

**MISE EN EVIDENCE CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS D'UNE ASSOCIATION
ENZYMATIQUE BIFONCTIONNELLE INTERVENANT DANS
LA BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE**

A. BOUDET

*Enzymologie et Métabolisme, Equipe de recherche Associée au C.N.R.S.,
Centre de Physiologie Végétale Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne, 31 Toulouse, France*

Received 18 March 1971

In the extracts of *Quercus pedunculata* roots, the activities of 5-dehydroquinate hydro-lyase and shikimate: NADP oxydoreductase are eluted in the same fractions whatever separation procedures are used: chromatography on Sephadex G 100, DEAE cellulose and hydroxylapatite, centrifugation in sucrose density gradient, disc electrophoresis. These results are closely related to those obtained on the aggregate of enzymes involved in the shikimate pathway in *Neurospora crassa*. The molecular weight of the association determined by gel filtration is about 55,000.

1. Introduction

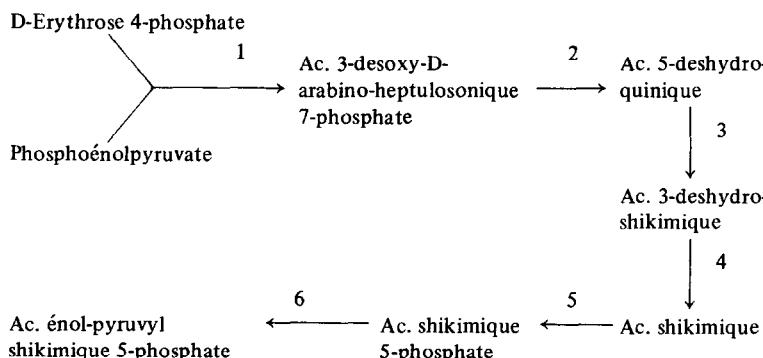
Parallèlement aux progrès réalisés sur la localisation intracellulaire des enzymes, se développe à l'échelle moléculaire, l'idée selon laquelle les protéines catalysant des réactions successives d'une même chaîne métabolique existeraient à l'état de systèmes multienzymatiques hautement organisés. De cette association résulteraient une efficacité accrue et de nouvelles possibilités de contrôle de la voie biosynthétique.

L'intervention de tels systèmes est actuellement

bien établie chez les microorganismes et les animaux: complexes de l'oxydation du pyruvate, de la synthèse du tryptophane, de la synthèse des acides gras [1, 2].

En 1967, Giles et al. [3] ont identifié chez *Neurospora crassa* un agrégat catalysant cinq réactions séquentielles dans la voie de l'acide shikimique (étapes 2 à 6 — schéma). Des études sur six autres champignons inférieurs [4] ont montré la présence de cette même association alors que les enzymes constitutives étaient trouvées séparément chez plusieurs espèces de Bactéries [5].

Schéma



Chez les végétaux supérieurs, bien que la présence de tels complexes soit hautement probable [6] on ne possède que peu d'éléments expérimentaux en faveur de leur existence dans une fraction soluble. Ce travail apporte la démonstration de l'association de deux activités intervenant séquentiellement dans la synthèse de l'acide shikimique chez *Quercus pedunculata*, la 5-deshydroquinate hydro-lyase (EC 4.2.1.10) et la shikimate: NADP oxydoreductase (EC 1.1.2.5) (étapes 3 et 4 — schéma). Très récemment il a été montré sur des cultures de cellules de *Nicotiana tabacum* que ces deux enzymes n'étaient pas séparables par centrifugation sur gradient de saccharose [7].

2. Partie expérimentale

2.1. Matériels

L'extraction des enzymes porte sur des racines de *Quercus pedunculata* Ehrh. obtenues après stratification des glands pendant un mois dans du sable humide à 20°. On homogénéise 10 g de matériel frais en présence de 2,5 g de Polyclar AT dans 80 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5 renfermant 0,5% de P.E.G. 6000 et 0,25% de thioglycolate de sodium. Le surnageant obtenu après 20 mn de centrifugation à 16.000 g constitue l'extrait brut.

L'acide shikimique et le NADP sont d'origine commerciale (Calbiochem), l'acide 5-deshydroquinique a été préparé à partir de l'acide quinique selon la technique de Grewe et Haendler [8].

2.2. Mesure des activités enzymatiques

L'activité de la 5-deshydroquinate hydro-lyase a été appréciée par l'augmentation de l'absorbance à 234 nm due à la production de 3-deshydroshikimate [9] dans le tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5. Celle de la shikimate: NADP oxydoréductase est déterminée, dans le sens d'oxydation de l'acide shikimique, par la mesure de l'augmentation d'absorbance à 340 nm selon le protocole de Udvary et Farkas [10] au pH optimum de l'enzyme du Chêne: 9,5.

2.3. Techniques de fractionnement des protéines enzymatiques

2.3.1. Chromatographie

Les protéines de l'extrait ont été chromatogra-

phiées sur gel de Séphadex G 100 (Parmacia Fine Chemicals), sur DEAE cellulose (Cellex D Bio-Rad) et sur hydroxylapatite (Biogel HTP Bio-Rad).

2.3.2. Centrifugation en gradient de densité

Des gradients linéaires ont été préparés à 4° à partir de solutions de saccharose (5—20%) dans le tampon tris-HCl 0,1 M de pH 7,5, 10⁻⁴ M en dithiothreitol [4].

On dépose sur chaque gradient de 4,8 ml, 0,1 ml d'extrait enzymatique puis on centrifuge à 39.000 tours/min dans le rotor SW 39 d'une ultra centrifugeuse Spinco modèle L, pendant 17 h à 4°. Après avoir percé chaque tube à sa partie inférieure on recueille 36 fractions de 2 gouttes sur lesquelles on détermine l'activité des deux enzymes.

2.3.3. Electrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée sur un appareil Shandon et les gels préparés selon Davis [13]. L'électrophorèse est conduite pendant 3/4 d'heure à 4° sous un voltage de 4 mA par tube. La révélation de la shikimate: NADP oxydoréductase s'effectue d'après Udvary et Farkas [10]. Pour l'élution des enzymes après migration, le gel est découpé en fragments d'environ 2 mm qui sont ensuite homogénéisés dans 2,5 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5 à l'appareil Ultra-Turrax. La mesure des activités enzymatiques est réalisée sur 1 ml de la solution.

2.4. Estimation du PM du complexe par filtration sur gel

Le poids moléculaire du complexe a été déterminé par filtration sur gel de Séphadex G 100 [12]; la colonne (3,5 X 38 cm) équilibrée dans du tampon tricine-soude M/200 de pH 8 est étalonnée à l'aide de protéines de poids moléculaires connus (Mann Research Laboratories).

3. Résultats et discussion

A la suite des diverses opérations de fractionnement retenues la détermination des deux activités enzymatiques indique une concordance parfaite

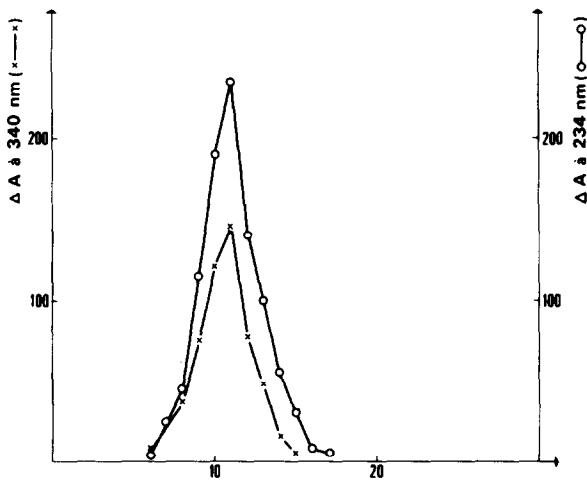


Fig. 1. Diagramme d'élation des deux activités sur Séphadex G 100. Colonne 54 x 5 cm équilibrée et éluée avec un tampon phosphate M/10 pH 7,5. Débit: 100 ml/h, fractions de 10 ml après le Vo.

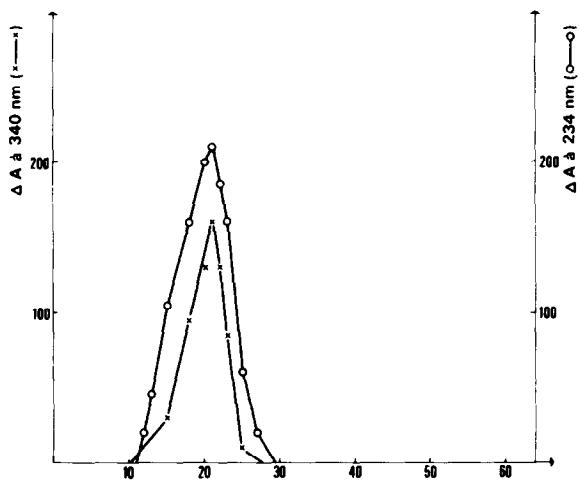


Fig. 3. Diagramme d'élation des deux activités sur hydroxylapatite. Colonne 1 x 10 cm équilibrée dans un tampon phosphate M/200 de pH 6,7. Elution par un gradient linéaire (300 ml tampon d'équilibration - 300 ml tampon phosphate pH 6,7 M/5).

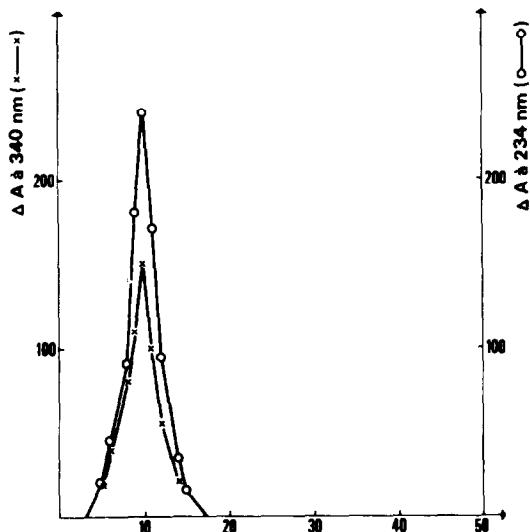


Fig. 2. Diagramme d'élation des deux activités sur DEAE cellulose. Colonne 1 x 10 cm équilibrée dans un tampon phosphate M/100 de pH 7,5. Elution par un gradient linéaire (250 ml tampon d'équilibration - 250 ml tampon phosphate pH 7,5 M/5). Débit de 60 ml/h. Fractions de 10 ml.

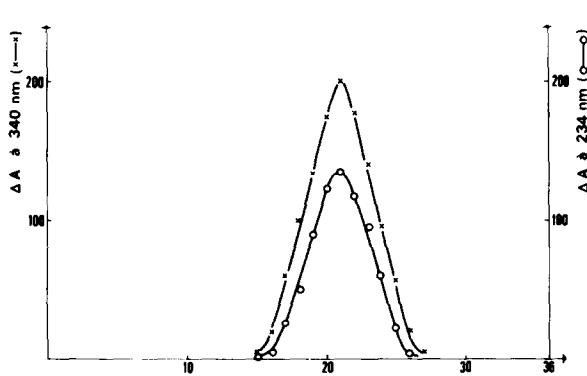


Fig. 4. Localisation des deux activités après centrifugation sur gradient de saccharose. L'extrait enzymatique provient de la lyophilisation de la zone active recueillie après Séphadex G 100.

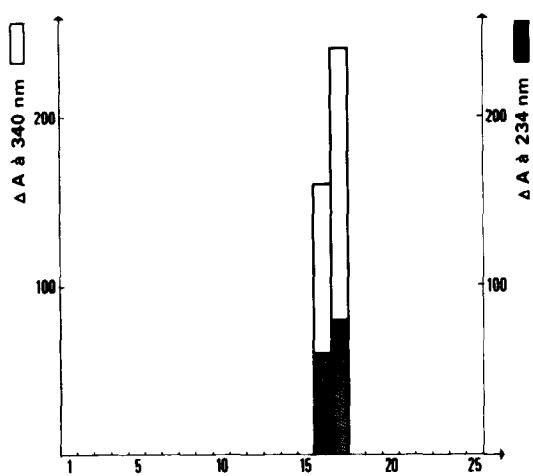


Fig. 5. Localisation des deux activités après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'extrait enzymatique correspond à un éluat actif obtenu après hydroxylapatite, concentré par lyophilisation et amené à 10% en saccharose.

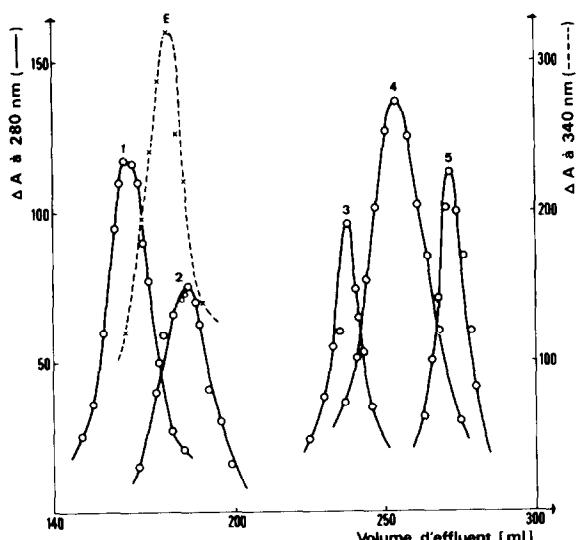


Fig. 6. Diagramme d'élution des protéines étalons et de l'association enzymatique du Chêne sur colonne de Séphadex G 100. (1) Albumine 67.000, (2) ovalbumine 45.000, (3) chymotrypsinogène 25.000, (4) myoglobine 17.800, (5) cytochrome 12.400, (E) association enzymatique. Le PM de E a été apprécié sur une courbe étalon tracée à partir des données du diagramme.

entre le comportement de la 5-deshydroquinate hydro-lyase et celui de la shikimate:NADP oxydoréductase (figs. 1-5). Ces résultats rendent probable l'association des deux activités au sein d'une même structure protéique. On ne peut cependant savoir s'il s'agit d'une seule enzyme bifonctionnelle ou d'un complexe formé d'unités enzymatiques distinctes.

Le poids moléculaire de cette association déterminé par filtration sur gel serait d'environ 55.000 (fig. 6). Cette valeur reste proche de celles obtenues pour les deux enzymes de *Nicotiana tabacum* et pour la shikimate:NADP oxydoréductase de l'orge [10] mais diffère nettement de celle du système multienzymatique conduisant de l'étape 2 à l'étape 6 de la voie de l'acide shikimique chez *Neurospora crassa* qui est de 230.000.

S'agit-il chez le Chêne d'une association uniquement bifonctionnelle?

Les enzymes catalysant les étapes 1 et 2 ont été mises en évidence chez ce végétal [13] mais, par suite de leurs faibles activités, nous n'avons pu suivre leur comportement au cours de cette étude. Par ailleurs, les étapes 5 et 6 dont l'existence a été démontrée récemment chez le Haricot et le Pois [14] n'ont pas été recherchées. La faible valeur de PM obtenue pour l'association du Chêne ne suggère pas un caractère multifonctionnel comme chez *Neurospora crassa* mais ce type d'organisation pourrait exister *in vivo*, le complexe pouvant subir une dissociation en certains de ses composants au cours des opérations d'extraction et de purification.

En dehors des travaux nécessaires à la connaissance de la structure et des modalités de régulation d'un tel système, le nombre d'activités qui y sont réellement engagées reste donc à préciser.

Ce premier indice de l'existence de complexes multienzymatiques chez les Végétaux supérieurs laisse prévoir une plus grande généralité du phénomène; son intervention dans la voie de l'acide shikimique apporte un élément nouveau dans la compréhension du métabolisme alicyclique chez les plantes et en particulier dans les interrelations entre acides quinique et shikimique.

Remerciements

Je tiens à remercier vivement Monsieur Antoine

Carrasco pour son excellente collaboration technique et Monsieur Raoul Ranjeva pour ses suggestions.

Références

- [1] L.J. Reed et D.J. Cox, *Ann. Rev. Biochem.* 35 (1966) 57.
- [2] A. Ginsburg et E.R. Stadtman, *Ann. Rev. Biochem.* 39 (1970) 429.
- [3] N.H. Giles, M.E. Case, C.W.H. Partridge et S.I. Ahmed, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58 (1967) 1453.
- [4] S.I. Ahmed et N.H. Giles, *J. Bacteriol.* 99 (1969) 231.
- [5] M.B. Berlyn et N.H. Giles, *J. Bacteriol.* 99 (1969) 222.
- [6] A. Oaks et R.G.S. Bidwell, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21 (1970) 43.
- [7] M.B. Berlyn, S.I. Ahmed et N.H. Giles, *J. Bacteriol.* 104 (1970) 768.
- [8] R. Grewe et H. Haendler, *Biochem. Prep.* II (1966) 21.
- [9] D. Balinsky et D.D. Davies, *Biochem. J.* 80 (1961) 300.
- [10] J. Udvardy et G.L. Farkas, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 3 (1968) 153.
- [11] B.D. Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 406.
- [12] E. Gero et A. Candido, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) 194.
- [13] A. Boudet, Résultat non publié.
- [14] S.I. Ahmed et T. Swain, *Phytochemistry* 9 (1970) 2287.