

trop minime pour entraver, par une action irritante, les effets stériliants, ou curatifs en général, de l'ozone.

Si l'on voulait cependant diminuer encore les concentrations des oxydes d'azote dans le gaz effluvé, il y aurait lieu d'utiliser, pour la production de l'ozone, un oxygène de provenance électrolytique, de préférence à l'oxygène ordinaire, qui est fabriqué le plus souvent par distillation de l'air liquide. A défaut, l'ozone devrait être recueilli dans un gazomètre sur l'eau ; dans ces conditions, les oxydes d'azote qui se trouvent en contact avec de l'ozone en grand excès, ont le temps, même à ces teneurs, de s'oxyder en anhydride nitrique absorbé intégralement dans l'eau. On peut trouver une preuve de cette élimination complète des oxydes d'azote dans les mesures d'activité catalytique de l'ozone au moyen du réactif aldéhydique<sup>1)</sup>. Dans ce cas, en effet, l'oxyde d'azote, même à des concentrations extrêmement faibles (de l'ordre de  $10^{-9}$ ), exerce une action inhibitrice très marquée. Or l'ozone, après avoir été préparé par effluation de l'air (c'est-à-dire dans des conditions où il se forme bien davantage d'oxyde d'azote) puis recueilli et conservé dans un gazomètre sur l'eau, a manifesté une action catalytique tout à fait en rapport avec la concentration.

Laboratoire de Chimie technique, théorique et  
d'Electrochimie de l'Université de Genève.

Juin 1941.

---

**102. De la protection contre l'hydrolyse enzymatique exercée par les groupes phosphoryles. Etude de la dégradation enzymatique d'un peptide et d'un polyose phosphorylés<sup>2)</sup>**

par Théodore Posternak et Hans Pollaczek.

(2. VII. 41.)

Lorsqu'on soumet les phosphoprotéides (caséine, vitelline, ichthuline) à l'action des ferment protéolytiques, on observe la formation de composés de poids moléculaires assez élevés et dont les teneurs en phosphore sont plus fortes que celles des protides de départ. Suivant leur mode d'obtention, on leur a donné les noms de pseudo- ou para-nucléines, de tyries, de phospho-peptones<sup>3)</sup>, etc. Un certain stade de dégradation une fois atteint, ces produits résistent à l'action des ferment.

<sup>1)</sup> E. Briner et G. Papazian, Helv. **23**, 542 (1940).

<sup>2)</sup> Communication préliminaire: Th. Posternak et H. Pollaczek, C. r. Soc. phys. et hist. nat., Genève, **57**, 234 (1940).

<sup>3)</sup> S. Posternak, C. r. **184**, 306 (1927); C. Rimington, Biochem. J. **21**, 1179 et 1187 (1927).

D'autre part, comme l'un de nous l'a montré il y a quelques années<sup>1)</sup>, certaines espèces d'amidon dont le représentant le plus typique est la féculle de pommes de terre, contiennent des groupes phosphoryles combinés à des restes de glucose faisant partie des chaînes du polysaccharide. Lorsqu'on soumet l'amidon de pommes de terre à l'action des amylases, les parties phosphorylées du polysaccharide donnent naissance à des acides polyose-monophosphoriques. Sous l'action prolongée des amylases, ces phospho-polyoses se transforment finalement en un acide tétraose-mono-phosphorique qui, lui, ne se laisse plus dégrader. Si l'on admet que la chaîne de ce tétraose phosphorylé résulte de l'union de deux restes de maltose, il faut en conclure, comme nous le faisions remarquer à l'époque, que la liaison glucosidique centrale qui unit ces deux restes de maltose, résiste à l'action de l'amylase.

La résistance qu'opposent à l'action des hydrolases certains produits riches en phosphore obtenus à partir des phosphoprotéides et de l'amidon, peut s'expliquer de deux manières :

a) Cette résistance est due à la nature ou au mode de liaison des acides aminés et des sucres qui entrent dans la composition de ces produits ;

b) la présence des restes phosphoryles inhibe l'action des hydrolases.

Dans le deuxième cas, le départ des groupes phosphoryles, sous l'action d'une phosphatase, devrait permettre une dégradation enzymatique normale.

Pour trancher la question, nous avons commencé par étudier l'action des ferment sur des composés phosphorylés de constitution simple.

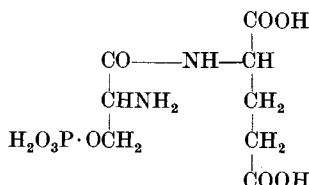
En 1933, *Levene* et *Hill*<sup>2)</sup> ont soumis à une hydrolyse acide ménagée une phospho-peptone de la caséine; ils en ont retiré un dipeptide composé d'acide sérine-phosphorique et d'acide glutamique. Cet acide « *dipeptide-phosphorique* » a été isolé par l'intermédiaire d'un sel de brucine cristallisé, et il représente probablement un composé homogène. La question de l'ordre de liaison des acides aminés n'a pas été éclaircie : la substance de *Levene* et *Hill* peut représenter en effet soit l'acide phospho-séryl-glutamique, soit la glutaminyl-phosphosérine. Pour résoudre cette question, nous avons soumis l'acide dipeptide-phosphorique à l'action de l'acide nitreux : il en résulte l'élimination de la moitié de l'azote. Le produit désaminé a été ensuite isolé ; après hydrolyse acide, nous avons pu y déceler par la réaction d'*Eegriwe-Rapoport*<sup>3)</sup> près de 87 % de la quantité théorique

<sup>1)</sup> *Th. Posternak*, *Helv.* **18**, 1351 (1935).

<sup>2)</sup> *J. Biol. Chem.* **101**, 711 (1933).

<sup>3)</sup> *Bioch. Z.* **289**, 406 (1937).

d'acide glycérique. Le groupe amino libre de la substance primitive faisait donc partie d'un reste de sérine, et l'acide dipeptide-phosphorique de *Levene* et *Hill* représente ainsi l'*acide phospho-séryl-glutamique*.



Nous avons alors soumis l'acide dipeptide-phosphorique à l'action de la dipeptidase contenue dans l'extrait glycériné de la muqueuse intestinale du porc. Pour mesurer l'hydrolyse enzymatique nous avons recouru à la méthode de *van Slyke*. Nous avons constaté que le phospho-dipeptide résiste ou que tout au moins il ne se laisse scinder que très lentement par la dipeptidase; à côté de cette scission, il se produit une minéralisation lente du phosphore due à la présence d'un peu de phosphatase dans notre solution de dipeptidase. Nous pensons que cette déphosphorylation lente rend possible la scission, lente également, de la liaison peptidique par la peptidase, et que le substrat se montrerait encore plus résistant s'il était traité par une peptidase complètement exempte de phosphatase. En effet, si l'on ajoute au mélange dipeptidase-substrat de la phosphatase des reins de porc préparée d'après *H. et E. Albers*<sup>1)</sup> (ne contenant pas de quantité notable de peptidase), on observe que la minéralisation rapide du phosphore qui en résulte s'accompagne parallèlement d'une croissance rapide de l'azote aminé. Si l'on emploie une quantité réduite de phosphatase, on constate que la vitesse de déphosphorylation et la vitesse de scission de la liaison peptidique sont du même ordre de grandeur.

On voit ainsi que la présence de l'acide phosphorique dans le composé de *Levene* et *Hill* protège la liaison peptidique contre l'action de la dipeptidase; dès que le groupe phosphoryle a été éliminé par la phosphatase, le dipeptide se laisse scinder.

Nous avons fait des expériences analogues avec l'*acide tétraose-mono-phosphorique*, obtenu à partir de l'amidon de pommes de terre<sup>2)</sup> (voir plus haut).

Traité par un extrait glycériné de pancréas de porc (amylase  $\alpha$ ) exempt de phosphatase, la substance résiste. Dès qu'on la déphosphoryle au moyen de la phosphatase des reins, elle se laisse scinder par l'amylase. Si la quantité de phosphatase employée est petite, on observe la relation

$$\frac{\text{PM}}{\text{GR}} \sim 1$$

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 232, 193 (1935).

<sup>2)</sup> Th. Posternak, loc. cit.

dans laquelle:  $\Delta\text{GR}$  = augmentation des groupes réducteurs (en équivalents);  $\text{PM}$  = phosphore minéral (en équivalents). Le pouvoir réducteur primitif finit par doubler, ce qui indique la scission du tétraose en deux molécules de maltose. Nous voyons donc que le reste phosphoryle protégeait l'acide tétraose-mono-phosphorique primitif contre l'action amylatique.

*Remarque sur la teneur en phosphore des dextrines résiduelles de Myrbäck.*

Il y a peu de temps, *Myrbäck* et ses collaborateurs<sup>1)</sup> ont affirmé que la formation des dextrines résiduelles de l'amidon serait due entre autres à la présence de phosphore dans le polysaccharide. Ce phosphore, concurremment à d'autres «anomalies de structure», bloquerait l'action des amylases. Cette conclusion se rapproche de celle que nous avons tirée de nos propres observations. Ajoutons cependant que les faits expérimentaux communiqués par *Myrbäck* à l'appui de cette thèse n'entraînent guère la conviction. Ayant fractionné grossièrement les dextrines résiduelles par précipitation au moyen d'alcool, *Myrbäck* constate que les produits de poids moléculaires moyens les plus élevés sont aussi les plus riches en phosphore, et que la majeure partie du phosphore de l'amidon se retrouve dans les dextrines. Il en tire la conclusion que l'action amylatique est inhibée par les restes phosphoryles. Faisons observer que plus tard, *Myrbäck* a limité singulièrement la portée de ses conclusions en indiquant qu'une partie du phosphore des dextrines résiduelles provient de la levure qu'il introduit après l'action de l'amylase pour éliminer les sucres fermentescibles<sup>2)</sup>. D'autre part, il semble que *Myrbäck* n'ait guère cherché à isoler des dextrines résiduelles des produits phospho-organiques purifiés et il n'a pu ainsi apporter la preuve que le phosphore fait réellement partie des composés de poids moléculaires les plus élevés. *Myrbäck* a indiqué d'ailleurs qu'il a obtenu également à partir d'amidons de céréales (blé, maïs) des dextrines résiduelles contenant du phosphore; si ce phosphore provient réellement de l'amidon (et non de la levure) il ne fait pas alors partie de groupes phosphoryles combinés directement aux chaînes des dextrines, mais bien de phosphatides<sup>3)</sup> entraînés sous forme de symplexes et il est très peu probable qu'il puisse bloquer l'action de l'amylase. Pour toutes ces raisons, on ne pouvait tirer aucune conclusion valable de la teneur en phosphore attribuée par *Myrbäck* aux dextrines résiduelles. Pour établir l'inhibition de l'action de l'amylase par les groupes phosphoryles, il fallait s'adresser, comme nous venons de le faire, à un substratum phosphoré de constitution simple.

En résumé, les deux exemples étudiés montrent que *la présence d'un groupe phosphoryle dans le voisinage d'une liaison peptidique ou glucosidique protège cette dernière contre l'action des hydrolases.*

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

##### **Acide dipeptide-phosphorique.**

###### *Préparation.*

Comme produit de départ on a utilisé le sel de calcium d'une phospho-peptone de caséine (de rapport atomique  $\text{N}/\text{P} = 4,4$ ) obtenue par digestion tryptique de la caséine et isolée d'après *S. Posternak*<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Svensk. Kem. Tid. **49**, 216 (1937); Bioch. Z. **297**, 172 (1938).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **303**, 337 (1940); **307**, 49 (1940).

<sup>3)</sup> Th. Posternak, loc. cit.      <sup>4)</sup> C. r. **186**, 1762 (1928).

L'hydrolyse ménagée de cette phospho-peptone par l'acide chlorhydrique 2-n. et l'isolement des produits phospho-organiques ont été effectués d'après la prescription de *Levene* et *Hill*<sup>1)</sup> à ce détail près que l'hydrolysat a été neutralisé au moyen de carbonate de calcium et de lait de chaux et non de baryte. Le produit phospho-organique a donc été isolé finalement sous forme de sel de calcium. On l'a ensuite transformé en sel de brucine.

*Levene* et *Hill* indiquent que la substance obtenue par cristallisation du sel de brucine dans l'acétone représente le dipeptide-phosphate de brucine pur; cependant, les cristaux obtenus sont en réalité des mélanges en proportions variables de dipeptide-phosphate et de sérine-phosphate de brucine. Ceci n'est d'ailleurs pas surprenant, car le sel de brucine de l'acide sérine-phosphorique est doué d'un pouvoir de cristallisation analogue à celui de l'acide dipeptide-phosphorique. Nous avons trouvé que le mélange se laisse séparer en raison de la solubilité plus forte du dipeptide-phosphate dans l'acétone aqueuse.

4 gr. de sel calcique brut ( $N/P = 2,53$ ) sont débarrassés de leur calcium par la quantité strictement nécessaire d'acide oxalique. On ajoute de la brucine en excès, en solution dans l'alcool méthylique. L'excès de brucine est ensuite enlevé par agitation avec du chloroforme; la solution aqueuse est évaporée à sec dans le vide. Le sel de brucine brut pèse 7,5 gr. Il est dissous dans 75 cm<sup>3</sup> d'eau; on introduit en agitant continuellement de l'acétone (280 cm<sup>3</sup>) jusqu'à trouble persistant et on laisse reposer quelques jours à la glacière. Il se produit une cristallisation. La solution-mère est additionnée de nouvelles quantités d'acétone, ce qui provoque l'apparition de nouveaux cristaux. La dernière solution-mère est finalement concentrée dans le vide à un petit volume (30 cm<sup>3</sup>) et additionnée de quelques volumes d'acétone, ce qui amène une dernière cristallisation.

Les premiers cristaux obtenus (1,4 gr.) transformés en sel de baryum suivant la méthode habituelle fournirent un produit de rapport  $N/P = 1,77$ . Les sels de baryum obtenus à partir des dernières fractions avaient par contre un rapport  $N/P = 1,97—2,01$  (rapport théorique pour un dipeptide-phosphate:  $N/P = 2,00$ ).

On peut encore séparer les acides sérine-phosphorique et dipeptide-phosphorique sous forme de leurs sels de baryum: le mélange ( $N/P = 1,77$ ) est dissous dans 40 parties d'eau et on ajoute des quantités croissantes d'alcool; les premiers précipités obtenus sont riches en sérine-phosphate, alors que les dernières fractions représentent le sel de l'acide dipeptide-phosphorique.

40,68 mgr. subst. ont neutralisé (*Kjeldahl*) 1,55 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1-n.

13,56 mgr. subst. ont donné 0,1072 gr. SPBa<sup>2)</sup>

67,80 mgr. subst. ont donné 0,0454 gr. BaSO<sub>4</sub>

(C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub>PBa)<sub>2</sub>Ba      Calculé N 5,43   P 6,02   Ba 40,00%

Trouvé „, 5,33 „, 5,84 „, 39,40%

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **101**, 711 (1933).

<sup>2)</sup> SPBa = sulfo-phosphomolybdate de baryum; voir S. Posternak, Bl. [4] **27**, 507 et 564 (1920).

Désamination.

0,35 gr. de dipeptide-phosphate de baryum sont dissous dans un mélange de 3,5 cm<sup>3</sup> d'eau et de 2,5 cm<sup>3</sup> d'une solution de nitrite de sodium à 30 %. En refroidissant on ajoute lentement 0,7 cm<sup>3</sup> d'acide acétique glacial. On laisse ensuite séjourner 5 minutes à température ordinaire en agitant fréquemment; puis on introduit 20 cm<sup>3</sup> d'alcool à 96 %. Le précipité formé est essoré, lavé à l'alcool à 80 %, puis à l'alcool fort, puis enfin à l'éther. On le purifie en le dissolvant dans l'eau et en le reprécipitant par l'alcool.

Le dipeptide-phosphate de baryum primitif avait, à l'état anhydre, une teneur en azote de 5,61 %; après désamination, la teneur en azote de la substance anhydre était de 2,73 %; calculé pour  $(C_8H_9O_{10}NPBa)_2Ba$ : N 2,71 %.

*Dosage de l'acide glycérique dans l'hydrolysat du produit désaminé.*

Ce dosage a été effectué par la méthode colorimétrique de Eegrive-Rapoport<sup>1)</sup> en comparant les colorations obtenues à partir des deux solutions suivantes (A et B):

*Solution A:* Elle a été préparée en chauffant 30 heures à l'ébullition à reflux 4 cm<sup>3</sup> HCl à 18% et 100 mgr. de sel de baryum de l'acide dipeptide-phosphorique désaminé.

*Solution B:* Comme solution de comparaison B, on utilise non pas une solution d'acide glycérique, mais bien un hydrolysat préparé de la manière suivante: du sérine-phosphate de baryum pur<sup>2)</sup> a été désaminé exactement dans les conditions indiquées plus haut pour l'acide dipeptide-phosphorique. Le sel de baryum de l'acide 3-phospho-glycérique ainsi obtenu (60 mgr.) est traité 30 heures à l'ébullition à reflux par 4 cm<sup>3</sup> HCl à 18%.

Ce mode de procéder a pour but de réduire au minimum l'erreur due à l'action prolongée des acides bouillants sur l'acide phospho-glycérique. L'acide glycérique phosphorylé, surtout lorsqu'il est engagé en combinaison amidée, semble en effet subir, sous l'action des acides, une altération analogue à celle par laquelle la phospho-sérine des phosphopeptides se transforme en acide pyruvique<sup>3)</sup>. Une partie de l'acide glycérique primitivelement présente à l'état combiné se trouve donc détruite.

Des quantités de liquide correspondant à 0,05 cm<sup>3</sup> de chacune des deux solutions A et B sont évaporées à sec au bain-marie bouillant dans des éprouvettes larges et courtes. On ajoute 2 cm<sup>3</sup> d'une solution fraîchement préparée à 0,1% de naphtorésorcine dans l'acide sulfurique concentré et on chauffe une heure au bain-marie bouillant. Après dilution par l'acide sulfurique concentré à 25 cm<sup>3</sup>, on compare les colorations bleues obtenues au colorimètre Dubosq.

0,05 cm<sup>3</sup> de la solution B contiennent 50,6 γ P, ce qui correspond à 173 γ d'acide glycérique. On a trouvé par colorimétrie, dans la solution A, 173 γ également d'acide glycérique; ces 0,05 cm<sup>3</sup> de la solution A contiennent 58,7 γ P, ce qui correspondrait à 200 γ d'acide glycérique (dans l'hypothèse que tout le phosphore de l'acide dipeptide-phosphorique examiné soit combiné à de l'acide glycérique). On a

<sup>1)</sup> Bioch. Z. **289**, 406 (1937).

<sup>2)</sup> Ce produit a été préparé à partir de l'ovotyrosine; voir S. et Th. Posternak, C. r. **184**, 909 (1927); Levene et Lippmann, J. Biol. Chem. **98**, 109 (1932).

<sup>3)</sup> S. et Th. Posternak, C. r. **187**, 313 (1928).

trouvé ainsi 86,5 % de la quantité théorique d'acide glycérique; nous attribuons le déficit à la destruction de l'acide glycérique lors de l'hydrolyse par les acides minéraux bouillants.

#### Action des ferment.

La solution de substrat a été obtenue comme suit: le dipeptide-phosphate de baryum a été traité par la quantité d'acide sulfurique strictement nécessaire pour précipiter tout Ba<sup>++</sup>; après filtrage, le liquide a été neutralisé par la soude caustique jusqu'à p<sub>H</sub> 7,8.

La solution de dipeptidase a été préparée de la manière suivante: une partie de muqueuse intestinale de porc finement divisée est suspendue dans 5 parties de glycérine à 87%. Au bout de quelques semaines de séjour à température ordinaire, on dilue la suspension de 3 volumes d'eau et on centrifuge. L'extrait clair est ensuite additionné de 1/10 de volume d'acide acétique 0,1-n. On éloigne par centrifugation le précipité formé; le liquide clair est ensuite additionné de soude caustique 0,1-n. jusqu'à p<sub>H</sub> 7,8.

La phosphatase des reins de porc a été préparée d'après la méthode de A. et E. Albers<sup>1)</sup>. Comme nous avons pu le constater, elle ne contient pas de quantité notable de peptidase.

#### Action de la dipeptidase.

*En présence de phosphatase des reins:*

Série I. — 1) 4 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptide-phosphate (contenant par cm<sup>3</sup> 1,445 mgr. P et 1,305 mgr. N dont 48% à l'état aminé) + 12 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase + 15 mgr. de phosphatase (210 P.E.)<sup>2)</sup>. p<sub>H</sub> = 7,8.

2) 4 cm<sup>3</sup> d'eau + 12 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase + 15 mgr. de phosphatase. p<sub>H</sub> = 7,8.

Série II. — 1) 7 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptide-phosphate (contenant par cm<sup>3</sup> 0,966 mgr. N dont 51,7% à l'état aminé et 1,096 mgr. P) + 21 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase + 7 mgr. de phosphatase (100 P.E.). p<sub>H</sub> = 7,8.

2) 7 cm<sup>3</sup> d'eau + 21 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase + 7 mgr. de phosphatase. p<sub>H</sub> = 7,8.

*En l'absence de phosphatase des reins:*

Série III. — 1) 2 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptide-phosphate (contenant par cm<sup>3</sup> 1,445 mgr. P et 1,305 mgr. N dont 48% à l'état aminé) + 6 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase. p<sub>H</sub> = 7,8.

2) 2 cm<sup>3</sup> d'eau + 6 cm<sup>3</sup> de solution de dipeptidase. p<sub>H</sub> = 7,8.

Les 3 séries ont été mises à l'étuve à 35°; les p<sub>H</sub> se maintiennent suffisamment constants pendant les expériences pour qu'il soit inutile d'introduire des mélanges tampons.

Les chiffres des essais 2) ont été soustraits des chiffres correspondants des essais 1).

On voit qu'en l'absence de phosphatase des reins (série III), il ne se produit qu'une déphosphorylation lente due à la présence de phosphatase intestinale à côté de la dipeptidase. L'augmentation de l'azote aminé (action de la dipeptidase) est alors lente également. En présence de phosphatase des reins, par contre (séries I et II), la minéralisation rapide du phosphore s'accompagne d'une augmentation également de l'azote aminé (voir tableau p. 928).

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 232, 193 (1935).

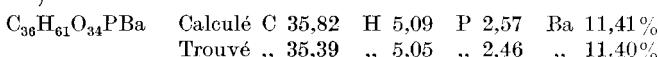
<sup>2)</sup> P.E. = Phosphatase-Einheit, voir Albers, loc. cit.

Tableau 1.

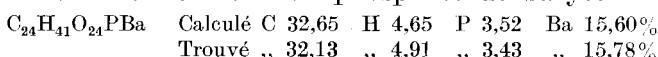
Série	Phosphatase des reins (nombre de P.E. par cm <sup>3</sup> )	Temps en minutes	$\Delta \text{NH}_2\text{-N}$ augmentation de N aminé (en % de N du substrat)	PM = P minéral en % de P du substrat	$\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}}$ (en atomes)
I	13	0	0,0	0,0	—
		170	24,7	81,0	0,61
		540	39,5	89,1	0,89
II	3,5	0	0,0	0,0	—
		150	11,8	39,4	0,60
		330	21,2	50,4	0,83
		1290	32,9	80,1	0,81
III	0	0	0,0	0,0	—
		540	6,5	7,8	1,66

**Acides polyose-monophosphoriques.**

Nous avions à notre disposition sous forme de sels de baryum deux échantillons d'acides polyose-monophosphoriques qui avaient été préparés il y a quelques années par l'un de nous, à partir de la féculle de pommes de terre<sup>1</sup>). Les deux produits ne s'étaient pas altérés: ils ne contenaient pas d'acide phosphorique minéral et leur pouvoir réducteur était resté constant. L'un des deux échantillons avait la composition et les propriétés d'un hexaoose-mono-phosphate de baryum,



l'autre, celles d'un tétraose-monophosphate de baryum



Pour préparer les solutions de substrats, on a débarrassé les deux sels des ions baryum par la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique et on a neutralisé ensuite par la soude caustique.

La solution d'amylase pancréatique a été préparée comme suit: on traite durant 10 heures à 35° une partie de pancréas de porc desséché et dégraissé (à l'acétone et à l'éther) par 16 parties de glycérine à 87%; la suspension est additionnée ensuite de 5 volumes d'eau et filtrée<sup>2</sup>).

Les dosages de groupes réducteurs ont été effectués d'après Willstaetter-Schudel.

La solution d'amylase pancréatique ne contient pas de phosphatase en quantité notable; elle contient, par contre, une petite quantité de maltase. Nous avons donc soustrait des pouvoirs réducteurs constatés au cours de nos expériences une « correction de maltase »; elle correspondait à la moitié de la scission qu'aurait subie le maltose formé à partir des polyoses s'il avait été présent dès le début de l'expérience. Cette scission a été établie dans des essais spéciaux que nous renonçons à décrire en détail en soumettant dans nos conditions d'expériences une solution de maltose à l'action de l'enzyme.

<sup>1)</sup> Th. Posternak, Helv. **18**, 1361 (1935); on y trouvera des détails relatifs à la préparation et aux propriétés de ces phospho-polyoses.

<sup>2)</sup> Willstaetter et coll., Z. physiol. Ch. **126**, 143 (1923).

*Acide hexaose-monophosphorique.*

A) *Traitements par l'amylase seule.*

1)  $4 \text{ cm}^3$  d'une solution d'hexaose-mono-phosphate de sodium (contenant 0,766 mgr.P par  $\text{cm}^3$ ) +  $11,75 \text{ cm}^3$  de solution-tampon 0,2-n. acétate de sodium-acide acétique de  $P_H 6,6 + 1,25 \text{ cm}^3$  de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  à 1% +  $1 \text{ cm}^3$  NaCl 0,2-n. +  $2 \text{ cm}^3$  de solution d'amylase (0,9 A.E.)<sup>1)</sup>.

2) Comme en 1) mais en remplaçant les  $4 \text{ cm}^3$  de solution de substrat par  $4 \text{ cm}^3$  d'eau.

Laissé à l'étuve à  $35^\circ$ , prélevé pour les dosages de groupes réducteurs d'après Willstaetter-Schudel  $2,5 \text{ cm}^3$ ; soustrait les chiffres de l'essai 2) des chiffres correspondants de l'essai 1):

Tableau 2.

Temps en minutes	Nombre $\text{cm}^3$ I 0,1-n. consommés (avec correction de maltase)
0	0,250
240	0,485
600	0,475

On voit que le pouvoir réducteur primitif a presque doublé au bout de 4 heures, ce qui correspond à une scission du phospho-hexaose en phospho-tétraose et maltose. Par la suite, le pouvoir réducteur n'a plus augmenté.

B) *Addition de phosphatase.*

Au bout de 4 heures de séjour à l'étuve, on ajoute à  $15 \text{ cm}^3$  de chacun des deux mélanges précédents 1) et 2) 10 mgr. de phosphatase<sup>2)</sup> de reins de porc (200 P.E.). On laisse à l'étuve à  $35^\circ$ .

Les chiffres de l'essai 2) sont soustraits de ceux de l'essai 1).

Tableau 3.

Temps en minutes	Nombre $\text{cm}^3$ I 0,1-n. consommés par $2,5 \text{ cm}^3$ de liquide		P minéral		$\frac{PM}{A GR}$ <sup>3)</sup> (en équivalents)
	Sans correction de maltase	Avec correction de maltase	en mgr. dans $2,5 \text{ cm}^3$ de liquide	en % du P du substrat	
0	0,485	0,485	0,00	0,0	—
150	0,60	0,60	0,172	44,9	0,97
330	0,705	0,68	0,303	79,3	1,00
1050	0,845	0,74	0,378	98,7	0,96

<sup>1)</sup> A.E. = Amylase-Einheit, voir Willstaetter et coll., loc. cit.

<sup>2)</sup> Nous avons constaté préalablement par des essais spéciaux que la phosphatase employée est presque exempte d'amylase.

<sup>3)</sup> PM = phosphore minéral; A GR = augmentation des groupes réducteurs (avec correction de maltase).

Au cours de cette expérience le pouvoir réducteur a augmenté finalement de pres de moitié, alors que la minéralisation du phosphore était presque quantitative. Cela signifie que, sous l'action simultanée de la phosphatase et de l'amylase, le phospho-tétraose a été scindé en acide phosphorique minéral et en deux molécules de maltose. Le phospho-hexaose primitif se trouve alors décomposé en 3 molécules de maltose et en acide phosphorique.

*Acide tétraose-monophosphorique.*

**A) Traitement par l'amylase seule.**

1)  $2 \text{ cm}^3$  de solution de tétraose-phosphate de sodium (contenant 1,112 mgr. P par  $\text{cm}^3$ ) +  $5,5 \text{ cm}^3$  de solution-tampon 0,2-n. acétate de sodium-acide acétique de  $\text{pH}$  6,6 +  $0,5 \text{ cm}^3$  NaCl 0,2-n. +  $1 \text{ cm}^3$  d'eau +  $1 \text{ cm}^3$  de solution d'amylase (0,45 A.E.).

2) Comme en 1) mais en remplaçant les  $2 \text{ cm}^3$  de solution de substrat par  $2 \text{ cm}^3$  d'eau.  
Laissé à l'étuve à  $35^\circ$ .

Le pouvoir réducteur de  $2,5 \text{ cm}^3$  de 1) diminué de celui de  $2,5 \text{ cm}^3$  du témoin 2) est au début de  $0,35 \text{ cm}^3$  I 0,1-n. Au bout de 22 heures, il n'a pas augmenté; pas de formation de phosphore minéral.

**B) Traitement simultané par l'amylase et la phosphatase.**

1)  $4 \text{ cm}^3$  de solution de tétraose-monophosphate de sodium (contenant 1,112 mgr. P par  $\text{cm}^3$ ) +  $11 \text{ cm}^3$  de solution-tampon 0,2-n. acétate de sodium-acide acétique de  $\text{pH}$  6,6 +  $1 \text{ cm}^3$  NaCl 0,2-n. +  $1 \text{ cm}^3$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  à 1% +  $1 \text{ cm}^3$  suspension de phosphatase de reins de porc (150 P.E.) +  $2 \text{ cm}^3$  de solution d'amylase (0,9 A.E.).

2) Comme en 1), mais en remplaçant la solution de substrat par  $4 \text{ cm}^3$  d'eau.  
Laissé à l'étuve à  $35^\circ$ . Les chiffres de l'essai 2) sont soustraits de ceux de l'essai 1).

Tableau 4.

Temps en heures	Nombre $\text{cm}^3$ I 0,1-n. consommés par $2,5 \text{ cm}^3$ de liquide		P minéral		$\frac{\text{PM}}{\Delta \text{GR}}^{-1}$ (en équivalents)
	Sans correction de maltase	Avec correction de maltase	en mgr. dans $2,5 \text{ cm}^3$ de liquide	en % du P du substrat	
0	0,35	0,35	0,00	0,0	—
3	0,44	0,44	0,169	30,4	1,21
7	0,50	0,50	0,271	48,7	1,16
10	0,55	0,55	0,346	62,2	1,12
22	0,72	0,65	0,479	86,2	1,03

Ici encore, la minéralisation du phosphore permet la scission du polyose sous l'action de l'amylase.

Genève, Laboratoire de Chimie organique et inorganique  
de l'Université.

<sup>1)</sup> PM = phosphore minéral;  $\Delta$  GR = augmentation des groupes réducteurs (avec correction de maltase).