

BBA 66137

SÉPARATION ET ÉTUDE PARTIELLE DE DEUX PHOSPHATASES ALCALINES DE LEVURE

J. ATTIAS, J. L. BONNET ET J. C. SAUVAGNARGUES

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Montpellier, (34) (France)

(Reçu le 2 mars, 1970)

SUMMARY

Separation and partial study of two alkaline phosphatases from baker's yeast

1. Two fractions with alkaline phosphatase activity were separated in baker's yeast extracts. These fractions were separated by DEAE-cellulose chromatography and partially purified. They could be characterized by polyacrylamide gel electrophoresis.

2. One of these fractions hydrolyses specifically *p*-nitrophenylphosphate with a pH optimum of 8.4. It is strongly activated by Mg²⁺ and inhibited by Be²⁺ and Zn²⁺. EDTA is activator at low concentration.

3. The second fraction is not substrate specific. Its pH optimum with *p*-nitrophenyl phosphate is 10.0; this varies according to the substrates used. The enzyme is activated by Mg²⁺ and inhibited by Be²⁺ and Zn²⁺.

INTRODUCTION

Si les phosphatasées alcalines des levures ont fait l'objet de nombreuses études sur leur localisation et quelques unes de leurs propriétés, peu de travaux ont été consacrés à leur isolement et à leur purification.

SUOMALAINEN *et al.*¹ ont montré sur des extraits bruts de levure l'existence de deux pH optimum d'action en milieu alcalin (7.8 et 8.9) pour l'hydrolyse du phénol-phthaléine-diphosphate suggérant la présence de deux phosphatasées alcalines, HOFFMANN-OSTENHOF *et al.*² ont purifié une phosphatasée alcaline de levure de bière de pH optimum 9.2, TONINO ET STEYN-PARVÉ³ signalent l'existence d'une seule phosphatasée alcaline "intracellulaire" de pH optimum compris entre 9 et 10 selon les substrats, CSOPAK⁴ a purifié une phosphatasée alcaline de pH optimum 8.1. Dans un travail très récent, GORMAN ET HU⁵ séparent deux phosphatasées de pH optimum compris entre 8.5 et 8.8, l'une spécifique du *p*-nitrophényle-phosphate, l'autre non spécifique, ainsi qu'une L-histidinol-phosphatasée spécifique dans des extraits bruts de cultures de *Saccharomyces cerevisiae* en fin de phase exponentielle.

Le présent travail se rapporte à la purification partielle et à la caractérisation de deux fractions présentant une activité phosphatasique en milieu alcalin, à partir de préparations commerciales de levure de boulangerie.

MÉTHODES

Activité enzymatique

Elle est déterminée avec le *p*-nitrophénylphosphate comme substrat, le *p*-nitrophénol libéré est dosé colorimétriquement à 400 nm en milieu alcalin. L'enzyme est injecté à 2.0 ml de substrat 5 mM convenablement tamponné et préincubé à 37° ± 0.1°. La réaction est arrêtée par addition de 2.0 ml NaOH 1 M. L'unité d'activité enzymatique est définié comme la quantité d'enzyme qui provoque une augmentation d'absorbance à 400 nm de 1 unité par min à 37°. D'après un étalonnage avec une solution connue de *p*-nitrophénol 1 unité d'adsorbance correspond à une concentration de 55 µM.

Electrophorèses

Elles sont réalisées sur gels de polyacrylamide à 7.5% dans un tampon Tris-glycine (pH 8.5) à l'aide d'un appareil "Acrylophor" Pleuger. Une tension de 80 V est appliquée pendant 2 h. Après migration, on révèle pour un même échantillon l'activité enzymatique sur deux substrats: l'*α*-naphtylphosphate et le *p*-nitrophénylphosphate. Pour cela, les gels sont incubés pendant 10 min à 37° dans le substrat (5 mM) à pH 9.5 en présence de MgCl₂ 10 mM. L'*α*-naphtol est révélé après coloration par la 5-chloro-*O*-toluidine diazotée (Fast Red TR), le *p*-nitrophénol apparaît sous forme d'une bande jaune.

Dosage du Pi

Il est déterminé selon la méthode de DELSAL ET MANHOURI⁶, l'intensité de la coloration est mesurée à 880 nm.

RÉSULTATS

Extraction

500 g de levure fraîche (Lesaffre) conservée à -30° sont émiettés dans un bêcher en acier inoxydable, congelés dans l'azote liquide puis portés à 30°. Congélation et décongélation sont répétés 2-3 fois à la suite de quoi la levure prend une consistance liquide. On ajoute à la suspension 500 ml NaHCO₃ 0.1 M et l'on soumet le mélange à une agitation mécanique lente à température ambiante pendant 8 h. Après centrifugation (15 min à 3000 × g) on répète ce traitement sur le culot pendant 4 h. Les surnageants sont réunis. Toutes les opérations ultérieures sont conduites à 4°.

Précipitation au (NH₄)₂SO₄

La solution (environ 1200 ml), est additionnée de (NH₄)₂SO₄ à raison de 66 g pour 100 ml (0.9 satn.). Après 4 h le précipité est recueilli par centrifugation, repris par 200 ml de Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM, MgCl₂ 1 mM (tampon standard), dialysé contre ce tampon et centrifugé pendant 30 min à 75 000 × g.

Précipitation au sulfate de protamine

Au surnageant obtenu on ajoute lentement 100 ml d'une solution à 1% de sulfate de protamine tamponnée à pH 7.4. Après 15 min l'important précipité formé

est séparé par centrifugation (10 min à 25 000 × g). Ce traitement élimine environ 90% des acides nucléiques sans perte notable d'activité enzymatique.

Chromatographie sur DEAE-cellulose

La solution est chromatographiée sur une colonne de DEAE-cellulose de 6.5 cm × 16 cm équilibrée dans le tampon standard. Après lavage de la colonne on applique un gradient linéaire de force ionique, réalisé à l'aide de deux flacons identiques contenant l'un 1 l de tampon standard, l'autre 1 l de NaCl 0.5 M dans le même tampon, reliés par leur base. Le débit de la colonne est réglé à 150 ml/h, des fractions de 10 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions. Des fractions enzymatiquement actives sont recueillies avant et pendant l'application du gradient. Une fois réunies on les désigne respectivement par Fraction A et Fraction B (Fig. 1).

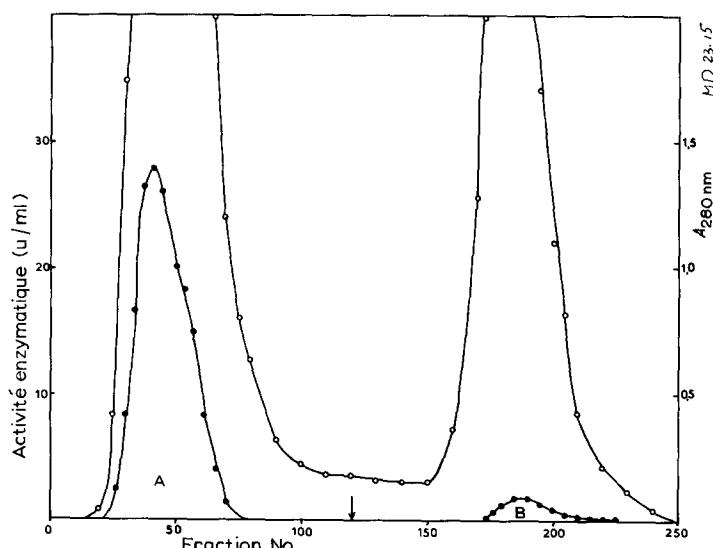


Fig. 1. Chromatographie sur DEAE-cellulose de l'extrait obtenu après traitement au sulfate de protamine. L'activité enzymatique des différentes fractions est testée sur le *p*-nitrophénylphosphate (5 mM) en tampon carbonate (pH 9.4) 20 mM, MgCl₂ 10 mM. La flèche indique le départ du gradient. ○—○, Absorbance à 280 nm; ●—●, activité enzymatique.

Dans le présent travail la Fraction A a été chromatographiée sur gel Sephadex G-200 sans purification ultérieure. La Fraction B a été partiellement purifiée par fractionnement acétонique. L'activité enzymatique se retrouve dans la fraction qui précipite à 40% (v/v) d'acétone.

Electrophorèses

L'électrophorèse d'extraits bruts de levure sur gels de polyacrylamide montre l'existence de deux bandes actives sur le *p*-nitrophénylphosphate dont une seule réagit également sur l'*a*-naphtylphosphate. La fraction la plus électronégative, qui réagit sur les deux substrats essayés, correspond à la Fraction B, la Fraction A réagit sur le *p*-nitrophénylphosphate seul (Fig. 2).

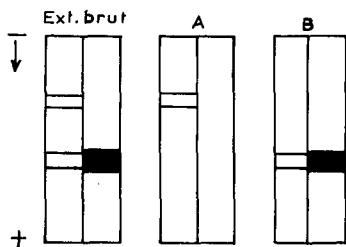


Fig. 2. Electrophorèses sur gels de polyacrylamide de l'extrait brut concentré et des Fractions A et B montrant la position des bandes d'activité enzymatique sur le *p*-nitrophénylphosphate (bandes blanches) et sur l' α -naphthylphosphate (bandes noires).

Ce comportement indique que l'on a à faire à deux enzymes différents. L'étude d'autres propriétés rapportée ci-dessous confirme cette hypothèse.

pH optimum et spécificité

La Fraction A présente un pH optimum vers 8.4 avec le *p*-nitrophénylphosphate, elle est sans action sur plusieurs monoesters phosphoriques (Tableau I). Cette fraction, encore très impure, possède une activité distincte sur l' α -glycérophosphate que nous avons identifiée à celle de l' α -glycérophosphatase spécifique de pH optimum 6.5 décrite par TSUBOI *et al.*⁷.

La Fraction B présente une faible spécificité, elle hydrolyse divers esters phos-

TABLEAU I

SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT DES FRACTIONS A ET B

La Fraction A est testée à pH 3.8, tampon Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 20 mM; la Fraction B à pH 10.0, tampon carbonate 20 mM, MgCl₂ 10 mM. Concentration des substrats 5 mM. Le degré d'hydrolyse est déterminé par dosage du P_i libéré.

Substrat	Activité (%)	
	Fraction A	Fraction B
<i>p</i> -Nitrophényle phosphate	100	100
α -Glycérophosphate	0	12
β -Glycérophosphate	4	34
Phényle phosphate	0	71
Sérine-phosphate	0	45
Ethanolamine-phosphate	4	16
Choline-phosphate	0	39
α -Naphthylphosphate	0	76

phoriques avec des vitesses variables (Tableau I). Le pH optimum varie selon les substrats utilisés, il est de 10.0 pour le *p*-nitrophényle phosphate, 9.4 pour le phényle phosphate, 8.8 pour le β -glycérophosphate, 8.6 pour l' α -glycérophosphate. Cette fraction hydrolyse aussi le PP₁ avec un optimum à pH 7.5 mais il est possible qu'à ce stade de purification l'activité observée soit due à la pyrophosphatase inorganique spécifique décrite par KUNITZ ET ROBBINS⁸.

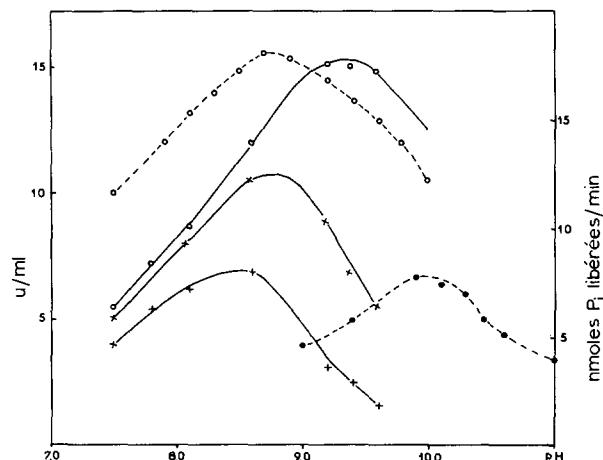


Fig. 3. pH optimum des Fractions A et B. L'activité est déterminée par dosage du *p*-nitrophénol pour le *p*-nitrophénylphosphate (unités/ml), par dosage du P_i libéré pour les autres substrats (nmoles P_i par min). Milieux d'incubation: substrats 5 mM, tampons 25 mM, $MgCl_2$ 10 mM. Tampons utilisés: Tris-maléate (pH 7.0-7.8), Tris-HCl (7.2-9.0), 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol-HCl (8.8-10.0), éthanolamine-HCl (9.4-11.0). Action sur le *p*-nitrophénylphosphate: ○—○, Fraction A; ●—●, Fraction B. Les courbes en traits pleins se rapportent à l'action de la Fraction B sur les substrats suivants: ○—○, phénylphosphate; ×—×, β -glycérophosphate; +—+, α -glycérophosphate. La Fraction A est inactive sur ces substrats (Tableau I).

Effecteurs

Fraction A. Les ions Mg^{2+} activent fortement l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate, l'activation maximale est observée pour Mg^{2+} 20 mM (Tableau II). L'enzyme est pratiquement inactif en absence de cet ion.

Les ions Be^{2+} , Zn^{2+} sont inhibiteurs à faible concentration (100% d'inhibition à 0.4 mM). L'EDTA est activateur à faibles concentrations jusqu'à 0.01 mM puis devient inhibiteur. Le phosphate est inhibiteur (Tableau II).

Fraction B. L'enzyme est activé par les ions Mg^{2+} , l'activité est doublée pour une concentration optimale de 10 mM. Zn^{2+} est légèrement activateur jusqu'à 0.4 mM

TABLEAU II

ACTION DE QUELQUES EFFECTEURS SUR LES FRACTIONS A ET B

La Fraction A est testée à pH 8.2, tampon Tris-HCl 50 mM. La Fraction B est testée à pH 9.4, tampon carbonate 20 mM. Substrat: *p*-nitrophénylphosphate 5 mM. Les pourcentages d'activité sont calculés par rapport à l'activité sans effecteur.

Fraction A					Fraction B						
Mg^{2+} (mM)	Act. (%)	P_i (mM)	Act. (%)	EDTA (μM)	Mg^{2+} (mM)	Act. (%)	P_i (mM)	Act. (%)	EDTA (μM)	Zn^{2+} (mM)	Act. (%)
0.5	300	10	75	4	460	0.4	124	4	74	4	74
1.0	820	20	66	10	830	0.8	137	8	60	10	45
2.5	1040	40	55	20	430	2	158	20	39	20	39
5	1130	100	37	40	120	4	173	40	26	100	12
20	1200	200	21	100	30	10	200	100	14	400	0
										8	30

puis devient inhibiteur aux concentrations supérieures. L'enzyme est inhibé par Be^{2+} (98% à 0.4 mM), l'EDTA et le phosphate (Tableau II).

DISCUSSION

Nous avons isolé et partiellement purifié deux fractions possédant une activité phosphomonoestersique en milieu alcalin. Ces deux fractions sont séparables par chromatographie sur DEAE-cellulose et peuvent être différenciées, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide grâce à leurs spécificités différentes. L'une d'elles (Fraction A), qui représente environ 80-90% de l'activité totale, hydrolyse spécifiquement le *p*-nitrophénylphosphate à un pH optimum de 8.4, la seconde (Fraction B), peu spécifique, présente avec ce substrat un pH optimum de 10.0. Ces deux fractions sont semblables à celles décrites par GORMAN ET HU⁵, obtenues à partir d'extraits bruts de cultures de *Saccharomyces*. Nos résultats, obtenus sur des préparations plus purifiées, confirment dans l'ensemble ceux de ces auteurs : la spécificité de la Fraction A pour le *p*-nitrophénylphosphate, la faible spécificité de la Fraction B, l'influence des ions métalliques et de l'EDTA. Ils diffèrent cependant sur un point : le pH optimum de la Fraction B pour l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate (pH 10.0 au lieu de pH 8.6 environ). La différence observée peut être due au fait que les fractions isolées ont été obtenues à des stades de purification différents.

Nos résultats sont en accord à cet égard avec ceux de TONINO ET STEYN-PARVÉ³ pour la phosphatase alcaline de *Saccharomyces* et de HOFFMANN-OSTENHOF *et al.*² pour la phosphatase alcaline de levure de bière qui signalent des pH optimum voisins ou supérieurs à 9.

La Fraction A est évidemment loin d'être pure, nous avons observé qu'elle contient en particulier l' α -glycérophosphatase spécifique (EC 3.1.3.19) décrite par TSUBOI *et al.*⁷, mais plusieurs tentatives de séparation de ces deux activités ont été infructueuses. L'activité de cette fraction sur le *p*-nitrophénylphosphate se caractérise par une grande instabilité vis-à-vis des solvants organiques (acétone, éthanol, butanol) dans les conditions où nous l'avons étudiée, ce qui rend délicate sa purification par les procédés habituellement utilisés pour l'extraction des phosphatases alcalines de tissus animaux par ces solvants.

Le pH optimum de la Fraction A est voisin de celui de l'enzyme décrit par STADTMAN⁸ qui contamine certaines préparations cristallisées d'alcool déshydrogénase de levure. Les seuls substrats connus de cet enzyme sont le *p*-nitrophénylphosphate et le phosphoramidate, il est activé par Fe^{2+} (réf. 10). Comme GORMAN ET HU⁵ nous n'avons pas observé d'activation par cet ion.

Par contre cette fraction ne s'identifie pas à l'enzyme purifié par CSOPAK⁴ (pH optimum 8.1) qui ne présente pas, d'après cet auteur, de spécificité particulière vis-à-vis des monoesters phosphoriques.

En ce qui concerne l'effet des ions métalliques, la Fraction A est très sensible à l'inhibition par Be^{2+} et Zn^{2+} , inhibiteurs connus de nombreuses phosphatases alcalines¹⁰. La propriété remarquable de cet enzyme est son besoin quasi absolu de Mg^{2+} pour fonctionner. Des activités observées en absence de Mg^{2+} dans le milieu de test sont probablement dues aux faibles concentrations de cet ion apportées par l'introduction de l'enzyme conservé dans un milieu contenant du Mg^{2+} . L'activation par les

faibles concentrations d'EDTA peut s'expliquer par la chelation d'ions métalliques inhibiteurs, à la lumière des effets observés avec Be^{2+} et Zn^{2+} .

La grande spécificité de la Fraction A pour le *p*-nitrophénylphosphate ne nous éclaire pas sur le rôle physiologique de cet enzyme et le problème se pose de savoir quel est son substrat naturel. Cet enzyme est probablement intracellulaire puisque NURMINEN *et al.*¹¹ ne signalent pas sa présence dans des préparations de membranes plasmatisques ou de parois isolées de *Saccharomyces*.

L'enzyme de la Fraction B se caractérise par son pH optimum d'action en milieu alcalin et sa faible spécificité de substrat. Il est activé par Mg^{2+} et inhibé par Be^{2+} et Zn^{2+} . Par ces propriétés il se classe dans la catégorie des phosphatasées alcalines (EC 3.1.3.1). D'après les résultats de TONINO ET STEYN-PARVÉ³ il serait également intracellulaire puisqu'on ne peut déceler d'activité phosphatasique alcaline ni sur des cellules entières ni sur des préparations de sphéroplastes intacts.

Des travaux en cours dans notre laboratoire ont pour objet la purification des deux fractions isolées en vue de l'étude de leurs propriétés moléculaires.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de subventions du Centre National de la Recherche Scientifique.

Les auteurs remercient Mr. le Professeur E. Kahane de ses conseils pour la rédaction du manuscrit.

RÉSUMÉ

1. Nous avons séparé à partir d'extraits de levure de boulangerie deux fractions enzymatiques présentant une activité phosphatasique alcaline. Ces fractions ont été séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose et partiellement purifiées. On peut les mettre en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2. Une de ces fractions hydrolyse spécifiquement le *p*-nitrophénylphosphate à un pH optimum de 8.4. Elle est fortement activée par Mg^{2+} et inhibée par Be^{2+} et Zn^{2+} . L'EDTA est activateur à faible concentration.

3. La seconde fraction ne présente pas de spécificité de substrat. Son pH optimum est de 10.0 avec le *p*-nitrophénylphosphate, il varie selon les substrats utilisés. L'enzyme est activé par Mg^{2+} et inhibé par Be^{2+} et Zn^{2+} .

REFERENCES

- 1 M. SUOMALAINEN, M. LINKO ET E. OURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 37 (1960) 482.
- 2 O. HOFFMANN-OSTENHOF, M. MOSER ET R. EHRENREICH, *Monatsh.*, 82 (1952) 295.
- 3 G. J. M. TONINO ET E. P. STEYN-PARVÉ, *Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 453.
- 4 H. CSOPAK, *Acta Chem. Scand.*, 18 (1964) 2414.
- 5 J. A. GORMAN ET A. S. L. HU, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 1645.
- 6 J. L. DELSAL ET M. MANHOURI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 1623.
- 7 K. K. TSUBOI, G. WIENER ET P. B. HUDSON, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 621.
- 8 M. KUNITZ, P. W. ROBBINS, dans P. D. BOYER, M. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 5, Academic Press, New-York, 1961, p. 169.
- 9 T. C. STADTMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 95.
- 10 T. C. STADTMAN, dans P. D. BOYER, M. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 5, Academic Press, New-York, 1961, p. 55.
- 11 T. NURMINEN, E. OURA ET M. SUOMALAINEN, *Biochem. J.*, 116 (1970) 61.