

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PHOSPHATASES DE FEUILLES

par

JEAN COURTOIS ET MADJID KHORSAND

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

Les phosphatases des végétaux supérieurs ont été bien moins fréquemment étudiées que les phosphatases animales. Les recherches les concernant ont porté presque exclusivement sur les enzymes des graines. Les travaux sur les enzymes des feuilles sont peu nombreux^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}.

Le Tableau I indique qu'il existe d'assez nettes différences entre les activités des

TABLEAU I

ACTIVITÉS PHOSPHATASIQUES DE DIVERSES FEUILLES FRAÎCHES

Suspension de pulpe de feuilles fraîches à 10% : 10 ml (ou 10 ml du filtrat sur papier de la suspension) sont opposés à 20 ml de glycérophosphate *M*/25 de pH 5.2 (24.8 mg de P estérifié) — 5 ml de tampon acide acétique — soude *M*/1 de pH 5.2 et de l'eau distillée q s p. 50 ml, hydrolyse à 37°.

Origine de la feuille	Durée de l'hydrolyse (en jours)	Mg de P libérés (sous forme de PO_4H_2)	
		suspension	filtrat de la suspension
Marronnier d'Inde	1	2.7	0.54
	4	6.8	1.4
	8	9.7	2.3
Lierre	1	20.5	19.6
Laurier-cerise	1.5	1.9	0.87
	8	8.7	0.87
Lilas	1	1.52	0.76
	4	5.6	1.52
	8	7.4	2.4
<i>Parthenocinus quinquefolia</i>	1	1.85	0.1
	4	4.9	0.76
	8	8.0	1.42
Belladone	1	10.9	6.54
	4	17.9	12.2
	8	21.3	16.13

suspensions de feuilles de diverses espèces, ces écarts ne sont pas ici attribuables à des degrés divers de développement car pour les deux feuilles les plus actives: celles de Lierre ont été récoltées au milieu de l'hiver et celles de Belladone au printemps en début de végétation.

Les écarts sont encore plus nets pour les fractions extractibles par l'eau: la majeure partie des phosphatases de Lierre et Belladone est à l'état de lyoenzyme tandis que pour les autres feuilles la plus grande part semble être à l'état de desmoenzyme. Il existe de multiples exemples de cas où l'autolyse d'un tissu s'accompagne d'une solubilisation des desmoenzymes en lyoenzymes. Les feuilles fraîches soigneusement lavées et essuyées sont pulpées; 400 ml de suspension aqueuse à 25 % sont placées à l'étuve à 37° en présence de 40 ml de toluène et 40 ml d'acétate d'éthyle. Après une durée variable de séjour, nous prélevons une partie aliquote du mélange, filtrons et déterminons à pH 5.2 l'activité

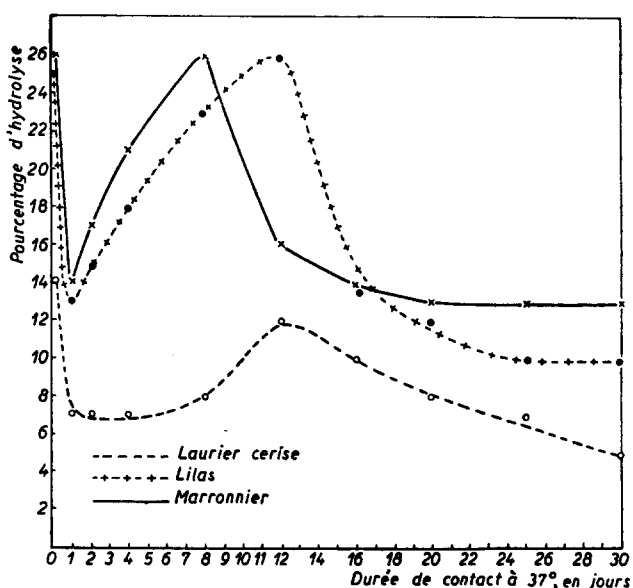


Fig. 1. Libération des phosphatases par autolyse

Quel que soit le processus, l'autolyse n'a pas fourni de préparations solubles plus actives que la fraction initialement soluble.

Influence de la réaction du milieu sur l'hydrolyse phosphatasique

Nous avons déterminé l'activité en fonction du pH de phosphatases de feuilles dont l'enzyme est en grande partie extractible par l'eau, et d'autres où il est au contraire presque exclusivement sous forme de desmoenzyme. Les diverses courbes obtenues sont assez semblables, aussi nous n'en reproduirons que trois dans la Fig. 2: suspensions des feuilles de Laurier-Cerise et Lierre et enzyme obtenu à partir des feuilles de Belladone par extraction aqueuse et précipitation acétonique. Les courbes obtenues présentent deux optima, l'un très net et très saillant entre pH 4.7 à 5.2 selon l'origine des enzymes, l'autre plus ou moins net selon les cas vers pH 4.0-4.3. Ce second optimum est particulièrement manifeste avec l'enzyme de Belladone en présence d'ion magnésium ou la

suspension de *Lierre* pour une durée d'hydrolyse de 24 heures. Il convient cependant de signaler qu'avec les feuilles de *Marronnier* nous n'avons observé qu'un seul optimum assez saillant vers pH 5.2.

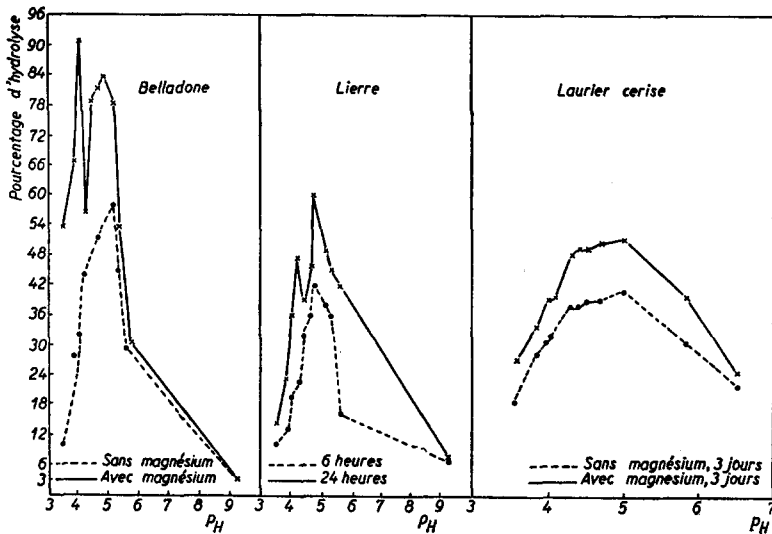


Fig. 2

Les courbes permettent de supposer que les feuilles contiennent au moins deux phosphatases isodynamiées distinctes: la première du type II de la classification proposée pour les phosphatases⁸ de pH optimum voisin de 5.0; l'autre à optimum vers 4.0-4.2 qui se rapprocherait ainsi de la phosphatase III.

S'il a été possible de déceler régulièrement des phosphatases II dans les divers organes des végétaux supérieurs^{1, 2, 8, 9} une phosphatase du type III n'y a été que très rarement mise en évidence^{10, 11}.

En vue de rechercher s'il existait deux systèmes phosphatasiques distincts dans les feuilles, nous avons étudié l'action de divers effecteurs chimiques sur les phosphatases de feuilles, nous avons réalisé nos essais au voisinage du pH optimum de chacune des deux phosphatases éventuelles.

Action des effecteurs chimiques

Nous avons utilisé les composés chimiques ayant manifesté une action activatrice ou inhibitrice nette et relativement spécifique sur les phosphatases des divers types. Comme source de phosphatase nous avons eu recours à l'un des enzymes de feuilles les plus aisément extractible par l'eau: la préparation obtenue par extraction aqueuse et précipitation acétonique à partir des feuilles de *Lierre*. D'autre part, nous avons étudié une desmophosphatase, celle de *Marronnier*. Les feuilles soigneusement nettoyées sont desséchées à l'étuve à 37° puis dans le vide sulfurique, la poudre obtenue est extraite 2 fois de suite par 10 parties d'eau distillée; le résidu est lavé à l'acétone puis desséché dans le vide. La poudre ainsi obtenue ne cède pratiquement plus de phosphatase soluble par agitation avec de l'eau distillée.

Nous avons réuni dans les Tableaux II et III les résultats obtenus avec les divers effecteurs.

Bibliographie p. 182.

TABLEAU II
ACTION DE DIVERS EFFECTEURS SUR LES PHOSPHATASES DES FEUILLES DE LIERRE

Comme pour les Tableaux III et IV les chiffres représentent les activités relatives: mg de PO_4H_3 libérés en présence d'effecteur/mg de PO_4H_3 libérés en l'absence d'effecteur dans les mêmes conditions opératoires (ce rapport étant multiplié par 100). De ce fait l'activité du témoin sans effecteur est fixée arbitrairement à 100. En l'absence d'effecteur la phosphatase hydrolyse 12 % du substrat (20 ml de glycérophosphate $M/25$) à pH 4.07-30 % à pH 4.95 et 22 % à pH 5.6

pH de l'essai	Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu	Nature de l'effecteur											
		SO ₄ Na ₂	Cl ₂ Ca	SO ₄ Mg	Cl ₂ Mg	SO ₄ Zn	SO ₄ Mn	SO ₄ Fe	SO ₄ Ni	SO ₄ Co	SCNNH ₄	CNNa	acide oxalique
4.07	2 · 10 ⁻³	92	92	157	135	135	121	57	135	142	92	100	92
	4 · 10 ⁻³	85	85	185	164	142	128	50	142	157	92	107	85
	2 · 10 ⁻²	64	78	228	214	128	150	42	157	185	85	107	35
4.95	2 · 10 ⁻³	91	97	117	111	58	88	41	103	123	94	100	141
	4 · 10 ⁻³	88	94	129	117	47	85	23	106	129	91	100	111
	2 · 10 ⁻²	70	88	153	147	35	76	17	112	141	85	100	94
5.6	2 · 10 ⁻³	84	96	115	107	38	84	61	108	107	96	100	115
	4 · 10 ⁻³	77	88	123	115	30	80	42	112	107	96	100	142
	2 · 10 ⁻²	61	76	146	130	23	69	30	120	123	92	100	115

TABLEAU III

ACTION DE DIVERS EFFECTEURS SUR LA DESMOPHOSPHATASE DU MARRONNIER

Les chiffres du Tableau représentent les activités relatives calculées comme au Tableau II. En l'absence d'effecteur la phosphatase hydrolyse 15% du substrat à pH 4.0 et 26% à pH 5.2

pH de l'essai	Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu	Nature de l'effecteur						
		SO ₄ Mg	SO ₄ Zn	SO ₄ Mn	SO ₄ Fe	acide oxalique	L-alanine	L-alanine SO ₄ Mg
4.0	2 · 10 ⁻³	129	117	117	58	88	88	129
	4 · 10 ⁻³	158	129	123	35	82	82	147
	2 · 10 ⁻²	194	111	141	23	47	70	164
5.2	2 · 10 ⁻³	120	60	86	40	113	113	100
	4 · 10 ⁻³	133	50	83	23	106	106	113
	2 · 10 ⁻²	153	33	73	16	93	93	123

Un premier examen permet d'en dégager deux faits caractéristiques:

1. La lyophosphatase du Lierre et la desmophosphatase du Marronnier réagissent d'une façon identique à l'action des divers effecteurs.

2. Certains effecteurs paraissent influencer indépendamment deux systèmes phosphatases distincts. Nous allons examiner d'une façon plus détaillée ce dernier point.

En premier lieu, certains effecteurs inhibent également l'hydrolyse aussi bien vers pH 4.0 que vers pH 5.0. C'est en particulier le cas du fluorure de sodium (Tableau IV) qui, à notre connaissance, est un inhibiteur général de toutes les phosphatases réagissant en milieu acide¹²; il en est de même pour l'acide molybdique, inhibiteur de toutes les phosphatases acides étudiées^{13, 14}. Le sulfate ferreux exerce également une nette inhibition aux divers pH étudiés.

TABLEAU IV

ACTION DU FLUORURE ET DU MOLYBDATE SUR LES PHOSPHATES DE FEUILLES

Les chiffres du Tableau représentent les activités relatives calculées comme au Tableau II

Origine de l'enzyme		Marronnier			Lierre					
Nature de l'effecteur		FNa			FNa			MoO ₄ H ₂		
Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu		1 · 10 ⁻³	2 · 10 ⁻³	1 · 10 ⁻²	1 · 10 ⁻³	2 · 10 ⁻³	1 · 10 ⁻²	2 · 10 ⁻⁵	4 · 10 ⁻⁵	2 · 10 ⁻⁴
pH de l'essai	4.0	29	5	2	28	7	3	42	28	10
	4.95				41	23	17	50	38	23
	5.2	33	13	3						
	5.6				53	46	23	53	46	30

Le cyanure de sodium est pratiquement sans action, ce qui semble indiquer que des métaux lourds tels que le fer ou le cuivre ne sont pas des constituants des phosphatases de feuilles. Le sulfocyanate d'ammonium exerce une action très irrégulière: activateur ou inhibiteur selon l'origine des phosphatases acides^{15, 16}.

Dans le cas de la phosphatase des feuilles de Lierre, nous n'avons observé qu'une faible inhibition, peu caractéristique, quelle que soit la réaction du milieu.

Enfin le sulfate de sodium et le chlorure de calcium exercent une légère inhibition

croissant avec la concentration de l'effecteur et sensiblement indépendante de la réaction du milieu. L'ion calcium avait activé les phosphatases III actives vers pH 4.0 du Soja et des Amandes¹⁰, par contre il s'était également révélé inhibiteur des phosphatases II des mêmes graines¹⁰ ou de celles de Radis¹⁶, tandis qu'il activait la phosphatase II des graines de Seigle¹⁶.

Si divers effecteurs manifestent une action inhibitrice quel que soit le pH, d'autres effecteurs exercent une activation aux divers pH étudiés: ce sont les ions Mg^{++} , Ni^{++} , et Co^{++} . Dans la Fig. 2, nous avons déjà pu constater que les phosphatases des feuilles de Belladone et Laurier-cerise étaient activées par l'ion magnésium quel que soit le pH. C'est surtout de pH 4.0 à 5.0 que cette activation est la plus manifeste; nous observons des faits similaires avec le lyoenzyme du Lierre et le desmoenzyme du Marronnier, l'activation est plus importante à pH 4.0-4.1 qu'aux alentours de pH 5.0. Dans le cas du Lierre, l'influence de l'anion associé paraît être assez minime, SO_4Mg activant d'une façon un peu supérieure à Cl_2Mg . Tout se passe donc comme si les feuilles contenaient une phosphatase II moyennement activable et une phosphatase III beaucoup plus fortement activable. Ces résultats n'ont pas manqué de nous surprendre; en règle générale, les phosphatases du type II ne sont pas activées par l'ion Mg^{++} , mais au contraire faiblement inhibées. Il n'existe que de rares exceptions à cette règle: jus d'Orange¹⁷, enzyme dialysé du *Lycoperdon* (Basidiomycètes)¹⁸, graines de Seigle¹⁶, ces trois préparations étant faiblement activées par les ions Mg^{++} . L'activation magnésienne des phosphatases II de feuilles bien que peu courante n'est donc pas exceptionnelle. Mais la très nette activation de la phosphatase III est exceptionnelle. NGUYEN VAN THOAI¹⁰ a pu considérer avec juste raison que "l'inhibition par l'ion magnésium constitue le caractère le plus constant de la phosphatase très acide". Cette particulière sensibilité fut observée sur des phosphatases III d'origines les plus diverses: Basidiomycètes, taka-diastrase, graines de Soja, sérum sanguin etc. . . Il n'existe, à notre connaissance, qu'une exception: la phosphatase III de l'émulsine d'Amande¹⁰. Ainsi la nette activation magnésienne des phosphatases II et III des feuilles différencie clairement ces enzymes de presque toutes les phosphatases du même type; cependant elle les rapproche nettement des phosphatases alcalines I fortement activées par les sels de magnésium. D'autres caractères permettent encore de rapprocher les phosphatases de feuilles des phosphatases I actives en milieu alcalin: l'activation par les ions Ni^{++} et Co^{++} . Ces deux ions sont après l'ion Mg^{++} parmi les activateurs les plus énergiques des phosphatases I^{19, 20}. Il convient de remarquer que pour la phosphatase des feuilles de Lierre l'activation par les ions Mg^{++} , Ni^{++} et Co^{++} est beaucoup plus manifeste sur la phosphatase III que sur l'enzyme II associé. Cette légère différence va s'accroître considérablement avec d'autres ions bivalents; tandis que Mn^{++} et Zn^{++} inhibent la phosphatase II de pH 4.9 à 5.6; ils activent par contre nettement la phosphatase III à pH 4.0. Cette dernière présente donc une nouvelle analogie avec les phosphatases alcalines fortement activées par ces deux ions¹⁹. L'inhibition par le zinc des phosphatases II de feuilles apparaît par contre être un caractère général des enzymes de ce type, urine²¹, graines de Radis et Seigle¹⁶.

Un seul des effecteurs active la phosphatase II et inhibe la phosphatase III: l'anion oxalique. L'acide oxalique active la phosphatase II du Seigle¹⁶ mais inhibe celles de Lactaire¹⁰, Moutarde²², Radis¹⁶.

Nous signalerons enfin que l'alanine n'a que peu d'action sur la phosphatase II de Marronnier mais inhibe l'enzyme du type III. L'alanine restreint l'action activatrice de Mg^{++} sur les phosphatases du Marronnier, différence avec les phosphatases alcalines²⁴.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Pour ne pas surcharger cet exposé, nous n'y avons pas fait figurer les résultats obtenus par action de divers effecteurs soit sur la fraction lyophosphatasique des feuilles de Belladone, soit sur le desmoenzyme des mêmes feuilles. Ces effecteurs ont influencé les hydrolyses dans le même sens que pour les enzymes de Lierre et Marronnier. Il en résulte donc que les phosphatases de feuilles étudiées présentent une nette homogénéité de comportement vis à vis des effecteurs: les lyoenzymes et desmoenzymes ayant des caractères identiques. Nous pouvons donc considérer que les feuilles étudiées renferment deux systèmes phosphatasiques distincts:

a. Une phosphatase de type II à pH optimum vers 5.0-5.2 — qui, à l'exception d'une faible activation par l'ion Mg^{++} , semble réagir vis à vis des effecteurs comme les autres phosphatases du même type.

b. Une deuxième phosphatase qui par son pH optimum vers 4.0-4.2 se rapproche des enzymes du type III. Cet enzyme semble posséder des caractères assez particuliers: il est inhibé par les inhibiteurs généraux des phosphatases acides: fluorures, molybdates, qui sont pratiquement sans action sur les phosphatases alcalines.

La phosphatase III de feuilles est de plus nettement activée par un certain nombre d'ions bivalents: Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} . Ces ions sont également activateurs des phosphatases alcalines I mais n'avaient jamais été signalés comme favorisant l'action de phosphatases acides. Cette phosphatase III de feuilles est, à notre connaissance, la seule phosphatase acide décrite jusqu'ici aussi sensible à l'activation par les ions bivalents.

Nous remercions le Professeur P. FLEURY pour l'intérêt qu'il a porté à ces recherches.

RÉSUMÉ

Les feuilles paraissent renfermer deux systèmes phosphatasiques distincts, plus ou moins complètement extractibles par l'eau selon l'origine de la feuille.

1. Une phosphatase II, de pH optimum 5.0-5.2; cet enzyme réagit vis à vis des effecteurs comme les autres phosphatases du même type, à l'exception des ions Mg^{++} , Ni^{++} et Co^{++} qui l'activent nettement.

2. Une phosphatase III à pH optimum voisin de 4.0. Cet enzyme est inhibé par certains effecteurs des phosphatases acides: fluorure, molybdate; mais il diffère nettement des autres phosphatases acides III déjà décrites par le fait qu'il est très nettement activé par certains ions bivalents, également activateurs des phosphatases alcalines I: Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} .

SUMMARY

Leaves seem to contain two distinct phosphatase systems, more or less completely extractible by water according to the origin of the leaves:

1. A phosphatase II, of pH optimum 5.0-5.2; various agents influence this enzyme in the same manner as they do other phosphatases of the same type, with the exception of Mg^{++} , Ni^{++} and Co^{++} ions which markedly activate it.

2. A phosphatase III of pH optimum at about 4.0; this enzyme is inhibited by certain agents influencing of acid phosphatases: fluoride, molybdate, but it is quite different from the other phosphatases III already known, on account its of very marked activation by certain bivalent ions which are also activators of the alkaline phosphatases I: Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} .

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blätter scheinen zwei verschiedene Phosphatase-Systeme zu enthalten, welche je nach Ursprung der Blätter mehr oder weniger vollständig durch Wasser extrahiert werden können.

Bibliographie p. 182.

Eine Phosphatase II (pH-Optimum 5.0-5.2); viele Reagenzien beeinflussen diese Phosphatase ebenso wie andere gleichartige Phosphatasen, mit Ausnahme der Ionen Mg^{++} , Ni^{++} und Co^{++} die sie deutlich aktivieren.

Eine Phosphatase III (pH-Optimum 4.0); dieses Enzym wird durch verschiedene Agentien gehemmt, die auf saure Phosphatasen wirken, wie Fluorid und Molybdat, aber es unterscheidet sich deutlich von den anderen bereits beschriebenen sauren Phosphatasen III, da es sehr deutlich durch gewisse zweiwertige Ionen, wie Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , aktiviert wird, die auch Aktivatoren der alkalischen Phosphatasen I sind.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ V. IGNATIEFF ET H. WASTENEYS, *Biochem. J.*, 30 (1936) 1171.
- ² V. IGNATIEFF, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1611.
- ³ P. PRATESI, *Ann. chim. applicata*, 15 (1937) 309.
- ⁴ P. PRATESI, *Ann. chim. applicata*, 15 (1937) 321.
- ⁵ P. PRATESI, *Ann. chim. applicata*, 15 (1937) 382.
- ⁶ J. COURTOIS ET P. DENIS, *Enzymologia*, 5 (1938) 288.
- ⁷ C. PEREZ, *Thèse Doctorat Etat, Pharm.* Paris, 1949.
- ⁸ J. ROCHE ET J. COURTOIS, *Exposés annuels Biochim. Méd.*, 4 (1944) 259.
- ⁹ J. COURTOIS, *Thèse Doctorat Sci. Phys.* Paris, 1938.
- ¹⁰ NGUYEN VAN THOAI, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1370.
- ¹¹ R. T. ROGERS, R. W. PEARSON ET W. H. PIERRE, *Soil Sci.*, 54 (1942) 353.
- ¹² J. COURTOIS ET C. ANAGNOSTOPOULOS, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1494, 1504.
- ¹³ J. COURTOIS ET M. BOSSARD, *Bull. soc. chim. biol.*, 26 (1944) 464.
- ¹⁴ J. COURTOIS ET C. ANAGNOSTOPOULOS, *Enzymologia*, 13 (1949) 183.
- ¹⁵ J. COURTOIS ET M. BOSSARD, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 406.
- ¹⁶ J. COURTOIS ET C. PEREZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1234.
- ¹⁷ B. AXELROD *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 57.
- ¹⁸ S. BOUCHILLOUX, J. EMERY ET M. ROGER, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 1064.
- ¹⁹ J. ROCHE, *Le rôle des métaux dans la structure et dans l'activité des enzymes à constituant métallique dissociable*, Hermann éditeur, Paris, 1946.
- ²⁰ O. BODANSKY *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 81.
- ²¹ J. COURTOIS ET M. PLUMEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 165.
- ²² J. COURTOIS, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 37.
- ²³ O. BODANSKY, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 605.
- ²⁴ NGUYEN VAN THOAI, J. ROCHE ET M. ROGER, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1 (1947) 61.

Reçu le 4 janvier 1950