

MULTPLICITE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE CEREBRALE DE DIFFERENTES ESPECES

Claude BRUNEL et Guy CATHALA

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 34 - Montpellier, France

Received 3 December 1969

The alkaline phosphatase of beef, horse, pig and sheep brain have been purified. In each case, the alkaline phosphatase activity can be separated into two or three components by DEAE-cellulose chromatography and by electrophoresis. Although the properties of these enzyme fractions are very similar, there are sufficient differences to identify each species.

Furthermore two of the three components separated in sheep brain differ in their Michaelis constants using β -glycerophosphate as substrate, whereas the two pig brain components are not different in this respect. This supports the view of two alkaline phosphatase isoenzymes in sheep brain.

1. Introduction

La plupart des phosphatases alcalines se présentent sous deux ou plusieurs formes actives dont les propriétés sont très proches [1-4]. Plutôt que des isoenzymes, ces formes souvent interconvertibles sont considérées comme des "variantes chromatographiques ou électrophorétiques" d'un enzyme unique. Pourtant, des différences faibles mais caractéristiques sont parfois signalées [5-6]. Sur des extraits partiellement purifiés de cerveau de mouton, Saraswathi et Bachhawat [7-8] ont montré l'existence de deux formes différencierées par leur affinité pour le 5'-AMP et le pyridoxal 5-phosphate.

Dans un travail précédent [9], nous avons décrit les propriétés de la phosphatase alcaline du cerveau de boeuf et montré que l'enzyme qui est sans action sur le pyridoxal-5-phosphate est effectivement séparé, par chromatographie sur DEAE-cellulose, en deux fractions actives dont l'une trop faiblement représentée n'a pas été étudiée.

Cette nouvelle étude, réalisée sur des cerveaux de plusieurs espèces, confirme la subdivision de l'activité enzymatique en deux ou trois pics de composition variable suivant les espèces. S'il est possible d'identifier l'espèce, la distinction entre deux formes provenant de la même espèce est moins aisée. Deux des trois fractions

isolées du cerveau de mouton paraissent pourtant différer par leur affinité pour le β -glycérophosphate. Il peut s'agir dans ce cas d'isoenzymes dont les différences de propriétés résulteraient plus d'une variabilité de la structure tertiaire du site actif que de modifications plus fondamentales.

Tableau 1
 % de désactivation en fonction du temps d'exposition aux ions H^+ à $0^\circ C$. A $100 \mu l$ de solution enzymatique, on ajoute $100 \mu l$ de tampon acétate $0,2 M$ pH 3,9, puis entre 0 et 50 min on prélève des portions de $10 \mu l$ qui sont ajoutées au milieu réactionnel préalablement placé à $37^\circ C$ (cf. Méthodes). Pour mesurer l'influence de la sérum albumine, on ajoute $200 \mu g$ de cette protéine par ml de mélange tampon acétate-enzyme.

| Temps (min) | % d'activité résiduelle | | | | | | |
|----------------|-------------------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| | B | C | P ₁ | P ₂ | M ₁ | M ₃ | M ₃ + sérum albumine |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 60 | 57 | 52 | 71 | 55 | 44 | 71 |
| 10 | 46 | 43 | 37 | 60 | 40 | 29 | 58 |
| 20 | 34 | 32 | 22 | 42 | 31 | 17 | 50 |
| 35 | 27 | 22 | 12 | 30 | 20 | 10 | 46 |
| 50 | 24 | 15 | 10 | 21 | 13 | 8 | 44 |

Tableau 2

pH optimum d'hydrolyse de quelques esters phosphoriques. *p*-Nitrophénylphosphate, β -Glycérophosphate, *O*-Phosphoryléthanolamine sont utilisés à la concentration 5 mM en tampon carbonate-bicarbonate 3 mM, MgCl₂ 1 mM. PP_i est utilisé à la concentration 1 mM en tampon tris-HCl 3 mM, NaCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM.

| Substrat | pH Optimum | | | | | | |
|----------------------------------|------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | B | C | P ₁ | P ₂ | M ₁ | M ₂ | M ₃ |
| <i>p</i> -Nitrophénylphosphate | 10,2 | 9,9 | 10,0 | 9,9 | 10,2 | 10,1 | 10,1 |
| β -Glycérophosphate | 9,4 | 9,5 | 9,5 | 9,6 | 9,6 | — | 9,6 |
| <i>O</i> -Phosphoryléthanolamine | 9,7 | 9,7 | 9,7 | 9,7 | 9,7 | — | 9,8 |
| PP _i | 8,8 | 8,7 | 8,6 | 8,6 | 8,9 | — | 8,8 |

Tableau 3

Affinité des différents enzymes pour trois substrats à plusieurs pH. Les K_m ont été déterminés graphiquement par la méthode de Lineweaver-Burk. Chaque valeur représente la moyenne de plusieurs déterminations.

| Substrat | pH | K _m (mM) | | | | | | |
|----------------------------------|------|---------------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | B | C | P ₁ | P ₂ | M ₁ | M ₂ | M ₃ |
| <i>p</i> -Nitrophénylphosphate | 10,0 | 0,9 | 1,7 | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| <i>O</i> -Phosphoryléthanolamine | 9,25 | — | — | — | — | 1,2 | — | 1,2 |
| | 9,7 | 6,2 | 16,7 | 7,1 | 5,9 | 7,1 | — | 6,2 |
| β -Glycérophosphate | 9,0 | — | — | — | — | 0,7 | — | 1,3 |
| | 9,25 | — | — | 1,3 | 1,3 | 1,0 | — | 1,6 |
| | 9,5 | 2,1 | 2,5 | 1,8 | 2,0 | 1,9 | — | 2,6 |
| | 10,0 | 8,3 | 10 | 20 | 20 | 12,5 | — | 6,7 |
| | 10,2 | — | — | — | — | 33 | — | 22 |

2. Méthodes

Elles ont été décrites en détail dans notre précédent article [9]. Les enzymes, qui se révèlent homogènes à l'électrophorèse sur acétate de cellulose et gel de poly-acrylamide, sont préparés par extraction au butanol, précipitation par l'acétone et (NH₄)₂SO₄, chromatographie sur DEAE-cellulose et gel filtration sur Sephadex G-200; ils sont conservés à 4°C en tampon tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contenant NaCl 0,1 M.

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une μ mole de *p*-nitrophénol par min à 37° dans un milieu contenant du *p*-nitrophényl-phosphate 5 mM, MgCl₂ 1 mM et du tampon carbonate 3 mM pH 10,0. A 2,5 ml de ce mélange on ajoute de 5 à 20 μ l d'extrait enzymatique purifié contenant 7 à 8

unités/ml et on suit la variation d'absorbance à 400 m μ pendant 5 min avec un spectrophotomètre Unicam SP 800 équipé d'un enregistreur SP 20 (ϵ_M (*p*-nitrophénol) = 18.300). Les courbes d'hydrolyse de tous les autres substrats sont suivies par le dosage du P_i libéré selon la méthode de Delsal et Manhouri [10].

3. Résultats et discussion

La chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (figs. 1 et 2) révèle la multiplicité de la phosphatase alcaline. Il y a deux fractions actives dans les extraits de cerveau de boeuf et de cheval mais, dans les deux cas, la forme la plus électronégative représente seulement 2 à 3% de l'activité totale. Il y a aussi deux pics dans les ex-

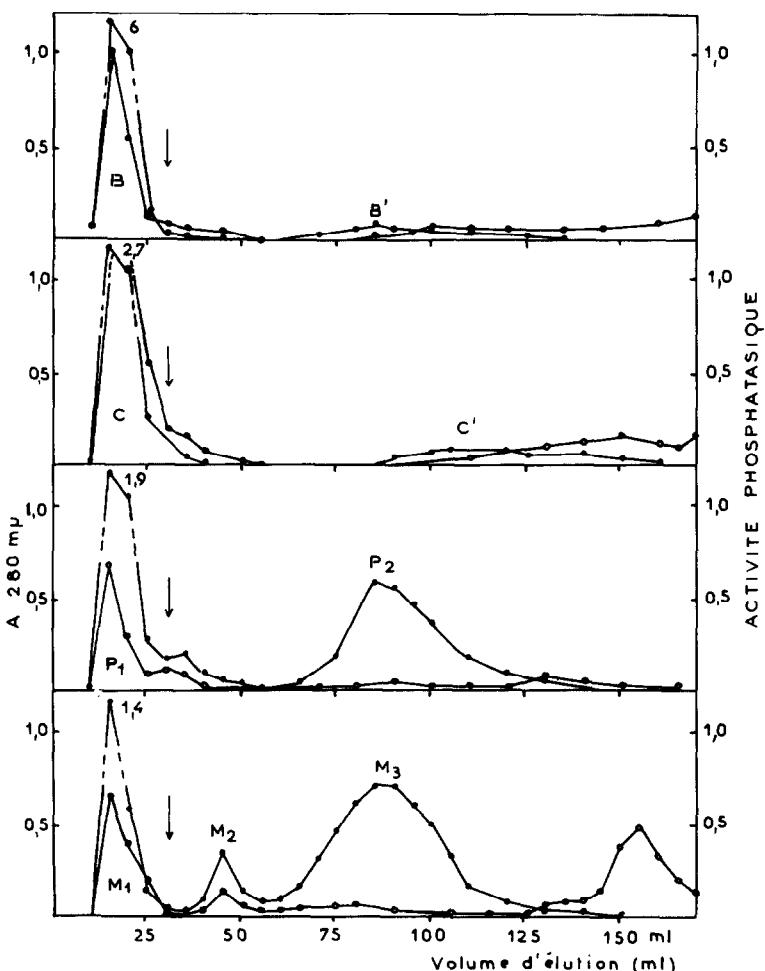


Fig. 1. Fractionnement de l'activité phosphatasique sur colonne de DEAE-cellulose. ○—○; A_{280 mμ}; ●—● Activité phosphatasique déterminée avec le *p*-nitrophénylphosphate comme substrat (cf. Méthodes). Les extraits chromatographiés contiennent 30 mg de protéines au maximum. Colonne: 12 xm X 1 cm; tampon d'elution: tris-CHI 0,05 M (pH 7,7); gradient NaCl: 0—0,5 M (Les flèches indiquent le point de départ du gradient); volume de mélange 250 + 250 ml; volume des fractions 5 ml. Les pics actifs ont été purifiés par gel filtration sur Sephadex G-200.

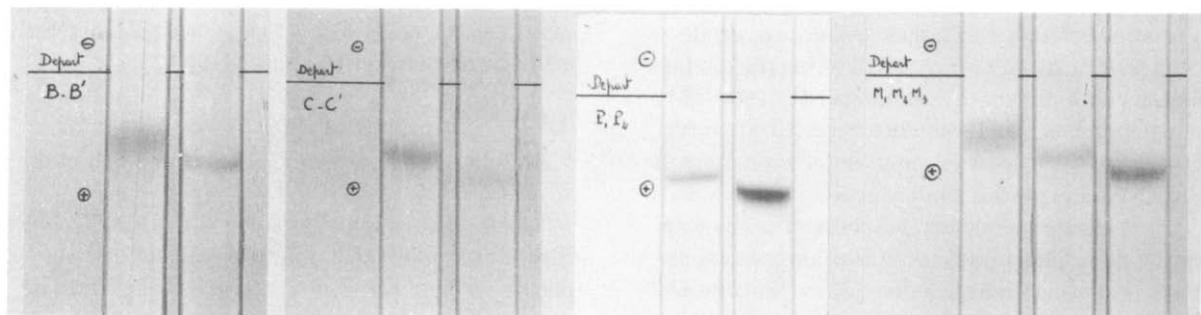


Fig. 2. Electrophorèses sur acétate de cellulose. Révélation enzymatique de la phosphatase alcaline. Substrat: α -naphtylphosphate 5 mM, MgCl₂ 1 mM tampon carbonate 3 mM pH 10,0. Révélation par 5-chloro-*o*-toluidine diazotée [9].

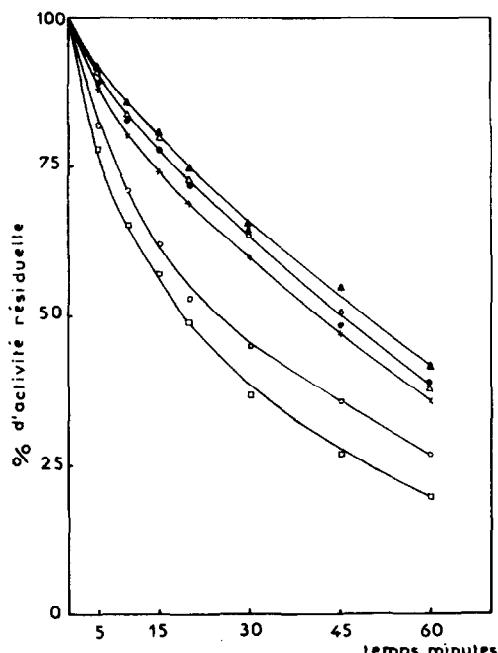


Fig. 3. Action de la température sur l'activité phosphatasique (*p*-nitrophényle phosphate). Les enzymes sont chauffés en ampoules scellées à 55°C puis testés dans les conditions habituelles (cf. Méthodes). $x-x$ B; $\square-\square$ C; $\triangle-\triangle$ P₁; $\blacktriangle-\blacktriangle$ P₂; $\circ-\circ$ M₁; $\bullet-\bullet$ M₃.

traits de cerveau de porc représentant respectivement 55 et 45% et trois, très inégalement répartis: 30,7 et 63% de l'activité totale, dans ceux de mouton. Ces fractions dont l'identité est confirmée par électrophorèse sur acétate de cellulose et gel de polyacrylamide sont respectivement désignées: B et B' pour le boeuf, C et C' pour le cheval, P₁ et P₂ pour le porc, M₁, M₂ et M₃ pour le mouton.

La neuraminidase ne modifie pas les propriétés enzymatiques, mais elle affecte les mobilités électrophorétiques au point que tous les enzymes ont un déplacement sensiblement égal. Par rapport aux témoins, alors que B, C et M₁ ne sont pas déplacés vers la cathode ou le sont très peu, la mobilité des autres fractions est considérablement diminuée. Si l'on tient compte des proportions différentes de chaque forme suivant l'espèce, on en déduit une variabilité très importante du contenu en acide sialique des phosphatasases alcalines cérébrales. Il est alors possible que M₂ puisse résulter

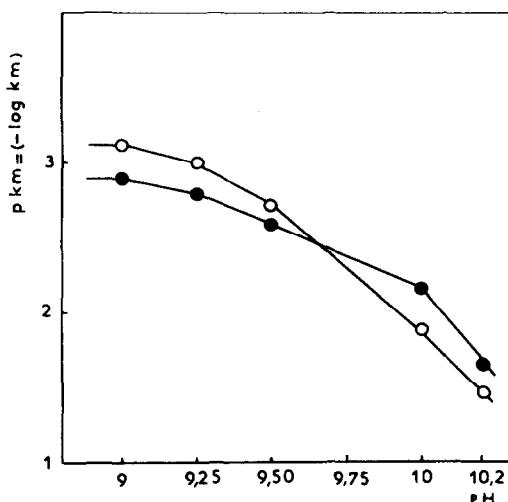


Fig. 4. Diagramme de Dixon (pK -pH). Hydrolyse du β -glycérophosphate. $\circ-\circ$ M₁; $\bullet-\bullet$ M₃.

de M₃, relativement abondant, par perte d'acide sialique. Nous pensons tout de même que M₂ est constitutif et non un artefact de préparation car cette fraction peut être mise en évidence à tous les stades de la purification.

Outre la molibilité électrophorétique, quelques différences faibles ou plus notables dans les propriétés physico-chimiques de ces enzymes (poids moléculaire, résistance aux ions H⁺, thermostabilité) sont à remarquer. Elles permettent au moins d'identifier l'espèce dont ils proviennent.

1) La variation du poids moléculaire déterminé sur colonne de Sephadex G-200 est peu importante. Nous attribuons 190.000 environ à B, P₂ et M₃, 160.000 à C, P₁ et M₁.

2) Les phosphatasases alcalines cérébrales sont particulièrement sensibles à l'acidité du milieu, beaucoup plus que d'autres enzymes du même groupe précédemment décrits [11]. A pH 3,9 la désactivation est rapide et pratiquement irréversible dès les premières minutes d'exposition aux ions H⁺, puis l'activité décroît selon une équation du premier ordre. Les cinétiques de désactivation de B, C, P₁ et M₁ ne montrent pas de différences très significatives (tableau 1); P₂ est plus résistant, M₃ plus fragile. La sérum albumine a un effet protecteur considérable.

3) La thermostabilité des phosphatases alcalines est un phénomène bien connu et cette propriété est d'une grande utilité pour la détermination de l'origine tissulaire des phosphatase du sérum [1]. Notre étude de la résistance des phosphatases cérébrales à 55°C, avec ou sans ions Mg^{2+} , permet de différencier avec certitude deux des quatre espèces considérées. M_1 et M_3 sont aussi différents tandis que P_1 et P_2 ne peuvent pas être distingués (fig.3). Mg^{2+} n'a pas d'effet protecteur.

Du point de vue de leur activité, ces enzymes ont des propriétés très semblables. Ils sont tous également activables par Mg^{2+} , inhibés au même degré par la L-phénylalanine, doués d'activité pyrophosphatasique. Ils ont aussi sensiblement le même pH optimum d'action pour un substrat donné (tableau 2).

Les constantes de Michaelis ont été déterminées pour trois substrats (tableau 3). L'enzyme C se distingue assez nettement des autres, mais entre deux fractions provenant de la même espèce, il n'y a de différences qu'entre M_1 et M_3 lorsque le β -glycérophosphate est utilisé comme substrat. La détermination graphique des K_m présentant toujours un caractère d'incertitude, l'étude a été réalisée à plusieurs pH entre 9,0 et 10,2. Les différences sont faibles mais définies et on remarque une inversion de l'affinité des deux enzymes suivant le pH. Il peut s'agir d'isoenzymes, mais le diagramme de Dixon (pK-pH) (fig. 4) montre que les pK sont pratiquement identiques et situés à pH 9,5 - 9,7. Il est donc probable qu'il n'y a pas de différences fondamentales dans le fonctionnement du site actif, mais seulement des variations dans la structure tertiaire de ces enzymes comme semblent l'indiquer par ailleurs les résultats de l'action des ions H^+ et de la résistance à la désactivation par la chaleur. Un pK voisin de 9,6 peut correspondre à l'ionisation des groupes hydroxyphénoliques de la tyrosine, de -SH ou encore de ϵ -NH₂ de la lysine. Fishman et Ghosh [1] ont proposé

un mécanisme dans lequel intervient un groupe ϵ -NH₂, et nous avons nous-mêmes déjà signalé [9] l'absence de groupes -SH et suggéré la participation d'un groupe ϵ -NH₂ à la formation du complexe ES en nous basant sur le fait que la phosphatase alcaline du cerveau de boeuf écétylée a un K_m plus grand que l'enzyme témoin. Le diagramme de Dixon obtenu semble confirmer cette hypothèse.

Remerciements

Nous remercions vivement les Professeurs E.Kahane et J.Moretti ainsi que le Docteur J.Attias pour les conseils qu'ils nous ont prodigués. Nos remerciements vont aussi à Mme A. Vie pour sa précieuse collaboration technique.

References

- [1] W.H.Fishman et N.K.Ghosh, Advances in clinical chemistry, Vol. 10 (Academic Press, New York, 1967) pp. 255-370.
- [2] D.W.Moss, Biochem. J. 94 (1965) 458.
- [3] P.J.Butterworth, Biochem. J. 107 (1968) 467.
- [4] M.J.Schlesinger et L.Andersen, Ann. N. Y. Acad. Sci. 151 (1968) 159.
- [5] F.Moog, H.R.Vire et R.D.Grey, Biochim. Biophys. Acta 113 (1966) 336.
- [6] M.J.Griffin, Arch. Biochem. Biophys. 132 (1969) 299.
- [7] S.Saraswathi et B.K.Bacchawat, J. Neurochem. 13 (1966) 237.
- [8] S.Saraswathi et B.K.Bacchawat, Biochem. J. 107 (1968) 185.
- [9] C.Brunel, H.Cathala et M.Saintot, Biochim. Biophys. Acta 191 (1969) 621.
- [10] J.L.Delsal et H.Manhouri, Bull. Soc. Chim. Biol. 40 (1958) 1623.
- [11] P.J.Butterworth, Biochem. J. 108 (1968) 243.