

SPÉCIFICITÉ D'ORGANE DES PHOSPHATASES  
 ALCALINES ANIMALES ET ORIGINE DE LA PHOSPHATASE  
 ALCALINE DU SÉRUM HUMAIN AU COURS DES  
 HYPERPHOSPHATASÉMIES

par

JEAN ROCHE ET HENRI SARLES\*

*Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris*

et

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie,  
 Marseille (France)*

De nombreux tissus animaux renferment une phosphatase alcaline (phosphomono-estérase) de  $p_H$  optimum voisin de 9.5 et dont la sensibilité à certains effecteurs présente des caractères propres à chaque organe. Pour CLOETENS<sup>1</sup>, les différences observées à cet égard seraient liées au mélange en proportions diverses de deux phosphatases. BODANSKY<sup>2</sup>, BELFANTI, CONTARDI ET ERCOLI<sup>3</sup>, ROCHE, DE LAROMIGUIÈRE ET LAURENS<sup>4</sup> envisagent au contraire l'existence d'enzymes particuliers à chaque type cellulaire. Les faits sur lesquels on s'est basé pour distinguer ceux-ci sont d'interprétation incertaine, sauf en ce qui concerne la phosphatase de la muqueuse intestinale, plus faiblement inhibée que celle des autres organes par les acides biliaires<sup>5</sup>, les oxalates alcalins<sup>6</sup>, l'aldéhyde formique<sup>5</sup>. La sensibilité des phosphatases aux effecteurs est en effet fonction, dans une très large mesure, de leur degré de purification et ses variations quantitatives d'une préparation à l'autre ne permettraient de différencier avec certitude ces enzymes qu'à condition d'être importantes, et tel n'est pas toujours le cas.

Nous nous sommes proposés de démontrer l'identité ou la diversité des phosphatases alcalines en étudiant leur affinité pour un même substrat. La détermination de la constante d'affinité des enzymes intestinal, mammaire, osseux et rénal a fait l'objet de travaux<sup>6-11</sup> dont les résultats ne peuvent être coordonnés. Ils ont en effet été obtenus selon des modalités particulières à chaque auteur et la valeur de  $K_M$  est fonction des conditions dans lesquelles elle a été établie. Le premier but de nos recherches a été de mesurer l'affinité des phosphatases alcalines du foie, de la muqueuse intestinale, des os, du rein, pour un substrat dans des expériences comparatives, afin de mettre en évidence leur identité ou leur diversité.

Ayant démontré qu'il existe des phosphatases alcalines spécifiques de chaque organe, nous avons cherché à tirer parti de cette notion pour étudier l'origine de l'enzyme présent dans le sérum sanguin. L'activité phosphatasique de celui-ci est susceptible d'augmenter très fortement au cours d'états pathologiques osseux (maladie de PAGET, métastases osseuses de cancers) ou hépatiques (ictères par rétention) et l'on admet que ce phénomène, dont la clinique a mis à profit l'étude, est dû au passage dans le

\* Boursier de Recherches de l'Institut National d'Hygiène

sang d'enzymes cellulaires. Toutefois, il n'a pas encore été possible de définir la part qui revient à un organe déterminé dans la phosphatasémie et l'on en a été réduit dans ce domaine à enregistrer des coïncidences. Les phosphatasées des divers organes ayant été au préalable caractérisées par des constantes d'affinité différentes, le second but de notre travail a été de déterminer celle des enzymes de sérum humains normaux ou hyperphosphatasémiques. Les résultats obtenus devaient, a priori, permettre de préciser, d'une part, si les premiers renferment ou non un mélange de phosphatasées, et d'autre part, si l'on peut ou non rapporter à un tissu, différent selon les états pathologiques, l'excès d'enzymes présent dans les seconds.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel d'étude et Techniques.* Des phosphatasées alcalines de foie (Bœuf, Chien) de muqueuse intestinale (Chien), d'os (foetus à terme ou près du terme d'Homme et de Mouton), de rein (Bœuf, Chien) ont été extraits des organes broyés, par autolyse de 24 heures en présence de 3 à 5 volumes d'eau additionnée de 20% d'acétone et de 10% d'un mélange à parties égales de toluène et d'acétate d'éthyle. Les extraits ont ensuite été précipités par l'acétone à 60%. Les produits obtenus, mis en solution dans l'eau, présentent une affinité pour le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium rigoureusement identique à celle des préparations purifiées par plusieurs précipitations acétонiques. De même, le fractionnement entre des concentrations de 38 à 50% d'acétone et la conservation pendant plusieurs semaines à 0° n'ont exercé aucune influence à cet égard. Ce dernier fait montre que nos préparations étaient plus stables que celles de l'enzyme rénal étudié par H. ET E. ALBERS<sup>12</sup>, la phosphatasée purifiée selon les indications de ces auteurs s'inactivant spontanément en quelques semaines, même si elle est conservée sous vide. Ceci étant, nous avons employé dans la plupart de nos essais des enzymes n'ayant subi qu'une précipitation acétonique. Quant aux sérum, ils provenaient d'hommes à jeun et ont été étudiés quatre heures environ après leur prélèvement. Le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium pur, que nous remercions M. O. BAILLY d'avoir mis à notre disposition en quantité importante, a servi de substrat dans toutes nos expériences, poursuivies à  $pH = 9.7$  ( $\pm 0.1$ ) et à  $37^\circ$  ( $\pm 0.1$ )\*.

L'étude de l'affinité d'un enzyme pour un substrat repose sur la mesure de l'activité du premier sur le second à diverses concentrations en celui-ci. Nous l'avons poursuivie dans des conditions se prêtant à une comparaison rigoureuse des résultats. Tous les réactifs, préparés à l'eau bidistillée, ont été ramenés à  $pH = 9.7$  et de fréquents contrôles, à l'électrode de verre, du  $pH$  des mélanges réactionnels ont été opérés. La composition des essais, d'un volume total de 10 ml, était la suivante: solution enzymatique ou sérum, de 0.2 à 1.0 ml; solution tampon de MICHAËLIS au vénoral sodique ( $pH = 9.8$ ) 4.0 ml; sulfate de magnésium 0.004 M;  $\beta$ -glycérophosphate de sodium 0.1-0.0005 M. La durée de l'hydrolyse a été choisie de manière à ce que le dédoublement du substrat ne porte pas sur plus de 10% de la quantité d'ester mise en œuvre; elle a varié selon les cas de 30 minutes à 3 heures. Le dosage des phosphates minéraux libérés a été opéré par la méthode de BRIGGS-RONISON. Dans des prises d'essai dont la dilution préalable (cas des fortes concentrations en substrat) avait éliminé toute possibilité d'erreur due à un excès d'ester.

L'expression la plus objective de l'affinité d'un enzyme pour un substrat est la constante d'affinité  $K_M$ , inverse de la constante de dissociation moléculaire de la combinaison enzyme-substrat ou constante de MICHAËLIS  $K_m$ . Le but de nos expériences était de déterminer  $K_m$  pour calculer  $K_M = 1/K_m$ . Dans le cas des phosphatasées de divers organes, nous avons disposé de préparations très actives ( $Q_p = 2000$  à 8000), que nous avons dilué afin de poursuivre les essais de détermination de  $K_m$  selon la méthode de MICHAËLIS ET MENTEN<sup>13</sup>, dont l'application aux phosphatasées a été développée par COURTOIS<sup>6</sup>. Nous avons établi pour cela des courbes de vitesse d'hydrolyse du substrat S en fonction de  $-\log[S]$ , en prenant comme indice de la vitesse de la réaction la quantité de phosphates minéraux libérée dans les conditions de l'expérience (vitesse initiale). Lorsque la réaction est catalysée par un enzyme unique, ces courbes affectent la forme d'une lettre S majuscule; elles sont alors symétriques par rapport à un point d'inflexion correspondant à la moitié de la vitesse maxima pour  $[S] = K_m$ . La valeur

\* La valeur de  $pH = 9.2$  a été indiquée par erreur dans une note préliminaire (C. R. Soc. Biol., 142 (1948) 917).

de la constante de MICHAËLIS a été en outre déterminée selon VON EULER ET LAURIN<sup>14</sup> à partir des courbes de vitesse d'hydrolyse du substrat (activité enzymatique en période de vitesse initiale) en fonction de  $[S]$ ;  $K_m$  correspond alors à la concentration en ester

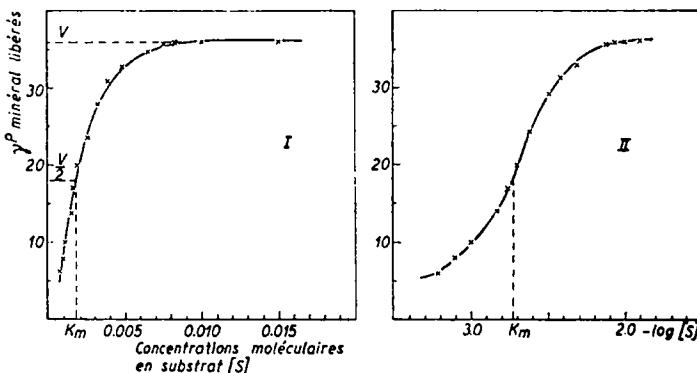


Fig. 1. Hydrolyse du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium par la phosphatase alcaline du foie (Chien) agissant à diverses concentrations moléculaires en substrat  $[S]$ , à  $pH = 9.7$  et à  $37^\circ$  (conditions expérimentales indiquées dans le texte) I. Abscisses:  $[S]$ , ordonnées:  $\gamma P$  minéral libérés. II. Abscisses:  $-\log [S]$ , ordonnées:  $\gamma P$  minéral libérés.

à laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maxima. Les deux modes de détermination de  $K_m$  ont été employés simultanément dans le cas des phosphatases des organes. Ils ont donné des résultats concordants, à de très minimes écarts près, et un exemple des documents expérimentaux obtenus est reproduit sur la Fig. 1.

Il n'a été possible de déterminer  $K_m$  que sur les courbes d'activité en fonction de  $[S]$  dans le cas des sérum. En effet, comme le montre l'examen de la Fig. 2, ces courbes se prêtent à pareille opération, tandis qu'il n'en est pas de même de celles traduisant la vitesse de l'hydrolyse en fonction de  $-\log [S]$ . Ces dernières ne présentent pas de point d'inflexion, pour des raisons que nous discuterons plus bas. Aussi avons-nous estimé que la valeur de la "constante de MICHAËLIS  $K_m$ " établie dans ces conditions ne permettait pas de définir celle de la constante d'affinité  $K_M$ , mais seulement d'obtenir

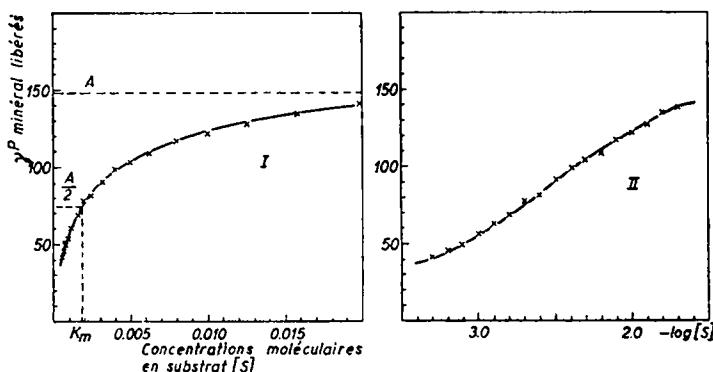


Fig. 2. Hydrolyse du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium par la phosphatase alcaline du sérum humain (No. 17, métastases osseuses d'un cancer du sein, 21 unités BODANSKY) agissant à diverses concentrations moléculaires en substrat  $[S]$ , pendant 3 heures à  $pH = 9.7$  et à  $37^\circ$  (conditions expérimentales indiquées dans le texte). I. Abscisses:  $[S]$ , ordonnées:  $\gamma P$  minéral libérés. II. Abscisses:  $\log [S]$ ,  $\gamma P$  minéral libérés.

une valeur apparente de celle-ci, que nous désignons sous le nom d'indice d'affinité  $I_M$  ( $I_M = 1/K_M$ ). Celui-ci est le témoin de l'affinité globale du système enzymatique, quel que soit le nombre de ses constituants. Sa détermination exige celle de la vitesse maxima de l'hydrolyse ou, ce qui revient au même, celle de l'activité maxima A de l'enzyme sérique lorsqu'il est saturé par le substrat. L'examen de la courbe 1 de la Fig. 2 montre que cette opération est facile à réaliser par la méthode graphique, comme dans le cas des phosphatasées d'organe (courbe 1, Fig. 1).

### Résultats expérimentaux

Les valeurs de  $K_M$  caractérisant la phosphatasée alcaline de chaque organe se sont montrées identiques ( $\pm 5\%$ ) dans toutes les expériences poursuivies sur un enzyme provenant d'un même tissu, quelle que soit l'origine animale de celui-ci. Il n'y a donc lieu de rapporter ici que des moyennes communes aux espèces animales étudiées. Toutefois, dans le cas particulier des os, nous n'avons retenu que les résultats obtenus sur l'enzyme d'embryons à terme ou près du terme celui d'organismes moins développés ne paraissant pas identique. Les valeurs moyennes de  $K_M$  ont été rassemblées dans le Tableau I.

TABLEAU I

VALEURS MOYENNES DES CONSTANTES D'AFFINITÉ  $K_M$  POUR LE  $\beta$ -GLYCÉROPHOSPHATE DE SODIUM DES PHOSPHATASES ALCALINES DE DIVERS ORGANES À PH = 9.4 ET À 37°

| Organe                       | Nombre de préparations | Nombre de déterminations de $K_M$ | Valeur moyenne de $K_M$ |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Foie (Bœuf, Chien)           | 6                      | 8                                 | 550                     |
| Muqueuse intestinale (Chien) | 3                      | 6                                 | 200                     |
| Os (Homme, Mouton)           | 5                      | 8                                 | 860                     |
| Rein (Bœuf, Chien)           | 3                      | 5                                 | 360                     |

L'indice d'affinité  $I_M$ , correspondant à  $K_M$  pour l'enzyme sérique, a été déterminé sur dix-neuf sérums humains, les uns provenant de sujets normaux, les autres hyperphosphatasémiques. Comme ces derniers avaient été prélevés chez des sujets atteints d'affections hépatiques ou osseuses, on pouvait espérer que les valeurs d' $I_M$  permettraient de différencier les enzymes du foie et des os chez les uns et les autres et d'établir l'origine des diverses hyperphosphatasémies. Les résultats obtenus ont été groupés dans le Tableau II, où l'on trouvera les valeurs de l'activité phosphatasique maxima A et celles de l'indice d'affinité  $I_M$  des sérums. Pour des raisons de commodité, A a été exprimé en unités arbitrairement choisies, une unité étant égale à 35 γ de phosphore minéral libérés en 3 heures d'hydrolyse par ml de sérum. A traduit l'activité phosphatasique d'un sérum avec plus de précision que l'expression de celle-ci en unités BODANSKY; cette dernière est d'un emploi usuel plus commode, puisqu'elle n'exige qu'un seul dosage, mais elle ne permet pas le calcul d' $I_M$ .

### DISCUSSION DES RÉSULTATS

1. *Affinité pour le substrat et spécificité d'organe des phosphatasées alcalines.* L'examen du Tableau I ne permet aucun doute sur la diversité des phosphatasées alcalines du foie, *Bibliographie p. 284.*

TABLEAU II

ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE MAXIMA A ET INDICE D'AFFINITÉ  $I_M$  POUR LE  $\beta$ -GLYCÉROPHOSPHATE DE SODIUM À pH = 9.4 ET À 37° DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE SÉRUMS HUMAINS NORMAUX ET HYPERPHOSPHATASÉMIQUES

| Etat du sujet  | Activité phosphatasique maxima A | Indice d'affinité $I_M$ |
|--|----------------------------------|-------------------------|
| <i>I. Sujets normaux ou à phosphatasémie normale</i> |                                  |                         |
| 1. Mélitococcie, le 5.X.1948                         | 3.0                              | 1600                    |
| 2. Mélitococcie, le 13.XI.1948                       | 4.4                              | 1000                    |
| 3. Hypertension                                      | 3.6                              | 1000                    |
| 4. Néoplasme du sein avec métast. oss.               | 4.0                              | 1000                    |
| 5. Mélitococcie                                      | 4.5                              | 1100                    |
| 6. Sujet normal                                      | 4.7                              | 1000                    |
| 7. Sujet normal                                      | 5.0                              | 1000                    |
| 8. Néoplasme gastrique                               | 6.0                              | 900                     |
| 9. Sujet normal                                      | 7.4                              | 870                     |
| <i>II. Ictères par rétention</i>                     |                                  |                         |
| 10. Récidive de néoplasme gastrique                  | 13.0                             | 715                     |
| 11. Lithiase du cholédoque                           | 15.0                             | 660                     |
| 12. Métastase ganglionnaire de cancer colique        | 19.0                             | 670                     |
| 13. Lithiase biliaire, le 30.IV.1948                 | 15.0                             | 710                     |
| 14. Lithiase biliaire, le 5.V.1948                   | 32.0                             | 590                     |
| <i>III. Maladies osseuses</i>                        |                                  |                         |
| 15. Métastases multiples de cancer prostatique       | 16.0                             | 840                     |
| 16. Métastases osseuses de cancer du sein            | 20.0                             | 625                     |
| 17. Métastases osseuses de cancer du sein            | 20.8                             | 550                     |
| 18. Maladie de Paget                                 | 75.0                             | 520                     |
| 19. Maladie de Paget                                 | 100.0                            | 580                     |

de la muqueuse intestinale, de l'os et du rein. Ces enzymes sont caractérisés par des affinités très différentes pour un même substrat et les écarts de  $K_M$  observés sont beaucoup plus significatifs que les différences de sensibilité des mêmes phosphatasées aux effecteurs signalées antérieurement<sup>1-5</sup>. La spécificité d'organe des phosphatasées alcalines est manifeste. Comme aucun fait ne permet de penser que leurs groupements actifs ne sont pas identiques, il est légitime de rapporter la diversité de  $K_M$  à celle des apoenzymes protéiques.

L'affinité de la phosphatasée osseuse pour l'ester présente un intérêt particulier. En effet, selon un schéma général du mécanisme biochimique de l'ossification élaboré par l'un de nous<sup>15</sup>, la glycogénolyse phosphorylante permet à la fois de drainer vers les os les phosphates sanguins et de fournir à la phosphatasée son substrat physiologique, formé au sein de la substance osseuse. L'affinité exceptionnellement élevée de la phosphatasée des os la rend apte à fixer l'ester, même à de très faibles concentrations des humeurs en celui-ci, et à l'hydrolyser au fur et à mesure de sa formation. C'est là un état de choses favorable à la production osseuse d'ester de CORI (déplacement de l'équilibre donnant naissance à ce corps) et à l'efficacité physiologique de la phosphatasée.

On ne saurait, par contre, attribuer de signification précise à la faible valeur de  
Bibliographie p. 284.

$K_M$  de l'enzyme intestinal, valeur voisine de celle caractérisant les phosphatases acides de la prostate<sup>16</sup>, du cerveau<sup>17</sup>, ni à celle, relativement élevée, propre aux enzymes rénal et hépatique\*. Il est possible que des phosphatases alcalines dont l'activité est couplée à celle de processus métaboliques de phosphorylation, dont l'évolution est rapide, présentent pour leurs substrats une affinité beaucoup plus grande que d'autres, dont la fonction physiologique est plus autonome (hydrolyse digestive d'esters alimentaires).

2. Sur l'affinité globale d'un mélange de phosphatases pour un même substrat. Lorsqu'un substrat est soumis à l'action simultanée de plusieurs enzymes de  $K_M$  divers, l'affinité du système doit nécessairement présenter des caractères particuliers. Comme on pouvait a priori penser que le sérum renferme plusieurs phosphatases alcalines, il y avait lieu d'étudier le comportement d'un mélange de celles-ci pour interpréter les résultats. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer l'affinité pour le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium à  $pH = 9.7$  et à  $27^\circ$  de préparations renfermant les enzymes intestinal ( $K_M = 200$ ) et osseux ( $K_M = 860$ ). On trouvera reproduit sur la Fig. 3 un exemple des résultats obtenus sur les phosphatases de ces deux origines et sur leur mélange.

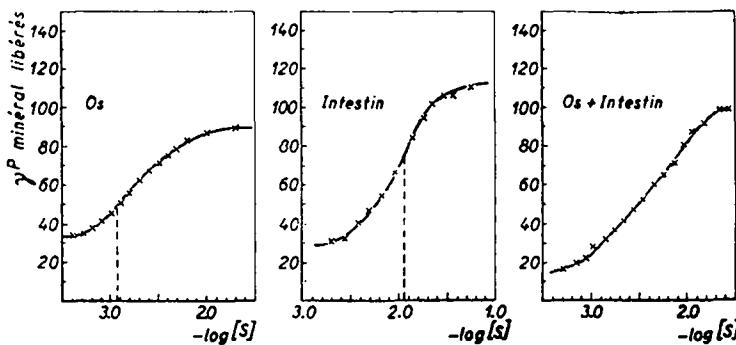


Fig. 3. Hydrolyse du  $\beta$ -glycérophosphate de sodium par la phosphatase alcaline des os, par celle de la muqueuse intestinale et par leur mélange, agissant à diverses concentrations moléculaires en substrat  $[S]$ , à  $pH = 9.7$  et à  $27^\circ$  (conditions expérimentales indiquées dans le texte). Abscisses :  $-\log [S]$ . Ordonnées :  $\gamma^P$  minéral libérés.

La courbe de l'activité enzymatique en fonction de  $-\log [S]$  diffère sensiblement lorsque l'on opère en présence d'une seule ou de deux phosphatases. Elle n'affecte pas dans le second cas la forme classique d'un S dont les deux branches sont symétriques par rapport à un point d'infexion définissant  $K_m$ . Elle offre au contraire en son milieu une large zone sans inflexion, ce qui rend impossible le repérage de  $K_m$ . La comparaison des Figs 2 et 3 fait ressortir une analogie entre les documents que l'on peut établir sur un mélange de deux phosphatases de  $K_m$  différents et sur le sérum. Aussi l'existence dans celui-ci de plusieurs enzymes devait-elle être considérée comme probable.

Ces observations sont défavorables à l'hypothèse de CLOETENS<sup>1</sup>, selon laquelle les tissus animaux renfermeraient un mélange de deux phosphatases alcalines. L'argumentation sur laquelle repose la manière de voir de cet auteur est basée sur les résultats de l'étude de la sensibilité de ces enzymes non purifiées aux effecteurs et nous avons signalé les incertitudes qu'elle comporte. Or, les vingt-sept courbes d'activité phosphatasique

\* Les valeurs très élevées obtenues par JACOBSEN<sup>8</sup> pour la phosphatase du rein de Porc n'ont pas été retrouvées au cours de ce travail. Par contre, celle indiquée par BODANSKY<sup>11</sup> pour l'enzyme des os de Rat est sensiblement inférieure à la notre, laquelle doit, pour des raisons indiquées plus haut, être considérée comme propre aux foetus à terme.

en fonction de  $-\log[S]$  à partir desquelles a été établi le Tableau I présentent toutes la forme typique en S que l'on obtient en mettant en œuvre un enzyme unique. Par contre, les mélanges de deux phosphatases conduisent toujours à des courbes analogues à celle reproduite sur la Fig. 3. Il n'y a donc pas lieu de retenir la théorie de CLOETENS.

### 3. Activité phosphatasique du sérum et origine des phosphatases alcalines circulantes.

La valeur apparente de  $K_M$ , à savoir celle de l'indice d'affinité  $I_M$ , de la phosphatase alcaline n'est pas identique dans tous les sérums. Elle est d'autant plus élevée que l'activité phosphatasique du sérum, A, est plus faible et ses variations en fonction de A s'ordonnent régulièrement selon une courbe, que reproduit la Fig. 4 (données du Tableau II).

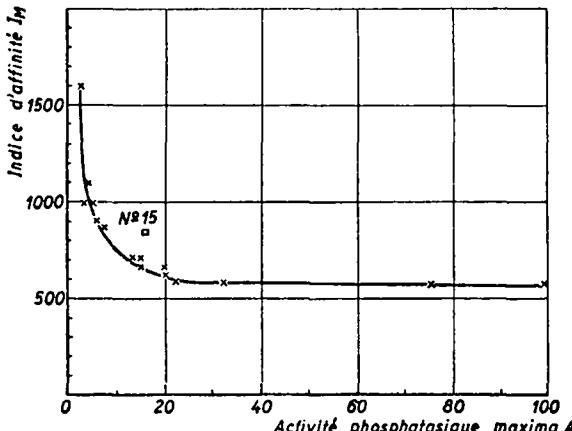


Fig. 4. Variations de l'indice d'affinité  $I_M$  des phosphatases alcalines de sérums humains pour le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium en fonction de l'activité phosphatasique maxima A de sérums normaux ou hyperphosphatasémiques recueillis au cours d'états pathologiques divers (voir Tableau II).  
Abscisses: activité phosphatasique maxima A, ordonnées: indice d'affinité  $I_M$ .

Cette courbe est, à partir de l'ordonnée 1600, asymptote à une verticale d'abscisse 3 et, à partir de l'abscisse 35, asymptote à une horizontale d'ordonnée 550. Un point expérimental seulement sur dix-neuf (No. 15, métastase osseuse de cancer) est aberrant. Il en découle que, si l'indice d'affinité des sérums est susceptible de varier dans des proportions importantes (de 1600 à 550), il est pratiquement fixe pour une même activité phosphatasique maxima, quelle que soit l'origine de l'hyperphosphatasémie. Cette fixité ne tient pas à un ensemble de conditions réalisées dans le sérum, car la constante d'affinité des phosphatases ajoutées à celui-ci ne se modifie pas, même après incubation d'une heure à 37°. Elle doit, dès lors, relever d'une autre explication.

Nous avons interprété le fait que l'indice d'affinité  $I_M$  est fonction de l'activité phosphatasique maxima A et admettant qu'il existe dans le sérum deux phosphatases alcalines; la première (1) correspondant à une activité maxima 3 (ou au dessous) et de  $K_M = 1600$  (ou au dessus), serait présente à un taux pratiquement constant et la seconde (2), de  $K_M = 550$ , apparaîtrait au cours des hyperphosphatasémies (sauf dans le cas No. 15) en quantité variable. Le traitement mathématique des données expérimentales obtenues a permis d'exprimer les variations d' $I_M$  en fonction de A par une équation du second degré, et cela de la manière suivante\*.

\* Nous remercions les Professeurs DEPOSSEL et MÉRIGOUX (Faculté des Sciences, Marseille) d'avoir bien voulu examiner la validité de l'établissement de cette équation du point de vue mathématique.

Soient  $V_1$  la vitesse maxima de l'enzyme (1),  $V_2$  celle de l'enzyme (2),  $K_1$  la constante d'affinité de l'enzyme (1),  $K_2$  celle de l'enzyme (2) et  $x$  la valeur de l'indice d'affinité  $I_M$ . Le point de la courbe (Fig. 4) d'abscisse  $x$  a pour ordonnée  $v = A/2$  ou, par définition,  $V_1 + V_2/2$ . Par ailleurs,  $v$  est la somme de  $v_1$  et  $v_2$ , vitesses correspondant, pour chacune des deux phosphatases, à la concentration en substrat  $1/x$ . L'équation de MICHAËLIS ET MENTEN<sup>18</sup> permet de calculer  $v_1$  et  $v_2$ :

$$v_1 = V_1 \frac{x}{x + K_1} \text{ et } v_2 = V_2 \frac{x}{x + K_2}, \text{ d'où l'on tire}$$

$$v = V_1 \frac{x}{x + K_1} + V_2 \frac{x}{x + K_2}.$$

$$\text{Soit } y \text{ l'activité maxima, } y = V_1 + V_2 = 2 V_1 \frac{x}{x + K_1} + 2 V_2 \frac{x}{x + K_2}$$

$$V_2 \left( 1 - \frac{2x}{x + K_2} \right) = V_1 \left( \frac{2x}{x + K_1} - 1 \right)$$

$$V_2 \left( \frac{K_2 - x}{x + K_2} \right) = V_1 \left( \frac{x - K_1}{x + K_1} \right)$$

$$y = V_1 \left[ 1 + \frac{(x - K_1)(x + K_2)}{(K_2 - x)(x + K_1)} \right], \text{ d'où l'on tire}$$

$$y = V_1 \frac{2(K_1 - K_2)x}{(x - K_2)(x + K_1)}.$$

Cette équation vérifie la courbe reproduite sur la Fig. 4; l'hypothèse sur laquelle elle repose est donc plausible. Il en découle que le sérum renferme probablement deux phosphatases alcalines, dont l'une, très peu abondante et présente à un taux relativement constant ( $A = 3$  ou moins), est accompagnée, au cours des hyperphosphatasémies, d'une autre que l'on rencontre alors à des concentrations variables.  $K_M$  serait égal (ou supérieur) à 1600 pour la première et à 550 pour la seconde. Aucune des phosphatases alcalines étudiées ne présentant une constante d'affinité dépassant 860 dans les conditions où nous nous sommes placés, il n'est pas possible de préciser l'origine de l'enzyme existant en quantité minime dans les sérums normaux et pathologiques. Par contre la valeur de 550 correspond à la phosphatase hépatique.

Les résultats acquis permettent de discuter brièvement la nature des hyperphosphatasémies. DELORY ET KING<sup>18</sup> ont admis que celles-ci sont dues à une augmentation du taux sérique de l'enzyme et non à une activation de celui-ci, envisagée par TANN-HÄUSER, REICHEL, GRATAN ET MADDOCK<sup>19</sup>. La manière de voir des premiers doit seule être retenue, puisque l'indice d'affinité de l'enzyme varie régulièrement en fonction de l'activité, et cela en raison de la présence d'une phosphatase d'affinité constante pour le substrat. Par ailleurs, un seul des dix-neuf sérums étudiés se comporte comme s'il renfermait un excès d'une phosphatase de  $K_M = 840$ , valeur voisine de celle caractérisant la phosphomonoestérase osseuse ( $K_M = 860$ ). Toutes les autres hyperphosphatasémies paraissent dues à la présence d'un excès de phosphomonoestérase alcaline de  $K_M$  identique à celui de l'enzyme hépatique, soit  $K_M = 550$ . On peut donc admettre, en première approximation, que la plupart des hyperphosphatasémies sont d'origine

hépatique, tant au cours des icères par rétention qu'au cours d'autres états pathologiques en apparence sans lien direct avec des troubles de fonctionnement du foie. Toutefois, la question de la formation dans les os d'une phosphatase d'affinité anormalement faible pour son substrat dans la maladie de PAGET et certains cancers mérite d'être posée. L'hyperphosphatasémie due à la présence d'un enzyme osseux normal apparaît comme exceptionnelle, celle d'origine hépatique étant, au contraire, commune.

### RÉSUMÉ

1. L'affinité des phosphatases alcalines (phosphomonoestérases) de divers tissus animaux pour le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium a été étudiée à  $pH = 9.4$  et à  $37^\circ$  dans le but de rechercher si elle traduit l'existence d'une spécificité d'organe de ces enzymes. Dans les conditions adoptées, la valeur de la constante d'affinité  $K_M$  est très différente pour les phosphatases du foie, de la muqueuse intestinale, des os, du rein. Il en découle que les phosphatases alcalines de ces divers organes ne sont pas identiques.

2. Le sérum humain renferme (au moins) deux phosphatases, dont une seule paraît augmenter au cours des hyperphosphatasémies. Celles-ci sont dans presque tous les cas liées à la présence dans le sérum d'un excès de phosphatase hépatique, celle de la phosphatase osseuse étant exceptionnelle. Il est possible que certains états pathologiques osseux comportent des modifications des caractères de la phosphatase du squelette.

3. L'hypothèse de CLOETENS sur la présence dans les organes animaux d'un mélange de deux phosphatases doit être abandonnée.

### SUMMARY

1. The affinity of alkaline phosphatases (phosphomonoesterases) of various animal tissues for sodium  $\beta$ -glycerophosphate has been studied at  $pH = 9.4$  and  $37^\circ$ , in order to demonstrate the identity or non-identity of these enzymes. Under the conditions of the experiments, the value of the affinity constant  $K_M$  is very different for the phosphatases of bone, intestine, kidney and liver. Thus the phosphatases of these organs are not identical.

2. Human blood serum contains (at least) two alkaline phosphatases, the level of one alone seeming to increase in the hyperphosphatasemias. Nearly all of these correspond to the presence of an excess of liver phosphatase, an excess of bone enzyme being exceptional. It is possible that modifications of the affinity of the last one are due to certain bone disease.

3. CLOETEN's hypothesis on the presence of a mixture of two alkaline phosphatases in animal organs must be left aside.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Affinität alkalischer Phosphatasen (Phosphomonoesterasen) aus verschiedenen tierischen Geweben für Natrium  $\beta$ -Glycerophosphat wurde bei  $pH 9.4$  und bei  $37^\circ$  untersucht um eine allfällige Organspezifität dieser Enzyme aufzuzeigen. Unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen war die Affinitätskonstante  $K_M$  für Phosphatasen aus Leber, Darmschleimhaut, Knochen und Niere sehr verschieden. Die alkalischen Phosphatasen aus diesen verschiedenen Organen sind also nicht identisch.

2. Das menschliche Serum enthält (mindestens) zwei Phosphatasen, von denen nur eine bei Hyperphosphatasemie an Menge zuzunehmen scheint. Fast alle Fälle von Hyperphosphatasemie sind auf einen Überschuss von Leberphosphatase im Serum, nur ausnahmeweise auf einen solchen von Knochenphosphatase zurückzuführen. Möglicherweise hängen gewisse pathologische Zustände der Knochen mit Veränderungen der Phosphatase des Skelettes zusammen.

3. Die Hypothese von CLOETENS über das Vorkommen eines Gemisches zweier Phosphatasen in den tierischen Organen muss aufgegeben werden.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. CLOETENS, *Enzymologia*, 6 (1939) 46.
- <sup>2</sup> O. BODANSKY, *J. biol. Chem.*, 118 (1937) 341.
- <sup>3</sup> S. BELFANTI, A. CONTARDI ET A. ERCOLI, *Biochem. J.*, 29 (1935) 1491.
- <sup>4</sup> J. ROCHE, S. DE LARONIGUIÈRE ET A. LAURENS, *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, 25 (1943) 1157.
- <sup>5</sup> J. ROCHE ET M. A. M. ABUL-FADL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 427.
- <sup>6</sup> J. COURTOIS, *Thèses. Doct. Sc. phys.*, Paris, 1938.
- <sup>7</sup> S. J. FOLLEY ET H. D. KAY, *Biochem. J.*, 29 (1935) 1837.
- <sup>8</sup> E. JACOBSEN, *Biochem. Z.*, 249 (1932) 2.
- <sup>9</sup> M. MARLAND ET R. ROBISON, *Biochem. J.*, 21 (1927) 665.
- <sup>10</sup> G. E. DELORY ET E. J. KING, *Biochem. J.*, 37 (1943) 547.
- <sup>11</sup> O. BODANSKY, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 605.
- <sup>12</sup> H. ALBERS ET E. ALBERS, *Z. physiol. Chem.*, 232 (1935) 165.
- <sup>13</sup> L. MICHAËLIS ET L. MENTEN, *Biochem. Z.*, 49 (1913) 333.
- <sup>14</sup> H. VON EULER ET L. LAURIN, *Z. physiol. Chem.*, 110 (1920) 55.
- <sup>15</sup> J. ROCHE, *Ann. nutr. alim.*, 1 (1947) 3.
- <sup>16</sup> W. KUTSCHER ET A. WÖRNER, *Z. physiol. Chem.*, 239 (1936) 109.
- <sup>17</sup> K. V. GIRI ET N. C. DATTA, *Biochem. J.*, 30 (1936) 1089.
- <sup>18</sup> G. E. DELORY ET E. J. KING, *Biochem. J.*, 38 (1944) 50.
- <sup>19</sup> S. J. TANHÄUSER, M. REICHEL, J. F. GRATTAN ET S. J. MADDOCK, *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 631.

Reçu le 19 juillet 1949