

# Association de peroxydases aux membranes de courgettes : de Raifort et de Pharbitis nil

Autor(en): **Kiefer, S. / Penel, Cl. / Greppin, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **40 (1987)**

Heft 3: **Archives des Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740326>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# ASSOCIATION DE PEROXYDASES AUX MEMBRANES DE COURGETTES, DE RAIFORT ET DE PHARBITIS NIL

PAR

**S. KIEFER <sup>1</sup>, Cl. PENEL <sup>1</sup>, H. GREPPIN <sup>1</sup>, E. WAGNER <sup>1</sup>**

---

## RÉSUMÉ

La capacité de fixation, en présence de calcium ou de manganèse, de peroxydases basiques, sur des extraits cellulaires membranaires a été testée. La séparation par électrophorèse à flot continu montre que les peroxydases basiques se fixent surtout sur le plasmalemme et le tonoplaste. Des sites de reconnaissance liés à la présence des sucres de la peroxydase basique semblent exister. Un rythme circadien de la capacité de fixation des peroxydases par les membranes de Pharbitis existe; il est modifié après l'induction florale.

## ABSTRACT

Binding of Peroxidases to Zucchini, Horseradish and Pharbitis nil Membranes.

The basic peroxidases binding capacity, in presence of calcium or manganese, has been tested with membranous cellular extracts. It is showed, by free flow electrophoretic separation, that basic peroxidases are essentially bound to plasmalemma and tonoplast. Recognition sites to the basic peroxidase sugars seem to exist. A circadian rhythm of the basic peroxidases binding capacity has been detected; after flowering, this capacity is modified.

## INTRODUCTION

Il a été montré (Penel et Greppin, 1974; Penel *et al.*, 1976, 1977) qu'il était possible de moduler, *in vivo* (épinard) et *in vitro* (courgette), l'interaction entre la peroxydase basique et les membranes par les lumières rouge clair (660 nm) et rouge lointain (730 nm), c'est-à-dire, via le phytochrome. L'amplitude de cette modulation est, respectivement, de 50 et 100%, par rapport à l'activité peroxydasique des témoins. Chez l'épinard, cette interaction est modifiée à la suite de l'induction florale (Karege *et*

---

\* Laboratoire de Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève 4.

*al.*, 1979). Il est possible, chez la courgette (Penel et Greppin, 1979) d'isoler les peroxydases associées aux membranes, puis de les solubiliser à l'aide d'EGTA. Les enzymes ainsi libérées peuvent être réassociées aux membranes, en présence de calcium. Nous allons présenter quelques travaux accomplis sur *Pharbitis nil*, *Cucurbita pepo* et *Armoracia rusticana*.

### *Matériel et méthodes*

Les graines de *Pharbitis nil*, var. «Violet» sont mises à germer dans de la vermiculite et cultivées dans un phytotron en lumière continue (tubes fluorescents Sylvania «daylight» de 40 W, l'éclairement sur les plantes est de 20 W/m<sup>2</sup>), à une température de 20°C ± 1 et une humidité relative de 75% ± 5. On utilise les cotylédons de plantules âgées de cinq à sept jours.

La germination des graines de courgettes (*Cucurbita pepo*, var. «black beauty») est faite dans des pétris, sur papier humide, à la température de 25°C ± 0,5 et à l'obscurité totale. Après cinq jours, les hypocotyles des plantules sont utilisés.

Le raifort frais (*Armoracia rusticana*) provient du marché, au moment de la récolte (novembre).

### *Extraction des membranes*

Dix grammes de matériel frais sont hachés et broyés à froid dans un mortier, en présence de 20 ml de solution tampon (MOPS, 25mM, saccharose, 400 mM, mercaptoéthanol, 25 mM; pH 7,2). L'homogénat est filtré sur nylon (45µm), puis centrifugé à 1500 g pendant cinq minutes. Le surnageant est soumis à une deuxième centrifugation à 20 000 g, pendant vingt minutes, en présence de 100 mM NaCl et 5mM EGTA. Les membranes présentes dans le culot sont resuspendues dans du tampon MOPS, 25 mM (pH 7,2 et homogénéisées (Kiefer, 1986).

### *Extraction et séparation des peroxydases basiques et acides*

Dix grammes de matériel frais sont broyés dans 20 ml de tampon Tris/HCl, 50 mM, pH 8, à l'aide d'un Ultra-Turrax, 3 fois 20 sec., à froid. L'extrait est filtré sur toile de nylon (45 µm) et centrifugé à 12 000 g pendant dix minutes. Le surnageant est passé sur 2 colonnes Pharmacia de DEAE-Sephacel, préalablement équilibrées dans le même tampon. Les protéines basiques passent à travers l'échangeur d'ions et peuvent être récoltées dans un tube. Les protéines acides sont décrochées par du NaCl 1 M et concentrées dans une unité d'ultrafiltration CX, immersible de Millipore (Kiefer, 1986).

### *Association des peroxydases aux membranes*

Dans un tube à centrifuger, on introduit, toujours dans le même ordre, les solutions suivantes: 170 µl NaCl (100 mM), 17 µl CaCl<sub>2</sub> (10 mM), 500 µl d'extrait mem-

branaire, 1000  $\mu$ l de peroxydases basiques. Après centrifugation à 20 000 g, pendant vingt minutes, le surnageant est écarté et le culot repris dans 0,5 ml de tampon MOPS, 25 mM (pH 7,2), à l'aide d'un homogénéisateur en verre. Les peroxydases sont dosées dans le culot et le surnageant, les protéines dans le culot (Kiefer, 1986). La capacité de fixation des peroxydases est exprimée par:  $\Delta$ DO 470 nm/mg prot. min.

#### *Dosage des peroxydases*

L'activité peroxydasique est mesurée au spectrophotomètre (470 nm), après une minute, cinq ou dix minutes, dans un tampon phosphate 1/15 M, pH 6,1, contenant 8 mM gaiacol, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'extrait à tester (Kiefer, 1986).

#### *Dosage des protéines*

Il est réalisé selon la microméthode de Bradford (1976), les protéines formant un complexe avec le bleu brillant G-250 de Coomassie, en solution acide (spectrophotomètre, à 595 nm). La sérum-albumine de bœuf est utilisée pour l'étalonnage.

#### *Séparation des membranes par électrophorèse en flux continu*

Cette méthode, qui permet d'avoir, sur un même extrait, la séparation du tonoplaste et du plasmalemme, d'une très grande pureté, a déjà été décrite ailleurs (Auderset *et al.*, 1986, Penel *et al.*, 1987; Sandelius *et al.*, 1986a).

#### *Microscopie électronique*

Les fractions membranaires sont fixées (glutaraldéhyde 2%; tétr oxyde d'osmium 0,2% dans du cacodylate de sodium 0,1 M; pH 7,3) pendant deux heures à 4°C. Le détail de la méthode est décrit ailleurs (Sandelius *et al.*, 1986a, Auderset *et al.*, 1986). Les coupes ont été faites par G. Auderset.

#### *Résultats*

Dans le tableau 1, nous avons présenté la capacité de fixation des peroxydases basiques, dans des conditions saturantes, par des extraits membranaires, en présence de calcium. Lors d'associations hétérospécifiques, nous constatons des variations dans cette capacité, dues tant aux différences des propriétés des membranes qu'à celles des peroxydases des espèces considérées (Pharbitis, courgette, raifort). La peroxydase basique commerciale de raifort a perdu cette capacité, en raison probablement de petites modifications dans son groupe prosthétique sucré qui ne permet plus la reconnaissance des sites membranaires.

La séparation par électrophorèse en flux continu permet de bien purifier les extraits membranaires (fig. 1, photographies 1 et 2). Nous constatons que les peroxydases basiques se fixent électivement sur le plasmalemme (B) et dans une moindre

TABLEAU 1.

Pourcentage de fixation, en présence de 10 mM Ca<sup>++</sup> (saturation), des peroxydases basiques, par rapport aux témoins sans calcium (mesure de l'activité peroxydasique fixée sur les membranes).

Source de membranes	Peroxydases basiques fraîches			HRP IX sigma
	Pharbitis	Cucurbita	Armoracia	
<u>Pharbitis nil</u>	+ Ca	+ Ca	+ Ca	+ Ca
vésicules	325 %	200 %	133 %	- 0 %
tonoplaste	700 %			
plasmalemme	1250 %			
<u>Cucurbita pepo</u>	+ Ca			+ Ca
vésicules	300 %			- 0 %
<u>Armoracia</u>	+ Ca			
<u>rusticana</u>	216 %			
vésicules				

mesure sur le tonoplaste (A), qui sont les deux lieux de sortie hors du cytoplasme. Les moyens de reconnaissance des différents types de membranes ont déjà été précisés ailleurs (Sandelius *et al.*, 1986a; 1986b; Penel *et al.*, 1987).

Par rapport aux vésicules totales, la capacité de fixation est beaucoup plus élevée; étant rapportée aux seules membranes qui ont cette propriété, il en résulte que l'activité peroxydasique est divisée par un dénominateur plus petit qu'auparavant (protéines des vésicules cellulaires: mélange de membranes diverses).

Nous observons dans la fig. 2 que non seulement les peroxydases basiques se fixent électivement aux membranes, mais que la quantité d'enzymes fixées, en conditions saturantes, varie de manière circadienne. La peroxydase étant la même, il s'agit donc d'une modification périodique des propriétés des membranes, en particulier des sites récepteurs (accessibilité). Suite à l'induction florale, de nombreuses modifications ont été observées concernant tant les membranes que les peroxydases basiques: mobilité électrophorétique de celles-là, cinétique d'accrochage de celles-ci en présence de calcium et/ou de manganèse (affinité), changement dans la capacité de fixation suite aux modifications du groupe carbohydrate de la glycoprotéine ainsi qu'à la réorganisation du plasmalemme (Kiefer, 1986; Kiefer *et al.*, 1986; Penel *et al.*, 1987).

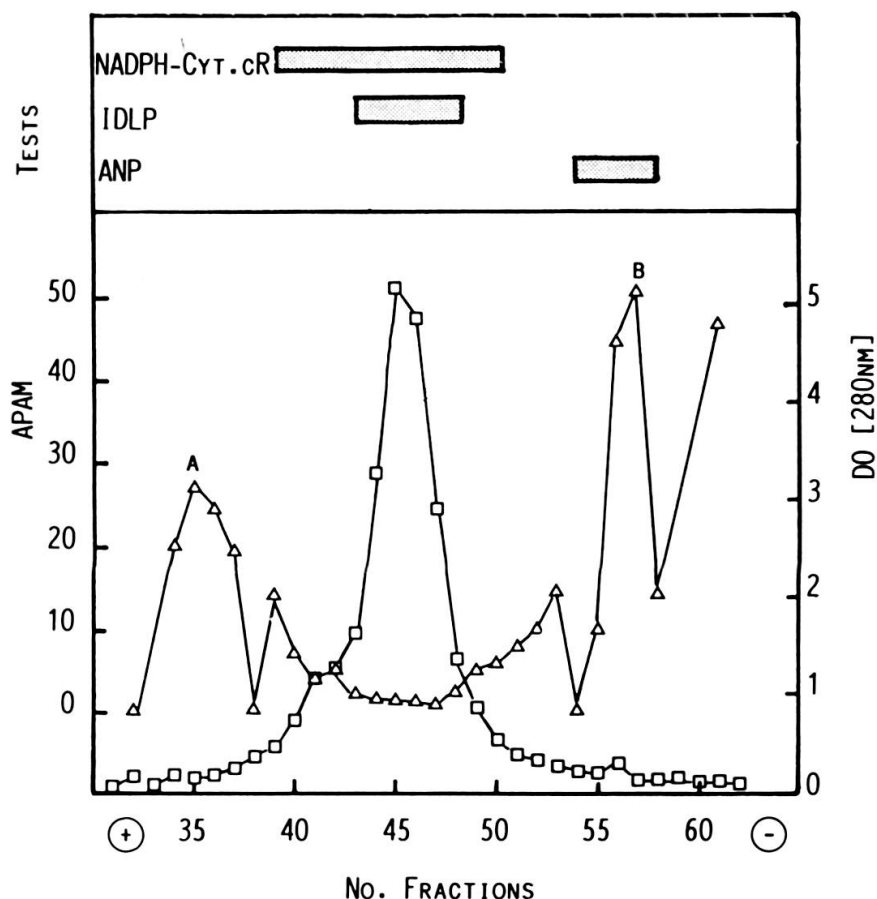


FIG. 1.

Electrophorèse à flux continu (800 V/9,2 cm de champ  $165 \pm 5$  mA;  $6^\circ\text{C}$ ) de l'extrait membranaire de Pharbitis (DO à 280 nm). APAM: activité peroxydasique basique associée aux membranes:  $\Delta$  DO 470 nm/ml min/DO 280 nm.

Marqueurs enzymatiques. ANP: liaison avec l'acide N-1-naphthylphtalamique (plasmalemme); IDLP: inosine diphosphatase (Golgi); NADPH cyt. c-R: cytochrome c réductase NADPH (réticulum endoplasmique). APAM est mesurée en présence de calcium, 10 mM. L'activité des témoins sans calcium a été soustraite.

### Discussion

Les peroxydases sont des glycoprotéines (20% environ du PM constitué de carbohydrates; Welinder, 1976; Gaspar *et al.*, 1982), pouvant interagir avec certaines membranes, en raison de la complémentarité de séquences spécifiques d'oligosaccharides avec certaines protéines membranaires possédant des sites pouvant lier ces carbohydrates. Des récepteurs analogues sont connus chez les plantes et les animaux (Bowles et Kauss, 1975; Brummer et Parish, 1983; Ashwell et Harford, 1982).

Ainsi, les peroxydases basiques (en fait certaines) de Pharbitis, courgette, raifort, lentille, épinard, ont une affinité très élevée pour les membranes plasmiques, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou de  $\text{Mn}^{2+}$ . (Penel et Greppin, 1976, 1977, 1979 *a, b*, Darimont *et al.*, 1977; Kiefer et Greppin, 1983; Kiefer *et al.*, 1985; Kiefer, 1986). Cette

liaison semble très spécifique. Elle n'existe pas chez les isozymes acides que nous avons testées (glycoprotéines ayant une autre structure du groupe prosthétique sucré; Conroy *et al.*, 1982); chez les isozymes basiques elle n'est pas affectée par la présence de concentrations élevées en NaCl (plus de 200 mM), ce qui exclut l'hypothèse de liaisons purement électrostatiques entre enzymes et membranes. Les peroxydases basiques ayant subi un traitement chimique insuffisamment ménagé (peroxydase commerciale du raifort), ou modifiées, *in vivo* (espace extracellulaire), ont perdu cette capacité due à une différence mineure (pratiquement la même mobilité électrophorétique et le même poids moléculaire, à quelques pour-cent près).

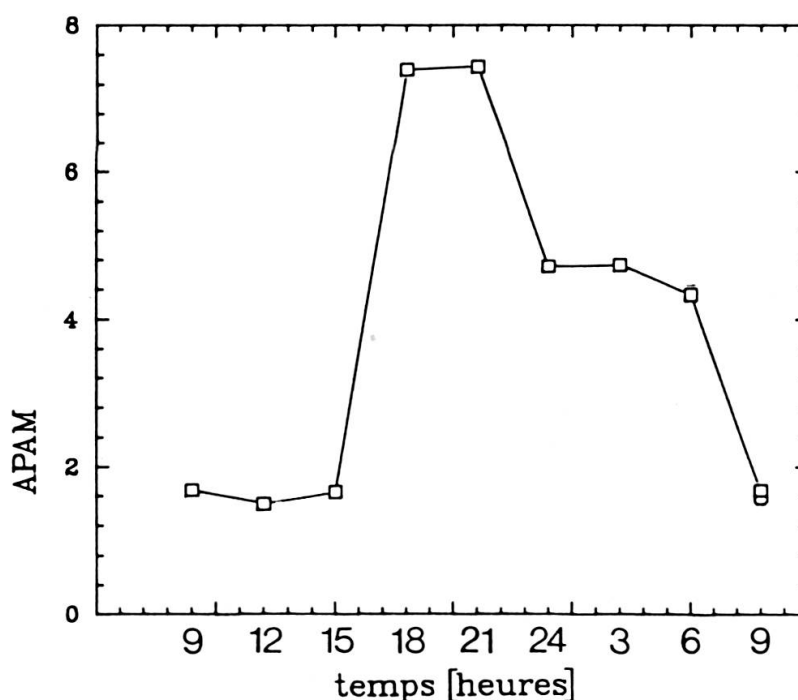


FIG. 2.

Evolution, pendant vingt-quatre heures, de l'activité peroxydasique accrochée à l'extrait membranaire cellulaire, en présence de Manganèse, 10 mM. L'activité des témoins sans manganèse est soustraite.

L'enlèvement de quelques monosaccharides terminaux sur la peroxidase, par un traitement à la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase ou l'inhibition de la glycosylation de la peroxydase néosynthétisée par la tunicamycine (action sur certaines N-acétylglucosamine-1P-transférases) font perdre cette capacité (Kiefer *et al.*, 1985). Il s'agit donc d'une reconnaissance très spécifique, même si le récepteur n'est pas encore connu. Ce processus, d'autre part, paraît général chez les plantes supérieures. Les essais d'accrochage interspécifique (tableau 1), indiquent un certain conservatisme dans les structures de reconnaissance; celui-ci est bien connu chez les peroxydases basiques par rapport aux acides (Cairns *et al.*, 1980; Conroy *et al.*, 1982; Greppin *et al.*, 1986b).

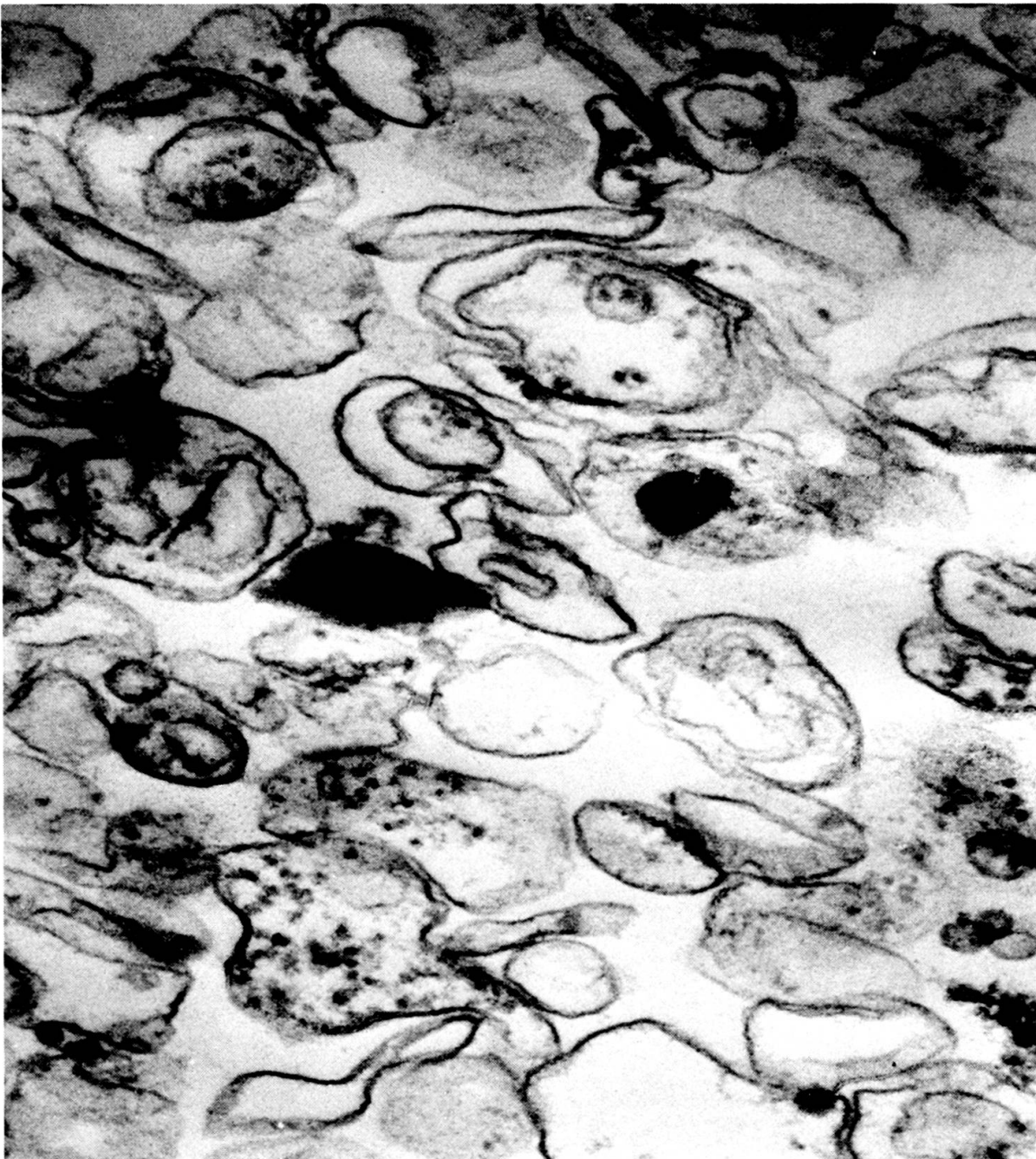


PHOTO 1.

Microscopie électronique ( $50\,000 \times 2,5$ ) d'une fraction enrichie en tonoplaste.



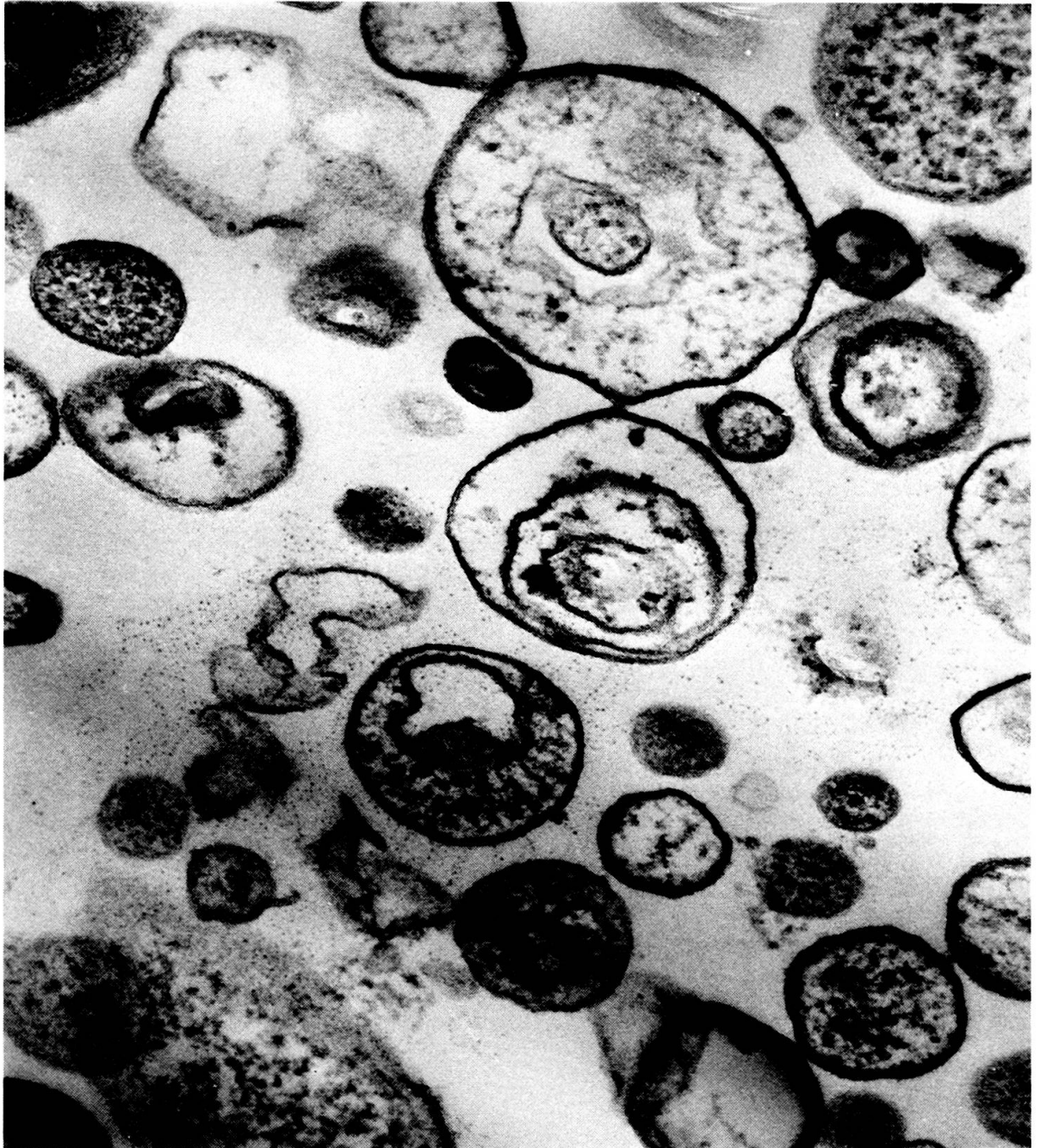


PHOTO 2.

Microscopie électronique ( $50\,000\times 2,5$ ) d'une fraction enrichie en plasmalemme.

L'existence, dans le plasmalemme, d'un rythme circadien dans la capacité de fixer la même peroxydase basique, ouvre des possibilités intéressantes pour comprendre, au niveau moléculaire, le fondement de cette rythmicité susceptible, couplée au phytochrome, de permettre l'orientation dans le temps (vingt-quatre heures, saisons) du travail cellulaire (Njus *et al.*, 1977; Wagner, 1976; Wagner *et al.*, 1985).

Ainsi, le passage de l'état végétatif à l'état floral, chez les plantes à sensibilité photopériodique, est dépendant d'horloges physiologiques. Durant cette transition, tant chez le Pharbitis nil (plante de jours courts), que chez l'épinard (plante de jours longs), le plasmalemme est modifié physiquement et chimiquement (Greppin *et al.*, 1978; 1986a; Auderset *et al.*, 1986; Kiefer, 1986; Kiefer *et al.*, 1986; Penel *et al.*, 1987).

Les changements dans la reconnaissance du plasmalemme par les peroxydases basiques, après induction florale, traduisent en partie, les modifications de l'organisation membranaire, lesquelles sont très précoces, donc très près des événements primaires de l'induction dans la feuille.

#### RÉFÉRENCES

#### BIBLIOGRAPHIE

- ASHWELL, G., J. HARFORD, 1982. Carbohydrate specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 531-554.
- AUDERSET, G., A. S. SANDELIUS, C. PENEL, A. BRIGHTMAN, H. GREPPIN, J. D. MORRE, 1986. Isolation of plasma membrane and tonoplast fractions from spinach leaves by preparative free-flow electrophoresis and effect of photo-induction. *Physiol. Plant.* 68, 1-12.
- BOWLES, D. J., H. KAUSS, 1975. Carbohydrate binding proteins from cellular membrane of plant tissue. *Plant. Sci. Lett.*, 4, 411-418.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- BRUMMER, B., R. W. PARISH, 1983. Identification of specific proteins and glycoproteins associated with membrane fractions isolated from *Zea mays* L. coleoptiles. *Planta*, 157, 446-453.
- CAIRNS, E., R. B. VAN HUUSTEE, W. L. CAIRNS, 1980. Peanut and Horseradish peroxidase isoenzymes. Intraspecies and interspecies immunological relatedness. *Physiol. Plant.*, 49, 78-82.
- CONROY, J. M., D. C. BORZELLECA, L. A. McDONELL, 1982. Homology of plant peroxidases. An immunological approach. *Plant. Physiol.*, 69, 28-31.
- DARIMONT, E., C. PENEL, G. AUDERSET, H. GREPPIN, 1977. Peroxydases de haut poids moléculaire identifiées à des peroxydases membranaires chez les lentilles. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, Liège, 85, 497-507.
- GASPAR, Th., C. PENEL, T. THORPE, H. GREPPIN, 1982. Peroxidases 1970-1980. *Centre de Botanique*, Genève, 324 pp.
- GREPPIN, H., G. AUDERSET, M. BONZON, C. PENEL, 1978. Changement d'état membranaire et mécanisme de la floraison. *Saussurea*, Genève, 9, 83-101.

- GREPPIN, H., G. AUDERSET, M. BONZON, R. DEGLI AGOSTI, R. LENK, C. PENEL, 1986a. Le mécanisme de l'induction florale. *Saussurea*, Genève, 17, 71-84.
- GREPPIN, H., C. PENEL, Th. GASPAR, 1986b. Molecular and Physiological Aspects of Plant peroxidases. *Centre de Botanique*, Genève, 470 pp.
- KAREGE, F., C. PENEL, H. GREPPIN, 1979. Reaction of a peroxidase activity to red and far red light in relation to the floral induction of spinach. *Plant. Sci. Lett.*, Berlin, 17, 37-42.
- KIEFER, S., H. GREPPIN, 1983. Association of peroxidases to membranes from *Pharbitis nil* cotyledons: the effect of calcium and the role of sugar residue. In: *Membranes and Compartmentation in Regulation of Plant Functions*. Univ. P. Sabatier, Toulouse, p. 48.
- KIEFER, S., C. PENEL, H. GREPPIN, 1985. Calcium and manganese-dependent attachment of the glycoprotein peroxidase to membranes from *Pharbitis* cotyledons. *Plant. Sci.*, 39, 37-43.
- KIEFER, S., H. GREPPIN, C. PENEL, 1986. Association of a peroxidase to membrane of *Pharbitis* cotyledons. In: *Cell-free Analysis of Membrane Traffic*, ed. G. Cook, W. Evans, K. Howell, I. Mellman, J. D. Morré, Embo, Heidelberg, 50 pp.
- KIEFER, S., H. KLINGER, C. PENEL, H. GREPPIN, E. WAGNER, 1986. Photoperiod and phytochrome control of peroxidase binding to microsomes from *Pharbitis nil* cotyledons. In: *Proc. 5th. Congr. Fed. Europ. Soc. Plant. Physiol.*, ed. K. Dörffling, Hamburg, 5, 25.
- KIEFER, S., 1986. Etude, *in vitro*, de l'association aux membranes de peroxydases chez *Pharbitis nil*, Thèse n° 2213, Univ. Genève.
- NJUS, D., F. M. SULZMAN, J. N. HASTINGS, 1974. Membrane model for the circadian clock. *Nature*, 248, 116-120.
- PENEL, C., H. GREPPIN, 1974. Variation de la photostimulation de l'activité des peroxydases chez l'épinard. *Plant Sci. Lett.*, Berlin, 3, 75-80.
- PENEL, C., H. GREPPIN, J. BOISARD, 1976. *In vitro* photomodulation of a peroxidase activity through membrane-bound phytochrome. *Plant Sci. Lett.*, Berlin, 6, 117-121.
- PENEL, C., H. GREPPIN, 1977. Effect of  $Ca^{2+}$  and light on particle-bound peroxidase activity. In: *Proc. Ann. Europ. Symp. on Photomorphogenesis*, Bet Dagan, p. 74.
- 1979a. Effect of far red and red light on a pelletable peroxidase activity in extracts from spinach leaves. *Physiol. Plant.*, 46, 208-210.
- PENEL, C., E. DARIMONT, H. GREPPIN, Th. GASPAR, 1979b. Rôle du calcium dans l'association de peroxydases à des membranes de racines de lentille. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, D 289, 529-532.
- PENEL, C., G. AUDERSET, S. KIEFER, A. SANDELIUS, A. BRIGHTMAN, H. GREPPIN, J. D. MORRE, 1987. Plasma membrane and tonoplast fractions isolated from spinach leaves by preparative free-flow electrophoresis: effect of photo-induction. In: *The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids*, ed. P. K. Stumpf, J. B. Mudd, W. D. Nes, Plenum Pub., New York, pp. 217-219.
- SANDELIUS, A. S., C. PENEL, G. AUDERSET, A. BRIGHTMAN, M. MILLARD, J. D. MORRE, 1986a. Isolation of highly purified fractions of plasma membrane and tonoplast from the same homogenate of soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Plant Physiol.*, 81, 177-185.
- SANDELIUS, A., C. PENEL, G. AUDERSET, A. BRIGHTMAN, K. SAFRANSKI, H. GREPPIN, J. D. MORRE, 1986b. Isolation of plasma membrane and tonoplast from the same homogenates of plant cells by free-flow electrophoresis. In: *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, ed. A. J. Trewavas, Plenum Pub. New York, pp. 353-354.
- WAGNER, E., 1976. Endogenous rhythmicity in energy metabolism: basis for timer-photoreceptor-interactions in photoperiodic control. In: *Dalhlem Workshop on the Molecular Basis of Circadian Rhythms*, ed. J. W. Hastings, H. G. Schweiger, Abakon Verlag, Berlin, pp. 215-238.
- WAGNER, E., M. BONZON, H. GREPPIN, 1985. Membrane-oscillator hypothesis of metabolic control in photoperiodic time measurement and the temporal organization of development and behavior in plants. In: *New Development and Methods in Membrane Research and Biological Energy Transduction*, ed. L. Packer, Plenum Pub., pp. 525-546.
- WELINDER, K. G., 1976. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase. *FEBS Lett.*, 72, 19-23.