

RECHERCHES SUR LA GLYCÉROPHOSPHATASE DU CERVEAU (*).

F. CEDRANGOLO

(Laboratoire de Chimie Biologique de la R. Université de Napoli
dirigé par le Prof. G. QUAGLIARIELLO)

(Avec 5 figg. d. l. t.)

La présence de glycérophosphatase dans le tissu nerveux résulte de recherches nombreuses: je rappellerai celles de GYÖRCY qui constata une hydrolyse des composants phosphoriques de bouillies cérébrales, pendant l'autolyse aseptique, et les expériences de VONDRÁČEK qui étudia la concentration de l'enzyme dans les diverses sections du système nerveux central des mammifères. Par contre je n'ai pu trouver, dans la littérature, aucune recherche sur les propriétés de l'enzyme, ce qui m'a décidé à entreprendre les recherches dont je parlerai dans cette note.

Pour la préparation de l'enzyme je me suis servi de cerveaux de cobayes ou de lapins. Après avoir lavé abondamment l'organe avec une solution physiologique, de manière à enlever toute trace de sang, je le broyais dans un mortier avec un peu de sable de quartz et je l'extrayais avec 4 volumes de solution physiologique; après une demi-heure je centrifugeais l'extrait et j'employais immédiatement le liquide, fortement opalescent, qui se trouvait au-dessus.

Comme substratum je me suis servi de glycérophosphate sodique MERCK, très pur, et d'échantillons de α - et β -glycérophosphate sodique. Ces deux derniers sels ont été obtenus en faisant agir du sulfate de sodium respectivement sur une solution de α -glycérophosphate de barium, obtenu synthétiquement de la glycide (ZETSCHÉ et AESCHLI-MANN), et sur une solution de sel double de β -glycérophosphate et de nitrate de barium, obtenu du glycérophosphate commun (KARRER et BENZ): ces sels de barium ont été préparés dans le laboratoire par le prof. MAZZA.

(*) *Archivio di Scienze Biologiche*, XXI, 337-344. — Pour la bibliographie voir la Note complète.

La détermination du phosphore scindé a été faite sur le produit déprotéinisé par acide trichloracétique, suivant la méthode de BRIGGS; les lectures ont été faites au colorimètre à cellule photoélectrique.

Je résume ici, brièvement, le résultat de mes expériences.

1. - *Influence du pH.* - Dans des ballons de 10 cc je mélangeais 2 cc d'extrait avec 2 cc de solution à 1% de glycérphosphate sodique et 2 cc de *puffer* de véronal sodique-acétate sodique, selon MICHAELIS, pour pH entre 2,62 et 9,16, ou de *puffer* de chlorure-ammonico-ammoniacal pour pH supérieurs à 9,16; une preuve analogue, mais sans glycérphosphate, servait de contrôle. On portait à volume avec de l'eau distillée et, après 12 heures de permanence dans le thermostat à 37°, sous toluol, on déterminait le phosphore inorganique.

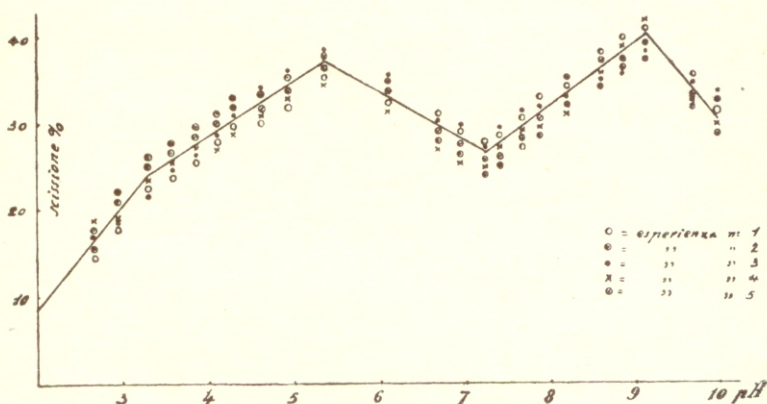


Fig. 1. - Influence du pH. *Puffer* de véronal-acétate sodique pour pH entre 2,62 et 9,16; *puffer* de chlorure ammonico-ammoniacal pour pH supérieurs à 9,16. Concentration du glycérphosphate 0,0066 mol par litre; extrait d'enzyme 2 cc.

Les résultats, exprimés par la courbe de la fig. 1, démontrent que l'enzyme présente deux maximums d'activité, un dans la zone acide à pH 5,32; l'autre dans la zone alcaline à pH 9,16, environ. Un phénomène analogue a déjà été remarqué, récemment, par BAMANN et RIEDEL, pour la glycérphosphatase du foie et du rein du porc et du veau, et par NORRIS et RAO pour les phosphatases des liquides cavitaires de quelques invertébrés marins (Echynodermes et Mollusques). Selon WALDSCMIDT-LEITZ et NONNENBRUCH ce double maximum d'activité dépendrait de la présence, dans les extraits, de la glycérphosphatase

des globules rouges, qui a un optimum d'activité vers pH 6 (ROCHE). Dans mon cas je crois pouvoir exclure la présence d'enzymes provenant du sang, car j'ai eu soin, comme je l'ai fait remarquer, de laver, à plusieurs reprises, le tissu avec une solution physiologique avant de procéder à l'extraction.

2. - *Influence de la concentration du substratum.* - Dans un groupe d'expériences, faites avec une technique analogue à celle que je viens de décrire, exception faite pour la concentration du glycérophosphate, qui était variable, et pour le pH qui était le pH *optimum* de la zone alcaline, j'ai étudié l'influence de la concentration du substratum sur l'activité de l'enzyme. Les résultats obtenus, exprimés par la courbe de la fig. 2, démontrent que l'enzyme présente le maximum de son activité à une concentration du glycérophosphate de 0,0016 mol; les concentrations supérieures ont une action inhibitoire, phénomène qui est commun à beaucoup d'enzymes hydrolasiques (EULER).

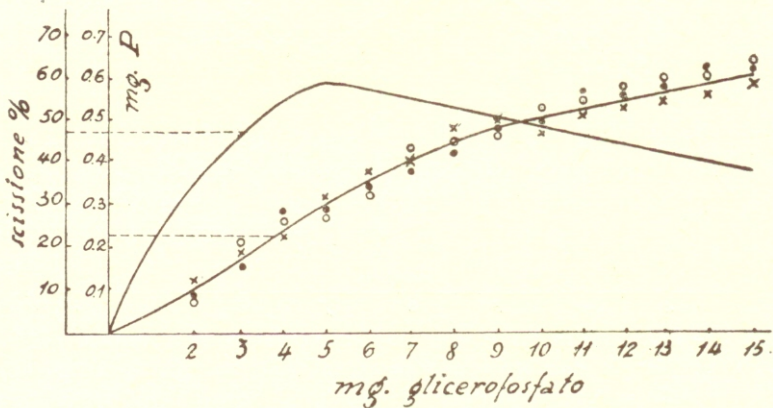


Fig. 2. - Influence de la concentration du substratum. Les mg de glycérophosphate se rapportent à des quantités présentes en 10 cc de liquide. pH = 9,16; extrait enzymatique 2 cc.

3. - *Influence de la concentration de l'enzyme.* - Dans ces expériences, faites elles-aussi à pH 9,16, et avec glycérophosphate 0,0066 mol, j'ai cherché à déterminer l'effet de la concentration de l'enzyme sur son activité; dans ce but j'ai fait des expériences avec des quantités diverses d'extrait. Les résultats sont exprimés par la courbe de la fig. 3, dans laquelle sur les abscisses, au lieu de noter le volume de l'extrait que j'ai employé, j'ai noté les mg de son résidu sec. La

courbe présente, dans la première partie, un décours parabolique conformément à la loi de SCHÜTZ.

4. - *Purification de l'enzyme.* - Pour purifier l'enzyme j'ai suivi la technique adoptée par BARWIN et BODANSKY pour la purification de la phosphatase de l'intestin des bœufs et des rats. Dans ce but j'ai traité mes extraits par HCl 0,1 N jusqu'à précipitation; j'ai centrifugé, j'ai lavé le précipité avec alcool et éther et j'ai desséché dans le vide

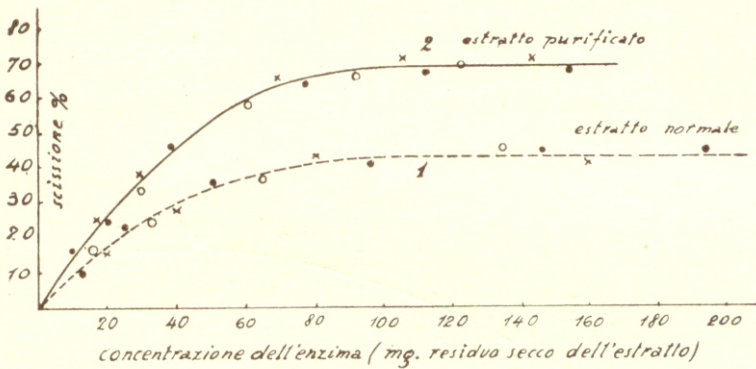


Fig. 3. - Influence de la conc. de l'enzyme. Les mg de résidu sec de l'extrait se rapportent au volume de l'extrait enzymatique qu'on a employé. pH = 9,16; glycérophosphate 0,0066 mol' par litre.

sur acide sulfurique. La poudre grisâtre que j'ai obtenue avec ce procédé a servi pour les expériences. Dans ce cas aussi, tout en maintenant constant le pH (9,16) et la concentration du substratum (0,0066 mol), j'ai fait varier la quantité d'extrait. La courbe 2 de la fig. 3, qui résume les résultats de ces expériences, a le même comportement de celle que j'ai obtenue avec l'enzyme non purifié; seulement elle se développe à un niveau plus élevé, démontrant ainsi que, à parité de résidu sec, l'extrait purifié est plus actif que celui qui ne l'est pas.

5. - *Action des Mg⁺⁺.* - Les recherches fondamentales de ERDTMANN sur la phosphatase du rein, suivies de celles d'autres nombreux AA. sur la phosphatase d'autres organes, ont démontré que les préparations de cet enzyme perdent presque complètement leur activité si on les soumet à une dialyse prolongée, et qu'on peut les réactiver moyennant l'adjonction du dialysé ou de sels de magnésium, attendu que la substance active s'identifie justement avec les Mg⁺⁺. J'ai fait des re-

cherches analogues sur des extraits de cerveau préparés avec la technique habituelle. Dans ce but les extraits ont été soumis à électrodialyse à travers des membranes de collodium, pendant 2 heures, avant d'être employés. On ajoutait le magnésium sous forme de $MgCl_2$, obtenu en faisant agir du HCl concentré sur une quantité, exactement pesée, de $MgCO_3$ pur et porté à poids constant à 110° et en faisant évaporer ensuite le liquide, à bain-marie, jusqu'à obtenir un résidu sec; on expérimentait toujours à pH 9,16 et glycérphosphate à 0,0066 mol. On peut voir les résultats sur la courbe de la fig. 4 qui démontre que le Mg^{++} agit en activateur sur les préparations enzymatiques du cerveau, électrodialysées, déjà à une concentration toute petite: l'activation augmente avec la concentration pour atteindre ensuite des valeurs constantes.

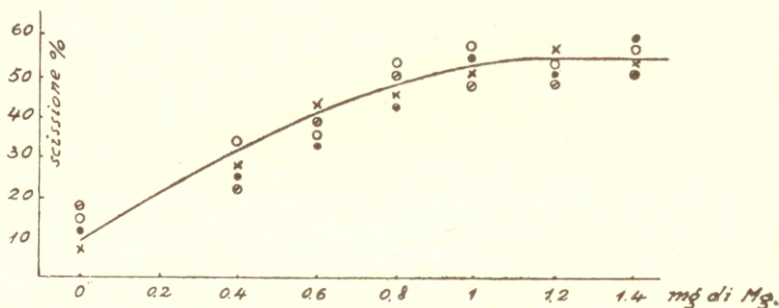


Fig. 4. - Action des Mg^{++} . Les mg de Mg se rapportent à des quantités présentes en 10 cc de liquide. pH = 9,16; glycérphosphate 0.0066 mol par litre.

6. - *Action des inhibiteurs.* - J'ai employé, comme inhibiteurs, le fluorure sodique, consacré désormais par les classiques expériences de MEYERHOF et par celles, plus récentes, de LIPMANN, l'acide mono-iodo-acétique et la phlorizine qui, selon LUNDSGAARD, inhibent, quoique avec un mécanisme différent, la glycolyse du muscle, et, enfin, l'acide arsénieux, inhibiteur bien connu des activités enzymatiques des divers organes.

Des courbes de la fig. 5 on peut relever le comportement de l'inhibition relativement à chaque poison, à concentration croissante; elles démontrent que, pour tous les inhibiteurs qu'on a employés, l'inhibition augmente lorsqu'on augmente leur concentration, pour atteindre ensuite des valeurs constantes. Comparativement aux concentrations

rapportées dans la figure, on voit que le fluorure sodique et l'acide mono-iodo-acétique ont expliqué une plus grande activité sur l'enzyme cérébral; l'acide arsénieux s'est révélé moins actif et la phlorizine moins encore.

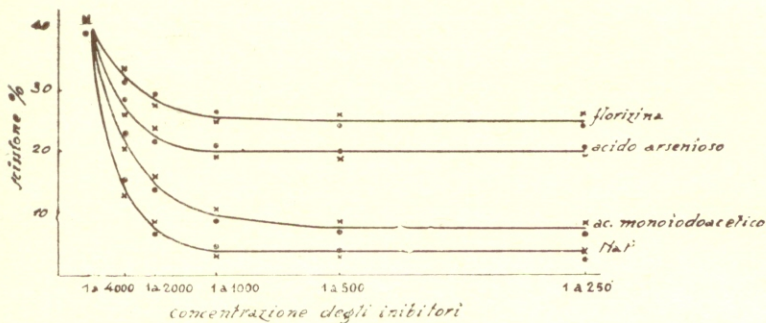


Fig. 5. - Action de quelques inhibiteurs. pH = 9,16; glycérophosphate 0,0066 mol par litre.

Les courbes de la figure 5 sont relatives à des expériences faites avec glycérophosphate 0,0066 mol et à pH = 9,16. D'autres expériences faites à pH = 5,32, en employant les mêmes inhibiteurs, à la concentration optimum d'inhibition de g l à 250, démontrent que l'ordre d'activité de ces poisons, établi à pH = 9,16, est valable aussi à pH = 5,32. En effet, si nous considérons = 100 l'activité de l'enzyme, elle se réduit à 14, 17, 53, 66 respectivement par action du fluorure de sodium, de l'acide mono-iodo-acétique, de l'acide arsénieux et de la phlorizine.

7. - *Comportement des acides α - et β - glycérophosphoriques.* - Dans la littérature nous trouvons des données disparates sur l'hydrolyse de ces deux composés, sous l'action des glycérophosphatases des divers organes. KARRER et FREULER trouvent que l'hépto-pancreas de l'escargot scinde en mesure égale les deux acides; KAY, KAY et LEE trouvent que le tissu rénal des mammifères hydrolyse plus rapidement l'acide β et il remarquent la même chose pour la glycérophosphatase du plasma à pH = 8,9 et non à pH = 7,6, où la scission de l' α - composé est plus considérable. DE RIENZO trouve que la phosphatase des os hydrolyse plus facilement la forme α ; par contre ROCHE trouve que la phosphatase des os, du sérum, du rein et de l'intestin est plus active sur la forme β et celle des érythrocytes sur la forme α .

Dans le tableau suivant je rapporte les valeurs de scission des

deux acides, obtenues dans des expériences faites aux deux pH optimum.

P scindé % du P total			
pH = 5,32		pH = 9,16	
Acide α	Acide β	Acide α	Acide β
44	33	49	35
46	36	46	36
-----	-----	-----	-----
moyenne 45	34,5	47	35,5

De ces données il résulte que l'acide α -glycérophosphorique asymétrique est scindé, par l'enzyme cérébral, en plus grande quantité que l'acide β -glycérophosphorique qui représente la forme optiquement inactive.

Conclusions. - Par des recherches destinées à établir quelques propriétés de la glycérophosphatase du cerveau de cobaye et de lapin, j'ai pu démontrer:

- 1) que l'enzyme présente deux maximums d'activité, un à pH = 5,32, l'autre à pH = 9,16;
- 2) que l'enzyme présente un maximum d'activité pour une concentration du glycérophosphate 0,0016 mol;
- 3) que l'activité de l'enzyme augmente au fur et à mesure qu'augmente sa concentration, jusqu'à une certaine concentration, au delà de laquelle elle reste constante;
- 4) qu'il est possible de purifier les extraits enzymatiques par précipitation au point isoélectrique avec HCl 0,1 N, obtenant des préparations beaucoup plus actives que les préparations non purifiées;
- 5) que le magnésium active les extraits enzymatiques, inactivés par l'électrodialyse et que l'activation augmente lorsqu'augmente la concentration des Mg^{++} pour atteindre ensuite des valeurs constantes;
- 6) que l'activité de l'enzyme est inhibée par le fluorure de sodium et par l'acide mono-iodo-acétique, par l'acide arsénieux et par la phlorizine et que l'activité inhibitrice décroît du premier au quatrième;
- 7) que des deux acides α - et β - glycérophosphoriques, le premier est scindé en plus grande quantité que le second.