

LES PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASES DES FEUILLES DE HARICOT: PROPRIÉTÉS CATALYTIQUES DES DEUX ISOENZYMES*

C. VÉRIN-VERGEAU, P. BALDY†, J. PUECH‡ et G. CAVALIÉ

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

(Reçu le 23 juillet 1979)

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

Abstract—2-Phosphoglycollate phosphatase (EC 3.1.3.18) isoenzymes I and II, from French bean leaves, have pH optima at 6.7-6.9 and 6.7-7.0, respectively, showing specificity for 2-phosphoglycollate; K_m values were 2.0×10^{-3} M (E_I) and $0.18-0.85 \times 10^{-3}$ M at low and high substrate concentrations (E_{II}). Both isoenzymes required divalent metal ions for activity: K_m values for Co^{2+} and Mg^{2+} were 1.7×10^{-4} and 1.0×10^{-4} M with E_I and 5.0×10^{-4} and 0.9×10^{-4} M with E_{II} . They exhibited regulatory responses to a number of metabolites including sugar phosphates, amino acids and some organic acids. Serine (K_i , 0.87 mM), glycollate (K_i , 6.50 mM), 6-P-gluconate (K_i , 0.55 mM), fructose-6-P (K_i , 2.40 mM), and formate (K_i , 32.0 mM) were the most potent inhibitors of isoenzyme E_I . Two kinds of inhibitors interacted with E_{II} which is inhibited by glycine, glycollate and glyoxylate at substrate concentrations greater than 0.40×10^{-3} M, and by α -alanine, glutamate and fructose-6-P at any substrate concentrations. The activity of the two isoenzymes was stimulated by ADP. On the other hand, glycollate biosynthesis was inhibited by treating excised leaves with glutamate or serine.

INTRODUCTION

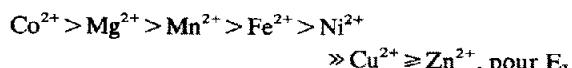
Le glycollate, substrat photorespiratoire, a la particularité d'être biosynthétisé, chez le haricot, par l'intermédiaire de deux phosphoglycollate phosphatases [1] alors qu'une seule forme de cette enzyme a été, jusqu'à présent, décelée et étudiée chez les végétaux [2-8]. Pour aborder la signification biologique de ces deux formes isofonctionnelles, une première approche a été faite en étudiant leurs propriétés catalytiques, *in vitro*, et en analysant l'action, *in situ*, de certains effecteurs. Ces résultats, suivis d'une discussion sur la régulation métabolique possible des deux phosphatases, sont exposés dans ce rapport.

RÉSULTATS

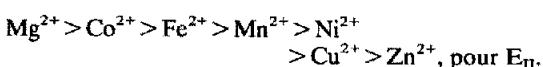
Cofacteurs

Les isoenzymes E_I et E_{II} ne sont actives, *in vitro*, qu'en présence de cations métalliques divalents (Tableau 1). A concentration égale, l'échelle de leur

efficacité est la suivante:



et



Les constantes, K_m , de l'isoenzyme E_I sont 1.7×10^{-4} M pour Co^{2+} et 1.0×10^{-4} M pour Mg^{2+} ; les K_m de E_{II} pour Co^{2+} et Mg^{2+} sont, respectivement, 5.0×10^{-4} et 0.9×10^{-4} M. Ces valeurs sont déterminées, expérimentalement, à pH 6.8, 30° et dans le tampon cacodylate-Na (Cl^-), 50 mM. Les propriétés catalytiques des deux isoenzymes sont étudiées en présence de MgSO_4 , 2 mM, comme cofacteur.

pH optimum

L'activité de la forme E_I est maximale de pH 6.7 à pH 6.9 et la zone optimale d'action de la forme E_{II} est comprise entre pH 6.7 et 7.0. L'étude des propriétés des deux phosphoglycollate phosphatases est réalisée à pH 6.8.

Substrat

Les deux isoenzymes sont spécifiques du P-glycollate: les autres composés phosphorylés présents dans le chloroplaste ne sont pas hydrolysés. La vitesse de catalyse par E_I suit une loi Michaélienne, la valeur de K_m étant 2.0×10^{-3} M à pH 6.8, 30° et avec MgSO_4 , 2 mM.

Dans les mêmes conditions, pour l'isoenzyme E_{II} , la courbe de variation de la vitesse, en fonction de la

* Deuxième partie des résultats de travaux ayant fait l'objet d'une Thèse de Spécialité en Physiologie Végétale soutenue à l'Université de Toulouse par C. Vérin-Vergeau. Publication de la 1ère partie, Vérin-Vergeau, C., Baldy P. et Cavalié G. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1279.

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

‡ Adresse: Laboratoire de Physique Structurale, Université Paul Sabatier, 31077 Toulouse Cédex, France.

Tableau 1. Action de différents cations métalliques divalents sur l'activité catalytique des deux phosphoglycolate phosphatases, E_I et E_{II} , du haricot

| Cations | Isoenzymes | |
|-----------|------------|----------|
| | E_I | E_{II} |
| 0 | 0 | 0 |
| Mg^{2+} | 100 | 100 |
| Co^{2+} | 108 | 97 |
| Mn^{2+} | 70 | 60 |
| Fe^{2+} | 55 | 70 |
| Ni^{2+} | 40 | 50 |
| Zn^{2+} | 5 | 22 |
| Cu^{2+} | 6 | 46 |

Le milieu réactionnel (3 ml) de pH 6,8 renferme: E_I , 0,2 unités phosphoglycolate phosphatase; E_{II} , 0,02 unités; tampon cacodylate- $Na(Cl^-)$, 50 mM; P-glycolate, 3,33 mM; cofacteurs, ajoutés sous forme de sulfates, 10 mM, préincubés 10 min à 30° dans le milieu réactionnel avant l'addition du substrat. Résultats exprimés en % de l'activité en présence de $MgSO_4$, 10 mM.

concentration en substrat, fait apparaître deux phases séparées par une brusque transition (Fig. 1): les K_m sont égaux à $0,18 \times 10^{-3}$ M, aux concentrations en P-glycolate inférieures à $0,7 \times 10^{-3}$ M, et $0,85 \times 10^{-3}$ M aux concentrations en substrat supérieures; le rapport des deux valeurs correspondantes de V_{max} est égal à 1,60. Ces résultats ont été obtenus, de façon reproducible, à partir de plusieurs préparations enzymatiques.

Si l'on cherche à représenter empiriquement ces données expérimentales par une équation de vitesse, il faut introduire des termes de degré au moins égal à trois [9]. En l'absence de renseignements concernant la structure quaternaire de l'isoenzyme E_{II} , on peut

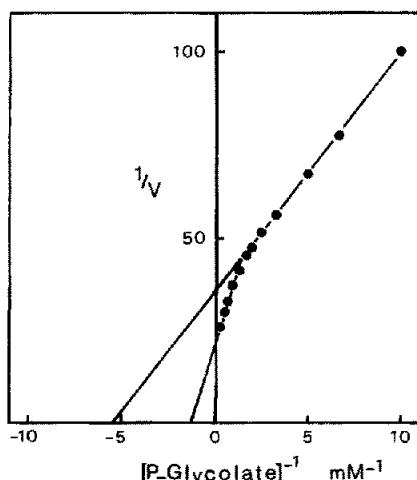


Fig. 1. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction catalysée par l'isoenzyme E_{II} , (0,02 unités). Le milieu réactionnel (3 ml) de pH 6,8 renferme: $MgSO_4$, 2 mM; P-glycolate, concentrations variables.

envisager plusieurs types de mécanismes catalytiques rendant compte d'un tel comportement: par exemple, la molécule d'enzyme peut être un dimère formé de deux sous-unités différentes, chacune d'elle portant un site de fixation du substrat et au moins l'un des sites étant un site catalytique; à l'équilibre dynamique stationnaire un tel modèle fournit une équation de vitesse du troisième degré. En choisissant convenablement les valeurs des constantes de vitesse, on a d'ailleurs pu retrouver les résultats expérimentaux. Si on suppose, au contraire, que l'enzyme est un tétramère, comme l'est probablement la P-glycolate phosphatase du tabac [8], on obtient, dans ce cas, une équation de vitesse du quatrième degré. Quel que soit le modèle, une forte coopérativité négative apparaît entre les sites de fixation occupés par le substrat.

Il faut également signaler que le comportement cinétique de E_{II} n'est pas modifié par une préincubation, 10 min avant l'addition du substrat, en présence d'urée 55 et 82 mM; ces concentrations en urée ne sont pas dénaturantes mais peuvent être 'désensibilisantes' pour certaines enzymes.

Effecteurs

Les effecteurs des deux P-glycolate phosphatases sont rassemblés dans le Tableau 2; ils ont été recherchés parmi les métabolites du chloroplaste et aussi du peroxysome et de la mitochondrie, organites également impliqués dans la photorespiration. Au cours de ces investigations on a pu observer que les

Tableau 2. Action de métabolites sur les deux isoenzymes, à activité phosphoglycolate phosphate, isolées de *Phaseolus vulgaris* et partiellement purifiées

| Effecteurs | Concentrations (M) | Inhibition % | |
|---------------------|--------------------|--------------|----------|
| | | E_I | E_{II} |
| 3-P-glycéraldéhyde | 1×10^{-3} | 20 | 0 |
| Dihydroxyacétone-P | 1×10^{-3} | 5 | 0 |
| Erythrose-4-P | 1×10^{-3} | 5 | 0 |
| 6-P-gluconate | 1×10^{-2} | 68 | 0 |
| Ribose-5-P | 1×10^{-2} | 5 | 0 |
| Glucose-6-P | 1×10^{-2} | 13 | 0 |
| Fructose-6-P | 1×10^{-3} | 28 | 33 |
| Ribulose-1,5-di-P | 1×10^{-3} | 5 | 0 |
| Phosphoénolpyruvate | 1×10^{-3} | 7 | 0 |
| α -Alanine | 1×10^{-2} | 0 | 90 |
| Sérine | 1×10^{-2} | 98 | 50 |
| Glutamate | 1×10^{-2} | 18 | 100 |
| Glycine | 1×10^{-2} | 18 | 40 |
| Glycolate | 1×10^{-2} | 24 | 40 |
| Glyoxylate | 1×10^{-2} | 9 | 100 |
| Succinate | 1×10^{-2} | 9 | 20 |
| Oxaloacétate | 1×10^{-2} | 0 | 50 |
| Pyruvate | 1×10^{-2} | 0 | 13 |
| Formiate | 1×10^{-2} | 35 | 0 |
| | | Activation % | |
| ADP | 1×10^{-2} | 133 | 270 |

Le milieu réactionnel (3 ml) de pH 6,8 renferme: E_I , 0,2 unités d'activité; E_{II} , 0,02 unités; tampon cacodylate- $Na(Cl^-)$, 50 mM; P-glycolate, 3,33 mM; $MgSO_4$, 2 mM; métabolites, préincubés 10 min à 30° dans le milieu réactionnel, avant l'addition du substrat.

composés suivants: 3-P-glycérate, fructose-1,6-di P, ribulose-5-P, xylulose-5-P, sédoheptulose-7-P, aspartate, hydroxypyruvate, malate, α -cétoglutarate, citrate, oxalate, glycérate, NADP^+ , NADPH et ATP ne modifient pas la vitesse d'hydrolyse du P-glycolate, même si on les emploie à des concentrations élevées ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$).

Pour l'isoenzyme E_{II} , l'étude des effecteurs les plus puissants montre que l'addition de fructose-6-P (K_i , 2,40 mM) et de formiate (K_i , 32,00 mM) entraîne seulement une diminution de V_{max} , alors que l'inhibition par la sérine (K_i , 0,87 mM), le 6-P-gluconate (K_i , 0,55 mM) et le glycolate (K_i , 6,50 mM) se traduit par une modification du K_m et de V_{max} , leur rapport restant constant. Divers mécanismes, pouvant rendre compte de ces résultats expérimentaux, ont fait l'objet de calculs théoriques. L'inhibition par le glycolate ne résulte pas d'une compétition avec le substrat mais, vraisemblablement, d'une association avec le phosphoryl-enzyme (EPi) formé à partir du complexe enzyme-substrat (ES). On peut donner la même interprétation à propos de l'action de la sérine et, peut-être, du 6-P-gluconate bien que ce composé renferme un groupement phosphorylé. L'explication la plus simple, des effets du fructose-6-P et du formiate, consiste à invoquer une inhibition non compétitive mais on ne peut exclure, *a priori*, l'éventualité d'un phénomène plus complexe: occupation du site catalytique de l'enzyme libre et fixation sur le phosphoryl-enzyme.

Pour l'isoenzyme E_{II} , il existe deux catégories d'inhibiteurs dont la structure chimique, et probablement le mode d'action, sont très différents. Les métabolites tels que glycine, glycolate et glyoxylate, dont la molécule contient deux atomes de carbone, ne diminuent pas la vitesse d'hydrolyse aux concentrations en P-glycolate inférieures à $0,40 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Fig. 2); l'inhibition qui apparaît au-delà n'est pas levée par les fortes concentrations en substrat. L'action de ces effecteurs peut être interprétée selon le modèle précité: Ils se fixeraient sur le phosphoryl-enzyme; l'absence d'inhibition constatée aux faibles concentrations en substrat impliquerait que la vitesse de formation de

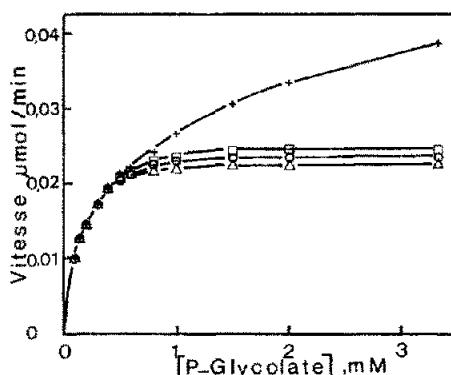


Fig. 2. Inhibition de l'activité P-glycolate phosphatase, catalysée par la forme isofonctionnelle E_{II} (0,02 unités) par: la glycine (□), le glycolate (○), et le glyoxylate (△). Les effecteurs, 2 mM dans le milieu réactionnel, sont préincubés 10 min, à 30°, avant l'addition du substrat (concentration variables). Milieu réactionnel (3 ml) de pH 6,8.

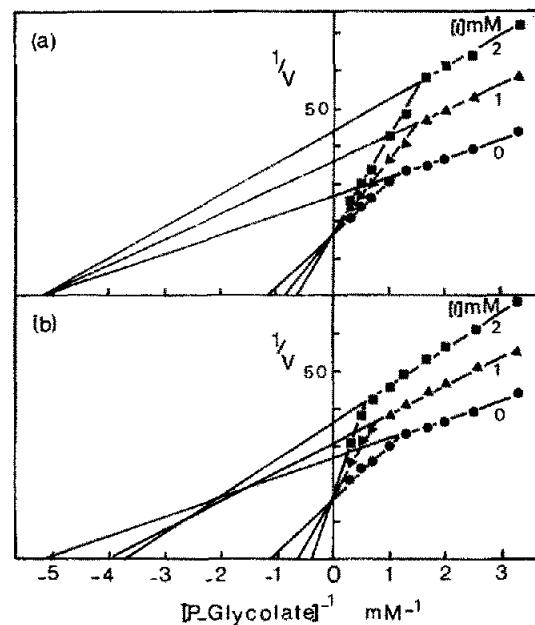


Fig. 3. Inhibition de la P-glycolate phosphatase E_{II} par l' α -alanine, 1 et 2 mM (a) et le glutamate, 1 et 2 mM (b), (inhibition par la sérine et le fructose-6-P non représentée car action analogue à celle observée avec le glutamate).

Conditions expérimentales de la Fig. 2.

ES, à partir de EPi et de glycolate, soit très inférieure à la vitesse de dissociation de EPi. Les métabolites ayant au moins trois atomes de carbone (Tableau 2), dont l' α -alanine, la sérine, le glutamate et le fructose-6-P, agissent sur la protéine, même aux faibles concentrations en substrat (Fig. 3); il semble que l'emploi de concentrations en P-glycolate, supérieures à celles utilisées au cours de l'expérimentation, permette de lever complètement l'inhibition. Ces inhibiteurs entrent certainement en compétition avec le substrat.

Concentration en biocatalyseur et cinétique de la réaction

La quantité de glycolate formé est directement proportionnelle à la durée de catalyse durant au moins 60 min avec E_{II} (quantité de protéines correspondant à 0,02 unités d'activité, environ) et 45 min avec E_{I} (en moyenne 0,2 unités d'activité); au-delà de 45 min, l'infexion de la courbe traduirait l'action inhibitrice du glycolate formé (Tableau 2) qui est alors $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans le milieu. Même lorsque la teneur en protéines est quatre fois supérieure à celle utilisée dans les conditions expérimentales [1], on observe une relation linéaire entre la vitesse et la quantité de protéines.

DISCUSSION

Les résultats acquis font nettement apparaître les propriétés catalytiques différentes des deux protéines à activité P-glycolate phosphatase et confirment leur nature isoenzymatique antérieurement mise en évidence par différentes techniques [1].

L'activation des P-glycolate phosphatases végétales par les ions métalliques bivalents est généralement observée *in vitro* [2, 6-8]. La présence de ces cations

est indispensable à l'activité des isoenzymes E_1 et E_{11} du haricot, après purification. Par contre, l'activité phosphatasique de l'extrait brut foliaire et du précipité acétonique représente, en l'absence de cofacteurs, 33 et 3% de l'activité mesurée en présence de Mg^{2+} ; ces résultats s'expliquent par l'existence de phosphatasases non spécifiques, en particulier d'une 3-P-glycérate phosphatasase très active hydrolysant le P-glycolate [1] et ne nécessitant pas de cations divalents [5].

Par analogie avec la localisation cellulaire de cette enzyme chez les végétaux [5, 10, 11], les deux isozymes du haricot devraient être chloroplastiques. Ainsi le Co^{2+} n'a pas été utilisé pour les études *in vitro*, non seulement parce qu'il n'est pas décelé dans les chloroplastes, du moins chez l'épinard [11], mais en raison de l'importance physiologique du Mg^{2+} , cofacteur de nombreuses enzymes chloroplastiques, et dont la teneur est modulée par l'éclairage [12, 13]. Celui-ci fait également varier le pH stromatique: 7,0 à l'obscurité, 7,8 à la lumière; on peut alors envisager que l'alcalinisation du stroma contribue à diminuer faiblement l'activité P-glycolate phosphatasase étant donné qu'à pH 7,8 on constate une baisse d'activité de E_1 et E_{11} , respectivement, 10 et 33%. Durant l'héméropériode, l'action du pH devrait être compensée par l'augmentation du Mg^{2+} chloroplastique.

Certains composés phosphorylés pourraient intervenir dans les mécanismes de régulation, *in vivo*, si leur taux, dans le chloroplaste, est suffisant; le fructose-6-P inhibe l'isoenzyme E_{11} ; il ralentit également la vitesse de catalyse de E_1 , protéine régulée, avec plus ou moins d'efficacité, par des intermédiaires du cycle de Calvin: dihydroxyacétone-P, érythrose-4-P, 3-P-glycéraldéhyde, ribose-5-P également inhibiteur de l'enzyme du tabac [8], ribulose-1,5-di P et par d'autres métabolites phosphorylés dont le glucose-6-P. L'importante inhibition provoquée par le 6-P-gluconate, se formant à l'obscurité dans les chloroplastes [14], pourrait, en raison de son affinité pour la protéine, avoir à ce moment-là, une signification physiologique. Il en serait de même de l'ADP, antagoniste du 6-P-gluconate en absence de lumière; cet adénylate est un effecteur positif, non seulement de E_1 mais aussi de E_{11} .

Quant à l'intervention du formiate sur E_1 , son rôle, *in situ*, est plus douteux en raison du peu d'affinité pour l'enzyme et de sa localisation.

Contrairement à l'action de certains oses phosphate inhibant essentiellement E_1 , les aminoacides inhibent plus particulièrement E_{11} . La plus forte inhibition des deux isoenzymes est provoquée par le glutamate et la sérine dont les teneurs sont notables dans les limbes de haricot—1,24 et 0,88 μ mol par g de matériel végétal frais—bien que ces valeurs fassent abstraction de toute compartmentation cellulaire. Leur action inhibitrice est en parfait accord avec les résultats obtenus *in situ* à partir de feuilles excisées de haricot ayant absorbé du glutamate ou de la sérine à la lumière; dans les essais, comparativement aux témoins prétraités dans les mêmes conditions, on n'observe pas, ou peu, de glycolate radioactif après absorption de $^{14}CO_2$. Dans un second type d'expérimentation, basée sur le dosage du glycolate inerte après inhibition de la glycolate oxydase par l'acide α -hydroxy-2-pyridine-méthane sulfonique, la teneur en glycolate

baisse, en moyenne, de 74 et 16% dans les feuilles ayant absorbé soit du glutamate, soit de la sérine. Une baisse de la teneur en glycolate, concomitante d'une élévation de l'activité photosynthétique nette, se manifeste dans les disques de feuilles de tabac traités par le glutamate, le site et le mode d'action de l'acide α -hydroxy-2-pyridine-méthane sulfonique sur l'enzyme sont assez spécifiques de l'espèce végétale dont elle est extraite [16].

Le comportement des P-glycolate phosphatasases du haricot, en présence des effecteurs, semble indiquer une régulation indirecte possible par les réactions photochimiques (pH, ADP, Mg^{2+}). Les différences observées dans les mécanismes probables de régulation des deux phosphatasases montre l'importance des isoenzymes dans la cellule; des données acquises dans ce travail il ressort, également, que la protéine E_{11} devrait occuper un rôle physiologique plus important en raison de ses propriétés cinétiques particulières qui contribuent à éviter toute élévation du taux de P-glycolate, inhibiteur du métabolisme glucidique du chloroplaste [17]. Quant aux modèles proposés, pour rendre compte des propriétés cinétiques de E_{11} , ils demandent à être étayés par une étude de la structure moléculaire de la protéine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

La nature isoenzymatique des deux formes de P-glycolate phosphatasase, E_1 et E_{11} , isolées des feuilles de haricot dans un bon état de pureté, a pu être démontrée par différentes techniques [1]. La terminologie E_1 et E_{11} , des deux isoenzymes, spécifie l'ordre de sortie des protéines catalytiques au cours de la chromatographie sur DEAE-cellulose (2 × 6 cm): l'élution par paliers de force ionique —0,02 M (50 ml), 0,05, 0,08 et 0,12 M (100 ml)— avec le tampon acide citrique (Na^+) de pH 7,2 permet, à la fois, leur séparation et leur purification partielle.

Au cours de l'étude des propriétés catalytiques des deux formes isofonctionnelles, le procédé de détermination de l'activité dans le milieu d'incubation [1] fournit toujours la 'vitesse initiale' correspondant à l'équilibre dynamique stationnaire. L'influence du pH est analysée en présence de $MgSO_4$, 2 mM, et de phosphoglycolate 3,33 mM, dans une zone comprise entre pH 5,2 et 9,0 en utilisant deux mélanges tampons: Tris (Cl^-) et cacodylate- $Na(Cl^-)$, 50 mM. Il a été vérifié, pour les pH communs à ces deux tampons, que leur nature n'interférerait pas sur la vitesse de catalyse. L'action des effecteurs, sur les deux isoenzymes, est recherchée conformément à la méthode de mesure utilisée [1], d'après le protocole inclus dans la légende du Tableau 2 et de la Fig. 2. Les résultats expriment la moyenne d'au minimum 3 essais. Une unité d'activité correspond à la quantité d'enzyme catalysant, à 30°, la formation de 1 μ mol de Pi par min.

Remerciements—Ces recherches ont été effectuées au Centre de Physiologie Végétale, Laboratoire associé au C.N.R.S. 'Adaptations physiologiques chez les Végétaux', L.A. No. 241. Nous remercions vivement le Dr. M. L. Champigny (Maitre de Recherche, Orsay) pour l'intérêt porté à ce travail, et Monsieur le Professeur A. Baudras pour les suggestions qu'il nous a faites.

BIBLIOGRAPHIE

1. Vérin-Vergeau, C., Baldy, P. et Cavalié, G. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1279.
2. Richardson, K. E. et Tolbert, N. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1285.
3. Yu, Y. L., Tolbert, N. E. et Orth, G. M. (1964) *Plant Physiol.* **39**, 643.
4. Anderson, D. E. et Tolbert, N. E. (1966) *Methods in Enzymology* (Wood, W. A., ed.) Vol IX, pp. 646-650. Academic Press, New York.
5. Randall, D. D. et Tolbert, N. E. (1971) *Photosynthesis and Photorespiration* (Hatch, M. D., Osmond, C. B. and Slatyer, R. O., eds.) pp. 259-266. Wiley-Interscience, New York.
6. Kerr, M. W. et Gear, C. F. (1974) *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 338.
7. Randall, D. D. (1976) *Aust. J. Plant Physiol.* **3**, 105.
8. Christeller, J. T. et Tolbert, N. E. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1780, 1786.
9. Engel, P. C. et Ferdinand, W. (1973) *Biochem. J.* **131**, 97.
10. Thompson, C. M. et Whittingham, C. P. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 642.
11. Joyard, J. et Douce, R. (1976) *Physiol. Veg.* **14**, 31.
12. Lin, D. C. et Nobel, P. S. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 622.
13. Miginiac-Maslow, M. et Hoarau, A. (1977) *Plant Sci. Letters* **9**, 7.
14. Champigny, M. L. (1976) *Physiol. Veg.* **14**, 607.
15. Oliver, J. D. et Zelitch, I. (1977) *Plant Physiol.* **59**, 688.
16. Kelly, G. J. (1978) *Proceedings of the 4th International Congress on Photosynthesis 1977* (Hall, D. O., Coombs, J. and Goodwin, T. W., eds.) pp. 437-446. The Biochemical Society, London.
17. Anderson, L. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 237.