

SHORT COMMUNICATIONS

BBA 63414

Tamisage sur Sephadex G-100 des peroxydases, catalases, phénoloxydases et acide β -indolylacétique oxydases d'extraits radiculaires de *Lens* et de *Pisum*

Les gels de dextrane Sephadex ont été utilisés à maintes reprises dans l'étude du catabolisme auxinique¹⁻⁸ et des peroxydases y associées^{4,6,9,10}. Certains auteurs^{1-4,7,9} les ont utilisés uniquement pour "dialyser" leurs extraits acide β -indolylacétique oxydasiques et peroxydasiques, d'autres^{5,6,8,10} en vue de séparer des acide β -indolylacétique oxydases et des peroxydases de poids moléculaire différent.

Le tamisage sur Sephadex d'extraits de racines⁶ et de feuilles⁸ de tabac révèle l'existence d'au moins deux systèmes acide β -indolylacétique oxydasiques différents correspondant plus ou moins⁶ à deux groupes de fractions peroxydasiques.

Chez le pois⁵, deux systèmes acide β -indolylacétique oxydasiques ont également été décelés mais la correspondance entre acide β -indolylacétique oxydase et peroxydase n'a pas été établie; elle ne pourrait pas l'être selon KONINGS¹¹ qui attribue dans ce matériel l'activité acide β -indolylacétique oxydasique aux phénoloxydases plutôt qu'aux peroxydases. Dans la racine de la lentille, autre légumineuse, de fortes présomptions existent pour attribuer l'activité acide β -indolylacétique oxydasique aux peroxydases^{12,13} mais il n'est pas exclu que la catalase puisse aussi dégrader l'acide β -indolylacétique¹⁴.

Il était donc intéressant de comparer le tamisage parallèle des enzymes de ces deux légumineuses.

Des racines de *Lens culinaris* Med. et de *Pisum sativum* var. "Vlijmse Gele Krombek"** âgées de 3 jours (germination à l'obscurité à 26° sur ouate et papier filtre imbibés d'eau distillée) sont broyées dans une solution de tampon-phosphates (0.067 M, pH 7) à 2°, à raison de 2 g de poids frais pour 10 ml de solution. Le broyat est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 min. 2 ml du surnageant sont déposés sur une colonne (1.6 cm × 40 cm) de Sephadex G-100 équilibrée avec le tampon phosphates 0.067 M (pH 7). Un collecteur automatique récolte des fractions de 2 ml dès que la pénétration de l'extrait est terminée. Le dosage des protéines dans chacune des fractions est effectué par la méthode de LOWRY *et al.*¹⁵.

Les mesures des activités peroxydasique, phénoloxydasique, catalasique et acide β -indolylacétique oxydasique ont été décrites ailleurs^{12-14,16}.

Les protéines de l'extrait de lentille (Fig. 1)—et de l'extrait de pois—sortent de la colonne à partir de la 8ème fraction selon une courbe de dosage indiquant un seul pic majeur à la 12ème fraction. La mesure de l'activité peroxydasique des différentes fractions (Fig. 1) fait apparaître deux groupes de peroxydases: un premier pic coïncide exactement avec le pic des protéines, un second avec un épaulement se présente plus loin à la 21ème fraction.

Les catalases se répartissent autour d'un seul pic situé à la 14ème fraction, tout juste au minimum de l'activité peroxydasique entre les deux groupes de peroxydases.

* Nous remercions vivement le Dr. H. Konings qui nous a envoyé la variété de pois utilisée dans son mémoire¹¹.

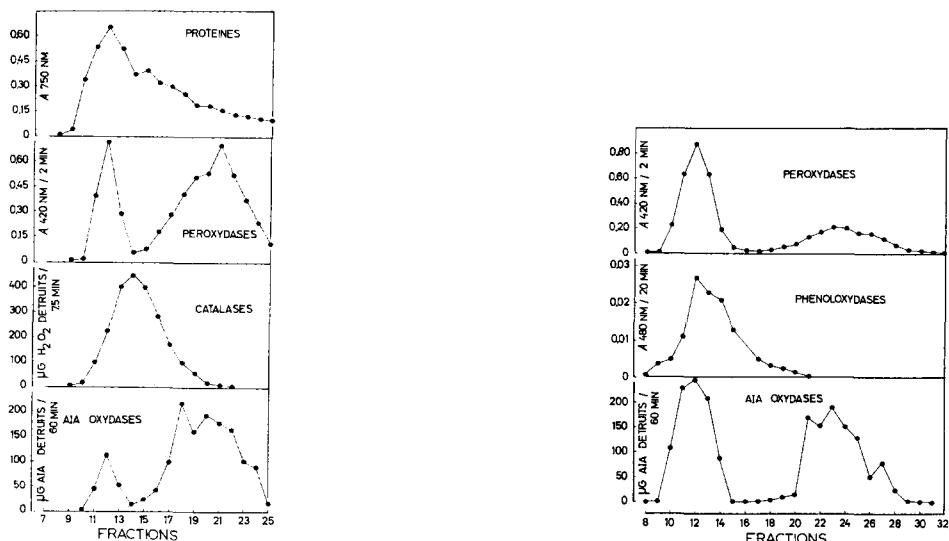


Fig. 1. Tamisage de l'extrait enzymatique brut de lentille sur colonne de Sephadex G-100. Composition des mélanges d'incubation: Peroxydases: 7.9 ml tampon-phosphates (pH 5.5) + 1 ml gaiacol 1% + 1 ml H_2O_2 à 0.2 vol. + 0.1 ml enzyme. Catalase: 1 ml H_2O_2 30 mM (tampon véronal, pH 8) + 0.1 ml enzyme. Acide β -indolylacétique (AIA) oxydases: 3 ml tampon-phosphates (pH 4.5) + 0.5 ml eau (ou $MnCl_2$ 1 mM) + 0.5 ml 2,4-dichlorophénol 1 mM + 1 ml acide β -indolylacétique .La teneur relative en protéines est exprimée par l'absorbance à 750 nm des mélanges extrait + réactif.

Fig. 2. Tamisage de l'extrait enzymatique brut de pois sur colonne de Sephadex G-100. Composition des mélanges d'incubation: Peroxydases et acide β -indolylacétique (AIA) oxydases: voir Fig. 1. Phénoloxydases: 4 ml tampon-phosphates (pH 6.1) + 0.5 ml de DOPA 10 mM + 0.5 ml extrait.

Entre les pH 4.5 et 7, aucune des fractions recueillies ne manifeste d'activité acide β -indolylacétique oxydasique sans addition de cofacteurs. En présence de 2,4-dichlorophénol avec ou sans $MnCl_2$, au pH 4.5 (la catalase de foie de boeuf est pratiquement inactive comme catalase à ce pH et en présence de ces effecteurs, elle détruit l'acide β -indolylacétique¹⁴), deux groupes d'acide β -indolylacétique oxydases sont mises en évidence, parallèlement aux peroxydases. Deux petits pics et plusieurs épaulements font présumer la présence de plusieurs "isozymes" dans le second groupe des acide β -indolylacétique oxydases. Aucun pic d'activité acide β -indolylacétique oxydasique n'a jamais pu être mis en évidence au niveau du pic des catalases. Avant que des séparations plus poussées des enzymes ne soient entreprises, tout porte donc de nouveau à croire que l'activité acide β -indolylacétique oxydasique des extraits de lentille est liée directement aux peroxydases présentes.

Mises à part quelques variations dans la valeur relative des différents pics enzymatiques, le tamisage de l'extrait de *Pisum* (Fig. 2) donne des résultats en tout parallèles à ceux obtenus pour la lentille et recoupent ceux de CRONENBERGER *et al.*⁵.

La phénoloxydase présumée de KONINGS¹¹ peut être mise en évidence (Fig. 2) avec un pic coïncidant avec celui des protéines et avec le premier pic des peroxydases. Aucune activité phénoloxydasique n'a jamais pu être révélée au niveau et au-delà du second pic des peroxydases, où se manifestent pourtant plusieurs acide β -indolylacétique

oxydases. Puisque dans chacune des fractions, aucune activité acide β -indolylacétique oxydasique ne peut être mise en évidence sans l'aide d'effecteurs tels que le 2,4-di-chlorophénol et le manganèse, il est logique, chez le pois aussi, d'attribuer cette activité acide β -indolylacétique oxydasique aux peroxydases seules. Les conclusions de KONINGS¹¹ quant à la nature de l'auxine oxydase de *Pisum* nous paraissent donc devoir être reconsidérées.

*Laboratoire de Biologie générale,
Université de Liège, Liège (Belgique)*

TH. GASPAR
M. HOFINGER
J. LACOPPE

- 1 K. L. GAMBURG, *Fiziol. Rast.*, 12 (1965) 361.
- 2 R. W. RITZERT, H. M. SELL ET M. J. BUKOVAC, *Plant Physiol.*, 40 (1965) viii.
- 3 C. KAMINSKI, *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 35 (1966) 386.
- 4 C. LEYH ET M. BASTIN, *Compt. Rend.*, 262 (1966) 2593.
- 5 L. CRONENBERGER, R. VILLE ET H. PACHECO, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 833.
- 6 L. SEQUEIRA ET L. MINEO, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1200.
- 7 P. E. PILET, J. P. ZRYD ET P. LAVANCHY, *Physiol. Végétale*, 5 (1967) 327.
- 8 W. J. MEUDT, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 144 (1967) 118.
- 9 D. RACUSEN ET M. FOOTE, *Can. J. Botan.*, 44 (1966) 1633.
- 10 G. MAZZA, C. CHARLES, M. BOUCHET, J. RICARD ET J. RAYNAUD, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 89.
- 11 H. KONINGS, *Acta Botan. Neerl.*, 13 (1964) 566.
- 12 TH. GASPAR ET A. XHAUFFLAIRE, *Planta*, 72 (1967) 252.
- 13 J. LACOPPE ET TH. GASPAR, *Planta*, 80 (1968) 27.
- 14 TH. GASPAR ET M. DINANT, *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 36 (1967) 533.
- 15 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 16 J. LACOPPE ET M. HOFINGER, *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 37 (1968) 605.

Reçu le 16 juin, 1969

Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 463-465