

ACTION COMPARÉE DE QUELQUES RÉACTIFS DES FONCTIONS AMINES SUR DIVERSES PHOSPHATASES ACIDES ET ALCALINES

par

C. ANAGNOSTOPOULOS

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Pharmacie, Paris (France)

Il est bien connu que l'action des enzymes, comme celle de toutes les protéines présentant une activité physiologique spécifique, dépend de l'intégrité de certains groupements fonctionnels libres dans la molécule protéique. Dans le but d'identifier ces groupements "essentiels", l'intérêt des chercheurs s'est concentré sur les groupements polaires de la molécule protéique, les plus actifs du point de vue chimique, et surtout sur les fonctions: thiol, amine et phénol.

Les groupements thiols qui paraissent essentiels pour l'activité d'un grand nombre d'enzymes, entre autres: l'adénosine triphosphatase¹, ne semblent pas indispensables à l'activité des phosphomonoestérases, acides et alcalines^{1, 2, 3}.

L'étude des groupements aminés des phosphatases fut abordée par GOULD⁴ sur certaines phosphomonoestérases alcalines: (la phosphatase intestinale purifiée préparée par SCHMIDT ET THANNHAUSER⁵ et des autolysats bruts du rein et de l'os). Cet auteur a constaté que les groupements aminés sont indispensables à l'activité des phosphatases alcalines. BACCARI ET AURRICCHIO⁶ par la suite, opérant sur des extraits aqueux de muqueuse intestinale du cheval, ont signalé que les groupements aminés sont aussi nécessaires pour l'activité des phosphatases acides. Cette conclusion paraît dès le premier abord trop généralisée.

Nos recherches antérieures sur certains effecteurs de phosphatases^{7, 8} nous ont amené à considérer les groupements susceptibles de jouer un rôle dans l'activité phosphatasique et à poser le problème de l'importance des fonctions amines.

Nous nous sommes alors proposés de faire une étude plus détaillée, poursuivie sur plusieurs phosphatases de différents types et d'origines très diverses avec plusieurs réactifs des fonctions amines.

Dans la première partie de ce travail nous envisagerons les résultats obtenus avec quatre réactifs des fonctions amines très fréquemment employés dans l'étude des protéines: le cétène, l'acide nitreux, l'aldéhyde formique et l'isocyanate de phényle.

Pendant la durée de ce travail nous avons eu connaissance des travaux de J. ROCHE ET ABUL-FADL^{9, 10} qui ont employé l'aldéhyde formique et l'isocyanate de phényle sur des préparations phosphatasiques hautement purifiées, du rein et de l'intestin (phosphatases alcalines, type I) et du foie et des champignons (phosphatases acides, type II). Dans l'ensemble nos résultats concordent avec ceux de ces auteurs.

PARTIE EXPERIMENTALE

Préparations diastasiques

Parmi les différents types des phosphatases isodynames, nous avons utilisé les préparations suivantes:

a) *Phosphatases du type I* (alcalines, pH optimum 8.6–9.4): phosphatases du rein et du foie du Bœuf.

Ces enzymes étaient préparées suivant la méthode de J. ROCHE, NGUYEN-VAN-THOAI ET SARTORI¹¹ par autolyse des organes broyés en présence d'un mélange d'eau, d'acétone, d'acétate d'éthyle et de toluène. L'autolysat était filtré et précipité par l'acétone (à une concentration de 60% dans le milieu). Ce précipité est desséché dans le vide sulfurique.

Activité: 1. phosphatase rénale: 5 ml d'une solution à 0.10% libèrent 7.0 mg de phosphore de 5 ml de β -glycérophosphate de sodium 0.10 M en 24 heures, à 37°, en présence de sulfate de magnésium 0.002 M et de diéthylbarbiturate de sodium 0.02 M (comme tampon à pH 8.6).

2. Phosphatase hépatique: 5 ml d'une solution à 0.10% dans les mêmes conditions libèrent 4.6 mg de phosphore.

b) *Phosphatases du type II* (acides, pH opt. 5.0–5.6): deux enzymes du règne végétal: phosphatase des graines de la Moutarde-blanche et celle du son de Blé, et deux enzymes du règne animal: la phosphatase de la prostate humaine et la phosphatase acide du foie du Bœuf.

Les phosphatases végétales furent préparées par macération à 0° pendant 24 heures, de la poudre des graines délipidée dans 10 fois son poids d'eau. Les extraits aqueux filtrés et refroidis à 0° sont précipités par quatre parties d'acétone. Les précipités lavés (par l'acétone et l'éther) et desséchés sous vide sulfurique sont mis en suspension dans de l'eau (2%) et soumis à un fractionnement par le sulfate d'ammonium, à 0°. Avec le sulfate d'ammonium à 66% de saturation, on a obtenu les préparations les plus riches en enzyme. Ces précipités dissous dans de l'eau sont longuement dialysés puis reprécipités par 1.5 volumes d'acétone.

La phosphatase prostatique est préparée par autolyse de 24 heures dans 10 parties d'une solution physiologique (à 0.9%). Après filtration, nous fractionnons par le sulfate d'ammonium à 0°. Le sulfate d'ammonium à 80% de saturation a donné le précipité le plus actif. Ce précipité, dissous dans de l'eau, est dialysé jusqu'à élimination du sulfate d'ammonium. Nous utilisons ce liquide dialysé et dilué de façon que 5 ml correspondent à 0.005 g de résidu sec.

Comme phosphatase acide du foie, nous avons utilisé la même préparation que pour la phosphatase alcaline hépatique.

Activité: 1. phosphatases de la Moutarde-blanche et du son de Blé:

5 ml d'une solution à 0.20% réagissant sur 20 ml de β -glycérophosphate de sodium 0.25 M, en 24 heures, à 37° et pH 5.2 (tampon acide acétique-acétate de sodium) libèrent: 9.6 mg de phosphore (phosphatase de la Moutarde-blanche) et 6.0 mg (phosphatase du son de Blé).

2. phosphatase prostatique: 5 ml de la préparation prostatique (0.005 g de résidu sec) libèrent 7.9 mg de phosphore en 1 heure, à 37°, de 20 ml de β -glycérophosphate de sodium 0.25 M, à pH 5.2 (Tampon acide acétique-acétate de sodium).

c) *Phosphatases du type III* (acides, pH optimum 4.0) la takadiastase en poudre de la firme PARKE-DAVIS.

Activité: 10 ml d'une solution à 1% libèrent 5.0 mg de phosphore de 5 ml de β -glycérophosphate de sodium 0.10 M en 24 heures, à 37° et à pH 4.0 (Tampon acide acétique-acétate de sodium).

En dehors de ces enzymes, nous avons réalisé un certain nombre d'essais avec des préparations phosphatasiques brutes (simples autolysats d'organes, comme phosphatases du type I, précipités acétoniques des extraits aqueux des graines comme phosphatases du type II). Les résultats étant les mêmes, nous ne rapporterons ici que ceux obtenus avec les préparations énoncées ci-dessus.

Mesure de l'activité phosphatasique

Nous avons utilisé le protocole habituel suivi dans ce laboratoire^{12, 13}. L'acide orthophosphorique libéré était dosé par la méthode de COPAUX.

Action des réactifs des groupements aminés

a) *Acétylation par le cétène*. Le cétène est un réactif assez spécifique des groupements aminés des protéines naturelles. Cette réaction s'effectue à pH 4.5–8.5 et elle est très rapide¹⁴. Il réagit aussi avec les hydroxyles phénoliques, mais cette dernière réaction est relativement lente^{14, 15}. La seule exception connue est celle de l'hormone lactogène dont les hydroxyles phénoliques sont, dans certaines conditions, acétylés plus rapidement que les groupements NH_2 ¹⁶. Mais, même dans cet exemple, les groupements aminés sont totalement bloqués après une acétylation de 60 minutes. Le cétène réagit

aussi avec les groupements thiols^{17, 18}; il ne réagit pas avec les hydroxyles aliphatiques, les groupements guanidiques¹⁹ et les noyaux imidazole²⁰.

Nous avons traité par le cétène quatre de nos préparations phosphatasiques; celle du rein (type I), de la Moutarde-blanche, du son de Blé et de la prostate (type II).

Les acétylations ont été effectuées à 0° et à pH 5.5, pour les phosphatases acides et 8.0 pour la phosphatase alcaline. Nous avons pris: 300 ml d'une solution à 0.20% dans un tampon acide acétique-acétate de sodium 1 M à pH 5.5 pour les phosphatases de la Moutarde-blanche et du son de Blé; 300 ml d'un mélange à volumes égaux de la préparation prostatique avec le tampon acide acétique-acétate de sodium 1 N à pH 5.5 pour la phosphatase de la prostate et 300 ml d'une solution à 10% dans un tampon diéthylbarbiturate de sodium 0.10 M à pH 8.0 pour la phosphatase rénale.

Le cétène était produit dans un générateur identique à celui de HERRIOTT^{21*}. Nous avons fait passer un courant rapide de cétène pendant une heure. Le pH de nos solutions enzymatiques était attentivement suivi pendant la durée de l'acétylation à l'électrode de verre, et maintenu constant par affusion de soude normale. Nous avons prélevé des échantillons identiques de chaque solution acétylée au bout de 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 minutes. Ces échantillons ont été amenés au pH optimum de chaque phosphatase et leur activité phosphatasique a été déterminée. Des échantillons identiques ont été soumis à une dialyse, pendant une nuit. Les résultats étaient les mêmes dans les deux cas. Des témoins ont été dialysés dans les mêmes conditions, sans traitement par le cétène. Les résultats obtenus figurent sur le Tableau I.

TABLEAU I

ACTION DU CÉTÈNE SUR DIVERSES PHOSPHATASES

(Les chiffres représentent les activités relatives: mg de phosphore libérés sous forme d'acide ortho-phosphorique après l'action du cétène/mg libérés dans l'essai témoin. Ce rapport est multiplié par 100)

Origine de l'enzyme	pH de l'acétylation	Durée de l'action du cétène (en minutes)						
		5'	10'	15'	20'	30'	45'	60'
Rein (alcaline)	8.0	0	0	0	0	0	0	0
Prostate (acide)	5.5	88.8	83.3	77.7	69.4	38.8	5.5	2.7
Moutarde-blanche (acide)	5.5	100.0	100.0	97.7	95.4	86.3	81.8	72.2
Son de Blé (acide)	5.5	100.0	100.0	93.1	—	79.3	72.4	68.9

On voit que la phosphatase alcaline du rein est totalement inactivée après un traitement de cinq minutes par le cétène. Les phosphatases acides des graines conservent leur activité initiale intacte après un traitement de 30 minutes. La phosphatase acide de la prostate présente une chute d'activité appréciable après 15 minutes d'acétylation et elle est complètement inactivée au bout de 45 minutes.

La légère inhibition observée sur les phosphatases des graines après 45 minutes de traitement peut correspondre à un début de blocage des hydroxyles phénoliques. Ces groupements d'ailleurs paraissent être essentiels à l'activité phosphatasique, acide et alcaline². Mais ce travail portant plus spécialement sur les groupements aminés, nous

* Les acétylations ont été faites aux LABORATOIRES DE CHIMIE BACTÉRIENNE et DE CHIMIE BIOLOGIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR. Nous remercions MM. P. GRABAR, BOURLAND ET J. TABONE qui ont mis à notre dispositions les appareils et le matériel nécessaire et nous ont conseillé et aidé pendant ce travail.

n'avons pas prolongé l'action du cétène au-delà d'une heure pour avoir un blocage plus complet des hydroxyles phénoliques.

b) *Désamination par l'acide nitreux*. L'acide nitreux est fréquemment employé comme réactif des fonctions amines primaires des protéines qui peuvent subir sans dénaturation un p_H de 4.0-5.0. Les conditions habituelles de son utilisation sont: 0°, p_H 4.0-5.0 et NO_2Na 1 M dans le milieu. Dans ces conditions l'acide nitreux désamine les protéines sans provoquer une dénaturation de la molécule protéique²². Il réagit aussi avec des corps à fonction phénol par une sorte de réaction de diazotation du noyau, mais la désamination est beaucoup plus rapide, et c'est à elle qu'est d'habitude attribuée l'inactivation rapide d'une protéine physiologiquement active pendant l'action de l'acide nitreux²³.

L'acide nitreux réagit encore comme oxydant sur les groupements thiols. Cette réaction devient réversible sous l'influence des agents réducteurs²⁴.

Nous avons employé l'acide nitreux avec toutes les préparations phosphatasiques énumérées plus haut. Une partie de chaque solution enzymatique a été mélangée avec un volume égal de tampon acétique-acétate de sodium à p_H 4.0 et à ce mélange nous ajoutons un volume égal de NO_2Na 2 M. Une autre partie de la solution enzymatique utilisée comme témoin et, pour permettre de voir aussi l'inactivation par les ions hydrogène pouvant être associée à l'action de l'acide nitreux, a été traitée de la même façon, mais avec de l'eau distillée au lieu de nitrite de sodium. L'opération a eu lieu à 0°. Des échantillons convenables ont été prélevés à des intervalles précis (voir Tableau II), amenés au p_H optimum de chaque enzyme, à l'aide de $HONa$ 1 N, dialysés pendant la nuit, et leur activité fut mesurée le lendemain. Les résultats figurent sur le Tableau II.

TABLEAU II

ACTION DE L'ACIDE NITREUX SUR LES PHOSPHATASES ACIDES ET ALCALINES

(Les activités relatives sont calculées comme dans le Tableau I)

Origine de l'enzyme		Durée de contact								
		5'	30'	60'	2h	3h	4h	5h	18h	24h
Rein (alcaline)	Témoins*	6.55	6.55	5.60				4.58		
	Essais*	1.30	0.10	0.10				0.10		
	Activité relative	19.80	1.50							
Foie (alcaline)	Témoins*	6.10	6.10	6.10	4.35					0.22
	Essais*	0.87	0.87	0.87	0.22					inf.
	Activité relative	14.26	14.26	14.26	5.05					0
Foie (acide)	Témoins*	4.4	4.4	4.4	3.3					3.3
	Essais*	0.5	0.25	0.25	0.10					0.10
	Activité relative	11.3	5.6	5.6	3.3					3.3

TABLEAU II (continué)

Origine de l'enzyme		Durée de contact								
		5'	30'	60'	2h	3h	4h	5h	18h	25h
Prostate (acide)	Témoins*	7.2	4.58	3.3	2.3	1.7				0.50
	Essais*	4.8	3.0	1.3	0.90	0.60				inf.
	Activité relative	66.6	65.4	39.3	39.0	35.2				0
Moutarde- blanche (acide)	Témoins*	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
	Essais*	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	6.10	5.2
	Activité relative	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	63.5	54.1
Son de Blé (acide)	Témoins*	5.7	5.0	4.0	3.5	—	2.6	—	1.7	—
	Essais*	5.7	5.0	4.0	3.3	—	2.2	—	0.2	—
	Activité relative	100.0	100.0	100.0	94.2	—	84.6	—	11.7	—

* mg de P libérés sous forme de PO_4H_3 .

Les phosphatases alcalines du rein et du foie et la phosphatase acide du foie furent rapidement inactivées, presque totalement après 5 minutes de traitement. La phosphatase prostatique a été inactivée partiellement dès le début et totalement après 24 heures.

Les phosphatases acides végétales n'ont présenté une chute d'activité qu'après un traitement de 18 heures. La réaction de diazotation peut être responsable de cette lente inactivation.

Notons aussi la sensibilité de la phosphatase prostatique et de la phosphatase du son de Blé au pH assez acide de la réaction.

Sur le comportement de la phosphatase de la takadiastase envers l'acide nitreux, nous n'avons pas pu avoir de renseignements, parce que la désamination a lieu au pH optimum de l'enzyme et nous ne pouvons pas arrêter l'action de l'acide nitreux au moment voulu. D'ailleurs la phosphatase de la takadiastase traversait les membranes celluloses de nos dialyseurs rendant impossible ce mode d'élimination de l'excès de nitrite de sodium. Nous obtenons alors toujours une inactivation presque totale (87.5%), très difficile à interpréter.

c) *Action de l'aldéhyde formique.* Les réactions de l'aldéhyde formique avec les protéines sont nombreuses et complexes. Il réagit avec presque tous les groupements libres de la molécule protéique (fonctions amines, groupements thiols, guanidiques, indole, amide, il réagit aussi comme agent réducteur et quelquefois comme agent oxydant). Avec les groupements aminés la réaction a lieu à la température du laboratoire et à pH plus alcalin que 6.0. Cette réaction est une réaction d'équilibre et peut devenir

réversible par dilution, dialyse contre un tampon à pH 3.0 ou en présence de dimédon bloquant le formaldéhyde. Les réactions avec les autres groupements (guanidique, indole et amide) se produisent après un temps de contact prolongé à la neutralité ou plus rapidement mais en solution alcaline^{25, 26}. Ces combinaisons sont plus stables que celles obtenues avec les groupements aminés. Le formaldéhyde est en outre susceptible de former des réactions de condensation interne ("crosslinking") avec deux groupements différents d'une molécule protéique, en formant entre eux un pont méthylénique²⁷. Ces produits sont très stables, surtout si la durée du contact de la protéine avec le réactif est suffisamment longue. Des groupements NH_2 substitués par l'action de l'aldéhyde formique peuvent se combiner avec les groupements amide, indole, imidazole, phénol et autres. De cette façon, des groupements qui ne se combinent pas avec l'aldéhyde formique par eux-mêmes peuvent être impliqués par l'intermédiaire de ces réactions^{23, 27}.

A des concentrations élevées ou après un temps de contact prolongé, l'aldéhyde formique exerce une action dénaturante sur les protéines.

A cause de ces réactions multiples l'interprétation des changements observés sur l'activité et les autres propriétés des protéines naturelles après l'action de l'aldéhyde formique devient alors extrêmement difficile.

Pour étudier l'action de l'aldéhyde formique sur nos préparations phosphatasiques, nous avons adopté la méthode suivante:

Des échantillons des solutions enzymatiques ont été mis en contact pendant 1 heure à la température du laboratoire avec deux quantités différentes d'une solution d'aldéhyde formique à 10% créant une concentration de 1% et de 3% (0.33 et 1 M) en aldéhyde formique dans le milieu, à la neutralité (sans addition de tampon) et à pH 8.0 (tampon véronal sodique).

La solution d'aldéhyde formique était préparée par dépolymérisation du trioxyméthylène et titrée par mercurimétrie selon la méthode de BOUGAULT ET GROS²⁸.

Des témoins étaient traités de la même façon sans addition d'aldéhyde formique.

Après une heure, les échantillons amenés au pH optimum de chaque phosphatase (à l'aide de l'acide acétique 1 N ou $HO Na$ 1 N) et dilués ont été soumis à une dialyse pendant la nuit. Leur activité phosphatasique fut déterminée le lendemain.

TABLEAU III

ACTION DE L'ALDÉHYDE FORMIQUE SUR LES PHOSPHATASES ACIDES ET ALCALINES

(1 heure de contact à la neutralité)

(Les chiffres expriment les activités relatives calculées comme dans le Tableau I)

Concentration en aldéhyde formique (g p. 100)	Origine de l'enzyme						
	Rein I	Foie (alcaline) I	Foie (acide) II	Prostate II	Moutarde blanche II	Son de Blé II	Taka- diastase III
1.0	14.2	44.0	55.0	100.0	90.7	100.0	50.0
3.0	0	12.0	10.0	80.0	69.0	56.0	50.0

Le Tableau III montre qu'à une concentration de 1% en aldéhyde formique, seules les phosphatases alcalines, la phosphatase acide du foie et la takadiastase, sont inhibées. Mais, une concentration de 3% en aldéhyde formique provoque, en même temps qu'une inactivation totale des phosphatases alcalines, une inactivation partielle des phosphatases acides du type II.

Nous avons cherché à voir si cette inactivation partielle des phosphatases acides

était due à un blocage des groupements aminés ou à une dénaturation des enzymes par l'excès du réactif. Dans le premier cas, on pourrait retrouver l'activité perdue en dialysant à p_H acide. Nous avons effectué des dialyses de longue durée des phosphatases acides traitées par l'aldéhyde formique (Moutarde-blanche et son de Blé), à p_H 3.0 et 5.0, mais, dans aucun cas, nous n'avons pu récupérer l'activité initiale de ces enzymes.

D'autre part, la réaction de l'aldéhyde formique avec les groupements aminés est considérée comme instantanée, tandis que la dénaturation est augmentée par la durée de contact. Nous avons effectué des essais d'action de l'aldéhyde formique sur nos phosphatases acides en fonction du temps, en ajoutant le substrat, le tampon, etc., immédiatement après l'addition de l'aldéhyde formique ou en prolongeant le temps d'incubation jusqu'à 18 et 24 heures. Les résultats sont contenus dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

ACTION DE L'ALDÉHYDE FORMIQUE SUR LES PHOSPHATASES ACIDES DE LA MOUTARDE-BLANCHE ET DE LA PROSTATE EN FONCTION DU TEMPS

Origine de l'enzyme	Concentration en aldéhyde formique %	Durée du contact (en heures)			
		0	1	18	24
Moutarde-blanche	3	72.2	60.0	62.8	60.0
Prostate	3	100.0	80.0	66.6	—

On voit que, dans le cas de la phosphatase de la Moutarde-blanche, bien qu'il y ait une augmentation de l'inhibition avec le temps, la grosse chute d'activité est instantanée. Dans le cas de la phosphatase prostatique, au contraire, qui est insensible à l'action immédiate d'une concentration de 3% en aldéhyde formique, on observe une inactivation de 20% après une heure, qui augmente jusqu'à 45% après 18 heures d'incubation; cette inactivation peut être attribuée à une dénaturation de l'enzyme. Il est possible dans les deux cas qu'il s'agisse du blocage de groupements autres que les groupements aminés.

La phosphatase de la takadiastase est inactivée jusqu'à 50% par une concentration de 1% en aldéhyde formique et cette inactivation n'est pas augmentée par une concentration plus élevée du réactif. Ce sont les seules données que nous avons pu obtenir sur l'action des réactifs des fonctions amines sur les phosphatases du type III.

d) *Action de l'isocyanate de phényle.* L'isocyanate de phényle réagit avec les groupements aminés des protéines naturelles en formant des dérivés phényluréidiques à p_H autour de 8.0 et à 0°²⁹. Pourtant, ce réactif est loin d'être considéré comme un réactif spécifique des groupements aminés. Il existe une certaine évidence qu'il agit aussi, dans les mêmes conditions avec les hydroxyles phénoliques^{30, 23, 31}, mais cette réaction n'est pas encore élucidée, par suite de l'imperfection des techniques analytiques. Il réagit aussi avec les groupements thiols¹⁷ et guanidiques^{31, 23}.

Un facteur qui influence beaucoup la réaction de l'isocyanate de phényle avec les groupements NH_2 des protéines est la quantité de réactif ajouté: l'on considère^{29, 32} que l'isocyanate de phényle bloque tous les groupements aminés primaires des protéines quand il est ajouté à une quantité égale à la moitié de la quantité de la protéine, c'est-à-dire quand le rapport quantité de protéine/quantité de réactif est de 2/1.

En concentrations élevées (surtout quand ce rapport est supérieur à 1/5) l'isocyanate de phényle provoque des altérations plus profondes de la molécule protéique.

Nous avons déterminé l'influence de ce réactif sur toutes nos préparations phosphatasiques: Différentes quantités de solutions diastasiques ont été mélangées, à 0°, avec un volume égal de tampon à pH 8.0 (tampon diéthylbarbiturate de sodium et tampon carbonate de sodium-acétate de sodium; les résultats étaient les mêmes dans les deux cas) et de différentes quantités d'une solution d'isocyanate de phényle à 2% dans l'acétone pure, de façon à créer des rapports protéine diastasique/isocyanate de phényle correspondant à 2/1, 1/1, 1/2 et 1/8. Les solutions étaient agitées fréquemment. Des témoins étaient soumis au même traitement, sans addition d'isocyanate.

Après une heure de contact, à 0°, le précipité de diphenylurée formé était éliminé par centrifugation; nous avons prélevé des échantillons convenables des liquides surnageant limpides. Ces échantillons ont été amenés au pH optimum de chaque phosphatase et leur activité phosphatasique a été déterminée. Les résultats obtenus figurent dans le Tableau V.

TABLEAU V
ACTION DE L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE SUR LES PHOSPHATASES ACIDES
ET ALCALINES

(Contact 1 heure — à 0° et à pH 8.0)
(Activités relatives calculées comme dans le Tableau I)

Origine de l'enzyme	Rapport enzyme/isocyanate			
	2:1	1:1	1:2	1:8
Rein (alcaline)	78.1	43.7	25.0	0
Foie (alcaline)	52.3	—	23.8	—
Foie (acide)	27.7	—	5.5	—
Prostate (acide)	100.0	100.0	97.4	—
Moutarde-blanche (acide)	42.8	42.8	42.8	25.0
Son de Blé (acide)	78.7	74.2	46.9	—

On voit que l'isocyanate de phényle agit sur toutes les préparations (sauf sur la phosphatase prostatique) acides et alcalines, mais avec des modalités d'action différentes. La phosphatase de la Moutarde-blanche est plus sensible aux faibles doses d'isocyanate que les phosphatases alcalines. La phosphatase acide du foie est plus facilement inactivée que la phosphatase alcaline du même organe et cette dernière est plus sensible que la phosphatase rénale (nous avons observé le contraire avec l'aldéhyde formique).

Pour les phosphatases du type III, nous n'avons pas pu avoir de renseignements, la takadiastase étant détruite à pH 8.0.

Afin de préciser la nature de l'action de l'isocyanate de phényle sur les phosphatases acides, nous avons soumis une de nos phosphatases acides, la phosphatase de la Moutarde-blanche, au même traitement par l'isocyanate de phényle, mais à pH 5.2, cette fois, les groupements aminés étant présumés ne réagir avec ce réactif qu'en milieu alcalin.

Le Tableau VI montre l'action comparative de l'isocyanate de phényle sur la phosphatase de la Moutarde-blanche à pH 5.2 et 8.0. Nous voyons que l'inactivation

provoquée par de fortes doses de réactif (rapport supérieur à 1/2) peut être attribuée à une action non spécifique de l'isocyanate de phényle. Mais la nature de l'inactivation partielle provoquée par de faibles doses de ce réactif à p_H 8.0 reste encore à préciser.

TABLEAU VI
ACTION DE L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE SUR LA PHOSPHATASE DE LA MOUTARDE-BLANCHE À DIFFÉRENTS p_H
(Contact 1 heure — 0°)

p_H de la réaction	Rapport enzyme/isocyanate			
	2:1	1:1	1:2	1:8
5.2	100.0	100.0	37.8	27.5
8.0	42.8	42.8	42.8	25.0

DISCUSSION

En comparant l'action des quatre réactifs sur les phosphatases, on voit que toutes les phosphatases étudiées ne se comportent pas de la même façon.

Le fait qui prédomine, c'est une différence frappante entre le comportement des phosphatases acides (du type II) et le comportement des phosphatases alcalines envers tous ces réactifs, (à l'exception de la phosphatase acide du foie dont nous examinerons le cas plus loin).

(Pour les phosphatases acides du type III, les seules données que nous possédons, sont l'inactivation partielle par l'aldéhyde formique qui les différencie des autres types) (Tableau IV).

Pour les phosphatases alcalines, qui sont totalement inactivées par tous les réactifs, nous pouvons affirmer avec GOULD⁴ et ROCHE ET ABUL-FADL^{9, 10} que les groupements aminés paraissent être indispensables à leur activité.

Le cas des phosphatase acides est plus complexe. Les phosphatases des graines se sont révélées insensibles à l'action du cétène et de l'acide nitreux. Il convient de remarquer que ces deux réactifs sont les plus spécifiques des groupements aminés parmi les quatre réactifs employés. L'aldéhyde formique à de faibles concentrations est également sans influence. Par contre, les phosphatases des graines sont partiellement inactivées par un excès d'aldéhyde formique et par l'isocyanate de phényle.

La phosphatase prostatique est inactivée par le cétène et par l'acide nitreux; elle l'est cependant beaucoup plus lentement que les phosphatases alcalines. Par ailleurs, cette même phosphatase est moins sensible que les phosphatases des graines à l'action de l'aldéhyde formique et de l'isocyanate de phényle.

Pour interpréter ces faits, deux hypothèses peuvent être envisagées. La première est que les groupements aminés ne sont pas nécessaires à l'activité des phosphatases acides. L'inactivation partielle, provoquée par l'excès de l'aldéhyde formique, peut être attribuée au blocage d'autres fonctions, à des réactions de condensation interne ("cross-linking") ou, en tenant compte du gros excès du réactif et de la non réversibilité de la réaction, à une dénaturation des enzymes. Examinons maintenant le cas de l'isocyanate de phényle: sa spécificité (comme réactif des groupements NH_2) reste discutée,

son action peut porter sur d'autres groupements (hydroxyles phénoliques, groupements guanidiques, groupements iminés des noyaux indole ou imidazole). Il peut aussi agir d'une façon indirecte: en introduisant des chaînes volumineuses dans la molécule diastatique, pendant sa réaction avec les groupements NH_2 , il peut influencer défavorablement l'activité d'un groupement "essentiel" adjacent, mais non réagissant avec ce réactif²³, par une sorte d'empêchement stérique. D'ailleurs, d'autres protéines actives, comme l'insuline et le virus de la mosaïque du tabac, pour lesquelles les groupements NH_2 ne constituent pas des groupements essentiels, sont inactivées partiellement par l'aldéhyde formique et l'isocyanate de phényle^{30, 33, 31, 34, 35}. La seconde hypothèse est qu'il y a une différence de "réactivité" entre les fonctions amines des phosphatases acides et celles des phosphatases alcalines. Il a été observé dans certaines protéines que les groupements aminés ne réagissaient pas tous avec les réactifs employés^{36, 37}. Des recherches très récentes³⁸ ont montré l'existence dans les protéines de différents types de groupements aminés avec des propriétés chimiques distinctes. En plus, la réactivité d'un même groupement: des groupements $\varepsilon\text{-NH}_2$ de la lysine, dépend de l'état de la protéine (c'est-à-dire, si elle est intacte ou dénaturée) et du réactif utilisé^{38, 39}. Ces fonctions n'ont pas toujours la même possibilité de réagir, peut-être parce qu'elles participent, dans la molécule protéique, à des liaisons labiles⁴⁰. Il est bien possible que les groupements aminés des phosphatases acides soient d'un type différent de ceux des phosphatases alcalines ou qu'ils possèdent une "réactivité" moindre envers certains réactifs.

Nos renseignements, sont pour le moment, insuffisants pour opter entre ces deux hypothèses. Il est nécessaire qu'on puisse soumettre ces résultats au contrôle analytique: suivre, par exemple, le blocage des groupements NH_2 et des autres fonctions susceptibles d'être bloquées pendant l'action d'un réactif, parallèlement à la variation de l'activité phosphatasique. Mais pour cela, il faut posséder des enzymes purs et des techniques analytiques adéquates.

Ce travail ne fait qu'ajouter de nouveaux arguments permettant de distinguer les enzymes acides végétaux et la phosphatase de la prostate des phosphatases animales alcalines.

Nos recherches ont également mis en évidence les faits suivants:

1. Dans le même type de phosphatases il existe, à côté des analogies d'ensemble, des différences particulières:

a) Différence de comportement des diverses phosphatases du même type envers les réactifs des fonctions amines (plus petites que les différences qui séparent les deux types). C'est ainsi que la phosphatase rénale et la phosphatase hépatique se comportent différemment avec l'aldéhyde formique et l'isocyanate de phényle.

La phosphatase prostatique et les phosphatases végétales présentent certaines différences de comportement envers tous les réactifs employés (Tableaux I-V). Des différences analogues ont été signalées aussi par GOULD⁴ et ROCHE ET ABUL-FADL^{9, 10} entre la phosphatase intestinale et la phosphatase rénale.

b) La phosphatase prostatique et, à un degré moindre, la phosphatase du son de Blé, sont plus sensibles à l'action dénaturante des ions hydrogène que la phosphatase de la Moutarde-blanche (Tableau II).

D'autres effecteurs aussi, ont montré des différences existant au sein d'un même type de phosphatases: COURTOIS ET BOSSARD⁴¹ ont observé une irrégularité de comportement des diverses phosphatases du type II, envers les sulfocyanates. Toutes ces différences dérivent probablement de la diversité des apoenzymes protéiques.

2. La phosphatase acide du foie montre un comportement identique à celui de l'enzyme alcalin du même organe, (sauf avec l'isocyanate de phényle qui l'inhibe plus fortement). Ce fait nous incite à penser à l'existence possible d'un constituant commun pour les phosphatases appartenant à des types différents, mais ayant la même origine.

3. La lente action inhibitrice du cétène et de l'acide nitreux sur les phosphatases acides apporte un argument non négligeable à l'appui de l'hypothèse^{3, 4} que les hydroxyles phénoliques sont indispensables à l'activité phosphatasique, acide et alcaline.

Nous désirons remercier MM. les Professeurs P. FLEURY et J. COURTOIS pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos recherches.

RÉSUMÉ

L'action des quatre réactifs des fonctions amines (cétène, acide nitreux, aldéhyde formique et isocyanate de phényle) a été étudiée sur différentes phosphomonoestérases acides et alcalines (phosphatases alcalines du rein et du foie de Bœuf, phosphatases acides des graines de la Moutarde-blanche, du son de Blé, de la prostate humaine et du foie du Bœuf et la phosphatase acide du type III de la takadiastase). Les phosphatases alcalines (et la phosphatase acide hépatique) ont été totalement inactivées par tous ces réactifs. Les phosphatases acides n'étaient que très lentement inhibées par le cétène et l'acide nitreux et partiellement inactivées par un excès d'aldéhyde formique ou d'isocyanate de phényle.

Ces différences entre ces deux types d'enzymes peuvent être attribuées à ce que les groupements aminés ne sont pas indispensables à l'activité des phosphatases acides. On pourrait aussi envisager une "réactivité" différente de ces fonctions chez les phosphatases acides. L'état actuel de nos connaissances ne permet pas de choisir entre ces deux hypothèses.

Ce travail met aussi en évidence des différences moindres existant parmi les phosphatases du même type.

SUMMARY

The action of four reagents of the amino-groups (ketene, nitrous acid, formaldehyde and phenyl isocyanate) has been studied upon different acid and alkaline phosphomonoesterases (alkaline phosphatases of beef liver and kidney, acid phosphatases of white mustard seeds, wheatbran, human prostate and beef liver and the acid phosphatase of type III of takadiastase). The alkaline phosphatases (and the liver acid phosphatase) were completely inactivated by all these reagents. The acid phosphatases were only very slowly inhibited by ketene and nitrous acid and partially inactivated by an excess of formaldehyde or by phenyl isocyanate.

These differences between the two types of enzymes may be attributed to the fact that the amino-groups are not indispensable for the activity of acid phosphatases or to the different "reactivity" of these groups in acid phosphatases. The present state of our knowledge does not permit us to decide in favour of the one or the other hypothesis.

This work also shows smaller differences which are to be found in phosphatases of the same type.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung von 4 Reagentien der Aminogruppen (Keten, salpetrige Säure, Formaldehyd und Phenylisocyanat) auf verschiedene saure und alkalische Phosphomonoesterasen untersucht (alkalische Phosphatasen der Niere und Ochsenleber, saure Phosphatasen der Samenkörner des weissen Senfs, der Weizenkleie, der menschlichen Prostata und der Ochsenleber, sowie die saure Phosphatase des Typus III aus Takadiastase).

Die alkalischen Phosphatasen (sowie die saure Leberphosphatase) wurden durch alle diese Reagentien vollständig inaktiviert. Die sauren Phosphatasen wurden durch Keten und salpetrige Säure nur sehr langsam geschwächt, und durch einen Überschuss an Formaldehyd oder Phenylisocyanat teilweise inaktiviert.

Diese Unterschiede zwischen den beiden Enzymtypen können davon herrühren, dass die

Aminogruppen für die Wirkung der sauren Phosphatasen nicht unentbehrlich sind. Man könnte aber auch eine unterschiedliche Reaktivität dieser Gruppen bei den sauren Phosphatasen ins Auge fassen. Im gegenwärtigen Zustand unserer Kenntnisse kann zwischen diesen beiden Hypothesen keine Wahl getroffen werden.

In dieser Arbeit sind auch geringfügigere Unterschiede, welche zwischen Phosphatasen des gleichen Typus bestehen, zu Tage getreten.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. S. G. BARRON ET T. P. SINGER, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 221.
- ² I. W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 405.
- ³ J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET E. DANZAS, *Bull. soc. chim. biol.*, (Trav.), 26 (1944) 1153.
- ⁴ B. S. GOULD, *J. Biol. Chem.*, 56 (1944) 365.
- ⁵ G. SCHMIDT ET J. THANNHAUSER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 369.
- ⁶ V. BACCARI ET G. AURICCHIO, *Boll. soc. biol. sper.*, 12 (1946) 49.
- ⁷ J. COURTOIS ET C. ANAGNOSTOPOULOS, *Compt. rend. ac. sci.*, 226 (1948) 523.
- ⁸ C. ANAGNOSTOPOULOS, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 158.
- ⁹ J. ROCHE ET M. A. M. ABUL-FADL, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 999.
- ¹⁰ J. ROCHE ET M. A. M. ABUL-FADL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 427.
- ¹¹ NGUYEN-VAN-THOAI, J. ROCHE ET L. SARTORI, *Compt. rend. soc. biol.*, 138 (1944) 47.
- ¹² J. COURTOIS, *Thèse. Doct. Sc. Phys.*, Paris (1938).
- ¹³ M. BOSSARD, *Thèse. Doct. Univ. Pharm.*, Paris (1946).
- ¹⁴ R. M. HERRIOTT ET J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1934) 35.
- ¹⁵ R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1935) 283.
- ¹⁶ C. H. LI ET A. KALMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 285.
- ¹⁷ H. L. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 385.
- ¹⁸ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 497.
- ¹⁹ A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1452.
- ²⁰ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Un symposium sur les protéines (Congrès Inter. Chim. Biol. (Liège) (1946) 257.*
- ²¹ R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 169 (1934) 8.
- ²² J. ST. PHILPOT ET P. A. SMALL, *Biochem. J.*, 32 (1938) 542.
- ²³ H. S. OLCOTT ET H. FRAENKEL-CONRAT, *Chem. Revs.*, 41 (1947) 151.
- ²⁴ E. WEILL ET M. L. CADWELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 214.
- ²⁵ H. FRAENKEL-CONRAT ET H. S. OLCOTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 34.
- ²⁶ H. FRAENKEL-CONRAT ET B. A. BRANDON ET H. S. OLCOTT, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 99.
- ²⁷ H. FRAENKEL-CONRAT ET H. S. OLCOTT, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 827.
- ²⁸ J. BOUGAULT ET R. GROS, *J. pharm. chim.*, 26 (1922) 41.
- ²⁹ S. J. HOPKINS ET A. WORMALL, *Biochem. J.*, 27 (1933) 740.
- ³⁰ G. L. MILLER ET W. L. STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 905.
- ³¹ W. E. GAUNT ET A. WORMALL, *Biochem. J.*, 30 (1936) 1915.
- ³² I. W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 547.
- ³³ K. FREUDENBERG, W. DIRSCHERL ET H. EYER, *Z. physiol. Chem.*, 187 (1930) 89.
- ³⁴ C. K. STERN ET A. WHITE, *J. Biol. Chem.*, 122 (1937) 371.
- ³⁵ B. KASSANIS ET A. KLECZKOWSKI, *Biochem. J.*, 38 (1944) 20.
- ³⁶ A. M. PAPPENHEIMER JR., *J. Biol. Chem.*, 125 (1938) 201.
- ³⁷ A. KLECZKOWSKI, *Brit. J. Exptl. Path.*, 21 (1940) 1.
- ³⁸ R. P. PORTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 105.
- ³⁹ BRAND et coll., *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 1524.
- ⁴⁰ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 989.
- ⁴¹ J. COURTOIS ET M. BOSSARD, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 406.

Reçu le 21 février 1949