

BBA 67020

ISOPEROXYDASES ET HYDROXYPROLINE DANS LES PAROIS CELLULAIRES DES RACINES DE LENTILLE

E. DARIMONT, K. SCHWACHHOFER ET TH. GASPAR

Institut Van Beneden, 22, quai Van Beneden, B-4000 Liège (Belgique)

(Reçu le 16 avril, 1973)

SUMMARY

Isoperoxidases and hydroxyproline in the cell walls of lentil roots

1. Two ionically and three covalently bound peroxidases have been separated from a lentil (*Lens culinaris* Medikus) root cell walls preparation.
 2. Analysis of hydroxyproline in the two "ionic" peroxidases gave negative results.
 3. The cell wall covalently bound proteins corresponding to the peroxidase fraction (obtained by chromatography on Sephadex G-200) contained one fourth of the hydroxyproline of a cell wall crude fraction.
 4. The three covalently bound cell wall peroxidases were further purified by means of electrofocalisation. One of them which appeared free of other proteins was shown to contain hydroxyproline.
-

INTRODUCTION

Des protéines caractérisées par une forte teneur en hydroxyproline sont liées aux parois cellulaires des végétaux^{1,2} mais la nature exacte de ces protéines n'est pas connue³. Les analyses ont révélé que parmi les enzymes constitutives des parois cellulaires, seule la peroxydase paraît susceptible de contenir de l'hydroxyproline. Shannon *et al.*⁴ ont en effet montré que trois isoperoxidases solubles du raifort contenaient à la fois du sucre et de l'hydroxyproline et d'autre part, dans une iso-enzyme au moins, cette hydroxyproline est liée à l'arabinose dans une liaison O-glycosidique analogue à celle qui caractérise le complexe protéine-sucre des parois cellulaires⁵. Une autre isoperoxidase isolée du radis par Morita *et al.*⁶ contient également de l'hydroxyproline.

Lorsque, sous l'effet de l'éthylène, la teneur en peroxydases augmente dans les parois cellulaires la teneur en hydroxyproline croît parallèlement⁷ mais cela ne signifie pas nécessairement une incorporation de cette hydroxyproline dans ces peroxydases; celles-ci pourraient servir à l'hydroxylation de la proline pour d'autres protéines dans la paroi cellulaire.

Dans le présent travail, nous avons extrait séparément les peroxydases liées soit ioniquement soit de manière covalente aux parois cellulaires de la racine de lentille afin de les comparer après électrophorèse en gel d'amidon, à celles que nous avons antérieurement séparées de la fraction protoplasmique soluble^{8,9}. Des dosages d'hydroxyproline ont été effectués dans ces deux fractions peroxydasiques liées aux parois ainsi que dans deux peroxydases "covalentes" purifiées ultérieurement par électrophorèse et électrofocalisation.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Les analyses ont été faites sur des racines (25 mm) de *Lens culinaris* Med., cultivé à partir de la graine pendant 3 jours à l'obscurité et à 26 °C sur ouate et papier filtre imbibés d'eau distillée.

Préparation des parois cellulaires

La technique utilisée est dérivée de celle de Ridge et Osborne⁷ et de Carlier et Van Assche¹⁰: 50 g (poids frais) de racines sont broyés à froid (4 °C) au mortier dans 0,5 ml d'éthanol à 80% pour 1 g puis additionné de 6 ml du même éthanol pour 1 g. La suspension est alors centrifugée à 2000 × g pendant 5 min. Le culot est lavé 2 fois à l'alcool à 80%, 3 fois par du tampon phosphates 0,2 M de pH 6, 2 fois par une solution de Triton X-100 (déttergent non ionique) à 1% et enfin par du tampon phosphates jusqu'à disparition d'activité peroxydasiqe dans le surnageant. Le culot est dans chaque cas récupéré après 45 s de centrifugation à 1500 × g.

Préparation des peroxydases "ioniques"

Les peroxydases liées ioniquement aux parois correspondant au dernier culot sont séparées par huit lavages successifs dont trois au NaCl 1 M, deux au NaHCO₃ 0,5 M et trois au NaCl 1 M. Les surnageants réunis (\pm 50 ml) sont dialysés contre du tampon phosphates 0,05 M de pH 6 pendant 24 h puis concentrés au moyen de lyphogel (Gelman Instrument Company) jusqu'à 5–6 ml.

Préparation et purification des peroxydases "covalentes"

Le dernier culot, après trois lavages à l'eau distillée, est digéré pendant 20 h dans 50 ml de solution tampon acétate de sodium 0,1 M de pH 4,0 contenant 2,5% de pectinase (Sigma) et 0,5% de cellulase (Merck). Après dialyse (2 h) contre une solution tampon phosphates 0,05 M de pH 6, le volume est réduit à 4 ml au moyen de lyphogel. Ce dernier extrait contient les peroxydases dites covalentes, et peut être déposé tel quel sur le gel d'amidon pour analyse qualitative. En vue du dosage de l'hydroxyproline, l'extrait concentré correspondant aux peroxydases covalentes d'un poids frais de 50 g est passé sur une colonne (4 cm × 60 cm) de Séphadex G-200 équilibrée avec du NH₄HCO₃ 0,05 M. Les fractions de 10 ml (de 33 à 55) correspondant au pic des peroxydases (voir Fig. 2) sont rassemblées et éventuellement lyophilisées.

Les peroxydases contenues dans cette fraction concentrée sont ultérieurement soumises à l'électrofocalisation (gradient d'Ampholines LKB du pH 3 au pH 6, 400 V

pendant 70 h): des fractions de 2 ml sont recueillies et leur pH est mesuré immédiatement.

Hydrolyse protéique et dosage de l'hydroxyproline

Les fractions à analyser sont lyophylisées puis hydrolysées en présence de HCl 6 M (2 ml) à 110 °C pendant 24 h, évaporées sous vide (enceinte contenant NaOH et P₂O₅) reprises à raison de 1.5 mg pour 0.7 ml d'eau distillée. L'hydroxyproline est soit dosée selon la méthode de Bergman et Loxhey¹¹ dans des échantillons de 0.1 ml soit calculée d'après la valeur de son pic à la sortie de l'analyseur d'acides aminés Beckman 120 B (l'hydrolysat étant repris dans 1 ml de tampon citrate de sodium de pH 2.2).

Les techniques de mesure d'activité peroxydase, la séparation électrophorétique des isoperoxydases en gel d'amidon et leur révélation ont été décrites ailleurs^{8,9}.

RESULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 montre les zymogrammes des peroxydases "ioniques" et "covalentes" des parois, comparés à celui de la fraction protoplasmique, additionnée ou non de ces peroxydases des parois. Les peroxydases liées ioniquement aux parois sont au nombre de deux, du côté cathodique, et correspondent aux isoperoxydases protoplasmiques C₄ et C₇. Les peroxydases "covalentes" sont au nombre de trois, toutes anodiques, et ne correspondent à aucune de celles rencontrées dans la fraction

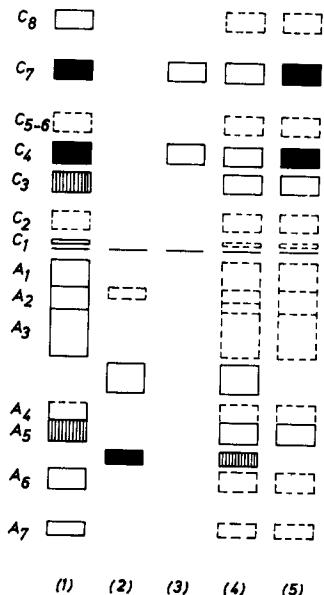


Fig. 1. Electrophorégramme des peroxydases protoplasmiques (1), des fractions covalentes (2) et ioniques (3) des parois cellulaires et de leurs mélanges (4): peroxydases protoplasmiques + peroxydases covalentes; (5): peroxydases protoplasmiques + peroxydases ioniques après révélation par un mélange d'*o*-dianisidine et de gaïacol.

protoplasmique. Ces résultats sont tout à fait parallèles à ceux obtenus par Ridge et Osborne⁷ chez *Pisum*.

La fraction peroxydases-covalentes brute correspondant à l'extrait digéré des parois (débarrassées des peroxydases ioniques) a été tamisée sur Séphadex G-200, ce qui a pour conséquence de séparer l'ensemble de ces peroxydases de la majeure partie des protéines comme le montre la Fig. 2.

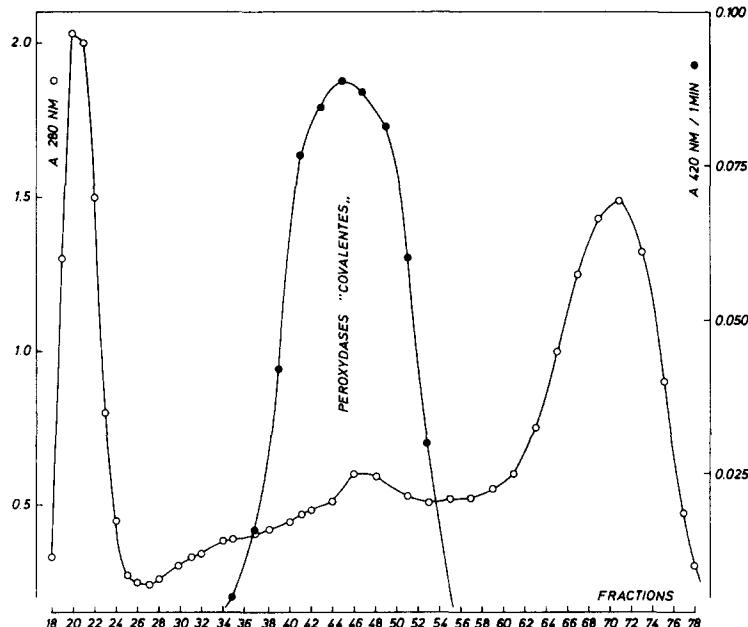


Fig. 2. Tamisage de l'extrait digéré de parois cellulaires (débarrassées des peroxydases ioniques) de lentille sur une colonne de Sephadex G-200. L'absorption des fractions est mesurée à 254 nm (ordonnée gauche) et leur activité peroxydasique mesurée à 420 nm (ordonnée de droite) dans les mélanges d'incubation ainsi composés: 7.9 ml tampon phosphates (pH 6) + 1 ml gaiacol 1% + 1 ml H₂O₂ à 0.2 vol. + 0.1 ml enzyme.

L'hydroxyproline a été dosée dans l'ensemble de ces fractions peroxydases-covalentes, après passage sur Séphadex, comparativement à la fraction des peroxydases-ioniques et aux parois cellulaires (débarrassées des seules peroxydases ioniques), chacune de ces fractions correspondant à une même activité peroxydasique (mesurée au gaiacol) équivalente à $2.9 \cdot 10^{-3}$ mg de peroxydase de raifort Fluka. Les valeurs trouvées en mg sont, pour les parois: $1.66 \cdot 10^{-3}$, pour les peroxydases covalentes: $0.4 \cdot 10^{-3}$ et pour les peroxydases ioniques: 0. L'hydroxyproline n'est donc pas décelée dans la fraction ionique; elle est par contre présente dans la fraction covalente où elle représente approximativement un quart de l'hydroxyproline totale de la paroi.

En vue de débarrasser les peroxydases covalentes d'autres protéines contenant éventuellement de l'hydroxyproline les fractions à activité peroxydasique après tamisage sur Séphadex sont rassemblées, concentrées puis soumises à l'électrofocalisation (Fig. 3). Celle-ci, tout comme l'électrophorèse en gel d'amidon, révèle la présence de trois peroxydases correspondant aux points isoélectriques 4.4, 4.7 et 4.9.

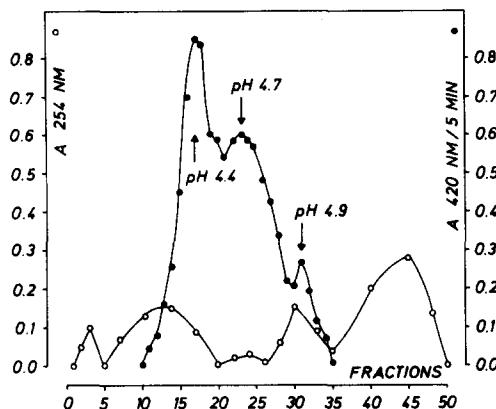


Fig. 3. Electrofocalisation de la fraction peroxydase-covalente (obtenue après tamisage sur Séphadex G-200). L'absorption des fractions est mesurée à 254 nm (ordonnée de gauche) et leur activité peroxydasique mesurée à 420 nm (ordonnée de droite) dans les mêmes conditions que celles de la Fig. 2. Les pH correspondant aux points isoélectriques des 3 pics de peroxydases sont indiqués.

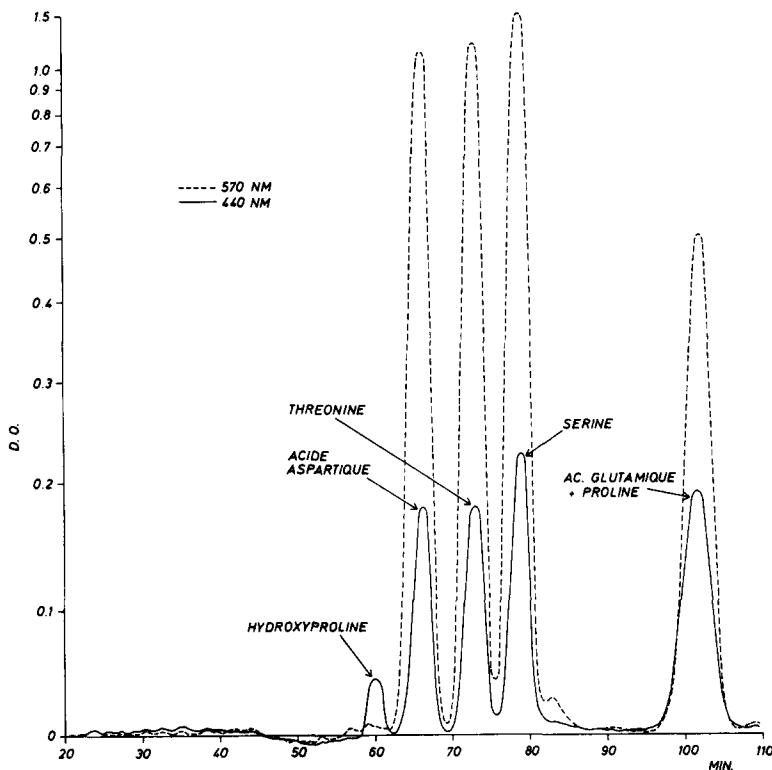


Fig. 4. Diagramme résultant de l'analyse sur l'analyseur Beckman 120 B des acides aminés de la peroxydase covalente de point isoélectrique 4.7 après hydrolyse par HCl 6 M.

La peroxydase de point isoélectrique 4.7 et qui est la mieux purifiée (en se basant sur l'absorption à 254 nm à cet endroit et à l'absence d'autres protéines après une

électrophorèse en gel d'acrylamide et révélation au bleu de Coomassie R), est reprise, concentrée et soumise à l'hydrolyse. L'analyseur d'acides aminés y révèle la présence d'hydroxyproline (Fig. 4) qui peut être estimée à $1.4 \cdot 10^{-4}$ mg/g de poids frais de racine. Cette peroxydase paraît donc bien contenir de l'hydroxyproline d'autant plus que le passage sur l'analyseur, de la solution hydrolysée d'ampholines utilisée lors de l'électrofocalisation ne décèle pas d'hydroxyproline.

L'analyse révèle aussi de l'hydroxyproline dans la fraction peroxydasique de point isoélectrique 4.4 mais n'ayant pas encore été à même de débarrasser celle-ci d'autres protéines contaminantes, nous ne pouvons pas affirmer avec autant de certitude que cette peroxydase contient également l'hydroxyproline. Les recherches se poursuivent sur les caractéristiques physico-chimiques et le rôle de ces peroxydases à hydroxyproline liées de manière covalente aux parois cellulaires.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (Contrat No. 998).

REFERENCES

- 1 Lampert, D. T. A. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21, 235-270
- 2 Cleland, R. (1971) *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 22, 197-222
- 3 Brysk, M. M. et Chrispeels, M. J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 257, 421-432
- 4 Shannon, L. M., Kay, E. et Lwe, J. Y. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2166-2172
- 5 Liu, E. H. et Lampert, D. T. A. (1968) *Plant Physiol.* 43, 16
- 6 Morita, Y., Yoshida, C. et Maeda, Y. (1971) *Agric. Biol. Chem.* 35, 1074-1091
- 7 Ridge, I. et Osborne, D. J. (1970) *J. Exp. Bot.* 21, 843-856
- 8 Darimont, E. et Gaspar, Th. (1972) *Soc. Bot. France, Mémoires 1972 (Coll. Morphologie)* pp. 211-222
- 9 Gaspar, Th., Khan, A. et Fries, D. (1973) *Plant Physiol.* 51, 146-149
- 10 Carlier, A. et Van Assche, J. (1968) *Z. Pflanzenphysiol.* 59, 353-363
- 11 Bergman, T. et Loxhey, R. (1963) *Anal. Chem.* 35, 1961-1965