

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.

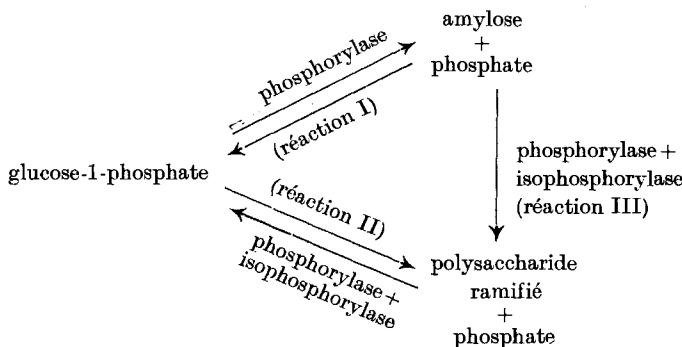
229. Sur les enzymes amylolytiques VII¹).

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).

rapport des concentrations de phosphorylase et d'isophosphorylase, ainsi que par la durée de l'action enzymatique¹).

Pour faire varier leurs concentrations relatives, nous avons évité de mélanger simplement les solutions de phosphorylase et d'isophosphorylase en proportions différentes, ceci pour ne pas faire varier en même temps la concentration de leurs impuretés, surtout celle des polysaccharides pouvant influencer l'action des phosphorylases²). Mais nous avons ajouté à un mélange donné de ces deux enzymes un inhibiteur, en quantités croissantes, n'affectant d'une manière spécifique qu'un seul de ces deux enzymes.

Comme inhibiteur spécifique, nous avons employé la phloridzine. On sait que la phloridzine est un fort inhibiteur de la phosphorylase³). Par contre, nous avons trouvé que l'isophosphorylase, en particulier celle de pomme de terre, ne subit aucune diminution de son activité sous l'influence de la phloridzine. En effet, en présence de phosphate minéral, la dextrine résiduelle est rendue accessible à la dégradation β -amylatique par l'action de l'isophosphorylase, aussi bien en présence ($6 \cdot 10^{-3}$ mol.) qu'en absence de phloridzine (voir tableau 1). La phosphorylase est presque totalement inhibée dans les mêmes conditions.

Tableau 1.

Concentration de la phloridzine	Dégradation de la dextrine résiduelle par la β -amylase en 8 heures à 20° à p_H 6,0*	
	En présence d'isophosphorylase	En absence d'isophosphorylase
0	25%	0%
$6 \cdot 10^{-3}$ mol.	25%	0%

*) Tampon de phosphates.

En faisant agir notre mélange de phosphorylase et d'isophosphorylase sur le glucose-1-phosphate pendant un temps relativement court (2 heures) et en présence de quantités croissantes de phloridzine, nous avons obtenu une série de polysaccharides donnant chacun une autre coloration à l'iode. Nous avons caractérisé ces colorations à l'iode en les comparant à notre échelle de couleurs⁴). Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 2.

¹⁾ Communication préliminaire, *P. Bernfeld et A. Meutémédian*, Nature, à paraître.

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); *P. H. Hidy et H. G. Day*, *J. Biol. Chem.* **152**, 477 (1944); *J. B. Sumner, G. F. Somers et E. Sisler*, *J. Biol. Chem.* **152**, 479 (1944).

³⁾ *J. K. Parnas*, *Handbuch d. Enzymologie (Nord-Weidenhagen)*, Leipzig 1940, 902.

⁴⁾ *P. Bernfeld et M. Fuld*, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

Tableau 2.

Concentration de la phloridzine	Coloration à l'iode	
	Couleur	N° de l'échelle ¹⁾
0*)	bleu	1
$0,8 \cdot 10^{-3}$ mol.	bleu-violacé	3
$1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.	violet	5
$1,1 \cdot 10^{-3}$ mol.	pourpre	7
$1,2 \cdot 10^{-3}$ mol.	rouge-pourpre	9
$1,3 \cdot 10^{-3}$ mol.	„	10
$1,4 \cdot 10^{-3}$ mol.	rouge-brun	11
$1,6 \cdot 10^{-3}$ mol.	brun	14

*) Action de la phosphorylase seule, en absence d'isophosphorylase.

Ces résultats montrent que, lors de l'action combinée de la phosphorylase et de l'isophosphorylase sur le glucose-1-phosphate, le rapport des concentrations relatives de ces deux enzymes possède une forte influence sur la coloration à l'iode du polysaccharide synthétisé.

D'après nos connaissances, il existe une relation entre la structure chimique d'un polysaccharide du groupe de l'amidon et sa coloration à l'iode²⁾. Cette coloration dépend de deux facteurs: du degré de polymérisation du polysaccharide et de son degré de ramification.

Le premier de ces deux facteurs, le degré de polymérisation du polysaccharide, n'est pas influencé par la présence de phloridzine, lors de sa synthèse. En effet, nous avons observé que la phloridzine ne fait que *ralentir* l'action de la phosphorylase, exempte d'isophosphorylase, sur le glucose-1-phosphate. Le résultat de cette action, ralenti par la phloridzine, est toujours un polysaccharide donnant une coloration bleue à l'iode. Le poids moléculaire de ce dernier n'est donc pas influencé par la phloridzine.

Il semble, d'après cette observation, que la synthèse d'une molécule de polysaccharide est achevée avant que celle d'une nouvelle molécule ne soit commencée. C'est le nombre de molécules qui augmente au cours de la réaction et non pas le poids moléculaire moyen des particules.

Cette constatation est analogue à celle faite par *Swanson*³⁾, selon laquelle la dégradation β -amylatique d'une molécule d'amylose est achevée avant qu'une nouvelle molécule ne soit attaquée.

En conséquence, les différences de la couleur à l'iode observées indiquent que le *degré de ramification* du polysaccharide synthétisé est influencé par la concentration de phloridzine et partant, par le

¹⁾ *P. Bernfeld et M. Fuld*, Helv. **31**, 1420 (1948).

²⁾ *K. H. Meyer et P. Bernfeld*, Helv. **24**, 389 (1941); *M. A. Swanson*, J. Biol. Chem. **172**, 825 (1948).

³⁾ *M. A. Swanson*, J. Biol. Chem. **172**, 805 (1948).

rapport des concentrations relatives des deux enzymes. Plus la teneur relative en isophosphorylase est grande, plus le polysaccharide synthétisé est ramifié (réactions I et II du schéma).

Mais les résultats de notre essai sont tout à fait changés si la durée de l'action des deux enzymes est prolongée. En effet, après 24 heures, la coloration à l'iode est brune, quelle que soit la concentration de phloridzine. Ceci confirme notre constatation selon laquelle l'équilibre entre le polysaccharide non ramifié et le polysaccharide ramifié se trouve être en faveur de ce dernier (voir communication précédente). Même les polysaccharides peu ou moyennement ramifiés (colorations violette et pourpre à l'iode) sont transformés à la longue en polysaccharides fortement ramifiés (coloration brune à l'iode). L'équilibre s'établit lentement en faveur des ces derniers, quel que soit le rapport des concentrations de phosphorylase et d'isophosphorylase (réaction III du schéma).

D'autre part, si l'on élimine le glucose-1-phosphate du mélange de réaction, soit par dialyse, soit par voie enzymatique (addition de phosphoglucomutase) ou si l'on ajoute un très grand excès de phosphate minéral, la réaction se déroulera en direction du glucose-1-phosphate. Il sera ainsi possible de dégrader le glycogène presque totalement en glucose-1-phosphate par un mélange de phosphorylase et d'isophosphorylase, quel que soit le rapport de leurs concentrations.

Swanson rapporte une dégradation presque totale du glycogène par la phosphorylase de muscle cristallisée. Il nous semble que cette phosphorylase cristallisée devait contenir une faible trace d'isophosphorylase. Cette dernière doit, en effet, se trouver dans le muscle, *Kiessling* ayant obtenu la synthèse de glycogène avec une fraction de muscle¹⁾. Inversément, lors de la synthèse du polysaccharide par la phosphorylase en présence d'une trace d'isophosphorylase, cette dernière n'entre pas en ligne de compte, l'amyllose formé se soustrayant rapidement à la réaction enzymatique ultérieure par la formation de submicrons et de particules insolubles.

Partie expérimentale.

Solutions:

¹⁾ *Solution de glucose-1-phosphate* 0,02-m.: 0,372 gr. de glucose-1-phosphate ($C_6H_{11}O_5-O-PO_3K_2$, 2 H_2O) sont dissous dans un peu d'eau, additionnés de 5 cm^3 d'une solution de CH_3CO_2Na mol. et de 0,5 cm^3 de CH_3CO_2H n., puis complétés à 50 cm^3 ; $pH = 6,0$.

²⁾ *Solution de phloridzine*: 0,436 gr. de phloridzine sont dissous dans 300 cm^3 d'eau; cette solution est $3,33 \cdot 10^{-3}$ molaire.

³⁾ *Solution contenant les deux phosphorylases*: 6 cm^3 de la solution de phosphorylase de pomme de terre, préparée selon les indications de *Meyer* et de *Traz*²⁾, sont mélangés à 2 cm^3 d'une solution contenant 16,0 mgr. de la poudre sèche d'isophosphorylase³⁾.

Essai:

On introduit les solutions suivantes par des pipettes graduées de 1 cm^3 dans une série d'éprouvettes, en observant l'ordre ci-après: 0,5 cm^3 de 1 dans chaque tube, ensuite

¹⁾ *W. Kiessling*, Biochem. Z. **302**, 50 (1939).

²⁾ *K. H. Meyer* et *Cl. de Traz*, Helv. **27**, 840 (1944).

³⁾ *Helv.* **31**, 1724 (1948).

dans le premier tube rien, dans le deuxième tube $0,35 \text{ cm}^3$ de **2**, dans le troisième $0,40 \text{ cm}^3$, puis $0,45 \text{ cm}^3$, $0,50 \text{ cm}^3$, $0,55 \text{ cm}^3$, $0,60 \text{ cm}^3$, et $0,65 \text{ cm}^3$ dans le dernier tube. On complète ensuite le volume de chaque solution à $1,15 \text{ cm}^3$ par de l'eau distillée, et finalement on ajoute à chaque tube $0,25 \text{ cm}^3$ de **3**.

Après 2 heures à 20° , on arrête les réactions en ajoutant à chaque tube 2 cm^3 de NaOH n., puis on neutralise par 3 cm^3 de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ n. et on ajoute à chaque tube $0,3 \text{ cm}^3$ d'une solution de I_2 0,01-n. dans IK. On compare finalement les teintes obtenues avec l'échelle des couleurs¹⁾. Les résultats sont donnés 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.

RÈSUMÉ.

La phloridzine, fort inhibiteur de la phosphorylase, n'inhibe pas l'isophosphorylase. L'adjonction de la phloridzine à un mélange de phosphorylase et d'isophosphorylase modifie le rapport des concentrations actives des deux enzymes, sans changer la teneur de la solution en impuretés.

Lors de l'action simultanée de la phosphorylase et de l'isophosphorylase de pomme de terre sur le glucose-1-phosphate, il se forme d'abord un polysaccharide dont le degré de ramification dépend du rapport des concentrations de phosphorylase et d'isophosphorylase. Ce polysaccharide est d'autant plus ramifié que la concentration relative en isophosphorylase est plus grande. Mais, par une action prolongée de ces deux enzymes, les polysaccharides peu ramifiés, formés d'abord, se transforment lentement en polysaccharides fortement ramifiés. Le produit final, stable en présence de ces deux enzymes, est toujours fortement ramifié, quel que soit le rapport de leurs concentrations; l'équilibre se trouve donc être en faveur d'un polysaccharide ressemblant au glycogène.

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

¹⁾ *Helv.* **31**, 1420 (1948).