

# De l'activité phosphorylante de l'hexokinase intestinale (muqueuse de l'intestin grêle) vis-à-vis de différents monosaccharides

Autor(en): **Bissegger, Arnold**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =  
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **41 (1951)**

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308308>

## **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.

# **De l'activité phosphorylante de l'hexokinase intestinale (Muqueuse de l'intestin grêle) vis-à-vis de différents monosaccharides**

par ARNOLD BISSEGGER

## INTRODUCTION

Les substances nutritives ingérées avec les aliments subissent différentes transformations par les ferments des sucs digestifs avant leur passage à travers la paroi intestinale dénommée absorption. Ces transformations sont des processus de décomposition par lesquels les substances nutritives de structure complexe sont scindées en leurs composantes simples. La digestion modifie le caractère physico-chimique propre aux substances nutritives ingérées, ce qui permet l'assimilation de substances étrangères au corps. La scission de ces substances permet en général aux particules plus petites de traverser la paroi intestinale plus aisément que les grosses molécules ou les agrégats moléculaires des aliments non digérés.

Les ferments jouent un rôle important non seulement dans la digestion au niveau de l'estomac et de l'intestin, mais aussi dans les cellules épithéliales de leurs muqueuses, lors du passage des substances nutritives à travers la paroi intestinale. Il est intéressant de constater que, malgré des propriétés physico-chimiques semblables, certaines substances sont facilement résorbées, alors que d'autres ne le sont pas du tout ou très peu.

Après la découverte des lois de la diffusion, on a d'abord cru qu'elles devaient être valables dans l'échange constant des substances au sein de l'organisme. Mais les expériences ont démontré que cette théorie n'est pas applicable sans autre à la cellule vivante. Parmi les phénomènes biologiques les plus intéressants, il faut citer la différence des vitesses d'absorption des divers monosaccharides dans le tube digestif.

En 1889 déjà, HÖBER constata que la molécule de glucose, quoique plus grande, est plus rapidement résorbée que celle de sulfate de magnésie. Il en conclut à l'influence de processus actifs dans l'absorption des sucres. Plus tard, HEDON (1900) et NAGANO (1902) découvrirent que les hexoses étaient plus rapidement absorbés que les pentoses, de dimensions moléculaires plus faibles. NAGANO (1902) constatait, en outre, que les hexoses stéréo-isomères n'étaient pas tous absorbés avec la même vitesse. HEDON (1900) put établir, chez le lapin, la série suivante, quant aux différentes vitesses d'absorption : glucose, galactose, arabinose. NAGANO (1902) découvrit, chez le chien, l'ordre suivant : galactose, glucose, lévulose, mannose, xylose, arabinose.

Ce n'est qu'en 1925 que CORI fit des expériences approfondies sur les vitesses d'absorption des différents monosaccharides chez des rats non opérés. En admettant que la quantité de glucose absorbé pendant un temps défini est égale à 100, il établit les rapports suivants :

Galactose . . . . .	110
Glucose . . . . .	100
Fructose . . . . .	43
Mannose . . . . .	19
Xylose . . . . .	15
Arabinose . . . . .	9

WILBRANDT et LASZT (1933) trouvèrent, pour des rats opérés, les rapports suivants :

Galactose . . . . .	115
Glucose . . . . .	100
Lévulose . . . . .	44
Mannose . . . . .	33
Xylose . . . . .	30
Arabinose . . . . .	29

Travaillant sur des pigeons et des rats non opérés, WESTENBRINK (1936) indique les chiffres ci-dessous :

d-galactose . . . . .	108 (rat)	115 (pigeon)
d-glucose . . . . .	100	100
d-lévulose . . . . .	42	55
d-mannose . . . . .	15	33
l-xylose . . . . .	13	33
l-arabinose . . . . .	2	16

La physiologie de l'absorption a pour but de trouver une solution à ces problèmes que l'on ne peut expliquer par les lois physiques de la diffusion pure.

En 1889, HÖBER écrit : « Les phénomènes des sucres ne semblent pas refléter entièrement les lois physiques. Ils sont peut-être dus à ce que les cellules de la muqueuse intestinale absorbent partiellement ces sucres, qui y subissent alors des transformations. Comme la solution qui baigne les cellules est appauvrie en sucre, le gradient de concentration entre le contenu intestinal et les vaisseaux sanguins augmente, et de ce fait la quantité diffusée par unité de temps croît selon la loi de Fick. »

Plus tard, VERZÀR (1931) supposa également que l'absorption sélective était due à une transformation des sucres dans la muqueuse intestinale. La diffusion des sucres du tube digestif à travers la muqueuse dépend du gradient de diffusion. Lorsqu'un sucre subit une transformation chimique dans la muqueuse, sa concentration y est diminuée, le gradient de diffusion s'accroît et la vitesse d'absorption augmente. VERZÀR (1931) indique que plusieurs auteurs ont constaté une augmentation de la concentration en glycogène dans le sang de la veine cave pendant la phase d'absorption des sucres. ARNOLD constata la formation de glycogène en mettant du glucose en présence d'épithélium intestinal.

MAGEE (1931) découvrit que de faibles concentrations de phosphate accélèrent la vitesse d'absorption du glucose et non celle du xylose. Se basant sur ces résultats, WILBRANDT et LASZT (1933) expliquent l'absorption sélective des hexoses par l'hypothèse suivante : les hexoses seraient phosphorylés lors de leur passage à travers les cellules épithéliales de l'intestin : le gradient de diffusion augmenterait donc et accélérerait l'absorption. Afin de prouver cette hypothèse, les auteurs susmentionnés étudièrent l'absorption des différents monosaccharides sur des rats normaux et traités par l'acide mono-iodo-acétique. Cet acide est un poison pour les ferments et inhibe indirectement la phosphorylation des sucres. Ils constatèrent, chez tous les animaux traités, un ralentissement de l'absorption des hexoses ; l'absorption des pentoses n'était par contre pas influencée. Les vitesses relatives d'absorption sont, de ce fait, approximativement égales aux vitesses de diffusion à travers une membrane ordinaire.

*Vitesses relatives d'absorption des sucres*

	Sans acide mono-iodo-acétique	Avec acide mono-iodo-acétique
Galactose . . . . .	115	32,0
Glucose . . . . .	100	32,6
Fructose . . . . .	44	36,8
Mannose . . . . .	33	24,9
Sorbose . . . . .	30	32
Xylose . . . . .	30	30,5
Arabinose . . . . .	29	28,9

(Le chiffre 100 indique la quantité de glucose absorbée par un animal normal dans l'unité de temps.)

Peu de temps après, LUNDSGAARD (1933) vérifiait l'hypothèse de WILBRANDT et LASZT (1933) en travaillant sur un autre poison, la phlorrhizine, qui inhibe directement l'activité de l'hexokinase. Il constata que la phlorrhizine ralentit en effet l'absorption du glucose, fait déjà constaté par NAKASAWA (1922) et par WILSON (1932), alors que l'absorption du xylose ne se trouve pas modifiée. LUNDSGAARD (1933) insista sur le fait que la phosphorylation du glucose joue un rôle non seulement dans l'absorption au niveau de l'intestin, mais aussi dans la réabsorption au niveau des tubes contournés du rein. Il explique le diabète rénal, c'est-à-dire le diabète dû à la phlorrhizine, par une inhibition au niveau de ces tubes. Ces résultats furent confirmés par les travaux de WERTHEIMER (1934), OEHNELL et HÖBER (1939), et BECK (1942). Mentionnons encore qu'ABDERHALDEN et EFFKEMANN (1934) ont réussi à inhiber l'absorption sélective par l'amygdaline. Comme preuve ultérieure de la phosphorylation, WILBRANDT et LASZT (1933) et LASZT (1935) démontrèrent que des extraits de muqueuse peuvent phosphoryler les hexoses, mais que cette propriété est supprimée par l'acide mono-iodo-acétique. LASZT et SÜLLMANN (1935) prouvèrent que, pendant l'absorption des hexoses, il y a formation d'esters phosphoriques dans la muqueuse intestinale. BECK (1942) constata que cette formation d'esters phosphoriques n'a pas lieu chez les animaux traités avec de la phlorrhizine. Plus tard, KJERULF-JENSEN KAY (1942) isola même différents esters phosphoriques d'hexoses pendant l'absorption des sucres correspondants. Par l'acide phosphorique marqué, le même auteur démontra en outre la phosphorylation quantitative du fructose dans la muqueuse intestinale durant la phase d'absorption. Ceci nous apprend qu'il n'y a pas d'absorption du fructose sans phosphorylation.

Par ses travaux, CSAKY (1942) contribua considérablement à prouver la phosphorylation des hexoses. En examinant l'absorption de différents dérivés méthylés du glucose, il remarqua que la vitesse d'absorption du méthyl-3-glucose est égale à celle du glucose libre, et bien supérieure à celle du méthyl-1-glucose ou du méthyl-6-glucose. La vitesse d'absorption diminue donc lorsque les positions 1 et 6 sont bloquées par méthylation. Ces recherches engagent à supposer la formation d'esters 1,6-phosphoriques des hexoses.

MEYERHOF (1927, 1932) fut le premier à découvrir l'hexokinase, ferment indispensable à la phosphorylation des sucres ; COLOWICK et SUTHERLAND (1942) nous ont appris que le phosphate nécessaire à la réaction est fourni par l'ATP :

Hexose + ATP + hexokinase  $\rightarrow$  Ester phosphorique d'hexose + ADP.

BERGER, SLEIN, COLOWICK et CORI (1946) constatèrent, au cours de leurs travaux sur l'hexokinase cristalline et isolée de la levure, que les hexoses ne sont pas phosphorylés à la même vitesse. Ces mêmes auteurs (1946) nous indiquent que les proportions relatives concernant le transfert du phosphate de l'ATP au sucre sont de 1 : 1,4 : 0,3, pour le glucose, le fructose et le mannose. Ils ont également trouvé que des ferments différents agissent sur les aldoses et les cétooses. Quant à LEUTHARDT et TESTA (1950, 1951), ils réussirent à démontrer que la phosphorylation du fructose et du glucose dans le foie de rat se fait par deux ferments distincts. Ils divisent les hexokinases en aldo- et en céto-hexokinases.

Il nous a paru dès lors intéressant d'étudier :

1. Si la phosphorylation dans la muqueuse intestinale se fait dans les mêmes conditions que dans le muscle et dans le foie.
2. Si la vitesse de phosphorylation intestinale des hexoses dépend de leur structure.
3. Si les vitesses relatives de phosphorylation de différents sucres sont analogues aux vitesses relatives de leur absorption.

Il serait également important de savoir s'il y a plusieurs hexokinases dans la muqueuse intestinale.

Nous avons extrait des muqueuses intestinales et examiné l'activité de leur hexokinase. Ces muqueuses provenaient de différentes espèces animales.



## Exposé des conditions de nos expériences

Nous avons l'intention de préparer des extraits frais de muqueuse intestinale contenant l'hexokinase et d'examiner les vitesses de phosphorylation des différents sucres. Nous aurions alors voulu déterminer par fractionnement s'il existe plusieurs hexokinases dans la muqueuse intestinale. Mais nous nous sommes heurtés à des difficultés considérables dans la préparation d'extraits frais et nous avons dû renoncer à cette recherche.

Pour avoir à notre disposition non seulement un choix important de matériel, mais encore des quantités suffisantes, nous avons d'abord essayé de nous servir de produits d'abattoir provenant de plusieurs espèces animales (veau, mouton, porc). Il s'est avéré au cours de nos expériences que l'on obtient une plus forte activité enzymatique en se servant d'un intestin exempt de chyme et de bile. Comme cette condition, indispensable à une bonne activité du ferment *in vitro*, n'était pas réalisée par le matériel d'abattoir, nous avons alors utilisé, pour nos essais, des lapins et des chats, de préférence des animaux jeunes (1,2 – 2 kg.). Nous les avons laissés sans nourriture pendant 48 heures et avons pu ainsi préparer un extrait pur de muqueuse, exempt dans la mesure du possible de toute substance étrangère (chyme et bile). L'extraction elle-même fut réalisée selon la méthode de CORI (1945, 1947). Nous avons opéré simultanément, dans les mêmes conditions d'expérience (mêmes proportions et muqueuse du même intestin), deux extractions, l'une par l'eau, l'autre avec une solution-tampon phosphatique au NaCl. Comme l'indique le *tableau 1*, l'activité de l'hexokinase se révèle plus grande en employant le dernier procédé. Lors d'une première

*Tab. 1. Influence du mode d'extraction sur la phosphorylation du glucose*

Animal d'expérience : Lapin.

Glucose ajouté en mg.	Après incubation de l'extrait aqueux		Après incubation de l'extrait tamponné	
	Glucose non phosphorylé retrouvé (en mg.)	Glucose phosphorylé (en mg.)	Glucose non phosphorylé retrouvé (en mg.)	Glucose phosphorylé (en mg.)
10,000	9,500	0,5	8,960	1,040
10,000	8,990	1,010	7,960	2,040

expérience, la quantité de glucose phosphorylé fut de 1,040 mg. avec la solution tamponnée, et de 0,500 mg. avec l'extrait aqueux, pendant le même temps d'incubation. Lors d'une deuxième expérience, nous avons obtenu, par la solution-tampon, 2,040 mg. de glucose phosphorylé, et 1,010 mg. avec l'extrait aqueux.

L'extrait frais de la muqueuse intestinale contenant de l'hexokinase est obtenu de la façon suivante : après avoir tué l'animal par choc, on dégage rapidement l'intestin grêle. Cette partie excisée est rincée soigneusement au sérum physiologique conservé en glacière. On ouvre alors l'intestin, on broie la muqueuse prélevée dans un mortier durant 4 minutes, puis on ajoute une quantité double de solution-tampon phosphatique au NaCl (1,45 m. + 0,5 % NaCl : pH = 7,6) et on centrifuge ce mélange pendant 10 minutes. Toutes ces opérations doivent être faites à froid (4° C).

Le procédé d'expérience est basé sur les données de CORI et de ses collaborateurs. Comme notre prise d'essai était de 2 cc. de solution de ferment, nous avons porté la dose de NaF de 0,15 à 0,5 cc. pour inhiber l'activité des phosphatases (voir tableau 2).

Tab. 2. Influence de la dose de NaF sur la réaction de phosphorylation

Glucose ajouté en mg.	Glucose non phosphorylé retrouvé après incubation de 50' (en mg.)		
	Dose de NaF par prise d'essai		
	0,15 cc.	0,5 cc.	1,0 cc.
10,000	9,800	8,880	9,600
10,000	9,020	8,140	—

Notre prise d'essai comprend 0,8 cc. de MgCl<sub>2</sub> 0,4 m. + 1,35 cc. de CO<sub>3</sub>HNa 0,1 m. + 0,2 cc. ATP 0,1 m. + 0,5 cc. de NaF 1,8 m. + 0,2 cc. d'hexose à 5 % et 2 cc. d'extrait de ferment. Sans addition d'ATP, il ne se produit pas de réaction.

On prélève à deux reprises 1 cc. de ce mélange : une première fois immédiatement après l'addition du ferment, une seconde fois après incubation de 50 minutes à 37°. On ajoute à chaque échantillon 15 cc. d'eau distillée, on précipite les albumines et les esters phosphoriques des sucres par un mélange de sulfate de zinc (2 cc., à 5 %) et d'hydroxyde de baryum (2 cc., 0,3 n), et on dose alors le



sucre réducteur non phosphorylé du filtrat selon la méthode de NELSON (1944), c'est-à-dire par la mesure de l'intensité de coloration au colorimètre photoélectrique (Lumétron) à 530 m $\mu$ .

Nous avons fait quelques essais parallèles dans lesquels la phase gazeuse consistait soit en CO<sub>2</sub> 5 % et en N<sub>2</sub> 95 %, soit en air.

Tab. 3. Degré de phosphorylation du glucose suivant la phase gazeuse en présence  
Temps d'incubation : 50 minutes.

Glucose ajouté en mg.	Phase gazeuse			
	5 % CO <sub>2</sub> + 95 % N <sub>2</sub>		Air	
	Glucose non phosphorylé retrouvé	Glucose phosphorylé	Glucose non phosphorylé retrouvé	Glucose phosphorylé
10,000	8,680	1,320	8,560	1,440
10,000	8,640	1,360	8,560	1,440

Il ressort du tableau 3 qu'il n'y a aucune différence entre les résultats des expériences ayant comme phase gazeuse l'air ou un mélange de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub> 95 % N<sub>2</sub>). Nous avons, pour cette raison, renoncé à employer cette phase gazeuse artificielle dans nos expériences ultérieures.

#### Marge d'erreur

Pour déterminer la marge d'erreur, nous avons fait des essais parallèles.

Tab. 4. Degré de phosphorylation de différents hexoses

Hexose	Sucre ajouté en mg.	Sucre retrouvé après incubation de 50'	Sucre phosphorylé après incubation de 50'		Marge d'erreur
			en mg.	en %	
a) Glucose . .	10,000	8,160	1,840	18,4	± 1,5 %
» . .	10,000	8,480	1,520	15,2	
b) Glucose . .	10,000	8,720	1,280	12,8	± 1,2 %
» . .	10,000	8,960	1,040	10,4	
c) Galactose .	10,000	6,360	3,640	36,4	± 0,1 %
» .	10,000	6,340	3,660	36,6	

On constate, par le tableau 4, que la marge d'erreur moyenne est de ± 0,92 %.

## Exposé expérimental

### I. L'activité phosphorylante de l'hexokinase intestinale provenant de différentes espèces animales

Nos premiers essais avec des extraits de ferment provenant de la muqueuse intestinale du veau, du porc et du lapin ne se rapportaient qu'à la phosphorylation du glucose.

Tab. 5. Variations de l'activité phosphorylante des extraits suivant les espèces

Animal d'expérience	Glucose ajouté (en mg.)	Glucose non phosphorylé après incub. de 50'	Glucose phosphorylé après incubation de 50'
Veau . . . . .	10,000	9,820	0,180
» . . . . .	10,000	9,120	0,880
» . . . . .	10,000	9,950	0,050
Porc . . . . .	10,000	9,720	0,280
» . . . . .	10,000	8,960	1,040
» . . . . .	10,000	9,440	0,560
» . . . . .	10,000	9,900	0,100
Lapin . . . . .	10,000	8,860	1,140
» . . . . .	10,000	8,720	1,280
» . . . . .	10,000	9,040	0,960
» . . . . .	10,000	9,120	0,880
» . . . . .	10,000	9,900	0,100

Comme nous l'avons déjà mentionné, il s'est avéré que l'activité de l'hexokinase se trouve diminuée lorsque l'intestin contient du chyme et de la bile. Nous avons même pu constater dans certains cas (voir tableau 5) que l'extrait ne montrait aucune activité enzymatique. C'est pourquoi nous avons poursuivi nos expériences sur des animaux laissés sans nourriture pendant 48 heures.

### II. Influence du facteur temps sur l'activité de l'hexokinase

Afin de nous rendre compte de la variation du degré de phosphorylation en fonction du temps, nous avons fait deux essais avec un extrait de ferment d'un intestin de lapin, essais dont nous rapportons les moyennes des résultats obtenus dans le tableau 6.

*Tab. 6. Variation du degré de phosphorylation en fonction du temps d'incubation*

Minutes	15'	30'	45'	60'
Quantité de glucose phosphorylé, en mg. (moyennes)	0,400	1,040	1,150	1,200

Le tableau 6 nous montre que le degré de phosphorylation croît avec le temps d'incubation jusqu'à une certaine limite, correspondant à la position d'équilibre de la réaction, position pratiquement atteinte au bout de 50 minutes. Ces résultats nous ont servi de base pour fixer le temps d'incubation à 50 minutes.

### III. Expériences en vue de déterminer l'action de l'hexokinase sur la phosphorylation de différents monosaccharides

Nous avons étendu nos expériences à différents sucres et nous avons obtenu, avec le même extrait de ferment, les résultats suivants :

*Tab. 7. Action de l'hexokinase du lapin sur la phosphorylation des hexoses*

Animal d'expérience : Lapin.

Hexose	Sucre ajouté (en mg.)	Hexose non phosphorylé retrouvé après incubation de 50'	Hexose phosphorylé après incubation de 50'
Glucose . .	10,000	9,120	0,880
Galactose .	10,000	8,720	1,280
Fructose .	10,000	8,560	1,440
Sorbose . .	10,000	9,440	0,560

Il ressort de ce tableau que le degré de phosphorylation varie selon la structure moléculaire du sucre, ou, en d'autres termes, que les vitesses de phosphorylation des différents sucres ne sont pas égales.

Dans nos expériences ultérieures, nous nous sommes servis d'extrait de ferment provenant de la muqueuse intestinale du chat. Nos résultats sont condensés dans les tableaux 8 à 13.

Tab. 8. La phosphorylation du glucose

N° d'expérience	Glucose ajouté (en gammas)	Quantité de glucose libre non phosphorylé après incubation de 50'	Glucose phosphorylé pendant l'incubation
1a *	10'000	9120	880
2a	10'000	9200	800
3a	10'000	8800	1200
4a	10'000	8400	1600
5a	10'000	9200	800
6a	10'000	9120	880
7a	10'000	9020	980
8a	10'000	8800	1200
9a	10'000	8720	1280
10a	10'000	8160	1840
11a	10'000	8400	1600
12a	10'000	8240	1760
13a	10'000	8160	1840
13b -	10'000	8480	1520
			moyenne : 18180 : 14 = <u>1298,5</u>

\* Voir tableau 12.

Tab. 9. La phosphorylation du galactose

N° d'expérience	Galactose ajouté (en gammas)	Quantité de galactose libre non phosphorylé après incubation de 50'	Galactose phosphorylé pendant l'incubation
1b *	10'000	7600	2400
2b	10'000	8960	1040
4b -	10'000	7040	2960
5b	10'000	8640	1360
6b	10'000	8240	1760
7b	10'000	8560	1440
8b	10'000	8800	1200
9b	10'000	8960	1040
10b	10'000	5920	4080
11b	10'000	7920	2080
12b	10'000	7760	2240
13c -	10'000	6320	3680
			moyenne : 25280 : 12 = <u>2106,6</u>

Tab. 10. La phosphorylation du fructose

N <sup>o</sup> d'expérience	Fructose ajouté (en gammas)	Quantité de fructose libre non phosphorylé après incubation de 50'	Fructose phosphorylé pendant l'incubation
1c *	10'000	7600	2400
2c	10'000	8720	1280
4c	10'000	6800	3200
5c	10'000	7440	2560
6c	10'000	8720	1280
7c	10'000	7280	2720
8c	10'000	7840	2160
9c	10'000	8640	1360
10c	10'000	5200	4800
11c	10'000	8080	1920
12c	10'000	7680	2320
13d —	10'000	7600	2400
			moyenne : 28400 : 12
			= <u>2368,8</u>

Tab. 11. La phosphorylation du sorbose

N <sup>o</sup> d'expérience	Sorbose ajouté (en gammas)	Quantité de sorbose libre non phosphorylé après incubation de 50'	Sorbose phosphorylé pendant l'incubation
1d *	10'000	9360	640
2d	10'000	8800	1200
4d —	10'000	8880	1120
6d —	10'000	9680	320
7d	10'000	9040	960
8d	10'000	9520	480
9d	10'000	9440	560
11d	10'000	8960	1040
12d	10'000	8720	1280
13e —	10'000	9600	400
			8000 : 10 = <u>800</u>



Tab. 12. La phosphorylation du mannose

N° d'expérience	Mannose ajouté (en gammas)	Quantité de mannose libre non phosphorylé après incubation de 50'	Mannose phosphorylé pendant l'incubation
2e *	10'000	9360	640
6e -	10'000	9680	320
7e	10'000	9280	720
8e	10'000	9120	880
10d -	10'000	9520	480
12e	10'000	9880	120
			<u>4680 : 7 = 668,5</u>

\* Ces chiffres indiquent que les expériences ont été faites avec le même extrait de muqueuse ; les lettres indiquent les différents sucres.

Tab. 13. La phosphorylation du xylose comparée à celle du glucose

N° d'expérience	Hexose	Hexose ajouté (en mg.)	Hexose non phosphorylé retrouvé après incubation de 50'	Hexose phosphorylé après incubation de 50'
A 1	Glucose	10,000	8,720	1,280
A 2	Xylose	10,000	9,600	0,400
B 1	Glucose	10,000	8,320	1,680
B 2	Xylose	10,000	9,360	0,640
C 1	Glucose	10,000	8,960	1,040
C 2	Xylose	10,000	10,000	—
D 1	Glucose	10,000	9,280	0,720
D 2	Xylose	10,000	9,760	0,240
E 1	Glucose	10,000	9,120	0,880
E 2	Xylose	10,000	9,440	0,560
F 1	Glucose	10,000	8,800	1,200
F 2	Xylose	10,000	9,360	0,640
G 1	Glucose	10,000	9,280	0,720
G 2	Xylose	10,000	9,760	0,240
H 1	Glucose	10,000	9,360	0,640
H 2	Xylose	10,000	9,840	0,160
I 1	Glucose	10,000	8,400	1,600
I 2	Xylose	10,000	9,440	0,560
K 1	Glucose	10,000	8,560	1,440
K 2	Xylose	10,000	9,680	0,320

Les tableaux 8 à 12 démontrent clairement que les rapports des vitesses de phosphorylation des différents sucres correspondent d'une série à l'autre, malgré une activité enzymatique variant sensiblement d'animal à animal. Les différences qui existent dans la quantité de sucre phosphorylé entre le mannose et le sorbose sont susceptibles d'entrer dans la marge d'erreur. Nos essais avec le xylose ont été faits séparément. Afin de pouvoir établir la comparaison entre la phosphorylation du xylose et celle des autres sucres, nous avons procédé à des essais parallèles avec le xylose et le glucose. Les résultats obtenus ont été condensés dans le tableau 13.

En admettant que la quantité de glucose phosphorylé pendant le temps normal d'incubation (50 min.) soit égale à 100, on obtient les vitesses relatives de phosphorylation suivantes :

Fructose . . . . .	184,4
Galactose. . . . .	161,6
Glucose . . . . .	100
Sorbose . . . . .	61,8
Mannose . . . . .	51,4
Xylose. . . . .	29,7

A l'exception du fructose, dont nous parlerons plus tard, nos expériences *in vitro* sur les vitesses de phosphorylation des différents monosaccharides correspondent aux vitesses d'absorption observées *in vivo* chez différentes espèces animales.

#### IV. Influence de l'acide mono-iodo-acétique sur l'activité de l'hexokinase

Après avoir établi qu'il existe réellement un parallélisme entre l'activité de l'hexokinase *in vitro*, la vitesse de phosphorylation et la vitesse d'absorption, nous avons tenté de travailler avec différentes substances qui inhibent l'absorption, dans le but de déterminer leur mode d'action sur l'hexokinase et son activité.

L'influence de l'acide mono-iodo-acétique (m.-i.-a.) nous semblait être particulièrement intéressante. La fermentation de la levure qui débute par la phosphorylation du sucre est inhibée par l'acide m.-i.-a. Cette fermentation a lieu, par contre, si l'on remplace le sucre par un hexose phosphorylé. L'acide m.-i.-a. inhibe aussi la formation d'acide lactique dans les extraits de muscle. Ce fait est

dû non pas à une inhibition de la phosphorylation, mais à une accumulation de phosphate d'hexose qui ne peut plus être dégradé. OSTERN (1934) a découvert que l'acide m.-i.-a. inhibe la dismutation intra-moléculaire de l'acide triose-phosphorique en acide phosphoglycérique, dans la glycolyse musculaire. C'est ainsi que cet agent peut atteindre les processus de phosphorylation par voie indirecte.

BACQ (1941) a constaté, au cours d'expériences récentes, que l'activité de l'hexokinase dépend de la présence d'un groupe thiol. On admet que l'inhibition des processus de fermentation par l'acide m.-i.-a. est due à sa propriété d'oxyder le groupe thiol du ferment.

C'est pour ces raisons qu'il nous importait de savoir si l'activité de l'hexokinase dépend bien d'un groupe thiol libre, et si celui-ci peut être oxydé par l'acide m.-i.-a. Nous nous sommes servis uniquement de glucose comme substrat de ces essais, et nous avons ajouté, à chaque prise, de l'acide m.-i.-a. en différentes concentrations.

*Tab. 14. Influence de l'acide mono-iodo-acétique sur l'activité de l'hexokinase intestinale*

Mol. acide mono-iodo-acétique	Quantité de glucose phosphorylé après une incubation de 50'	
	avec acide m.-i.-a.	sans acide m.-i.-a.
$5,37 \cdot 10^{-3}$	0,640 mg.	0,800 mg.
$2,66 \cdot 10^{-3}$	1,040	0,880
$2,66 \cdot 10^{-3}$	0,720	1,040
$5,37 \cdot 10^{-3}$	0,720	1,200
$8,66 \cdot 10^{-3}$	1,440	1,360
$5,37 \cdot 10^{-3}$	0,640	0,500
$5,37 \cdot 10^{-3}$	0,720	0,640

Il ressort de ce tableau que l'acide m.-i.-a., lorsque le degré de concentration varie de  $2,66 \cdot 10^{-3}$  à  $8,6 \cdot 10^{-3}$ , n'a aucune influence inhibitrice sur l'activité de l'hexokinase.

### V. Influence du sélénite sur l'activité de l'hexokinase

Après avoir observé les effets de l'acide m.-i.-a. sur l'extrait de muqueuse intestinale, nous avons entrepris l'étude de l'action du sélénite de soude, un autre poison typique du groupe thiol. LASZT (1951) trouva notamment que le sélénite inhibe l'absorption

du glucose au niveau de l'intestin. Nous avons procédé alors de la même façon que pour l'acide m.-i.-a. et il s'est avéré que le sélénite de soude, à une concentration de  $1,86 \cdot 10^{-3}$  à  $3,72 \cdot 10^{-3}$ , inhibe fortement l'activité de l'hexokinase. Nous renvoyons au tableau qui suit :

*Tab. 15. Influence du sélénite de soude sur l'activité de l'hexokinase intestinale*

Mol. sélénite ( $\text{SeO}_3\text{Na}_2 + \text{H}_2\text{O}$ )	Quantité de glucose phosphorylé après une incubation de 50'	
	avec sélénite	sans sélénite
$2 \cdot 10^{-3}$	1,520 mg.	2,080 mg.
$2 \cdot 10^{-3}$	1,460	1,920
$5 \cdot 10^{-3}$	0,300	0,680
$5 \cdot 10^{-3}$	0,400	1,120
$5 \cdot 10^{-3}$	0,240	1,520

## VI. Influence de la paludrine sur l'activité de l'hexokinase

MARSHALL (1947) a fait des recherches quant à l'action de la paludrine sur la consommation de glucose et d'oxygène dans les érythrocytes. Il pense qu'il est probable que la paludrine inhibe l'activité de l'hexokinase des globules rouges. LASZT (1951) a trouvé que la paludrine enrayer la fermentation de la levure. D'après ses recherches sur des rats diabétiques, on a pu conclure que la paludrine exerce aussi une action inhibitrice sur l'absorption du sucre au niveau de l'intestin. Nous avons examiné l'effet de la paludrine

*Tab. 16. Influence de la paludrine sur l'activité de l'hexokinase intestinale*

Mol. paludrine	Quantité de glucose phosphorylé après une incubation de 50' (en mg.)	
	avec paludrine	sans paludrine
$4 \cdot 10^{-3}$	0,600	1,920
$4 \cdot 10^{-3}$	1,280	2,000
$4 \cdot 10^{-3}$	0,880	1,440
$4 \cdot 10^{-3}$	0,240 *	1,400 *
$4 \cdot 10^{-3}$	0,000 *	1,400 *

\* Essais faits avec du galactose.

sur l'activité de l'hexokinase. Comme l'indique le *tableau 16*, la paludrine, à la concentration de  $4 \cdot 10^{-3}$ , a un effet inhibiteur sur l'activité de l'hexokinase.

### VII. Influence de l'atébrine et du 2,4-dinitro-phénol sur l'activité de l'hexokinase

LOOMIS et LIPMANN (1948) ont trouvé que l'atébrine et le dinitro-phénol inhibent la phosphorylation oxydante dans une préparation de tissu rénal homogénéisé. Ces deux corps par leur substitution au groupe phosphate entravent la phosphorylation. HELLERMANN, BOVARNICK et PORTER (1946) ont constaté que l'influence de l'atébrine sur des systèmes enzymatiques isolés est supprimée par l'ATP. Ils supposent que l'atébrine et l'ATP (co-ferment indispensable à la phosphorylation du glucose) entrent en concurrence avec les albumines du ferment. LASZT (1948) a observé que l'atébrine inhibe l'absorption du glucose à une concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$ ; cette action est cependant moins prononcée que celle de l'acide mono-iodo-acétique.

Il nous importait de savoir si l'activité de l'hexokinase de la muqueuse intestinale pouvait être influencée *in vitro* par la présence d'atébrine ou de dinitro-phénol.

On peut conclure, d'après le tableau ci-dessous, que l'atébrine, à la concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$ , et le dinitro-phénol, à la concentration de  $2,7 \cdot 10^{-3}$ , n'ont aucune influence sur l'activité de l'hexokinase dans les conditions données.

Tab. 17. Influence de l'atébrine et du 2,4-dinitro-phénol sur l'activité de l'hexokinase intestinale

1) Mol. atébrine 2) Mol. dinitro-phénol	Quantité de glucose phosphorylé après une incubation de 50' (en mg.)	
	+ atébrine ou dinitro-phénol	essai témoin
$5 \cdot 10^{-3}$ 1)	1,200 1)	1,200
$5 \cdot 10^{-3}$ 1)	2,160 1)	2,000
$5 \cdot 10^{-3}$ 1)	0,560 1)	0,640
$5 \cdot 10^{-3}$ 1)	0,600 1)	0,720
$2,7 \cdot 10^{-3}$ 2)	1,960 2)	2,000
$2,7 \cdot 10^{-3}$ 2)	1,120 2)	1,200



### VIII. Influence de l'insuline sur l'activité de l'hexokinase

LASZT et VOGEL (1946) ont constaté que chez des rats atteints de diabète alloxanique, la vitesse de résorption augmente parallèlement à l'intensité du diabète, et qu'elle redevient normale après injection d'insuline. La question de l'influence de l'insuline sur l'activité de l'hexokinase présentait déjà une certaine importance du fait que CORI et ses collaborateurs (1945, 1947) avaient démontré que chez les animaux alloxane-diabétiques, l'activité de l'hexokinase

Tab. 18. Influence de l'insuline sur l'activité de l'hexokinase

N° d'essai	U. I. d'insuline par prise d'essai	Quantité de glucose phosphorylé après une incubation de 50' (en mg.)	
		+ insuline	sans insuline
1	10 *	1,560 *	2,000
2a	12 *	1,040 *	1,040
2b	12 *	0,800 *	0,800
3a	24	0,600	1,540
3b	8	0,960	—
3c	4	1,320	—
4a	12	1,280	1,040
4b	8	0,800	—
4c	4	1,040	—
5a	12	1,680	1,280
5b	8	0,760	1,120
5c	4	1,760	—
6a	16	0,800	1,520
6b	16	1,320	1,760
7a	16	0,960	0,840
7b	16	1,200	1,120
8a	16	1,040	1,920
8b	16	1,280	2,000
9a	16	0,400	0,720
9b	16	0,680	1,040
10a	16	0,880	1,080
10b	16	0,800	1,080
11a	16	1,040	1,040
11b	16	0,800	1,040

\* Essais faits avec de la substance pure qui a été mise gracieusement à notre disposition par la maison Hoffmann-La Roche & C<sup>ie</sup> S. A., Bâle.

était diminuée, mais qu'elle pouvait être ramenée à sa valeur normale par l'insuline. Nous n'avons étudié l'activité de l'hexokinase que sur le glucose, avec ou sans insuline. Pour certaines expériences, nous avons utilisé la substance pure en doses de 10 à 12 unités par essai. Pour d'autres, nous avons employé de l'iloglandol (4-24 U. par essai).

Selon les indications du tableau, on constate qu'aussi bien la substance pure que l'iloglandol exercent, dans certaines expériences, une influence inhibitrice marquée sur l'activité de l'hexokinase. Cependant, dans la plupart des extraits, l'insuline n'a aucune action. Comme des essais parallèles ont été faits avec l'insuline, et que les valeurs obtenues se trouvent bien en dehors des limites d'erreur, il faut admettre dans quelques extraits une action inhibitrice réelle. La question de savoir à quoi il faut attribuer cette inhibition, reste pour le moment en suspens,

## Discussion

Dans le présent travail, nous nous sommes proposé de mettre en évidence l'activité de l'hexokinase dans des extraits bruts de muqueuse intestinale, et de vérifier s'il existe un parallélisme entre les vitesses de phosphorylation des différents monosaccharides *in vitro* et leurs vitesses de résorption.

Quoique l'activité des différents extraits provenant d'animaux divers présente, malgré un traitement préalable identique, de grandes différences, on peut cependant démontrer que, pour des extraits d'un seul et même animal, les monosaccharides ne sont pas tous phosphorylés dans la même mesure. Avec les extraits de muqueuse de lapin aussi bien qu'avec ceux de chat, nous avons obtenu la série suivante :

Fructose . . . . .	184,4
Galactose. . . . .	161,6
Glucose . . . . .	100,0
Sorbose . . . . .	61,8
Mannose . . . . .	51,4
Xylose. . . . .	29,7

Soulignons que ces chiffres représentent les moyennes des essais dans lesquels nous avons étudié simultanément, avec le même

extrait, l'activité de l'hexokinase sur plusieurs monosaccharides, indiqués dans les tableaux 8 à 13.

Abstraction faite de la vitesse de phosphorylation du fructose, la vitesse de phosphorylation des autres monosaccharides concorde avec leur vitesse de résorption. Les écarts de vitesse de phosphorylation entre le sorbose et le mannose ne sont pas très grands, et peuvent encore s'insérer dans la limite d'erreur.

Nous ne pouvons malheureusement pas établir de comparaisons quantitatives entre les vitesses de phosphorylation *in vitro* et les vitesses de résorption chez le chat, car, sur cet animal, aucun essai précis n'a encore été effectué quant aux vitesses de résorption des divers monosaccharides. ISSEKUTZ, LASZT et VERZÀR (1938) n'ont examiné, chez les chats, que la résorption du glucose et du xylose. Ces expériences prouvent que, dans ce cas aussi, le glucose est résorbé sélectivement. Mais le rapport des vitesses de résorption du glucose et du xylose est notablement plus petit chez le chat que chez le rat (2 : 1 chez le chat ; 4 : 1 environ chez le rat). Ce qui est certain, c'est que l'on a constaté l'ordre indiqué plus haut chez toutes les espèces étudiées jusqu'ici, même chez les animaux à sang froid, seuls les rapports des nombres varient suivant les espèces. Comme il a été mentionné plus haut, c'est le fructose qui est phosphorylé le plus rapidement, ce qui est en contradiction avec la vitesse de résorption de ce sucre. La résorption sélective des hexoses dépend aussi bien de leur vitesse de phosphorylation à leur entrée par la surface extérieure de la membrane cellulaire, que de leur vitesse de déphosphorylation (activité de la phosphatase) à la surface intérieure de cette membrane, lors de leur sortie de la cellule. En effet, les sucres résorbés se retrouvent à l'état libre dans le sang. Ainsi que l'ont déjà démontré LASZT et SÜLLMANN (1935) et plus tard KJERULF-JENSEN KAJ (1942), l'ester phosphorique du fructose, pendant la résorption de ce sucre, s'accumule davantage que celui des autres sucres. KALCKAR (1938) a examiné cette question plus en détail. Il a démontré que la muqueuse intestinale scinde très lentement l'ester fructose-phosphorique formé, c'est-à-dire que la vitesse de phosphorylation de ce sucre est bien supérieure à celle d'autres sucres ; la vitesse de scission, par contre, serait plus faible, ce qui entraîne un ralentissement de la résorption.

On trouve dans la muqueuse intestinale plusieurs phosphatases,

dont l'action sur les différents esters phosphoriques des sucres n'a pas encore pu être étudiée en détail. ROCHE et BOUCHILLOUX (1950) ont examiné l'action de diverses fractions de mono-estérase phosphoriques (phosphatases) alcalines du chien et du porc, sur la vitesse de scission de différents acides saccharo-phosphoriques. Ils mirent en évidence que les phosphates (6) de glucose, de galactose et de mannose ont, sous l'action du ferment, une vitesse de scission à peu près égale ; par contre, la vitesse de scission du phosphate (6) de fructose est considérablement plus élevée.

L'emploi de poisons pour ferments nous a donné les résultats attendus. Il est étonnant de constater que le sélénite, qui agit sur les groupes thiols des ferments, paralyse presque complètement l'activité de l'hexokinase dans des extraits de muqueuse d'intestin grêle, tandis que l'acide mono-iodo-acétique, que l'on admet être aussi un poison du groupe thiol, n'exerce, à concentration à peu près égale à celle du sélénite, aucune action inhibitrice sur l'activité de l'hexokinase.

Le mécanisme de l'action de l'atébrine et du dinitrophénol est différent, ainsi qu'il a été mentionné plus haut ; comme l'ATP neutralise l'effet de l'atébrine, on pouvait s'attendre à ce que, dans nos expériences, il ne se produise aucune inhibition. De plus, il est remarquable de constater que le xylose est aussi phosphorylé *in vitro*. Par contre, la résorption du xylose dans l'intestin n'est pas influencée par des substances capables d'inhiber la phosphorylation.

Il faut admettre qu'une inhibition totale de l'activité de l'hexokinase par des poisons est incompatible avec les processus vitaux. C'est pourquoi l'activité de l'hexokinase n'est que partiellement inhibée dans les essais quant à l'influence des poisons sur la résorption. D'autre part, comme la phosphorylation du xylose est très faible, l'influence des poisons sur sa résorption ne peut être décelée.

## RÉSUMÉ

1. Dans le présent travail, nous avons étudié l'activité de l'hexokinase, provenant d'extraits bruts de muqueuse de l'intestin grêle de différentes espèces d'animaux, sur la vitesse de phosphorylation de divers monosaccharides.

2. On a constaté l'ordre suivant :

Fructose . . . . .	184,4
Galactose. . . . .	161,6
Glucose . . . . .	100,0
Sorbose . . . . .	61,8
Mannose . . . . .	51,4
Xylose. . . . .	29,7

3. Abstraction faite de la vitesse de phosphorylation du fructose, les vitesses de phosphorylation des autres monosaccharides concordent avec les vitesses de résorption des sucres correspondants.

4. Le sélénite (conc.  $1,86 - 3,72 \cdot 10^{-3}$ ), la paludrine (conc.  $4 \cdot 10^{-3}$ ) paralysent l'activité de l'hexokinase.

5. L'acide mono-iodo-acétique (conc.  $2,66 - 8,6 \cdot 10^{-3}$ ), l'atébrine (conc.  $5 \cdot 10^{-3}$ ), le dinitrophénol (conc.  $2,7 \cdot 10^{-3}$ ) n'ont pas d'action inhibitrice.

6. Le fait que le fructose est phosphorylé plus rapidement que les autres monosaccharides, ce qui ne concorde pas avec sa vitesse de résorption, est soumis à une discussion.

### Bibliographie

- ABDERHALDEN E. et EFFKEMANN G., Biochem. Z. 223, 514 (1934).  
ARNOLD C., Anat. Anz. 43, 437 (1893).  
BACQ M. C., Enzymologia 10, 48 (1941).  
BECK L. V., J. biol. Chem. 143, 403 (1942).  
BERGER J., SLEIN M. W., COLOWICK S. P., CORI C. F., J. gen. Physiol. 29, 379 (1941).  
— — J. gen. Physiol. 29, 391 (1946).  
COLOWICK S. P., CORI G. T. et SLEIN M. W., J. biol. Chem. 168, 583 (1947).  
COLOWICK S. R. et SUTHERLAND E. W., J. biol. Chem. (Am.) 144, 423 (1942).  
CORI C. F., J. biol. Chem. 66, 691 (1925).  
— — Proc. Roy. Soc., Londres 22, 497 (1925).  
CSAKY T., Z. physiol. Chem. 277, 47 (1942).  
HEDON E. C. R., Soc. biol. 52, 41 (1900).  
— — Soc. biol. 52, 87 (1900).  
HELLERMANN L., BOVARNICK M. R. et PORTNER C. C., Fed. Proc. 5, 400 (1946).  
HÖBER R., Pflügers Arch. 47, 246 (1899).  
v. ISSEKUTZ B., LASZT L. et VERZAR F., Pflügers Arch. 240, 6 (1938).  
KALCKAR H., Nature 1938, 76.  
KJERULF-JENSEN KAJ, Act. physiol. scand. 4, 225 (1942).



- LASZT L., *Biochem. Z.* 276, 44 (1935).  
— — *Aerzt. M.-Hefte*, 4, 661 (1948).  
— — *Schweiz. med. Wochenschr.* 1951, 81.  
LASZT L. et DALLA TORRE, *Schweiz. med. W'schr.* 71, 1416 (1941).  
LASZT L. et SÜLLMANN H., *Biochem. Z.* 278, 401 (1935).  
LASZT L. et VOGEL H., *Nature* 157, 551 (1946).  
LOHMANN K., *Biochem. Z.* 236, 444 (1931).  
LEUTHARDT F. et TESTA E., *Helv. physiol. pharm. Acta* 8, C 67 (1950).  
— — *Helv. chim. Acta* 34, 93 (1951).  
LOOMIS W. F. et LIPMANN F., *J. biol. Chem.* 173, 807 (1948).  
LUNDSGAARD E., *Biochem. Z.* 220, 1 (1930).  
— — *Biochem. Z.* 246, 221 (1933).  
MAGEE H. E. et REID E., *J. Physiol. (Brit.)* 73, 181 (1931).  
MARSHALL P. B., *Nature* 160, 463 (1947).  
MEYERHOF O., *Biochem. Z.* 183, 176 (1927).  
— — *Biochem. Z.* 246, 249 (1932).  
MINNIBECK H., *Pflügers Arch.* 242, 344 (1939).  
NAGANO J., *Pflügers Arch.* 90, 389 (1902).  
NAKASAWA F., *Tohoku J. exper.* 3, 288 (1922).  
NELSON N., *J. biol. Chem.* 153, 375 (1944).  
OEHNELL R. et HÖBER R., *J. cell. comp. Physiol.* 13, 161 (1939).  
OSTERN P., *Biochem. Z.* 275, 87 (1934).  
PRICE W. H., CORI C. F. et COLOWICK S. P., *J. biol. Chem.* 160, 633 (1945).  
ROCHE J. et BOUCHILLOUX SIMONE, *Bull. Soc. chim. biol.* 32, 739 (1950).  
WERTHEIMER Z., *Pflügers Arch.* 233, 514 (1934).  
WESTENBRINK H. T. K., *Arch. néerl. Physiol.* 21, 433 (1936).  
WILBRANDT W. et LASZT L., *Biochem. Z'schr.* 259, 398 (1933).  
WILSON R. H., *J. biol. Chem.* 97, 497 (1932).  
VERZÀR F., *Ergebn. der Physiol.* 32, 391 (1931).  
YAMASAKI I., *Biochem. Z.* 228, 123 (1930).