

LA PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE DES FEUILLES DE HARICOT: DEUX FORMES ISOFONCTIONNELLES*

C. VERIN-VERGEAU, P. BALDY† et G. CAVALIÉ

Centre de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cédex, France

(Revisé reçu le 10 janvier 1979)

Key Word Index—*Phaseolus vulgaris*; French bean; Leguminosae; phosphoglycollate phosphatase; enzyme purification; isoenzymes; glycollate metabolism.

Abstract—2-Phosphoglycollate phosphohydrolase (EC 3.1.3.18) was isolated and partially purified from leaves of *Phaseolus vulgaris* L. by acetone fractionation followed by chromatography on DEAE-cellulose. Two chromatographically stable forms could be separated by stepwise elution from DEAE-cellulose; they have been resolved by electrofocusing (pI 4.2 and 5.5) and exhibited two protein bands (R_f s 0.68 and 0.82) on polyacrylamide gel electrophoresis. These data suggest the isoenzymatic nature of the two forms which are specific for phosphoglycollate.

INTRODUCTION

La majeure partie du phosphoglycolate, formé au cours de l'assimilation photosynthétique du CO_2 [1-4], provient de l'activité oxygénasique de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase [5] première enzyme du cycle photosynthétique de réduction du carbone (PCR). La phosphoglycolate phosphatase est alors responsable de la biosynthèse du substrat de la photorespiration [6, 7], le glycolate, dont le métabolisme est appelé cycle photo-respiratoire d'oxydation du carbone (PCO). Chez les végétaux chlorophylliens, le rendement photosynthétique est totalement dépendant de la photorespiration, processus particulièrement intense chez les plantes de type photosynthétique C_3 [8].

La phosphoglycolate phosphatase, initialement isolée des feuilles de tabac et purifiée [9], a ensuite été étudiée chez cette plante [10, 11] et divers végétaux [12-15]. La recherche des mécanismes de régulation de l'activité catalytique de cette enzyme est le but principal qui a guidé ce travail; leur connaissance devrait permettre, en effet, une meilleure compréhension et, peut-être, un contrôle de la photorespiration.

Dans cette publication sont reportés les résultats concernant la mise en évidence de deux formes isofonctionnelles de la phosphoglycolate phosphatase, isolées de feuilles de haricot et partiellement purifiées.

RÉSULTATS

Purification

Une seule étape de précipitation fractionnée à l'acétone (40-60%) permet de récupérer 71% de l'activité avec un

degré de purification de 13, et la filtration moléculaire sur Sephadex G-25 augmente toujours, d'environ 20%, l'activité de l'effluent protéique (Tableau 1). Quant à l'élution de la DEAE-cellulose, par gradient linéaire ou par paliers de force ionique (Tableau 1), elle a été réalisée avec du tampon acide citrique (Na^+), les ions citrate stabilisant l'activité de la phosphoglycolate phosphatase isolée du haricot.

Ce protocole a permis de purifier cette enzyme au moins 52 fois avec un rendement de 46% et de déceler deux formes enzymatiques dont l'une a une activité environ 4 fois moindre. Ces résultats tiennent compte de la présence, dans l'extrait brut, de phosphatases non spécifiques pouvant hydrolyser le phosphoglycolate. Les phosphatases contaminantes sont progressivement éliminées; l'extrait brut et, à un degré moindre, le précipité acétonique, hydrolysent les composés suivants: fructose-1,6-diphosphate, ribose-5-phosphate, 6-phosphogluconate, ADP, ATP, PPi et 3-phosphoglycérate. Il a été démontré que la très faible dégradation de ces deux dernières substances par les fractions actives E_I et E_{II} (Tableau 1) était uniquement liée à la présence de phosphatases contaminantes non spécifiques. Les deux formes, isolées du haricot et partiellement purifiées, sont donc spécifiques du phosphoglycolate.

A chaque étape de purification, les préparations enzymatiques sont stables au moins 15 jours à 4° et 6 semaines à -20°. Les extraits purifiés sont conservés, à -20°, en présence de glycérol à 45% pour éviter la congélation et non en tant qu'agent stabilisant.

Mise en évidence de deux isoenzymes

Chromatographie sur DEAE-cellulose. Un gradient linéaire de force ionique conduit à l'élution de la majorité de l'activité phosphoglycolate phosphatase à 0.05 M, alors qu'un petit pic de protéines actives est élue à 0.08 M. L'élution par paliers de force ionique confirme la présence de deux fractions actives, E_I et E_{II} , nettement séparées ce qui a permis de les isoler et de les rechromatographier, individuellement, sur DEAE-cellulose: aucune interconversion des deux formes enzymatiques n'est décelée.

* Publication de la première partie des résultats de travaux ayant fait l'objet d'une Thèse de Spécialité en Physiologie Végétale soutenue à l'Université de Toulouse; résultats partiels présentés (Poster) au 4 ème Congrès International de Photosynthèse, 4-9 Septembre, 1977, Reading, U.K.

† Toute la correspondance doit être adressée à P. Baldy, Centre de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, 31077 Toulouse Cédex, France.

Tableau 1. Purification partielle de la phosphoglycolate phosphatase isolée des feuilles de *Phaseolus vulgaris*

Etapes	Protéines (mg)	Activité		Rapport des activités: P-glyc./PGA/ PPi‡	Rendement (%)	Purification
		Total*	Sp.†			
Extrait brut	1500	350	0.23	1/2.5/0.8	100	1
Précipité acétone (40-60%)	84	250	2.98	1/0.4/0.2	71	13
Sephadex G-25	82	265	3.23		76	14
DEAE-cellulose (élution par paliers)	E _I E _{II}	7.1 6.4	132 30	1/0.01/0.04 1/0.06/0.03	46	52

* Valeurs corrigées tenant compte de l'activité des phosphatases contaminantes, et exprimées en unités ($\mu\text{mol Pi/min}$). Résultats rapportés à 100 g de matériel végétal frais et représentant la moyenne des valeurs de 5 expériences.

† Unités/mg de protéines.

‡ Rapports des vitesses d'hydrolyse du phosphoglycolate (P-glyc.) du 3-phosphoglycérate (PGA) et du pyrophosphate (PPi), chacun à la concentration de $3.33 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans le milieu réactionnel.

Electrofocalisation. A partir du précipité acétone, on retrouve 60 % de l'activité en deux pics, bien individualisés, localisés sur le gradient à pH 4.3 et 5.5. L'électrofocalisation des formes E_I et E_{II}, dont le rendement est respectivement de 77 et 92 %, montre leur homogénéité et la correspondance exacte, sur le gradient pH, avec les protéines du précipité acétone; elle permet également de les identifier: la forme E_I a un pI de 4.2 et la forme E_{II} un pI de 5.5.

Electrophorèse sur gels de polyacrylamide. Les électrophoreses séparées des fractions actives E_I et E_{II} (Fig. 1) permettent de déceler, pour chacune, une seule zone de protéines à activité phosphoglycolate phosphatase de R_f respectif 0.68 et 0.82; elles sont assimilables aux deux bandes actives identifiées sur les gels après migration du précipité acétone et sont spécifiques du phosphoglycolate.

On peut noter (Tableau 1, Fig. 1) que le précipité acétone renferme une 3-phosphoglycérate phosphatase; elle dégrade activement le phosphoglycolate (bande 8). Certaines pyrophosphatases (bandes 1 et 3) utilisent également le phosphoglycolate comme substrat (bande 1).

DISCUSSION

Au cours de l'isolement de la phosphoglycolate phosphatase des feuilles de *Phaseolus vulgaris* L. et de sa purification partielle, en combinant un degré de purification convenable (52 fois) et un rendement suffisant (46 %), deux formes isofonctionnelles ont pu, en raison de leur stabilité chromatographique, être séparées et isolées sur DEAE-cellulose avec une activité spécifique de 18.6 et 4.7 unités par mg de protéines. Elles sont caractérisées, respectivement, par un pI de 4.2 et 5.5 et correspondent, sur les gels d'électrophorèse (sans SDS) à deux bandes de protéines, de R_f distincts—0.68 et 0.82—hydrolysant spécifiquement le phosphoglycolate. La concordance des résultats obtenus au moyen de ces différentes techniques élimine l'éventualité d'un artefact lié à l'une d'elles, ou au vieillissement des extraits, étant donné que toutes les manipulations ont été réalisées, successivement, dès la récolte des organes foliaires.

On a d'ailleurs pu constater, qu'après chromatographie sur DEAE-cellulose d'une préparation enzymatique conservé 15 jours à -20° , seul le rendement était modifié. Jusqu'à ce jour, une seule forme à activité phospho-

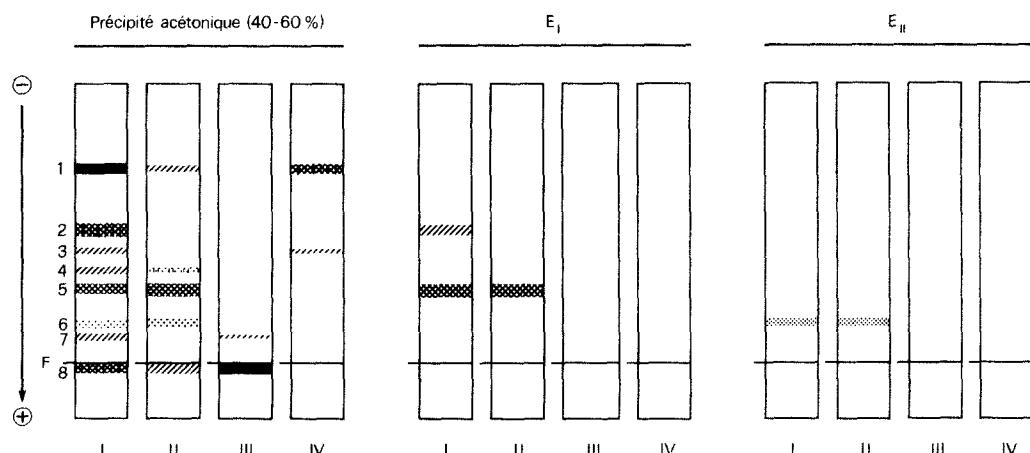


Fig. 1. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide. Les protéines du précipité acétone (250 µg, ou 0.75 unités) des formes enzymatiques, E_I (40 µg soit 0.70 unités) ou E_{II} (15 µg soit 0.07 unités) sont déposées sur les gels (0.45 × 7 cm), 7.0 % en acrylamide dans le tampon Tris-glycine, pH 8.3. Electrophorèses à 4°, durant 30-45 min, avec un courant de départ de 5 mA/gels. Protéines révélées au bleu de Coomassie à 0.25 % (I); hydrolyse du phosphoglycolate (II), du 3-phosphoglycérate (III) et du PPi (IV), chaque substrat étant à la concentration de 2 mM; F, front de migration.

glycolate phosphatase a été isolée de divers végétaux, et purifiée: un pl de 4.4 caractérise l'enzyme des feuilles de pois [14] et un pl de 3.9 celle des feuilles de tabac [11]. Les deux formes isoenzymatiques isolées au cours de ce travail sont spécifiques du phosphoglycolate, comme l'enzyme extraite d'autres plantes [9, 11, 15].

La stabilité des phosphoglycolate phosphatases du limbe de haricot est remarquable, l'addition d'aucun agent stabilisant n'étant nécessaire au cours de la préparation, ou de la conservation, de l'extrait brut. Cependant, une importante diminution de l'activité se manifeste au cours de la chromatographie sur DEAE-cellulose: elle a pu être évitée par la présence, dans le tampon d'élution, d'ions citrate; ceux-ci stabilisent également l'enzyme du tabac et de l'épinard [11].

Par ailleurs, dans l'extrait de feuilles de haricot, variété Contender, le rapport des activités 3-phosphoglycérate phosphatase-phosphoglycolate phosphatase est de 2.5/1 (Tableau 1), comme pour la variété Sanalac [16], mais il est inversé chez d'autres plantes de type photosynthétique C₃ [13]. Toutefois, la 3-phosphoglycérate phosphatase, particulièrement active, n'est pas spécifique de son substrat mais hydrolyse fortement le phosphoglycolate (Fig. 1); cette propriété n'est pas une particularité de l'espèce étudiée [13].

En conclusion, la nature isoenzymatique des deux formes de phosphoglycolate phosphatase, isolées des feuilles de *Phaseolus vulgaris* L., variété Contender, et partiellement purifiées, vient d'être démontrée; leur existence est confirmée par leurs propriétés catalytiques et la régulation de leur mécanisme d'action (résultats à paraître).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel végétal. Les germinations de *Phaseolus vulgaris* L., var. Contender, sont obtenues sur sable, en salle climatisée: 22°/18°, jour/nuit; héméropériode 14 hr, 9000 lux; hygrométrie, 55–75% avec le milieu, de pH 5.8: MgSO₄, 7 H₂O, 2.0 × 10⁻³ M; Ca(NO₃)₂, 4 H₂O, 5.0 × 10⁻³ M; KH₂PO₄, 1.0 × 10⁻³ M; KNO₃, 5.0 × 10⁻³ M; FeSO₄, 7 H₂O, 4.6 × 10⁻⁵ M; EDTA(Na₂), 2 H₂O, 4.6 × 10⁻⁵ M; H₃BO₃, 2.4 × 10⁻⁵ M; MnSO₄; H₂O, 8.9 × 10⁻⁶ M; ZnSO₄, 7 H₂O, 1.7 × 10⁻⁶ M; CuSO₄, 5 H₂O, 1.0 × 10⁻⁶ M; K₂MoO₄, 1.0 × 10⁻⁷ M. L'enzyme est extraite des feuilles primordiales et trifoliolées de plantules de 18 jours.

Essai enzymatique. Le milieu réactionnel standard, de 3 ml et pH 6.8, renferme: tampon cacodylate-Na(Cl⁻), 150 μmol; MgSO₄, 6 μmol; phosphoglycolate, 10 μmol; extrait enzymatique, 0.2 unités phosphoglycolate phosphatase, environ, excepté pour l'isoenzyme E_{II}, de l'ordre de 0.02 unités. La réaction est amorcée par l'addition du substrat après 10 min de préincubation à 30°, et est arrêtée par 1 ml de TCA à 10% au bout de 10 min d'hydrolyse enzymatique à 30°. L'activité enzymatique est déterminée en dosant le Pi libéré par la méthode d'Allen [17]. La stoechiométrie de la réaction et la validité de la méthode de dosage ont pu être confirmées en déterminant, colorimétriquement [18, 19], la quantité de glycolate apparue au cours de l'hydrolyse enzymatique du phosphoglycolate. Une unité d'activité phosphoglycolate phosphatase correspond à la quantité d'enzyme catalysant, à 30°, la formation de 1 μmol de Pi/min; l'activité spécifique est exprimée en unité d'activité/mg de protéines. Les résultats donnés représentent la moyenne d'au minimum 3 essais.

Purification partielle de la phosphoglycolate phosphatase. Les limbes dénervurés sont immersés dans le tampon cacodylate-

Na(Cl⁻), 0.001 M de pH 6.3 (2 vol/g matériel frais) et broyés 2 × 30 sec à vitesse maximale (Sorvall); après filtration de l'homogénat, de pH 6.3 (2 épaisseurs de gaze), le surnageant (15000 g, 20 min) constitue l'extrait brut. La précipitation fractionnée des protéines, à l'acétone, est alors effectuée d'après les conditions préconisées par Anderson et Tolbert [10]. L'acétone, prérefroidie à -20°, est ajoutée, par écoulement continu et lent, à l'extrait brut maintenu à 0° et sous agitation; celle-ci est ensuite prolongée 15 min. Le culot (15000 g × 10 min), renfermant les protéines précipitant entre les concn finales en acétone 40–60%, est mis en suspension dans le tampon acide citrique (Na⁺) 0.01 M, pH 7.2; concn moyenne en protéines: 1 mg/ml. Ces extraits sont filtrés sur des gels de Sephadex G-25 (équilibrés et élusés par le tampon acide citrique (Na⁺) 0.01 M de pH 7.2) et les effluents protéiques sont chromatographiés sur des colonnes de DEAE-cellulose (Cellex D-Biorad, 0.7 ± 0.1 meq/g, tassée sous pres: 1 kg/cm²) de 2 × 6 cm.

Electrofocalisation. Le pl est déterminé d'après la technique de Vesterberg et Svensson [20] avec une colonne LKB-8100. La force ionique des extraits enzymatiques à focaliser est de 0.01 M. Comme la présence d'ampholine empêche le dosage du Pi, l'activité des fractions de 2 ml est déterminée en dosant le glycolate formé dans le milieu réactionnel décrit précédemment; 4 ml du milieu sont traités avec 1 ml de Dowex 1 élue par 4 ml de HOAc 4 N et 250 μl de l'effluent servent à doser colorimétriquement le glycolate [19].

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide. Elle est réalisée selon la méthode de Davis [21] suivant le protocole inclus dans la légende de la Fig. 1. Après électrophorèse, les protéines sont révélées au bleu de Coomassie à 0.25% [22], la durée de la révélation et de la décoloration étant respectivement de 15 min et 20 hr. L'activité phosphoglycolate phosphatase est localisée par les bandes blanches de phosphate de Pb après immersion des gels, 30 min à 30°, dans le milieu: tampon cacodylate-Na(Cl⁻), 100 mM; Pb(NO₃)₂, 2 mM; MgSO₄, 3 mM; substrats: phosphoglycolate, 3-phosphoglycérate, PPI, 2 mM [23, 24]; pH, 6.8.

Dosage des protéines. Par la méthode de Lowry [25] soit directement, soit après précipitation des protéines au TCA (concn finale, 20%, v/v).

Remerciements—Ce travail a été réalisé au Centre de Physiologie Végétale, Laboratoire associé au C.N.R.S. 'Adaptations physiologiques chez les Végétaux', L.A. No. 241. Nous sommes reconnaissants au Dr. M. L. Champigny, Maître de Recherche (Université d'Orsay), pour l'intérêt porté à ce travail et ses discussions toujours positives.

BIBLIOGRAPHIE

- Dimon, B. et Gester, R. (1976) *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* **283**, 507.
- Kirk, M. R. et Heber, U. (1976) *Planta* **132**, 131.
- Krause, G. H., Thorne, S. W. et Lorimer, G. H. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **183**, 471.
- Lorimer, G. H., Krause, G. H. et Berry, J. A. (1977) *FEBS Letters* **78**, 199.
- Bowes, G., Ogren, W. L. et Hageman, R. H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 716.
- Tolbert, N. E. (1971) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 45.
- Lorimer, G. H., Woo, K. C., Berry, J. A., Osmond, C. B. (1978) *Proceedings of the IVth International Congress on Photosynthesis* (Hall, D. O., Coombs, J. et Goodwin, T. W., eds.) pp. 311–322. The Biochem Soc., London.
- Chollet, R. et Ogren, W. L. (1975) *Bot. Rev.* **41**, 137.

9. Richardson, K. E. et Tolbert, N. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1285.
10. Anderson, D. E. et Tolbert, N. E. (1966) *Methods in Enzymology* (Wood, W. A., ed.) Vol. IX, pp. 646-650. Academic Press, New York.
11. (a) Christeller, J. T. et Tolbert, N. E. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1780; (b) *J. Biol. Chem.* **253**, 1786; (c) *J. Biol. Chem.* **253**, 1791.
12. Yu, Y. L., Tolbert, N. E. et Orth, G. M. (1964) *Plant Physiol.* **39**, 643.
13. Randall, D. D. et Tolbert, N. E. (1971) *Photosynthesis and Photorespiration* (Hatch, M. D., Osmond, C. B. et Slatyer, R. O., eds.) pp. 259-266. Wiley-Interscience, New York.
14. Kerr, M. W. et Gear, C. F. (1974) *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 338.
15. Randall, D. D. (1976) *Aust. J. Plant Physiol.* **3**, 105.
16. Randall, D. D., Tolbert, N. E. et Gremel, D. (1971) *Plant Physiol.* **48**, 480.
17. Allen, R. J. L. (1940) *Biochem. J.* **34**, 858.
18. Zelitch, I. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 3077.
19. Takahashi, K. (1972) *J. Biol. Chem.* **71**, 563.
20. Vesterberg, O. et Svensson, H. (1966) *Acta Chem. Scand.* **20**, 820.
21. Davis, B. J. (1964) *Ann. Acad. Sci. New York* **121**, 404.
22. Weber, K. et Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406.
23. Gomori, G. (1941) *Arch. Pathol.* **32**, 189.
24. Jacob, J. L., Ribaillier, D. et d'Auzac, J. (1970) *Physiol. Veg.* **8**, 247.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.