

BBA 67730

PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE**II. STRUCTURE SOUS-UNITAIRE, NATURE METALLOPROTEIQUE ET PARAMETRES CINETIQUES**

G. LINDEN et C. ALAIS

Laboratoire de Biochimie, Université de Nancy I, F. 54037, Nancy Cedex (France)

(Received August 29th, 1975)

Summary

Cow's milk alkaline phosphatase. II. Subunit structure, metalloproteic nature and kinetic parameters

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) from cow's milk as a dimer comprising two identical or very similar subunits of about 85 000 molecular weight. The enzyme contains 4.9 ± 0.6 atoms of zinc per mol of protein. The essential kinetic properties are the same as those of other alkaline phosphatases: variation of pH optimum value, the lack of specificity, increase of K_m and V with pH value. The phosphotransferase activity is enlarged, at constant concentration of acceptor, with an increasing concentration of donor. The small size of molecules and the presence of hydroxyls and amino groups increase the percentage of transfer phosphate. The phosphotransferase reaction is better with the D-isomer of serine and the enzyme possesses a more important affinity for the D-phosphoserine.

Introduction

Les propriétés catalytiques de la phosphatase alcaline (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) du lait de vache ont été peu étudiées jusqu'à présent [1–3]. Aussi, avant de comprendre son rôle physiologique, il est nécessaire d'étudier les propriétés de l'enzyme dont la purification et les caractéristiques moléculaires ont été décrites dans une précédente publication [4].

L'étude de la structure sous-unitaire et de la nature métalloprotéique de l'enzyme, de même que l'examen des principaux paramètres cinétiques devaient nous permettre également de classer la phosphatase alcaline du lait parmi les enzymes de son groupe. L'activité phosphotransférante, propriété importante et commune à toutes les phosphatases alcalines [5,6], a fait l'objet d'une étude

particulière; les conditions que l'accepteur doit remplir pour que cette activité devienne prépondérante, ont été dégagées.

Materiel et Methodes

Matériel

La phosphatase alcaline a été préparée selon la méthode décrite précédemment [4]. Les réactifs suivants proviennent de Merck: *p*-nitrophénylphosphate, β -glycérophosphate, 2-amino-2-méthyl propanol et la D-sérine et L-sérine. Le α -glycérophosphate, la DL-phosphosérine sont fournis par Fluka; l'adénine monophosphate, la DL-phosphothreonine, la L-phosphosérine et D-phosphosérine, la phosphocréatine et la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* par Sigma; le glucose 1-phosphate et la D-glucosamine par Calbiochem; le glucose 6-phosphate par Boehringer; la sérum albumine, la γ -globuline, l'ovalbumine et l'acrylamide sont fournis par Serva.

Méthodes

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium a été effectuée selon la méthode de Weber et Osborn [7]. La migration électrophorétique a été réalisée à pH 7.4 en présence de tampon phosphate, 100 mM, contenant 0.1% de mercaptoéthanol et 0.1% de dodécyle sulfate de sodium. La courbe d'étalonnage en gel de polyacrylamide à 5% a été obtenue avec la sérum albumine bovine, la γ -globuline ovine (chaînes H et L), la phosphatase alcaline d'*E. coli*, l'ovalbumine.

La détermination de la teneur en zinc de la préparation enzymatique a été effectuée avec un spectromètre d'absorption atomique Varian-Techtron (modèle AA-5) muni d'un accessoire d'atomisation sans flamme "Carbon rod" (modèle 63) en utilisant la raie de résonance de 213.8 nm. La métallophosphatase a été obtenue par addition d'un excès de zinc (10^{-2} M) à pH 8.0 en tampon Tris · HCl, 100 mM. La solution Zn^{2+} -phosphatase (5 mg/ml) a été éluée sur une colonne (10×1 cm) de Séphadex G-25 superfine équilibrée en tampon Tris · HCl, pH 8.0. Les ions métalliques contaminants de la solution tampon ont été éliminés par un traitement à la dithizone [8].

Pour la détermination de l'activité enzymatique, on prélève à des temps successifs des portions de 1 ml du mélange réactionnel sur lesquelles on dose le *p*-nitrophénol à 410 nm dans le cas de l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate ou le phosphate libéré par la méthode de Delsal et Manhoury [9] dans le cas des autres esters phosphoriques.

Les constantes de Michaelis (K_m) et les vitesses maximum d'hydrolyse (V) sont obtenues à partir de la représentation de Lineweaver et Burk [10]. La détermination de la constante d'inhibition (K_i) a été faite selon Velick et Hayes [11].

La concentration en protéines de la préparation enzymatique a été déterminée par la méthode de Lowry et al. [12].

Resultats

Structure sous-unitaire

Nous avons déjà signalé que la phosphatase alcaline native du lait de vache

dont la masse moléculaire est d'environ 170 000, migre sous forme d'une bande en électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8 [4]. Si l'enzyme native est traitée pendant 2 min à 100°C en tampon phosphate contenant 1% de dodécyle sulfate de sodium, elle migre à pH 7.4 sous forme d'une bande plus rapide identique à celle observée après une incubation de l'enzyme native à pH 2.1 (Fig. 1). La migration de cette bande en gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium correspond à une masse moléculaire de 85 000. Ces observations suggèrent la dissociation d'un dimère en deux monomères identiques ou très similaires.

Teneur en zinc

La faible spécificité de substrat de la phosphatase alcaline du lait de vache permet de la considérer comme une métallo-protéine à Zn^{2+} [13]. Comme Simpson et Vallee [14], nous avons constaté que les différents traitements de purification démetallisent l'enzyme qui contient moins d'un atome-g de zinc par mol de protéine. Après métallisation, l'enzyme renferme 4.9 ± 0.6 atomes-g de zinc par mol de protéine d'une masse moléculaire de 170 000.

Paramètres cinétiques

pH optimum. L'activité optimale de l'enzyme varie considérablement avec les conditions d'essai. Une des principales causes de variation reste, comme le montre la Fig. 2, la nature du substrat. Il existe, en effet, plus de 3 unités pH de différence entre le pH optimum d'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate (10.5) et celui de la caséine (6.8). Lorsque la concentration du *p*-nitrophénylphosphate passe de 5 mM à 0.625 mM, on observe un déplacement du pH optimum de 10.2 à 9.9. D'autres facteurs physico-chimiques (force ionique, nature du tampon...) influencent la valeur du pH optimum. En présence de Mg^{2+} (1 mM) dans le milieu réactionnel, tous les autres facteurs expérimentaux étant identi-

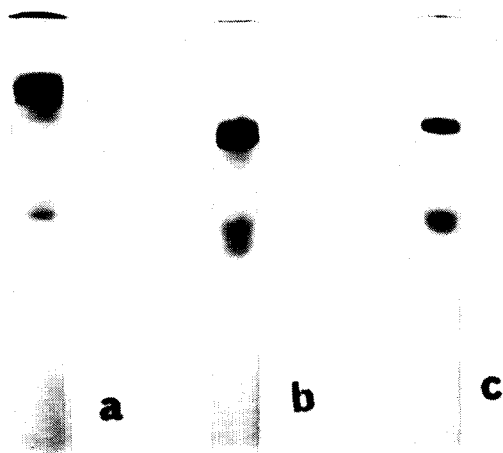


Fig. 1. Diagrammes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide. La migration a été réalisée à pH 7.4 en présence de tampon phosphate 100 mM contenant 0.1% de mercaptoéthanol et 0.1% de dodécyle sulfate de sodium (a) enzyme native, (b) enzyme traitée pendant 2 min, à 100°C en tampon phosphate contenant 1% de dodécyle sulfate de sodium, (c) enzyme dénaturée à pH 2.1. La bande inférieure est celle de l'étalon de migration.

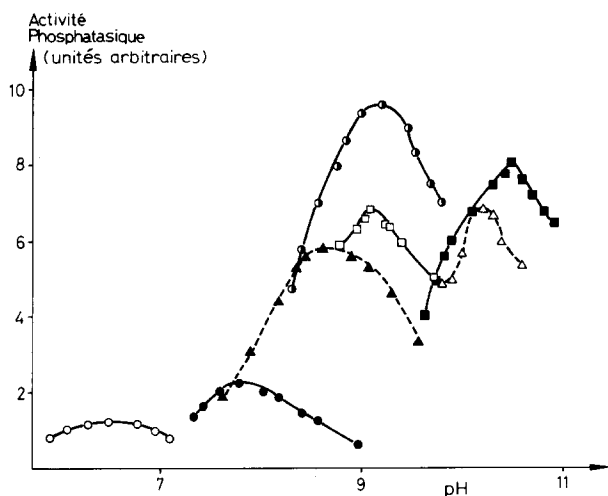


Fig. 2. pH optimum d'action de la phosphatase alcaline du lait de vache sur différents substrats. ○—○, caséine entière à 2% en tampon borate 50 mM, Mg^{2+} 1 mM; ▲—▲, phosphosérine; □—□, β -glycérophosphate, ●—●, phosphothréonine en tampon borate 50 mM. ■—■, *p*-nitrophénylphosphate en tampon carbonate 25 mM, Mg^{2+} 1 mM; △—△, *p*-nitrophénylphosphate dans le même milieu sans Mg^{2+} ; ●—●, pyrophosphate en tampon borate 50 mM exempt de Mg^{2+} . La concentration des substrats dans le milieu réactionnel est de 5 mM.

ques, le pH optimum d'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate est plus alcalin (10.5 au lieu de 10.2). Ce déplacement n'est plus observé pour d'autres esters phosphoriques: DL-phosphosérine, DL-phosphothréonine, β -glycérophosphate de sodium.

Détermination des K_m et V . Les constantes de Michaelis et les vitesses maximum d'hydrolyse de l'enzyme ont été déterminées pour plusieurs esters phosphoriques à 37°C à pH 9 en tampon borate 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM (Tableau I). Pour le pyrophosphate, le milieu d'essai est à pH 7.5 et exempt de $MgCl_2$.

Comme toutes les phosphatases alcalines, l'enzyme présente un manque de

TABLEAU I

PARAMETRES CINETIQUES AVEC QUELQUES ESTERS PHOSPHORIQUES

A pH 9 en tampon borate 50 mM avec ou sans $MgCl_2$ 1 mM, pour le pyrophosphate à pH 7.5 sans $MgCl_2$. Mesures effectuées à 37°C.

Substrats	$V \times 10^3$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)		K_m (mM)
	— Mg^{2+}	+ Mg^{2+}	
<i>p</i> -Nitrophénylphosphate	190	210	0.69
Adénine monophosphate	62	70	1.35
α -Glycérophosphate	7	9	1.72
β -Glycérophosphate	16	20	2.04
Glucose 1-phosphate	46	71	1.64
Glucose 6-phosphate	35	54	2.33
DL-Phosphothréonine	18	20	2.7
DL-Phosphosérine	20	23	3.7
D-Phosphosérine	16	19	3.6
L-Phosphosérine	33	42	10.0
Phosphocréatine	21	25	4.0
Pyrophosphate	65	—	0.63

spécificité de substrat. On constate cependant que l'affinité pour des substrats organiques, du type *p*-nitrophénylphosphate, est très élevée. Les esters phosphoriques du type biologique sont hydrolysés dans la zone de leur pH optimum avec une vitesse qui peut varier d'un facteur 6. A pH 9, la présence de Mg^{2+} (1 mM) dans le milieu réactionnel n'a aucune influence sur l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. Par contre, l'augmentation des vitesses d'hydrolyse est variable selon l'ester phosphorique. La détermination de la constante de Michaelis vers pH 10 permet de constater une baisse d'affinité en absence de Mg^{2+} .

Les vitesses d'hydrolyse de la DL-phosphothréonine, de la DL-phosphosérine et du β -glycérophosphate sont très voisines. En outre, relevons que l'enzyme semble présenter une affinité plus grande pour l'isomère D de la phosphosérine; l'isomère L est hydrolysé avec une vitesse deux fois supérieure à celle de l'isomère D. Cette diminution de l'affinité apparente pour le substrat s'accompagne donc d'une augmentation de la vitesse d'hydrolyse. On retrouve ce comportement de l'enzyme dans l'influence du pH sur K_m et V .

Dans le cas du pyrophosphate, la vitesse maximum d'hydrolyse est atteinte pour des valeurs de pH plus basses; dans la zone de pH 9–10, V est très faible.

En tampon borate à pH 9, nous avons vérifié que le phosphate et l'arséniate sont des inhibiteurs compétitifs de la phosphatase alcaline et nous avons obtenu les valeurs suivantes: $K_i = 0.25$ mM pour le phosphate et $K_i = 0.03$ mM pour l'arséniate.

Variation de K_m et V en fonction du pH. L'examen de la Fig. 3 montre que la valeur de K_m augmente avec le pH, ce qui revient à dire que l'affinité pour le substrat diminue alors que la vitesse d'hydrolyse augmente. L'enzyme du lait présente une des propriétés classiques de toutes les phosphatases alcalines.

Le diagramme de Dixon $K_m = f(\text{pH})$ montre une inflexion de pente pour pH = 8,6. La courbe $\log V = f(\text{pH})$ fait apparaître un seul pK (égal à 9) du complexe ES dans l'intervalle de pH étudié.

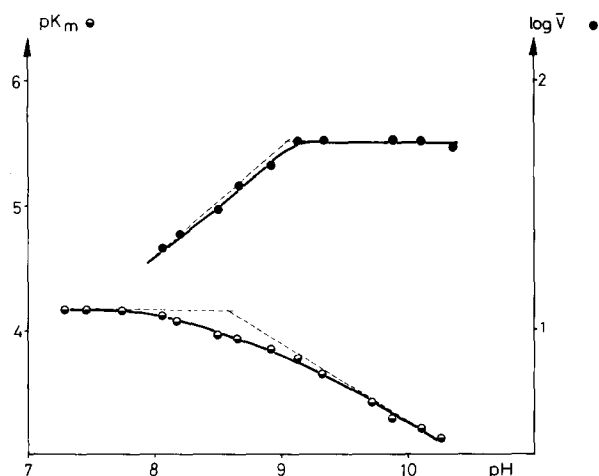


Fig. 3. Variation du pK_m et du logarithme de la vitesse maximum d'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate en fonction du pH. Les mesures sont effectuées en tampon barbital 0.1 M entre pH 7.2 et 9.6. Au-dessus de 9.6, le tampon carbonate 50 mM est utilisé. Le milieu réactionnel contient Mg^{2+} 1 mM et a une force ionique constante par addition de NaCl.

TABLEAU II

ACTIVITE PHOSPHOTRANSFERANTE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DU DONNEUR

Rapport	accepteur donneur	<i>p</i> -Nitrophénol (μmol)*	P_i (μmol)*	$\frac{\text{p-Nitrophénol}}{\text{P}_i}$	Phosphate transféré (%)
10		3.00	0.96	3.1	68
50		3.45	1.38	2.5	62.8
100		3.35	1.51	2.2	55
400		3.40	1.83	1.85	46
700		3.30	1.80	1.84	44.2
1000		3.20	1.80	1.78	44.3

* Les valeurs representent les quantités de *p*-nitrophénol ou de P_i libérées en 15 min en tampon borate 50 mM, pH 9, en présence de Mg^{2+} 1 mM. La concentration de l'accepteur: Tris dans le milieu réactionnel est de 1 M; la concentration du donneur *p*-nitrophénylphosphate varie de 100 à 1 mM.

Activité phosphotransférante. Avec le *p*-nitrophénylphosphate comme donneur et le Tris (1 M) comme accepteur, la quantité de phosphate transféré par unité de temps est d'autant plus élevée que le rapport accepteur/donneur est faible (Tableau II).

De plus, la nature et le nombre des radicaux chimiques portés par l'accepteur: présence d'un groupement aminé, nombre de groupements hydroxyles permet à l'activité de transfert de devenir prépondérante (Tableau III). La trop grande taille de certaines molécules semble être un critère limitatif de cette activité. L'enzyme exerce dans la réaction de transphosphorylation une sélectivité stéréospécifique à l'égard des isomères de la sérine qui corrobore les valeurs de K_m et V trouvées pour les esters phosphoriques de cet acide aminé.

L'éthanolamine est un accepteur qui privilégie davantage la réaction de transphosphorylation que les substances tampons telles que le Tris, le 2-amino-2-méthylpropanol. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Amador et Urban [15].

TABLEAU III

ACTIVITE PHOSPHOTRANSFERANTE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DU LAIT DE VACHE EN PRESENCE DE DIFFERENTS ACCEPTEURS

Accepteur	<i>p</i> -Nitro- phénol (μmol)*	P_i (μmol)*	$\frac{\text{p-Nitrophénol}}{\text{P}_i}$	Phosphate transféré (%)
Ethanolamine	1.20	0.71	1.69	40.8
D-Glucosamine	1.68	1.06	1.58	36.9
2-Amino-2-méthylpropanol-(1)	2.60	1.67	1.56	35.8
Tris	2.00	1.29	1.55	35.6
D-Sérine	0.86	0.65	1.32	24.4
L-Sérine	0.40	0.41	0.98	0
D-Glucose	1.04	0.87	1.20	16.4
Glycérol	1.47	1.29	1.14	12.2
Lactose	1.04	1.06	0.99	0

* Les valeurs représentent les quantités de *p*-nitrophénol ou de P_i libérées en 15 min en tampon borate 50 mM, pH 9, en présence de Mg^{2+} 1 mM. La concentration de l'accepteur dans le milieu réactionnel est égale à 0.4 M; celle du donneur: *p*-nitrophénylphosphate est de 20 mM.

Discussion

La structure sous-unitaire de la phosphatase alcaline du lait est similaire à celle déjà observée pour la phosphatase alcaline d'*E. Coli* [16], d'intestin de veau [17], du placenta humain [18,19] et du rein de boeuf [20]. La masse moléculaire de 170 000 pour l'enzyme native est en très bon accord avec celles trouvées précédemment [4].

La phosphatase alcaline du lait de vache contient 4.9 atomes-g de Zn^{2+} par mol de dimère. Un résultat similaire a été trouvé pour d'autres phosphatases alcalines de mammifères: intestin de veau [17], rein de boeuf [20].

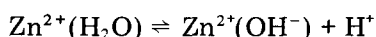
L'étude des paramètres cinétiques montre que la phosphatase alcaline du lait de vache présente également les caractéristiques communes des enzymes de son groupe et, tout particulièrement, de celles extraites du foie, des os, du rein, du cerveau: les valeurs de pH optimum obtenues avec les différents substrats sont comparables à celles trouvées pour d'autres phosphatases alcalines de mammifères [21,22], son affinité apparente pour les esters d'alcool, de phénol ou d'hémiacétal est sensiblement la même, l'activité pyrophosphatase présente les caractéristiques classiques [23].

Les meilleures conditions d'activité phosphotransférante de la phosphatase alcaline du lait ont été étudiées par Morton [24]. Il a notamment dégagé l'importance de la spécificité et de la concentration de l'accepteur et constaté que la variation du donneur (phosphocréatine) de 5 à 60 mM ne semble pas avoir un effet sur le pourcentage de phosphate transféré. Nous avons, par contre, observé qu'une variation du rapport accepteur/donneur de 1000 à 10 permet d'accroître le pourcentage de phosphate transféré de près de 25%. Il est bien connu, en outre, que les composés nucléophiles favorisent l'activité phosphotransférante [25,26]. Nous avons relevé que la réaction de transphosphorylation est favorisée en présence d'un accepteur de taille réduite, comportant un ou plusieurs hydroxyles et un radical aminé. De plus, la configuration de la L-sérine est moins favorable à l'activité transférase que l'isomère D, résultat qui se trouve corroboré par les valeurs de K_m des isomères de la phosphosérine.

L'effet de Mg^{2+} sur la valeur du pH optimum et du K_m est fonction du pH. L'augmentation de V , seul effet catalytique apparent peut être la conséquence d'une modification conformationnelle qui contribue au rapprochement de certains groupes du centre actif [27].

L'étude de la variation du K_m et de V en fonction du pH montre l'importance de deux groupes ionisables dans l'activité de l'enzyme dont les valeurs sont voisines de 8.6 et 9 à 37°C. Plusieurs résidus d'acides aminés peuvent être concernés par une valeur de pK de 9 à 37°C, à savoir le groupe $\alpha-NH_2$ ou $\epsilon-NH_2$ de la lysine, le groupe hydroxyle de la tyrosine et le radical sulfhydryl de la cystéine.

On peut aussi considérer, par analogie avec la phosphatase alcaline d'*E. Coli*, que le zinc est coordonné à une molécule d'eau [25]. Or, ce complexe présente un pK de 8.9 à 25°C et est dissocié selon la réaction:



Notons que le profil $pK_m - pH$ est similaire à ceux obtenus pour la phosphatase

tase alcaline d'intestin de veau [26], d'intestin de poulet [28] et de placenta de rat [29].

L'étude de l'action de quelques effecteurs métalliques sur l'activité enzymatique et celle de réactifs spécifiques de certains radicaux d'acides aminés sont en cours et doivent nous permettre de préciser le mécanisme réactionnel.

Remerciements

Nous remercions vivement le Professeur M. Lazdunski pour ses précieux conseils.

Resumé

La phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1) du lait de vache est un dimère comprenant deux sous-unités identiques ou très similaires d'une masse moléculaire d'environ 85 000. L'enzyme contient 4.9 ± 0.6 atomes-g de zinc par mol de protéine. Les propriétés cinétiques essentielles sont celles des enzymes de son groupe: forte variation de la valeur du pH optimum avec les conditions d'essai, manque de spécificité de substrat, augmentation du K_m et de V avec la valeur du pH. L'activité transférase se trouve augmentée, à concentration fixe d'accepteur, en présence de concentration croissante de donneur. La faible taille des molécules et la présence de groupements hydroxyles et amine accroissent le pourcentage de phosphate transféré. La réaction de transphosphorylation se fait de préférence avec l'isomère D de la sérine et l'enzyme présente une plus grande affinité pour la D-phosphosérine.

Bibliographie

- 1 Morton, R.K. (1955) *Biochem. J.* 61, 232—240
- 2 Morton, R.K. (1957) *Biochem. J.* 65, 674—682
- 3 Barman, T.E. et Gutfreund, H. (1966) *Biochem. J.* 101, 460—466
- 4 Linden, G., Mazon, P., Michalowski, J.B. et Alais, C. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 358, 82—90
- 5 Georgatos, J.G. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 619—624
- 6 Cox, R.P. et Griffin, M.J. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 552—562
- 7 Weber, K. et Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406—4412
- 8 Sandell, E.B. (1959) *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, Interscience, New York
- 9 Delsal, J.L. et Manhouri, H. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 1623—1636
- 10 Lineweaver, H. et Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658
- 11 Velick, S.F. et Hayes, J.E. (1953) *J. Biol. Chem.* 203, 545
- 12 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265—275
- 13 Lazdunski, M., Petitclerc, C., Chappelet, D. et Lazdunski, C. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 124—139
- 14 Simpson, R.T. et Vallee, B.L. (1969) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 166, 670—690
- 15 Amador, E. et Urban, J. (1972) *Am. J. Clin. Pathol.* 57, 167—172
- 16 Lazdunski, C. et Lazdunski, M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 113, 551—565
- 17 Fosset, M., Chappelet-Tordo, D. et Lazdunski, M. (1974) *Biochemistry* 13, 1783—1787
- 18 Harkness, D.R. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 503—512
- 19 Gottlieb, A.J. et Sussman, H.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 160, 167—171
- 20 Cathala, G., Brunel, C., Chappelet-Tordo, D. et Lazdunski, M. (1975) *J. Biol. Chem.*, sous presse
- 21 Brunel, C. (1972) Thèse doctorat-ès-sciences, Montpellier
- 22 Hérou, M. (1974) Thèse spécialité Biochimie, Montpellier
- 23 Moss, D.W. (1969) *Biochem. J.* 112, 699—701
- 24 Morton, R.K. (1958) *Biochem. J.* 70, 139—150
- 25 Lazdunski, C. et Lazdunski, M. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 294—300

- 26 Chappelet-Tordo, D., Fosset, M., Iwatsubo, M., Gache, C. et Lazdunski, M. (1974) *Biochemistry* 13, 1788—1795
- 27 Brunel, C. et Cathala, G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 309, 104—115
- 28 Hinberg, I. et Laidler, K.J. (1973) *Can. J. Biochem.* 51, 1096—1103
- 29 Petitclerc, C., Delisle, M., Martel, M., Fecteau, C. et Brière, N. (1975) *Can. J. Biochem.*, sous presse