

BBA 66305

PHOSPHATASE ALCALINE DU CERVEAU DE BOEUF

ROLE DU MAGNÉSIUM SUR L'ACTION DE LA L-PHÉNYLALANINE
ET D'AUTRES ACIDES AMINES

CLAUDE BRUNEL ET GUY CATHALA

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

(Reçu le 20 novembre, 1970)

SUMMARY

Beef brain alkaline phosphatase: Role of magnesium on the action of L-phenylalanine and other amino acids

1. Alkaline phosphatase from beef brain (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) is not very sensitive to L-phenylalanine. The stereospecific effect is only 38%, compared to 65% and 90% for the calf intestinal and human placental enzymes, respectively. For all three enzymes, the phenomenon is uncompetitive and not allosteric in nature.

2. At pH < 9.5, in the presence of Mg²⁺, the D-isomer activates the brain phosphatase and has no effect on the two other enzymes. L-Phenylalanine is also an activator with respect to the control and its stereospecific effect is only evident when compared with the D-isomer.

3. This activation is closely related to the activation by Mg²⁺. Both phenomena are pH dependent, practically identical from pH 8.5 to 10.0 and their effect on the enzyme is noncompetitive. Mg²⁺ is a possible site for the binding of L-phenylalanine to the brain enzyme.

4. All the natural α-amino acids have an identical behaviour. The D-isomers produce the same activation as glycine, whereas the effect of L-isomers, themselves activators when compared with the control, is dependent on the molecular weight of the amino acid (alanine, serine have no effect, maximum effect is observed with tryptophan) and on its conformation (the effects are different with leucine, isoleucine, norleucine). For the intestinal and placental phosphatases, only L-phenylalanine and L-tryptophan have an important effect.

5. The mode of action of phenylalanine and the other amino acids capable of causing a stereospecific effect on the brain enzyme seems to be different from the one described previously in the literature for the rat intestinal and human placental alkaline phosphatases. It is suggested that the strong or the weak sensitivity, of these two kinds of enzymes, to Mg²⁺ may be responsible for the observed differences. The role of Mg²⁺ on the reactivity of alkaline phosphatases is also discussed.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de FISHMAN *et al.*^{1,2}, la L-phénylalanine est considérée comme un inhibiteur stéréospécifique des phosphatases alcalines des tissus de mammifères. Certaines de ces enzymes, issues de l'intestin de rat ou de l'intestin et du placenta humains, sont très sensibles à l'inhibiteur alors que beaucoup d'autres réagissent plus faiblement. Cette propriété témoigne d'une spécificité d'organe.

FISHMAN et collaborateurs²⁻⁶ montrent que l'inhibition produite sur les enzymes dites "L-phénylalanine sensibles" est de type incompétitif et résulte de la combinaison stéréospécifique de l'acide aminé avec le complexe de Michaelis (*ES*) ; cette combinaison au centre actif pourrait être un exemple de phénomène homostérique⁷ par opposition au phénomène allostérique dans lequel la molécule produisant la modification se lie sur l'enzyme à un site distinct du site catalytique.

GRIFFIN⁸ suggère au contraire que l'inhibition produite par la L-phénylalanine et le L-tryptophane sur l'enzyme de cellules HeLa humaines pourrait être de type allostérique, puisqu'en présence du L-amino acide, l'enzyme agit plus en tant que pyrophosphatase que comme phosphatase.

FERNLEY ET WALKER⁹ (phosphatase placentaire) apportent des arguments en faveur d'une action de la L-phénylalanine sur la vitesse de déphosphorylation de l'intermédiaire phosphoryl-enzyme plutôt que sur la réactivité du complexe *ES*.

La phosphatase alcaline du cerveau de boeuf, dont nous avons précédemment décrit la purification et les propriétés^{10,11}, appartenant à la catégorie des enzymes peu sensibles à la L-phénylalanine, il nous a paru intéressant de faire une étude cinétique détaillée de sa réactivité. On peut en effet se demander si les différences de sensibilité observées entre l'enzyme du placenta et celle du cerveau par exemple, proviennent seulement d'une variabilité de l'affinité pour la L-phénylalanine, ou bien s'il existe des différences plus fondamentales sur la nature des sites pouvant entraîner des modes d'intervention différents. Les deux types d'enzyme étant très différemment activables par Mg²⁺, le rôle de cet ion ne pourrait-il pas être prépondérant? A titre de comparaison quelques expériences ont été réalisées avec l'enzyme du placenta humain et celle de l'intestin de veau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

La phosphatase alcaline du cerveau de boeuf (monoester orthophosphorique phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) a été préparée comme précédemment décrit¹⁰.

L'enzyme de l'intestin de veau était une préparation du commerce (C. F. Boehringer et Soehne GmbH Mannheim 15436 EPAC; Lot No. 6498213 (juin 1969)). La suspension à 1 mg/ml dans (NH₄)₂SO₄ 2.6 M pH 7.0 était diluée 200 fois avec du tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8.0) et dialysée pendant au moins 48 h avec le même tampon afin d'éliminer Mg²⁺ et Zn²⁺ contenus dans la préparation.

La phosphatase alcaline du placenta humain a été préparée selon la méthode de GHOSH ET FISHMAN¹² ("laboratory-scale method"). Toutefois, le deuxième fractionnement par éthanol (Stade 6 du protocole décrit par ces auteurs) était omis et la fraction la plus active après le premier fractionnement était concentrée, dialysée et

passée à travers une colonne de Sephadex G-200 (85 cm × 2.5 cm) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8.0).

Dans tout ce qui suit, nous désignons ces trois enzymes respectivement par C, I et P.

Tous les réactifs employés étaient des produits de grande pureté.

Essais enzymatiques

Le milieu réactionnel standard contient du borate 25 mM ou du carbonate 50 mM au pH désiré, du *p*-nitrophénylphosphate 5 mM, du MgCl₂ 1 mM et l'acide aminé dont la concentration varie entre 0 et 20 mM. Dans tous les cas, le pH du mélange final est vérifié avant les essais avec un pH-mètre Beckman type recherche. L'écart toléré est de ± 0.02 unité pH. A 2.5 ml du mélange ainsi préparé, préalablement placé à 37°, on ajoute de 5-20 µl de la solution enzymatique, contenant 7-8 unités/ml¹⁰, et on suit la variation d'absorbance à 400 nm avec un spectrophotomètre Unicam SP 800 équipé d'un enregistreur SP 20.

Dans quelques cas, le β -glycérophosphate ou le phénylphosphate sont pris comme substrats à la même concentration que le *p*-nitrophénylphosphate et dans les mêmes conditions expérimentales. Les cinétiques d'hydrolyse sont suivies par le dosage du Pi libéré selon la méthode de DELSAL ET MANHOURI¹³.

Dans leur étude cinétique GHOSH ET FISHMAN³ comparent l'effet produit par l'isomère L de la phénylalanine à un témoin contenant la D-phénylalanine à la même concentration. Ainsi de part et d'autre, les conditions sont identiques à l'exception de la position stérique du radical organique attaché au carbone α . La différence d'activité entre les deux isomères est appelée "inhibition stéréospécifique" et le degré d'inhibition est défini par le rapport [(D-L)/D] × 100, où D est l'activité en présence de D-phénylalanine et L l'activité en présence de L-phénylalanine à la même concentration.

Dans ce qui suit, nous raisonnons de la même façon mais nous appelons la différence D-L: "effet stéréospécifique".

RÉSULTATS

pH optimum, effet stéréospécifique, pH de l'effet stéréospécifique maximum, effet de Mg²⁺

Les résultats présentés dans le Tableau I concernent l'hydrolyse du *p*-nitro-

TABLEAU I

INFLUENCE DES IONS Mg²⁺ SUR L'ACTIVITÉ DES TROIS ENZYME

| Enzyme | pH optimum | | pH optimum avec D-phénylalanine | | pH optimum avec L-phénylalanine | | pH de l'effet D - L maximum | | $\frac{D - L}{D} \times 100$ en tampon carbonate au pH de l'effet D - L maximum |
|----------|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|---|
| | - Mg ²⁺ | + Mg ²⁺ | - Mg ²⁺ | + Mg ²⁺ | - Mg ²⁺ | + Mg ²⁺ | - Mg ²⁺ | + Mg ²⁺ | |
| Cerveau | 10.7 | 10.1 | 10.6 | 10.1 | 10.7 | 10.25 | — | 9.1 | — 38 |
| Intestin | 9.7 | 9.8 | 9.8 | 9.85 | 10.05 | 10.1 | 8.8 | 8.7 | 66 63 |
| Placenta | 10.3 | 10.5 | 10.45 | 10.5 | 11 | 11.2 | 9.4 | 9.1 | 93 93 |

phénylphosphate par les trois enzymes dans les conditions standard (carbonate 50 mM avec ou sans Mg²⁺ 1 mM, D- ou L-phénylalanine 20 mM). Par rapport à la phosphatase P, très sensible à l'action de la L-phénylalanine, la phosphatase C est peu sensible, alors que l'enzyme I a une sensibilité intermédiaire. Dans les trois cas, le pH de l'effet maximum observé est indirectement lié au pH optimum d'activité; il correspond sensiblement à une diminution de 1 unité pH. Comme le signalent GHOSH ET FISHMAN³, les pH optimum en présence de L-phénylalanine sont déplacés vers les pH alcalins et ceci d'autant plus que la L-phénylalanine a plus d'effet.

L'introduction de Mg²⁺ dans le milieu réactionnel influence assez peu l'activité des enzymes P (facteur d'activation = 1.2-1.5 au pH optimum) et I (1.5-2). L'enzyme C est par contre très activable, de 5-14 fois suivant le degré de purification. Toutes les préparations utilisées dans cette étude avaient un facteur d'activation supérieur à 10 fois.

Contrairement aux enzymes P et I, le pH optimum de l'enzyme C est considérablement diminué en présence de Mg²⁺ indépendamment de la présence ou de l'absence de phénylalanine. Les deux isomères optiques ne paraissent pas avoir d'effet significatif sur l'enzyme C, lorsque le milieu réactionnel ne contient pas Mg²⁺.

Influence de la concentration en phénylalanine sur l'activité des trois enzymes

Les Courbes a, a', b, b', c, c' (Fig. 1) montrent l'effet des deux isomères sur les enzymes C, I et P en tampon borate (pH 9.0) contenant Mg²⁺ 1 mM. Dans le cas de P, les courbes confirment les résultats de GHOSH ET FISHMAN³, c'est-à-dire un effet négligeable de l'isomère D et un effet inhibiteur suivant une courbe exponentielle de l'isomère L. Sur I, la D-phénylalanine est très légèrement inhibitrice à forte concentration. Sur C, on remarque une activation considérable produite par les deux isomères avec cependant un effet moindre de la L-phénylalanine. Le degré d'activation par l'isomère D (défini par $\{(D-T)/T\} \times 100$ où T est l'activité d'un témoin sans acide aminé) a une valeur moyenne de 70%; jusqu'à 120% dans quelques cas à pH 8.5. La différence des ordonnées des courbes D et L représente l'effet stéréospécifique dont la valeur atteint 38% pour une concentration en phénylalanine 20 mM.

On peut aussi remarquer que le degré d'effet stéréospécifique pour I et P en tampon borate (pH 9.0) est un peu plus faible que celui obtenu en tampon carbonate au pH de l'effet maximum (Tableau I).

Le β -glycérophosphate ou le phénylphosphate, dans les mêmes conditions de tampon et de pH, donnent les mêmes résultats. La valeur moyenne de l'activation par l'isomère D sur l'enzyme C est de 70%, l'effet stéréospécifique est de 32% pour le β -glycérophosphate et de 36% pour le phénylphosphate.

Influence du tampon

La comparaison des courbes obtenues en tampon carbonate à pH 9.0 (Fig. 2, a et a') à celles obtenues en tampon borate au même pH (Fig. 1, a et a') montre que l'activation est plus faible. Celle-ci est maximum pour 4 mM de D-phénylalanine et 2 mM de L-phénylalanine, puis l'activité diminue lorsque la concentration en effecteur augmente; à 20 mM l'isomère D est inhibiteur par rapport au témoin sans acide aminé. Le borate est donc un meilleur milieu d'étude que le carbonate. A pH 8.5 on observe une activation maximum pour D-phénylalanine 6 mM, qui reste inchangée

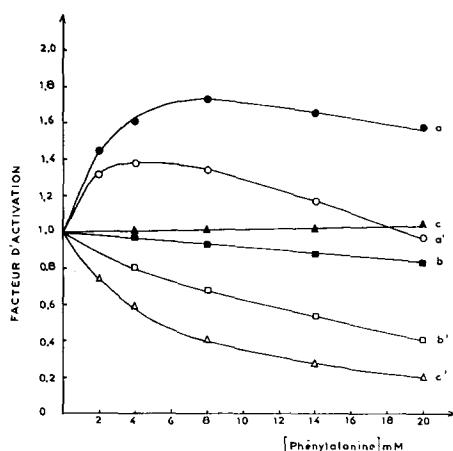


Fig. 1. Action des deux isomères optiques de la phénylalanine sur les trois enzymes. Tampon borate 25 mM, pH 9.0, *p*-nitrophénylephosphate 5 mM, Mg^{2+} 1 mM. La concentration en acide aminé D ou L varie de 0 à 20 mM. a (●—●), D-phénylalanine, enzyme C; a' (○—○), L-phénylalanine, enzyme C. b (■—■), D-phénylalanine, enzyme I; b' (□—□), L-phénylalanine, enzyme I. c (▲—▲), D-phénylalanine, enzyme P; c' (△—△), L-phénylalanine, enzyme P.

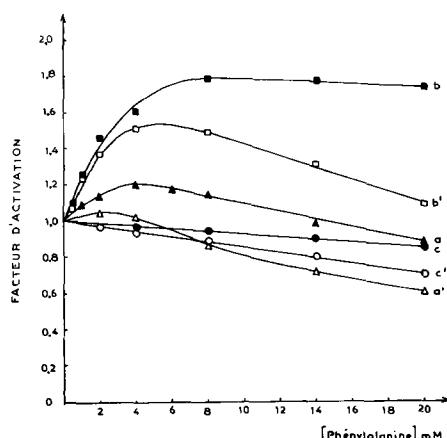


Fig. 2. Action des deux isomères optiques de la phénylalanine sur l'enzyme C dans des conditions diverses. a (▲—▲), D-phénylalanine, a' (△—△) L-phénylalanine: tampon carbonate 50 mM, pH 9.0, *p*-nitrophénylephosphate 5 mM, Mg^{2+} 1 mM. La concentration en acide aminé D ou L varie de 0 à 20 mM. b (■—■) D-phénylalanine, b' (□—□) L-phénylalanine: tampon borate 25 mM, pH 8.5, *p*-nitrophénylephosphate 5 mM, Mg^{2+} 1 mM. La concentration en acide aminé D ou L varie de 0 à 20 mM. c (●—●) D-phénylalanine, c' (○—○) L-phénylalanine: mêmes conditions que ci-dessus à pH 10.1.

jusqu'à 20 mM au moins. L'effet stéréospécifique ne varie pratiquement pas entre pH 8.5 et 9.0.

N.B. Le résultat que nous avancions précédemment¹⁰ à propos de l'effet de la L-phénylalanine sur l'enzyme C en tampon carbonate, et qui ne tenait pas compte de l'effet de l'isomère D était entaché d'une erreur due à un effet du tampon.

Influence du pH sur l'activation

Les Courbes b, b' et c, c' (Fig. 2) montrent les effets obtenus à pH 8.5 et 10.1. A pH 10.1, là où l'activité enzymatique est maximum, il n'y a plus d'activation par la D-phénylalanine ni par la L; on note même une légère inhibition par la D par rapport au témoin. L'effet stéréospécifique est aussi beaucoup plus faible.

Les courbes représentant l'effet des deux isomères sur l'activité en fonction du pH (Fig. 3, a) montrent un point d'inflexion à pH 9.2. Ce *pK* peut être attribué soit à la phénylalanine soit à un groupe ionisable de l'enzyme.

Influence de Mg^{2+} sur l'activation de l'enzyme C et sur l'effet stéréospécifique

Nous avons déjà noté que la différence D—L sur l'enzyme C en l'absence de Mg^{2+} ne paraît pas significative. De même, il n'y a pas d'activation par les D- et L-phénylalanine sans Mg^{2+} , que l'enzyme ait été préincubée ou non avec l'acide aminé. A pH 8.5 et pour Mg^{2+} 1 mM, l'activation en présence de D-phénylalanine est voisine de 70%; elle reste inchangée jusqu'à Mg^{2+} 20 mM.

L'enzyme, préincubée à 4° pendant 1 h avec Mg^{2+} 20 mM en tampon Tris-HCl ou borate (pH 8.0), est plus active à pH 8.5 que l'enzyme témoin non incubée mais testée avec Mg^{2+} 1 mM; le degré atteint, est légèrement supérieur à celui obtenu avec D-phénylalanine + Mg^{2+} 1 mM ou 20 mM ajoutés au milieu réactionnel. Cette préactivation de l'enzyme par Mg^{2+} dépend de la concentration de l'ion activateur et de la température du mélange incubant. L'effet maximum peut être obtenu avec Mg^{2+} 1 mM à 37° après 5 min d'incubation. L'enzyme ainsi modifiée conserve l'activité

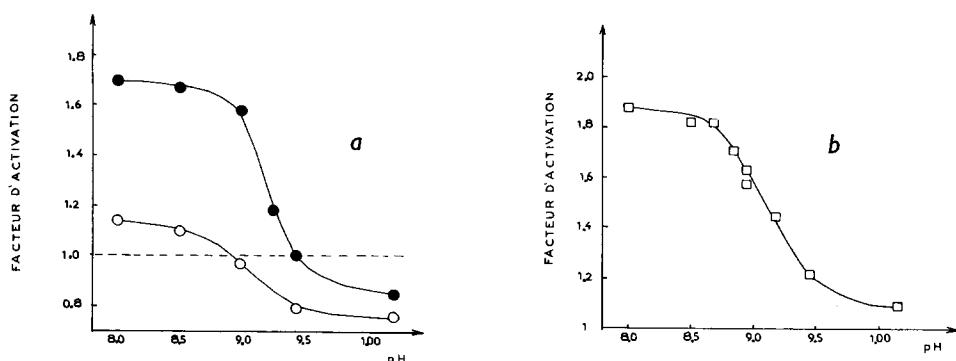


Fig. 3. (a) Activation par D-phénylalanine (●—●) et L-phénylalanine (○—○) en fonction du pH: tampon borate 25 mM au pH choisi, *p*-nitrophénolphosphate 5 mM, Mg^{2+} 1 mM, phénylalanine D ou L 20 mM. (b) Activation par Mg^{2+} incubant en fonction du pH. L'enzyme est incubée à pH 8.0 comme indiqué dans le texte: tampon borate 25 mM au pH choisi, *p*-nitrophénolphosphate 5 mM, Mg^{2+} 1 mM.

acquise, même lorsqu'elle est diluée dans le milieu réactionnel ne contenant pas Mg^{2+} . La quantité d'ion nécessaire pour maintenir l'activité maximum est donc très faible. Une dialyse prolongée à pH 8.0 permet toutefois d'éliminer Mg^{2+} fixé sur l'enzyme.

En fonction du pH (Fig. 3, b) la courbe d'activation par Mg^{2+} incubant a la même allure que celles obtenues avec addition de D- ou L-phénylalanine, ce qui prouve que le phénomène d'activation par la D-phénylalanine représente bien une action de l'acide aminé favorisant la fixation de Mg^{2+} sur l'enzyme et ne pouvant avoir lieu qu'en présence du substrat. Tout semble se passer comme si le substrat s'opposait à la fixation de Mg^{2+} , alors que celle-ci serait possible en présence de phénylalanine.

Le point d'inflexion à pH 9.2 paraît bien correspondre au pK d'un groupe ionisable de l'enzyme.

La phénylalanine n'est plus activatrice lorsque l'enzyme a été préincubée avec Mg^{2+} ; les courbes deviennent comparables à celles que l'on obtient avec les enzymes I et P (Fig. 1, b, b' et c, c'), avec un effet stéréospécifique toujours égal à 38%. Cela n'exclut pourtant pas l'intervention de l'acide aminé au niveau de Mg^{2+} préfixé sur l'enzyme puisqu'en l'absence totale de cet ion l'effet D-L n'est pas significatif. Il est probable que la structure de l'enzyme sans Mg^{2+} est peu propice à la fixation de l'acide aminé comme elle est peu propice pour produire l'hydrolyse.

Mg^{2+} paraît donc être directement responsable de l'activation de l'enzyme C et indirectement de l'effet stéréospécifique en rendant possible la fixation de l'isomère L, ce qui ne peut être le cas des enzymes P et I pour lesquelles le phénomène est

TABLEAU II

CONSTANTES DE MICHAELIS DE L'ENZYME C EN L'ABSENCE ET EN PRÉSENCE D'EFFECTEURS

A pH 8.5 (tampon borate) la concentration en substrat (*p*-nitrophénylphosphate) varie de 0.15 à 1 mM; à pH 9.1 (tampon carbonate) de 0.05 à 0.625 mM; à pH 10.1 (tampon carbonate) de 0.5 à 5 mM. Les valeurs représentent la moyenne de plusieurs déterminations.

| Effecteur ajouté (20 mM) | K_m (mM) | | |
|--|-------------|--------|---------|
| | pH 8.5 | pH 9.1 | pH 10.1 |
| O | 0.17 | 0.08 | 1.54 |
| D-Phe | 0.17 | 0.08 | 1.38 |
| L-Phe | 0.11 | 0.05 | 1.04 |
| D-Leu | 0.17 | | |
| L-Leu | 0.09 | | |
| D-Trp | 0.17 | | |
| L-Trp | 0.09 | | |
| Mg ²⁺ incubant | 0.17 | | |
| Concentration en substrat (mM) pour obtenir effet D — L maximum par phénylalanine | ≈ 1 | 0.1 | 4 |

indépendant de la présence ou de l'absence de Mg²⁺. Ainsi, par leur sensibilité au Mg²⁺ les deux types d'enzyme apparaissent comme pouvant être, de manière qualitative, différemment sensibles à la L-phénylalanine.

Nature de l'effet stéréospécifique sur l'enzyme C; action des deux isomères de la phénylalanine et de Mg²⁺ sur K_m

Nos résultats sur les caractères cinétiques de l'effet stéréospécifique confirment les résultats de GHOSH ET FISHMAN³⁻⁶, la seule différence apparente n'étant en fin de compte qu'une valeur plus faible de la différence D—L.

L'effet stéréospécifique dépend de la concentration du substrat (mais pas de

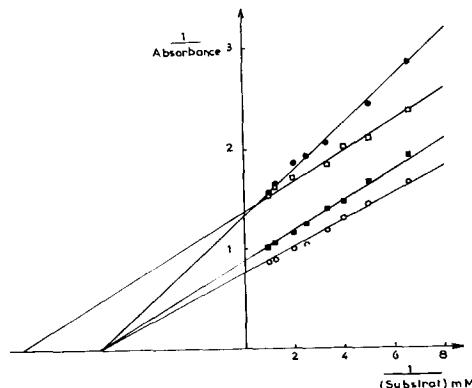


Fig. 4. K_m à pH 8.5. ●—●, enzyme témoin; ○—○, enzyme incubée avec Mg²⁺; ■—■, enzyme témoin + D-phénylalanine 20 mM; □—□, enzyme témoin + L-phénylalanine 20 mM. Conditions des tests: cf. Tableau III.

sa nature), du pH, présente les caractères d'une action du type incompétitif (Tableau II et Fig. 4) et ne peut pas représenter un phénomène allostérique. En effet, (a) aucune sigmoïdité n'apparaît dans les courbes reliant les activités à la concentration du substrat et de l'effecteur; (b) en coordonnées de Hill, les courbes $\log \{(D-L)/L\}/\log [L\text{-phénylalanine}]$ et $\log \{v/(v_{\max}-v)\}/\log [\text{substrat}]$ ont une pente dont la valeur est toujours sensiblement égale à 1 quels que soient le pH et la concentration du substrat (Tableau III).

TABLEAU III

COEFFICIENTS D'INTERACTION POUR L'EFFECTEUR ET LE SUBSTRAT

Effecteur désigne l'effet stéréospécifique $D - L$. Les tests sont réalisés en tampon borate 25 mM, Mg^{2+} 1 mM. Pour n l'effecteur variant de 0 à 20 mM, le substrat (ρ -nitrophénylphosphate) est 5 mM. Pour n' l'effecteur est 0 ou 20 mM, le substrat variant de 0.15 à 1 mM.

| Enzyme | Coefficient d'interaction pour l'effecteur : n à plusieurs pH | | | | | Coefficient d'interaction pour le substrat : n' à pH 8.5 | | |
|----------|---|-----|------|-----|------|--|-------------|-------------|
| | 8.0 | 8.5 | 9.0 | 9.5 | 10.0 | 0 | +D-Phe | +L-Phe |
| Cerveau | 0.97 | 1 | 0.82 | 1 | 1.05 | ≈ 1 | ≈ 1 | ≈ 1 |
| Intestin | — | — | 1 | — | — | — | — | — |
| Placenta | — | — | 1 | — | — | — | — | — |

Les résultats expérimentaux sont identifiables à quelques uns des cas envisagés par FRIEDEN¹⁴.

Le cas général est représenté par le mécanisme suivant:



où E est l'enzyme, S le substrat, M l'effecteur.

Pour interpréter le phénomène d'effet stéréospécifique, nous supposons que E' représente l'enzyme activable par le complexe $Mg^{2+} + D\text{-acide aminé}$. Dans ces conditions M désigne la différence $D - L$. Les courbes parallèles $(1/v) = f(1/[S])$ en présence de D - et de L -phénylalanine illustrent deux cas signalés par FRIEDEN (a) "Cas limitant 3" dans lequel $k_6 = 0$ et $K_2 = \infty$ et où K_m doit toujours diminuer lorsque la concentration de l'effecteur augmente. C'est effectivement ce que l'on observe. (b) "Cas non limitant 1" dans lequel $K_2/K_3 = k_5/k_6$. Le fait que l'activité en présence de L -phénylalanine soit toujours plus faible que l'activité en présence de D -phénylalanine implique $k_6 < k_5$ donc $K_2 > K_3$. Le rapport calculé K_3/K_2 est effectivement inférieur à 1. Ce raisonnement ne permet donc pas de choisir entre les deux solutions, mais le fait que l'enzyme modifiée EMg^{2+} L -phénylalanine (activation par L -phénylalanine) soit dans certaines conditions plus active que E ou EMg^{2+} (enzyme + Mg^{2+})

incorporé au milieu réactionnel) suggère que k_6 ne peut pas être égal à zéro. La deuxième solution rend aussi mieux compte d'un effet stéréospécifique relativement faible résultant seulement d'un empêchement stérique par le radical organique attaché au carbone α de l'acide aminé.

La D-phénylalanine ajoutée au milieu de test, soit $Mg^{2+} + \text{acide aminé}$, et Mg^{2+} incubant produisent sur l'enzyme un effet activateur de type non compétitif ce qui est en accord avec une action de la phénylalanine par l'intermédiaire de Mg^{2+} . Le cas "non limitant 3 A" de FRIEDEN où $K_2/K_3 > k_5/k_6$ avec $K_2 = K_3$ est représentatif de cet état. K_m ne variant pas, on a en effet $K_3/K_2 = 1$ donc $K_2 = K_3$ ou $k_5 > k_6$.

Étant donné la très faible activité de l'enzyme sans Mg^{2+} , on peut à la limite négliger cette activité et supposer que la seule enzyme vraiment active est l'enzyme modifiée par Mg^{2+} . C'est alors le cas "limitant 1 a" de FRIEDEN dans lequel $k_5 = 0$. Là encore K_m ne variant pas lorsque la concentration en Mg^{2+} augmente, on a le rapport $K_3/K_2 = 1$.

Action de quelques autres acides aminés à pH 8.5

Tous les α -D-aminoacides produisent une activation de l'enzyme C comparable à celle obtenue avec D-phénylalanine. Les isomères L sont aussi activateurs. La β -alanine a un effet presque nul; les acides aminés substitués ont un effet nul ou faible (Tableau IV).

TABLEAU IV

ACTIVATION DE L'ENZYME C PAR QUELQUES DÉRIVÉS DES ACIDES AMINÉS À pH 8.5

Les mesures ont été faites sur une solution enzymatique dont le degré d'activation par Mg^{2+} incubant dépassait 100%. Concn. acide aminé — 10 mM.

| | <i>Ala</i> | <i>β-Ala</i> | <i>Gly</i> | <i>Glycine éthyl ester</i> | <i>Sarcosine</i> | <i>Diméthyl- glycine</i> | <i>Bétaine</i> |
|-----------------------|------------|-------------------------------|------------|------------------------------------|------------------|------------------------------|----------------|
| % Activation enzyme C | 117 | 5 | 117 | 67 | 36 | 36 | 10 |

La glycine produit l'activation maximum et tous les isomères D produisent un effet égal. L'effet stéréospécifique dépend du poids moléculaire des acides aminés considérés (Fig. 5). Pour ceux dont le poids moléculaire est faible (alanine, serine), il n'y a pas d'effet D—L. Pour leucine, lysine, arginine et tryptophane, l'effet atteint ou dépasse 50% (les valeurs des K_m en présence des L-leucine et L-tryptophane sont données dans le Tableau II). Ils produisent donc un effet plus grand que la L-phénylalanine. Les L-diacides et leurs amides ont un effet faible (acide glutamique, glutamine) ou nul (acide aspartique, asparagine). La conformation est importante: leucine, isoleucine et norleucine ont des effets différents.

L'effet stéréospécifique incompletif sur l'enzyme C n'est donc pas spécifique de la phénylalanine, alors que sur I et surtout sur P, seuls la L-phénylalanine, le L-tryptophane et à un degré moindre la L-leucine produisent un effet considérable (Tableau V). Cela est encore en faveur d'une action qualitativement différente de l'acide aminé sur les deux types d'enzyme.

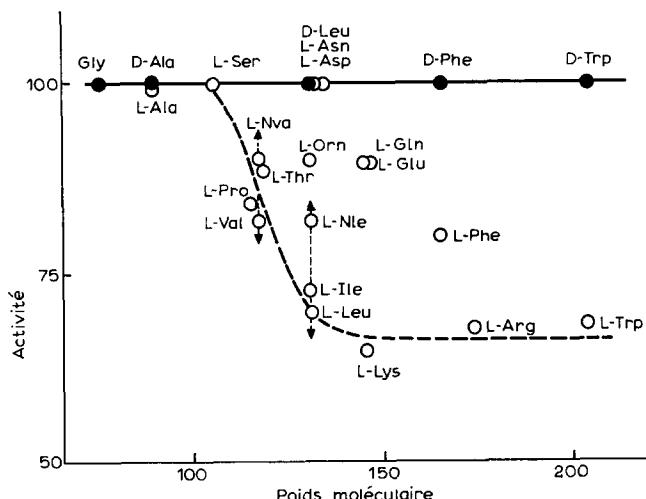


Fig. 5. Action des acides aminés à pH 8.5 en fonction de leur poids moléculaire. Tests: conditions habituelles en tampon borate 25 mM, concn. acide aminé = 10 mM. On donne la valeur 100 à l'activité en présence de glycine; dans ces conditions l'activité de l'enzyme témoin sans acide aminé a la valeur 46.

DISCUSSION

Des préparations de phosphatase alcaline provenant de deux espèces ont été considérées: bovine (cerveau, intestin), humaine (placenta), alors que jusque là seules les enzymes du rat (intestin) et humaines (intestin, placenta) avaient fait l'objet d'études cinétiques détaillées. L'enzyme du cerveau de boeuf se distingue des autres par un effet activateur des deux isomères optiques de la phénylalanine et d'autres acides aminés et par un effet stéréospécifique bien plus faible.

L'activation observée en présence de Mg^{2+} et du substrat paraît être sans rapport avec le résultat rapporté par FISHMAN ET GHOSH⁴ sur la phosphatase intestinale du rat qui peut dans quelques cas être activée par la D-phénylalanine de manière compétitive ("cas limitant 3 D" de FRIEDEN¹⁴). Cette activation intervenant notamment après modification de l'enzyme par acétylation ou traitement par des réactifs de $-SH$, les auteurs suggèrent que toute phosphatase alcaline susceptible d'être

TABLEAU V

EFFET STÉRÉOSPÉCIFIQUE INCOMPÉTITIF SUR LES TROIS ENZYME À pH 8.5
Les chiffres représentent la moyenne de plusieurs déterminations. Concn. acide aminé = 10 mM.

| Origine des enzymes | D — L — X 100 | | | | | |
|------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | D | L-Phe | L-Trp | L-Leu | L-Lys | L-Arg |
| Cerveau | 20 | 31 | 30 | 35 | 32 | |
| Intestin | 35 | 50 | 20 | 2 | 0 | |
| Placenta | 65 | 65 | 40 | 0 | 0 | |

activée par la D-phénylalanine ne peut représenter qu'une protéine modifiée et non une enzyme native. Il ne peut s'agir non plus d'un phénomène consécutif à une dénaturation de l'enzyme puisqu'il n'a pas été constaté de diminution d'activité spécifique après une longue conservation des préparations ou après dialyse prolongée.

Le mode de fixation de la phénylalanine et de tous les autres acides aminés susceptibles ou non de produire un effet stéréospécifique incomplet pourrait donc être différent de celui qui est décrit par FISHMAN ET GHOSH⁵. Ces auteurs pensent que la phénylalanine intervient sur un site métal de l'enzyme qui paraît être Zn²⁺ d'après leurs propres travaux et aussi ceux de HARKNESS¹⁶. Dans le cas de l'enzyme du cerveau, nous avons montré que Mg²⁺ paraît essentiel, bien qu'il ne soit pas absolument prouvé que Zn²⁺ ne participe pas à la formation du complexe (la présence d'un Zn²⁺ au site actif est généralement admise pour toute phosphatase alcaline). L'absence de spécificité de cette enzyme pour la phénylalanine ou le tryptophane, contrairement aux enzymes du placenta et de l'intestin de veau, et l'activation produite par tous les α -amino acides, sont aussi des arguments en faveur d'un mode d'action qualitativement différent.

Il est possible que d'autres phosphatasées alcalines se comportent comme celle du cerveau de boeuf et que l'effet stéréospécifique produit dépende de leur sensibilité au Mg²⁺. En 1963, FISHMAN *et al.*¹ remarquaient déjà que la phosphatase alcaline de l'intestin humain, moins activable par Mg²⁺ que l'enzyme de l'intestin de rat, est plus fortement affectée par la L-phénylalanine. Les enzymes de l'os, du poumon et du foie sont activables par Mg²⁺ (voir ref. 2) et peu sensibles à la L-phénylalanine¹. Il en est de même pour l'enzyme du rein qui est très activable par Mg²⁺, de l'ordre de 9 fois selon BUTTERWORTH¹⁶.

Sur le rôle de Mg²⁺, l'hypothèse la plus souvent avancée est que cet ion est nécessaire comme entité catalytique^{17,18}. Cependant, sur l'enzyme du cerveau le fait qu'il agisse par préincubation avec l'enzyme et que l'activation soit de type non compétitif, implique aussi une action directe sur l'enzyme. L'effet de Mg²⁺ pourrait être analogue à celui qui a été mis en évidence sur la phosphoglucomutase¹⁹⁻²¹ sur laquelle il agit à la fois comme entité catalytique et comme effecteur de la structure tertiaire du centre actif. Etant donné les différences de sensibilité des phosphatasées alcalines au Mg²⁺ il est concevable que, dans le cas d'une activation considérable (cerveau), Mg²⁺ confère à l'enzyme une structure déterminante pour son activité et sa sensibilité aux acides aminés. Dans le cas d'une activation plus faible (placenta), il est possible que le Zn²⁺ soit suffisant pour maintenir l'enzyme dans un état actif, ou que l'arrangement des groupes du centre actif soit tel que l'enzyme se trouve déjà dans un état actif et sensible à la L-phénylalanine. Quelques observations peuvent permettre de corroborer cette hypothèse. Sur la phosphatase placentaire HARKNESS¹⁵ démontre que l'enzyme après désactivation par dialyse contre EDTA peut être réactivée par addition de Zn²⁺. Sur l'enzyme du cerveau, Zn²⁺ seul ne permet aucune récupération, même partielle, de l'activité. Il faut ajouter dans l'ordre Zn²⁺ et Mg²⁺ (voir ref. 10). CLARK ET PORTEOUS¹⁸ (phosphatase intestinale de lapin), BELLAMIE²² et J. ATTIAS ET S. BELAMIE (résultats non publiés) (phosphatase intestinale de veau) aboutissent à une conclusion similaire à cette différence près que Zn²⁺ seul permet une récupération partielle de l'activité de l'ordre de 30%.

Des travaux ayant pour but de préciser le rôle des ions métalliques bivalents dans l'action des phosphatasées alcalines sont en cours dans ce laboratoire.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de subventions du Centre national de la recherche scientifique.

Les auteurs remercient vivement Mr. le Professeur E. Kahane et le Docteur J. Attias pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à ce travail, Mme A. Vié pour sa collaboration technique et Mr. P. Guiraud qui a préparé, au laboratoire, la phosphatase alcaline du placenta humain.

RÉSUMÉ

1. La phosphatase alcaline cérébrale (monoester orthophosphorique phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) est peu sensible à la L-phénylalanine. L'effet stéréospécifique est seulement de 38% alors que les phosphatases alcalines de l'intestin de veau et du placenta humain sont affectées à 65% et 90%. Pour les trois enzymes, le phénomène est incompétitif non allostérique.

2. A pH < 9.5 en présence de Mg²⁺, l'isomère D a un effet activateur sur l'enzyme du cerveau qui n'apparaît pas sur les deux autres enzymes. La L-phénylalanine est aussi activatrice par rapport au témoin et, son effet stéréospécifique n'est évident que par comparaison avec l'isomère D.

3. L'activation est liée à l'effet activateur du Mg²⁺. Les deux phénomènes sont en effet dépendants du pH, pratiquement superposables de pH 8.5 à 10.0 et de type non compétitif. Mg²⁺ apparaît comme étant un site possible pour la fixation de la L-phénylalanine sur l'enzyme du cerveau.

4. Tous les acides α aminés naturels ont un comportement identique. Les isomères D produisent la même activation que la glycine, tandis que l'effet stéréospécifique des isomères L, eux-mêmes activateurs par rapport au témoin, dépend de leur poids moléculaire (effet nul pour alanine, serine; maximum pour tryptophane) et de leur conformation (effet différent entre leucine, isoleucine, norleucine). Sur les phosphatases intestinale et placentaire, seuls ont un effet important la L-phénylalanine et le L-tryptophane.

5. Le mode d'action de la phénylalanine et des acides aminés susceptibles de produire un effet stéréospécifique sur l'enzyme du cerveau paraît donc différent de celui déjà décrit dans la littérature à propos de la phosphatase intestinale du rat et du placenta humain. Il est suggéré que la forte ou la faible sensibilité au Mg²⁺ de ces deux types d'enzyme est responsable des différences observées. Le rôle de Mg²⁺ sur la réactivité des phosphatases alcalines est également discuté.

REFERENCES

- 1 W. H. FISHMAN, S. GREEN ET N. I. INGLIS, *Nature*, 198 (1963) 685.
- 2 W. H. FISHMAN, S. GREEN ET N. I. INGLIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 62 (1962) 363.
- 3 N. K. GHOSH ET W. H. FISHMAN, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2516.
- 4 W. H. FISHMAN ET N. K. GHOSH, *Biochem. J.*, 105 (1967) 1163.
- 5 W. H. FISHMAN ET N. K. GHOSH, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 10, Academic Press, New York, 1967, p. 255.
- 6 N. K. GHOSH ET W. H. FISHMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 700.
- 7 W. D. McELROY, M. DE LUCA ET J. TRAVIS, *Science*, 157 (1967) 150.
- 8 M. J. GRIFFIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 132 (1969) 299.
- 9 H. N. FERNLEY ET P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 116 (1970) 543.

- 10 C. BRUNEL, G. CATHALA ET M. SAINTOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 191 (1969) 621.
- 11 C. BRUNEL ET G. CATHALA, *FEBS Letters*, 6 (1970) 262.
- 12 N. K. GHOSH ET W. H. FISHMAN, *Biochem. J.*, 108 (1968) 779.
- 13 J. L. DELSAL ET H. MANHOURI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 1623.
- 14 C. FRIEDEN, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 3522.
- 15 D. R. HARKNESS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 (1968) 513.
- 16 P. J. BUTTERWORTH, *Biochem. J.*, 107 (1968) 467.
- 17 D. DABICH ET O. W. NEUHAUS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 415.
- 18 B. CLARK ET J. W. PORTEOUS, *Biochem. J.*, 95 (1965) 475.
- 19 W. J. RAY, JR., *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3740.
- 20 E. J. PECK, JR. ET W. J. RAY, JR., *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3748.
- 21 E. J. PECK, JR. ET W. J. RAY, JR., *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3754.
- 22 S. BELAMIE, Thèse de spécialité, Montpellier, 1970.

Biochim. Biophys. Acta, 235 (1971) 106-118