

L'activité *in vivo* de l'aspartate kinase

Étude par suivi isotopique (^{15}N)

Fabiola Anzala, Marie-Christine Morère-Le Paven et Anis M. Limami

Résumé L'aspartate kinase (AK) est une enzyme qui catalyse la phosphorylation de l'aspartate en aspartyl phosphaste, première réaction de la voie de synthèse des acides aminés essentiels (méthionine, thréonine et lysine). Il en existe deux formes : l'aspartate kinase monofonctionnelle (AK) et l'aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase bifonctionnelle (AK-H). La forme bifonctionnelle a la particularité de court-circuiter la voie de synthèse de la lysine en faveur de celle de la méthionine et de la thréonine. Chez le maïs (*Zea mays*), une étude génétique révèle que les AK pourraient être impliquées dans le contrôle de la vitesse de germination de deux lignées. Afin de vérifier cette hypothèse au niveau enzymatique, une étude de suivi isotopique est menée au cours de la germination des deux lignées. La dégradation de l'Asp- ^{15}N fourni est analysée en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS/HRSIM) pour étudier l'activité *in vivo* des formes AK/AKH.

Mots-clés Aspartate kinase (AK), aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase (AKH), maïs, traçage isotopique.

Abstract *In vivo* aspartate kinase activity: study by ^{15}N labelling
Aspartate kinase (AK) is the first enzyme of aspartate pathway that produces essential amino acids and the precursors of ethylene. The AK catalyses the phosphorylation of aspartate in aspartyl phosphate. There are two forms of aspartate: the aspartate kinase monofunctional (AK) and the aspartate-kinase-homoserine-dehydrogenase bifunctional (AKH). The bifunctional form has the characteristic to shunt the lysine synthesis branch on behalf of threonine and methionine synthesis branch. A genetic study on corn reveals that AK could be implied in the control of germination efficiency. In order to check this assumption, a labelling method was undertaken during the germination of two lines. This analysis allows to study the *in vivo* aspartate kinase activity by followed ^{15}N . The results showed that the ways of aspartate implemented during germination are different according to the lines and that the activity of the AK/AKH would thus be implied in the control of the germination speed.

Keywords Aspartate kinase (AK), aspartate-kinase-homoserine-dehydrogenase (AKH), corn, isotopic tracer.

Les éléments chimiques existent dans la nature sous plusieurs formes, les isotopes, qui ne diffèrent que par leur nombre de neutrons et donc par leur masse atomique. Il est possible de déterminer la proportion isotopique de chaque atome dans un compartiment (exemple : $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$; l'abondance du ^{13}C dans la matière organique étant en moyenne de 1,1%). L'évolution de ce rapport en fonction des événements peut être utilisée pour identifier les processus biophysico-chimiques (par exemple pour évaluer le transfert du carbone entre la biosphère, l'atmosphère, l'océan et les sédiments). La différence de masse due à la composition isotopique des molécules est exploitée grâce à la puissance et à la précision de mesure offerte par le couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC-MS). Dans le domaine de l'archéologie, l'utilisation des propriétés isotopiques à travers la datation au carbone ^{14}C est bien connue. Cependant, des exemples d'utilisation de composés enrichis en isotope stable dans un système biologique pour en comprendre les mécanismes biochimiques sont moins connus du grand public.

L'étude présentée ici illustre l'utilisation des isotopes stables dans le domaine de la biochimie, mais est aussi un exemple original d'étude enzymatique. L'activité d'une enzyme⁽¹⁾ est régie par l'ensemble des éléments de son environnement

cellulaire : pH, tampon, température, co-facteur, inhibiteur, allostérie. De nombreuses études portant sur l'activité enzymatique sont réalisées *in vitro*. En effet de manière générale, l'activité d'une enzyme est étudiée en dosant l'apparition ou la disparition d'un des produits de la réaction qu'elle catalyse. Dans ces conditions, il est très difficile de reproduire l'environnement cellulaire, ce qui limite l'interprétation entre les résultats obtenus et la réalité métabolique *in vivo*. Il est possible de s'affranchir de ce problème entre capacité enzymatique *in vitro* et activité réelle *in vivo* en passant par une technique de traçage isotopique. Grâce à cette technique, la voie de l'aspartate, qui correspond à l'ensemble des réactions de biosynthèse des acides aminés essentiels (lysine, méthionine, thréonine et isoleucine) à partir de l'aspartate, a pu être analysée. L'étude est basée sur l'enzyme clé de cette voie, l'aspartate kinase (AK), qui régulerait le flux de production des acides aminés essentiels chez les végétaux. Nous avons montré l'implication de la voie de l'aspartate dans le contrôle de la germination⁽²⁾ et la croissance post-germinative [1].

La problématique est de mettre en évidence une différence, au niveau de la voie de l'aspartate, entre deux lignées de maïs qui germent à des vitesses différentes. Doser les produits de la réaction ne nous aurait pas permis de conclure, les acides aminés pouvant en effet provenir d'une synthèse

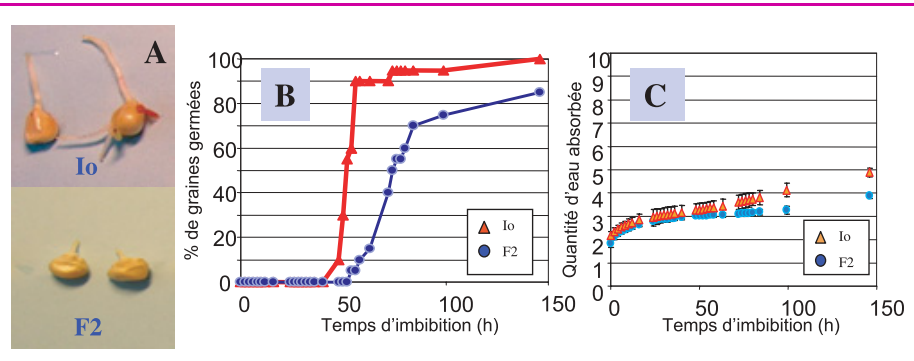


Figure 1 - Germination des lignées Io et F2. Les grains de maïs ont été mis à germer à 20 °C dans des boîtes de Petri contenant 5 mL d'eau stérile. A : photo de Io et F2 après 72 h d'imbibition ; B : courbes de germination. Le pourcentage de grains germés a été relevé à des heures régulières ; C : courbes d'imbibition. Le poids frais des grains a été mesuré toutes les 3 h dans les premières phases de la germination. La quantité d'eau absorbée présentée correspond au poids frais moins le poids sec des graines. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions de lots de 30 graines.

issue de l'aspartate, mais aussi des réserves ou de la dégradation des protéines. Le suivi isotopique permet de différencier les acides aminés nouvellement synthétisés à partir de l'aspartate fourni, marqué au ¹⁵N, des acides aminés existant dans la semence avant la reprise du métabolisme ou dérivant de la dégradation des protéines de réserves. L'originalité de ce travail sur l'utilisation du suivi isotopique pour mettre en évidence un métabolisme particulier chez deux lignées de maïs est détaillée dans cet article.

L'aspartate kinase : un candidat pour la modulation de la vitesse de germination du maïs

Une courbe de germination et une courbe d'imbibition ont été réalisées en fonction du temps pour deux lignées de maïs Io et F2 (figure 1) ; la première correspond au pourcentage de grains germés et la seconde représente la prise d'eau. L'analyse des courbes révèle que la lignée Io germe plus vite que la lignée F2 et que cette différence n'est pas liée à une différence d'absorption d'eau. Le T50, qui correspond au temps nécessaire pour la germination de 50 % des graines, est de 52 h pour Io et 74 h pour F2. De plus, l'absorption d'eau est similaire chez les deux lignées lors de la phase de la germination au sens strict. Afin de connaître les bases moléculaires qui expliquent cette différence de germination, une étude génétique récente s'est portée, entre autres, sur la mise en évidence de zones du génome impliquées dans le contrôle du caractère « vitesse de germination » [2]. L'analyse de ces travaux a révélé que deux QTL⁽³⁾ du caractère « vitesse de germination » coïncident avec des gènes codant pour deux formes d'aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase (AKH1 et AKH2) et une forme d'aspartate kinase (AK2), enzymes de la voie de l'aspartate.

L'enzyme aspartate kinase (AK) a été retenue comme candidat pour deux raisons :

- Trois gènes qui codent pour l'enzyme AK sont localisés dans des zones du génome identifiées comme étant impliquées dans le contrôle du caractère vitesse de germination.
- On sait que la germination est un processus complexe de mobilisation des réserves, de remaniement et de biosynthèse des acides aminés. L'AK intervient à ce niveau car c'est l'enzyme clé du métabolisme des acides aminés essentiels.

La voie de l'aspartate : voie de biosynthèse des acides aminés essentiels

Chez les végétaux et les bactéries, la voie de l'aspartate permet la synthèse d'acides aminés essentiels : méthionine, lysine, thréonine et isoleucine, mais aussi du S-adenosylméthionine, précurseur de l'éthylène, hormone de croissance (figure 2). La première enzyme de cette voie, l'aspartate-kinase, est une phosphotransférase avec un groupe carboxyle comme accepteur. Elle catalyse la réaction de synthèse de l'aspartyl phosphate à partir d'aspartate. Il existe deux formes d'aspartate kinase (AK) dont les gènes sont cartographiés sur le chromosome 7S pour la forme AK1 et sur le chromosome 2L pour la forme AK2. Elles se distinguent par leur régulation ; AK1 est rétroinhibée par la lysine, et AK2 par la lysine et S-adenosylméthionine [3-4]. La deuxième enzyme de cette voie est l'aspartate β-semi-aldéhyde déshydrogénase (ASADH) [5]. La troisième est l'homosérine déshydrogénase, une oxydoréductase qui agit sur un groupe CH-OH donneur d'électrons avec NAD(P)⁺ comme accepteur. Elle catalyse la réaction de synthèse de l'homosérine à partir d'aspartate semi-aldéhyde. Chez les plantes, l'existence d'une enzyme bifonctionnelle, l'aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase (AKH), a été mise en évidence chez le pois [6], puis confirmée chez le maïs [4]. Les AKH font partie d'une famille de gènes possédant un domaine ayant une activité aspartate kinase en 5' et un domaine homosérine déshydrogénase en 3' [7]. Les gènes codant pour les différentes formes d'AKH ont été cartographiés chez le maïs sur le chromosome 4L pour la forme 1 et sur le chromosome 2L pour la forme 2.

Au niveau du métabolisme des acides aminés, l'existence des deux formes, monofonctionnelle et bifonctionnelle, est très importante. L'enzyme monofonctionnelle permet de former un intermédiaire, l'aspartate semi-aldéhyde, indispensable à la formation de la lysine, alors que l'enzyme

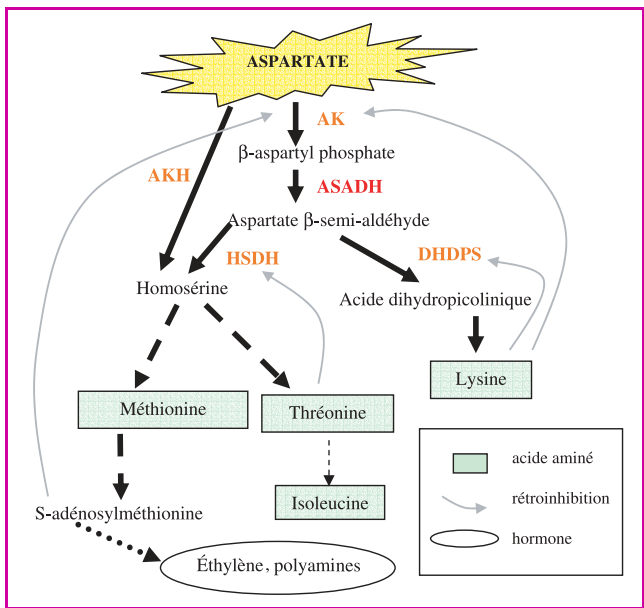


Figure 2 - Diagramme simplifié de la biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate (d'après [7-8]). AK : aspartate kinase ; AKH : aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase ; ASADH : aspartate β-semi-aldéhyde déshydrogénase ; DHDPS : dihydropicolinate synthase ; HSDH : homosérine-déshydrogénase.

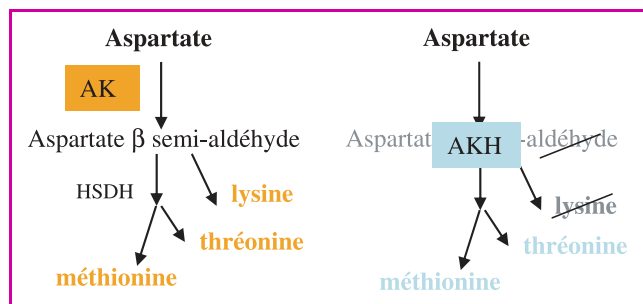


Figure 3 - Diagramme simplifié de la biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate en fonction de la forme d'aspartate kinase active.

AK : forme monofonctionnelle ; AKH : forme bifonctionnelle.

bifonctionnelle court-circuite cette voie au profit de la formation de méthionine, thréonine et isoleucine (figure 3).

L'expression des différentes formes d'AK peut être modulée en fonction des besoins de la cellule, de l'organisme, ou encore des conditions environnementales.

La voie de l'aspartate :

- produit des acides aminés essentiels (lysine, méthionine, thréonine, isoleucine), indispensables à la construction des protéines ;
- est sensible à l'état de la cellule et aux conditions extérieures, grâce aux régulations enzymatiques ;
- produit la lysine, qui en excès inhibe la croissance ;
- produit la méthionine, qui est un précurseur de l'éthylène (hormone de croissance végétale) et des polyamines.

Métabolisme de l'aspartate par suivi isotopique ^{15}N

L'azote 15 est un isotope énergétiquement stable qui n'émet aucune radioactivité. Il est utilisé pour marquer certains composés azotés comme les acides aminés afin de mettre en évidence le cheminement du groupement amine dans les différents métabolites.

Dans cette étude, l'aspartate marqué ^{15}N (99 % atome en excès) est utilisé afin de suivre sa dégradation en ses différents acides aminés dérivés (lysine, méthionine, thréonine) (figure 4).

Les grains de maïs sont mis à germer sur une solution d'Asp- ^{15}N pendant 24 ou 48 h. Les acides aminés sont extraits des embryons par une méthode hydroalcoolique permettant de récupérer tous les composés solubles dans l'eau ou dans l'éthanol. L'extrait est purifié par l'action du chloroforme et le passage sur une colonne Dowex 50WX8⁽⁴⁾. Les acides aminés sont ensuite dérivés par N-(ter-butyl-diméthylsilyl)-N-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) et dosés en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS)⁽⁵⁾. La spectrométrie de masse permet d'évaluer le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans les acides aminés séparés par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats obtenus montrent que l'Asp- ^{15}N est intégré dans le métabolisme (figure 5). Le pourcentage d'aspartate marqué augmente au cours du temps chez les deux lignées (8 à 40 % chez Io et 6 à 37 % chez F2). Le profil de la thréonine est sensiblement identique à celui de l'Asp- ^{15}N : on observe une augmentation du pourcentage de Thr- ^{15}N chez les deux lignées, bien que l'augmentation soit moins marquée chez F2 (9 à 35 % chez Io et 4 à 15 % chez F2). Le pourcentage de

Met- ^{15}N diminue chez Io (19 à 1 %) alors qu'elle est totalement absente chez F2. Le résultat inverse est observé pour la lysine : en effet, elle augmente dans le deuxième temps de marquage chez F2 (1 à 20 %) et est totalement absente chez Io.

Chemin spécifique pour chaque lignée :

Le suivi isotopique montre que l'aspartate est dégradé différemment en fonction des lignées. En effet, il est dégradé en méthionine et thréonine chez la lignée Io, alors qu'il est dégradé en lysine et thréonine chez la lignée F2.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le marquage isotopique issu de l'aspartate- ^{15}N fourni se retrouve dans les molécules de méthionine et de thréonine chez la lignée Io et dans les molécules de lysine et de thréonine chez la lignée F2 après 72 h de germination. Ces résultats ont permis de proposer un schéma sur le fonctionnement du métabolisme

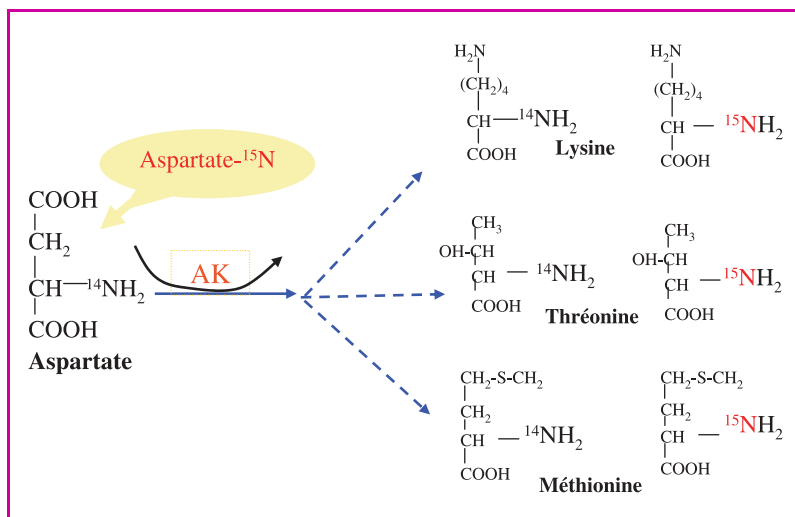


Figure 4 - Principe du marquage isotopique.

L'aspartate- ^{15}N est fourni en excès. Le suivi de l'évolution du rapport $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, à travers les acides aminés, donne une indication sur l'activité de l'aspartate kinase et sur le devenir du groupement amine de l'aspartate dans les différents métabolites.

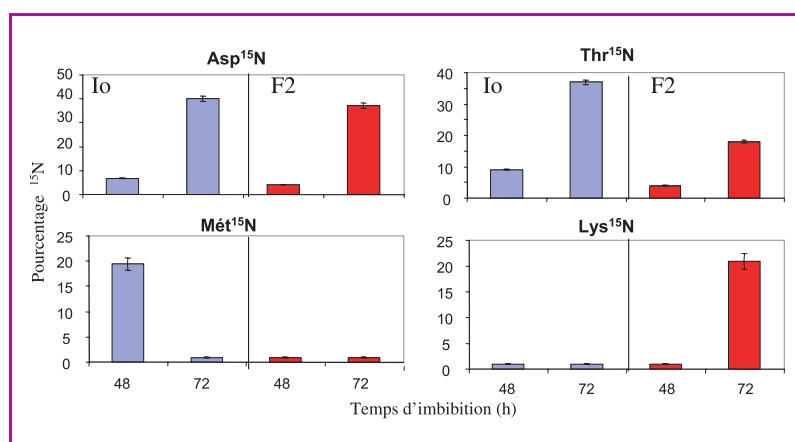


Figure 5 - Pourcentage de ^{15}N dans les acides aminés de la voie de l'aspartate.

Les graines ont été imbibées 24 h avec de l'eau stérile puis ont été transférées sur un milieu contenant de l'Asp- ^{15}N pendant 24 et 48 h. Le dosage du marquage isotopique est réalisé à 24 h (48 h d'imbibition) et 48 h (72 h d'imbibition) par une GC-MS. Les données du graphique représentent la quantité de l'acide aminé marqué au ^{15}N par rapport à la quantité totale de cet acide aminé.

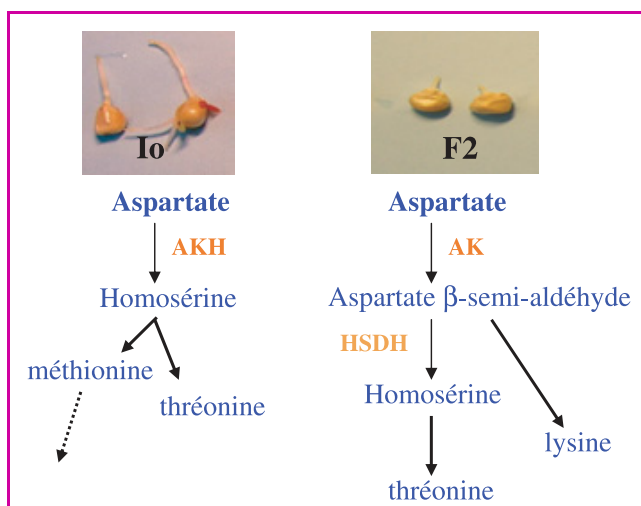


Figure 6 - Schéma du métabolisme de la voie de l'aspartate chez Io et F2 au cours de la germination.

L'aspartate est dégradé en méthionine et thréonine chez Io, et en lysine et thréonine chez F2. AK : aspartate kinase monofonctionnelle ; AKH : aspartate kinase bifonctionnelle ; HSDH : homosérine déshydrogénase.

de l'aspartate au cours des premières heures de la germination chez les deux lignées (figure 6).

En perspective de ce travail, il est possible d'envisager le suivi du métabolisme de ces deux lignées au cours du développement de la semence à la plante adulte afin de construire un modèle du métabolisme général permettant à une lignée de croître plus vite qu'une autre.

Remerciements

L'acquisition des données en GC-MS a été réalisée au sein du Service commun d'analyses spectroscopiques (SCAS) de l'Université d'Angers. Les auteurs remercient David Rondeau (ingénieur de recherche) et Sylvie Fournier (doctorante) pour leur accueil et leur collaboration.

Notes et références

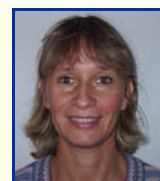
- (1) Enzyme : protéine accélérant une réaction chimique, autrement dit biocatalyseur. Les enzymes sont synthétisées à partir des informations codées dans l'ADN.
- (2) Germination : reprise du métabolisme et du développement après que les semences aient été imbibées. La germination correspond au passage de la semence à la plantule.

- (3) QTL (« quantitative trait loci ») : zone du génome contrôlant la valeur numérique d'un caractère (par exemple, la taille d'une feuille). La localisation de cette zone est réalisée grâce à une analyse statistique entre les variations du génome et la variation numérique du caractère dans une population.
- (4) 200-400 mesh, H-form resin ; Supelco, Bellefonte, PA, États-Unis.
- (5) JMS 700 Jeol, Japon, équipé d'une colonne (30 m*0,25 mm*0,25 µm) à 70 eV.
- [1] Anzala F., Morère-Le Paven M.-C., Fournier S., Rondeau D., Limami A.M., Physiological and molecular aspects of aspartate-derived amino acid metabolism during germination and postgermination growth in two maize genotypes differing in germination efficiency, *Journ. of Experimental Botany*, **2006**, *57*, p. 645.
- [2] Limami A.M., Rouillon C., Glevarec G., Gallais A., Hirel B., Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase, *Plant Physiol.*, **2002**, *130*, p. 1860.
- [3] Azevedo R., Blackwell R., Smith R., Lea P., Three aspartate kinase isoenzymes from maize, *Phytochemistry*, **1992**, *31*, p. 3725.
- [4] Azevedo R.A., Smith R.J., Lea P.J., Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase, *Phytochemistry*, **1992**, *31*, p. 3731.
- [5] Weil J.H., *Biochimie générale*, Dunod, Paris, **2001**.
- [6] Aarnes H., Rognes S., Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*, *Phytochemistry*, **1974**, *13*, p. 2717.
- [7] Muehlbauer G.J., Somers D.A., Matthews B.F., Gengenbach B.G., Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family, *Plant Physiol.*, **1994**, *106*, p. 1303.
- [8] Galili G., Regulation of lysine and threonine synthesis, *Plant Cell*, **1995**, *7*, p. 899.



F. Anzala

Fabiola Anzala¹ est docteur en biologie, **Marie-Christine Morère-Le Paven**² est maître de conférence et **Anis M. Limami**³ est professeur à l'Université d'Angers*.



M.-C. Morère-Le Paven



A.M. Limami

* UMR 1191 « Physiologie moléculaire des semences », Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01.

Fax : 02 41 73 53 52.

¹ Tél. : 02 41 73 54 58.

Courriel : anzalafabiola@hotmail.com

² Tél. : 02 41 73 54 58.

Courriel : lepaven@univ-angers.fr

³ Tél. : 02 41 73 54 46.

Courriel : anis.limami@univ-angers.fr

« Comment ça marche ? »

Agroalimentaire, carburants, colles, cosmétiques, matériaux, peintures, pharmacie, produits d'entretien...

La rubrique de **L'Actualité Chimique** qui répond à vos questions sur la chimie de votre quotidien.

Proposez-nous vos sujets, vos projets d'articles...

Coordinatrice de la rubrique : Véronique Nardello-Rataj (Université de Lille)

Courriel : veronique.rataj@univ-lille1.fr - Tél./fax : 03 20 33 63 69.

