

Diversité et caractéristiques des peroxydases foliaires du palmier dattier

K. Majourhat* et M. Baaziz

Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390. Marrakech.
Email : baaziz@ucam.ac.ma

Resumé :

Les peroxydases (POX) des feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ont été extraites et purifiées partiellement suivant deux méthodes différentes. Une purification partielle basée sur un fractionnement au sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100 a servi pour la détermination de certaines caractéristiques physicochimiques et catalytiques. Une extraction par solubilisation progressive a permis d'élucider leur distribution subcellulaire.

Les POX partiellement purifiées ont montré une grande affinité pour H₂O₂ et pour le guaiacol comme substrats. Comme il a été démontré chez d'autres plantes les POX foliaires du palmier dattier agissent selon un mécanisme de catalyse de type 'Ping Pong'. Ces enzymes ont montré une thermostabilité élevée. En effet, elles peuvent garder 58 % de leur activité après 30 min de chauffage à 50 °C. Le pH optimum d'activité des POX foliaires du palmier dattier se situe autour de 5,4. L'ajout du H₂O₂ à des concentrations supérieures à 4 mM a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de ce substrat sur les POX.

L'extraction par solubilisation progressive a permis d'avoir deux fractions enzymatiques actives. La fraction soluble (S), très abondante est facile à extraire et la fraction liée aux parois de façon ionique (I) extraite en présence de NaCl 1 M. La fraction (S) des peroxydases reste plus active que la fraction (I). En effet, cette dernière représente, seulement, 17,16 % de l'activité POX totale. L'évaluation de la diversité des fractions S et I, a été effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La séparation sur milieu basique des fractions S et I a permis de révéler un grand nombre d'isoformes acides. Elles sont séparées en deux zones d'activité dans le cas de la fraction S et une seule dans le cas de la fraction I. Les POX acides solubles présentent une zone monomorphe moins mobile et une deuxième zone plus polymorphe constituée de 2 à 9 bandes. La fraction I, montrant moins d'isoformes que la fraction S, présente une seule zone constituée d'une ou deux isoformes

La séparation sur milieu acide des formes basiques des POX des Fractions S et I, révèle moins d'isoformes par rapport aux formes acides. Ainsi,

l'analyse des zymogrammes des POX basique solubles montre deux zones d'activité. La première zone constituée de trois isoformes. La deuxième zone d'activité est constituée par 1 à 4 bandes. Les isoformes basiques de la fraction I se présentent sous forme d'une à deux isoformes seulement. Le rôle possible des différentes formes des peroxydases est discuté dans cette étude.

Mots clés : *Phœnix dactylifera*, peroxydases, purification partielle, solubilisation progressive.

Introduction:

Le palmier dattier joue un rôle socio-economique et écologique très important dans les pays phoenicoles. Au Maroc une combinaison de facteurs abiotique et biotiques, dont la plus dévastatrice est la fusariose vasculaire, entrave le développement de ce secteur. Si la lutte génétique s'avère le seul moyen de remédier à ce fléau, force est de constater que le développement des marqueurs biochimiques et moléculaires devient une grande nécessité. Le recours à ces marqueurs est d'autant plus pressant car la plante présente une croissance très lente et une entrée en floraison tardive. Parmi les marqueurs biochimiques utilisés dans la caractérisation des ressources génétiques des espèces végétales, les peroxydases ont été largement utilisés vu leur faible coût, leur grande diversité et leur large distribution (Majourhat et al., 2002, Azeqour et al., 2002, Majourhat et al., 1999, Baaziz et al., 1996, Baaziz, 1989). Ils sont des hemo-glycoprotéines de la famille des oxydoréductases dont le poids moléculaire moyen est égal à 35 000 Kda (Siegel, 1993). Ils catalysent l'oxydation d'une large gamme de composés (généralement phénoliques) en utilisant le peroxyde d'hydrogène ou parfois l'oxygène comme seconds substrats. Elles sont reconnues intervenir dans plusieurs processus physiologiques chez les plantes.

L'objectif du présent travail consiste, d'une part, à évaluer la diversité des peroxydases foliaire chez le palmier dattier selon leur distribution subcellulaire et leur comportement électrophorétique. D'autre part à étudier certaines de leurs caractéristiques physicochimiques.

Matériel et Méthodes:

Les échantillons de feuilles ont été collectés sur des palmes de la couronne moyenne de palmiers adultes de la palmeraie de Marrakech.

Deux types d'extractions ont été utilisés pour répondre à notre objectif. Une extraction progressive selon le protocole décrit par Baaziz et al., (1994) utilisée pour étudier la distribution subcellulaire des peroxydases ainsi que leur variabilité suivant leur comportement électrophorétique. La deuxième procédure d'extraction est une purification partielle des peroxydases afin d'étudier leur caractéristiques physicochimiques. Elle consiste en trois étapes. Broyage dans un tampon acétate 0,1 M (pH 3,6) contenant le PVP (25% (P/P)) et du β mercaptoéthanol (2 mM). Les protéines du surnageant, récupéré après centrifugation du broyat, sont ensuite précipitées par

le sulfate d'ammonium (de 40% à 90% de saturation). Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min le culot protéique est repris dans du tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,2). Il correspond à l'extrait peroxydasique précipité. Ce dernier subit un dessalage sur une colonne de Sephadex G-25 et un fractionnement sur une colonne Sephadex G-100. La fraction récupérée par élution par le Tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) servira pour la détermination des caractéristiques physicochimiques.

Le dosage des activités peroxydasique et la séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ainsi que la révélation des isoenzymes ont été réalisés selon la procédure décrite par Baaziz et al., (1994).

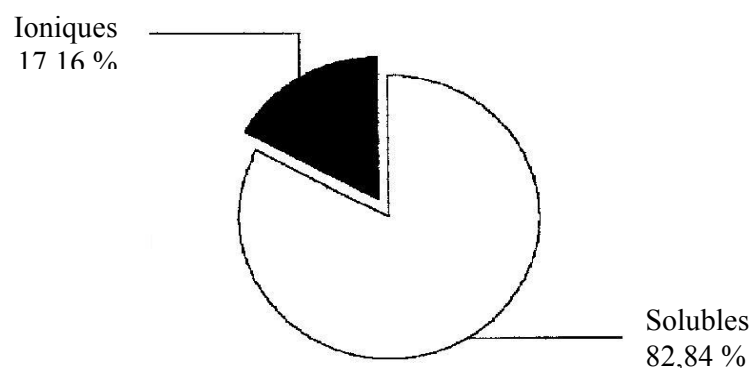


Figure 1 : Proportions des fractions solubles et ioniques des peroxydases foliaires du palmier dattier

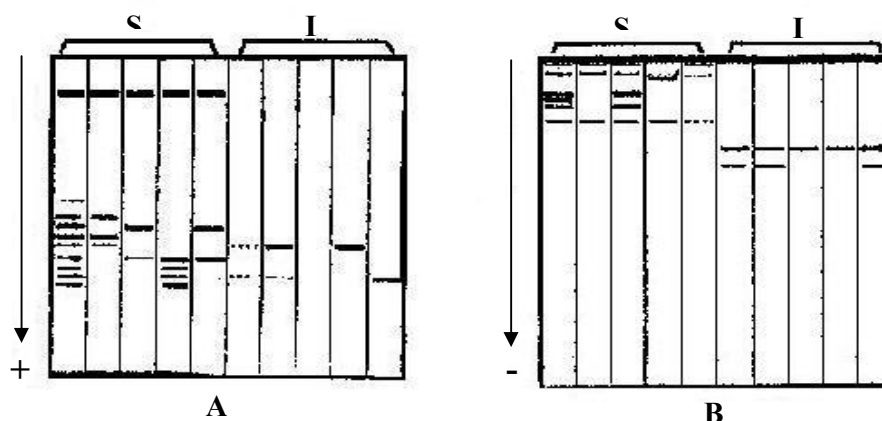


Figure 2 : Profils électrophorétiques des fraction solubles (S) et ioniques (I) des peroxydases acides (A) et basiques (B) des feuilles du palmier dattier.

peroxydases solubles par rapport aux ioniques. Ces dernières représentent 17,16 % seulement de l'activité peroxydasique totale. Plusieurs auteurs travaillant sur le même matériel végétal ou sur d'autres espèces ont observée la même répartition subcellulaire des peroxydases (Baaziz et al., 1994 ; Aouad, 1997). Chez plusieurs plantes, la fraction soluble des peroxydases a été impliquée dans les phénomènes de croissance, de développement végétatif, la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Baaziz et al., 1996, Obinger et al., 1996, Jackson et al., 1996, Tahlil et al., 1999). Cependant, les peroxydases ioniques sont impliquées dans les processus de lignification et de rigidifications des parois cellulaires (Aouad, 1997, Sato et al., 1995) (fig. 1)

L'étude qualitative des fractions solubles et ioniques des peroxydases foliaires du palmier dattier a révélé une grande variabilité des formes au sein de cette classe d'enzyme. Le nombre d'isoformes solubles est plus important que celui des ioniques. La séparation par électrophorèse en milieu basique, permettant la séparation des peroxydases anioniques, présente une zone monomorphe moins mobile constituée d'une seule bande de R_f égale à 0,10 et une deuxième zone plus polymorphe constituée de 2 à 9 bandes de R_f compris entre 0,42 et 0,61. La fraction I, montrant moins d'isoformes que la fraction S, présente une seule zone constituée d'une ou deux isoformes de R_f compris entre 0,56 et 0,59 (Fig 2A).

L'électrophorèse des fractions solubles et ioniques en milieu acide, permettant la séparation des peroxydases cationiques, a révélé moins d'isoformes par rapport aux formes acides. Ainsi, l'analyse des zymogrammes des peroxydases basiques solubles montre deux zones d'activité. La première zone constituée de trois isoformes de R_f compris entre 0,01 et 0,04. La deuxième zone d'activité est constituée par 1 à 4 bandes de R_f compris entre 0,10 et 0,32. Les isoformes basiques de la fraction I se présentent sous forme d'une à deux isoformes de R_f 0,42 et 0,38 (fig. 2B).

Les POX partiellement purifiées ont montré une grande affinité pour H_2O_2 et pour le guaiacol comme substrats. En effet, l'affinité en terme de K_m pour le guaiacol est de l'ordre de 12,5 mM alors que pour le H_2O_2 le K_m est de 2,5 mM. Comme il a été démontré chez d'autres plantes les POX foliaires du palmier dattier agissent selon un mécanisme de catalyse de type 'Ping Pong'. Des résultats similaires ont été trouvés par Aouad (1997) chez les peroxydases de céréales. La vitesse maximale observée pour la fraction étudiée ($2,05 \text{ unité min}^{-1}$) reste très faible par rapport à celles des peroxydases du raifort (Browleader et al., 1995). L'apport de H_2O_2 à des concentrations supérieures à 4 mM provoque une inhibition de l'activité peroxydasique. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs à des

concentrations variables d'une espèce à une autre (Aouad, 1997; Miyake et al., 1993). Cet effet inhibiteur dépendrait de la concentration de certains composés (comme l'acide ascorbique) dans le milieu réactionnel (Miyake et al., 1993). Le pH optimum d'activité des POX foliaires du palmier dattier se situe autour de 5,4. Des pH optimum similaires ont été observés par Baaziz, (1989) chez différentes variétés marocaine de palmier dattier. Les essais sur l'activité des peroxydases après incubation à différentes températures pendant différentes périodes de temps, ont montré une thermostabilité relativement élevée. En effet, elles peuvent garder 58 % de leur activité après 30 min de chauffage à 50 °C. Ceci vient confirmer les résultats observés par Baaziz, (1989).

L'abondance, la diversité, le faible coût et la facilité d'extraction des peroxydases constituent un grand atout en faveur de leur exploitation comme marqueurs des ressources génétiques du palmier dattier.

References:

- Majourhat, K., Bendiab, K., Medraoui, L. et Baaziz, M. (2002). Diversity of leaf peroxidases in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) as revealed in an example of marginal (seedling derived) palm groves. *Scientia Horticulturae* 95: 31-38.
- Azeqour, M., Majourhat, K. et Baaziz, M. (2002). Morphological variations and isozyme polymorphism of date palm clones from in vitro culture acclimatized and established on soil in south Morocco. *Euphytica* 123:57-66.
- Majourhat, K., Bendiab, K. et Baaziz, M. (1999). Etude comparative des palmiers mâles et femelles de la région de Marrakech réalisée sur la base des phénotypes isoenzymatiques des estérases, peroxydases et endopeptidases. *Alawamia* 100: 41-49.
- Baaziz, M., Moukhlisse, N., Bendiab, K., Koulla, L., Aouad, A., Hdadou, H. et Majourhat, M. (1996). Peroxidases as markers in date palm culture. In: *Plant peroxidases, Biochemistry and physiology*. C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin, Eds. University of agriculture, Vienna and University of Geneva. pp. 298-302.
- Siegel, B.Z. (1993). Plant peroxidases. An organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12:303-312.
- Baaziz, M., Aissam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I., et Cheikh, R. (1994). Electrophoresis patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica* 76:159-168.
- Aouad (1997). Contribution à l'étude des peroxydases des céréales en relation avec la

- résistance à la salinité. Thèse de 3eme cycle éssciences. Université cadi ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech (Maroc), 198p.
- Brownleader, M., Ahmed, M.D., Trevan, M., Chaplin, M.F. et Dey, P.M. (1995) Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol.* 109:1115-1123.
- Miyake, C., Cao, W. et Asada, K. (1993). Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34:881-899.
- Baaziz, M. (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultuvars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New phytol.* 111:403-411.
- Tahlil, N., Rada, A., Baaziz, M., Morel, J.L., El Meray, M. El Atmani, M. (1999) Quantitative and qualitative peroxidase changes of two varieties of Zucchini (*Cucurbita pepo* L.) stressed with heavy metals. *Biol. Plant.* 42:75-82.
- Sato, Y., Sugiyama, M., Takagi, T. et Fukuda, H. (1995). Purification of cationic peroxidases bound ionically to the cell wall from the root of *Zinnia elegans*. *J. Plant Res.* 108:463-468.
- Jackson, P., Paulo, S. et Ricardo, C.P. (1996) B2, the soluble peroxidase of lupins in vegetatif development and the plant response to pathogenic agents. In: *Plant peroxidases, Biochemistry and physiology*. C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin, Eds. University of agriculture, Vienna and University of Geneva. pp.247-254.