

228. Sur les enzymes amylolytiques VI¹⁾.

L'isophosphorylase

par P. Bernfeld et A. Meutémédian.

(1 IX 48)

La découverte du glucose-1-phosphate par *Cori*, les travaux de *Cori*, ceux de *Hanes*, de *Kiessling*, de *Schäffner*, et ceux de *Parnas* sur la transformation du glucose-1-phosphate en glycogène ou amidon: glucose-1-phosphate \rightleftharpoons glycogène (ou amidon) + phosphate, sont les travaux fondamentaux effectués dans le domaine de la synthèse biologique des polyglucosanes. L'enzyme qui intervient dans la formation de ces polysaccharides est la phosphorylase.

L'action de la phosphorylase de muscle cristallisée ou de la phosphorylase de pomme de terre purifiée, sur le glucose-1-phosphate, ne produit pourtant ni du glycogène ni de l'amidon (amylopectine), mais un polysaccharide non ramifié du type de l'amylose, contenant uniquement des liaisons α -1,4-glucosidiques²⁾. D'autre part, des polysaccharides ramifiés, ressemblant au glycogène, sont formés par l'action d'extraits bruts de muscle³⁾, de levure⁴⁾ ou d'extraits bruts de cœur, de cerveau et de foie⁵⁾ sur le glucose-1-phosphate.

Quelle différence y a-t-il entre la synthèse des polysaccharides ramifiés et celle de l'amylose? *Meyer* et *Bernfeld*⁶⁾ ont démontré en 1942 que la levure contient un enzyme qui scinde, par action phosphorolytique, les liaisons α -1,6-glucosidiques terminales de la dextrine résiduelle. Ils admettent que l'action de cet enzyme est réversible, c'est-à-dire que cet enzyme est aussi capable de former des liaisons α -1,6-glucosidiques. Ces auteurs concluent que la synthèse des polysaccharides ramifiés est le résultat de l'action simultanée de deux enzymes différents: l'un est la phosphorylase dont la spécificité pour les liaisons α -1,4-glucosidiques est connue, et l'autre une phosphorylase spécifique pour les liaisons α -1,6-glucosidiques. En effet, en 1943, *Cori* trouve dans les extraits de foie et de cœur un

¹⁾ V^{me} communication, *Helv.* **31**, 1423 (1948).

²⁾ *W. Z. Hassid, G. T. Cori et R. M. McCready*, *J. Biol. Chem.* **148**, 89 (1943); *C. S. Hanes*, *Proc. Roy. Soc. London [B]* **128**, 421 (1940); **129**, 174 (1940).

³⁾ *W. Kiessling*, *Biochem. Z.* **302**, 50 (1939).

⁴⁾ *A. Schäffner et H. Specht*, *Naturwiss.* **26**, 494 (1938); *W. Kiessling*, *Naturwiss.* **27**, 129 (1939).

⁵⁾ *G. T. Cori et C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **135**, 733 (1940); *R. S. Bear et C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **140**, 111 (1941).

⁶⁾ *K. H. Meyer et P. Bernfeld*, *Helv.* **25**, 399 (1942); **25**, 404 (1942); *K. H. Meyer*, *Adv. Enzymol.* **3**, 109 (1943).

enzyme qu'il appelle *branching factor*¹⁾. Il constate que l'action commune de ce *branching factor* et de la phosphorylase de muscle cristallisée sur le glucose-1-phosphate provoque la formation de glycogène. En 1944, *Haworth, Peat* et *Bourne*²⁾ annoncent l'existence d'un enzyme semblable dans la pomme de terre, qu'ils appellent «Q-enzyme»³⁾. Leur «Q-enzyme» possède en outre une action α -amylatique⁴⁾.

Dans le présent travail, nous avons entrepris une étude de l'enzyme responsable de la formation et de la scission des liaisons α -1,6-glucosidiques⁵⁾.

Nous proposons d'appeler cet enzyme ou ce groupe d'enzymes «*isophosphorylase*». Car, comme nous allons le montrer par la suite, son action est analogue à celle de la phosphorylase.

Méthode d'identification et de dosage de l'isophosphorylase.

Nous nous sommes servis de la méthode décrite par *Meyer* et *Bernfeld* en 1942⁶⁾. Le principe en est le suivant: en faisant agir de l'isophosphorylase sur de la dextrine résiduelle, produit final de la dégradation β -amylatique de l'amylopectine (structure, voir figure 1), des liaisons terminales α -1,6-glucosidiques sont scindées si du phosphate minéral est présent. Des chaînes α -1,4-glucosidiques, protégées jusqu'ici contre l'action β -amylatique par la présence d'une ramification, peuvent maintenant être dégradées par la β -amylase.

Nous faisons donc agir un mélange d'isophosphorylase et de β -amylase sur la dextrine résiduelle en présence de phosphate, et nous déterminons la quantité de maltose libéré par l'action combinée de ces deux enzymes. Simultanément, nous effectuons un essai parallèle dans les mêmes conditions, mais sans addition de phosphate minéral. L'isophosphorylase ne pouvant pas réagir en absence de phosphate, une augmentation du pouvoir réducteur dans ces conditions indique la présence d'une α -amylase⁷⁾. Le tableau 1 rapporte les résultats d'un essai de dosage de l'isophosphorylase.

La faible dégradation de la dextrine résiduelle sans addition de phosphate (tableau 1, dernière colonne) est due ici à la présence de faibles traces de phosphate dans les solutions de dextrine résiduelle, de β -amylase et d'isophosphorylase. Notre isophosphorylase ne contient pas d' α -amylase, comme nous allons le montrer plus bas.

1) *G. T. Cori* et *C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **151**, 57 (1943).

2) *W. N. Haworth*, *S. Peat* et *E. J. Bourne*, *Nature* **154**, 236 (1944).

3) *E. Bourne* et *S. Peat*, *Soc.* **1945**, 877; *E. Bourne*, *A. Macey* et *S. Peat*, *Soc.* **1945**, 882.

4) *S. Peat*, *E. Bourne* et *S. A. Barker*, *Nature* **161**, 127 (1948).

5) Communication préliminaire: *P. Bernfeld* et *A. Meutémédian*, *Nature* **162**, 297 (1948).

6) *K. H. Meyer* et *P. Bernfeld*, *Helv.* **25**, 399 (1942).

7) *P. Bernfeld* et *P. Gürtler*, *Helv.* **31**, 106 (1948).

Tableau 1.

Solution d'isophosphorylase ajoutée	Dégradation de la dextrine résiduelle par la β -amylase	
	avec addition de phosphate minéral	sans addition de phosphate minéral
0 cm ³	0 %	0 %
0,3 cm ³	4,5%	0,7%
0,5 cm ³	7,5%	1,2%

Durée de l'essai: 2 heures; $t = 20^{\circ}$; $p_H = 6,6$.

On voit que la différence entre la valeur réductrice en présence de phosphate et celle en absence de phosphate minéral est proportionnelle à la concentration de l'isophosphorylase.

Il est évident que cette méthode de dosage est spécifique pour une phosphorylase s'attaquant aux liaisons α -1,6-glucosidiques.

La méthode utilisée par Cori¹⁾ pour identifier son «*branching factor*» est basée sur le fait que la vitesse de réaction catalysée par la phosphorylase (formation de polysaccharides à partir du glucose-1-phosphate) dépend dans une certaine limite de la quantité de groupes terminaux non réducteurs du polysaccharide déjà présent²⁾. En créant de nouvelles ramifications et, partant, de nouveaux groupes terminaux non réducteurs, l'action de l'isophosphorylase a pour effet d'augmenter la vitesse de réaction de la phosphorylase. Cette augmentation progresse autocatalytiquement. Cependant, la présence d'une α -amylase a le même effet. Car, son action augmente également le nombre des groupes terminaux. Cette méthode ne permet donc pas de distinguer l'action d'une α -amylase de celle de l'isophosphorylase.

La préparation de l'isophosphorylase.

Comme matériel de départ pour la préparation d'isophosphorylase, nous avons choisi le suc de pomme de terre. Nous avons mis au point une méthode qui permet d'obtenir l'isophosphorylase de pomme de terre très enrichie et exempte de phosphorylase et d' α -amylase.

La préparation et la purification se font en six stades: 1^o obtention d'un suc de pomme de terre après inhibition par l'acide cyanhydrique de la polyphénoloxydase³⁾; 2^o élimination du phosphate minéral; 3^o précipitation de l'isophosphorylase à p_H 7 par l'acétone à 32%; 4^o élimination d'impuretés solubles dans l'eau pure (α -amylase, phosphatases, autres protéines facilement solubles, acétone, sels, etc.) par des lavages répétés du précipité à l'eau pure; 5^o extraction de l'isophosphorylase par une solution saline à p_H 10; 6^o obtention d'une poudre sèche par congélation à -70° et sublimation de la glace. On obtient ainsi une poudre blanche, soluble dans l'eau, contenant des protéines et beaucoup de sels et dont l'activité isophosphorolytique persiste pendant plusieurs semaines à 0° .

¹⁾ G. T. Cori et C. F. Cori, J. Biol. Chem. **151**, 57 (1943).

²⁾ G. T. Cori, M. A. Swanson et C. F. Cori, Federation Proceedings **4**, 234 (1945); M. A. Swanson et C. F. Cori, J. Biol. Chem. **172**, 815 (1948).

³⁾ F. Kubowitz, Biochem. Z. **292**, 221 (1937); **299**, 32 (1938).

Pureté enzymatique de notre isophosphorylase.

Notre isophosphorylase ne contient pas de phosphatases, puisque son action sur le glycérophosphate est nulle. En outre, elle est exempte d' α -amylase. En effet, un empois d'amidon ne subit aucune diminution de sa viscosité en présence de notre enzyme. D'autre part, notre isophosphorylase ne contient pas de phosphorylase¹⁾, car la quantité de phosphate qu'elle libère à partir du glucose-1-phosphate en présence de glycogène ou d'amylose est la même en absence et en présence de phloridzine. Si notre enzyme contenait de la phosphorylase, celle-ci serait inhibée par la phloridzine et l'action sur le glucose-1-phosphate serait plus faible en présence de cet inhibiteur qu'en son absence (voir aussi communication suivante²⁾).

L'action de l'isophosphorylase.

1° *Phosphorolyse*: la faculté de l'isophosphorylase de scinder des liaisons α -1,6-glucosidiques par phosphorolyse est prouvée par son comportement vis-à-vis de la dextrine résiduelle. Notre méthode de dosage est, en effet, spécifique pour une telle action. Cependant, cette action semble être limitée aux liaisons α -1,6-glucosidiques se trouvant dans le voisinage immédiat de liaisons α -1,4-glucosidiques, comme

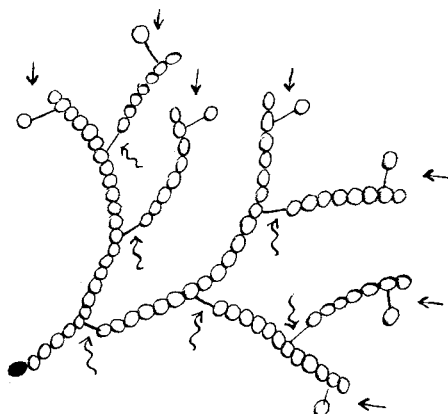


Fig. 1.

Dextrine résiduelle.

- Reste de glucose.
- Liaisons α -1,4-glucosidiques.
- Liaison α -1,6-glucosidique.
- Groupe terminal réducteur.
- Liaison pouvant être scindée par l'isophosphorylase.
- ~~~~ Liaison ne pouvant pas être scindée par l'isophosphorylase.

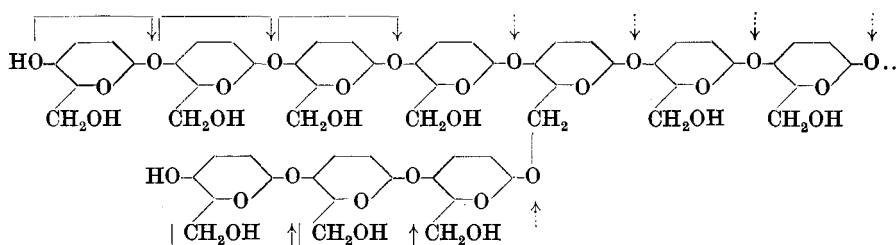
¹⁾ Voir aussi *S. Hestrin*, *Brewers Digest* **23**, 46 (1948).

²⁾ *Helv.* **31**, 1735 (1948).

c'est le cas dans la dextrine résiduelle (voir figure 1). Nous avons, en effet, trouvé que l'isophosphorylase n'attaque pas du tout un polysaccharide ne contenant que des liaisons α -1,6-glucosidiques, comme le dextrane de bactérie¹⁾.

En outre, l'action phosphorolytique de l'isophosphorylase est limitée aux seules liaisons α -1,6-glucosidiques *terminales*. Car nous trouvons qu'un empois d'amidon ne subit aucune diminution de sa viscosité en présence de notre isophosphorylase. Celle-ci ne peut donc pas scinder des liaisons situées à l'intérieur de la molécule d'amylopectine ou de dextrine résiduelle (voir figure 1).

Ce comportement de l'isophosphorylase est tout à fait analogue à celui de la phosphorylase. En effet, ce dernier enzyme ne détache que les restes de glucose *terminaux* non réducteurs²⁾. Il ne possède, en revanche, aucune action sur la dextrine résiduelle.



Action de la phosphorylase sur l'amylopectine.

—↓ Ces liaisons peuvent être scindées, l'une après l'autre, par la phosphorylase.

.....→ Ces liaisons ne peuvent pas être scindées par la phosphorylase de pomme de terre.

Ce mode d'action de la phosphorylase de pomme de terre a été récemment confirmé par *Katz, Hassid* et *Doudoroff*³⁾, ainsi que par *Swanson*⁴⁾.

2° *Synthèse*: aucune réaction n'a lieu quand on met l'isophosphorylase en contact avec du glucose-1-phosphate. Ceci n'est pas étonnant puisque, inversement, cet enzyme n'exerce aucune action phosphorolytique sur un polysaccharide possédant uniquement des liaisons α -1,6-glucosidiques (dextrane). Par contre, en présence d'amylose ou de glycogène, l'isophosphorylase libère du phosphate à partir du glucose-1-phosphate. L'action synthétisante de l'isophosphorylase ne s'effectue donc qu'en présence de polysaccharides ou d'oligosaccharides possédant des liaisons α -1,4-glucosidiques. Elle constitue ainsi la réaction inverse de la phosphorolyse des liaisons α -1,6-glucosidiques

¹⁾ *W. Z. Hassid* et *H. A. Barker*, *J. Biol. Chem.* **134**, 163 (1940); nous remercions *M. le Prof. Hassid* d'avoir bien voulu mettre à la disposition de notre laboratoire un échantillon de dextrane.

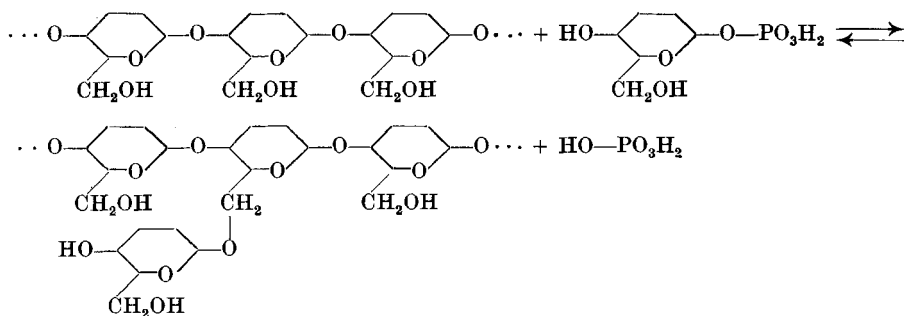
²⁾ *K. H. Meyer* et *P. Bernfeld*, *Helv.* **25**, 399 (1942).

³⁾ *J. Katz*, *W. Z. Hassid* et *M. Doudoroff*, *Nature* **161**, 96 (1948).

⁴⁾ *M. A. Swanson*, *J. Biol. Chem.* **172**, 805 (1948).

terminales de la dextrine résiduelle. La réaction catalysée par l'isophosphorylase est donc réversible.

3° *Schéma de la réaction*: en combinant les phénomènes décrits, nous arrivons au schéma suivant de la réaction catalysée par l'isophosphorylase:



Cette réaction est tout à fait analogue à celle catalysée par la phosphorylase¹⁾.

Action simultanée de l'isophosphorylase et de la phosphorylase.

En faisant agir un mélange de ces deux enzymes sur le glucose-1-phosphate, on obtient un polysaccharide donnant une coloration violacée, violette ou pourpre avec l'iode (voir communication suivante) L'action de la phosphorylase seule produit, comme on le sait, un polysaccharide donnant une coloration bleue avec l'iode.

D'autre part, en faisant agir le mélange des deux enzymes sur l'amylose, on observe qu'en présence de phosphate minéral la coloration à l'iode de la solution du polysaccharide subit un changement. Elle est bleue au début (amylose) et correspond à la couleur du tube n° 1 de l'échelle de comparaison²⁾. Après quelque temps, elle passe

Tableau 2.

Durée en heures	En présence de phosphate 1,35 P/amylose*)		En absence de phosphate < 0,01 P/amylose*)	
	Coloration à l'iode et N° de l'échelle des couleurs	Limite de dégradation par la β -amylase	Coloration à l'iode et N° de l'échelle des couleurs	Limite de dégradation par la β -amylase
0	bleu 1	100%	bleu 1	100%
24	violet 5		bleu 1	
72	pourpre 7		bleu 1	
144	pourpre 7	85%	bleu 1	100%

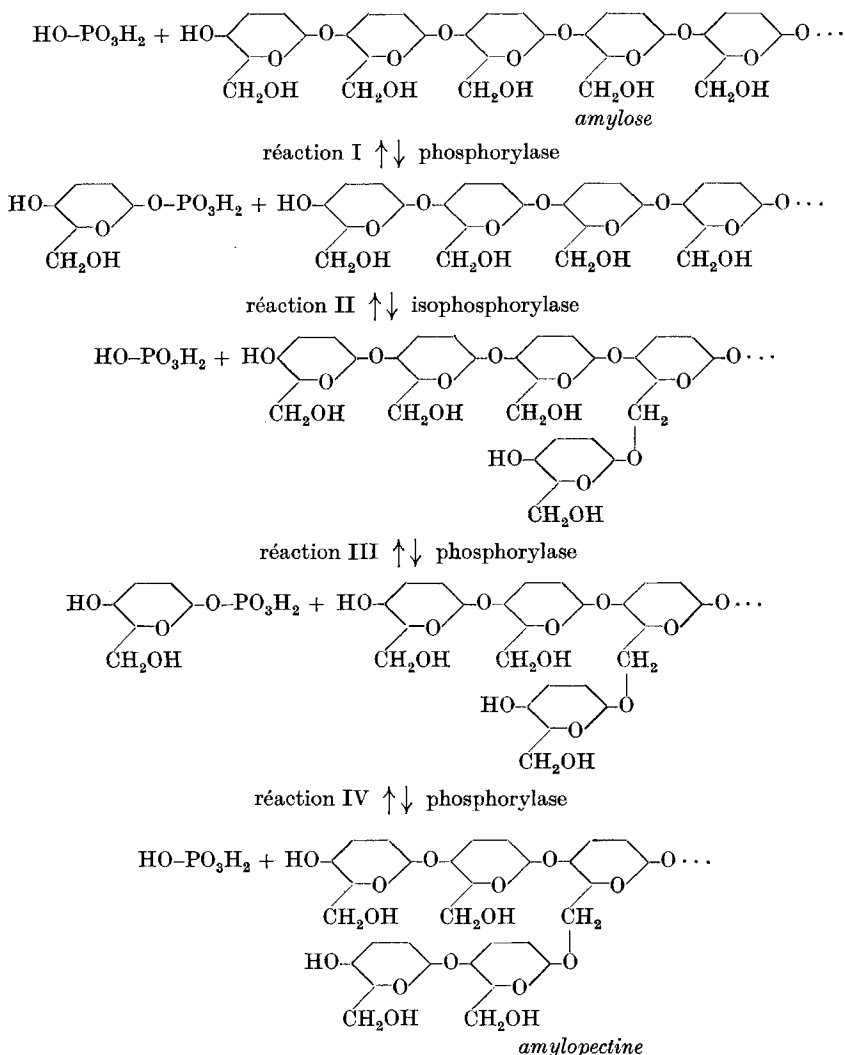
*) Moles de phosphate par équivalent de glucose du polysaccharide.

1) G. T. Cori, M. A. Swanson et C. F. Cori, Federation Proceedings **4**, 234 (1945).

2) P. Bernfeld et M. Fuld, Helv. **31**, 1420 (1948).

au violet (tube n° 5 de l'échelle) pour devenir finalement pourpre (tube n° 7). En outre, le polysaccharide résultant de cette action des deux enzymes sur l'amylose n'est dégradé qu'à 65% par la β -amylase, alors que l'amylose, avant d'avoir subi l'action des deux phosphorylases, pouvait être converti à 100% en maltose par la β -amylase. En absence de phosphate minéral, aucune action n'a lieu (voir tableau 2).

Ces faits indiquent que l'amylose a dû être transformé en amylopectine par l'action combinée de la phosphorylase et de l'isophosphorylase. Connaissant le mode d'action de ces deux enzymes, nous arrivons au schéma suivant de cette transformation:



D'abord, la phosphorylase agit sur l'amylose en formant du glucose-1-phosphate (réaction I). Celui-ci est utilisé ensuite par l'isophosphorylase pour synthétiser des liaisons de ramification (réaction II). L'isophosphorylase crée ainsi des embranchements qui donnent naissance, par la suite, à de nouvelles chaînes α -1,4-glucosidiques grâce à l'action de la phosphorylase (réactions III et IV).

En faisant agir, au contraire, le mélange des deux enzymes sur le glycogène, aucun changement de la couleur à l'iode n'a lieu. Il en résulte qu'en présence d'un mélange de phosphorylase et d'isophosphorylase l'équilibre entre l'amylose et le polysaccharide ramifié se trouve en faveur de ce dernier.

Peat et coll.¹⁾ interprètent la transformation de l'amylose en amylopectine d'une façon tout à fait différente. Ils admettent qu'il y a d'abord une dégradation hydrolytique de l'amylose en chaînes plus courtes. Puis il y aurait une resynthèse qui fournirait un polysaccharide ramifié, à partir de ces petites chaînes d'amylose. Une telle action nous semble impossible du point de vue énergétique.

L'importance de l'isophosphorylase.

Si l'isophosphorylase venait à manquer complètement dans les tissus, la formation des polysaccharides de réserve habituels, l'amidon et le glycogène, serait remplacée par la formation d'un autre polysaccharide, non ramifié, l'amylose. On sait que l'amylose possède une forte tendance à former des cristallites. Quand l'amylose n'est pas accompagné de polysaccharides ramifiés, ces cristallites sont très peu solubles dans l'eau et ils résistent à l'action enzymatique²⁾. Une utilisation rapide et rationnelle d'un tel hydrate de carbone de réserve en cas de besoin ne serait donc guère possible.

Partie expérimentale.

Dosage de l'isophosphorylase.

Solutions:

1° Tampon de phosphate 0,2-m., p_H 6,7: on dissout 3,5620 gr. PO_4Na_2H , 2 H_2O et 2,7228 gr. PO_4KH_2 dans de l'eau et complète à 200 cm^3 .

2° Tampon d'acétate 0,2-m., p_H 6,7: on dissout 5,50 gr. CH_3CO_2Na , 3 H_2O dans un peu d'eau, ajoute 1,0 cm^3 CH_3CO_2H 0,25-n. et complète à 200 cm^3 .

3° Solution de dextrine résiduelle: 80 mgr. de dextrine résiduelle de maïs préparée selon³⁾ sont dissous dans 10 cm^3 d'eau. Cette solution doit être fraîchement préparée le jour du dosage même.

4° Solution de β -amylase: une solution préparée selon⁴⁾ est diluée 1 à 20. Activité⁴⁾: 1 cm^3 donne environ 1 mgr. de maltose en 3 minutes à 20°.

5° Solution alcaline d'acide dinitrosalicylique, préparée selon³⁾.

1) S. Peat, E. J. Bourne et S. A. Barker, Nature **161**, 127 (1948).

2) M. Samec, Z. physiol. Ch. **263**, 17 (1940); P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, Helv. **30**, 1895 (1947).

3) G. Noelting et P. Bernfeld, Helv. **31**, 286 (1948).

4) Helv. **31**, 106 (1948).

Mode opératoire:

Avec des pipettes graduées de 1 cm³, on introduit respectivement les solutions et de l'eau dans 6 éprouvettes, selon les indications du tableau 3. On commence par les solutions de tampon, puis on continue dans l'ordre des colonnes du tableau de gauche à droite.

Tableau 3.

Eprouvette N ^o	Sol. 1 Tampon de phosphate	Sol. 2 Tampon d'acétate	Sol. 3 Dextrine résid.	Sol. 4 β -Amylase	Eau	Sol. d'iso- phosphorylase à doser
I	0,5 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³ 1,5 cm ³ 1,5 cm ³ 2,0 cm ³	0,5 cm ³
II	0,5 cm ³		0,5 cm ³	0,5 cm ³		0,5 cm ³
III			0,5 cm ³	0,5 cm ³		
IV			0,5 cm ³			
V						0,5 cm ³
VI						

Après 2 heures de repos à 20°, on arrête la réaction en ajoutant à chaque tube 2 cm³ de 5. On plonge les éprouvettes dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, puis refroidit et dilue chaque solution avec 20 cm³ d'eau. On détermine les extinctions dans le colorimètre photo-électrique *Klett-Summerson* en utilisant le filtre vert N^o 54, on soustrait l'extinction du tube VI de celle de chacun des tubes I, II, III, IV et V et on obtient la valeur de réduction de ces tubes que l'on exprime en mgr. de maltose selon une courbe étalon.

Les différences des valeurs de réduction suivantes expriment alors:

I—II: la dégradation de la dextrine résiduelle par la β -amylase, due à l'action d'isophosphorylase.

II—III: la dégradation de la dextrine résiduelle par la β -amylase, due à l'action d'une α -amylase. Cependant, les solutions 3 et 4 contiennent des traces de phosphate difficiles à éliminer, qui occasionnent une faible dégradation de la dextrine résiduelle en absence d' α -amylase.

III—IV: la dégradation de la dextrine résiduelle par la β -amylase seule. Si cette valeur est supérieure à 0,04 mgr. de maltose (1% de dégradation), l'essai est à recommencer avec une solution fraîche de dextrine résiduelle. La différence des tubes III—IV comprend également la valeur à blanc de la solution de β -amylase; elle est nulle pour notre solution 4.

Préparation de l'isophosphorylase.

1^o Suc de pomme de terre: des pommes de terre (janvier à mai) sont pelées puis lavées plusieurs fois à l'eau distillée. On les coupe en tranches fines que l'on immerge immédiatement dans une solution de CNK à 1‰, portée préalablement à p_H 7,0 par addition de CH₃CO₂H. Le volume de cette solution doit être suffisant pour recouvrir entièrement les pommes de terre.

Toutes les opérations suivantes sont effectuées à basse température, entre 0 et 4°.

On laisse reposer 12 heures, puis on décante la solution, lave les morceaux plusieurs fois à l'eau distillée et les broie finement à la machine à hâcher. La purée jaune clair ainsi obtenue est centrifugée pendant 10 minutes à 3000 tours/min. et on recueille la solution jaune clair surnageante (300 cm³ environ à partir de 1 kg. de pomme de terre; p_H entre 5,8 et 6,1; teneur en P minéral: 0,3 mgr./cm³ environ).

2^o Elimination du phosphate minéral: 250 cm³ de cette solution sont portés à p_H 8 par lente addition de NH₄OH 2-n. sous faible agitation. On ajoute alors goutte à goutte 20 cm³ d'une solution d'acétate de magnésium à 25%. Le p_H est maintenu à 8 pendant cette opération par l'adjonction de NH₄OH 2-n. si nécessaire. Il se forme un précipité

floconneux abondant, contenant du phosphate de magnésium et des protéines ne possédant pas d'activité isophosphorolytique. On agite encore pendant 15 minutes, puis on laisse déposer pendant une heure, centrifuge pendant 15 minutes et recueille la solution surnageante. Elle contient encore 40 à 80 γ de P minéral par cm^3 . On ajoute à nouveau 20 cm^3 de la solution d'acétate de Mg à 25% en ajustant le pH à 8 comme précédemment, puis on laisse déposer une heure. On élimine alors le précipité cristallin de PO_4MgNH_4 par une courte centrifugation et on répète encore deux fois le traitement à l'acétate de Mg. On arrive ainsi à une solution contenant moins de 8 γ de P minéral par cm^3 . L'addition d'une quantité égale de la solution d'acétate de Mg en une seule fois éliminerait beaucoup moins de phosphate.

3° Précipitation acétonique: on neutralise la solution (310 cm^3) à pH 7 par addition de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ n., puis on ajoute lentement et sous faible agitation 145 cm^3 d'acétone. Il se forme un précipité floconneux. On centrifuge 10 minutes à 3000 tours/min. et on jette la solution surnageante.

4° Lavage du précipité: on triture le précipité dans le tube de centrifugation avec 20 cm^3 d'eau distillée et centrifuge pendant 15 minutes à 3000 tours/min. Le liquide surnageant limpide est jeté et le précipité est encore traité deux fois de la même façon.

5° Extraction du précipité: le précipité encore humide est suspendu dans 20 cm^3 d'une solution de ClNa m. et le pH de cette suspension est porté à 10 par addition lente de NH_4OH n. sous faible agitation. Après 10 minutes, on centrifuge à 16000 tours/min.; cette vitesse est atteinte après 5 minutes environ, puis on laisse à cette vitesse pendant 10 minutes. Au cours de cette opération, la température du liquide peut atteindre de 30 à 35°. On recueille la liqueur surnageante, la refroidit et la neutralise par addition de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 0,5-n. Elle contient 1,9 mgr. d'azote par cm^3 .

6° Poudre sèche: on transvase cette solution dans une capsule en verre d'Iéna de 50 cm^3 , couvre par un verre de montre et plonge la capsule dans un mélange de neige carbonique et d'acétone à -70°C . Après 10 minutes, on place la capsule dans un dessiccateur, contenant du silicagel bleu¹⁾ et évacue rapidement à la trompe à mercure jusqu'à une pression de 0,01 mm. Hg. La solution ne doit pas dégeler. Après 24 heures, on obtient de 1 à 1,5 gr. de poudre sèche.

Vérification de l'absence d' α -amylase.

On chauffe 135 cm^3 d'eau à l'ébullition, ajoute 15 cm^3 de solution de tampon de phosphate (solution I de cette communication), puis, sous forte agitation, une suspension de 2,5 gr. d'amidon de pomme de terre dans 5 cm^3 d'eau froide. On maintient une faible ébullition pendant 10 minutes sous forte agitation, puis on refroidit. L'empois doit être préparé le jour même de la mesure viscosimétrique.

Un mélange fraîchement préparé de 5 cm^3 de cet empois et de 0,5 cm^3 de la solution d'isophosphorylase (d'une concentration égale à celle utilisée pour le dosage d'activité) est placé dans un viscosimètre d'Ostwald, se trouvant dans un thermostat à 20°. On mesure le temps d'écoulement de cette solution en fonction du temps de réaction (le temps de réaction $t = 0$ est le moment du mélange de l'empois avec l'enzyme). Simultanément on effectue un essai analogue avec un mélange de 5 cm^3 d'empois et 0,5 cm^3 d'eau (voir tableau 4).

Tableau 4.

Temps de réaction	Viscosité relative
5 min.	4,8
10 „	4,9
45 „	4,65
85 „	4,5

¹⁾ „Blaugel“ de la maison *Chemische Fabrik, Utikon*.

Transformation de l'amylose en amylopectine.

Solution de phosphorylase de pomme de terre, préparée selon les indications de Meyer et de Traz¹⁾.

Solution d'isophosphorylase: on dissout 400 mgr. de poudre sèche dans 5 cm³ d'eau.

Solution d'amylose: 100 mgr. d'amylose de maïs, fraction A de Schoch²⁾, sont humectés par 0,5 cm³ d'eau, puis triturés avec 5 cm³ de NaOH 2-n. à 30 à 40° jusqu'à dissolution complète, et la solution est complétée à 25 cm³.

Réaction en présence de phosphate: à 10 cm³ de la solution alcaline d'amylose, on ajoute goutte à goutte 38 cm³ de ClH 0,1-n., puis successivement 20 cm³ d'une solution de PO₄NaH₂ 0,015-m., 3 cm³ de la solution de phosphorylase, 1 cm³ de la solution d'isophosphorylase, 8 cm³ d'eau et trois gouttes de toluène. Le p_H de cette solution est de 6,8, sa teneur en phosphate de 0,116 mgr. P par cm³ = 3,75 · 10⁻³ molaire, et sa teneur en polysaccharide de 0,05% = 2,78 · 10⁻³ mol. par rapport aux restes de glucose.

Réaction en absence de phosphate: à 10 cm³ de la solution alcaline d'amylose, on ajoute goutte à goutte 36 cm³ de ClH 0,1-n., puis successivement 18 cm³ d'une solution de véronal-Na 0,143-m., 10,5 cm³ d'acide acétique 0,25-n., 3 cm³ de la solution de phosphorylase, 1 cm³ de la solution d'isophosphorylase, 1,5 cm³ d'eau et trois gouttes de toluène. Le p_H de cette solution est de 6,8, sa teneur en phosphate est inférieure à 2 γ P par cm³ = < 0,065 · 10⁻³ mol. et sa teneur en polysaccharide est de 0,05% = 2,78 · 10⁻³ mol. par rapport aux restes de glucose.

Les deux mélanges de réaction sont gardés dans le thermostat à 20°. A des intervalles différents, on détermine la coloration à l'iode en ajoutant à une prise de 1 cm³ du mélange trois gouttes d'une solution de I₂ 0,01-n. dans IK. On compare la teinte obtenue à l'échelle des couleurs³⁾. En outre, on détermine la limite de dégradation par la β-amylase. On prélève une prise de 40 cm³ du mélange, que l'on rajeunit par adjonction de 1 cm³ de NaOH 2-n. Puis on fait couler cette solution dans une solution de β-amylase en excès et tamponnée comme décrit précédemment⁴⁾. Les résultats se trouvent dans le tableau 2.

Nous tenons à remercier M. le Prof. Kurt H. Meyer de ses précieux conseils et de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Ces recherches ont été encouragées par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

RÉSUMÉ.

L'isophosphorylase est l'enzyme qui scinde et synthétise les liaisons α-1,6-glucosidiques de l'amylopectine et du glycogène.

L'isophosphorylase de pomme de terre a été préparée et enrichie. Le produit obtenu est exempt d'α-amylase, de phosphorylase et de phosphatase.

Une méthode de dosage de l'isophosphorylase est décrite. Elle consiste à mesurer la quantité de maltose scindé de la dextrine résiduelle en présence de phosphate minéral par l'action combinée de l'isophosphorylase et de la β-amylase. En absence de phosphate, l'isophosphorylase ne peut pas agir; il n'y a donc pas de formation de maltose. Ce dosage est spécifique pour un enzyme phosphorolytique.

1) K. H. Meyer et Cl. de Traz, *Helv.* **27**, 840 (1944).

2) Th. J. Schoch, *Am. Soc.* **64**, 2957 (1942).

3) *Helv.* **31**, 1420 (1948).

4) *Helv.* **31**, 106 (1948).

L'isophosphorylase de pomme de terre scinde et synthétise uniquement des liaisons terminales et cela seulement dans le voisinage immédiat de liaisons α -1,4-glucosidiques.

L'action simultanée de la phosphorylase et de l'isophosphorylase sur le glucose-1-phosphate produit un polysaccharide ramifié.

En présence de phosphate minéral, l'amylose est transformé en amylopectine par l'action combinée de la phosphorylase et de l'isophosphorylase. En absence de phosphate, cette transformation n'a pas lieu. Le mécanisme de cette transformation est discuté.

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

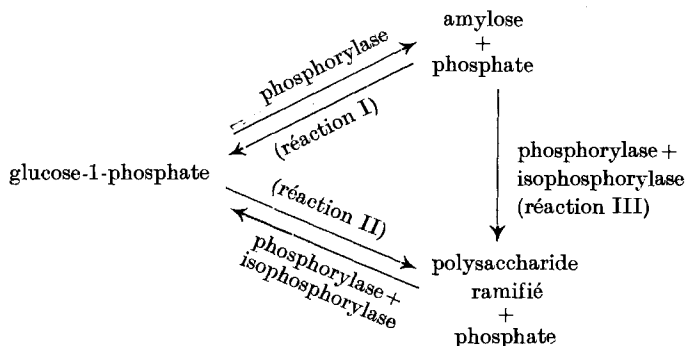
229. Sur les enzymes amylolytiques VII¹⁾.

L'isophosphorylase et la formation de polysaccharides ramifiés

par P. Bernfeld et A. Meutémédian.

(1 IX 48)

Dans la communication précédente¹⁾ nous avons décrit la préparation de l'isophosphorylase et la réaction catalysée par cet enzyme. L'action simultanée de l'isophosphorylase et de la phosphorylase sur le glucose-1-phosphate produit un polysaccharide ramifié (réaction II), alors que la phosphorylase seule forme de l'amylose (réaction I). Ce même mélange d'enzymes est capable, en présence de phosphate, de transformer l'amylose en amylopectine (réaction III):



Dans le présent travail, nous étudions de quelle manière le degré de ramification du polysaccharide synthétisé est influencé par le

¹⁾ VI^{me} communication, Helv. 31, 1724 (1948).