

Peroxydases d'*Opuntia ficus indica* L. Activités catalytiques et propriétés biochimiques.

Khales, A., M. Baaziz

Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. 2390, 40000 Marrakech, Maroc. E-mail: baaziz@ucam.ac.ma

Résumé

Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), plante bien adaptée à l'aridité, contribue à la mise en valeur des terres incultes et leur protection contre l'érosion. Les mécanismes de son adaptation aux contraintes abiotiques sont peu connus. La recherche de marqueurs biochimiques, physiologiques et moléculaires est indispensable pour la valorisation des ressources génétiques de l'espèce.

Les peroxydases (POX) sont des oxydoréductases impliquées dans plusieurs processus physiologiques chez les plantes dont la croissance, le développement et la résistance aux contraintes biotiques et abiotiques. L'extraction par solubilisation progressive des POX à partir des raquettes et des racines d'*O.ficus indica* a permis d'obtenir 3 fractions enzymatiques notées S, I et C correspondant respectivement aux POX solubles et liées aux parois cellulaires de façon ionique ou covalente. Contrairement aux fractions enzymatiques extraites des racines, les POX des raquettes n'ont montré aucune activité en présence du gaiacol comme substrat. Plusieurs isoperoxydases acides et basiques sont révélées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les études cinétiques réalisées sur des fractions enzymatiques partiellement purifiées montrent une haute affinité des POX vis-à-vis de l'o-dianisidine et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En plus d'une grande thermostabilité, Les POX d'*O.ficus indica* présentent un pH optimal proche de 6,6. L'apport d'H₂O₂ à une concentration supérieure à 2% provoque une inhibition de l'activité enzymatique.

Mots clés : *Opuntia ficus indica* L., peroxydases, électrophorèse, G25, thermostabilité

Introduction

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) sont très répandues dans le monde végétal. Elles catalysent l'oxydation de différents substrats (des amines aromatiques, des phénols) en présence du peroxyde d'hydrogène [1]. Plusieurs travaux ont montré l'implication de ces enzymes dans la lignification, la subérisation, la biosynthèse de la paroi, le catabolisme de l'auxine, la défense contre l'infection par les agents

pathogènes, la tolérance aux sels et la sénescence [2, 3].

Dans une même plante et au niveau d'un même tissu, plusieurs formes de peroxydases (isoperoxydases) peuvent exister. Elles diffèrent par quelques propriétés physico-chimiques et catalytiques [4]. L'activité optimale de ces enzymes dépend de trois paramètres principaux : La température [5] le pH [6] et la force ionique [7].

Opuntia ficus indica L., plus connue sous le nom de figuier de barbarie, est originaire de l'Amérique tropicale, surtout des régions arides et semi arides du Mexique [8]. Etant une plante tolérant la sécheresse, le figuier de barbarie permet la valorisation des zones arides et semi-arides.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les aspects quantitatif et qualitatif ainsi que quelques propriétés physico-chimiques des peroxydases d'*O.ficus indica* extraites à partir des raquettes et des racines en considérant leur localisation tissulaire, la nature du substrat transformé et le comportement électrophorétique des différentes isoperoxydases.

Matériels et méthodes

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de plants d'*Opuntia ficus indica* L. communément appelée figuier de barbarie. Les échantillons (raquettes et racines) sont prélevés sur des plants choisis au hasard dans la région de Marrakech.

- Extraction des peroxydases par solubilisation progressive

Cette méthode d'extraction des peroxydases (POX) a été utilisée dans plusieurs travaux antérieurs [3,9]. Les POX liées aux parois de façon ionique (I) ou covalentes (C) sont extraites respectivement, par une force ionique à 1 M NaCl ou un tampon contenant la pectinase et la cellulase [10].

- Spécificité liée aux substrats

Trois substrats ont été utilisés pour le dosage de l'activité des POX des raquettes et des racines du figuier. Il s'agit du guaiacol, du 4-chloro-1-Naphtol et de l'o-dianisidine. Les activités sont mesurées par spectrophotométrie, à l'aide d'une cuve de volume 1 ml contenant un donneur d'électron, du tampon acétate acide- acétique pH 5 et du H₂O₂. La variation de la densité optique est suivie pendant 3 min.

- Purification partielle

La purification partielle des peroxydases des raquettes d'*Opuntia ficus indica* est réalisée par broyage de 40 g de matériel végétal frais. Il en résulte un extrait brut (EB) dont les protéines sont fractionnées par précipitation par le sulfate d'ammonium (0 à 90 %) (EP). Les extraits enzymatiques sont dessalés par filtration sur colonne de Séphadex G25. L'élué est faite par le tampon Tris- HCl 50 mM (pH 7,2).

- Séparation des isoperoxydases par électrophorèse. Electrophorèse des formes acides.

Les formes acides des POX sont séparées sur un gel de polyacrylamide (gradient 10-16%) [3, 9].

Electrophorèse des formes basiques.

Les isoformes basiques des POX sont séparées en milieu acide, sur des gels de polyacrylamide à concentration uniforme 10% [10].

La révélation des peroxydases est réalisée à l'aide d'une solution de benzidine 0,05% (P/V) préparée dans le tampon acétate 0,1M (pH 5,0). La réaction est déclenchée par 1 ml d'une solution d'H₂O₂ 1%.

Résultats et discussion

La méthode d'extraction par solubilisation progressive permet d'avoir accès à la totalité des POX contenues dans le matériel végétal et renseigne mieux sur la diversité de ces oxydoréductases tout en gardant leur propriétés physico-chimiques [3, 9]. L'étude de la répartition des activités des peroxydases solubles et ioniques au niveau des raquettes et des racines, montre que les formes ioniques sont moins abondantes dans les racines et presque à égalité dans les raquettes représentant respectivement 23 et 43%. Cette large distribution expliquerait l'intervention de ces enzymes dans plusieurs processus physiologiques, comme la synthèse de la lignine [2] et la résistance au stress biotiques et abiotiques [11]

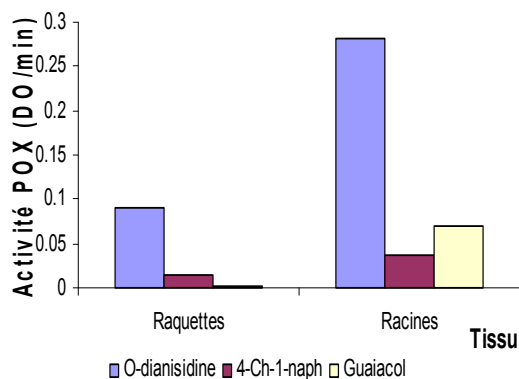


Fig. 1. Activité des POX solubles, extraites d' *O. ficus indica*, montrées avec les substrats o-dianisidine, 4-chloro1-naphtol et gaiacol

Les POX des raquettes d'*O. ficus indica* montrent une grande affinité pour l'o-dianisidine.

Le pH optimum correspondant à l'activité enzymatique maximale de la fraction G25 est 6,6 (Fig. 2). Un pH optimum similaire a été trouvé dans le cas d'autres plantes comme le chou [7].

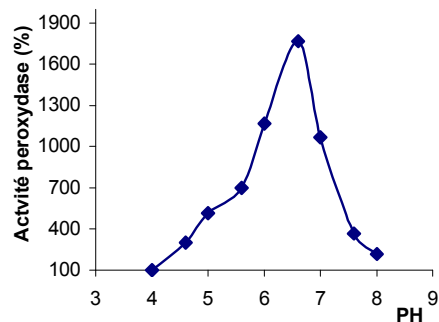


Fig. 2 Effet du pH sur l'activité des peroxydases

La comparaison des activités des peroxydases testées avec les trois substrats (guaiacol, 4-Chloro-1-Naphtol et o-dianisidine) montre que l'o-dianisidine reste le substrat le plus reconnu par les peroxydases d'*O. ficus indica*. Bien que le guaiacol soit le substrat le plus utilisé dans l'étude des peroxydases végétales, ce composé n'est pas reconnu par les enzymes des cladodes. Plusieurs facteurs peuvent être derrière ce comportement catalytique dont les concentrations élevées en produits du métabolisme secondaire [1].

Les isoformes ioniques de Rf 0,27 et 0,29 sont présentes au niveau des racines. Elles sont absentes dans les raquettes.

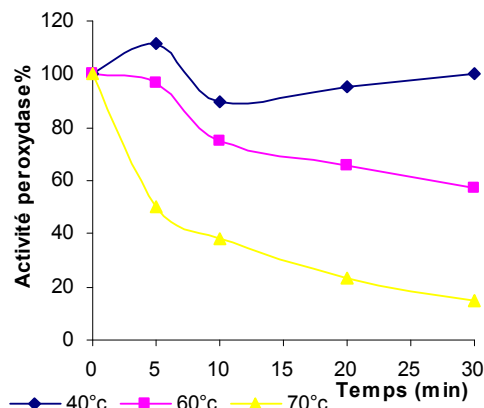


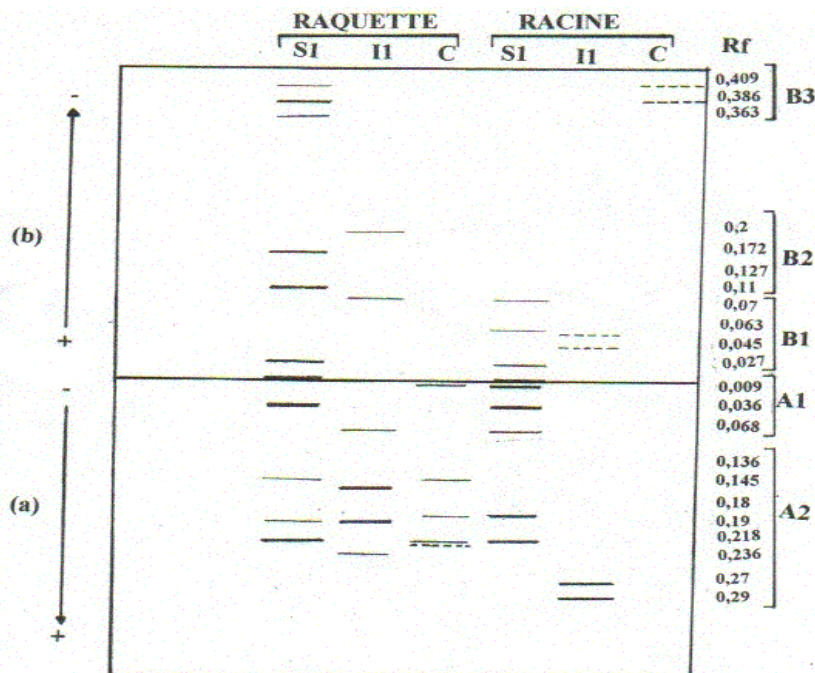
Fig. 3. Effet de la température sur l'activité des peroxydases de raquette d'*O. ficus indica*

Les peroxydases du figuier de barbarie sont hautement résistantes à la température, puisqu'elles gardent 40 % de leur activité après 10 min d'incubation à 70°C (Fig. 3). Alors que chez d'autres cactacées comme *pachycereus pringlei*, l'inactivation est totale [13].

D'autres part l'activité enzymatique est faiblement affectée par la présence des sels. Les ions Ca²⁺ ont un effet activateur à 30 et 60 mM, alors que l'activité reste inchangée à 120mM. Des résultats similaires ont été rapportés par Bakardjieva [14]. Les ions K⁺ provoque une stimulation de l'activité enzymatique à 120 mM. Cet effet activateur a été

également observé dans la fraction E2M extraite des folioles du palmier dattier mâle [9]. L'évolution de l'activité de la fraction G25 en fonction de la concentration de H₂O₂ a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur à partir des concentrations supérieures à 2 %. Cette inhibition par excès de substrat a été également enregistrée chez le cardon [13].

Les différentes fractions des peroxydases (S, I et C), obtenues par solubilisation progressive à partir des raquettes et des racines d'*Opuntia ficus indica*, ont permis de révéler plusieurs isoperoxydases après électrophorèse sur gels de polyacrylamide (Fig.4).



Spectre électrophorétique des peroxydases acides (a) et basiques (b) des fractions solubles (S), ioniques (I) et covalentes (C) extraites des raquettes et racines d'*Opuntia ficus indica* L.

Ainsi, le spectre électrophorétique des peroxydases solubles (S1), ioniques (II) et covalentes (C) a permis de montrer que les premières fractions contiennent aussi bien des isoformes acides que basiques. Cependant, les fractions ioniques et covalentes sont riches en isoformes acides. Ces différences qualitatives ont été notées chez d'autres espèces comme la laitue [15]. L'existence d'un polymorphisme remarquable du système POX chez *Opuntia ficus indica* permet d'envisager l'utilisation de ces oxydoréductases comme marqueurs permettant l'identification des différents écotypes et provenances de cette espèce.

Références bibliographiques

- [1] Gaspar Th., Penel C., Hagege D. & Greppin H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: Bio chemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Lobarzewski J., Greppin H., Penel C. & Gaspar Th., eds., Université de Genève (Suisse), pp. 249-280.
- [2] Susumu H., Katsutomo S., Hiroyuki I., Yuko O., & Hirokazu M. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant cell physiol.* 42 (5): 462-468.

- [3] Baaziz M. (1990). Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. Relation avec la résistance de la plante à la maladie du Bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de Doctorat d'Etat des Sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 173 p.
- [4] Shannon I. M., Kay E. & Lew J.Y. (1996). Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. isolation and physical properties. *J. Biol.Chem.* 241: 2166-2172.
- [5] Baaziz M. (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New phytol.* 111: 403-411.
- [6] Agostini E., De Forchetti S. R. M., & Tigier H.A. (1999). Characterization and application an anionic peroxidase isoenzyme from *Brassica napus* roots. *Plant Peroxidase Newsletter* 13: 153-159.
- [7] Hopkala H., Jozefczyk A., Ginalska G. & Lobarzewski J. (1999). The influence of iodide ions on the activity of soluble peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter* 12:31-35.
- [8] Le Houerou H.N. & Monjouze A. (1965). Le rôle des opuntias dans l'économie nord-africaine. *Bull. de l'ENSA. Tunis.*
- [9] Majourhat K. (2002). Etude des aspects quantitatifs et qualitatifs des peroxydases et des polyphénoloxydases chez le palmier dattier. Contribution à l'étude de la diversité génétique de la palmeraie de Marrakech et des nouvelles plantations. Thèse de Doctorat ES Sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc).
- [10] Baaziz M., Aissam, F, Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I., Cheikh, R. (1994). Electrophoretic 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.
- [11] Aouad A., Baaziz M. and Mergoum M. (2000). Quantitative and qualitative aspects of peroxidase isoformes in Moroccan cereal varieties and their relationships with the in vitro growth potential. *Plant Peroxidase newsletter* 5, 13-21
- [12] Aouad (1997). Contribution à l'étude des peroxydases des céréales en relation avec la résistance à la sténité. Thèse de 3eme cycle és-sciences. Université cadi ayyad, Fac. Sci. Sémalia, Marrakech (Maroc)
- [13] Garcia-Carreno F. L. (1993). Peroxidase activity in the xerophytic « cardon » (*Pachycereus Pringlei*), a cactaceae of Sonoran desert of Mexico. *J. Plant Physiol.*, 142: 274-280.
- [14] Bakardjieva N., Christova N., Nenkova R. & Christov K. (1999). Calcium ion, proline, tryptophan, valin and alanine are effectors of the activity and thermostability of horseradish peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter*, 12: 47-52.
- [15] Gomez T.H., Pedreno M.A., Ros Barcelo A. and Ferrer M.A. (1994). Subcellular localization of basic peroxidase isoenzyme in Crisphead Lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119, 1276-1278.