

## PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES SPÉCIFIQUES DES DEUX ISOENZYMES DE LA PHÉNYLALANINE- AMMONIAQUE LYASE CHEZ *QUERCUS PEDUNCULATA*

ALAIN BOUDET, RAOUL RANJEVA et PIERRE GADAL

Centre de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, 31-Toulouse, France

(Received 29 July 1970)

**Résumé**—Deux formes séparables de la phénylalanine-ammoniaque lyase (PAL) coexistent dans les feuilles de *Quercus pedunculata*. Elles se distinguent par leur pH optimum d'action mais surtout par leurs propriétés allostériques. Le produit de la réaction et l'acide *p*-coumarique rétroinhibent les deux isoenzymes, mais l'une d'entre elles se révèle particulièrement sensible à l'action des acides benzoïques tandis que l'autre est inhibée spécifiquement par les acides cinnamiques. L'acide gallique possède un effet activateur et lève l'inhibition due aux effecteurs négatifs. Les molécules de ligands agissent par effet coopératif uniquement sur la vitesse maximale de la réaction.

**Abstract**—Two PAL isoenzymes coexist in *Quercus pedunculata* leaves. They differ in their optimum pH and, principally in their allosteric properties. Cinnamic and *p*-coumaric acids inhibit both isoenzymes but one of them is especially sensitive to benzoic acids, whereas cinnamic acids inhibit the other. Gallic acid activates the two enzymatic reactions and reverses the inhibitor's action. The effectors act through cooperative effects only on the  $V_m$ .

### INTRODUCTION

DÉCOUVERTE en 1961 par Koukol et Conn,<sup>1</sup> la phénylalanine-ammoniaque lyase (PAL) représente certainement l'enzyme du métabolisme des composés aromatiques la plus étudiée chez les végétaux supérieurs. Cet intérêt s'explique par la répartition très générale du biocatalyseur et son rôle essentiel dans la biosynthèse des composés phénoliques; en effet, la PAL, qui transforme la phénylalanine en acide cinnamique, réalise une jonction entre le métabolisme primaire et de nombreux produits secondaires spécifiques des végétaux. Cependant, ce sont les variations particulièrement nettes de l'activité de l'enzyme avec l'état physiologique de la plante et sous l'effet de différents facteurs qui ont plus particulièrement retenu l'attention. Ainsi des corrélations très significatives entre le taux de production des composés phénoliques ou leur lieu de synthèse et l'activité du biocatalyseur ont pu être mises en évidence.<sup>2-5</sup> Par ailleurs, de nombreux travaux devaient démontrer la synthèse 'de novo' de la protéine enzymatique sous l'action de divers facteurs: éthylène,<sup>6</sup> abscissine II,<sup>7</sup> mais surtout sous l'influence de la lumière,<sup>8-9</sup> en particulier, par intervention du phytochrome.<sup>10</sup> L'induction de la PAL et son inactivation, par un mécanisme qui

<sup>1</sup> J. KOUKOL et E. E. CONN, *J. Biol. Chem.* **236**, 2692 (1961).

<sup>2</sup> T. MINAMIKAWA et I. URITANI, *J. Biochem.* **57**, 678 (1965).

<sup>3</sup> T. HIGUCHI, *Agri. Biol. Chem.* **30**, 667 (1966).

<sup>4</sup> L. L. CREASY, *Phytochem.* **7**, 1743 (1968).

<sup>5</sup> V. P. MAIER et S. HASEGAWA, *Phytochem.* **9**, 139 (1970).

<sup>6</sup> J. RIOV, S. P. MONSELISE et R. S. KAHAN, *Plant Physiol.* **44**, 631 (1969).

<sup>7</sup> D. C. WALTON et S. SONDHEIMER, *Plant Physiol.* **43**, 467 (1968).

<sup>8</sup> M. ZUCKER, *Plant Physiol.* **40**, 779 (1965).

<sup>9</sup> G. ENGELSMA, *Planta* **75**, 207 (1967).

<sup>10</sup> H. SMITH et T. H. ATTRIDGE, *Phytochem.* **9**, 487 (1970).

apparaît complexe,<sup>11</sup> constituent donc deux moyens efficaces de régulation dans la production des composés phénoliques.

La rétroinhibition par le produit de réaction déjà signalée par Koukol et Conn<sup>1</sup> a été observée par Minamikawa et Uritani<sup>12</sup> et analysée par Havir et Hanson.<sup>13</sup> Cependant comme le supposent ces derniers auteurs, la diversité des composés dérivant de l'acide cinnamique et en premier lieu les deux catégories d'acides phénoliques (série cinnamique, série benzoïque) suggère l'existence d'un mode de régulation plus fin de l'activité enzymatique. On peut ainsi concevoir l'action d'effecteurs spécifiques sur des enzymes isofonctionnelles comme ceci a été déjà signalé chez les microorganismes pour deux biocatalyseurs jouant un rôle important dans le métabolisme des composés aromatiques, la DAHP synthétase<sup>14</sup> et la chorismate mutase.<sup>15</sup> Chez le Chêne, nous avons déjà démontré l'existence de la PAL<sup>16</sup> et la présence de nombreux composés phénoliques;<sup>17</sup> dans ce travail, en tenant compte de résultats antérieurs<sup>12,18</sup> sur l'existence possible de formes multiples de la PAL, nous avons recherché chez *Q. pedunculata* la présence d'isoenzymes et étudié leur comportement sous l'influence de différents effecteurs.

## RESULTATS

### Mise en Évidence des Deux Isoenzymes

L'utilisation d'un gradient linéaire de NaCl permet de caractériser, par chromatographie sur DEAE-cellulose, deux protéines actives bien individualisées (Fig. 1), éluées respective-

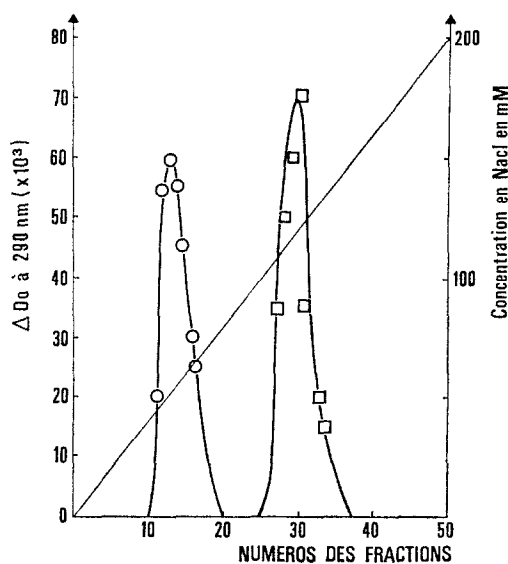


FIG. 1. COURBE D'ÉLUION DE LA PAL APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE. VOLUME DES FRACTIONS: 10 ml (—○—○—) PAL I; (—□—□—) PAL II.

<sup>11</sup> M. ZUCKER, *Plant Physiol.* **43**, 365 (1968).

<sup>12</sup> T. MINAMIKAWA et I. URITANI, *J. Biochem.* **58**, 53 (1965).

<sup>13</sup> E. A. HAVIR et K. R. HANSON, *Biochem.* **7**, 1904 (1968).

<sup>14</sup> F. LINGENS, W. GOEBEL et H. UESSELER, *European J. Biochem.* **2**, 442 (1967).

<sup>15</sup> R. G. H. COTTON et F. GIBSON, *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 76 (1965).

<sup>16</sup> A. BOUDET, Thèse Spécialité, *Physiol. Végétale*, Toulouse (1965).

<sup>17</sup> G. ALIBERT, G. MARIGO et A. BOUDET, *Physiol. Végétale* **7**, 57 (1969).

<sup>18</sup> E. A. HAVIR et K. R. HANSON, *Biochem.* **7**, 1896 (1968).

ment pour des concentrations en sel de 50 et 120 mM; les deux isoenzymes semblent donc différer par leurs charges. L'examen de cette figure montre également que les deux formes de la PAL coexistent en quantités sensiblement égales ce qui facilite l'étude de leurs propriétés spécifiques.

### *pH Optimum d'Action*

En règle générale, l'enzyme de désamination de la phénylalanine présente une zone d'activité maximale pour des valeurs de pH situées entre 8,5 et 9. On retrouve cette caractéristique chez *Q. pedunculata*, cependant, l'étude de l'activité des deux isoenzymes en fonction de la concentration en ions  $H^+$  permet de mettre en évidence l'existence d'un pH optimum spécifique de chacune d'elles: pH 8,8 pour la PAL I; pH 8,6 pour la PAL II. Ce résultat s'accorde avec l'hypothèse d'une différence dans le degré d'ionisation des deux isoenzymes, déjà suggérée par l'étude de leur comportement chromatographique sur DEAE-cellulose.

### *Propriétés Allostériques*

*Action inhibitrice des acides phénoliques.* Les deux isoenzymes sont sensibles à l'action inhibitrice des acides phénoliques. Les acides cinnamique et *p*-coumarique constituent des inhibiteurs allostériques communs aux deux formes isofonctionnelles (Tableau 1). Le produit de la réaction enzymatique exerce des actions sensiblement identiques dans les deux cas, tandis que le composé monohydroxylé agit plus particulièrement sur la PAL II.

Ces similitudes mises à part, des différences très remarquables entre les propriétés

TABLEAU 1. INFLUENCE DES ACIDES PHÉNOLIQUES SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Effecteurs Acides	Inhibition en % de l'essai sans effecteur	
	PAL I	PAL II
Série cinnamique		
Ac. cinnamique	35	35
Ac. <i>p</i> -coumarique	20	40
Ac. caféique	0	60
Ac. férulique	0	25
Ac. sinapique	0	0
Série benzoïque		
Ac. benzoïque	45	0
Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	20	0
Ac. salicylique	30	0
Ac. gentisique	25	0
Ac. protocatéchique	0	0
Ac. vanillique	70	0
Ac. syringique	60	0

Concentration en effecteur  $7 \times 10^{-4}$  M. L'enzyme est laissée 10 mn en présence de l'effecteur avant l'addition du substrat; les essais sont réalisés au pH optimum.

allostériques des deux isoenzymes apparaissent lors de l'étude de l'effet inhibiteur exercé par les autres acides phénoliques. En effet, seuls les acides de la série cinnamique rétro-inhibent la PAL II tandis que les composés de la série benzoïque sont des effecteurs spécifiques de la PAL I. Cette régulation particulière à chaque protéine enzymatique confirme bien, d'après Shaw,<sup>19</sup> la réalité de leur nature isofonctionnelle.

Pour les deux isoenzymes, l'inhibiteur le plus efficace est un acide phénolique possédant un noyau disubstitué: l'acide caféique (composé dihydroxylé) pour la PAL II, l'acide vanillique (hydroxylé en position 4 mais méthoxylé en position 3) dans le cas de la PAL I.

Enfin, parmi les composés étudiés, l'acide sinapique en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> et l'acide protocatéchique en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> ne déterminent aucune modification de l'activité de l'enzyme sans que l'on puisse relier cette absence d'action à une analogie structurale.

L'étude de l'inhibition des deux isoenzymes en fonction de concentrations croissantes de leur effecteur négatif le plus efficace: acide vanillique pour la PAL I, acide caféique pour la PAL II (Fig. 2), fait apparaître l'existence d'effets coopératifs entre les molécules de ligands. En effet, l'inhibition pratiquement nulle dans les deux cas pour des concentrations inférieures à  $0,5 \times 10^{-4}$  M se manifeste ensuite pour une faible variation de la concentration en effecteur.

*Activation par l'acide gallique.* Comme le montrent les Figs. 2 et 3 l'acide gallique se distingue des autres acides phénoliques par son effet activateur sur les deux formes de l'enzyme, son action stimulatrice étant la plus marquée sur la PAL II, isoenzyme la plus sensible aux seuls acides cinnamiques.

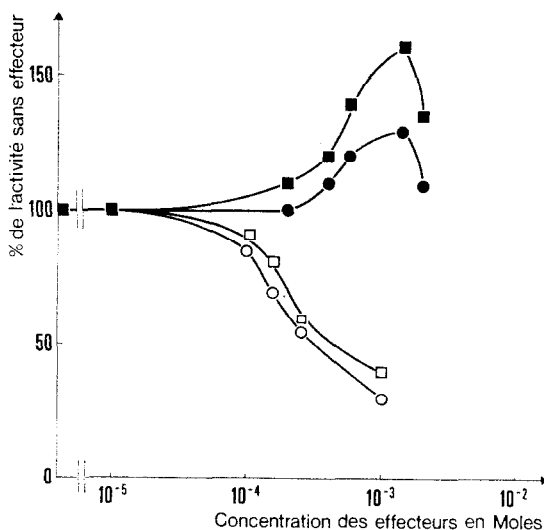


FIG. 2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EFFECTEURS SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE. ESSAIS EFFECTUÉS SELON LE PROTOCOLE DU TABLEAU 1.

PAL I { —○—○— Ac. vanillique.  
           —●—●— Ac. gallique.  
 PAL II { —□—□— Ac. caféique.  
           —■—■— Ac. gallique.

<sup>19</sup> C. R. SHAW, *Int. Rev. Cytol.* **29**, 297 (1969).

Pour des concentrations croissantes en acide gallique (Fig. 2) on observe à nouveau les courbes sigmoïdales typiques des interactions coopératives. Pour des teneurs élevées, cependant, l'inhibition classique<sup>20</sup> des enzymes par les acides phénoliques se manifeste et réduit la stimulation.

En plus de son rôle activateur, l'acide gallique possède la propriété de lever l'inhibition provoquée par les effecteurs négatifs (Fig. 3).

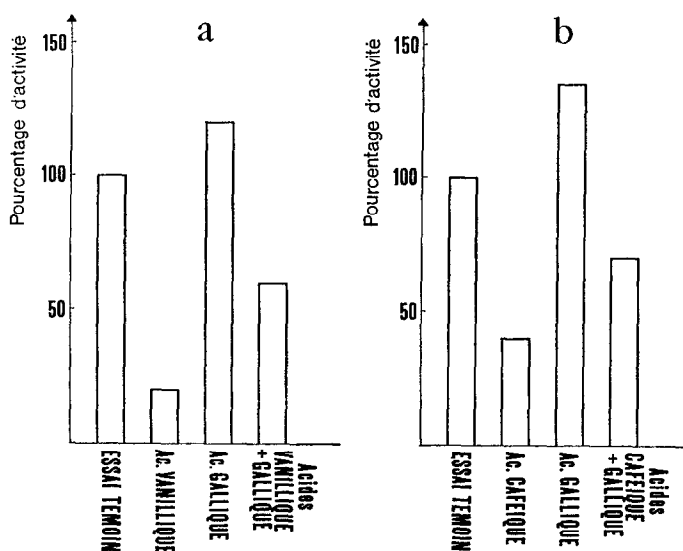


FIG. 3. INFLUENCE DE L'ACIDE GALLIQUE. ESSAIS EFFECTUÉS SELON LE PROTOCOLE DU TABLEAU 1. (a) PAL I; (b) PAL II.

*Influence de la concentration en substrat.* La vitesse d'action des deux isoenzymes en fonction de la concentration en substrat, présente, au pH optimum, l'allure d'une section d'hyperbole; elle obéit donc à la loi de Michaelis. Pour des teneurs constantes, les effecteurs positifs ou négatifs augmentent ou diminuent la vitesse maximale de la réaction. Ils n'exercent pas d'action notable pour les faibles concentrations en substrat et n'affectent donc pas de façon significative la valeur du  $K_m$ , mesure de l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat.

Par l'absence d'interactions coopératives entre les molécules de substrat, mais aussi, par l'allure sigmoïdale des courbes de vitesse en fonction de la concentration des effecteurs (Fig. 2), les deux isoenzymes du Chêne appartiennent donc<sup>21</sup> à la catégorie des enzymes allostériques du type V.

## DISCUSSION

L'existence de deux formes isofonctionnelles de la PAL a déjà été mise en évidence par Minamikawa et Uritani<sup>2</sup> et par Havar et Hanson<sup>1,8</sup> chez la Patate douce et la Pomme de terre, mais contrairement à ces deux végétaux dans lesquels les deux isoenzymes coexistent

<sup>20</sup> P. GADAL, H. BOUYSSOU et J. P. BARTHE, *Physiol. Végétale* 7, 69 (1969).

<sup>21</sup> G. N. COHEN, *Ann. Rev. Microbiol.* 19, 105 (1965).

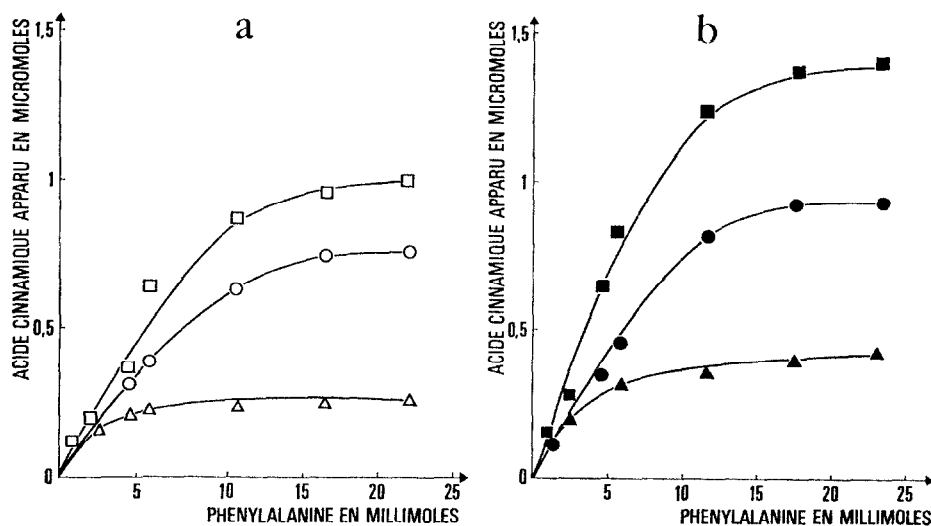


FIG. 4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT. ESSAIS EFFECTUÉS SELON LE PROTOCOLE DU TABLEAU 1.

Fig. 4a

**PAL I**

(—○—○—) Sans effecteur,  
 (—□—□—) + ac. gallique,  
 (—△—△—) + ac. vanillique.

Fig. 4b

**PAL II**

(—●—●—) Sans effecteur,  
 (—■—■—) + ac. gallique,  
 (—▲—▲—) + ac. caféique.

en proportion dissemblable, chez le Chêne elles sont présentes en quantités sensiblement identiques, le dernier constituant élué de la colonne de DEAE-cellulose (PAL II) étant toujours légèrement plus abondant que l'isoenzyme la moins retenue (PAL I).

La présence de formes isofonctionnelles de la PAL constitue-t-elle un fait général chez les végétaux? Marsh, Havir et Hanson<sup>22</sup> n'ont pu caractériser, malgré leurs recherches, qu'une protéine active chez le Maïs; mais, dans ce cas précis la tyrosine-ammoniaque lyase, exclusivement présente chez les Graminées, pourrait jouer le rôle tenu par l'une des deux PAL du Chêne.

Les résultats obtenus sur la biosynthèse des acides phénoliques s'accordent sur un mode de formation des dérivés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> mettant en jeu la désamination des acides aminés aromatiques, suivie d'hydroxylations et méthylations successives des premiers produits apparus. L'origine des acides benzoïques est moins bien connue; certains d'entre eux se formeraient à partir d'intermédiaires de la voie de l'acide shikimique, tandis que d'autres proviendraient d'une  $\beta$ -oxydation de leurs homologues cinnamiques. Ainsi la biosynthèse d'un grand nombre d'acides phénoliques apparaît liée à l'activité de la PAL; parmi les mécanismes possibles de régulation de cette chaîne branchée, l'existence de deux formes isofonctionnelles de cette enzyme-clé peut constituer l'un des moyens les plus efficaces de contrôle de la biosynthèse des composés aromatiques dérivant de la phénylalanine.

Dans cette optique, et d'après les résultats de ce travail (Schéma I), la PAL II pourrait

<sup>22</sup> H. V. MARSH, E. A. HAVIR et K. R. HANSON, *Biochem.* 7, 1915 (1968).

plus particulièrement intervenir dans la biosynthèse des acides cinnamiques. En effet cette isoenzyme n'est inhibée que par les seuls acides phénoliques pourvus d'une chaîne latérale à trois atomes de carbone. On peut de plus établir, dans cette série, une relation entre la structure de l'effecteur et l'importance de son action: le pouvoir inhibiteur augmente progressivement avec le nombre d'hydroxyles libres présents sur le noyau benzénique et l'acide caféique constitue l'effecteur le plus actif. Ce résultat confirme les données de Minamikawa et Uritani<sup>1,2</sup> qui ont également constaté l'inhibition sélective de l'une des deux isoenzymes de la Patate douce par les deux premiers termes hydroxylés de la série; l'action de l'acide caféique étant, comme chez le Chêne, supérieure à celle de l'acide *p*-coumarique. L'étude de l'action des autres acides cinnamiques, sur la PAL du Chêne, montre que la méthylation conduit à une réduction (acide férulique) ou même à la suppression totale de l'effet allostérique (acide sinapique). Il est d'ailleurs à noter qu'à l'inverse de tous les autres composés retenus dans cette étude, ce dernier acide n'a jamais pu être mis en évidence dans les feuilles de Chêne.<sup>1,8</sup>

La PAL I présente un comportement tout à fait différent et semblerait intervenir, préférentiellement, dans l'élaboration des acides benzoïques. L'action des composés en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> sur cette isoenzyme apparaît pourtant moins homogène que celle de leurs homologues cinnamiques sur la PAL II, cette hétérogénéité n'étant sans doute, que la conséquence des origines métaboliques diverses des termes de la série benzoïque.

Il est en effet particulièrement intéressant d'analyser les données de cette étude, à la lumière des connaissances acquises dans notre laboratoire, sur les voies de synthèse de ces acides chez *Q. pedunculata*<sup>2,3</sup> (Schéma I).

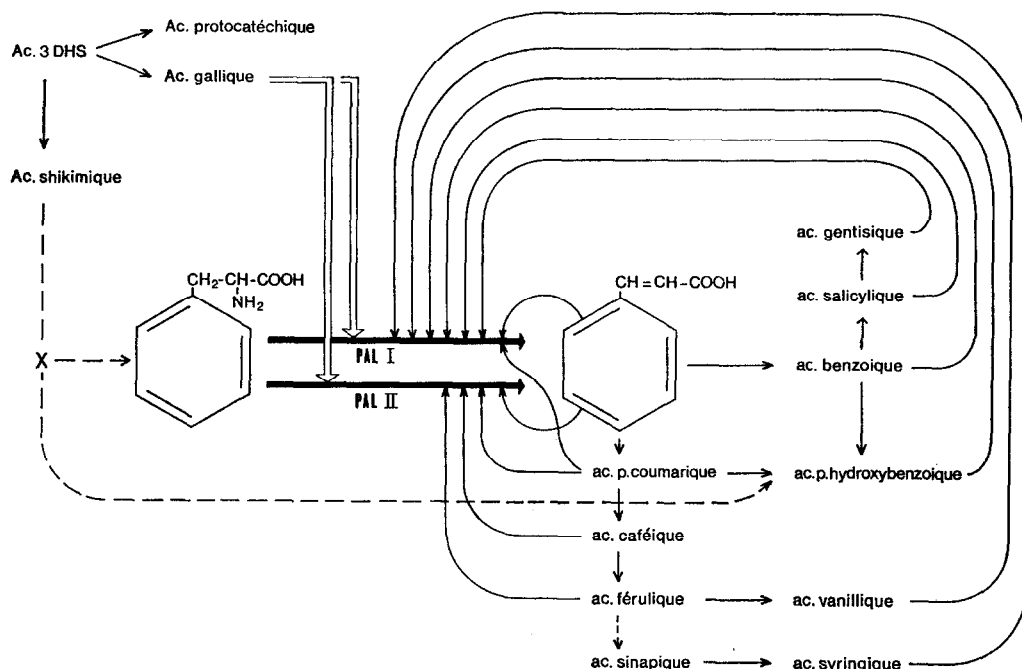


SCHÉMA I. BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ *Quercus pedunculata*<sup>2,3</sup> ET ACTION DE CES ACIDES SUR LES DEUX ISOENZYMES DE LA PAL. (⇔) Activation, (→) rétroinhibition.

<sup>2,3</sup> G. MARIGO, Thèse Spécialité, *Physiol. Végétale*, Toulouse (1970).

L'acide protocatéchique dépourvu de toute action et l'acide gallique, activateur de l'enzyme, se forment préférentiellement à partir de l'acide 3-DHS;<sup>24</sup> leur biosynthèse n'est donc pas directement redevable de l'action de la PAL. L'action de l'acide gallique constitue le premier exemple d'activation de cette enzyme par un composé phénolique; cette stimulation pourrait permettre à la plante d'orienter le flux carboné de la voie de l'acide shikimique vers les dérivés de l'acide cinnamique lorsque la quantité d'acide gallique présent dans la cellule devient excessive. Il faut ici rappeler la présence de ce composé en quantité importante chez le Chêne.<sup>18</sup>

L'acide *p*-hydroxybenzoïque, formé par  $\beta$ -oxydation de l'acide *p*-coumarique chez certains végétaux proviendrait en partie d'un intermédiaire situé entre l'acide shikimique et la phénylalanine, ce résultat pouvant expliquer le peu d'action de ce composé monohydroxylé.

En revanche, les inhibiteurs les plus efficaces de la PAL I (acides benzoïque, vanillique et syringique) dérivent probablement de leurs homologues cinnamiques, ce qui implique l'intervention de la PAL; l'acide cinnamique représente, dans ce cas, un terme commun aux deux voies métaboliques. Son action sur les deux formes isofonctionnelles de la PAL constitue sans doute le premier moyen pour la plante de réguler la biosynthèse des composés phénoliques en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> et en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.

A l'inverse de l'action des acides cinnamiques sur la PAL II, le pouvoir inhibiteur des composés en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> sur la PAL I est inversement proportionnel au nombre d'hydroxyles libres situés sur le noyau benzénique. L'effet inhibiteur, toujours élevé pour le composé non substitué, s'atténue à la suite d'hydroxylations. La méthylation de ces hydroxyles libres possède la propriété de rétablir l'effet inhibiteur.

L'ensemble de ces résultats, obtenus *in vitro*, constitue une première approche dans la connaissance des processus assurant la régulation de la biosynthèse des composés aromatiques. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir pour apprécier l'efficacité physiologique de tels mécanismes. On pourrait envisager une localisation intracellulaire spécifique des deux protéines enzymatiques comme cela a déjà été signalé pour d'autres isoenzymes végétales,<sup>19</sup> ou encore l'existence de complexes enzymatiques du type PAL II—enzymes du métabolisme des acides cinnamiques.

Par ailleurs, la présence des acides phénoliques essentiellement à l'état combiné dans les tissus végétaux (esters, glucosides) pose le problème de leur action régulatrice *in vivo*. L'effet inhibiteur des différents termes des séries benzoïque et cinnamique, sur l'activité de la PAL, joint à ces processus de détoxification permettrait à la plante de maintenir à un niveau très bas son taux d'acides phénoliques libres, composés particulièrement toxiques.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel Végétal

La recherche de l'enzyme porte sur des feuilles de *Q. pedunculata* récoltées dans, la région toulousaine, un mois environ après le débourrement. Ces organes, lyophilisés puis conservés à la température de -20°, sont ensuite utilisés pour la préparation des poudres acétoniques.

### Extraction et Purification de l'Enzyme

Toutes les opérations d'extractions et de purifications s'effectuent à des températures comprises entre 0 et 4°. On homogénéise la poudre acétonique, à 3 reprises, dans du tampon phosphate de K 0,1 M de pH 7,5, renfermant 1 % de PEG et 0,5 % d'isoascorbate de Na (13 ml de milieu d'extraction par g de poudre) et on désaère l'homogénéisat obtenu par passage d'un courant d'azote entre chaque broyage. On centrifuge ensuite 20 mn à 15.000 g et on purifie l'extrait enzymatique sur une colonne de Séphadex G 100 équilibrée dans du tampon Tris-HCl M/100 de pH 8; le développement de la colonne étant réalisé par ce même tampon.

<sup>24</sup> G. MARIGO, G. ALIBERT et A. BOUDET, *C. R. Acad. Sci., Paris* **269**, 1852 (1969).



On dépose ensuite la solution enzymatique recueillie, sur une colonne de DEAE-cellulose, préparée dans du tampon Tris-HCl M/100 de pH 8. L'élution de l'enzyme s'effectue par un gradient linéaire de concentration saline obtenu à partir du dispositif décrit par Peterson et Söber.<sup>25</sup> Dans le flacon mélangeur renfermant initialement 250 ml de tampon Tris-HCl M/100 de pH 8, on fait arriver progressivement un volume identique de ce même tampon contenant du NaCl à la concentration de M/5. Le débit de la colonne est réglé à un ml/mn.

#### *Détermination de l'Activité Enzymatique*

On détermine l'activité de la PAL par dosage spectrophotométrique ou radiochimique de l'acide cinnamique apparu.

*Méthode spectrophotométrique.* Le milieu réactionnel renferme 2 ml de la solution enzymatique, 66  $\mu$ M de phénylalanine et 150  $\mu$ M de tampon Tris-HCl, M/100 de pH 8, pour un volume total de 3,5 ml. Après 90 mn d'action à 40° on dose la quantité d'acide cinnamique apparu par mesure de l'absorption à 290 nm.

*Méthode radiochimique.* On ajoute au milieu réactionnel précédent 0,04  $\mu$ Ci de phénylalanine U<sup>14</sup>C (CEA). Après 90 mn d'action on acidifie le milieu par HCl, on extrait l'acide cinnamique par l'éther éthylique et on détermine sa radioactivité par scintillation en milieu liquide.

<sup>25</sup> E. A. PETERSON et H. A. SÖBER, *Method. Enzymol.* 5, 3 (1962).