

BBA 66928

L'ACTIVITÉ PYROPHOSPHATASIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU CERVEAU

GUY CATHALA ET CLAUDE BRUNEL

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Université des Sciences et Techniques du
Languedoc, 34060 Montpellier Cedex (France)*

(Reçu le 2 février, 1973)

SUMMARY

Inorganic pyrophosphatase activity of bovine brain alkaline phosphatase

1. The pyrophosphatase activity of alkaline phosphatase from bovine brain depends on Mg^{2+} bound to the enzyme, rather than on the formation of the complex ion, $MgP_2O_7^{2-}$. Indeed, the Mg^{2+} -enzyme (the enzyme preincubated with Mg^{2+}) hydrolyses the Mg^{2+} -free pyrophosphate and its activity reaches a maximum value without Mg^{2+} added to the assay medium. The Mg^{2+} -free enzyme hydrolyses the $MgP_2O_7^{2-}$ complex, but a weaker activity is observed. Its activity towards $P_2O_7^{4-}$ only reaches 1–5% of the value obtained with the Mg^{2+} -enzyme.

2. When present at relatively high concentration, $MgP_2O_7^{2-}$ is not hydrolyzed, but is able to activate the rate of *p*-nitrophenyl phosphate hydrolysis at pH 8.5, indicating that by its binding, $MgP_2O_7^{2-}$ has the same activating effect as Mg^{2+} .

3. Among divalent metal ions which can bind to the enzyme, Mg^{2+} is the most effective in inducing the pyrophosphatase activity. Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and particularly Zn^{2+} have weaker effects.

4. It is concluded that the true substrate of the pyrophosphatase activity of alkaline phosphatases is $P_2O_7^{4-}$, which behaves like a phosphomonoester.

INTRODUCTION

Les phosphatases alcalines (monoester orthophosphorique phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) issues d'organes divers hydrolysent le pyrophosphate inorganique^{1–7}. S'il est bien connu que l'activité pyrophosphatasique se caractérise par un pH optimum plus faible (pH 8.8) que celui que l'on observe généralement pour les phosphomonoesters (de 9.5 à 10.5 suivant l'enzyme et le produit considéré), et surtout par l'effet que produit Mg^{2+} qui n'est activateur qu'à faible concentration, la forme sous laquelle le pyrophosphate est préférentiellement hydrolysé est encore l'objet de résultats contradictoires bien que plusieurs auteurs^{5,7} s'accordent à penser que la forme complexée $MgP_2O_7^{2-}$ est plus réactive que la forme libre. Disons qu'il s'agit là d'une conception conforme aux conclusions sur les pyrophosphatases spécifiques qui n'hydrolysent

que l'ion complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$, car à moins d'imaginer que l'enzyme peut agir selon deux mécanismes distincts, il paraît a priori discutable d'attribuer à la formation de l'ion complexe un rôle déterminant. On sait en effet que c'est le même site qui est responsable des activités monophosphoestérasique et pyrophosphatasique^{3,4} et il n'existe pas de cas où l'on ait clairement démontré que Mg^{2+} agit au niveau du substrat si celui-ci est un ester orthophosphorique. On pourrait ajouter à cela que si toutes les phosphatases alcalines paraissent être douées d'activité pyrophosphatasique elles sont en général diversement activées par Mg^{2+} , indépendamment de la nature du substrat, suivant leur origine et leur degré de pureté.

Dans un article consacré à l'étude du processus d'activation de la phosphatase alcaline du cerveau par Mg^{2+} (ref. 8), nous avons montré que l'ion métallique se lie réversiblement à l'enzyme et suggéré qu'il s'en suit un changement conformationnel qui conférerait à l'enzyme une structure particulièrement propice à l'activité hydrolytique, rendant ainsi compte de la forte activation constatée (5-14 fois si le substrat est un ester orthophosphorique). Si nous n'excluons pas pour l'ion métallique lié la possibilité d'avoir un rôle catalytique direct qui pourrait être de favoriser la rupture du complexe intermédiaire phosphorylenzyme, nous considérons par contre qu'une action nécessaire sur la molécule de substrat n'est pas concevable. On devrait donc logiquement s'attendre à une conclusion semblable en ce qui concerne l'activité pyrophosphatasique.

Les résultats auxquels nous aboutissons tendent effectivement à montrer que l'activité pyrophosphatasique de la phosphatase alcaline de cerveau de boeuf dépend, comme l'activité monophosphoestérasique, de Mg^{2+} lié à l'enzyme plutôt que de la formation préalable du complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$.

MATÉRIEL

La phosphatase alcaline du cerveau de boeuf a été préparée comme précédemment décrit⁹. L'extrait utilisé avait une activité spécifique supérieure à 400 μmoles de *p*-nitrophénol libéré/min par mg de protéine dans les conditions suivantes: *p*-nitrophényl phosphate 5 mM, MgCl_2 1 mM en tampon NaHCO_3 - Na_2CO_3 33 mM (pH 10.0) dans un volume final de 2.5 ml placé à 37 °C (ϵ_{M} *p*-nitrophénol = 18 300).

"L'enzyme- Mg^{2+} " et les autres enzymes modifiées étaient obtenues par incubation de l'enzyme purifiée avec l'ion métallique à 4 °C pendant un temps prolongé. La concentration finale était 1 mM (5 mM dans certains cas) pour MgCl_2 , 5 mM pour NiCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 1.6 mM pour ZnCl_2 en tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M (pH 8.0).

Activité pyrophosphatasique

Le milieu d'essai standard contenait $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ et MgCl_2 aux concentrations choisies en tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 25 mM (pH 8.8) dans un volume final de 2.5 ou 5 ml placé à 37 °C. Après 10 ou 20 min d'incubation avec l'enzyme en quantité convenablement choisie, des portions de 1 ml étaient prélevées et immédiatement ajoutées à 5 ml de tampon acétate 0.27 M (pH 4.0) contenant CuSO_4 10 mM afin d'arrêter la réaction. Ce tampon et les autres réactifs utilisés (molybdate d'ammonium et méthylamino-4-phénol sulfate) sont ceux de la méthode de Delsal et Manhoury¹⁰ pour le dosage du P_i . Il a été vérifié que la réaction évolue selon un processus d'ordre zéro. Nous précisons également que le taux d'hydrolyse initial de la solution de

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a toujours été contrôlé, qu'il n'évolue pas au cours de la réaction et que le phosphate libéré se trouve en concentration trop faible pour avoir un effet décelable sur l'activité de l'enzyme.

Concentration des espèces présentes dans le milieu d'essai

Il a été démontré que lorsque PP_i et MgCl_2 sont mis en présence en solution aqueuse, la formation des complexes est instantanée¹¹. Les constantes de stabilité ont été déterminées par Lambert et Watters¹² pour la formation des complexes $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ et $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

$$K_{\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}} = \frac{[\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]} = 10^{5.4} \quad (1)$$

$$K_{\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7} = \frac{[\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}]} = 10^{2.4} \quad (2)$$

Le dernier pK de l'acide pyrophosphorique étant 8.2, on considère qu'à pH 8.8, l'espèce protonée $\text{P}_2\text{O}_7\text{H}^{3-}$ est pratiquement inexistante ou négligeable. Pour éviter toute confusion et pour simplifier l'écriture nous avons choisi les expressions $[\text{Mg}^{2+}]_t$ et $[\text{PP}_i]_t$ pour désigner les concentrations globales de MgCl_2 et de pyrophosphate.

Si $[\text{PP}_i]_t$ est plus grand que $[\text{Mg}^{2+}]_t$, il n'y a pas de Mg^{2+} libre. Les seules espèces en présence sont $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, et $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ dont la concentration est égale à $[\text{Mg}^{2+}]_t$ introduit dans le mélange. La concentration de $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ est donc donnée par la relation

$$[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}] = [\text{PP}_i]_t - [\text{Mg}^{2+}]_t \quad (3)$$

Si $[\text{Mg}^{2+}]_t$ est en excès, il se forme d'abord le complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$, puis le complexe $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ dont les concentrations en solution peuvent être déterminées par les relations 1 et 2. Dans le Tableau I nous donnons quelques valeurs des concentrations de ces complexes et de Mg^{2+} libre calculées pour des valeurs de $[\text{PP}_i]_t$ et $[\text{Mg}^{2+}]_t$ utilisées dans cette étude.

RÉSULTATS

Cas de l'enzyme purifiée

Butterworth⁵, pour l'enzyme du rein de porc, puis Nayudu et Miles⁷, pour l'enzyme de muqueuse intestinale de souris, ont montré que la relation $v = f([\text{PP}_i]_t)$ est michaelienne, si le rapport $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PP}_i]_t$ est constant. Si $[\text{Mg}^{2+}]_t$ est constant, la relation $v = f([\text{PP}_i]_t)$ est représentée par une courbe sigmoïde. Nayudu et Miles⁷ parlent dans ce cas de comportement pseudo-allostérique ce qui semble d'ailleurs ne pas être typique des phosphatases alcalines, mais de toute enzyme qui nécessite la présence d'ions métalliques et dont le substrat est un agent complexant (cas de la luciférase, Denburg et De Luca¹³).

Avec l'enzyme purifiée du cerveau, dépourvue de Mg^{2+} , on fait les observations suivantes:

(1) Quelles que soient les valeurs de $[\text{PP}_i]_t$ et $[\text{Mg}^{2+}]_t$ et quel que soit le pH, les cinétiques d'hydrolyse sont linéaires pendant 40 min au moins. Si MgCl_2 est absent du milieu d'essai, l'activité est très faible: de 1 à 5% de l'activité maximum observée en présence de MgCl_2 .

(2) $[\text{PP}_i]_t$ étant maintenu constant, on fait varier $[\text{Mg}^{2+}]_t$ (Fig. 1). Pour

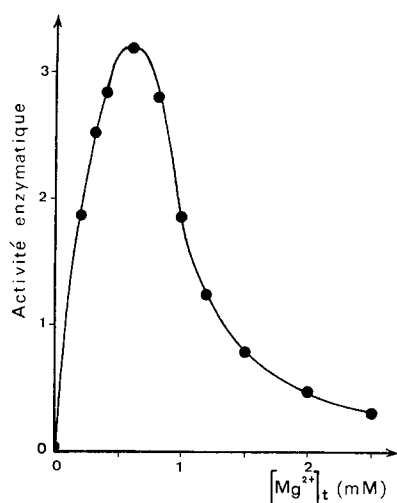


Fig. 1. Influence de $[\text{Mg}^{2+}]_t$ sur l'activité pyrophosphatase (enzyme purifiée dépourvue de Mg^{2+}). Le milieu d'essai contient: Tris-HCl 25 mM, NaCl 25 mM (pH 8.8), $[\text{PP}_i]_t = 1$ mM et MgCl_2 . Ici comme dans les autres schémas, les unités d'activité enzymatique sont arbitraires.

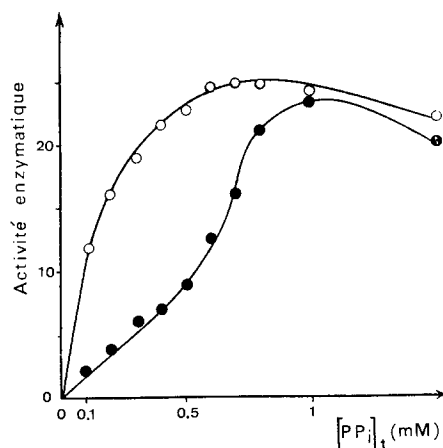


Fig. 2. Influence de $[\text{PP}_i]_t$ sur l'activité pyrophosphatase (enzyme purifiée dépourvue de Mg^{2+}). Le milieu d'essai contient: Tris-HCl 25 mM, NaCl 25 mM (pH 8.8). ○—○, $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PP}_i]_t = 0.7$. ●—●, $[\text{Mg}^{2+}]_t = 0.7$ mM.

$[\text{PP}_i]_t = 1$ mM, l'activité est maximum pour $[\text{Mg}^{2+}]_t = 0.7$ mM. Au-delà de cette concentration, l'activité diminue rapidement. Si $[\text{PP}_i]_t = 2$ mM, il n'y a d'inhibition que pour des valeurs de $[\text{Mg}^{2+}]_t$ supérieures à 1.4 mM, soit un rapport $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PP}_i]_t$ encore égal à 0.7, mais pour lequel le maximum d'activité est plus faible que précédemment. L'activité de l'enzyme dépend donc à la fois de $[\text{Mg}^{2+}]_t$ et de $[\text{PP}_i]_t$ avec inhibition par excès dans les deux cas. L'inhibition produite par $[\text{Mg}^{2+}]_t$ peut être totale alors que celle produite par $[\text{PP}_i]_t$ est plus faible et n'apparaît qu'au-delà de concentrations très supérieures à celles qui sont normalement utilisées pour les essais.

(3) La relation $v = f([\text{PP}_i]_t)$ est michaelienne, si $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PP}_i]_t = 0.7$. Si $[\text{Mg}^{2+}]_t = 0.7$ mM, la courbe est une sigmoïde (Fig. 2). Nous observons donc qualitativement les mêmes phénomènes que Butterworth⁵ puis Nayudu et Miles⁷.

(4) La seule considération de ces résultats tendrait évidemment à montrer, comme l'ont fait ces auteurs, que le véritable substrat n'est autre que le complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$, ne serait-ce que parce que l'activité maximum est obtenue à des valeurs de $[\text{Mg}^{2+}]_t$ et de $[\text{PP}_i]_t$ pour lesquelles l'espèce $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ est prédominante. On sait aussi que l'activité est très faible si MgCl_2 est absent du milieu d'essai. Raisonner ainsi, c'est négliger ce que nous avons mis en évidence concernant l'action directe de Mg^{2+} sur la structure de l'enzyme⁸ ou supposer a priori que le complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ a le même effet que l'ion magnésium libre.

Cas de l'enzyme- Mg^{2+}

(1) A l'inverse de l'enzyme purifiée qui est très peu active vis-à-vis de l'hydrolyse du pyrophosphate si MgCl_2 est absent du milieu d'essai, l'enzyme- Mg^{2+} est normalement active. On constate en effet que la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse

n'est pas augmentée par addition de Mg^{2+} . Cette seule indication permet d'affirmer que $P_2O_7^{4-}$ est un au moins aussi bon substrat que $MgP_2O_7^{2-}$ pris dans le cas où $[Mg^{2+}]_t/[PPi]_t = 0.7$. En effet, $[Mg^{2+}]_t$ apportée dans le milieu d'essai avec l'enzyme est toujours très faible devant $[PPi]_t$. La concentration de $MgP_2O_7^{2-}$ qui se forme dans ces conditions, qui, d'après la relation 3, est égale à $[Mg^{2+}]_t$ introduit avec l'enzyme, est donc toujours faible et négligeable devant la concentration de $P_2O_7^{4-}$.

(2) La cinétique d'hydrolyse de $P_2O_7^{4-}$ est linéaire pendant 10–15 min. Au-delà, elle s'aplatit rapidement ce qui, selon toute vraisemblance, correspond à une perte de Mg^{2+} par l'enzyme au profit de $P_2O_7^{4-}$.

(3) La relation $v = f([PPi]_t)$ est michaelienne exactement comme dans le cas où $[Mg^{2+}]_t/[PPi]_t = 0.7$.

(4) D'après les résultats illustrés dans Fig. 3, il est clair que $P_2O_7^{4-}$ est un meilleur substrat que $MgP_2O_7^{2-}$. Pour déterminer cela, il a suffi de mesurer l'activité de l'enzyme- Mg^{2+} dans un milieu d'essai contenant des concentrations croissantes de $MgCl_2$. La courbe obtenue est une sigmoïde. Elle montre que l'activité diminue

TABLEAU I

CONCENTRATIONS DE Mg^{2+} , $MgP_2O_7^{2-}$ ET $Mg_2P_2O_7$ CALCULÉES POUR DES VALEURS DE $[Mg^{2+}]_t > [PPi]_t$

$[PPi]_t$ (mM) :	$[Mg^{2+}]_t$ (mM)	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1	1.5
Mg^{2+}		0.1	0.05								
$MgP_2O_7^{2-}$	0.2	0.097	0.148								
$Mg_2P_2O_7$		0.002	0.002								
Mg^{2+}		0.2	0.15	0.1							
$MgP_2O_7^{2-}$	0.3	0.095	0.144	0.195							
$Mg_2P_2O_7$		0.005	0.005	0.005							
Mg^{2+}	0.3	0.25	0.2	0.1							
$MgP_2O_7^{2-}$	0.4	0.092	0.141	0.190	0.292						
$Mg_2P_2O_7$		0.007	0.009	0.009	0.007						
Mg^{2+}	0.4	0.35	0.3	0.2	0.1						
$MgP_2O_7^{2-}$	0.5	0.09	0.137	0.186	0.285	0.390					
$Mg_2P_2O_7$		0.009	0.012	0.014	0.014	0.010					
Mg^{2+}	0.5	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1					
$MgP_2O_7^{2-}$	0.6	0.088	0.134	0.181	0.279	0.381	0.487				
$Mg_2P_2O_7$		0.011	0.013	0.018	0.021	0.019	0.012				
Mg^{2+}	0.6	0.55	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1				
$MgP_2O_7^{2-}$	0.7	0.086	0.131	0.177	0.272	0.372	0.476	0.585			
$Mg_2P_2O_7$		0.013	0.018	0.022	0.027	0.028	0.024	0.015			
Mg^{2+}	0.7	0.65	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2				
$MgP_2O_7^{2-}$	0.8	0.085	0.128	0.174	0.266	0.363	0.465	0.571			
$Mg_2P_2O_7$		0.015	0.021	0.026	0.034	0.037	0.035	0.029			
Mg^{2+}	0.9	0.85	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2			
$MgP_2O_7^{2-}$	1	0.081	0.123	0.166	0.255	0.347	0.444	0.545	0.761		
$Mg_2P_2O_7$		0.018	0.026	0.033	0.045	0.052	0.056	0.055	0.038		
Mg^{2+}	1.4	1.35	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7	0.5		
$MgP_2O_7^{2-}$	1.5	0.073	0.111	0.150	0.230	0.313	0.339	0.489	0.680	0.888	
$Mg_2P_2O_7$		0.026	0.038	0.049	0.070	0.087	0.1	0.111	0.120	0.112	
Mg^{2+}	1.9	1.85	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.2	1.0	0.5	
$MgP_2O_7^{2-}$	2	0.067	0.102	0.137	0.210	0.285	0.363	0.443	0.614	0.799	1.332
$Mg_2P_2O_7$		0.032	0.048	0.062	0.090	0.115	0.137	0.156	0.186	0.201	0.168
Mg^{2+}	2.4	2.35	2.3	2.2	2.1	2.0	1.9	1.7	1.5	1.0	
$MgP_2O_7^{2-}$	2.5	0.062	0.094	0.126	0.193	0.261	0.332	0.406	0.560	0.726	1.198
$Mg_2P_2O_7$		0.038	0.056	0.073	0.107	0.138	0.168	0.194	0.240	0.274	0.302

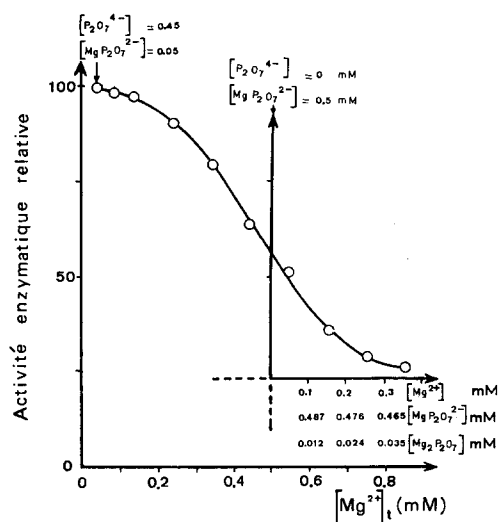


Fig. 3. Action de $[Mg^{2+}]_t$ sur l'activité pyrophosphatase (cas de l'enzyme- Mg^{2+}). Le milieu d'essai contient: Tris-HCl 25 mM, NaCl 25 mM (pH 8.5). $[Mg^{2+}]_t$ apportée avec l'enzyme dans le milieu d'essai = 0.05 mM. $[PP_i]_t = 0.5$ mM.

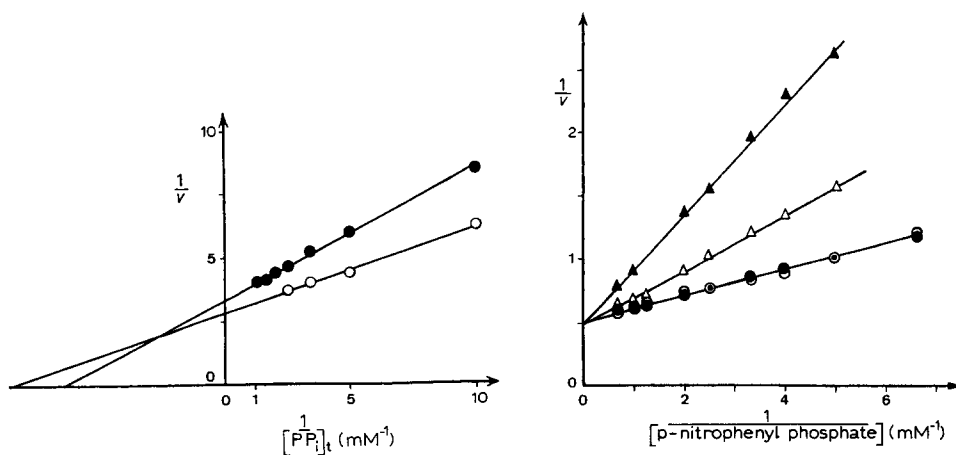


Fig. 4. Représentation de Lineweaver-Burk pour l'activité pyrophosphatase. Le milieu d'essai contient Tris-HCl 25 mM, NaCl 25 mM (pH 8.8). $[PP_i]_t$ varie de 0.1–1 mM. ○—○, enzyme- Mg^{2+} . Le milieu d'essai ne contient que $[Mg^{2+}]_t$ apportée avec l'enzyme $[Mg^{2+}]_t = 10 \mu M$. $[MgP_2O_7^{2-}]$ est négligeable devant $[P_2O_7^{4-}]$. ●—●, enzyme purifiée dépourvue de Mg^{2+} , $[Mg^{2+}]_t/[PP_i]_t = 0.7$. L'espèce $MgP_2O_7^{2-}$ est prédominante.

Fig. 5. Inhibition de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate par $P_2O_7^{4-}$ et $MgP_2O_7^{2-}$ en tampon borate 25 mM (pH 8.8) (enzyme- Mg^{2+}). La concentration en *p*-nitrophényl phosphate varie de 0.15–1.5 mM. $[Mg^{2+}]_t$ apportée avec l'enzyme est $4 \mu M$, donc négligeable. Pour le témoin, on a ajouté (●—●) ou non (○—○) $[Mg^{2+}]_t = 0.7$ mM au milieu d'essai. △—△, on a ajouté $[PP_i]_t$ 1 mM et $[Mg^{2+}]_t = 0.7$ mM. ▲—▲, on a seulement ajouté $[PP_i]_t$ 1 mM; le milieu d'essai ne contient que $[Mg^{2+}]_t$ apportée avec l'enzyme.

d'autant plus qu'il se forme plus de complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$. La première portion de la courbe correspond à la disparition de $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$. Pour $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PPi}]_t = 1$, c'est-à-dire lorsque la seule espèce réactive est $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$, l'activité initiale de l'enzyme est pratiquement diminuée de moitié. En première approximation, $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ est donc hydrolysé deux fois plus vite que $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$. La deuxième portion de courbe correspond à l'apparition de Mg^{2+} libre, à la disparition de $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ et à l'apparition de $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ qui n'est probablement pas hydrolysé.

(5) La valeur de K_m est plus faible pour l'enzyme- Mg^{2+} essayée sans MgCl_2 que pour l'enzyme- Mg^{2+} ou l'enzyme purifiée essayées en présence de MgCl_2 . L'affinité de la phosphatase alcaline cérébrale est donc plus grande pour $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ que pour $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ (Fig. 4). La différence paraît plus nette encore avec l'enzyme du placenta humain alors que les V sont peu différents (Cathala, G., observation non publiée).

Effet de $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ et $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ sur l'hydrolyse d'un phosphomonoester

Le phosphomonoester choisi est le *p*-nitrophényl phosphate; on a successivement réalisé des conditions expérimentales favorables et défavorables à l'activité pyrophosphatasique.

(1) Le pH de la réaction est 8.8 (tampon borate 25 mM), c'est-à-dire le pH optimum d'hydrolyse du pyrophosphate. On observe que $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ (cas où $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PPi}]_t = 0.7$) et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (cas de l'enzyme- Mg^{2+}) sont des inhibiteurs compétitifs de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate (Fig. 5).

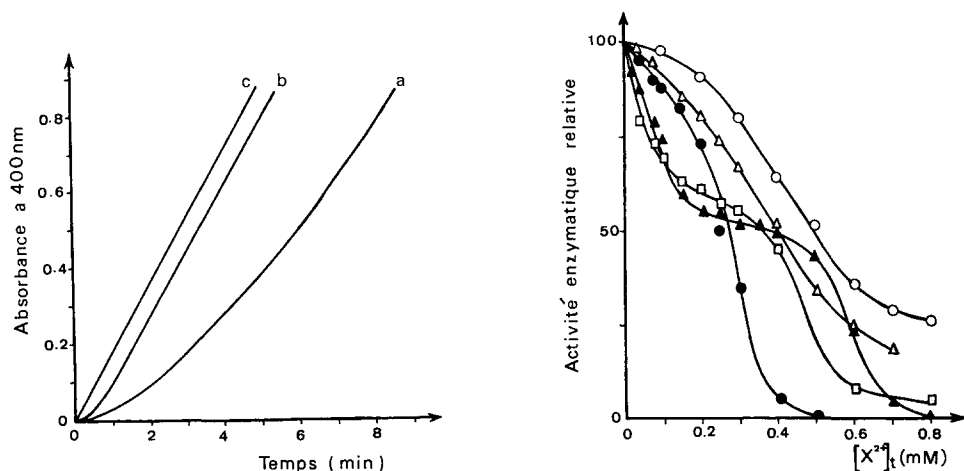


Fig. 6. Activation de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate par Mg^{2+} et les complexes du pyrophosphate. Enregistrement direct obtenu avec un spectrophotomètre Unicam SP 800. Conditions expérimentales: *p*-nitrophényl phosphate 5 mM en tampon borate 25 mM (pH 8.5). (a) Témoin, $[\text{Mg}^{2+}]$ ajoutée au milieu d'essai = 5 mM (enzyme purifiée dépourvue de Mg^{2+}). (b) On a ajouté au milieu d'essai: $[\text{PPi}]_t$ 2.5 mM et $[\text{Mg}^{2+}]_t$ 5 mM conditions pour lesquelles les concentrations des espèces présentes sont: $\text{Mg}^{2+} = 2.5$ mM, $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-} = 1.534$ mM, $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0.966$ mM. (c) $[\text{Mg}^{2+}]$ ajoutée au milieu d'essai est 5 mM, mais l'enzyme a été préalablement incubée avec Mg^{2+} (enzyme- Mg^{2+}).

Fig. 7. Réactivité de quelques complexes métalliques vis-à-vis de l'enzyme- Mg^{2+} . Pour $[\text{PPi}]_t = 0.5$ mM, on a ajouté des concentrations croissantes d'ions métalliques divalents (mêmes conditions que Fig. 3). $\text{X}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$ (○—○); $= \text{Ni}^{2+}$ (△—△); $= \text{Zn}^{2+}$ (●—●); $= \text{Mn}^{2+}$ (▲—▲); $= \text{Co}^{2+}$ (□—□).

$P_2O_7^{4-}$ est un inhibiteur plus puissant que $MgP_2O_7^{2-}$ ce qui confirme qu'il est un meilleur substrat vis-à-vis de l'activité pyrophosphatase.

(2) Si les conditions expérimentales sont défavorables à l'activité pyrophosphatase, on constate que les complexes du pyrophosphate peuvent activer l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate (Fig. 6) en donnant à l'enzyme dépourvue de Mg^{2+} une activité égale à celle de l'enzyme- Mg^{2+} . On a donc là un phénomène semblable à celui que nous avons observé dans le cas où un acide aminé est ajouté au milieu d'essai en présence de Mg^{2+} (ref. 14).

Il faut donc en déduire que le complexe $MgP_2O_7^{2-}$ et peut-être aussi le complexe $Mg_2P_2O_7$ sont susceptibles de se lier à l'enzyme au site récepteur du Mg^{2+} , comme Mg^{2+} libre.

Cas de l'enzyme incubée avec d'autres ions métalliques bivalents

Si la phosphatase alcaline du cerveau, purifiée et dialysée, est incubée avec Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+} , les enzymes nouvellement obtenues ont une activité pyrophosphatase plus faible que l'enzyme- Mg^{2+} . Par rapport à l'activité de l'enzyme- Mg^{2+} , les taux d'activité de ces enzymes sont plus faibles qu'ils ne l'étaient, lorsque le substrat était le *p*-nitrophényl phosphate⁸, notamment pour Mn^{2+} , Ni^{2+} (50% de l'activité de l'enzyme- Mg^{2+}) et Co^{2+} (20%).

Dans la Fig. 7, on a représenté l'effet des complexes formés avec ces ions métalliques sur l'activité pyrophosphatase de l'enzyme- Mg^{2+} . Les courbes sont différentes selon l'ion métallique considéré et il n'existe pas de complexe qui soit aussi catalytiquement actif que $P_2O_7^{4-}$. Il est aussi intéressant de remarquer que le complexe présumé $ZnP_2O_7^{2-}$ n'est pas hydrolysé (cas où $[Zn^{2+}]_t/[PP_i]_t = 1$).

Il a été montré¹⁵ que PP_i et Mn^{2+} (mais pas Mg^{2+}) forment en solution très diluée, des agrégats non hydrolysables par la pyrophosphatase inorganique de levure (EC 3.6.1.1). Il est par conséquent possible que la chute brutale d'activité que nous observons pour $[Mn^{2+}]_t$ faible soit due à la formation de ces agrégats qui ne seraient pas davantage hydrolysés par la phosphatase alcaline. Pour Co^{2+} le phénomène est peut-être identique.

DISCUSSION

Pour la raison que l'addition de Mg^{2+} n'augmente que très peu l'activité pyrophosphatase des phosphatases alcalines de l'intestin et du foie humains, Eaton et Moss³ ont estimé que la formation de l'ion complexe $MgP_2O_7^{2-}$ n'était pas une condition nécessaire. D'autres auteurs ont au contraire attribué à ce complexe un rôle déterminant en concluant qu'il est le véritable substrat même si la forme libre est aussi hydrolysée (Butterworth⁵ pour l'enzyme de rein de porc et Nayudu et Miles⁷ pour l'enzyme d'intestin de souris). La première de ces conclusions est une simple déduction logique, l'autre est inévitable si l'on considère que l'activité pyrophosphatase est augmentée alors que la forme complexée $MgP_2O_7^{2-}$ est prédominante dans le système, et que Mg^{2+} en est absent excluant ainsi toute hypothèse d'une action de l'ion métallique libre sur l'enzyme.

Les résultats que nous présentons à propos de la phosphatase alcaline du cerveau, faisant suite à l'étude cinétique que nous avons faite de l'activation par Mg^{2+} (ref. 8), démontrent précisément que l'augmentation d'activité pyrophosphatase

est explicable du fait de la seule association réversible et relativement stable qui s'établit après une incubation prolongée de l'ion métallique et de l'enzyme. L'activité observée de l'enzyme- Mg^{2+} , qui est en vitesse initiale de 20-100 fois supérieure à celle de l'enzyme purifiée dépourvue de Mg^{2+} , conduit à cette conclusion immédiate. La liaison enzyme-métal est par conséquent douée d'une certaine stabilité vis-à-vis de ce substrat complexant qu'est PP_i mais qui se comporte en définitive comme un phosphomonoester quelconque.

Nous constatons par ailleurs, comme ceux qui admettent que $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ est le véritable substrat, que la faible activité pyrophosphatasique de l'enzyme dépourvue de Mg^{2+} peut être largement augmentée si les conditions expérimentales sont correctement choisies parmi des valeurs de $[\text{Mg}^{2+}]_t$ et $[\text{PP}_i]_t$ assurant la présence simultanée de $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ et $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$; le cas le plus favorable étant donné par $[\text{Mg}^{2+}]_t/[\text{PP}_i]_t = 0.7$, soit lorsque $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ est prédominant. Il va de soi qu'il ne peut être question ici d'une association ion métallique-enzyme étant donné les valeurs élevées des constantes de stabilité des complexes. $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ est donc hydrolysé aussi, mais toujours plus faiblement que $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ par l'enzyme- Mg^{2+} ce qui confirme d'emblée que sa formation n'est pas une condition nécessaire. Le fait que K_m pour $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ait une valeur plus faible que K_m pour $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ va aussi dans ce sens.

L'hydrolyse de $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ alors qu'il n'y a pas de Mg^{2+} libre s'explique aisément si l'on conçoit que ce complexe peut avoir sur le site récepteur du Mg^{2+} de l'enzyme un effet analogue à celui de Mg^{2+} libre. L'activation quasi instantanée de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate dans des conditions de pH où celle produite par Mg^{2+} est lente, alors que $[\text{Mg}^{2+}]$ libre est diminuée et que l'activité pyrophosphatasique est inhibée, suggère effectivement que l'un des complexes au moins doit être considéré comme activateur.

Dans notre précédent article⁸, nous avons discuté l'idée selon laquelle Mg^{2+} lié à l'enzyme pourrait avoir un effet catalytique direct en favorisant la rupture du complexe intermédiaire phosphorylenzyme. Les résultats présentés ne sont pas en contradiction avec cette hypothèse, mais ils n'apportent en sa faveur aucun argument supplémentaire. On peut au mieux suggérer, puisque les facteurs d'activation sont différents, que Mg^{2+} lié paraît plus indispensable encore pour l'activité pyrophosphatasique, qu'il ne l'est dans le cas où le substrat est un phosphomonoester.

A l'image de suggestions déjà exprimées dans des études sur le mécanisme d'hydrolyse du pyrophosphate inorganique et des nucléosides pyrophosphate¹⁶ par les phosphatases alcalines, nous dirons encore sur l'ensemble de ces résultats et de ceux précédemment discutés⁸, qu'ils appuient fortement la thèse selon laquelle Mg^{2+} pourrait être un élément de régulation dans le mécanisme d'action de ces enzymes.

RÉSUMÉ

1. L'activité pyrophosphatasique de la phosphatase alcaline du cerveau dépend de Mg^{2+} lié à l'enzyme plutôt que de la formation de l'ion complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$. En effet, l'enzyme- Mg^{2+} (enzyme préincubée avec Mg^{2+}) hydrolyse le pyrophosphate libre et son activité n'est pas augmentée par addition de Mg^{2+} au milieu d'essai.

L'enzyme dépourvue de Mg^{2+} hydrolyse l'ion complexe $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$, mais plus faiblement. Son activité sur $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ atteint seulement 1-5 % de la valeur obtenue avec l'enzyme- Mg^{2+} .

2. A des concentrations relativement élevées, $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ n'est pas hydrolysé mais peut activer la vitesse d'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate à pH 8.5. De par sa liaison avec l'enzyme, $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ a probablement le même effet que Mg^{2+} libre.

3. Parmi les ions métalliques divalents susceptibles de se lier à l'enzyme, Mg^{2+} est celui qui produit la plus forte activité pyrophosphatasique. Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} et surtout Zn^{2+} ont des effets plus faibles.

4. Il est conclu que le véritable substrat de l'activité pyrophosphatasique est $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, lequel se comporte finalement comme un phosphomonoester.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Moss, D. W., Eaton, R. H., Smith, J. K. et Whitby, L. G. (1967) *Biochem. J.* 102, 53-57
- 2 Fernley, H. N. et Walker, P. G. (1967) *Biochem. J.* 104, 1011-1018
- 3 Eaton, R. H. et Moss, D. W. (1967) *Biochem. J.* 102, 917-921
- 4 Fernley, H. N. et Bisaz, S. (1968) *Biochem. J.* 107, 279-283
- 5 Butterworth, P. J. (1968) *Biochem. J.* 110, 671-675
- 6 Sussman, H. H. et Laga, E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 151, 281-283
- 7 Nayudu, P. R. V. et Miles, P. L. (1969) *Biochem. J.* 115, 29-35
- 8 Brunel, C. et Cathala, G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 309, 104-115
- 9 Brunel, C., Cathala, G. et Saintot, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 621-635
- 10 Delsal, J. L. et Manhour, H. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 1623-1636
- 11 Rogers, L. B. et Reynolds, C. A. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2081-2085
- 12 Lambert, S. M. et Watters, J. I. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5606-5608
- 13 Denburg, J. et De Luca, M. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 453-460
- 14 Brunel, C. et Cathala, G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 106-118
- 15 Cooperman, B. S. et Mark, D. H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 252, 221-234
- 16 Wass, M. et Butterworth, P. J. (1971) *Biochem. J.* 124, 891-896