Méthode de dosage et enrichissement de la phosphorylase de pomme de terre

Autor(en): **Meyer, Kurt-H. / Traz, Clément de**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences physiques et naturelles**

Band (Jahr): **24 (1942)**

PDF erstellt am: **26.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-741805

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Si φ_α est l'angle de f^α et de f_0^α défini par le cosinus réel positif et inférieur à l'unité

$$\cos\varphi_\alpha = (f^\alpha, f_0^\alpha) \qquad \text{on a} \quad a_\alpha = \cos\varphi_\alpha \,.$$

Il ne faut pas confondre les φ_α avec les angles d'un même vecteur et des axes f^α. On a:

$$\sum_\alpha a_\alpha^2 = \sum_\alpha \cos^2\varphi_\alpha \,, \quad (10) \qquad \Pi = \prod_\alpha \sin^2\varphi_\alpha \,. \quad (11)$$

Donc s'il n'y a pas de résidu h orthogonal à tous les f^α, la série 10 est infinie et le produit Π est nul. Les φ_α ne tendent pas assez rapidement vers $\frac{\pi}{2}$; et les normes des restes successifs tendent vers zéro

$$\left\| f_0^\alpha \right\| = \sin\varphi_0 \ldots \sin\varphi_{\alpha-1} \,.$$

S'il y a au contraire un résidu $h \neq 0$, les φ_α tendent rapidement vers $\frac{\pi}{2}$. Ceci dit pour le cas où une infinité d'alpha entrent en ligne, bien entendu.

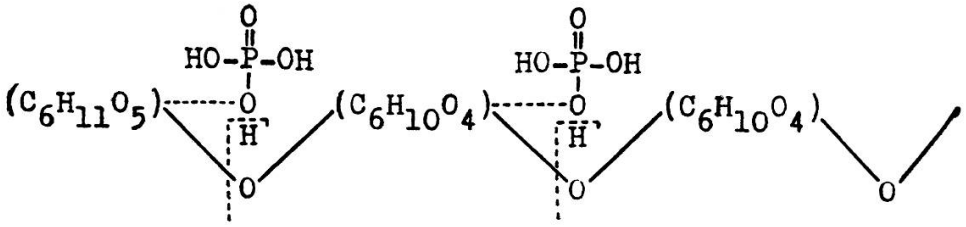
Kurt-H. Meyer et **Clément de Traz.** — *Méthode de dosage et enrichissement de la phosphorylase de pomme de terre.*

L'enzyme appelé phosphorylase a été récemment identifié dans une série d'organes animaux [1]: foie, cœur, muscle, etc.; il a son représentant dans le règne végétal aussi: les travaux de Hanes notamment, après s'être portés sur la phosphorylase du pois [2], se sont adressés à celle de la pomme de terre [3]. C'est cette dernière qui fait l'objet de nos recherches.

La molécule de l'amidon, soumise à l'action de la phosphorylase de pomme de terre en présence de phosphore inorganique, se scinde pour donner en premier stade l'ester glucose-1-phosphorique, dit ester de Cori; cet effet est réversible: l'ester de Cori, sous l'action de la phosphorylase, reforme le polysaccharide *in vitro*. S'agit-il de la phosphorylase du foie, le polysaccharide

synthétisé colore l'iode en brun, de celle du muscle ou de la plante, la coloration à l'iode est bleue.

Selon la définition de Parnas [4], le mode d'action de l'enzyme est une véritable « phosphorolyse », les éléments de l'acide phosphorique intervenant au même titre que ceux de l'eau lors d'une hydrolyse:



Cori et ses collaborateurs, Kiessling, pour l'enzyme animal, Hanes pour l'enzyme végétal, ont notamment publié d'importants travaux sur la cinétique et l'équilibre de la réaction globale:

$$\text{Polysaccharide} + \text{P inorgan.} \underset{\text{II}}{\overset{\text{phosphorylase I}}{\rightleftharpoons}} \text{ester de Cori} .$$

Le rôle coenzymatique de l'acide adénylique a été établi pour la phosphorylase animale, nié pour le ferment végétal [5]; Cori a montré en outre [6] que la réaction II (de droite à gauche) n'apparaît qu'après une « période d'induction » notable; cette dernière peut être entièrement abolie si l'on introduit dans la solution soumise à l'incubation une faible quantité de glycogène. Green et Stumpf [5] ont obtenu le même résultat avec l'amidon, aussi bien qu'avec la dextrine (voir notre méthode de dosage). Ce phénomène intéressant indique que la réaction II est autocatalytique. Il n'y a pas de période d'induction pour la réaction I.

Méthode de dosage.

Nous avons mis au point une méthode basée sur la mesure en un temps donné de l'accroissement du phosphore minéral formé au cours de la réaction II. Le substrat, ester glucose-1-

phosphorique, est préparé par synthèse enzymatique à partir de l'amidon de pomme de terre, soumis, en présence de P inorganique, à l'action du propre enzyme du tubercule. Cette synthèse, indiquée par Hanes [3] a été revue par nous et modifiée dans certains détails. Nous avons choisi, en nous basant sur une publication de Cori [3], une concentration en substrat de 17 mMol environ. Nous avons ajouté au substrat une petite quantité d'amidon de Zulkowsky dans le but de supprimer la période d'induction, et du KF (10 mMol.); ce dernier réactif, à une telle concentration, inhibe à 95-98% la phosphatase accompagnant nos préparations de phosphorylase, sans agir sur cette dernière (voir plus loin).

Dans le but de vérifier si la quantité de P libéré dans un temps donné est bien proportionnelle à la concentration de l'enzyme [6], nous avons procédé à l'essai suivant:

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

1/2 cc	enzyme	conc.	1/1	1,6	mg	P
1/2 »	»	»	1/2	0,80	»	»
1/2 »	»	»	1/4	0,37	»	»
1/2 »	»	»	1/8	0,19	»	»

Mode opératoire.

A. *Substrat.* — 700 mg du sel dipotassique ($2H_2O$ crist.) de l'ester glucose-1-phosphorique sont dissous dans un peu d'eau; on ajoute 2 cc. de tampon acétate-acétique M/1, de pH 6, 10 cc. d'une solution de KF M/10, acidifie jusqu'à pH 6 (20 gouttes de CH_3COOH N/2) et complète à 100 cc. Cette solution peut être conservée 15 jours à la glacière avec une goutte de toluène.

On fait par ailleurs une solution aqueuse (20 cc.) contenant 4 mg d'amidon de Zulkowsky par cc. (ne peut être conservée, à la glacière, que 4 à 5 jours, avec toluène).

B. *Incubation.* — On introduit 9 cc. de la solution d'ester de Cori dans une éprouvette, y ajoute 0,5 cc. de la solution d'amidon de Zulkowsky et abandonne 15 min. au thermostat à 35°. On introduit alors 0,5 cc. de la solution de phosphorylase à examiner; on prélève à la 20me minute un échantillon de 2 cc.

que l'on écoule immédiatement dans 2 cc. d'une solution à 10% d'acide trichloracétique; on porte à 5 cc. le volume de l'échantillon après 10 min. de repos, passe sur papier-filtre ordinaire et dose colorimétriquement le P minéral.

Il ne faut pas dépasser une libération de P de 1,8 mg. dans la solution soumise à l'incubation.

C. *Dosage du phosphore par colorimétrie* [7]. — Solutions nécessaires:

1° Témoin, à 0,01 mg P inorganique par cc.;
2° $HClO_4$ à 60%;
3° Molybdate d'ammonium à 5%;
4° Solution de 100 cc. contenant: 0,2 g. acide 1.2.4.aminonaphtol-sulfonique; 12 g. $NaHSO_3$; 2,4 g. Na_2SO_3. N'est pas valable plus de 15 jours.

Exemple d'analyse: prise de 1 cc. de la solution à doser; porter à 10 cc. environ, additionner successivement de: 1 cc. solution 2°, 1 cc. solution 3°, 0,5 cc. solution 4°. La coloration, développée pleinement en 5 min. à température ordinaire, se compare à celle d'un échantillon témoin (solution 1°).

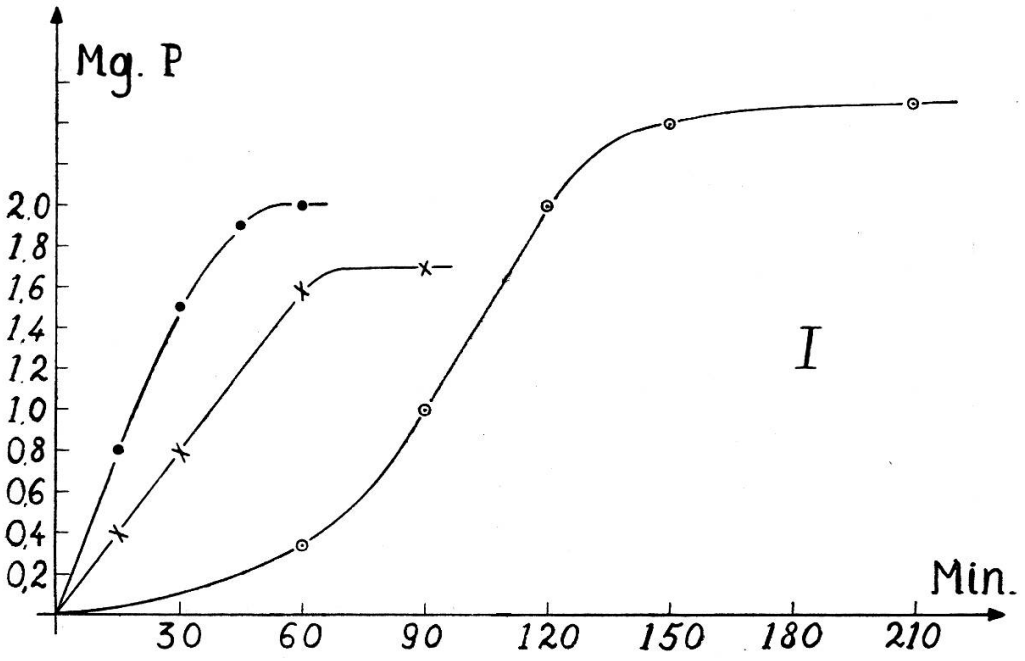
Amidon de Zulkowsky. — Ce produit a été choisi pour des raisons de bonne solubilité et de commodité d'emploi. Nous avons examiné son action catalytique dans le cas de la phosphorylase de pomme de terre (réaction II); les courbes suivantes ont été obtenues (voir p. 237).

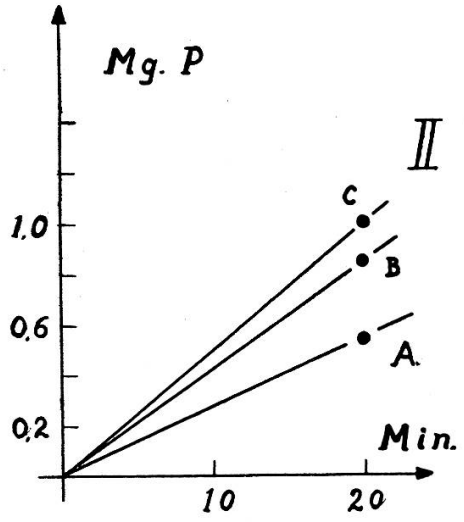
Enrichissement de l'enzyme.

Des pommes de terre saines sont pelées, broyées et pressées. Le jus brut (5 kg. de tubercules donnent environ 2 l. de jus) est dialysé 24 h. contre l'eau courante, puis concentré par congélation jusqu'à une teneur en produit secs de 4%.

300 cc. de jus, de pH 6, sont additionnés graduellement et avec forte agitation, à 0° C, de 255 cc. d'une solution saturée à 0° C de sulfate d'ammonium, de pH 6 (concentration en sulfate: 46% de saturation); le précipité est centrifugé et jeté.

La liqueur restante est à nouveau additionnée dans les mêmes





I: Pas d'adjonction d'amidon de Zulkowsky.
Adjonction de 0,12 ‰ amidon de Z.
» » 0,24 ‰ » » »

II: A 0,50 ‰ amidon de Z.
B 1 ‰ » » »
C 2 ‰ » » »

conditions de 105 cc. du même réactif (conc. en sulfate: 54,5% de la satur.); le précipité, centrifugé, repris par 100 cc. environ d'eau distillée est dialysé 48 h. contre l'eau courante.

La solution est centrifugée, placée 24 h. au thermostat à 35° et centrifugée à nouveau.

Voici un exemple de bilan obtenu par ces opérations:

Solution	Volume	Teneur en matières sèches	G_V	G_P	Enrichissement[1]	Rendement	
						Activité	Poids
1	2000 cc	6,4%	3	0,047	—	—	—
2	1000 »	4%	5	0,125	2,6 fois	83%	32%
3	100 »	1,56%	17,5	1,12	24 »	29%	1,2%
4	100 »	1,45%	17,5	1,2	25,6 »	29%	1,1%

1: jus fraîchement pressé.
2: solution prête à être précipitée au sulfate d'ammonium.
3: solution du précipité actif, dialysée 48 h. et centrifugée.
4: la même, après traitement 24 h. à 35° et centrifugation.
G_V: mg. P mis en liberté par cc. de solution d'enzyme.
G_P: mg. P mis en liberté par mg. de protéines actives.

Quelques caractéristiques de la phosphorylase de pomme de terre.

Examinant la sensibilité de notre préparation enzymatique purifiée par la méthode précédemment décrite, vis-à-vis de différents facteurs, nous avons trouvé, avec Green et Stumpf [5], une désactivation par acidification au pH de 4,6, par chauffage de 30-40 min. à 60° et par action de l'alcool et de l'acétone.

La dialyse contre l'eau courante, même prolongée (72 h.), n'affaiblit pas sensiblement l'acitivité du ferment; l'électrodialyse, au contraire, effectuée en solution tamponnée (acétate-acétique) M/50, pH 6, contre une solution de mêmes pH et concentration, provoque la désactivation de l'enzyme.

Des essais de réactivation (40 h. de contact, pH 6, métal examiné à 10 mMol), n'ont donné aucun résultat positif avec $Fe^{\cdot\cdot}$, $Co^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$, $Mn^{\cdot\cdot}$, $Zn^{\cdot\cdot}$. Il est cependant permis de supposer l'existence d'un coenzyme ionisé, dialysant avec une très grande lenteur.

[1] Rapporté à l'activité initiale.

Abandonnée trois mois à la glacière, une préparation purifiée de phosphorylase n'a pas montré de désactivation sensible; à 35°, l'activité de la même préparation a baissé de moitié en trois semaines.

Les ions CN′, F′ et $Mg^{\cdot\cdot}$ n'exercent aucune action (80 mMol, pH 6).

Métaux lourds : $Cu^{\cdot\cdot}$ inhibe de 75% à 5.10^{-4} Mol; $Hg^{\cdot\cdot}$ de 70% à $2{,}5.10^{-5}$ Mol et $Ag^{\cdot}$ de 90% à 1.10^{-4} Mol (essais effectués au pH 6).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Cori et collab., J. Biol. Chem. à partir de *119*, 1937.
[2] Hanes, Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B, *128*, 421.
[3] Id., *129*, 174.
[4] Parnas, Ergeb. Enzymforsch., *6*, 57, 1937.
[5] D.-E. Green et P.-K. Stumpf, J. Biol. Chem., *140*, 47, 1941.
[6] G.-T. Cori et C.-F. Cori, J. Biol. Chem., *135*, 733, 1940.
[7] King, Biochem. J., *26*, 292, 1942.

André Mercier. — *Sur le champ du tourbillon dans les fluides.*

Première note. — On peut toujours mettre un champ vectoriel $\vec{v}(P)$ fonction du point P de l'espace sous la forme

$$\vec{v} = \nabla H + \nabla \times \vec{W} \qquad (1)$$

Il suffit pour cela de définir les « potentiels » scalaire et vecteur H et $\vec{W}$ comme suit:

$$H(P) = -\frac{1}{4\pi}\int_{\tau} d\tau_Q \frac{\nabla \cdot \vec{v}(Q)}{r_{PQ}} + \frac{1}{4\pi}\oint_{\Sigma} \frac{d\vec{\sigma}_{Q'} \cdot \vec{v}(Q')}{r_{PQ'}},$$

$$\vec{W}(P) = \frac{1}{2\pi}\int_{\tau} d\tau_Q \frac{\vec{\omega}(Q)}{r_{PQ}} - \frac{1}{4\pi}\oint_{\Sigma} \frac{d\vec{\sigma}_{Q'} \times \vec{v}(Q')}{r_{PQ'}},$$

où $\vec{\omega} = \frac{1}{2}\nabla \times \vec{v}$ et où τ est le domaine de frontière Σ où le champ est défini. Si $\vec{v}$ est le champ de la vitesse dans le mouvement d'un fluide, $\vec{\omega}$ est le champ du vecteur tourbillon.