

MISE EN EVIDENCE PAR FOCALISATION ISOELECTRIQUE DE TROIS ISOENZYMES DE LA POLYPHENOLOXYDASE CHEZ *QUERCUS PEDUNCULATA* Ehrh.

J.P. BARTHE et P. GADAL

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 15 December 1971

Electrofocusing procedure resolves phenolase of oak's bark in three distinct major isozymes showing cresolase and catecholase activities. Their pI are: 6, 7.8 and 8.2. Little change in ratio of the two activities occurs during isoelectric separation. The ultracentrifuged isozymes exhibit sedimentation constant similar to the crude enzyme phenolase.

1. Introduction

La polyphénoloxydase ou phénolase (EC 1.10.3.1) est une enzyme largement répandue chez les micro-organismes, les animaux et les végétaux [1]. Elle peut agir, *in vitro*, sur deux types de substrats: les *o*-diphénols (activité catécholase) et les monophénols (activité crésolase).

Des formes multiples de cette oxydase ont souvent été mises en évidence chez un même organisme par les techniques d'électrophorèse sur gels d'amidon ou d'acrylamide; en vue de leur étude, ces isoenzymes ont été isolées par chromatographie sur échangeurs d'ions ou sur hydroxylapatite [2-9]. Ces deux dernières techniques n'ont pu être retenues dans la purification de la phénolase du Chêne car elles entraînaient une perte pratiquement totale de l'activité enzymatique.

En revanche, la focalisation isoelectrique, méthode non encore utilisée dans l'étude de la phénoloxydase s'est révélée particulièrement adaptée à la séparation des formes isofonctionnelles de cette enzyme chez le Chêne. Dans cette communication, nous présentons les premiers résultats obtenus par cette technique dans le fractionnement d'un extrait enzymatique réalisé à partir de l'écorce de *Quercus pedunculata*, partie du végétal la plus riche en biocatalyseur.

2. Partie expérimentale

2.1. Extraction et purification

L'extrait enzymatique est réalisé à partir d'écorce prélevée sur les extrémités des rameaux d'un Chêne (*Q. pedunculata* Ehrh.) situé en plein champ. Le matériel végétal, stabilisé par lyophilisation, est conservé à -20° ; il est réduit en poudre, au broyeur à billes Dangoumau, quelques instants avant l'extraction.

Toutes les opérations d'extraction et de purification sont effectuées à des températures comprises entre 0 et 4° . La poudre végétale, additionnée d'une quantité de polyclar AT correspondant à une fois et demi sa masse, est homogénéisée durant 1 hr par agitation magnétique dans du tampon phosphate mono-bipotasique 0,1 M de pH 7,5 renfermant 1% de polyéthylène glycol [10]. La suspension est centrifugée 1 hr à 100 000 g et le surnageant obtenu est déposé au sommet d'une colonne de Séphadex G-100 équilibrée dans du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5; l'élution est réalisée par ce même tampon. Les fractions renfermant l'enzyme sont réunies et leur concentration en tampon abaissée à M/200 par passage sur une colonne de Séphadex G-25.

2.2. Electrofocalisation

La solution enzymatique (55 ml) est soumise à l'électrofocalisation dans un appareil LKB modèle 110 selon le protocole de Vesterberg et Svensson [11]. La tension appliquée est de 600 V et l'expérience dure

48 hr; des fractions de 2 ml sont finalement recueillies au collecteur.

2.3. Ultracentrifugation

Un gradient linéaire, 5–20% de saccharose en solution dans le tampon phosphate mono-bipotassique 0,1 M de pH 7,5, est préparé dans un tube de 5 ml. On dépose ensuite 200 μ l de solution enzymatique sur 4,8 ml de gradient. La centrifugation dure 17 hr à 40 000 rpm à 4° dans le rotor SW 39 de l'ultracentrifugeuse Spinco modèle L. L'activité est déterminée sur des fractions de 0,2 ml.

2.4. Détermination des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont déterminées en dosant au spectrophotomètre 400 nm les produits

colorés issus de l'oxydation du catéchol et du *p*-crésol. Les réactions s'effectuent à pH 4.7, pH optimum d'action de l'enzyme, dans le tampon phosphate-acide citrique.

L'activité catécholase est mesurée, au bout de 30 sec d'action selon la méthode de Harel et al. [12]. Les mesures de l'activité crésolase ne s'effectuent qu'après la fin de la période de latence lorsque la vitesse d'action de l'enzyme est devenue constante.

3. Results et discussion

Les expériences ont été réalisées avec deux gradients de pH: le premier compris entre 3 et 10 et le second entre 7 et 10. Dans les deux cas (fig. 1 et 2), on observe

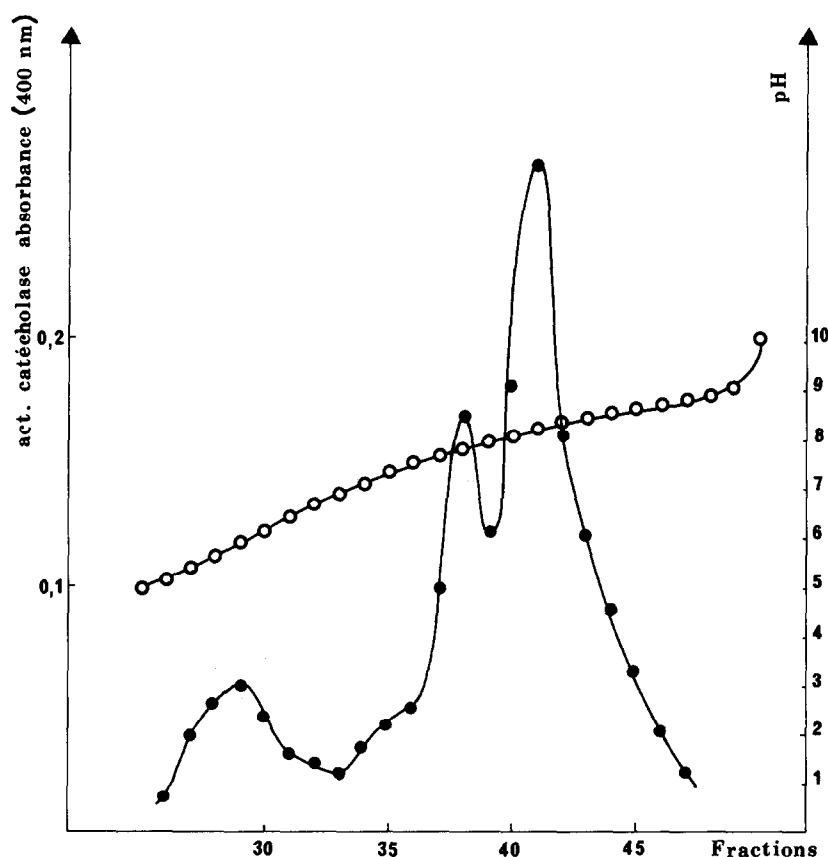


Fig. 1. Diagramme d'élution de la phénolase du Chêne après électrofocalisation (pH 3–10). (●-●-●): Catécholoxydase (ΔA en 30 sec/100 μ l d'enzyme), (○-○-○): pH.

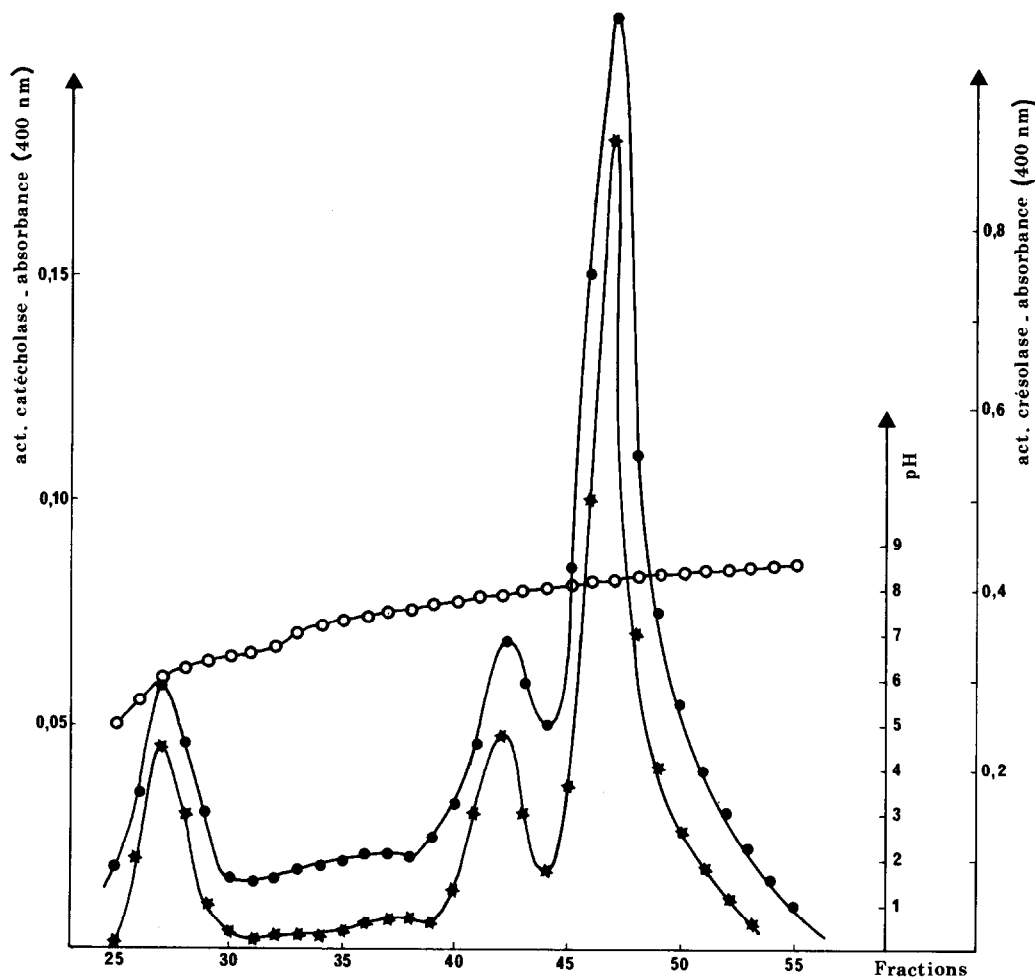


Fig. 2. Digramme d'éluion de la phénolase du Chêne après électrofocalisation (pH 7-10). (●—●—●): Catécholoxydase (ΔA en 30 sec/100 μl d'enzyme), (*—*—*): crésolase (ΔA entre 30 min et 60 min/200 μl d'enzyme), (○—○—○): pH.

trois isoenzymes présentant une activité catécholase; ces trois formes protéiques possèdent aussi une activité crésolase (fig. 2). Leurs points isoélectriques sont: 6; 7,8 et 8,2. La présence dans toutes les éluions d'un épaulement situé vers pH 7,3 constitue une forte présomption en faveur de l'existence d'une quatrième forme isofonctionnelle.

Quantitativement, la protéine de $pI = 8,2$ est la plus importante elle possède à elle seule plus de 50% pouvoir catalytique total. L'addition des activités contenues dans les diverses fractions montre une récupération pratiquement totale de la crésolase et de la catécholase introduites sur la colonne (tableau).

La focalisation isoélectrique constitue donc une

excellente méthode de séparation des isoenzymes pour la phénolase du Chêne. Elle se révèle en particulier supérieure aux techniques chromatographiques qui entraînent une perte pratiquement totale de l'activité enzymatique.

Les pourcentages d'activités crésolase et catécholase récupérées après focalisation sont similaires pour chacune des trois isoenzymes. L'importance relative de ces deux activités catalytiques est donc le même dans ces trois formes protéiques. De ce point de vue, elles se rapprochent des isoenzymes rencontrés chez d'autres végétaux supérieurs: Fève [5] et Pomme de terre [13] qui présentent aussi des valeurs pratiquement identiques du rapport:

Tableau 1

Etude par électrofocalisation de la phénolase du Chêne. Importance relative des trois isoenzymes — Pourcentages de récupération.

		Catécholase	Crésolase
Activité introduite sur la colonne		100	100
Activité récupérée	Isoenzyme I	12,2	11,9
	Isoenzyme II	17,7	17,8
	Isoenzyme III	52,2	54,7
Fractions 31–38 (épaulement)		8,9	1,6
Total		91%	86%

$$\frac{\text{activité crésolase}}{\text{activité catécholase}}$$

Par contre, elles diffèrent des isoenzymes des champignons *Psalliota campestris* [14] et *Psalliota bispora* [4] chez lesquelles ce rapport varie très nettement suivant la forme considérée.

Soumises à l'ultracentrifugation les trois formes isofonctionnelles présentent un coefficient de sédimentation identique à celui de l'enzyme non purifiée. Il ne s'agit donc pas de sous-unités provenant de la dissociation d'une même protéine initiale comme l'ont suggéré Jolley et Mason [15] chez le champignon de couche.

En conclusion, le haut pouvoir de résolution de la méthode utilisée et la présence de pics symétriques sur les diagrammes d'élution semblent indiquer que les isoenzymes du Chêne sont constituées de protéines bien individualisées possédant à la fois les activités crésolase et catécholase. De plus, ces protéines possèdent des poids moléculaires identiques, très voisins de celui de l'enzyme contenue dans l'extrait brut. Il serait intéressant de déterminer la nature exacte de ces trois formes isofonctionnelles et de savoir si les deux

activités catalytiques dépendent ou non des mêmes sites enzymatiques. L'étude approfondie des propriétés biochimiques des trois isoenzymes devrait nous permettre de résoudre ces problèmes.

Remerciements

Nous tenons à remercier vivement Monsieur le Professeur Fallot de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse qui a bien voulu mettre à notre disposition son appareil l'électrofocalisation L.K.B.

References

- [1] J.M. Nelson et C.R. Dawson, *Advanc. Enzymol.* 4 (1944) 99.
- [2] M.F. Malette et C.R. Dawson, *Arch. Biochem. Biophys.* 23 (1949) 29.
- [3] J.L. Smith et R.C. Krueger, *J. Biol. Chem.* 238 (1962) 1121.
- [4] S. Bouchilloux, P. MacMahill et H.S. Mason, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1699.
- [5] D.A. Robb, L.W. Mapson et T. Swain, *Phytochem.* 4 (1965) 731.
- [6] R.P.F. Gregory et D.S. Bendall, *Biochem. J.* 101 (1966) 569.
- [7] S.M. Constantinides et C.L. Bedford, *J. Food Sci.* 32 (1967) 446.
- [8] E. Harel, A.M. Mayer et Y. Shain, *Phytochem.* 4 (1965) 783.
- [9] M. Fling, N.H. Horowitz et S.F. Heinemann, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2045.
- [10] P. Gadal, H. Bouyssou et J.P. Barthe, *Physiol. Vég.* 7 (1969) 69.
- [11] O. Vesterberg et H. Svensson, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 820.
- [12] A.M. Mayer, E. Harel et R. Ben-Shaul, *Phytochem.* 5 (1966) 783.
- [13] S.S. Patil et M. Zucker, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 3938.
- [14] D. Kertesz et R. Zito, *Biochim. Biophys. Acta* 96 (1965) 447.
- [15] R.L. Jolley, Jr. et H.S. Mason, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1489.