

BBA 65993

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU CERVEAU DE BŒUF

C. BRUNEL, G. CATHALA ET M. SAINTOT

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Montpellier, Hérault (France)

(Reçu le 20 juin, 1969)

SUMMARY

Purification and properties of alkaline phosphatase from beef brain

1. Alkaline phosphatase from beef brain (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) has been purified over 1840-fold by butanol extraction, acetone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-200. Two active peaks were separated; one of these peaks contains 2–3% of the total activity, the other fraction is homogeneous on cellulose acetate and polyacrylamide gel electrophoresis.

2. The molecular weight based on elution volume is estimated to be about 190 000.

3. This enzyme is probably a Zn^{2+} metalloenzyme and is activated by Mg^{2+} . The following monoesters are hydrolysed: *p*-nitrophenylphosphate, phenylphosphate, β -glycerophosphate, DL-phosphoserine, *O*-phosphorylethanolamine. The K_m values have been determined. Pyridoxal 5-phosphate is very slightly hydrolysed. The optimum pH is 10.2, using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate in carbonate buffer.

4. The beef-brain alkaline phosphatase has also an inorganic pyrophosphatase activity, which is optimum in Tris-HCl buffer (pH 8.8) and inhibited by excess Mg^{2+} and substrate.

5. A study of inhibition of these two activities has established some differences. The pyrophosphatase activity is more sensitive to the action of EDTA and is recovered more slightly by metal ions. However, our data are consistent with previous results on alkaline phosphatases from different sources in which the phosphatase and pyrophosphatase activities have been shown to be located on the same site. The role of active groups is discussed.

6. Phosphotransferase activity has been found in a medium containing *p*-nitrophenylphosphate (donor) and Tris or ethanolamine (acceptor). The percentage of phosphate transferred is 50%.

INTRODUCTION

On sait depuis longtemps¹⁻³ que le cerveau contient des phosphatases et que l'activité phosphatasique globale est faible comparativement à d'autres tissus. Cepen-

dant, les recherches faites avec divers substrats, à divers pH et avec des inhibiteurs variés semblent indiquer une pluralité insoupçonnée de phosphatases alcalines non spécifiques ou à faible spécificité.

KORNGUTH ET STUBBS⁴ ont obtenu à partir du cerveau de bœuf une phosphatase dont l'optimum d'action se situe à pH 7.5. Cet enzyme hydrolyse le phosphohydroxypyruvate, le β -glycérophosphate, le glucose 6-phosphate et le fructose 6-phosphate mais est sans action sur le *p*-nitrophénylphosphate, la DL-phosphosérine ou la *O*-phosphoryléthanolamine.

DATTA ET GHOSH⁵ ont montré que les ribosomes du cortex cérébral de chèvre ont une activité phosphomonoestérasique alcaline vis à vis de nombreux esters phosphoriques à pH 8.1.

Sur le cerveau humain et chez le mouton, SARASWATHI ET BACHHAWAT⁶⁻⁸ ont mis en évidence l'existence de deux isoenzymes de la phosphatase alcaline répartis dans les différentes régions du cerveau et capables d'hydrolyser le pyridoxal 5-phosphate et de nombreux autres esters.

Dans le présent travail, nous décrivons une méthode de purification de la phosphatase alcaline du cerveau de bœuf (monoester orthophosphorique phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) et nous présentons une étude des activités phosphatasique, pyrophosphatasique et phosphotransférante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Les cerveaux ont été utilisés le plus rapidement possible après la mort de l'animal. Dans quelques cas où nous avons pris des cervelles surgelées du commerce, l'expérience a montré que les résultats ne sont pas différents. *p*-Nitrophénylphosphate (sel disodique), DL-phosphosérine, phénylphosphate (sel disodique), L-phénylalanine iodoacétamide, acide iodoacétique, sérum albumine et trypsine fournis par Fluka, β -glycérophosphate, EDTA, anhydride acétique, photo-rex (4-méthylaminophénylsulfate) et Tris par Merck, pyrophosphate de sodium par Prolabo, α -naphthylphosphate par Koch-Light Lab., pyridoxal 5-phosphate par K et K Lab., *O*-phosphoryléthanolamine et *p*-hydroxymercuribenzoate par Sigma, neuraminidase (*Vibrio cholera*) par Behringwerke AG, ovalbumine par Mann, γ -globuline par Calbiochem, phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* par Worthington, Sephadex G-200 par Pharmacia, DEAE-cellulose par Bio-Rad Lab.

Méthodes analytiques

Concentrations en protéines: déterminées par la méthode de LOWRY *et al.*⁹ avec un spectrophotomètre Beckman DU-2 à 660 m μ et la sérum albumine comme standard.

Électrophorèses: réalisées sur bandes d'acétate de cellulose 2.5 cm \times 17 cm (Cellogel) en tampon barbital sodique (pH 8.6) contenant du MgCl₂ 1 mM (tension appliquée 180 V pendant 2 h). Électrophorèses sur gel de polyacrylamide: faites avec un appareil Pleuger en tampon Tris-glycine (pH 8.5) (80 V pendant 30 min puis 160 V pendant 90 min). Dans les deux cas, la protéine a été révélée par coloration à l'amido-noir et l'activité phosphatasique par imbibition de la bande ou du gel avec

une solution d' α -naphthylphosphate 5 mM, MgCl_2 1 mM tamponnée à pH 10.0, et coloration de l' α -naphthol libéré par la 5-chloro-*O*-toluidine diazotée.

Action de la neuraminidase: l'enzyme, équilibré contre un tampon acétate 0.05 M (pH 5.5) contenant NaCl 0.15 M et CaCl_2 1.4 mM, a été soumis à la digestion par la neuraminidase (50 unités/ml de solution de phosphatase alcaline, 37° pendant 1 h) puis la mobilité électrophorétique a été étudiée comme ci-dessus.

Poids moléculaire: mesuré selon la méthode des volumes d'élution de WHITAKER¹⁰ en utilisant une colonne de Sephadex G-200 (85 cm \times 2.5 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 7.6) à 4°. La colonne a été calibrée avec les protéines suivantes: trypsine 23 800, ovalbumine 45 000, sérum albumine 67 000, phosphatase alcaline *E. coli* 75 000, γ -globuline 160 000, et du Bleu dextran pour la mesure de V_0 . On a déposé chaque fois 2 ml d'une solution à 5 mg/ml, et la position des pics a été repérée par la lecture de $A_{280 \text{ m}\mu}$. Pour la phosphatase alcaline, la quantité déposée était de l'ordre de quelques μg , de telle sorte que le pic n'était repérable que par la mesure de l'activité enzymatique.

Essais enzymatiques

*Activité phosphatasique (hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate)*

L'unité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmole de *p*-nitrophénol par min dans un milieu contenant du *p*-nitrophénylphosphate 5 mM, du MgCl_2 1 mM et du tampon carbonate 3 mM (pH 10.0).

La cinétique d'hydrolyse a été suivie à 37° par la variation de l'absorbance à 400 $\text{m}\mu$ pendant 5 min avec un spectrophotomètre Unicam SP 800 (ϵ_M (*p*-nitrophénol) = 18 300).

Les extraits purifiés contenaient environ 7 unités/ml de solution enzymatique; des quantités variant de 5 à 20 μl de cette solution étaient suffisantes dans un volume réactionnel de 2.5 ml.

Activité pyrophosphatasique (hydrolyse du PP_i)

On a utilisé 20 μl de solution enzymatique dans 6 ml de volume réactionnel, contenant du pyrophosphate de sodium 1 mM, du MgCl_2 1 mM et du tampon Tris-HCl 3 mM, NaCl 3 mM (pH 8.8). Le mélange a été placé à 37°, et entre 0 et 40 min, on a prélevé des aliquotes de 1 ml qui ont été ajoutées à 5 ml de tampon acétate (pH 4.0). L'hydrolyse spontanée du PP_i a été contrôlée chaque fois et dans les mêmes conditions. Le P_i libéré a été dosé selon la méthode de DELSAL ET MANHOURI¹¹ en utilisant le photo-rex comme réducteur.

Activité phosphotransférante

La réaction de transfert a été mise en évidence d'après les différences observées dans le dosage des produits de l'hydrolyse lorsque le milieu réactionnel contient du Tris ou de l'éthanolamine 1 M (pH 9.2), du *p*-nitrophénylphosphate 5 mM et du MgCl_2 1 mM. Le Tris ou l'éthanolamine possèdent en effet des groupes hydroxyles non substitués pouvant accepter les ions phosphates transférés.

Pour vérifier l'absence de transfert lorsque le milieu réactionnel ne contient pas d'accepteur, on a remplacé le Tris ou l'éthanolamine par du tampon carbonate 0.1 M (pH 9.2).

Dans les deux cas, à 15 ml de substrat on a ajouté 0.1 ml d'une solution enzymatique à 8 unités/ml et la réaction a été suivie à 37°. Entre 0 et 50 min, on a prélevé des aliquotes de 2 ml qui ont été ajoutées à 0.5 ml de H_2SO_4 2.5 M. Sur les

fractions ainsi obtenues, on a utilisé pour le dosage du *p*-nitrophénol des prises d'essai de 0.5 ml qui ont été portées à 10 ml avec du Tris ou de l'éthanolamine 1 M (pH 9.2) ou encore du carbonate 0.1 M (pH 9.2); l'absorbance à 400 m μ a été chaque fois comparée à une gamme de *p*-nitrophénol appropriée. Le P_i a été dosé également sur des prises d'essai de 0.5 ml par la méthode de DELSAL ET MANHOURI¹¹ dans un volume final de 10 ml. Les contrôles nécessaires ont été faits avec des solutions de phosphate standard.

Constantes de Michaelis, K_i et pH optimum

Les constantes de Michaelis vis à vis de divers substrats ont été déterminées par la méthode classique de LINEWEAVER-BURK¹². Les mélanges réactionnels étaient les mêmes que ceux décrits plus haut, respectivement pour les esters phosphoriques et le PP_i; pour la phosphosérine, le pH du tampon était maintenu à 9.8. Les concentrations suivantes ont été choisies. *p*-Nitrophénylphosphate et phénylphosphate: 5, 2.5, 1.25, 1, 0.625, 0.5, 0.33, 0.25 mM; DL-phosphosérine: 5, 4, 3, 2, 1 mM; β -glycérophosphate et *O*-phosphoryléthanolamine: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.25 mM; PP_i: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mM.

Pour la détermination des K_i, le milieu réactionnel contenait l'inhibiteur aux concentrations: P_i: 10 et 5 mM; arséniate: 1 mM.

L'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate a été suivie par le dosage du *p*-nitrophénol comme décrit ci-dessus, celle des autres esters, par le dosage du P_i en appliquant le même procédé que celui décrit pour l'hydrolyse du PP_i.

Le pH optimum de l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate a été déterminé en considérant une zone de pH comprise entre 9 et 10.6 aux concentrations en *p*-nitrophénylphosphate: 5, 1.25, 0.625, 0.33 mM; pour PP_i en tampon Tris-HCl, de pH 7.5-9.5.

Acétylation de la phosphatase

L'enzyme a été soumis à l'action de l'anhydride acétique à 0° en milieu acétate de sodium à demi-saturation et à pH 8.0, puis à nouveau équilibré par dialyse contre du Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8.0). Parallèlement un enzyme témoin approprié a été préparé.

RÉSULTATS

Extraction et purification

Le procédé est inspiré d'une modification de la méthode de MORTON¹³ apportée par AHMED ET KING¹⁴. Les différentes opérations sont faites à 4°. Le matériel (3 cerveaux: environ 1.2 kg) est lavé, débarrassé des membranes, coupé en morceaux et homogénéisé pendant 2 min avec un "ultra-turrax" dans 1200 ml d'eau distillée. Le pH de l'homogénat est amené à 6.5, puis on ajoute 1800 ml de butanol; on agite pendant 1 h au moins et on chauffe l'homogénat à 35° pendant 5 min. On centrifuge enfin à 3500 $\times g$ pendant 30 min. La phase aqueuse est siphonnée puis la couche protéique surnageante est reprise par 1000 ml d'eau distillée et centrifugée à nouveau. Les deux extraits aqueux sont ajoutés et filtrés.

On abaisse le pH de la solution à 4.9 par de l'acide acétique 1 M et on laisse

30 min à la température ambiante. Le précipité inactif est éliminé par centrifugation comme ci-dessus et le pH du surnageant est amené à 6.5 par de la soude 1 M.

On ajoute de l'acétone refroidie à -15° , jusqu'à 30% (v/v). On laisse 1 h au moins à -5° et on centrifuge à $3500 \times g$ pendant 20 min. La solution surnageante est amenée à 40% d'acétone et on abandonne la préparation à -5° . Après 24 h, le précipité obtenu contient toute l'activité phosphatasique. Il est recueilli par centrifugation, séché par de l'acétone pure et conservé à -15° .

Le précipité acétonique est repris par 50 ml d'eau distillée et le matériel insoluble est éliminé par centrifugation à $30\,000 \times g$. Le surnageant est amené à 0.4 satn. en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et après 24 h on centrifuge à $3500 \times g$ pour éliminer le précipité formé. On répète les opérations à 0.5, 0.6 et 0.7 satn. Le dernier précipité contenant la phosphatase alcaline, est solubilisé par 10 ml d'eau distillée et la solution est dialysée pendant 3 h contre un tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.7). Celui-ci est changé 2 fois.

Sur une colonne de DEAE-cellulose (12 cm \times 1 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.7), on dépose une partie de la solution dialysée correspondant à 30 mg de protéines environ. On lave la colonne jusqu'à ce que les protéines non fixées soient éluées, puis on applique un gradient linéaire de NaCl. Le récipient mélangeur est rempli avec 250 ml du tampon de lavage, le réservoir avec 250 ml du même tampon contenant du NaCl 0.5 M. On recueille des fractions de 5 ml. La Fig. 1 montre que la phosphatase alcaline du cerveau de bœuf est hétérogène et l'électrophorèse sur acétate de cellulose confirme ce résultat (Fig. 2). Le second pic (B') ne

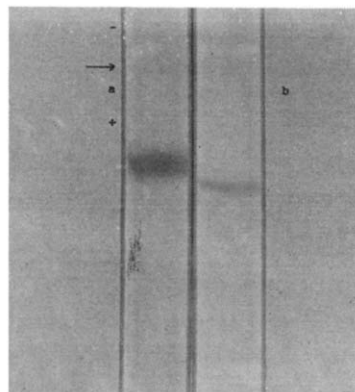
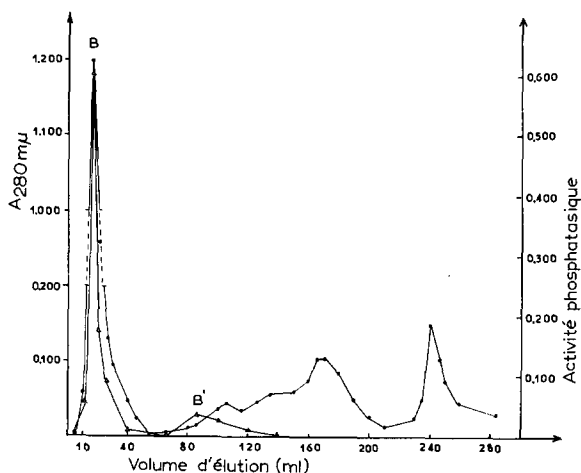


Fig. 1. Chromatographie sur DEAE-cellulose de l'extrait protéique obtenu après précipitation par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0.7 satn. \bullet — \bullet , $A_{280\text{ m}\mu}$; \triangle — \triangle , activité phosphatasique, exprimée par la variation de l'absorbance à $400\text{ m}\mu$ en 5 min (libération de *p*-nitrophénol), provoquée par une aliquote de chaque fraction de l'éluat dans 2.5 ml de substrat (conditions standard). Les deux pics à activité phosphatasique sont respectivement désignés par B et B'.

Fig. 2. Electrophorèse sur acétate de cellulose des deux fractions à activité phosphatasique séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose. (a) Pic B; (b) Pic B'. La flèche indique l'endroit où a été fait le dépôt.

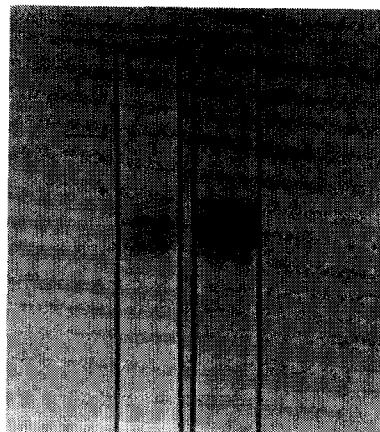
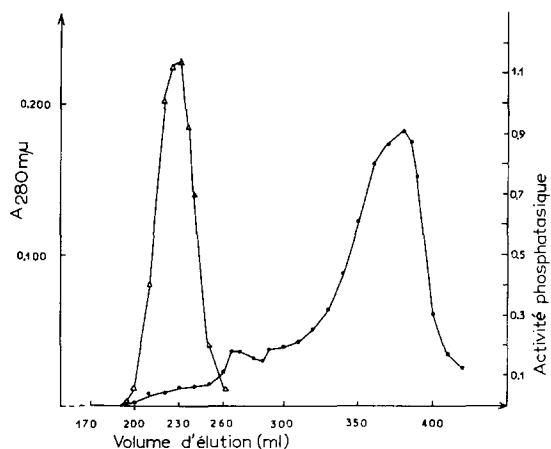


Fig. 3. Purification de la phosphatase alcaline (Pic B) sur colonne de Sephadex G-200. ●—●, $A_{280\text{ m}\mu}$; \triangle — \triangle , activité phosphatasique exprimée comme dans Fig. 1.

Fig. 4. Electrophorèse sur acétate de cellulose d'un extrait purifié de phosphatase alcaline cérébrale (Pic B). (a) Révélation protéique par l'amido-noir; (b) révélation enzymatique de la phosphatase alcaline. Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont abouti au même résultat.

contient que 2–3% de l'activité initiale et nous avons seulement considéré l'effet de la neuraminidase sur sa mobilité électrophorétique.

Les fractions constituant le Pic B sont rassemblées, concentrées à 2 ml par dialyse contre une solution concentrée de saccharose tamponnée à pH 8.0 et passées sur une colonne de Sephadex G-200 (85 cm \times 2.5 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8.0) (Fig. 3).

Les différentes étapes de la purification sont résumées dans le Tableau I. L'extrait final a une activité spécifique de 460 unités/mg de protéines et son homogénéité électrophorétique a été démontrée; à la bande active (révélation enzymatique) correspond une seule bande protéique qui se superpose à elle (Fig. 4). La phosphatase alcaline ainsi purifiée conserve 100% de son activité pendant plusieurs mois en solution concentrée ou diluée à pH 8.0.

Action de la neuraminidase

Dans nos conditions expérimentales, le traitement par la neuraminidase n'affecte

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE CERVEAU DE BOEUF

Fraction	Protéines totales (mg)	Unités totales	Activité spécifique (unités/mg)	Rendement (%)	Purification
Phase aqueuse Stade 1	5280	1320	0.25	100	0
Phase aqueuse Stade 2	2970	1190	0.40	90	1.6
Précipité acétonique 40%	320	710	2.2	54	8.8
Précipité $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.7 satn.	95	640	6.7	48	26.8
DEAE-cellulose* (Pic B)	35	590	16.8	45	67
Sephadex G-200	0.65	300	460	23	1840

* Les Pics B de 3 colonnes ont été réunis.

pas sensiblement la mobilité électrophorétique de l'enzyme B, alors que le déplacement de B' est diminué au point d'être pratiquement égal à celui de B.

SARASWATHI ET BACHHAWAT⁸ avaient déjà obtenu un résultat analogue en étudiant, avant et après digestion par la neuraminidase, le comportement chromatographique sur DEAE-cellulose des deux fractions isolées du cerveau de mouton. Selon ces mêmes auteurs, la différence du contenu en acide sialique des deux pics ne serait pas le seul facteur responsable de l'hétérogénéité de la phosphatase alcaline cérébrale.

Poids moléculaire

Sur la base du volume d'élution et d'après la moyenne de plusieurs déterminations, le poids moléculaire de l'enzyme du cerveau de boeuf est estimé à 190 000 environ. Cette propriété a été mise à profit pour la purification par gel filtration.

Thermostabilité

L'enzyme est longtemps stable à 45°; à 55° il conserve encore 50% de son activité après 45 min d'incubation; à 60° il n'en possède plus que 15% après 15 min.

pH optimum

Dans leurs conditions d'hydrolyse respectives: l'activité pour le *p*-nitrophénylphosphate est optimum à pH 10.1–10.2, pour le PP_i à pH 8.8 (Fig. 5).

Des travaux avec des phosphatases alcalines d'origines diverses^{15–18} ont déjà

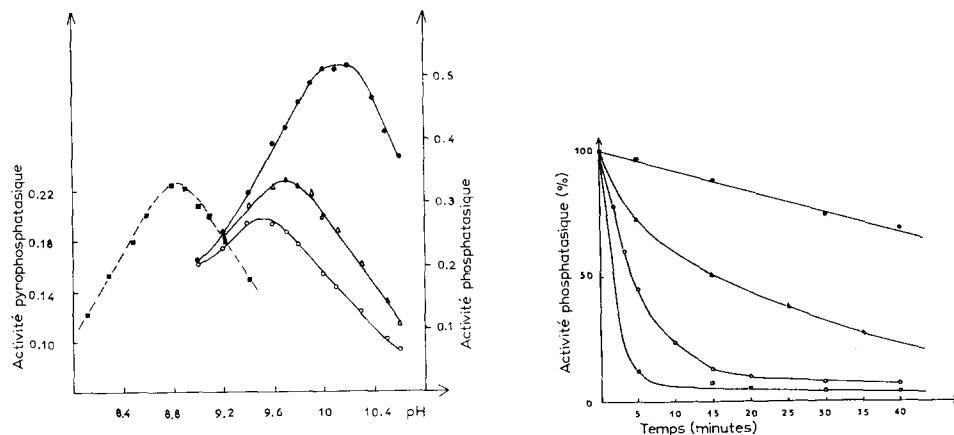


Fig. 5. pH optimum de l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate et variation en fonction de la concentration en substrat (*p*-nitrophénylphosphate): ●—●, 5 mM; △—△, 1.25 mM; ○—○, 0.625 mM. ■—■, pH optimum de l'hydrolyse du PP_i. Les activités sont exprimées en unités arbitraires.

Fig. 6. Cinétiques de désactivation par EDTA. L'enzyme est incubé à la température ambiante avec EDTA en tampon Tris-HCl à pH 8.0. Au temps choisi, on prélève une aliquote de 10 μ l qui est testée avec un substrat (*p*-nitrophénylphosphate) ne contenant pas Mg²⁺ (la dilution par le milieu de test est telle que la quantité résiduelle d'EDTA introduite avec l'enzyme n'influence pas la cinétique d'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate). Concentration en EDTA: ●—●, 0.2 mM; △—△, 0.8 mM; □—□, 1 mM; ○—○, cinétique de désactivation lorsque EDTA est ajouté au milieu de test à la concentration 1 mM.

TABLEAU II

ÉTUDE COMPARÉE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS

Substrat	pH	P_i libéré (μ moles/ min per l)	Activité relative	K_m apparent (mM)
<i>p</i> -Nitrophénylphosphate	10	9.8*	1.00	0.9
Phénylphosphate	10	16.3	1.66	0.9
Phosphosérine	9.8	5.1	0.52	2.2
Phosphoryléthanolamine	10	4.2	0.43	33.0
β -Glycérophosphate	10	3.6	0.37	8.3
Pyridoxal 5-phosphate	10	Négligeable	0	—
PP _i	8.8	2.4	0.24	2

* Estimé par la mesure du *p*-nitrophénol libéré.

montré que le pH optimum baisse lorsque la concentration en substrat diminue. Cela est vrai aussi pour la phosphatase cérébrale et il est remarquable de noter qu'à pH 9.0 l'activité ne dépend plus de la concentration en substrat, du moins entre 5 et 0.625 mM.

Avec la DL-phosphosérine, la variation du pH optimum est encore plus nette: 9.8–9.9 à 5 mM et 9.1 à 1.25 mM.

Spécificité de substrat, K_m , inhibition par P_i et arséniate (Tableau II)

De tous les substrats testés, seul le pyridoxal 5-phosphate est pratiquement résistant. Considérant que l'hydrolyse de cet ester pouvait être un cas particulier, des essais ont été faits dans des conditions diverses de pH, de tampon et de concentration en pyridoxal 5-phosphate. En aucun cas, il a été possible d'obtenir une hydrolyse mesurable.

Avec la phosphosérine surtout et la phosphoryléthanolamine, l'excès de substrat est inhibiteur, respectivement au-delà de 5 mM et 8 mM.

L'hydrolyse du PP_i est optimum à 1 mM en tampon Tris-HCl; au-delà l'excès de substrat est fortement inhibiteur. En tampon carbonate et au même pH l'hydrolyse est plus faible, mais le substrat n'est inhibiteur qu'au-dessus de 2 mM.

P_i et arséniate sont des inhibiteurs de type compétitif ($K_i = 2$ et 0.7 mM respectivement).

Inhibition incompétitive par la L-phénylalanine

En tampon carbonate 3 mM, MgCl₂ 1 mM, avec le *p*-nitrophénylphosphate 5 mM comme substrat et pour une concentration donnée en L-phénylalanine, l'inhibition maximum est obtenue à pH 9.2. L'inhibition est fonction de la concentration en inhibiteur selon une courbe hyperbolique. Elle atteint 46% lorsque le milieu réactionnel contient de la L-phénylalanine 8 mM et 68% à 16 mM.

Influence des ions bivalents

On voit d'après les chiffres rapportés dans le Tableau III que seul Mg²⁺ a un effet activateur important sur l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate. A 1 mM et au-delà, cette activation est de 4–5 fois en tampon carbonate et d'environ 2 fois en

TABLEAU III

ACTION DES IONS MÉTALLIQUES

Ion métallique (1 mM)	Activité relative (hydrolyse du <i>p</i> -nitrophénylphosphate)	
	Tampon triéthanol- amine (pH 10.0)	Tampon carbonate (pH 10.0)
—	0.25	0.25
MgCl ₂	0.52	1.06
CaCl ₂	0.34	—
SrCl ₂	0.21	—
CoCl ₂	0.14	—
NiCl ₂	0.12	—
ZnCl ₂	0	—

tampon triéthanolamine. L'effet est d'autant plus grand que la préparation est plus pure. Ca²⁺ est aussi légèrement activateur.

L'activité pyrophosphatasique est beaucoup plus sensible; elle est nulle sans Mg²⁺, maximum à 1 mM, fortement inhibée aux concentrations supérieures; les autres cations n'ont pas été testés.

Inhibition par EDTA et réactivation par les ions bivalents (Fig. 6)

Les deux activités, phosphatasique (*p*-nitrophénylphosphate) et pyrophosphatasique, sont inhibées mais avec des sensibilités différentes.

Les cinétiques de désactivation de l'enzyme préincubé avec EDTA montrent

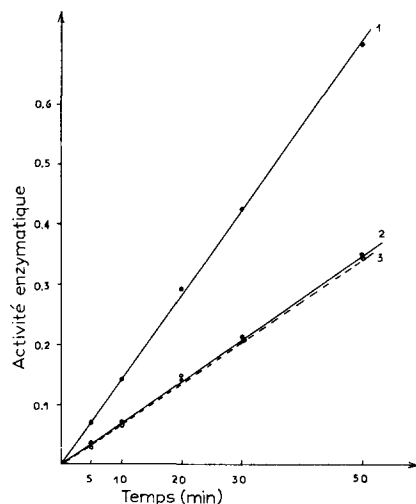


Fig. 7. Activité phosphotransférante: Courbe 1, *p*-nitrophenol; Courbe 2, P₁; Courbe 3 = *p*-nitrophenol — P₁. Les chiffres sont exprimés en μ moles de *p*-nitrophenol ou de P₁ contenues dans une prise d'essai de 0.5 ml (cf. MATÉRIEL ET MÉTHODES).

que, dans le cas de l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate, l'inhibition est fonction du temps et de la concentration en inhibiteur; à faible concentration: 0.2 mM le phénomène est linéaire pendant 40 min au moins; au-delà les cinétiques sont d'ordre 1 puis 2 suggérant ainsi que l'EDTA pourrait avoir deux effets: le premier rapide, correspondant à la formation d'un complexe enzyme-EDTA, le deuxième plus lent, correspondant à la libération du complexe EDTA-ion métallique.

Alors qu'à 1 mM en EDTA, la désactivation est de 80% après 5 min (hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate), vis-à-vis de son activité pyrophosphatasique l'enzyme paraît plus sensible: à 0.2 mM il est totalement inactivé après 5 min. Dans ce cas la formation du complexe enzyme-EDTA suffirait à inhiber l'hydrolyse de PP_i.

Lorsque l'EDTA est incorporé au milieu de test, le *p*-nitrophénylphosphate protège partiellement l'enzyme; l'inhibition est seulement de 75% après 10 min. Le pyrophosphate ne protège pas.

Après désactivation en présence de l'ester phosphorique dans le milieu réactionnel, Mg²⁺ ajouté en quantité équimolaire à l'EDTA permet de récupérer 70% de l'activité initiale, Ni²⁺ 57%, Ca²⁺ neutralise l'action de l'EDTA et l'activité observée est égale à l'activité de l'enzyme sans Mg²⁺; Zn²⁺, Co²⁺, Sr²⁺ à la concentration 1 mM sont sans effet. En présence de PP_i, Mg²⁺ ajouté dans les mêmes conditions donne une réactivation de 12% seulement; les autres ions n'ont aucun effet.

L'enzyme est totalement désactivé lorsqu'il est préincubé à la température ambiante pendant 2 h, avec EDTA 1 mM à pH 8.0. Mg²⁺ introduit dans le milieu réactionnel à la concentration 1 mM ne permet pas la réactivation; Zn²⁺ ajouté après Mg²⁺ à des concentrations allant de 2–40 μM ne permet pas non plus de rétablir l'activité. Par contre, si on introduit Mg²⁺ dans le milieu réactionnel contenant déjà le substrat, l'enzyme inactif et Zn²⁺ à faible concentration, on observe une réactivation sensible de l'enzyme qui est maximum pour des concentrations en Zn²⁺ allant de 100–20 μM. Ceci semble indiquer que la réactivation par Zn²⁺ n'est pas instantanée et que Mg²⁺ en excès peut empêcher l'enzyme de lier le Zn²⁺. Le pourcentage de réactivation atteint 70% pour l'activité phosphatasique et 18% pour l'activité pyrophosphatasique.

Si après incubation de l'enzyme et de l'EDTA on soumet la préparation à une dialyse prolongée, l'apoenzyme ainsi préparé est inactif et peut être réactivé comme ci-dessus en présence de Zn²⁺ et de Mg²⁺. Le maximum de réactivation (environ 60% de l'activité initiale) est obtenu avec Zn²⁺ 50 μM et Mg²⁺ 1 mM. Dans ce cas, le pourcentage de réactivation est sensiblement le même pour les deux activités.

Comme pour beaucoup d'autres phosphatases, Zn²⁺ paraît être l'ion métallique essentiel intervenant dans le mécanisme d'action de la phosphatase cérébrale. Co²⁺ peut remplacer Zn²⁺ mais dans tous les cas la réactivation est nettement plus faible. Ni²⁺, Ca²⁺ et Mn²⁺ se comportent comme Mg²⁺ mais à des degrés moindres.

Acétylation

L'anhydride acétique est un réactif de choix pour la substitution de groupes acétylés sur les groupes aminés des protéines. L'hydroxyle phénolique de la tyrosine est aussi acétylé, mais en présence de hautes concentrations d'acétate, l'acétyltyrosine s'hydrolyse rapidement et la réaction ne concerne pratiquement que les groupes NH₂.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose montre que la phosphatase alcaline acétylée a une mobilité plus grande vers l'anode que l'enzyme témoin; le même

TABLEAU IV

PHOSPHATASE ALCALINE ACÉTYLÉE

<i>Substrat</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Substrat hydrolysé (μmoles/ min per l)</i>	<i>Activité relative (%)</i>	<i>K_m (mM)</i>
<i>p</i> -Nitrophénylphosphate	Enzyme témoin	5.6	100	0.9
	Enzyme acétylé	2.9	52	1.4
PP _i	Enzyme témoin	1.2	100	2.0
	Enzyme acétylé	0.64	53	> 2.0

déplacement étant obtenu quelle que soit la quantité de réactif, il est probable que tous les groupes sous forme NH_3^+ accessibles sont acétylés.

L'activité enzymatique est diminuée en fonction de la quantité de réactif ajouté. Aux concentrations élevées, l'abaissement du pH peut contribuer à la perte d'activité, mais lorsqu'on ajoute 0.2 mmole de réactif à 1 ml de solution enzymatique contenant de l'acétate de sodium à 0.5 satn. et tamponnée à pH 8.0, il n'y a pas de modification sensible du pH et on observe la même chute d'activité après 30 min et 3 h quel que soit le substrat utilisé (*p*-nitrophénylphosphate ou PP_i). L'enzyme acétylé est doué d'une grande stabilité.

Bien que faibles, les différences observées dans les valeurs de K_m sont significatives. En effet, les chiffres rapportés dans le Tableau IV (activité phosphatasique *p*-nitrophénylphosphate) représentent les moyennes de plusieurs déterminations comprises entre 0.85 et 0.95 mM pour l'enzyme témoin, 1.35 et 1.45 mM pour l'enzyme acétylé. Par contre, le K_m de l'enzyme acétylé n'a pas pu être déterminé avec précision lorsque PP_i est utilisé comme substrat. Nous savons seulement qu'il est supérieur à 2 mM.

La persistance d'une activité égale à 50% de l'activité initiale après acétylation

TABLEAU V

ACTION DES REACTIFS SPÉCIFIQUES DE LA FONCTION THIOL

<i>Réactif</i>	<i>Concn. (mM)</i>	<i>Temps de réaction (h)</i>	<i>Activité phospha- tasique (%)</i>	<i>Activité pyrophos- phatasique (%)</i>
0	0		100	100
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoate	1	2	100	—
	2.5	2	100	—
Iodoacétamide	50	17	100	100
Acide iodoacétique	50	2	92	—
Cystéine*	0		100	100
	0.1		8.9	—
	0.25		5.4	—
	0.5		5.4	—
Cystéine + iodoacétamide	0.1		91	95

* La cystéine est incorporée au milieu de test.

suggère que les groupes aminés ne sont pas essentiels pour le fonctionnement du site catalytique, mais l'augmentation des valeurs de K_m peut signifier qu'ils participent à la formation du complexe enzyme-substrat.

Action de p-hydroxymercuribenzoate, iodoacétamide, acide iodoacétique

L'action de ces réactifs sur la phosphatase intestinale de veau¹⁹ et sur la phosphatase intestinale de rat²⁰ a permis de suggérer la présence de groupes -SH au site actif. Sur d'autres phosphatases alcalines¹⁷, les réactifs des thiols sont sans effet.

Sur la phosphatase cérébrale (Tableau V) et à pH 8.0, le *p*-hydroxymercuribenzoate, l'iodoacétamide et l'acide iodoacétique n'ont aucun effet significatif sur les activités phosphatasique et pyrophosphatasique, quelle que soit la concentration du réactif et même après des temps d'incubation prolongés.

La cystéine à faible concentration inhibe fortement l'enzyme et l'activité initiale est récupérée si on ajoute une quantité équimolaire d'iodoacétamide.

Propriétés phosphotransférantes

Sur des enzymes d'origines diverses et notamment la phosphatase alcaline d'*E. coli*, de nombreux travaux²¹⁻²³ ont mis en évidence une réaction de transfert du groupe phosphate sur une molécule à groupements oxhydrides.

La phosphatase alcaline cérébrale possède aussi cette activité. Avec le *p*-nitro-phénylphosphate comme substrat, du Tris 1 M comme accepteur et à pH 9.2, la cinétique de la réaction de transfert est d'ordre nul (Fig. 7); la quantité de phosphate transféré par unité de temps est égale à 50% (Tableau VI) indiquant qu'il y a équilibre entre les deux réactions. Avec l'éthanolamine 1 M la réaction d'hydrolyse est plus faible, mais le pourcentage de phosphate transféré est toujours égal à 50%. En l'absence d'accepteur, nous obtenons une bonne correspondance entre *p*-nitrophénol et P_i libérés.

TABLEAU VI

ACTIVITÉ PHOSPHOTRANSFÉRANTE

<i>Tampon</i>	<i>pH</i>	<i>p</i> -Nitro- phénol (μ moles*)	P_i (μ moles*)	<i>p</i> -Nitrophénol P_i	Phosphate transféré (%)
Tris	9.2	7.95	4.01	1.98	49.6
Ethanolamine	9.2	3.90	1.88	2.07	51.8
Carbonate	9.2	3.34	3.22	1.03	3.6

* Les valeurs représentent les quantités de *p*-nitrophénol ou de P_i libérées en 30 min. Chacune représente la moyenne de 3 déterminations.

En fonction du pH, entre 8.0 et 9.6, la différence *p*-nitrophénol — P_i augmente vers les pH plus alcalins et le rapport *p*-nitrophénol/ P_i est toujours peu différent de 2, ce qui tend à démontrer la proportionnalité entre la réaction d'hydrolyse et la réaction de transfert.

DISCUSSION

Le cerveau de bœuf contient deux formes de phosphatase alcaline électrophoré-

tiquement distinctes et qui peuvent être séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose. L'une d'elles est présente à l'état de traces, mais l'autre a pu être caractérisée. Son homogénéité à l'électrophorèse de même que son activité spécifique élevée sont de bons arguments pour la considérer comme une protéine hautement purifiée.

Avec un pH optimum d'action très alcalin, cet enzyme catalyse l'hydrolyse de plusieurs esters monophosphoriques et doit de ce fait être classé parmi le groupe des phosphomonoestérases alcalines non spécifiques. En outre, comme beaucoup d'autres enzymes de ce groupe notamment les phosphatases placentaire et intestinale, il est sensible aux ions métalliques, relativement stable à la chaleur, inhibé par la L-phénylalanine, inhibé compétitivement par P_i et arséniate, il catalyse enfin la réaction de transfert de groupes phosphate sur une molécule acceptrice à groupements oxhydriles non substitués. En dépit du caractère de non spécificité, le pyridoxal 5-phosphate n'est que très faiblement hydrolysé dans des conditions de pH et de tampon qui sont optimum pour tous les autres substrats. À l'inverse de nos résultats, SARASWATHI ET BACHHAWAT^{6,7} ont montré que des fractions isolées du cerveau humain et de mouton hydrolysent cet ester phosphorique. Leurs extraits n'étant que partiellement purifiés, il est probable qu'ils contenaient un enzyme spécifique du pyridoxal 5-phosphate. Avec un extrait non purifié, nous avons en effet vérifié que cet ester est effectivement hydrolysé.

D'après nos déterminations sur colonne de Sephadex G-200, nous suggérons un poids moléculaire d'environ 190 000 pour la phosphatase alcaline du cerveau de bœuf. Si cette valeur est comparable à celles proposées par d'autres auteurs pour des phosphatases d'origines diverses^{24,25}, il n'en reste pas moins que les phosphomonoestérases alcalines sont très hétérogènes de ce point de vue^{26,27}. Dans quelques cas, suivant la méthode utilisée, des valeurs différentes ont été proposées pour le même enzyme. HARKNESS²⁸ attribue 125 000 à la phosphatase placentaire humaine, alors que FISHMAN ET GHOSH³⁴ démontrent l'existence de deux espèces: l'une de 70 000 et l'autre supérieure à 200 000.

Il est généralement admis que les phosphatases alcalines des tissus de mammifères hydrolysent le PP_i ^{29,30}. Nos résultats montrent que la phosphatase cérébrale ne fait pas exception. Parce qu'il existe des différences importantes avec l'activité orthophosphatasique (pH optimum d'action et sensibilité aux ions métalliques en particulier), des recherches ont été entreprises pour savoir si ces deux activités doivent être attribuées à un site unique de l'enzyme. EATON ET MOSS³¹ (phosphatase intestinale et du foie humain) ont montré que chaque substrat est inhibiteur compétitif de l'autre et que les valeurs de K_i pour un inhibiteur donné sont indépendantes du type de substrat utilisé. SUSSMAN ET LAGA³² (phosphatase placentaire humaine) ont établi qu'il peut y avoir transfert de groupes phosphates aussi bien à partir du *p*-nitro-phénylphosphate que du PP_i . Nos résultats sur la phosphatase du cerveau de bœuf sont en plein accord avec ces données. En effet, les deux activités nécessitent la présence de Mg^{2+} et de Zn^{2+} et les effets optimum de ces ions sont obtenus à la même concentration pour les deux activités; l'acétylation provoque une modification de l'activité et des constantes cinétiques, qui paraît être de même nature pour les deux activités; les réactifs des -SH enfin, sont sans effet sur les deux activités.

Quant au rôle des ions métalliques, nos résultats sur l'action de l'EDTA suggèrent que Zn^{2+} qui agit à très faibles concentrations peut être impliqué dans la structure même du site actif. En effet, sur l'enzyme traité par le chelateur, Mg^{2+}

seul ne suffit pas à rétablir l'activité. Comme cela a été proposé par BOYER ET HARRISON³³, Mg^{2+} et les autres ions qui se comportent comme lui (Ni^{2+} , Ca^{2+} et Mn^{2+}) seraient des catalyseurs contribuant à neutraliser les charges négatives portées par le substrat, favorisant ainsi l'attaque nucléophile par les ions hydroxyles du milieu. Cela est d'ailleurs en accord avec l'idée selon laquelle l'inhibition de l'hydrolyse du PP_i par excès de Mg^{2+} , résulterait de la formation d'un complexe soluble (jusqu'à 10 mM en Mg^{2+} , au moins) et inhibiteur entre PP_i et Mg^{2+} .

La possibilité de la participation d'un groupe $\epsilon-NH_2$ à la formation du complexe ES , par attraction des charges négatives du substrat, est en accord avec le mécanisme proposé par FISHMAN ET GHOSH³⁴. Par contre, les réactifs spécifiques des $-SH$ n'ayant aucun effet, il convient de considérer qu'il n'y a pas de groupe thiol accessible et essentiel pour l'activité.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grâce à des subventions du C.N.R.S.

Nous remercions vivement les Professeurs E. Kahane et J. Moretti d'avoir bien voulu faire l'analyse critique du manuscrit, Mme A. Vie pour sa collaboration technique et Mr J. C. Tournigant qui a participé à l'une de nos expériences.

RÉSUMÉ

1. La phosphatase alcaline du cerveau de bœuf (monoester orthophosphorique phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) a été purifiée 1840 fois par extraction au butanol, précipitation par l'acétone et le $(NH_4)_2SO_4$, chromatographie sur DEAE-cellulose et gel filtration sur Sephadex G-200. Deux fractions actives ont été distinguées: l'une d'elles représente seulement 2-3% de l'activité totale, l'autre a été isolée, elle est homogène à l'électrophorèse sur acétate de cellulose et sur gel de polyacrylamide.

2. Sur la base du volume d'élution, le poids moléculaire est estimé à 190 000 environ.

3. Cet enzyme est probablement un métalloenzyme à Zn^{2+} , activable par Mg^{2+} . Les monoesters suivants sont hydrolysés: *p*-nitrophénylphosphate, phénylphosphate, β -glycérophosphate, DL-phosphosérine, *O*-phosphoryléthanolamine; les K_m ont été déterminés. Le pyridoxal 5-phosphate n'est que très faiblement hydrolysé. Le pH optimum est 10.2 lorsque le *p*-nitrophénylphosphate est utilisé comme substrat en tampon carbonate.

4. La phosphatase alcaline du cerveau de bœuf hydrolyse le pyrophosphate minéral. L'activité est optimum en tampon Tris-HCl à pH 8.8. Mg^{2+} et substrat en excès sont inhibiteurs.

5. Une étude de l'inhibition des deux activités a permis d'établir quelques différences. L'activité pyrophosphatasique est plus sensible à l'action de l'EDTA et la réactivation par les ions métalliques est plus faible. Nos données confirment cependant des résultats obtenus avec des phosphatases alcalines d'origines diverses localisant les deux activités sur le même site. Le rôle des groupements actifs est discuté.

6. L'activité phosphotransférante a été mise en évidence dans un milieu contenant du *p*-nitrophénylphosphate (donneur) et du Tris ou de l'éthanolamine (accepteur). Le pourcentage de phosphate transféré est égal à 50%.

REFERENCES

- 1 H. D. KAY, *Biochem. J.*, 22 (1928) 855.
- 2 E. J. KING, *Biochem. J.*, 25 (1931) 799.
- 3 M. G. MACFARLANE, L. M. B. PATTERSON ET R. ROBINSON, *Biochem. J.*, 28 (1934) 720.
- 4 M. L. KORNGUTH ET E. A. STUBBS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109 (1965) 104.
- 5 R. K. DATTA ET J. J. GHOSH, *J. Neurochem.*, 11 (1964) 779.
- 6 S. SARASWATHI ET B. K. BACHHAWAT, *J. Neurochem.*, 10 (1963) 127.
- 7 S. SARASWATHI ET B. K. BACHHAWAT, *J. Neurochem.*, 13 (1966) 237.
- 8 S. SARASWATHI ET B. K. BACHHAWAT, *Biochem. J.*, 107 (1968) 185.
- 9 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 10 J. R. WHITAKER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1950.
- 11 J. L. DELSAL ET H. MANHOURI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 1623.
- 12 H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 13 R. K. MORTON, *Biochem. J.*, 57 (1954) 595.
- 14 Z. AHMED ET E. J. KING, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 320.
- 15 R. K. MORTON, *Biochem. J.*, 65 (1957) 674.
- 16 I. MOTZOK, *Biochem. J.*, 72 (1959) 169.
- 17 D. DABICH ET O. W. NEUHAUS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 415.
- 18 D. R. HARKNESS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 513.
- 19 M. LAZDUNSKI, Thèse de doctorat ès-sciences, Marseille, 1964.
- 20 W. H. FISHMAN ET N. K. GHOSH, *Biochem. J.*, 105 (1967) 1163.
- 21 J. DAYAN ET I. B. WILSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 620.
- 22 I. B. WILSON, J. DAYAN ET K. CYR, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 4182.
- 23 R. P. COX ET M. J. GRIFFIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 122 (1967) 552.
- 24 T. E. BARMAN ET H. GUTFREUND, *Biochem. J.*, 101 (1966) 460.
- 25 J. K. SMITH, R. H. EATON, L. G. WHITBY ET D. W. MOSS, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 84.
- 26 L. ENGSTROM, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 36.
- 27 P. J. BUTTERWORTH ET D. W. MOSS, *Enzymologia*, 32 (1967) 269.
- 28 D. R. HARKNESS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 503.
- 29 D. W. MOSS, R. H. EATON, J. K. SMITH ET L. C. WHITBY, *Biochem. J.*, 102 (1967) 53.
- 30 H. N. FERNLEY ET P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 104 (1967) 1011.
- 31 R. H. EATON ET D. W. MOSS, *Biochem. J.*, 102 (1967) 917.
- 32 H. H. SUSSMAN ET E. LAGA, *Biochim. Biophys. Acta*, 151 (1968) 281.
- 33 P. D. BOYER ET W. H. HARRISON, dans W. D. McELROY ET B. GLASS, *The Mechanism of Enzyme Action*, John Hopkins University Press, Baltimore, Md., 1954, p. 666.
- 34 W. H. FISHMAN ET N. K. GHOSH, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 10, Academic Press, New York, 1967, p. 255.