

96. Recherches sur l'amidon. XXVI.
Sur la phosphorylase de pommes de terre
par Kurt H. Meyer et Cl. de Traz.
(1 IV 44)

J.-K. Parnas et Baranowski¹⁾ découvrirent en 1936 qu'un extrait de purée musculaire, autolysé et dialysé, soumis à l'incubation en présence de glycogène et de phosphore inorganique, provoquait la formation d'un hexose mono-phosphorylé.

Cori et ses collaborateurs²⁾³⁾ déterminèrent la nature de cet hexose: ester glucopyranose-1-phosphorique, connu depuis sous le nom d'ester de Cori. Parnas proposa le terme de „phosphorolyse“ pour cette dégradation, les éléments de l'acide phosphorique, en effet, intervenant d'une manière analogue à ceux de l'eau lors d'une hydrolyse, et le nom de „phosphorylase“ pour l'enzyme en question. Plus tard Tankó⁴⁾ et Hanes⁵⁾ trouvèrent des enzymes phosphorolytiques dans plusieurs plantes, p. ex. dans les pois et dans les pommes de terre. La phosphorylase de pommes de terre, découverte par Hanes, fait l'objet de notre travail. Nous avons essayé de la purifier; quoique le travail ne soit pas encore terminé, nous publions nos résultats parce que nous avons été obligés d'interrompre nos recherches.

Test d'activité de la phosphorylase.

On suit la libération du phosphore à partir de l'ester de Cori; comme le résultat peut être faussé par la présence de phosphatase, nous ajoutons du fluorure de potassium qui supprime l'action de la phosphatase de pommes de terre.

Nous avons vérifié le phénomène de la période d'induction décrit par Cori et d'autres auteurs, au moyen d'une préparation de phosphorylase dialysée, ne se colorant pas à l'iode (courbe I). L'addition d'une petite quantité d'amidon de Zulkowsky supprime la période d'induction et permet d'obtenir une courbe droite (fig. 1, courbes II, III).

Mode opératoire: A. Substrat. — 700 mg du sel dipotassique⁶⁾ (+ 2 H₂O de crist.) de l'ester glucose-1-phosphorique sont dissous dans un peu d'eau; on ajoute 2 cm³ de

¹⁾ J. K. Parnas et T. Baranowski, C. r. Soc. Biol. **120**, 307 (1936) ainsi que **120**, 282 (1936).

²⁾ C. F. Cori, G. T. Cori et S. P. Colowick, J. Biol. Chem. **119**, XIX (1937).

³⁾ C. F. Cori, S. P. Colowick et G. T. Cori, J. Biol. Chem. **121**, 465 (1937).

⁴⁾ B. Tankó, Biochem. J. **30**, 692 (1936).

⁵⁾ C. S. Hanes, Proc. Roy. Soc. (London) [B] **129**, 174 (1940).

⁶⁾ L'emploi du sel barytique a dû être écarté en raison de la teneur plus ou moins grande en sulfate d'ammonium de la plupart de nos préparations enzymatiques.

tampon acétate-acétique n, de p_H 6, 10 cm³ d'une solution de KF 0,1-n, acidifie jusqu'à p_H 6 (18 gouttes de CH₃COOH 2-n) et complète à 100 cm³. Cette solution se conserve un mois à la glacière avec quelques gouttes de toluène. On fait, par ailleurs, une solution aqueuse de 4 mg. d'amidon de Zulkowsky par cm³ (ne peut être conservée, à la glacière, que 4—5 jours, avec toluène).

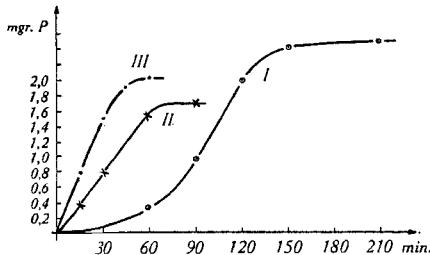


Fig. 1.

- I Pas d'adjonction d'amidon de Zulkowsky.
II Adjonction de 0,12 % amidon de Zulkowsky.
III Adjonction de 0,24 % amidon de Zulkowsky.

B. Incubation. — On introduit 9 cm³ de la solution d'ester de Cori dans une éprouvette, y ajoute 0,5 cm³ de la solution d'amidon de Zulkowsky et abandonne 15 minutes au thermostat à 35°. On pipette alors 0,5 cm³ de la solution de phosphorylase à examiner. On prélève à la 20^e minute un échantillon de 2 cm³ que l'on écoule immédiatement dans 2 cm³ d'une solution à 10% d'acide trichloracétique; on porte le volume à 5 cm³ après 10 minutes de repos, passe sur papier-filtre ordinaire et dose photométriquement le P minéral d'après King¹⁾.

Il ne faut pas dépasser une libération de P de 1,8 mgr. dans la solution soumise à l'incubation. Pour vérifier si la quantité de P libérée dans un temps donné est bien proportionnelle à la concentration de l'enzyme²⁾, nous avons procédé à l'essai suivant:

Une préparation, prise comme témoin, nous a donné, pour différentes concentrations, en 20 minutes:

½ cm ³ enzyme conc. 1/1	1,6 mgr. P.
½ cm ³ enzyme conc. 1/2	0,8 mgr. P.
½ cm ³ enzyme conc. 1/4	0,37 mgr. P.
½ cm ³ enzyme conc. 1/8	0,19 mgr. P.

Purification de la phosphorylase.

L'unité d'activité est la suivante:

Gp = activité rapportée au poids d'enzyme³⁾, soit les mgr. de P minéral dégagés en 20 minutes par 1 mgr. de substance active.

La source de phosphorylase est constituée par des pommes de terre de variétés courantes; l'activité des tubercules employés s'est montrée assez constante. Nous avons écarté les pommes de terre nouvelles: un dosage comparatif nous avait en effet fourni les résultats suivants (juin 1943):

Pommes de terre de l'année: Gp = 0,065
Pommes de terre nouvelles: Gp = 0,046

¹⁾ J. King, Biochem. J. 26, 292 (1932).

²⁾ G. T. Cori et C. F. Cori, J. Biol. Chem. 135, 733 (1940).

³⁾ Obtenu par dessication au bain-marie, dans un creuset de platine, de 5—10 cm³ de solution, dialysée préalablement en cas de présence éventuelle de sels.

Première étape de purification: Des pommes de terre saines sont pelées, traitées à la machine à hacher, et la purée obtenue passée à travers une presse à bras. 5 kg. de tubercules fournissent ainsi environ 2 litres de jus brut.

Le jus est ensuite dialysé 24 heures contre l'eau ordinaire courante, puis concentré par congélation jusqu'à teneur en résidu sec de 4%, et centrifugé. Cette première opération amène un enrichissement de 2-3 fois, et élimine la plus grande partie des sucres et des sels contenus dans le jus brut. Produit obtenu: N° 1, Gp = 0,11-0,12.

Green et Stumpf¹⁾ avaient signalé l'instabilité de la phosphorylase de pommes de terre au contact de l'alcool et de l'acétone; nous avons vérifié ce fait et dû renoncer à l'emploi de ces précipitants — au premier stade de purification tout au moins.

Nous nous sommes adressés alors au sulfate d'ammonium, en solution saturée à 0° C.²⁾. Après de nombreux essais nous avons adopté définitivement les conditions suivantes:

300 cm³ de N° 1 (teneur 4%) sont additionnés de 255 cm³ de sulfate d'ammonium de pH 6; le précipité, centrifugé 10 minutes à 3000 tours, est jeté, la liqueur surnageante est additionnée de 70 cm³ de la même solution de sulfate d'ammonium; la liqueur est jetée, le précipité repris par l'eau. Solution N° 2: Elle contient 5% de la substance sèche (presque exclusivement des protéines) et 50% de l'activité. L'enrichissement est donc de 10 fois; Gp = 1,05.

Dialyse et seconde précipitation au sulfate d'ammonium: La solution est dialysée 24 heures contre l'eau ordinaire courante, centrifugée, dialysée 24 heures contre l'eau distillée renouvelée, et centrifugée. Le rendement en activité est de 90%.

100 cm³ de N° 2 sont additionnés goutte à goutte de 150 cm³ de sulfate d'ammonium saturé à 0°, de pH 6,8 sous agitation moyenne. On centrifuge. Le précipité est éluté 20 minutes par 30 cm³ de sulfate d'ammonium 0,55 sat. de pH 6,8; la liqueur est jetée. Le résidu est éluté avec 30 cm³ de sulfate d'ammonium 0,4 sat.; la liqueur contient 33% des protéines et 66% de l'activité (sol. N° 3); enrichissement 2 fois, Gp = 2.

Tandis que les préparations moins purifiées perdent plus ou moins leur activité, cette solution est stable au froid. Elle est désactivée en 4 jours par dialyse contre l'eau distillée. La dessication par évaporation dans le vide désactive l'enzyme; une solution active, chauffée à 60°, perd son activité au bout d'une heure. La sensibilité envers la variation du pH est démontrée par la fig. 2; un séjour d'une heure à 18° de l'enzyme dans une solution du pH de l'abscisse donne l'activité indiquée sur la courbe. Pour le dosage de l'activité, le pH 6 est rétabli. Nos résultats confirment ceux de *Green et Stumpf*.

Le produit N° 3 contient encore une phosphatase s'attaquant au glycérophosphate, mais non pas au glucose-1-phosphate. La solution de glucose-1-phosphate soumise à l'action de N° 3 ne donne pas de coloration bleue à l'iode avant qu'une quantité appréciable de phosphore soit libérée. Nous croyons qu'il se forme d'abord un amylose de poids moléculaire bas (dextrine) et ne donnant pas la réaction à l'iode.

Laboratoires de Chimie inorganique et organique
de l'Université de Genève.

¹⁾ D. E. Green et P. K. Stumpf, J. Biol. Chem. 140, XLVII (1941).

²⁾ Nous préparons une telle solution comme suit: sursaturation à chaud par du sulfate d'ammonium crist. pur., en un grand bêcher contenant de l'eau distillée; abandonner une nuit; filtrer les cristaux. L'ajustage du pH se fait par NH₃ n de la manière suivante: pour pH 6, 0,45% en volume de NH₃; pour pH 6,8, 1% en volume de NH₃. La solution est gardée à 0°.

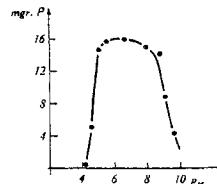


Fig. 2.