

## LE METABOLISME DU FRUCTOSE-1-PHOSPHATE DANS LE FOIE

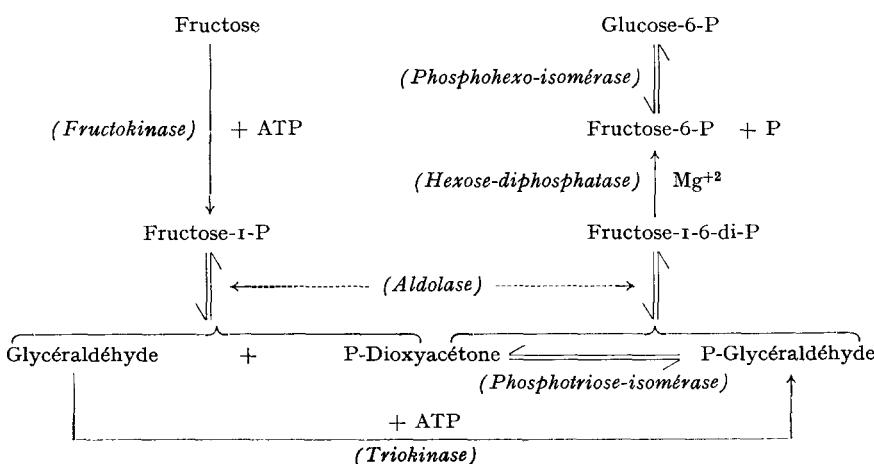
par

H. G. HERST ET T. KUSAKA \*\*

*Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de Louvain (Belgique)*

Plusieurs auteurs ont démontré récemment l'existence dans le foie d'une fructokinase qui phosphoryle le fructose en fructose-1-phosphate<sup>1-4</sup>. Le métabolisme ultérieur de cet ester a été étudié par CORI, OCHOA, SLEIN ET CORI<sup>5</sup> qui ont identifié dans le foie de rat un système enzymatique capable d'effectuer sa transformation en glucose-6-phosphate. Le magnésium est indispensable à cette réaction que les auteurs supposent être due aux actions successives d'une "phosphofructomutase" et de la phosphohexoisomérase, selon la séquence FIP  $\rightarrow$  F6P  $\rightarrow$  G6P\*\*\*. Leurs résultats ne leur permettent pas d'exclure le glucose-1-phosphate comme intermédiaire.

Les recherches décrites dans le présent mémoire ont été entreprises dans le but de préciser le mécanisme de la réaction découverte par CORI *et coll.*<sup>5</sup>. Nos résultats conduisent à rejeter l'une et l'autre des interprétations proposées par ces auteurs, le seul mécanisme qui ait pu être mis en évidence, tant dans des homogénats totaux de tissu hépatique que dans des extraits purifiés, étant la scission aldolaisque du FIP, suivie de la recombinaison des composés en C<sub>3</sub> formés, selon le schéma:



\* Chercheur qualifié du FNRS.

\*\* Boursier de l'AUCAM. Adresse actuelle: Institut de Biochimie, Université d'Okayama, Japon.

\*\*\* Nous utilisons les abréviations suivantes: F: Fructose; FIP: Fructose-1-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; FDP: Fructose-diphosphate; G: Glucose; G6P: Glucose-6-phosphate; GA: D-Glyceraldehyde; ATP: Adénosine-triphosphate.

Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs notes préliminaires<sup>6-8</sup> et le schéma proposé a déjà été confirmé par LEUTHARDT, TESTA ET WOLF<sup>9</sup>. D'après ces auteurs cependant, deux aldolases différentes agiraient sur le FIP et sur le FDP. Nos résultats n'apportent aucune preuve en faveur de cette conception, du moins en ce qui concerne le tissu hépatique.

#### TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Quatre types de *préparations hépatiques* ont servi aux expériences décrites: 1. *l'homogénat complet*, préparé en broyant le foie perfusé de rat, de lapin ou de cobaye, au tube de POTTER-ELVEHJEM<sup>10</sup>, dans trois volumes de KCl 0.15 M; 2. *l'extrait pH 5*, obtenu aux dépens du précédent après élimination des éléments particulaires par agglutination à pH 5 (HCl) et centrifugation; 3. *l'extrait centrifugé*, constitué par l'homogénat débarrassé des éléments particulaires par une centrifugation de 30 minutes à 100,000 g; 4. la *fraction 45-55*, recueillie entre 45 et 55 % de saturation en sulfate ammonique, en suivant exactement les indications données par CORI *et coll.*<sup>5</sup>. Toutes les manipulations sont faites à 0°.

*L'aldolase* a été préparée à partir de muscle de lapin et cristallisée une fois après deux fractionnements à l'acétone et au sulfate ammonique, selon TAYLOR, GREEN ET CORI<sup>11</sup>. La technique de GOMORI<sup>12</sup> a servi à isoler l'*hexose-diphosphatase* du foie de lapin.

Pour la préparation des mélanges tampons, nous avons utilisé le cacodylate<sup>13</sup>, l'imidazole et le tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (TRIS)<sup>14</sup>, ajustés au pH désiré à l'aide d'HCl.

Les méthodes de préparation des substrats, ainsi que les techniques analytiques que nous utilisons ont fait l'objet d'une publication précédente (HERZ, BEAUFAYS ET DE DUVE<sup>15</sup>). Lorsque toutes les déterminations nécessaires à l'établissement d'un bilan complet n'ont pas été effectuées, nous désignons les résultats des dosages par des termes particuliers, tels que *fructose total*, *fructose acidolabile*, etc., dont la signification a déjà été discutée<sup>15</sup>. Nous utilisons, en outre, les termes suivants:

*fructose estérifié*: différence entre le fructose total et le fructose libre ( $F_t - F_l$ ).

*P acido-stable*: différence entre le phosphore total et la somme du phosphore acido-labile et du phosphore inorganique ( $P_t - P_{25} - P_i$ ).

#### RESULTATS

##### *Non-intervention d'une phosphofructomutase*

Au cours d'une première série d'expériences nous avons retrouvé les faits fondamentaux décrits par CORI *et coll.*<sup>5</sup>. Le Tableau I montre qu'en présence de magnésium, des extraits de foie de rat font disparaître le FIP enzymatique ou synthétique, avec formation de quantités variables de sucres réducteurs, de fructose, de P inorganique et de P acido-stable. Ce dernier phénomène est surtout net lorsqu'on utilise des *extraits pH 5* qui sont beaucoup moins riches en phosphatases que les *homogénats complets* (de DUVE, BERTHET, HERZ ET DUPRET<sup>16</sup>). Dans l'expérience n° 4, le G6P représente 65 % du P acido-stable, ce qui correspond d'une manière satisfaisante à l'équilibre de l'isomérase.

Confirmant également les observations de CORI *et coll.*<sup>5</sup> nous avons constaté que le magnésium est indispensable à la formation de G6P. En l'absence de cet ion, il ne disparaît qu'une petite quantité de FIP et il n'y a pas de P inorganique formé (Tableau II).

La dernière expérience du Tableau II montre cependant que l'intervention d'une phosphofructomutase activée par le magnésium ne rend pas compte des faits observés. On voit en effet que l'extrait utilisé est dépourvu de toute activité hydrolytique vis-à-vis du G6P et du F6P maintenus en équilibre par la phosphohexo-isomérase, ce qui concorde d'ailleurs avec l'absence de glucose-6-phosphatase dans les *extraits pH 5*<sup>16</sup>. Il n'est donc pas légitime d'attribuer la formation de P inorganique et de sucres réducteurs à l'hydrolyse des hexoses-6-phosphates formés aux dépens du FIP.

TABLEAU I

## UTILISATION DU F1P PAR DES EXTRAITS DE FOIE

0.5 ml d'enzyme (foie de rat), incubé pendant 30 minutes à 37° en présence de F1P et de 10  $\mu M$  de  $MgCl_2$   
Volume total 0.9 ml.

Préparation enzymatique	pH	Substrat F1P* $\mu M$	$\Delta$ Fructose estérifié $\mu M F$	$\Delta$ P. inorg. $\mu M$	$\Delta$ P acido-stable $\mu M$	$\Delta$ Sucres réducteurs $\mu M G$	$\Delta$ Fructose libre $\mu M F$	$\Delta$ G6P $\mu M$
1. Homogénat complet	7	5.0 (E)	— 3.5	+ 3.04	+ 0.23	+ 3.00**	+ 0.50	—
2. Homogénat complet	9	5.0 (E)	— 4.51	+ 3.68	+ 0.87	+ 3.5**	+ 0.61	—
3. Extrait pH 5	7	6.5 (E)	— 2.00	+ 1.10	+ 1.10	+ 1.06	+ 0.25	—
4. Extrait pH 5	8	12.0 (S)	— 4.6***	+ 2.92	+ 2.16	+ 2.63	+ 0.63	+ 1.40

\* (E) = F1P préparé par voie enzymatique; (S) = F1P synthétique.

\*\* Fixés en ajoutant d'abord  $Ba(OH)_2$ , puis  $ZnSO_4$ ; destruction partielle de la glycéraldéhyde<sup>15</sup>.

\*\*\* Fructose acido-labile.

TABLEAU II

## INFLUENCE DU MAGNÉSIUM

0.5 ml d'extract pH 5 (foie de rat) dialysé, incubé à pH 8 pendant 30 minutes à 37°. Volume total 0.9 ml

Prépar. n°	Substrat	$MgCl_2$ 10 $\mu M$	$\Delta$ Fructose total $\mu M F$	$\Delta$ P inorg. $\mu M$	$\Delta$ P acido-stable $\mu M$	$\Delta$ Sucres réducteurs $\mu M G$	$\Delta$ Fructose libre $\mu M F$	$\Delta$ G6P $\mu M$
1	F1P (E) 6.5 $\mu M$	—	— 0.58	0	0	—	—	—
		+	— 1.80	+ 1.00	+ 0.03	—	—	—
2	F1P (S) 12.0 $\mu M$	—	— 1.08	0	+ 0.1	+ 0.46	0	0
		+	— 3.28	+ 2.65	+ 1.70	+ 2.1	+ 0.37	+ 1.35
G6P 5.0 $\mu M$	—	—	—	—	—	—	—	—
	+	—	+ 1.25	0	—	0	0	—

TABLEAU III

## IRRÉVERSIBILITÉ DE LA TRANSFORMATION DU F1P EN G6P

Préparation enzymatique	Conditions expérimentales	Substrat	$\Delta$ Fructose acido-labile $\mu M F$	$\Delta$ P acido-stable $\mu M$	$\Delta$ Fructose total $\mu M F$
Extrait centrifugé (foie de cobaye) 0.5 ml	Tampon imidazole pH 7.2 10 $\mu M$ de $MgCl_2$ 30 min à 37° vol. tot. 0.9 ml	F1P (S) 11 $\mu M$	— 3.4	+ 1.1	—
Fraction 45/55 (foie de rat) 14 mg de protéines	Tampon TRIS pH 8 10 $\mu M$ de $MgCl_2$ 60 min à 30° vol. tot. 1.5 ml	G6P 11 $\mu M$	+ 0.05	—	+ 2.8
		F1P (S) 11 $\mu M$	— 3.55	+ 1.15	—
		G6P 11 $\mu M$	0	+ 0.6	+ 2.85

D'autre part, nous avons constaté à plusieurs reprises que les extraits actifs ne forment pas de FIP aux dépens de G6P ou de F6P (Tableau III). D'après MEYERHOF ET GREEN<sup>17</sup> cependant l'équilibre d'une réaction phosphofructomutastique devrait être en faveur du FIP et correspondre à un rapport FIP/F6P = 2.35. L'irréversibilité des phénomènes observés plaide également contre l'intervention d'une phosphofructomutase.

*Intervention de l'aldolase et de l'hexose-diphosphatase*

Comme le montrent les Tableaux I et II, les extraits activés par le  $Mg^{+2}$  produisent toujours de petites quantités de fructose libre, probablement par hydrolyse directe du FIP, ainsi que des quantités beaucoup plus importantes de sucres réducteurs. Vu l'absence de glucose-6-phosphatase dans les extraits  $pH$  5, il était peu vraisemblable que cet excès de sucres réducteurs fût du glucose. Aussi avons nous recherché la présence de trioses, par la méthode décrite dans la publication précédente<sup>15</sup>. Pour avoir un bilan complet, nous avons suivi simultanément la disparition de D-glycéraldéhyde incubée en présence de la préparation enzymatique. Les résultats de deux expériences de ce type figurent au Tableau IV et montrent que le sucre réducteur autre que le fructose qui se forme aux dépens du FIP est un triose, vraisemblablement la D-glycéraldéhyde, et qu'il apparaît à peu près une mole de triose par mole de FIP disparu autrement que par hydrolyse directe.

TABLEAU IV

FORMATION DE GLYCÉRALDÉHYDE AU COURS DE L'UTILISATION DU FIP

0.5 ml d'enzyme incubé pendant 30 minutes à 37° en présence de 11  $\mu M$  de FIP et de 10  $\mu M$  de  $MgCl_2$ . Un témoin est incubé avec 10  $\mu M$  de GA et 10  $\mu M$  de  $MgCl_2$ . Volume total 0.9 ml.

Exp. n° 1. *Homogénat complet* de foie de rat, tampon TRIS pH 8.

Exp. n° 2. *Extrait centrifugé* de foie de cobaye, tampon imidazole pH 7.2.

Expér. n°	$\Delta$ Fructose acido-labile $\mu M$ F	$\Delta$ Fructose libre $\mu M$ F	Déférence $\mu M$ F	$\Delta$ GA $\mu M$	$\Delta$ GA témoin $\mu M$
1	— 6.66	+ 1.04	— 5.62	+ 5.7	0
2	— 3.4	+ 0.85	— 2.55	+ 1.81	— 0.44

Ces résultats peuvent s'expliquer par une scission aldolastique du FIP en glycéraldéhyde et phosphodioxyacétone. MEYERHOF, LOHMAN ET SCHUSTER<sup>18</sup> ont en effet synthétisé du FIP au moyen de zymohexase en partant de FDP et de D-glycéraldéhyde, mais considéraient cette réaction comme irréversible.

Les résultats qui figurent aux Tableaux V et VI indiquent cependant que le FIP est attaqué par l'aldolase musculaire purifiée et par l'enzyme présent dans les extraits hépatiques qui ont servi à nos expériences. En l'absence d'addition, la réaction est peu importante mais cependant décelable. Elle devient très nette lorsqu'on ajoute au système du sulfate d'hydrazine, qui complexe les produits de la réaction. La cystéine a un effet analogue, mais les trioses-phosphates ne sont plus dosés quantitativement en présence de ce corps, probablement parce que les mercaptals formés sont plus résistants à l'hydrolyse alcaline. Le cyanure ne peut être utilisé car il s'additionne également au FIP.

Dans le système que nous étudions, l'agent qui favorise la scission aldolastique du FIP (mesurée par l'accumulation de glycéraldéhyde) est l'ion  $Mg^{+2}$  qui permet l'hydro-

TABLEAU V

## ACTION DE L'ALDOLASE MUSCULAIRE PURIFIÉE SUR LE FIP

6  $\mu M$  de FIP (S) incubées à pH 8, 37° pendant 20 minutes en présence d'aldolase musculaire purifiée. Volume total 0.5 ml.

Addition	$\Delta$ Fructose total $\mu M F$	$\Delta$ P alcalino-labile $\mu M$
Aucune	— 0.52	+ 0.46
Sulfate d'hydrazine 50 $\mu M$	— 4.35	+ 4.26
Cystéine 40 $\mu M$	— 3.27	+ 0.95

TABLEAU VI

## ACTION DE L'ALDOLASE DU FOIE SUR LE FIP

6.7  $\mu M$  de FIP (E) incubées à pH 8, 37° pendant 26 minutes en présence de 0.2 ml d'*extrait pH 5* dialysé de foie de rat. Volume total: 0.7 ml.

Addition	$\Delta$ Fructose total $\mu M F$	$\Delta$ P inorgan. $\mu M$	$\Delta$ P alcalino-labile $\mu M$
Aucune	— 0.36	0	+ 0.20
MgCl <sub>2</sub> 10 $\mu M$	— 1.58	+ 1.05	+ 0.50
Hydrazine 25 $\mu M$	— 3.20	0	+ 3.10
Hydrazine + MgCl <sub>2</sub>	— 3.22	+ 0.77	+ 2.40
Cystéine 80 $\mu M$	— 2.28	0	+ 0.59
Cystéine + MgCl <sub>2</sub>	— 3.08	+ 1.65	+ 0.13

lyse des produits de la réaction. La phosphodioxyacétone formée s'isomérise en effet partiellement en phosphoglycéraldéhyde, avec laquelle elle se condense en FDP. Or les extraits de foie contiennent une hexose-diphosphatase spécifique qui exige d'une manière absolue la présence d'ions Mg<sup>2+</sup>; l'hydrolyse du FDP par cette phosphatase déplace les différents équilibres établis sous l'action de l'aldolase et de la phosphotriose-isomérase et provoque une accumulation de P inorganique, d'hexoses-6-phosphates et de glycéraldéhyde. On constate d'ailleurs (Tableaux I, II et VI) que les extraits forment toujours du P inorganique en quantité au moins équivalente à celle des hexoses-6-phosphates produits, ce qui est conforme à l'hypothèse que ces derniers prennent naissance par hydrolyse du FDP. On sait, d'autre part, que l'hexose-diphosphatase détache uniquement le phosphate fixé au carbone 1 du fructose-diphosphate<sup>12, 19, 9, 15</sup>.

Le schéma que nous proposons fait intervenir deux actions aldolasiques. On peut se demander si celles-ci sont dues à un ferment unique ou à deux enzymes différents. D'après LEUTHARDT *et coll.*<sup>9</sup> et CORI<sup>20</sup>, l'aldolase musculaire cristallisée, d'un haut degré de pureté, n'attaque pas le FIP. LEUTHARDT *et coll.*<sup>9</sup> concluent à l'existence dans le foie d'un second enzyme pour lequel ils proposent le nom de 1-phosphofructoaldolase, par opposition à la 1-6-diphosphofructoaldolase présente notamment dans le muscle.

Les recherches effectuées par l'un de nous, en collaboration avec JACQUES<sup>8</sup>, tout en confirmant l'existence de différences considérables entre les aldolases du muscle et du foie, conduisent à une interprétation légèrement différente. Comme l'indique le Tableau V, les préparations d'aldolase musculaire moins complètement purifiées sont parfaitement capables de scinder le FIP. Ce fait, comparé aux données de LEUTHARDT *et coll.*<sup>9</sup> et de CORI<sup>20</sup> citées plus haut, pose le problème de la dualité des aldolases musculaires.

Quant à l'activité aldolase du foie, il est peu probable qu'elle fasse intervenir deux ferments. En effet, nous avons observé qu'à saturation de substrats, une préparation partiellement purifiée de foie de lapin scinde le FIP et le FDP exactement à la même vitesse, mais possède des constantes de Michaëlis très différentes pour ces deux substrats. Ces résultats, qui sont représentés à la Fig. 1, ont été reproduits sur un *extrait centrifugé* de foie de rat, de sorte que la coïncidence observée ne paraît pas être l'effet du hasard, mais plaide plutôt en faveur de l'existence d'un enzyme hépatique unique. Seule une purification plus rigoureuse permettra de trancher la question, mais il nous paraît qu'au stade actuel de nos connaissances, le terme de 1-phosphofructoaldolase est difficilement applicable à un enzyme, qui, d'après nos résultats, pourrait avoir plus d'affinité pour le FDP que pour le FIP.

L'interprétation proposée dans ce travail rencontre une seconde objection dans les données de GOMORI<sup>12</sup>, qui semblent indiquer que l'hexose-diphosphatase du foie est inactive au pH auquel nous travaillons. Les essais décrits au Tableau VII, en même temps qu'ils démontrent la présence d'hexose-diphosphatase dans nos préparations, indiquent que l'optimum de pH très alcalin décrit par GOMORI<sup>12</sup> n'est caractéristique que de l'enzyme purifié selon la méthode de cet auteur et ayant subi notamment une incubation de 6 heures à 37° et à pH 3.4.

TABLEAU VII

## INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITÉ DE L'HEXOSE-DIPHOSPHATASE

0.2 ml d'enzyme incubé durant 20 minutes à 37°, en présence de FDP 0.01 M et de tampon TRIS 0.1 M.

Préparation enzymatique	μM de P libéré			
	pH 7	pH 8	pH 9	pH 9.5
Hexose diphosphatase purifiée + MgCl <sub>2</sub> 0.02 M	0	0.58	2.53	3.1
Extrait pH 5 + MgCl <sub>2</sub> (foie de lapin) — MgCl <sub>2</sub>	3.94	4.05	3.56	—
Extrait pH 5 + MgCl <sub>2</sub> (foie de rat) — MgCl <sub>2</sub>	1.68	3.1	2.7	—
	0.06	0.03	0.06	—

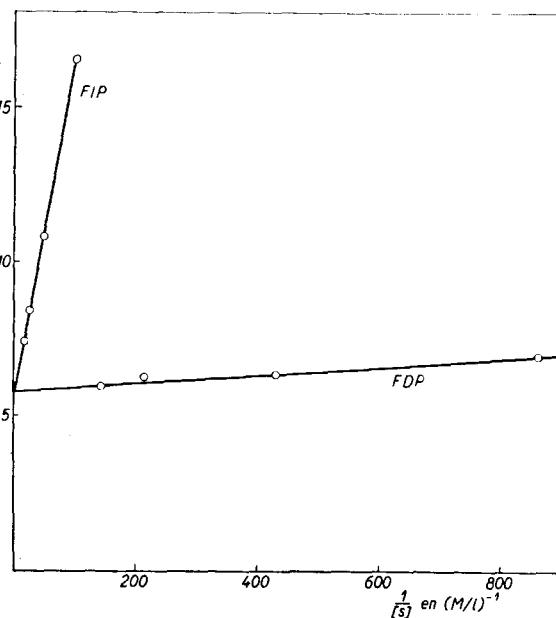


Fig. 1. Cinétique de la réaction aldolase. L'enzyme utilisé est un *extrait pH 5* de foie de lapin, fractionné entre 50 et 60 % de saturation en sulfate ammonique et dialysé. La vitesse de la réaction est mesurée par la méthode de SIBLEY ET LEHNINGER<sup>21</sup> et est exprimée en  $\mu M$  de substrat utilisé en 10 minutes. Les valeurs trouvées pour les constantes de MICHAËLIS sont de  $2.24 \cdot 10^{-4}$  moles · litre<sup>-1</sup> pour le FDP et  $1.84 \cdot 10^{-2}$  moles · litre<sup>-1</sup> pour le FIP.

Le ferment présent dans nos extraits est très actif à pH 7 et y présente également une dépendance absolue vis-à-vis du  $Mg^{+2}$ . Tout comme l'enzyme de GOMORI, il est spécifique de la fonction phosphate fixée au carbone 1 du FDP car il donne naissance à du F6P (dosé spectrophotométriquement au moyen de *zwischenferment* et d'isomérase) en quantité équivalente au P libéré.

### Bilans

Dans deux expériences effectuées à l'aide d'extraits différents préparés aux dépens de foie de rat en suivant exactement la technique de CORI *et coll.*<sup>5</sup> (*fraction 45-55*), nous avons dosé tous les composants qui figurent dans le schéma que nous proposons au début de cet article pour expliquer la conversion du F1P en hexoses-6-phosphates; soit le fructose-1-phosphate, la glycéraldéhyde, les trioses-phosphates, le fructose-diphosphate, le fructose-6-phosphate, le glucose-6-phosphate et le phosphate inorganique. Nous avons également dosé le fructose libre et le glucose libre. Ce dernier était nul. Les résultats de ces bilans sont résumés au Tableau VIII.

Dans la deuxième expérience, le système contenait initialement 12.7 micromoles de F1P et 0.55 micromoles de phosphate inorganique. L'analyse de sa composition finale a été décrite en détail dans une publication précédente (Tableau III de HERS *et coll.*<sup>15</sup>). Dans la première expérience, les analyses ont été effectuées de la même manière, mais sans vérification au *zwischenferment*.

TABLEAU VIII  
BILANS COMPLETS DES MÉTABOLITES FORMÉS AUX DÉPENS DU FIP

11 et 12.7  $\mu M$  de FIP synth. sont incubées 1 heure à 30° en présence de 10  $\mu M$  de  $MgCl_2$ , 100  $\mu M$  de tampon TRIS et 15 mg de protéines (*fraction 45-55*). Volume total 1.5 ml. Les deux expériences ont été réalisées avec des préparations enzymatiques différentes.

	1 <sup>re</sup> expériencer			2 <sup>me</sup> expériencer		
	$\mu$ Moles	$\mu$ Atomes C	$\mu$ Atomes P	$\mu$ Moles	$\mu$ Atomes C	$\mu$ Atomes P
FIP disparu	3.55	21.3	3.55	6.04	36.24	6.04
Fructose	0.7	4.2	—	1.08	6.48	—
Glycéraldéhyde	3.3	9.9	—	4.96	14.88	—
P inorganique	2.16	—	2.16	3.65	—	3.65
Hexoses-6-P	1.1	6.6	1.1	2.18	13.08	2.18
Fructose-di-P	0.06	0.36	0.12	0	0	0
Trioses-P	0.16	0.48	0.16	0.23	0.69	0.23
Total	—	21.54	3.54	—	35.13	6.06
Récupération:		101 %	100 %		97 %	100 %

Les données obtenues ne concordent pas entièrement avec le schéma proposé. Celui-ci exige, en effet, une égalité entre le P inorganique et les hexoses-6-phosphates formés, ainsi qu'entre la glycéraldéhyde produite et le F1P disparu. Il ne rend pas compte, d'autre part, de la production de fructose libre. Le Tableau IX montre que

les bilans s'équilibrent beaucoup mieux si l'on admet qu'une partie du FIP disparaît par hydrolyse directe. Ils deviennent très satisfaisants si l'on suppose en outre un certain degré d'hydrolyse des trioses-P. Nous croyons pouvoir attribuer ces hydrolyses à l'hexose-diphosphatase, car elles n'ont pas lieu en l'absence de  $Mg^{++}$  (Tableau II).

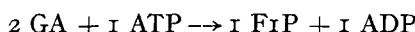
TABLEAU IX

## BILANS CORRIGÉS

	Après déduction du FIP hydrolysé		Après déduction des Trioses-P hydrolysés	
	1re expér.	2me expér.	1re expér.	2me expér.
FIP disparu	2.85	4.96	2.85	4.96
Glycéraldéhyde	3.3	4.96	2.94	4.57
P inorganique	1.46	2.57	1.1	2.18
Hexoses-6-P	1.1	2.18	1.1	2.18

## Triokinase

L'accumulation de glycéraldéhyde que nous observons au cours de l'utilisation du FIP pose le problème de son métabolisme. LINDBERG<sup>22</sup> a montré que l'addition de cette substance à des homogénats dialysés de rein accélère l'estéification oxydative du phosphate. On peut donc supposer l'existence d'une phosphokinase phosphorylant la GA aux dépens de l'ATP. Si cet enzyme existe, on peut prévoir que dans des extraits peu purifiés, riches en phosphotriose-isomérase et en aldolase, la phosphoglycéraldéhyde ainsi formée sera isomérisée en phosphodioxyacétone, qui réagira aussitôt avec une deuxième molécule de GA pour former du FIP, selon le schéma global:



Nous avons effectivement isolé une préparation qui catalyse cette réaction, en traitant un *extrait centrifugé* de foie de cobaye par un volume de sulfate ammonique saturé, en présence de tampon TRIS 0.05 M pH 8. Le précipité est recueilli par centrifugation, redissous et dialysé contre  $NaHCO_3 5 \cdot 10^{-3} M$ . Cette fraction, incubée à pH 7.2 en présence de glycéraldéhyde, en fait disparaître une petite partie en l'absence d'ATP et une quantité beaucoup plus grande en présence de ce corps. Comme le montre le Tableau X, 77% de la GA disparue se retrouve sous la forme de FIP et le reste sous la forme de trioses-phosphates. La DL-glycéraldéhyde est attaquée à la même vitesse et la dioxyacétone à une vitesse deux fois moindre. Dans ce dernier cas, il ne se forme pas de FIP, ce qui montre que la dioxyacétone n'est pas isomérisée par la préparation (Tableau X).

TABLEAU X  
EXISTENCE D'UNE TRIOKINASE

1 ml d'enzyme dialysé est incubé à 37° en présence de  $MgCl_2 6 \cdot 10^{-3} M$ , ATP  $6 \cdot 10^{-3} M$ , imidazole pH 7.2  $6 \cdot 10^{-2} M$ . Volume total 1.7 ml.

Les résultats sont exprimés en  $\mu M$ , par différence avec un témoin incubé sans ATP.

Substrat	$\Delta$ Trioses	$\Delta$ F acido-labile	$\Delta$ P alc. labile
9 $\mu M$ GA	— 7	+ 2.70	+ 1.96
5 $\mu M$ DOA*	— 3.32	0	+ 3.06

\* DOA = dioxyacetone

## DISCUSSION

Les résultats exposés dans ce travail rendent compte entièrement des observations effectuées par d'autres auteurs et par nous-mêmes au sujet du métabolisme du fructose par des préparations hépatiques *in vitro*. Ils montrent que la voie schématisée au début de cet article en est seule responsable et que l'hypothèse de l'action d'une phosphofructomutase ne peut pas être retenue. On ne peut évidemment exclure l'intervention d'autres mécanismes *in vivo*, mais on doit admettre que si ces mécanismes existent, ils deviennent inopérants dans des extraits. Jusqu'à preuve du contraire, il paraît vraisemblable que la voie décrite constitue la voie physiologique. Cette hypothèse comporte plusieurs corollaires importants.

On sait, depuis les travaux de CORI<sup>23</sup> que le fructose est plus rapidement transformé en glycogène hépatique que le glucose. Si, comme on l'admet généralement, la glucokinase du foie phosphoryle le glucose en G6P, ce dernier ester peut être considéré comme le premier intermédiaire commun aux deux mécanismes, la suite des réactions menant au glycogène étant la même dans les deux cas. Cela étant, on constate que pour transformer le glucose en G6P il suffit d'un seul enzyme et d'une molécule d'ATP, alors que 6 étapes enzymatiques et deux molécules d'ATP sont nécessaires pour arriver au même résultat à partir du fructose. Le fait que ce dernier est néanmoins assimilé plus rapidement suggère nettement que l'activité de la glucokinase constitue le facteur limitant de la transformation du glucose en glycogène dans le foie. Dans le sens catabolique, au contraire, les trioses-phosphates constituent les premiers intermédiaires communs aux métabolismes des deux hexoses. Ces faits sont importants du point de vue de l'action de l'insuline, qui semble bien agir spécifiquement sur l'utilisation du glucose.

Les observations effectuées sur le foie posent le problème du métabolisme du F1P au niveau du muscle, où cet ester constitue également le produit de phosphorylation du fructose (HERS<sup>24</sup>). Comme il a été montré dans ce travail, le muscle est capable de scinder le F1P par voie aldolaisique, mais des expériences récentes indiquent qu'il ne contient pas de triokinase. Aussi est-il probable que la 1-phosphofructokinase décrite par SLEIN *et coll.*<sup>1</sup> joue le rôle le plus important dans le métabolisme musculaire du F1P. Ces faits feront l'objet d'une communication ultérieure.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par un subside des "Lilly Research Laboratories". Nous remercions le professeur CHR. DE DUVE des conseils qu'il nous a donnés au cours de l'exécution de ce travail.

## RÉSUMÉ

1. Le mécanisme de la transformation du fructose-1-phosphate en fructose-6-phosphate par les extraits de tissu hépatique a été élucidé.

2. Le F1P est attaqué par l'aldolase, avec formation de glycéraldéhyde et de phosphodioxycétone. Celle-ci est partiellement isomérisée en phosphoglycéraldéhyde par la phosphotriose-isomérase et les deux trioses-phosphates se condensent en fructose-diphosphate encore une fois sous l'effet de l'aldolase. En l'absence d'ions  $Mg^{+2}$ , la réaction ne progresse pas plus loin et une fraction très faible du F1P disparaît, car l'équilibre des réactions est fortement en faveur de cet ester.

3. En présence de  $Mg^{+2}$ , le fructose-diphosphate est hydrolysé par l'hexose-diphosphatase en fructose-6-phosphate et phosphate inorganique, ce qui déplace l'équilibre des réactions aldolaisiques en faveur de la disparition du F1P.

*Bibliographie p. 437.*

4. Les bilans complets montrent que par mole de FIP métabolisé, il se forme 1 mole de glycéraldéhyde,  $\frac{1}{2}$  mole de P inorganique et  $\frac{1}{2}$  de F6P (partiellement isomérisé en G6P). De petites quantités de FIP et de trioses-phosphates disparaissent en outre par hydrolyse simple. La transformation directe du FIP en F6P par une phosphofructomutase ne peut pas être retenue.

5. En présence d'ATP, la glycéraldéhyde est phosphorylée en phosphoglycéraldéhyde par une triokinase. Dans les préparations incomplètement purifiées utilisées il se forme finalement du FIP, par condensation aldolasique d'une seconde molécule de glycéraldéhyde avec la phosphodioxycétone produite à partir de phosphoglycéraldéhyde.

6. Diverses observations ont été faites sur les enzymes en cause. La scission du FIP et du FDP semble être due à une seule *aldolase*, nettement différente de l'enzyme musculaire. Aussi active à saturation de substrat sur les deux esters, elle a cent fois plus d'affinité pour le second que pour le premier. L'*hexose-diphosphatase* présente dans les extraits exige d'une manière absolue l'ion  $Mg^{+2}$  et détache spécifiquement la fonction phosphate fixée au carbone 1 du FDP. Elle diffère de l'enzyme purifié par GOMORI par un optimum de pH plus acide. Un nouvel enzyme, la *triokinase*, a été décrit et purifié partiellement. En présence d'ATP, il phosphoryle approximativement à la même vitesse la D-glycéraldéhyde, la DL-glycéraldéhyde et la dioxyacétone.

## SUMMARY

1. The mechanism whereby extracts of hepatic tissue convert fructose-1-phosphate to fructose-6-phosphate has been elucidated.

2. FIP is split by aldolase to glyceraldehyde and phosphodioxycetone. The latter is partly isomerized to glyceraldehyde-phosphate and the two triose-phosphates condense, again under the action of aldolase, to form fructose-diphosphate. In the absence of  $Mg^{+2}$  ions, the reaction does not progress further and only small quantities of FIP disappear, since the equilibrium of the reactions is greatly in favour of this ester.

3. In the presence of  $Mg^{+2}$ , fructose-diphosphate is further hydrolyzed by hexose-diphosphatase, giving rise to fructose-6-phosphate and inorganic phosphate. The equilibrium of the aldolase reactions is thereby displaced in favour of FIP disappearance.

4. Complete balances indicate that for each mole of FIP metabolized, 1 mole of glyceraldehyde,  $\frac{1}{2}$  mole of inorganic P and  $\frac{1}{2}$  mole of F6P (partly converted to G6P) are formed. Small amounts of FIP and of triose-phosphates disappear by direct hydrolysis. A one-step conversion of FIP into F6P by a phosphofructomutase has been excluded.

5. In the presence of ATP, glyceraldehyde is phosphorylated to glyceraldehyde-phosphate, through the action of a triokinase. The final product, in the incompletely purified preparations used, is FIP, formed through an aldolase-catalyzed condensation of a second molecule of glyceraldehyde with the phosphodioxycetone formed from glyceraldehyde-phosphate.

6. Various observations have been made on the enzymes involved. The splitting of FIP and FDP appears to be due to a single *aldolase*, distinctly different from the muscle enzyme. It is equally active on both esters when saturated with substrate but has a hundred times more affinity for the latter than for the former. The *hexose-diphosphatase* present in the extracts shows an absolute requirement for  $Mg^{+2}$  ions and splits off specifically the phosphate group attached to carbon 1 of FDP. It differs from the enzyme purified by GOMORI by a more acid pH optimum. A new enzyme, *triokinase* has been described and partly purified. In the presence of ATP, it phosphorylates at approximately the same rate D-glyceraldehyde, DL-glyceraldehyde and dioxyacetone.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Mechanismus der Umwandlung von Fructose-1-phosphat in Fructose-6-phosphat durch Leberextrakte wurde erläutert.

2. FIP wird von Aldolase unter Bildung von Glycerinaldehyd und Phosphodioxyceton angegriffen. Phosphodioxyceton wird teilweise von der Phosphotrioseisomerase zu Phosphoglycerinaldehyd isomerisiert und die beiden Triosephosphate kondensieren sich noch einmal unter Einwirkung von Aldolase zu Fructosediphosphat. Bei Abwesenheit von  $Mg^{+2}$ -Ionen geht die Reaktion nicht mehr weiter und ein sehr geringer Bruchteil FIP verschwindet, denn das Gleichgewicht dieser Reaktionen ist stark zu Gunsten des Esters.

3. Bei Gegenwart von  $Mg^{+2}$  wird Fructosediphosphat von der Hexose-diphosphatase zu Fructose-6-phosphat und anorganischem Phosphat hydrolysiert und das Gleichgewicht der Aldolasereaktionen zu Gunsten des Verschwindens der FIP verschoben.

4. Die vollständige Bilanz zeigt, dass sich pro Mol verbrauchter FIP 1 Mol Glycerinaldehyd,  $\frac{1}{2}$  Mol anorganischer Phosphor und  $\frac{1}{2}$  Mol teilweise zu G6P isomerisierte F6P bildet. Kleine Mengen von FIP und von Triosephosphaten verschwinden außerdem durch gewöhnliche Hydrolyse. Die

direkte Umwandlung von F1P in F6P durch eine Phosphofructomutase kann nicht aufrechterhalten werden.

5. In Gegenwart von ATP wird Glycerinaldehyd durch eine Triokinase zu Phosphoglycerinaldehyd phosphoryliert. In den benützten unvollständig gereinigten Präparaten bildet sich schliesslich durch eine Aldolasekondensation eines zweiten Moleküls Glycerinaldehyds mit dem aus Phosphoglycerinaldehyd gebildeten Phosphodioxyacetone F1P.

6. Es wurden verschiedene Beobachtungen der beteiligten Enzyme angestellt. Die Spaltung der F1P und der FDP scheint einer einzigen *Aldolase* zuzuschreiben zu sein, die deutlich verschieden ist von dem Muskelenzym. Bei Sättigung des Substrates ist sie gegenüber beiden Estern gleich aktiv; ihre Affinität zu dem zweiten ist jedoch  $100 \times$  so gross wie zu dem ersten Ester. Die in den Extrakten anwesende *Hexosediphosphatase* benötigt unbedingt  $Mg^{+2}$ -Ion und spaltet spezifisch die am Kohlenstoffatom 1 der FDP sitzende Phosphatgruppe ab. Sie unterscheidet sich von dem von GOMORI gereinigten Enzym durch ein stärker saures pH-Optimum. Es wurde ein neues Enzym, die *Triokinase* beschrieben und teilweise gereinigt. Es phosphoryliert in Gegenwart von ATP D-Glycerinaldehyd, DL-Glycerinaldehyd und Dioxyacetone mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. W. SLEIN, G. T. CORI ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 763.
- <sup>2</sup> C. S. VESTLING, A. K. MYLROIE, U. IRISH ET N. H. GRANT, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 789.
- <sup>3</sup> F. LEUTHARDT ET E. TESTA, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1919; 34 (1951) 931.
- <sup>4</sup> H. G. HERZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 416.
- <sup>5</sup> G. T. CORI, S. OCHOA, M. W. SLEIN ET C. F. CORI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 304.
- <sup>6</sup> H. G. HERZ ET T. KUSAKA, IIe Congrès International de Biochimie, Paris 1952. Résumé des communications, p. 281.
- <sup>7</sup> C. DE DUVE in *Hormonal Factors in Carbohydrate Metabolism* (Symposium de la CIBA Foundation. Churchill Ltd. Londres W.C.1, 1953).
- <sup>8</sup> H. G. HERZ ET P. JACQUES, *Arch. Intern. Physiol.*, 61 (1953) 260.
- <sup>9</sup> F. LEUTHARDT, E. TESTA ET H. P. WOLF, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 227.
- <sup>10</sup> V. R. POTTER ET C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 495.
- <sup>11</sup> J. F. TAYLOR, A. A. GREEN ET G. T. CORI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 591.
- <sup>12</sup> G. GOMORI, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 139.
- <sup>13</sup> M. PLUMEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 129.
- <sup>14</sup> G. GOMORI, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 62 (1946) 33.
- <sup>15</sup> H. G. HERZ, H. BEAUFAYS ET C. DE DUVE, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 416.
- <sup>16</sup> C. DE DUVE, H. G. HERZ, J. BERTHET ET L. DUPRET, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 1242.
- <sup>17</sup> O. MEYERHOF ET H. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 655.
- <sup>18</sup> O. MEYERHOF, K. LOHMAN ET P. SCHUSTER, *Biochem. Z.*, 286 (1936) 319.
- <sup>19</sup> J. ROCHE ET S. BOUCHILLOUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 739.
- <sup>20</sup> C. F. CORI, Communication personnelle.
- <sup>21</sup> J. A. SIBLEY ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 859.
- <sup>22</sup> O. LINDBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 349.
- <sup>23</sup> C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 70 (1926) 577.
- <sup>24</sup> H. G. HERZ, *Arch. Intern. Physiol.*, 61 (1953) 426.

Reçu le 24 avril 1953