

Action de la phloridzine et de divers glycosides sur des tréhalases de Mammifères

J. LABAT, J. F. DEMELIER et J. E. COURTOIS

*Laboratoires de biochimie de l'Hôpital Laënnec et de la Faculté de pharmacie, Paris**

La tréhalase intestinale du Porc a été purifiée. Les propriétés sont similaires à celles des tréhalases purifiées des reins de l'Homme et du Porc: pH optimum vers 5,7, combinaison tréhalose—tréhalase peu dissociée, absence d'activation par les cations métalliques, inhibition compétitive par le saccharose.

Divers hétérosides phénoliques ont exercé une inhibition: phloridzine, arbutine, picéoside. Le phlorétol provoque une inhibition plus accentuée que la phloridzine.

Parmi les hétérosides étudiés, à structure se rapprochant de celle de la phloridzine, seuls l'isoasebotine et le salipurposide se sont révélés inhibiteurs. Le rôle physiologique possible de ces tréhalases est examiné lors de la discussion des résultats.

The intestinal trehalase of pig has been purified. Its properties are similar to those of purified trehalases from the kidneys of man or pig: optimum pH about 5.7, trehalose—trehalase linkage dissociated little, absence of activation by metal cations, competitive inhibition by sucrose.

Some phenol heterosides have manifested inhibition: phloridzine, arbutino, piceoside. Phloretol causes a more important inhibition in comparison to phloridzine.

Among the heterosides with a structure resembling that of phloridzine which have been studied, only isoasebotine and salipurposide have proved to be inhibitors. The possible physiological role of these trehalases is discussed in connection with the results obtained.

La tréhalase est une enzyme de spécificité très étroite qui paraît se limiter au seul tréhalose; elle hydrolyse ce disaccharide en deux molécules de glucose. La tréhalase est l' α - α' -glucoside-1-glucohydrolase (E.C.3.2.1.28). Elle a été décelée chez la plupart des Mammifères, dans divers organes et liquides biologiques [1—4]. Le rein, la muqueuse de l'intestin grêle en sont les plus riches. Le foie présente une activité minime. Le sérum, les urines [5, 6], la bile [7] en contiennent constamment de faibles quantités.

Le but de notre travail est de chercher à préciser l'origine des tréhalases, leur rôle biologique. Nous avons donc successivement purifié la tréhalase du rein de Porc [8], du rein d'Homme [9]. Nous rapportons ici les résultats que nous avons obtenu lors de la purification de la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc.

Communication présentée au colloque franco-tchécoslovaque sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Smolenice (Slovaquie), 29. Septembre — 4. Octobre 1969.

* E. R. A. n° 99, osides et osidasas du C. N. R. S.

Nous avons soumis ces trois préparations enzymatiques à l'action de divers effecteurs en insistant sur des composés plus ou moins apparentés à la phloridzine dont on connaît l'action sur de nombreux enzymes participant activement au transport des oses.

Matériel et méthodes

Tréhalases rénales de l'Homme et du Porc

La description de la préparation des tréhalases rénales de l'Homme et du Porc, de même que celle des dosages des activités enzymatiques sont les mêmes que celles qui ont été présentées dans des mémoires antérieurs [8, 9].

Préparation de tréhalase intestinale de Porc

Les intestins grêles des animaux sont prélevés aussitôt après l'abattage, rincés avec une solution de chlorure de sodium à 9‰ à 4°C et excisés. La muqueuse est alors séparée de la paroi intestinale par grattage avec une lame de verre.

Les différentes étapes de la préparation sont alors les suivantes:

a) Obtention de l'homogénat

1 partie de muqueuse est homogénéisée au broyeur à lame rotative avec 2 parties de mélange extractif [8]. L'homogénat est centrifugé 30 minutes à 10 000 tours/minute.

b) Précipitation par le sulfate d'ammonium

La fraction douée d'activité enzymatique se trouve dans la zone précipitant entre 50 et 70% de saturation à pH 5,2.

c) Électrophorèse en débit continu

La fraction précédente est soumise, après élimination du sulfate d'ammonium par dialyse à une électrophorèse préparative en débit continu. Les fractions douées d'activité tréhalasique sont rassemblées, dialysées contre de l'eau distillée et concentrées dans le boyau de dialyse par évaporation dans un courant d'air à 4°C.

d) Gel-filtration

La préparation précédente est purifiée par passage sur une colonne de Sephadex C 200, équilibrée par une solution de chlorure de sodium 0,1 M.

La courbe d'éluion de l'enzyme est présentée sur la figure 1. Les densités optiques sont portées en ordonnées, les volumes d'éluion en abscisses.

L'activité tréhalasique est localisée dans la branche ascendante du pic n° 3, matérialisée par la zone grise du schéma.

L'activité enzymatique spécifique de la préparation ainsi obtenue est environ 100 fois supérieure à celle de la préparation de départ. Cette préparation purifiée est dépourvue d'activité sur le saccharose, le lactose, le palatinose et le cellobiose. Seule per-

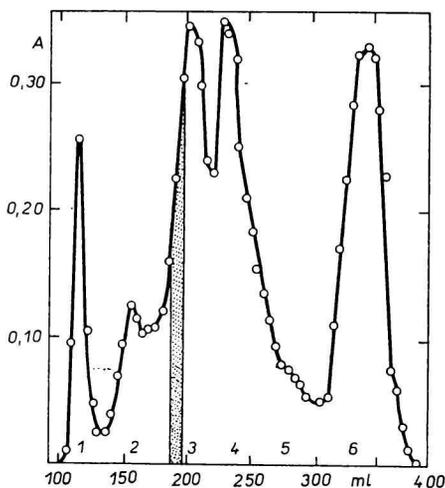


Fig. 1. Gel-filtration de la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc après précipitation par le sulfate d'ammonium et électrophorèse préparative.
A. absorbances à 280 nm; ml — volumes d'éluion en ml.

iste parmi les activités glycosidasiques une activité maltasique. Par chauffage de 10 minutes à 50°C et refroidissement immédiat, l'activité maltasique devenait nulle tandis que la tréhalase conservait la totalité de son activité initiale.

Effecteurs

Saccharose.

β -Phénylglucoside, picéoside que nous a aimablement remis M. R. Luneau [10], arbutine de *Saxifraga crassifolia* qui provenait de la collection Bourquelot-Hérissey de notre laboratoire.

Phloridzine Prolabo, phlorétol que nous avons préparé nous-mêmes à partir de la phloridzine par hydrolyse chlorhydrique (HCl 2% ébullition à reflux pendant 2 heures) suivie de recristallisation dans l'acétone; 4-méthyl-*p*-phloridzine, isoasébotine, sakuranine, sakuranétine-4'-glucoside, sakuranétine-5,4'-diglucoside, isosakuranétine diglucoside, pour lesquels il nous est agréable de remercier MM les Professeurs L. Mester et R. Bogner. Nous remercions également M. le Professeur R. R. Paris qui nous a fourni le salipurposide.

Ces divers effecteurs ont été utilisés à la concentration 0,01 M dans le milieu à l'exception de ceux qui, peu solubles, ont été employés à saturation dans le milieu.

Résultats

Caractères généraux des tréhalases de Mammifères

Relativement thermostable, puisqu'elle résiste à un chauffage de 10 minutes à 50°C et ne perd son activité qu'au delà de 60°C, la tréhalase de l'intestin de Porc présente un pH optimum situé entre 5,7—6,0. La valeur de son *K_m* a été déterminée selon trois modes de calcul différents:

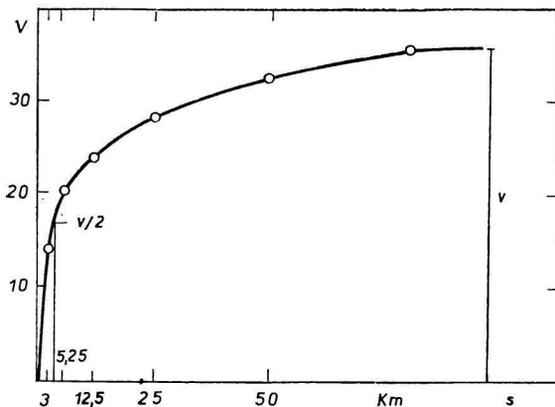


Fig. 2. Calcul de K_m de la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc d'après V_m .

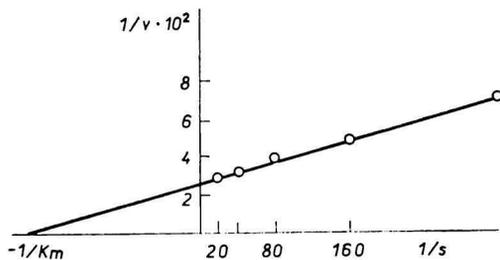


Fig. 3. Calcul de K_m de la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc, mode de représentation graphique de *Lineweaver et Burk*.

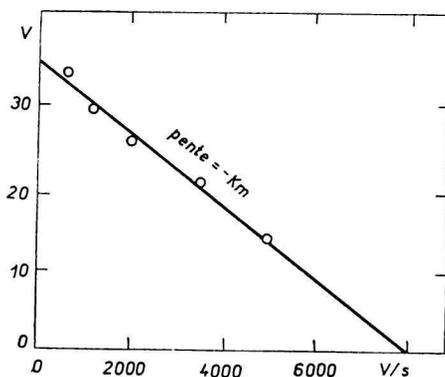


Fig. 4. Calcul de K_m de la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc, mode de représentation graphique d'*Augustinsson*.

- a) d'après V_m (fig. 2),
 b) selon le mode de représentation graphique de *Lineweaver et Burk* (fig. 3),
 c) en traçant, d'après *Augustinsson* [11], la courbe v en fonction de V/S . Ce dernier mode de représentation permet en outre de déceler l'existence dans un milieu de deux enzymes agissant indépendamment et simultanément sur le même substrat [12]. La représentation graphique obtenue lors de nos essais avec la tréhalase intestinale du Porc (fig. 4) est une droite. Il semble donc bien s'agir d'une seule et unique enzyme.

La valeur du K_m est de l'ordre de 5×10^{-3} M. Cette valeur représente la moyenne des trois résultats précédents.

Des valeurs identiques ont été obtenues avec diverses préparations d'intestin de Porc.

Nous avons rassemblé dans le tableau 1, afin de les comparer, les caractères généraux des trois tréhalases de Mammifères étudiées.

Tableau 1

Comparaison des caractères généraux des tréhalases rénales de l'Homme et du Porc et de la tréhalase intestinale du Porc

| Pourcentage d'activité après 10 mn de chauffage à : | Origine de la tréhalase | | |
|---|-------------------------|------------------------|----------------------|
| | rein d'Homme | Porc | |
| | | rein | intestin |
| 50°C | 88 | 101 | 107 |
| 60°C | 50 | 78 | 55 |
| 70°C | 3 | 6.5 | 2 |
| pH optimum | 5,6 | 5,7 | 5,7—6,0 |
| K_m | 3×10^{-3} M | $5,4 \times 10^{-3}$ M | 5×10^{-3} M |

L'analyse de ces résultats montre une grande analogie entre les trois tréhalases: même thermostabilité, valeurs comparables du pH optimum, valeurs du K_m du même ordre de grandeur. Dans les trois cas, le mode de représentation graphique du K_m selon Augustinsson a donné une droite; ceci permet d'envisager que dans chacune des trois préparations il ne paraît pas coexister d'isoenzymes de la tréhalase.

Action des effecteurs sur les tréhalases rénales et intestinales

I. Cations métalliques

Aux concentrations 1 mM, 5 mM et 10 mM dans le milieu, les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Co^{2+} se sont montrés sans effet sur le comportement des trois tréhalases.

Etudiant l'effet du Na^+ et du K^+ sur la tréhalase intestinale du Hamster, *Semenza* [13] avait obtenu des résultats analogues.

II. Tris

Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane est un inhibiteur des α -glucosidases [14–16]. Aux concentrations 1 mM et 5 mM dans le milieu, le Tris a inhibé les trois tréhalases étudiées. Cette inhibition ne peut être attribuée à un changement du pH du milieu. La pente d'activité de l'enzyme étant très abrupte dans la zone alcaline, nous avons ajusté au préalable le pH du milieu réactionnel à pH 5,6 lorsque cela a été nécessaire (concentration en Tris 5 mM). L'inhibition est de l'ordre de 20% pour une concentration en Tris de 1 mM.

III. Saccharose

La tréhalase de la muqueuse intestinale est inhibée compétitivement par le saccharose. Il en est de même pour les tréhalases rénales [8, 9].

Les valeurs des K_i , déterminées selon *Lineweaver* et *Burk*, d'après la formule

$$K_i = \frac{I}{\frac{K'm}{Km} - 1}$$

sont, dans les trois cas, du même ordre de grandeur:

tréhalase rénale du Porc: $K_i = 10,8 \times 10^{-3}$ M,

tréhalase rénale de l'Homme: $K_i = 6 \times 10^{-3}$ M,

tréhalase de l'intestin de Porc: $K_i = 9 \times 10^{-3}$ M.

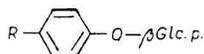
IV. Divers hétérosides

Avec la tréhalase du rein d'Homme [9], il avait été observé que divers hétérosides avaient exercé une action inhibitrice.

Des hétérosides avec un disaccharide relié à l'aglycone n'avaient pas manifesté d'action. Il en était de même pour la salicine et l'isoamyl- β -glucoside. Le picéoside et la phloridzine ont exercé une inhibition. Nous avons ainsi été amenés à étudier des hétérosides ayant des structures voisines du picéoside d'une part et de la phloridzine d'autre part.

I. Action du phényl- β -glucoside, du picéoside, de l'arbutine

À la concentration 0,01 M dans le milieu, le phényl- β -glucoside (I), le picéoside (II) et l'arbutine (III) ont inhibé les tréhalases de Mammifères:



| | |
|---|------------------------|
| I phényl- β -D-glucopyranoside | R = H |
| II picéoside (<i>p</i> -oxyacétophénone- β -glucoside) | R = CO-CH ₃ |
| III arbutine (hydroquinone- β -glucoside) | R = OH |

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

Le type de l'inhibition a été déterminé avec les trois tréhalases pour l'arbutine. Il s'agit d'une inhibition de type compétitif.

Tableau 2

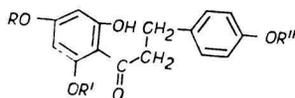
Action de trois β -glucosides d'aglycones benzéniques sur des tréhalases de Mammifères

| β -Glucoside d'aglycone benzénique | Origine de la tréhalase | | |
|---|-------------------------|----------|---------------|
| | Porc | | Homme rein |
| | rein | intestin | |
| phényl- β -glucoside | 19 ^a | 9 | 1,5 |
| picéoside | 18 | 20 | 17 |
| arbutine | 38 | 20 | 15 |

a) Les chiffres représentent les pourcentages d'inhibition obtenus à 37°C et à pH 5,7.

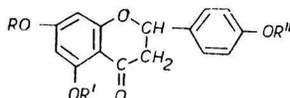
2. Action d'hétérosides du groupe des dihydrochalcones et des flavanones

A. Groupe des dihydrochalcones:



| | |
|------------------------------------|--|
| IV phlorétol | R = H R' = H R'' = H |
| V phloridzine | R = H R' = β Glc.p. R'' = H |
| VI 4-méthyl- <i>p</i> -phloridzine | R = β Glc.p. R' = β Glc.p. R'' = CH ₃ |
| VII isosébotine | R = CH ₃ R' = H R'' = β Glc.p. |

B. Groupe des flavanones:



| | |
|-----------------|----------------------------|
| VIII naringétol | R = H R' = H R'' = H |
|-----------------|----------------------------|

| | |
|---|--|
| <i>IX</i> salipurposide | R = H R' = β Glc.p. R'' = H |
| <i>X</i> naringosido | R = Rha.2.Glc.p. R' = H R'' = H |
| <i>XI</i> sakuranino | R = CH ₃ R' = β Glc.p. R'' = H |
| <i>XIII</i> sakuranétine-4'-glucoside | R = H R' = H R'' = β Glc.p. |
| <i>XIII</i> sakuranétine-5,4'-diglucoside | R = H R' = β Glc.p. R'' = β Glc.p. |
| <i>XIV</i> isosakuranétine diglucoside | R = β Glc.p. R' = β Glc.p. R'' = CH ₃ |

L'ensemble des résultats que nous avons obtenu en étudiant le comportement des tréhalases vis-à-vis des effecteurs précédents fournit la matière du tableau 3.

Tableau 3

Action d'hétérosides du groupe des dihydrochalcones et des flavanones sur les tréhalases rénales et intestinale de l'Homme et du Porc

| Origine de la tréhalase | Rein d'Homme | Porc | |
|--|-----------------|------|----------|
| | | rein | intestin |
| phlorétol 0,00014 M | 25 ^b | 41 | 25 |
| phloridzine 0,01 M | 43 | 79 | 57 |
| 4-méthyl- <i>p</i> -phloridzine ^a | 0 | 0 | 0 |
| isoasébotine ^a | 50 | 26 | 20 |
| naringétol 0,00014 M | 0 | 37 | 10 |
| salipurposide 0,01 M | 36 | 20 | 11 |
| sakuranine ^a | 0 | 0 | 0 |
| sakuranétine-4'-glucoside ^a | 0 | 0 | 0 |
| sakuranétine-5,4'-diglucoside ^a | 0 | 0 | 0 |
| isosakuranétine diglucoside ^a | 0 | 0 | 0 |

a) En raison de leur très faible solubilité, ces corps ont été utilisés en solution saturée.

b) Les chiffres représentent les pourcentages d'inhibition obtenus à 37°C et à pH 5,7.

Nous avons étudié le type de l'inhibition provoquée par le phlorétol et la phloridzine, les deux seuls inhibiteurs pour lesquels nous disposons de quantité notable de produit.

Il s'agit d'une inhibition réversible: l'enzyme retrouve son activité après élimination de l'inhibiteur par dialyse. Par ailleurs, l'étude cinétique de l'inhibition permet de constater qu'elle atteint son intensité maximum aussitôt après l'adjonction de l'inhibiteur.

L'inhibition est typiquement compétitive avec la tréhalase rénale de l'Homme, non compétitive avec la tréhalase rénale du Porc, mixte avec la tréhalase de la muqueuse intestinale du Porc.

Les valeurs des K_i font l'objet du tableau 4.

Tableau 4

K_i du phlorétol et de la phloridzine pour les diverses tréhalases de Mammifères

| Inhibiteur | Tréhalase rénale de l'Homme | Tréhalase rénale du Porc | Tréhalase de l'intestin de Porc |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| phlorétol 0,00014 M | $0,10 \times 10^{-3}$ | $0,21 \times 10^{-3}$ | — |
| phloridzine | 4×10^{-3} | 10×10^{-3} | 2×10^{-3} |

Ces valeurs ont été obtenues à pH 5,7.

Phlorétol et phloridzine exercent un effet identique sur les tréhalases. L'action inhibitrice du phlorétol est cependant beaucoup plus intense.

Discussion

Les trois tréhalases de Mammifères étudiées présentent des propriétés très voisines.

Pour analyser l'inhibition provoquée par le saccharose, le phényl- β -glucoside, le picéoside et l'arbutine, on peut envisager une analogie de structure avec le tréhalose; la partie active de la molécule serait le glucopyranose. L'apparition d'une courte chaîne latérale (picéoside) ou d'une fonction phénol sur le deuxième cycle (arbutine) entraîne un accroissement du pouvoir inhibiteur. La présence de deux noyaux cycliques paraît être nécessaire; le glucose, l'acétophénone n'ont exercé aucune action inhibitrice.

L'action des dihydrochalcones et des flavanones paraît plus difficile à analyser: les aglycones sont de loin les corps les plus actifs. Mais il n'est pas possible d'attribuer un rôle précis à tel ou tel groupement fonctionnel. Toutefois, le type d'inhibition du phlorétol et de la phloridzine étant le même, il semble que l'on puisse considérer qu'ils ont le même site de fixation sur l'enzyme.

Le résultat du mode d'action de ces composés est à rapprocher des effets obtenus par Zerr et coll. [17] sur la glucose-6-phosphatase.

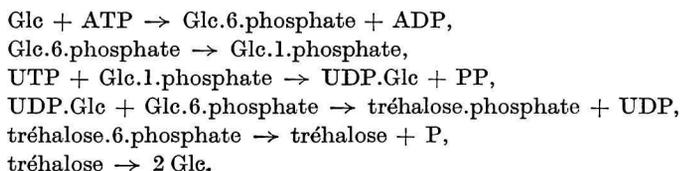
Les expériences décrites ci-dessus avaient pour but de chercher à individualiser les tréhalases de Mammifères. Elles ont au contraire mis en évidence leur étroite analogie de comportement. Ces tréhalases par contre se différencient de tréhalases d'autres origines. Nous citerons par exemple les tréhalases du Hanneton [18] et de *Pseudomonas fluorescens* [19] qui ne sont pas inactivées par le saccharose et la phloridzine.

La phloridzine exerce un effet inhibiteur sur un certain nombre d'enzymes impliqués dans le transport des oses: mutarotase, phosphatases intestinales et rénales, hexokinase des cellules ascitiques d'Ehrlich, phosphorylase du muscle de Lapin, enzymes requérant de l'A.T.P. [20]. Il paraît cependant douteux que les tréhalases participent à ce transport. Selon *Malathi* et *Crane* [21], puis *Semenza* [13], elles sont plutôt extérieures à ce transport.

Nos résultats sont en plein accord avec ceux de *Semenza*; les diverses tréhalases étudiées ne sont pas activées par l'ion Na^+ ; la valeur du K_i pour la phloridzine est dans le cas de la tréhalase intestinale égale à 2 mM. *Semenza* a obtenu une valeur identique avec la tréhalase de l'intestin de Hamster et fait remarquer que cette valeur est très supérieure à celle du K_i de l'inhibition par la phloridzine du transport intestinal des oses.

Injectés au Chien, la phloridzine et le salipurposide provoquent une abondante élimination urinaire de glucose. Nous nous étions demandé s'il existait une relation entre l'action glycosuriant et l'inhibition de la tréhalase. De la phloridzine a été injectée par voie sous-cutanée à des cobayes d'une part, à des rats de l'autre. Parmi les Mammifères que nous avons étudiés [1], seuls les rats ne présentaient pas d'activité tréhalasique appréciable dans le rein. Dans les deux cas, l'élimination urinaire du glucose a été précoce et massive [22]. Le point d'impact de la phloridzine ne semble donc pas être la tréhalase.

En 1962, nous avons émis une hypothèse [23], reprise par *Sacktor* [24] relative au rôle de la tréhalase. Elle pourrait intervenir en remettant en circulation le glucose bloqué dans du tréhalose. Il n'est pas impossible que ce disaccharide soit synthétisé en proportions plus ou moins abondantes au cours du métabolisme glucidique. Le mécanisme de ce processus est en général:



Les enzymes réalisant cette chaîne de réactions ont été caractérisées dans la levure, divers insectes et par *Sacktor* [24] dans le rein de Lapin. Récemment *Sacktor* [25], incubant des tranches de rein de Lapin avec du glucose marqué pendant un laps de temps très court a pu mettre en évidence la formation de tréhalose.

Il semble donc se confirmer que la tréhalase n'est pas impliquée dans le transport actif des oses, mais participe à une étape du métabolisme glucidique pour remettre en circulation le glucose condensé en tréhalose.

Bibliographie

1. Courtois J. E., Demelier J. F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 271 (1966).
2. Semenza G., in *American Handbook of Physiology*, Section 6. Alimentary Canal. (C. F. Code, Editor.) American Physiological Society, Washington D. C., 1968, p. 2543.
3. Lukomskaia I. S., Tarasova G. I., *Biokhimiya* **30**, 95 (1965).
4. Van Handel E., *Science* **163**, 1075 (1969).
5. Demelier J. E., Bark C., Labat J., Courtois J. E., *C. R. Soc. Biol.* **163**, 2092 (1969).

6. Demelier J. F., Bark C., Labat J., Courtois J. E., *Enzymol. Biol. Clin.*, 1969, à l'impression.
7. Demelier J. F., Massari M., Courtois J. E., *C. R. Soc. Biol.* **163**, 2094 (1969).
8. Courtois J. E., Demelier J. F., Labat J., Hargreaves F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1291 (1968).
9. Demelier J. F., Courtois J. E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 2553 (1968).
10. Luncau R., *Thèse de doctorat*. Univ. Pharm., Paris, 1938.
11. Augustinsson K. B., *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **15**, 52 (1948).
12. Hofstee H. J., *Science* **116**, 329 (1952).
13. Semenza G., Rihova L., *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 393 (1969).
14. Larnier J., Gillespie R. E., *J. Biol. Chem.* **223**, 709 (1956).
15. Dahlqvist A., *Biochem. J.* **80**, 547 (1961).
16. Manners D. J., Rowe K. L., *Carbohydr. Res.* **9**, 441 (1969).
17. Zerr C., Novoa W. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 129 (1968).
18. Guilloux E., Courtois J. E., Percheron F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1915 (1968).
19. Arcila M. A., Guilloux E., Courtois J. E., *C. R. Acad. Sci.* **267**, 1779 (1968).
20. Crane R. K., *Phys. Rev.* **40**, 789 (1960).
21. Malathi P., Crane R. K., *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 275 (1968).
22. Demelier J. F., *Thèse de doctorat*. Etat Pharm., Paris, 1970.
23. Courtois J. E., Debris M. M., Georget J. Cl., *Bull. Acad. Nat. Med.* **146**, 599 (1962).
24. Sacktor B., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **60**, 1007 (1968).
25. Sacktor B., Berger S. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 796 (1969).