

BBA 65784

ISOLEMENT, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES
DES PEROXYDASES DE NAVETGILBERT MAZZA, CLAUDETTE CHARLES, MIREILLE BOUCHET, JACQUES RICARD
ET JACQUES RAYNAUD*Laboratoire de Physiologie cellulaire végétale, associé au C.N.R.S., Faculté des Sciences, Saint-Jérôme,
Marseille (France)*

(Reçu le 22 avril, 1968)

SUMMARY

Isolation, purification and physicochemical properties of turnip peroxidases

Five peroxidases were isolated and obtained in a highly purified form from turnip roots (*Brassica napus* L. variety Blanc dur d'hiver). Three of these peroxidases are anodic at pH 6.8 and two are cathodic at this pH. All possess protohematin IX as their prosthetic group.

The isoelectric points, molecular weights, sedimentation constants and absorption spectra of these peroxidases were determined. In contrast to horseradish peroxidases, which possess very similar spectral characteristics, the wavelength and amplitude of the absorption peaks of the turnip peroxidases vary according to the nature of these hemoproteins.

One of the purified peroxidases, the most basic, shows analogies with the hemoprotein "566" discovered by HAGIHARA, SHIN AND NAKAMURA in wheat germ. It possesses some of the characteristics of a *b*-type cytochrome.

INTRODUCTION

Depuis l'isolement par THEORELL¹, dans les racines de Raifort, de deux peroxydases, divers chercheurs ont pu détecter dans des homogénats de tissus végétaux variés des formes multiples de peroxydases, différent par certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques^{2-14,21}. Nous nous proposons, dans le présent travail, d'isoler, de purifier les peroxydases de la racine de Navet (*Brassica napus* L. variété Blanc dur d'hiver) et de définir certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques.

METHODES D'ÉTUDE

Les électrophorèses de zone sont réalisées dans une cuve "Universelle" de Kohn (Shandon) à l'aide d'une alimentation régulée Vernon. Le support utilisé est un film d'acétate de cellulose de type "Cellogel" fourni par Chemetron. La taille des bandes est de 2.5 cm × 12 cm. Les électrophorèses durent 90 min à 4° sous une intensité de

2 mA dans un tampon phosphate d'ammonium 0.05 M (pH 6.8). Les peroxydases sont révélées soit par coloration au noir amido¹⁵ (Kuhlmann R.A.L.) soit en détectant l'activité peroxydase selon une méthode dérivée de JERMYN ET THOMAS⁹ et de VAN DUIJN¹⁶. On plonge les bandes d'électrophorèse dans une solution de benzidine à 400 mg/l, additionnée de 5 ml d' H_2O_2 1 M et amenée à pH 5 par NaOH 1 M, puis dans une solution de chlorure d'ammonium à 5%. L'intensité des bandes d'absorption est déterminée avec un photomètre enregistreur et intégrateur Vernon. Les spectres d'absorption de la peroxydase sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Spectronic 505 Bausch et Lomb. Les coefficients d'extinction moléculaire ont été déterminés par obtention d'un pyridine hémochromogène selon la méthode de KEILIN ET HARTREE¹⁷.

Les masses moléculaires sont évaluées par tamisage sur Sephadex G-100^{18,19}. L'équilibration est réalisée avec du tampon acétate de sodium 0.1 M, NaCl 0.4 M amené à pH 6 par de l'acide acétique. La colonne (1.1 cm × 170 cm) est étalonnée avec des protéines de masse moléculaire et de rayon de Stokes connus. Toutes ces opérations sont réalisées à 4°. Les constantes de sédimentation ont été déterminées à l'aide d'une centrifugeuse analytique Spinco modèle E* à la température de 20°. La centrifugeuse est équipée d'un télétachymètre digital permettant de contrôler la vitesse choisie (59 780 tours/min) à un tour près. Le pH du solvant est fixé à une valeur voisine de celle des points isoélectriques des diverses peroxydases (tampon citrate-phosphate 0.1 M (pH 4.8), tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH 6.8), tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH 8)). Les techniques de chromatographie utilisées sont décrites dans le paragraphe suivant.

RÉSULTATS

Isolation et purification des diverses peroxydases

L'électrophorèse de zone d'un extrait brut de racines de Navet met en évidence sept peroxydases (Fig. 1A). Quatre sont anodiques à pH 6.8, trois sont cathodiques à ce pH. Nous désignons par P_1 , P_2 P_7 ces sept peroxydases. Les composants P_4 et P_5 ne sont présents qu'à l'état de traces.

Les racines de Navet (240 kg) sont broyées à la température du laboratoire à l'aide d'un pressoir (Speichim Pressoir Colin). Les peroxydases, dans leur ensemble et contrairement à la plupart des protéines, restent fixées sur la "pulpe". Celle-ci est seule recueillie, mise en contact 18 h, à 4° avec du NaCl 2 M dans un tampon phosphaté d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). La pulpe est ensuite pressée. Le liquide obtenu est centrifugé puis porté à 80% de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité est recueilli, remis en suspension dans 2.4 l de tampon phosphate d'ammonium (pH 6.8). La suspension est dialysée contre le même tampon pendant 48 h, puis centrifugée. Elle est ensuite saturée, successivement à 50 et 90%, par du sulfate d'ammonium. Le premier précipité est éliminé. Le second est remis en suspension dans 0.24 l de tampon phosphate d'ammonium (pH 6.8). Cette suspension est dialysée 48 h contre le même tampon. Toutes les opérations décrites plus haut sont réalisées à 4°. On obtient

* Cette opération a été réalisée au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Marseille.

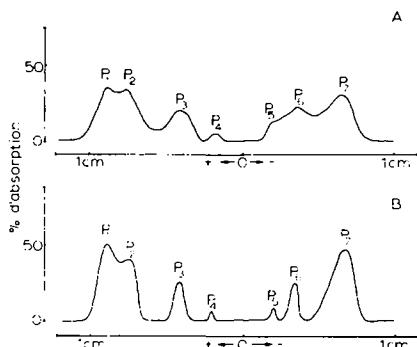


Fig. 1. Profils d'électrophorèse d'un extrait de racines de Navet. A. Profil d'électrophorèse obtenu à partir d'un homogénat de tissus (temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0.05 M (pH 6.8)). B. Profil d'électrophorèse obtenu à partir de l'extrait E (temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0.05 M (pH 6.8)).

ainsi l'extrait E. Il renferme (Fig. 1B) les sept peroxydases présentes dans un homogénat de racines.

L'extrait E est chromatographié sur une colonne de CM-Sephadex C-50 équilibrée avec le tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). A l'élution (Fig. 2A) on obtient deux pics, le premier correspond aux peroxydases P_1 , P_2 , P_3 , le second à la peroxydase P_6 et à des traces de P_5 (Fig. 2A). Le composant P_4 ne peut plus être décelé

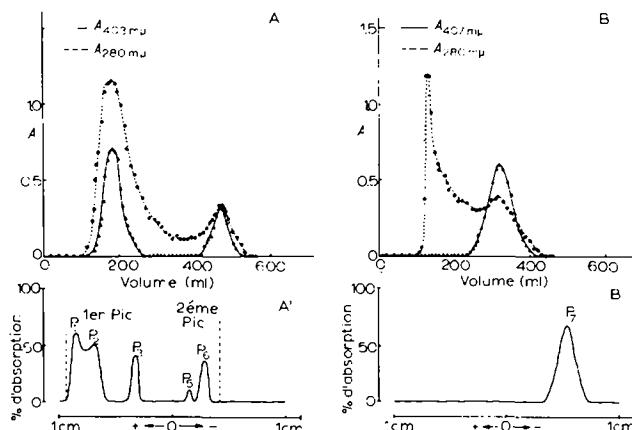


Fig. 2. Chromatographie sur CM-Sephadex C-50 des peroxydases de l'extrait E. A. On a déposé sur le sommet de la colonne 40 ml de l'extrait renfermant 22 mg de protéines par ml. La colonne (4 cm \times 48 cm) est équilibrée avec un tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). L'élution est conduite avec le même tampon. Le volume de chaque fraction est de 5 ml, la vitesse d'écoulement de 18 ml/h. A'. Electrophorèse de fractions, provenant des deux pics de la chromatographie précédente (temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0.05 M (pH 6.8)). B. On a déposé sur le sommet de la colonne, l'échangeur ayant fixé la peroxydase P_7 (sommet de la colonne correspondant à la chromatographie précédente). La colonne (2.5 cm \times 25 cm) est équilibrée avec le tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). L'élution est conduite avec un tampon phosphate d'ammonium 0.33 M (pH 6.8). Le volume de chaque fraction est de 5 ml. La vitesse d'écoulement est de 12.5 ml/h. B'. Electrophorèse de la peroxydase P_7 (pic de la chromatographie précédente, temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0.05 M (pH 6.8)).

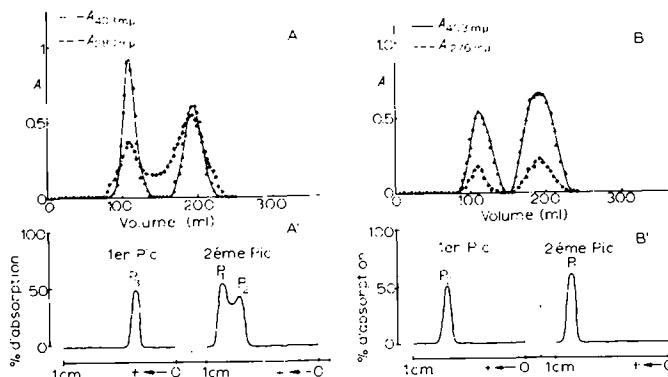


Fig. 3. Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 des peroxydases P_1 , P_2 , P_3 . A. On a déposé sur la colonne de DEAE-Sephadex A-50 10 ml du mélange des trois peroxydases (15 mg de protéines par ml). La colonne (2,5 cm \times 25 cm) est équilibrée avec un tampon citrate phosphate 0,04 M (pH 6,0). L'éluion est conduite avec le même tampon. Le volume de chaque fraction est de 5 ml. La vitesse d'écoulement est de 12,5 ml/h. A'. Electrophorèse de fractions provenant des deux pics de la chromatographie précédente (temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0,05 M (pH 6,8)). B. On a déposé sur la colonne de DEAE-Sephadex A-50 10 ml du mélange des peroxydases P_1 et P_2 (7 mg de protéines par ml). La colonne (2 cm \times 20 cm) est équilibrée avec un tampon citrate phosphate 0,01 M (pH 6,0). L'éluion est conduite avec le même tampon. Le volume de chaque fraction est de 5 ml. La vitesse d'écoulement est de 12,5 ml/h. B'. Electrophorèse des peroxydases P_1 et P_2 (pics de la chromatographie précédente, temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0,05 M (pH 6,8)).

dans aucune fraction. La peroxydase P_7 reste fixée au sommet de la colonne. On recueille le sommet de la colonne d'échangeur d'ions, sur lequel est retenue P_7 , et on le transfère sur une autre colonne de CM-Sephadex C-50 équilibrée avec le même tampon phosphate d'ammonium 0,1 M (pH 6,8). L'éluion est conduite avec du phosphate d'ammonium 0,33 M. On obtient ainsi en solution la peroxydase P_7 (Fig. 2B). La

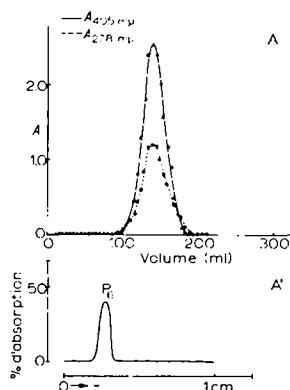


Fig. 4. Chromatographie sur CM-Sephadex C-50 de la peroxydase P_6 . A. On a déposé sur la colonne de CM-Sephadex C-50 6 ml d'un mélange des peroxydases P_5 et P_6 (3 mg de protéines par ml). La colonne (2,5 cm \times 35 cm) est équilibrée avec un tampon citrate-phosphate 0,08 M (pH 5,6). Le volume de chaque fraction est de 5 ml, la vitesse d'écoulement est de 12,5 ml/h. A'. Electrophorèse de la peroxydase P_6 (pic de la chromatographie précédente) temps d'électrophorèse 90 min, tampon phosphate d'ammonium 0,05 M (pH 6,8).

solution contenant les composants P_1 , P_2 , P_3 est dialysée contre un tampon citrate-phosphate 0.04 M (pH 6.0). Elle est ensuite chromatographiée sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50, équilibrée avec le même tampon. A l'élution on obtient deux pics (Fig. 3A). Le premier correspond uniquement au composant P_3 , le second aux composants P_2 et P_3 . Le mélange des peroxydases P_1 et P_2 est dialysé contre un tampon citrate-phosphate 0.01 M (pH 6.0) puis chromatographié sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 équilibrée avec le même tampon. On sépare ainsi les deux peroxydases (Fig. 3B). Le mélange des peroxydases P_5 et P_6 est dialysé contre un tampon citrate-phosphate 0.08 M (pH 5.6), puis chromatographié sur une colonne de CM-Sephadex C-50 équilibrée avec ce même tampon. On obtient ainsi, dans un état de pureté satisfaisant, le composé P_6 (Fig. 4). La peroxydase P_5 , présente au début de la chromatographie à l'état de traces, ne peut plus être décelée dans aucune fraction. Les peroxydases P_3 , P_6 , P_7 sont ensuite purifiées à nouveau par tamisage moléculaire sur Sephadex G-100 (Fig. 5). L'ensemble des opérations de chromatographie et de tamisage moléculaire est représenté dans le Tableau I.

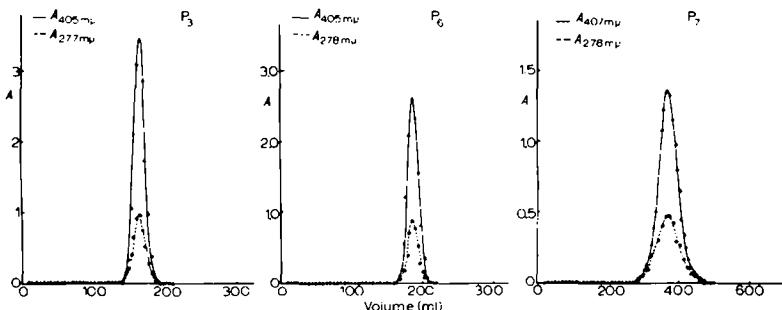


Fig. 5. Purification, par tamisage moléculaire sur Sephadex G-100, des peroxydases P_3 , P_6 , P_7 . On a déposé sur les colonnes: 12 ml d'une solution à 1 mg de protéines par ml (peroxydase P_3), ou: 15 ml d'une solution à 1.2 mg de protéines par ml (peroxydase P_6), ou: 20 ml d'une solution à 2 mg de protéines par ml (peroxydase P_7), dans un tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). Les colonnes (2.5 cm \times 83 cm) sont équilibrées avec un tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). Le volume de chaque fraction est de 5 ml. La vitesse d'écoulement est de 12.5 ml/h.

Quelques propriétés physico-chimiques des peroxydases de Navet

Le tableau II représente quelques unes des caractéristiques des cinq peroxydases isolées et purifiées. Les valeurs des masses moléculaires portées dans ce tableau ont été déterminées par tamisage moléculaire. Compte tenu de la précision des mesures, elles sont en excellent accord avec celles calculées à partir de la teneur en hème et du poids sec (valeurs portées entre parenthèses). Ces dernières valeurs sont toujours supérieures à celles obtenues par filtration moléculaire. La raison de cette différence réside dans le fait que des traces de protéines contaminantes peuvent être présentes dans les préparations lyophilisées et surtout que celles-ci s'hydratent nécessairement. Une erreur systématique est ainsi introduite au moment de la pesée. Le bon accord entre les deux séries de mesures portées dans la colonne 4 du Tableau II indique toutefois que ces cinq hémoprotéines sont sensiblement pures. Celles-ci sont homogènes à l'ultracentrifugation analytique (Fig. 6). Les constantes de sédimentation ont été

TABLEAU I

SCHEMA GÉNÉRAL DE L'ISOLEMENT ET DE LA PURIFICATION DES PEROXYDASES PAR CHROMATOGRAPHIE

On a porté entre parenthèses les valeurs des RZ (Reinheitszahl) à pH 6.8, de la manière suivante: (1) dans le cas des mélanges de peroxydases, $RZ = A_{403} \text{ m}\mu / A_{280} \text{ m}\mu$; (2) dans le cas des peroxydases isolées, $RZ = A$ (au pic de Soret)/ A (au maximum d'absorption de la protéine).

Extrait E (o.30)							
	P_1	+	P_2	+	P_3	+	P_4
	↓		↓		↓		↓
CM-Sephadex C-50 o.1 M (pH 6.8)	P_1 ↓	:	P_2 (o.62)	+	P_3		P_4 + P_5 (1.01)
DEAE-Sephadex A-50 o.04 M (pH 6.0)	P_1 ↓ (1.09)	+	P_2		P_3 (2.5)		↓
DEAE-Sephadex A-50 o.01 M (pH 6.0)	P_1 ↓ (3.0)		P_2 (2.98)				↓
CM-Sephadex C-50 o.08 M (pH 5.6)							P_6 (2.12)
Sephadex G-100 o.1 M (pH 6.8)					P_3 (3.30)		P_6 (3.03) + P_7 (2.94)

TABLEAU II

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEROXYDASES DE NAVET

Vitesses de migration: déterminées dans le tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). Points isoélectriques des P_1 , P_2 et P_3 : dans le tampon citrate-phosphate 0.05 M; de P_6 : dans le tampon phosphate de sodium 0.05 M; de P_7 : dans le tampon carbonate-bicarbonate amené au pH désiré par la NaOH. Masses moléculaires: déterminées par tamisage moléculaire à + 2500; entre parenthèses valeurs déterminées par pesée. RZ: dans le tampon phosphate d'ammonium 0.1 M pH 6.8.

Peroxydases	Vitesses de migration (mm/h)	Points isoélectriques	Masses moléculaires	RZ	$s_{20,w} \times 10^{13}$	Quantités obtenues (mg) à partir de 240 kg de racines
P_1	-11.4	3.3	51 500 (55 000)	3.0	3.9	17
P_2	-9.3	3.5	51 500 (56 000)	2.98	3.9	12
P_3	-5.0	3.7	42 700 (45 000)	3.30	3.8	32
P_6	+2.7	8.1	42 200 (44 000)	3.03	(3.4)*	21
P_7	+8.0	11.6	33 700 (34 000)	2.94	3.8	53

* Constante $s_{20,w}$ déterminée à la concentration protéique de 0.3 mg/ml.

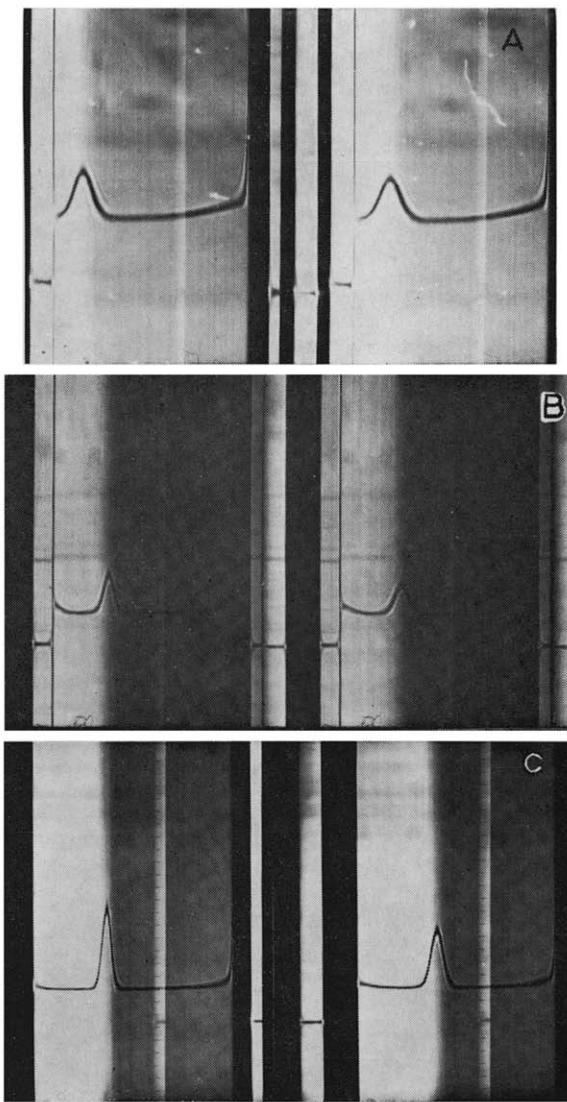


Fig. 6. Diagrammes d'ultra-centrifugation de peroxydases de Navet. A, peroxydase P_3 (5 mg/ml tampon acétate 0.1 M (pH 4.8)); B, peroxydase P_7 (5 mg/ml tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH 8)); C, mélange de peroxydases P_1 (2 mg/ml) et P_2 (2 mg/ml) (tampon acétate 0.1 M (pH 4.8)). La migration s'effectue de gauche à droite (vitesse de rotation 59 780 tours/min, angle de barre 70°, température 20°). L'identité des constantes de sédimentation et des masses moléculaires (déterminées par tamisage) des peroxydases P_1 et P_2 est confirmée par le fait qu'il n'est pas possible de distinguer les deux isozymes en cours de centrifugation.

déterminées dans un domaine de concentrations en protéines de 0.1 à 0.9 mg/ml. Pour quatre de ces peroxydases les valeurs des constantes de sédimentation ont été extrapolées à concentration nulle. Les valeurs $s_{20,w}^e$ sont portées dans le Tableau II. Les mobilités électrophorétiques des cinq peroxydases, obtenues en détectant, sur les films d'acétate de cellulose, la protéine par le noir amido, ou l'activité enzymatique

sont identiques. Les spectres d'absorption des cinq peroxydases sont représentés dans la Fig. 7. On peut noter de plus, que les spectres des pyridines hémochromogènes de tous ces composants sont identiques à celui de la protohématine IX. On devrait donc

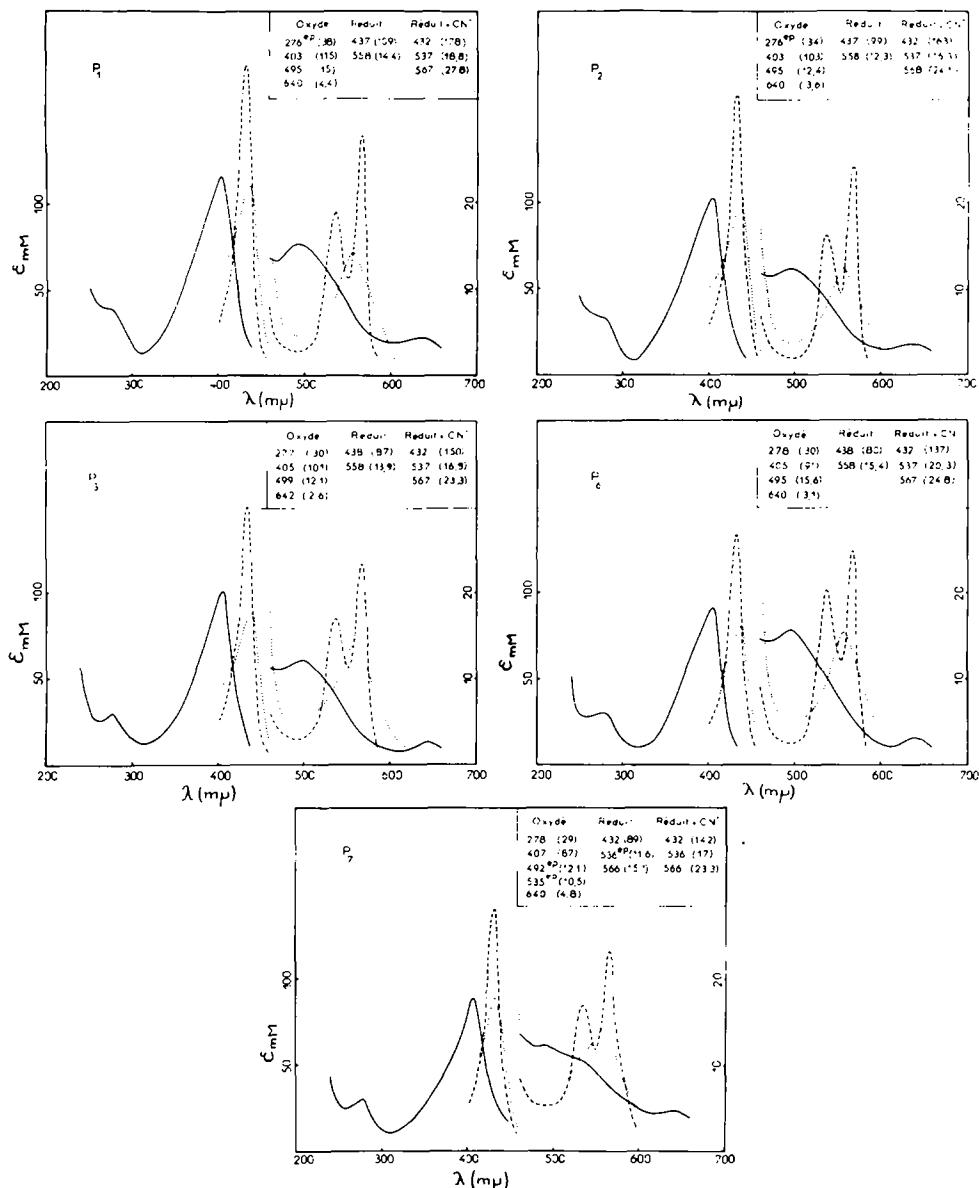


Fig. 7. Spectres d'absorption des diverses peroxydases. ---, hémoprotéine à l'état oxydé; - - - - , hémoprotéine à l'état réduit (par l'hydrosulfite de sodium); - - - - - , hémoprotéine à l'état réduit en présence de cyanure. Tous les spectres sont enregistrés dans un tampon phosphate d'ammonium 0.1 M (pH 6.8). Dans chaque tableau les valeurs entre parenthèses correspondent à l'extinction moléculaire à un pic d'absorption ou à un épaulement (ep).

pouvoir en conclure que toutes ces peroxydases possèdent la protohémateine IX comme groupement prosthétique.

DISCUSSION

Dans les racines de *Brassica rapa* Hosoya¹⁴ a purifié trois peroxydases. Il est possible de montrer des analogies étroites entre ces peroxydases et celles que nous avons isolées de *B. napus*. Ce qu'Hosoya appelle peroxydase A₁ chez *B. rapa* correspond probablement à un mélange de deux peroxydases assimilables aux deux peroxydases P₁ et P₂ de *B. napus*. Les peroxydases A₂ et D de *B. rapa* correspondent respectivement aux composants P₃ et P₆. Une peroxydase particulièrement intéressante est la peroxydase P₇. Elle présente des analogies avec un cytochrome de type b (pic à 566 m μ) et peut être considérée comme l'homologue de la peroxydase "566" de Blé^{7-10,20}. Alors que le cyanure produit un déplacement des bandes d'absorption des ferroperoxydases 1, 2, 3, 6, il exalte simplement les pics de la ferroperoxydase 7. HAGIHARA *et al.*⁷ ont observé un résultat analogue avec le peroxydase "566" de Blé, ils interprètent en admettant que le cyanure protège l'hémoprotéine réduite de l'autoxydation.

Alors que les sept peroxydases isolées par SHANNON, KAY ET LEW⁶ des racines de Raifort (*Armoracia rusticana*) possèdent des spectres identiques ou très voisins, des différences notables existent dans les spectres des cinq peroxydases isolées de *B. napus*. Les proportions respectives de ces peroxydases sont variables selon la période de l'année à laquelle les racines de Navet ont été récoltées. C'est ainsi que, dans le Midi de la France, les racines récoltées au printemps sont riches en peroxydases P₆ et P₇, par contre en automne, elles sont presque totalement dépourvues de peroxydase P₆ mais renferment des quantités encore plus importantes de P₇. Des observations semblables ont été faites sur des racines de Raifort⁸.

Il est important évidemment de savoir si ces peroxydases présentes dans l'homogénat sont toutes présentes dans la cellule ou si certaines d'entre elles n'ont pas été "créées" par les processus d'extraction. Les résultats présentés n'autorisent pas de réponse certaine. L'étude de la composition en aminoacides et en sucres, et l'analyse de la structure primaire de ces protéines pourra probablement permettre de répondre à cette question. Il est toutefois intéressant de noter que la plupart des auteurs^{14,7-10} admettent maintenant que les peroxydases multiples correspondent à une réalité physiologique contrairement à l'opinion initialement émise par KEILIN ET HARTREE¹⁷.

RÉSUMÉ

Cinq peroxydases ont été isolées et obtenues à l'état hautement purifié à partir de racines de Navet (*Brassica napus* L. variété Blanc dur d'hiver). Trois de ces peroxydases sont anodiques à pH 6.8 et deux sont cathodiques à ce même pH. Toutes possèdent comme groupement prosthétique la protohémateine IX.

Les points isoélectriques, les masses moléculaires, les constantes de sédimentation et les spectres d'absorption de ces peroxydases ont été déterminés. Contrairement aux peroxydases de Raifort qui possèdent des caractéristiques spectrales très

voisines, la localisation et l'amplitude des pics d'absorption des peroxydases de Navet sont variables selon la nature de ces hémoprotéines.

Une des peroxydases purifiées, la plus basique, présente des analogies étroites avec l'hémoprotéine "566" découverte par HAGIHARA, SHIN ET NAKAMURA dans le germe de blé. Elle possède certaines caractéristiques des cytochromes de type *b*.

NOTE AJOUTÉE EN COURS D'IMPRESSION (Reçu le 15 Juillet, 1968)

Dans un travail récent EL-FEKIH et KERTESZ²¹ ont isolé et purifié plusieurs peroxydases du latex de Figuier.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. THEORELL, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.*, 16A, No. 2 (1942).
- 2 A. JERMYN, *Nature*, 169 (1952) 488.
- 3 A. JERMYN ET R. THOMAS, *Biochem. J.*, 56 (1954) 631.
- 4 K. G. PAUL, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 1312.
- 5 M. H. KLAPPER ET D. P. HACKETT, *Biochim. Biophys. Acta*, 96 (1955) 272.
- 6 L. H. SHANNON, E. KAY ET J. Y. LEW, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2166.
- 7 B. HAGIHARA, K. TAGAWA, I. MORIKAWA, M. SHIN ET K. OKUNUKI, *Nature*, 181 (1958) 656.
- 8 K. TAGAWA, M. SHIN ET K. OKUNUKI, *Nature*, 183 (1959) 111.
- 9 K. TAGAWA ET M. SHIN, *J. Biochem.*, 46 (1959) 865.
- 10 M. SHIN ET W. NAKAMURA, *J. Biochem.*, 50 (1961) 500.
- 11 E. MOUSTAFA, *Nature*, 199 (1963) 1189.
- 12 J. J. EVANS ET M. A. ALLDRIDGE, *Phytochemistry*, 4 (1965) 499.
- 13 P. K. MACNICOL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117 (1966) 347.
- 14 T. HOSOYA, *J. Biochem.*, 47 (1960) 369.
- 15 S. KON ET J. R. WHITAKER, *J. Food Sci.*, 30 (1965) 977.
- 16 P. VAN DUIJN, *Rec. Trav. Chim.*, 74 (1955) 771.
- 17 E. F. KEILIN ET D. HARTREE, *Biochem. J.*, 49 (1951) 88.
- 18 J. KILLANDER ET G. LAURENT, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 317.
- 19 M. IWATSUBO ET A. CURDEL, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 5224.
- 20 A. R. WASSERMAN ET R. M. BURRIS, *Phytochemistry*, 4 (1965) 413.

Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 89-98