à des pouvoirs phosphatasiques plus élevés que ceux des produits cristallisés permet de penser que la cristallisation de la phosphatase va de pair avec un certain degré de dénaturation, comme dans le cas d'autres enzymes (catalase). C'est sans doute au même phénomène qu'il y a lieu de rattacher les pertes d'activité observées après des cristallisations successives <sup>18</sup> et la diminution de solubilité de l'enzyme dans des milieux de teneur croissante en acétone au cours de sa purification.

ne peut être expliqué ainsi. Cet antagonisme même traduit probablement le fait que les uns et les autres se fixent sur le constituant métallique de l'enzyme, le radical métall-anion (fluorure, phosphate, pyrophosphate) ne participant pas au pouvoir phosphatasique. Nos observations conduisent à se représenter le groupement actif comme un complexe de métal divalent avec certains radicaux de l'apoenzyme et il est possible que l'acide aminé joue un rôle important dans la formation du complexe actif, soit en „transportant” le métal auquel il est lié à des radicaux particuliers de l'apoenzyme, soit en participant à des complexes du type apoenzyme-métal-acide aminé. Enfin, le fait que l'incubation de l'enzyme inactivé doit, pour avoir toute son efficacité, être opérée en la présence d'un acide aminé, permet de penser que ce dernier intervient par lui-même dans la réversion de la dénaturation de l'apoenzyme. Aussi ne saurait-on interpréter simplement la fonction dévolue à lalanine dans la réactivation de la phosphatase. Pareille complexité s'est manifestée dans le rôle des acides aminés en tant que coactivateurs des ions  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , vis-à-vis de l'adénylpyrophosphatase (myosine cristallisée) qui, pour BAILEY<sup>33</sup>, consisterait en „l'élimination par formation de complexes de métaux lourds présents dans les préparations de myosine, l'augmentation de la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la chaleur et en une action spécifique de l'ion dipolaire”.

b. *Interchangeabilité des métaux actifs et constituant métallique naturel.* Dans les conditions où nous nous sommes placés, la réactivation de la phosphatase alcaline est assurée par divers cations divalents en présence d'un acide aminé. Il n'existe à cet égard aucune spécificité étroite du métal, mais seulement des différences dans les concentrations auxquelles chacun exerce son effet maximum (concentration optima) et dans l'intensité de son action. Une interprétation simple de ce fait peut être donnée. La réactivation comporte nécessairement la combinaison des cations à l'apoenzyme, sans doute par formation de complexes du métal avec des radicaux azotés de la protéine. Or l'affinité de ces radicaux n'est à coup sûr pas identique pour les divers cations et il est logique que le zinc, formant très facilement des complexes avec les groupements aminés des protéines et des peptides, „sature” l'enzyme à très faible concentration, tandis que le magnésium, participant beaucoup plus difficilement à des complexes, ne le ferait qu'à des taux très élevés. Un excès de zinc ou de fer doit par ailleurs se combiner à l'apoenzyme en dehors du groupement actif, surtout après la saturation de celui-ci, et il en résulterait une inhibition non spécifique. Par contre, la faible affinité de la protéine pour le magnésium la rend peu apte à s'unir à celui-ci, lequel n'est inhibiteur à aucune concentration dans les conditions où nous nous sommes placés \*. Des faits du même ordre ont été signalés par MASCHMANN<sup>21</sup> à propos de l'action des métaux sur diverses peptidases,  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Mn}^{++}$  présentant alors un seuil de concentration à partir duquel ils exercent un effet maximum ( $1.10^{-3}$  M), tandis qu'il existe pour  $\text{Zn}^{++}$  une concentration optima ( $1.10^{-7}$ — $10^{-6}$  M), au delà de laquelle cet ion est fortement

\* Dans les produits bruts, l'ion magnésium est faiblement inhibiteur à concentration très élevée (en l'absence d'acide aminé); il n'en est pas ainsi dans nos essais, soit en raison du caractère incomplet de la réversion des produits purifiés utilisés, soit, plus simplement, en raison de la présence d'alanine. Par ailleurs, l'activabilité de la phosphatase alcaline par l'ion magnésium est lié au degré de saturation de l'enzyme en métal. C'est ainsi que la phosphatase intestinale partiellement purifiée de SCHMIDT ET TANNHAÜSER<sup>35</sup> est peu sensible à cet ion parce que son métal naturel ne s'est pas dissocié au cours de sa préparation. L'augmentation du pouvoir activateur, des sels de magnésium par dilution et après une brève dialyse des extraits de muqueux intestinale signalée par BACCARI ET AURICCHIO<sup>37</sup> peut, par contre être reliée à la dissociation du constituant métallique naturel de la phosphatase.

inhibiteur. Dès lors, l'argumentation selon laquelle un cation activateur présentant un seuil d'action (Mg) doit plus probablement être considéré comme le constituant naturel d'un enzyme à métal dissociable que ceux (Fe, Zn, Mn) pour lesquels il existe une concentration optima, paraît fragile.

L'interchangeabilité expérimentale des cations divalents pose la question de la spécificité du constituant minéral naturel de la phosphatase alcaline. Le magnésium permet d'atteindre l'activité la plus élevée dans nos expériences, mais seulement à très forte concentration, tandis que le zinc et le fer provoquent une activité moindre, mais très importante, à l'état de traces ( $1.10^{-7}$ — $1.10^{-6}$  M). Il ne semble pas possible, en l'état actuel de nos connaissances, d'affirmer que la phosphatase alcaline soit une métalloprotéine renfermant du magnésium dans un organe, du zinc, du fer, du manganèse ou du calcium dans d'autres, la spécificité relative d'activation par l'un de ceux-ci observée par divers auteurs dans des conditions particulières pouvant tenir à la présence d'impuretés. Néanmoins il est probable que seuls le magnésium ou le zinc doivent être considérés comme constituants naturels de la phosphatase alcaline, l'interchangeabilité de l'un et de l'autre pouvant être envisagée. L'étude de la composition des produits purs ou très hautement purifiés extraits de divers organes, actuellement en cours, apportera une réponse ferme à cette question.

La nécessité, admise par CLOETENS<sup>3</sup>, de la présence de deux métaux, le magnésium et le zinc, dans la phosphatase alcaline ne semble pas devoir être retenue. Des expériences antérieures nous ont montré que la réactivation par l'ion magnésium n'est nullement renforcée par la présence d'ions zinc et des résultats nouveaux, dont il ne nous a pas paru utile de faire figurer ici le détail, ont permis de constater que  $Zn^{++}$  n'est activateur en présence de  $Mg^{++}$  que dans la mesure où la concentration de ce dernier est trop faible pour que le pouvoir phosphatasique maximum soit restauré par lui. Il y a alors addition des effets de  $Mg^{++}$  et de  $Zn^{++}$ , mais non la „potentialisation” de ceux-ci décrite par CLOETENS sur des produits moins purifiés que ceux utilisés pour nos recherches ; l'hypothèse de cet auteur sur la constitution de la phosphatase alcaline doit donc être abandonnée.

Le manque de spécificité des cations activateurs de la phosphatase alcaline rend peu probable la participation directe du métal à l'activité enzymatique. Divers faits établis sur la carboxylase (KUBOWITZ et LÜTTGENS<sup>19</sup> ; GREEN, HEREERT ET SUBRAHMANYAN<sup>24</sup>) sont à rapprocher de ceux décrits dans notre travail. Dans le cas de ce dernier enzyme, le magnésium naturel est remplaçable par le manganèse, le cobalt et par d'autres cations divalents, et le groupement actif serait le radical  $-\text{NH}_2$  fixé en position 6 au cycle pyrimidinique de l'aneurine ; le métal constituerait „un ciment, un pont chimique” entre l'apoenzyme et le coenzyme, associés l'un et l'autre dans un complexe magnésien. Aussi s'explique-t-on qu'il n'existe aucun lien étroit entre la nature du cation permettant de reconstituer la carboxylase à partir de ses produits de dissociation organiques (apoenzyme et aneurinediphosphate) et la spécificité de l'enzyme. Seul le degré d'activité du produit obtenu est fonction du métal présent \*. Il est légitime d'admettre comme hypothèse de travail qu'il en est de même pour la phosphatase alcaline ; dès lors, le métal de celle-ci ne jouerait pas le rôle de coferment qui lui est souvent attribué, car il ne participerait qu' *indirectement* à l'activité catalytique de l'enzyme.

\* Il n'existe pratiquement aucune différence d'activité entre les carboxylases „reconstituées” à Mg ou Mn ; celles renfermant Ca, Co, Fe et surtout Zn sont sensiblement moins actives.

Les expériences d' H. ALBERS et de ses collaborateurs<sup>1</sup> et les nôtres<sup>5</sup> sur le „transport du coferment” devront être reprises sur des produits purs pour qu'une opinion ferme soit formulée sur ce point, mais leurs résultats et ceux de nos recherches actuelles permettent de se faire une première représentation hypothétique de la molécule enzymatique. Celle-ci paraît être constituée soit par un complexe métallique — en général magnésien ou zincique — de l'apoenzyme et d'un corps organique dissociable, soit par un complexe dont les radicaux organiques spécifiquement unis au métal seraient tous empruntés à l'apoenzyme ; il n' existerait pas alors de coenzyme dissociable. Dans le premier cas, un peptide pourrait constituer le coenzyme et être remplaçable par divers acides aminés ; c'est là une éventualité peu probable. Dans le second, la coactivation par les acides aminés serait due à une sorte d'orientation du métal uni à l'acide aminé vers les groupements de l'apoenzyme aptes à se combiner à lui pour former un complexe actif. Ce dernier ne comprendrait pas nécessairement l'acide aminé, lequel pourrait n'être qu'un simple „transporteur” du métal. Si hypothétique que soit cette interprétation générale, elle nous a paru mériter d'être formulée pour objectiver la notion que le constituant métallique de la phosphatase alcaline (ou de phosphatases alcalines, d'apoenzymes divers) ne doit pas être considéré comme son coenzyme au même titre que le cuivre de certaines polyphénoloxydases et le zinc de l'anhydrase carbonique. Ceux-ci sont rigoureusement spécifiques d'un enzyme ou d'un type d'enzyme et ont une fonction catalytique, tandis que le métal de la phosphatase alcaline, étranger au groupement actif proprement dit, joue aussi — et peut-être exclusivement un — rôle de *structure* compatible avec une spécificité beaucoup moins étroite.

### RÉSUMÉ

1. La phosphatase alcaline purifiée (phosphomonoestérase de l'intestin de Chien) a été complètement inactivée par dialyse prolongée contre ce l'eau bidistillée et réactivée. Le pouvoir hydrolytique obtenu est supérieur à celui du produit initial, l'enzyme dédoublant alors jusqu'à 700 milimolécules de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium par minute et par gramme d'azote, à  $\text{pH} = 8,8$  et à  $37^\circ$  ( $\text{Qp} = 170.000$ ).

2. La réactivation maxima de la phosphatase a été réalisée après incubation (2 heures) de l'enzyme avec de l'alanine ( $1.10^{-2}$  M) à  $\text{pH} = 8,8$  et addition d' ions magnésium. Dans les mêmes conditions, d'autres cations divalents :  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  et  $\text{Zn}^{++}$ , réactivent l'enzyme à des degrés divers. Il existe pour eux une concentration optima, très faible pour  $\text{Zn}^{++}$  et  $\text{Fe}^{++}$  ( $1.10^{-7}$  M), plus élevée pour  $\text{Mn}^{++}$  ( $1.10^{-3}$  M) et pour  $\text{Ca}$  ( $1.10^{-2}$  M), tandis que l'on observe un seuil d'action pour  $\text{Mg}^{++}$ , actif avec son efficacité la plus grande à des taux supérieurs à  $1.10^{-2}$  M.

3. L'incubation préalable avec l'acide aminé est indispensable ; lorsqu'elle n'a pas eu lieu, seuls  $\text{Mg}^{++}$  et, à un degré moindre,  $\text{Mn}^{++}$ , sont activateurs, mais beaucoup plus faiblement qu'après séjour à  $\text{pH} = 8,8$  et à  $37^\circ$  de l'enzyme additionné d'alanine. Il est probable que ces faits sont en partie dus à la réversion de la dénaturation de la phosphatase en présence de l'acide aminé plutôt qu'à la lenteur de la réaction de celui-ci avec l'enzyme. L'incubation avec des ions métalliques est sans efficacité propre, qu'elle soit opérée avant ou après l'addition d'alanine. Tout se passe donc comme si la combinaison du métal à l'enzyme était immédiate.

4. L'incubation préalable de la phosphatase purifiée en présence de fluorures, d'orthophosphates, de pyrophosphates alcalins, empêche la réactivation par les acides nés et les cations divalents. Inversement, l'incubation préalable de l'enzyme en présence d'alanine gêne très fortement l'action inhibitrice des fluorures, des orthophosphates et des pyrophosphates alcalins. On peut en déduire que les acides aminés et les anions de ces derniers sels se combinent sans doute au même élément structural du groupement actif de la phosphatase.

5. On ne saurait trop insister sur le fait que l'action des effecteurs, en particulier des cations et des formateurs de complexe, sur la phosphatase alcaline ne s'exerce régulièrement que sur des produits purifiés et à des concentrations en métaux bien définies, différentes pour chacun de ceux-ci. Dans le cas contraire, elle est fonction de la présence de métaux et de formateurs de complexes naturels dans les préparations enzymatiques. Les multiples contradictions entre de nombreux travaux doivent être rattachées à cette cause ; des résultats divers, facilement reproductibles, peuvent en effet être obtenus selon le mode opératoire adopté.

6. La signification de ces faits en ce qui concerne la constitution de la phosphatase alcaline est discutée. L'interchangeabilité des métaux actifs n'est pas favorable à l'hypothèse admettant qu'il existe dans les divers organes des phosphatases dont chacune renferme spécifiquement un métal particulier au tissu où elle est présente. Le magnésium, et à un degré moindre le zinc, paraît être le constituant minéral le plus commun des phosphatases alcalines et y jouer un rôle d'élément de structure plutôt que celui d'un coenzyme catalytiquement actif.

#### SUMMARY

1. Purified alkaline phosphatase (phosphomonoesterase from dog's intestine) has been completely inactivated by prolonged dialysis against bidistilled water and reactivated. The hydrolytic power obtained, superior to that of the initial product, attains maximal 700 millimolecules of  $\beta$ -glycerophosphate of sodium per minute and per gramme of nitrogen, at a  $pH$  of 8,8, and at  $37^\circ C$  ( $Q_p = 170.000$ ).

2. The maximal reactivation of the phosphatase has been observed after incubation for 2 hours of the enzyme with alanine ( $1.10^{-2}M$ ), at a  $pH$  of 8,8 and addition of magnesium ions. Under the same conditions, other divalent cathions ( $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mn^{++}$  and  $Zn^{++}$ ) reactivate the enzyme at various degrees. The optimum concentration for these is : very weak for  $Zn^{++}$  and  $Fe^{++}$  ( $1.10^{-7}M$ ), stronger for  $Mn^{++}$  ( $1.10^{-3}M$ ) and  $Ca^{++}$  ( $1.10^{-2}M$ ), while, for  $Mg^{++}$ , there is a threshold of activity with its greatest efficacy above  $1.10^{-2}M$ .

3. Preliminary incubation with the aminoacid is indispensable ; if this is neglected, only  $Mg^{++}$  and, to a lesser degree,  $Mn^{++}$  can be active agents, though to much smaller extent than after incubation, at  $pH = 8,8$  and at  $37^\circ C$ , of the enzyme in presence of alanine. Probably this is partly due to the reversion of the denaturation of the phosphatase in presence of the aminoacid, rather than to the slowness of the latter's reaction with the enzyme. Incubation with metallic ions, whether before or after the addition of alanine, is not really effective. The whole process, therefore, takes place as if the metal combined immediately with enzyme.

4. Preliminary incubation of purified phosphatase in presence of fluorides, orthophosphates and alkaline pyrophosphates, prevents reactivation by aminoacids and divalent cathions. Conversely, preliminary incubation of the enzyme in the presence of alanine strongly interferes with the inhibiting action of fluorides, orthophosphates and alkaline pyrophosphates. We may deduce from this that aminoacids and the anions of the last-named salts combine with the same structural element in the active group of the phosphatases.

5. It is emphatically pointed out that the action of these agents, particularly that of cathions and of those forming complexes, on alkaline phosphatase can, as a rule, be effective only on purified products, and in certain definite metal-concentrations which vary with each of them. In the opposite case this action is a function of the presence of the metal and of substances forming natural complexes in the enzyme preparations. The frequent contradictions on this question found in the literature must be attributed to this fact ; different, easily reproducible results may, indeed, be obtained according to the method followed.

6. The importance of these facts is discussed regarding the constitution of alkaline phosphatase. The interchangeability of active metals does not argue in favour

of the hypothesis that there exist, in various organs, phosphatases, each of which specifically contains some metal peculiar to the tissue in which it is found. Magnesium or, to a lesser degree, zinc, appears to be the most common mineral constituent of alkaline phosphatases, and appears to function as a structural element rather than as a catalytically active enzyme.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Die gereinigte alkalische Phosphatase (Phosphomonoesterase) wurde vollkommen inaktiviert durch fortgesetzte Dialyse gegen bidestilliertes Wasser und reaktiviert. Das erzielte hydrolytische Vermögen ist grösser als dasjenige des Initialproduktes, da das Enzym bis zu 700 millimolekülen Natrium  $\beta$ -Glyzerophosphat pro Minut und pro Gramm Stickstoff bei  $pH = 8,8$  und bei  $37^\circ$  spaltet ( $Q_p = 170.000$ ).

2. Die maximale Reaktivierung der Phosphatase wurde nach Inkubation (2 Stunden) des Enzyms mit Alanin ( $1 \cdot 10^{-2} M$ ) bei  $pH = 8,8$  und durch Zusatz von Magnesiumionen verwirklicht. Unter gleichen Bedingungen wird das Enzym durch zweiwertige Kationen, wie  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mn^{++}$  et  $Zn^{++}$ , in verschiedenen Graden reaktiviert. Es besteht für dieselben eine optimale Konzentration, welche für  $Zn^{++}$  und  $Fe^{++}$  schwach ( $1 \cdot 10^{-2} M$ ), und für  $Mn^{++}$  ( $1 \cdot 10^{-3} M$ ) und  $Ca^{++}$  ( $1 \cdot 10^{-2} M$ ) höher ist, während für  $Mg^{++}$ , das seine grösste Aktivität bei Konzentrationsgraden über  $1 \cdot 10^{-2} M$  erreicht, eine Wirkungsschwelle beobachtet wird.

3. Die Vorinkubation der Aminosäure ist erforderlich. Bei Unterlassung derselben werden allein  $Mg^{++}$  und  $Mn^{++}$ , wenn auch in einem geringeren Grade, zu Aktivatoren, aber ihre Wirksamkeit ist viel kleiner als nach Verbleiben des mit Alanin bereicherten Enzyms bei  $pH = 8,8$  und bei  $37^\circ$ . Alles vollzieht sich also wie wenn die Verbindung des Metalls mit dem Enzyme augenblicklich stattfinden würde.

4. Die Vorinkubation der gereinigten Phosphatase in Gegenwart von Fluoriden (Fluoruren), Orthophosphaten, alkalischen Pyrophosphaten verhindert die Reaktivierung durch die Aminosäuren und die zweiwertigen Kationen. Umgekehrt, wird die hemmende Wirkung der Fluoriden (Fluoruren), der Orthophosphaten und der alkalischen Pyrophosphaten durch die Vorinkubation des Enzyms in Gegenwart von Alanin stark gehindert. Hieraus kann man schliessen, dass die Aminosäuren und die Anionen dieser letzteren Salzen sich wahrscheinlich mit dem gleichen Strukturelement der aktiven Phosphatasegruppe verbinden.

5. Es ist notwendig folgende Tatsache ganz hervorzuheben: die effektiven Agenten, insbesondere die Kationen und die Komplexbildner wirken nur regelmässig auf gereinigten Produkten und bei genau bestimmten Metallkonzentrationen, wobei letzteren für die einzelnen Metalle verschieden sind. Im entgegengesetzten Falle hängt diese Wirkung von dem Vorhandensein von Metallen und von natürlichen Komplexbildnern in den enzymatischen Präparaten ab. Die mannigfaltigen Widersprüche, die man in zahlreichen Arbeiten feststellt, müssen auf diese Ursache zurückgeführt werden. Verschiedene, leicht reproduzierbare Resultate können tatsächlich mit der angewandten Übungsmethode erzielt werden.

6. Die Bedeutung dieser Tatsachen bezüglich der Zusammensetzung der alkalischen Phosphatase wird besprochen. Die Auswechselbarkeit der aktiven Metalle ist nicht günstig für die Annahme, dass Phosphatosen in den verschiedenen Geweben vorhanden sind, und dass jede Phosphatase ein Metall spezifisch enthält, welches dem Gewebe eigen ist, worin sie vorhanden ist. Das Magnesium, und, in einem kleineren Grade, das Zink, scheint der häufigste mineralische Bestandteil der alkalischen Phosphatosen zu sein und die Rolle eines Strukturelementen eher als die eines katalytisch aktiven Koenzymes darin zu spielen.

### BIBLIOGRAPHIE

1. H. ALBERS, E. BEYER, A. BOHNENKAMP UND G. MÜLLER, *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, **71** (1938) 1913.
2. D. ALBERS, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **261** (1939) 43; *ibid.*, **261** (1939) 278.
3. R. CLOETENS, *Biochem. Ztschr.*, **307** (1941) 352; *ibid.*, **308** (1941) 37; *ibid.*, **310** (1941) 42.

- <sup>4</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET M. ROGER, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **Trav.**, **25** (1943) 1365.
- <sup>5</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET O. MICHEL-LILA, *C. R. Acad. Sc.*, **218** (1944) 249.
- <sup>6</sup> E. HOVE, C. A. ELVEHJEM AND E. B. HART, *Journ. of biol. Chem.*, **134** (1940) 425.
- <sup>7</sup> H. D. JENNER AND H. D. KAY, *Journ. of biol. Chem.*, **93** (1931) 733.
- <sup>8</sup> L. MASSART UND R. DUFAIT, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **272** (1942) 157.
- <sup>9</sup> L. MASSART ET L. VANDENDRIESSCHE, *Enzymolog.*, **11** (1945) 261.
- <sup>10</sup> NGUYEN-VAN THOAI, Spécificité des enzymes. Aperçu critique sur la conception actuelle de la spécificité dans le domaine de l'enzymologie suivi d'un exposé de recherches sur la chimie des phosphatas. *Thèse Doct. Sc. nat.*, Marseille, 1 vol., 181 p., Declume éd., Lons-le-Saulnier 1946.
- <sup>11</sup> NGUYEN-VAN THOAI ET J. RAYMOND, *C. R. Soc. Biol.*, **139** (1945) 814.
- <sup>12</sup> E. BAMANN, E. HEUMÜLLER, H. WERNER UND A. CARL, Documents inédits cités dans E. BAMANN UND K. MYRBÄCK, *Methoden der Fermentforschung*, Leipzig 1941, vol. II, p. 1669.
- <sup>13</sup> NGUYEN-VAN THOAI, J. ROCHE ET L. SARTORI, *C. R. Soc. Biol.*, **138** (1944) 47.
- <sup>14</sup> D. ALBERS, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **265** (1940) 129.
- <sup>15</sup> E. L. SMITH AND M. BERGMANN, *Journ. of biol. Chem.*, **138** (1941) 789; *ibid.*, **153** (1944) 627.
- <sup>16</sup> A. HUNTER AND C. E. DOWNS, *Journ. of biol. Chem.*, **155** (1944) 173.
- <sup>17</sup> M. S. MOHAMED AND D. M. GREENBERG, *Arch. of Biochem.*, **8** (1945) 349; *ibid.*, **8** (1945) 365.
- <sup>18</sup> D. E. GREEN, D. HERBERT AND V. SUBRAHMANIAN, *Journ. of biol. Chem.*, **134** (1940) 425.
- <sup>19</sup> F. KUBOWITZ UND W. LÜTTGENS, *Biochem. Ztschr.*, **307** (1941) 170.
- <sup>20</sup> O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Ztschr.*, **310** (1941) 384.
- <sup>21</sup> E. MASCHMANN, *Ergebn. d. Enzymforsch.*, **9** (1943) 166.
- <sup>22</sup> J. BELFANTI, A. CONTARDI AND A. ERCOLI, *Biochem. Journ.*, **29** (1935) 517.
- <sup>23</sup> J. ROCHE, S. DE LAROMIGUIÈRE ET A. LAURENS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **Trav.**, **25** (1943) 1365.
- <sup>24</sup> H. ERDTMANN, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **177** (1928) 211.
- <sup>25</sup> T. SVEDBERG, *Proc. Roy. Soc.*, B, **127** (1939) 1.
- <sup>26</sup> J. STEINHARDT, *Journ. of biol. Chem.*, **123** (1938) 543.
- <sup>27</sup> M. L. ANSON AND A. E. MIRSKY, *Journ. of Physiol.*, **17** (1934) 379.
- <sup>28</sup> S. BROHULT, *Nov. Act. reg. Soc. Sc. Upsal.*, (IV) **12** (1940) nr. 4.
- <sup>29</sup> M. L. ANSON AND A. E. MIRSKY, *Journ. of Physiol.*, **14** (1931) 605.
- <sup>30</sup> R. HILL AND F. R. HOLDEN, *Biochem. Journ.*, **20** (1926) 1326.
- <sup>31</sup> J. ROCHE ET R. COMBETTE, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **126** (1937) 950.
- <sup>32</sup> J. ROCHE ET M. S. CHOUAÏECH, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **22** (1940) 263.
- <sup>33</sup> K. BAILEY, *Biochem. Journ.*, **36** (1942) 121.
- <sup>34</sup> O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Ztschr.*, **311** (1942) 209; *ibid.*, **314** (1943) 149.
- <sup>35</sup> G. SCHMIDT AND S. J. TANNHÄUSER, *Journ. of biol. Chem.*, **149** (1943) 369.
- <sup>36</sup> R. CAPUTTO Y A. MARSAL, *Riv. Soc. argent. Biol.*, **17** (1941) 139.
- <sup>37</sup> V. BACCARI E G. AURICCHIO, *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.*, **22** (1946) 1.

Reçu le 22 mai 1946.