

UN CYTOCHROME DE TYPE P₄₅₀ DANS LE SPADICE D'ARUM

VÉRONIQUE YÁHIEL, MICHÈLE GILEWICZ COTTE-MARTINON et GASTON DUCET

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, U. E. R. de Luminy 70, Route Léon Lachamp,
13288 Marseille, Cedex 2, France

(Received 14 January 1974)

Key Word Index—*Arum italicum*; Araceae; cytochrome P₄₅₀; cytochrome b₅; microsomes.

Abstract—A cytochrome of the P₄₅₀ type has been shown to exist in the microsomal fraction derived from *Arum* spadices. It appears to be present in greater quantities than the cytochrome b₅. It is transformed, partially at least, into a pigment of type P₄₂₀ under the action of salts and detergents.

Résumé—Un cytochrome de type P₄₅₀ a été mis en évidence dans la fraction microsome du spadice d'*Arum* et semble présent en quantité plus importante que le cytochrome b₅. Il se transforme au moins partiellement en pigment de type P₄₂₀ sous l'action d'agents chaotropiques.

INTRODUCTION

LA PRÉSENCE d'un cytochrome de type b (cytochrome b₅) dans la fraction microsomale de cellules végétales est connue depuis les travaux de Martin et Morton,¹ (qui lui donnent le nom de cytochrome b₃ mais ce constituant isolé par Hill est facilement soluble alors que le cytochrome b₅ microsomal n'est solubilisable qu'après traitement aux détergents ou aux protéases), de Bonner² et nous l'avons observée dans celle du tubercule de pomme de terre.³ Par contre, la présence d'un cytochrome de type P₄₅₀ semble beaucoup plus variable et n'a été signalée que dans quelques végétaux supérieurs⁴ et un champignon.⁵ Dans l'étude du spadice d'*Arum italicum* et *Arum maculatum*, nous avons observé sur la fraction microsomale, un pigment de type P₄₅₀ présent en quantité importante.

RESULTATS ET DISCUSSION

La fraction microsomale du spadice d'*Arum italicum*, après réduction à l'hydrosulfite montre dans un spectre de différence (réduit contre réduit en présence d'oxyde de carbone) une forte bande d'absorption présentant un maximum à 450 nm, accompagnée d'une bande plus faible, variable selon les échantillons, centrée à 420 nm.

La Fig. 1 montre les spectres de différence oxydé contre réduit à l'hydrosulfite (courbe 1) et réduit en présence d'oxyde de carbone contre réduit (courbe 2) de la fraction microsomale du spadice. Sur la courbe 1 la bande α du cytochrome de type b₅ est bien visible, centrée vers 560 nm, la bande β est de faible amplitude et la bande γ a un maximum à

¹ MARTIN, E. M. et MORTON, R. K. (1955) *Nature* **113**, 1976.

² BONNER, W. D. (1961) *Heamatin Enzymes (Int. Union Bioch. Symp.)* (LEMBERG, F. R. et MORTON, R. K., eds.), Vol. 19, p. 479, Pergamon Press, Oxford.

³ COTTE-MARTINON, M., DIANO, M., MEUNIER, D. et DUCET, G. (1969) *Bull. Soc. Fr. Phys. Vég.* **15**, 279.

⁴ MARKHAM, A., HATMAN, G. C. et PARKE, N. D. (1972) *Biochem. J.* **130**, 908.

⁵ AMBIKE, S. H., BAXTER, R. M. et ZAHID, N. D. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1953.

429–430 nm mais se présente déformée et asymétrique. Cette bande de Soret est certainement composite et doit correspondre à la présence du cytochrome de type b_5 et du pigment de type P_{450} (spectre d'oxydo-réduction). La courbe 2 montre une bande intense centrée à 450 nm accompagnée d'un maximum secondaire faible centré à 423 nm. Aucune absorption nette n'est visible dans la région des bandes α . Cette courbe est donc très semblable à celle qui correspond au spectre du P_{450} contaminé par un peu de P_{420} dans les microsomes des tissus animaux.

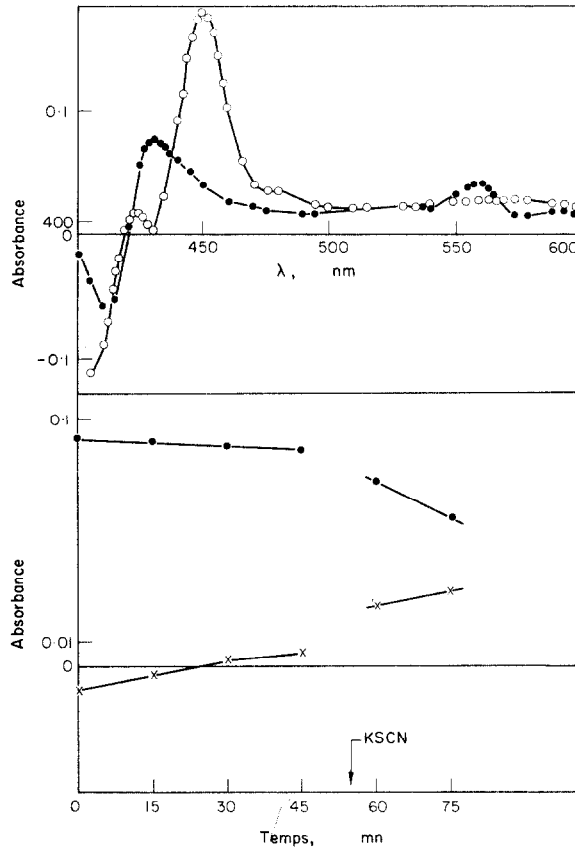


FIG. 1. SPECTRES DIFFÉRENTIELS DES CYTOCHROMES b_5 , P_{450} , P_{420} DANS LES MICROSOMES D'*Arum*. Trajet optique 10 mm 5 mg de protéines par ml. Courbe 1 ●—● réduit contre oxydé; courbe 2 ○—○ réduit contre réduit + CO.

FIG. 2. ACTIVATION DE LA CONVERSION DU CYTOCHROME P_{450} EN CYTOCHROME P_{420} PAR KSCN. Le spectre de différence (réduit contre réduit + CO a été enregistré aux temps 0, 15, 30 et 45 min. KSCN a été ajouté (concentration finale 0,8 M) à 55 minutes (flèche) puis le spectre de différence enregistré à 60 et 75 min. ●—● Absorbance à 450 nm par rapport à la ligne de base; ×—× absorbance à 420 nm par rapport à la ligne de base.

Avec les coefficients d'absorption donnés par Sato,⁶ il y aurait présents par mg de protéines microsomales environ: 310 p-mol de P_{450} , 30 p-mol de P_{420} et 210 p-mol de cytochrome b_5 d'après la bande α ou 230 p-mol de cytochrome b_5 d'après la bande de Soret. Cette dernière est fortement déformée, et la valeur du maximum n'est pas utilisable.

⁶ OMURA, T. et SATO, R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2370.

Le cytochrome P₄₅₀ de l'*Arum* est stable: il ne se dégrade pas pendant l'isolement des microsomes et durant les essais qui suivent. Des parties aliquotes de la fraction microsomale ont été congelées à -20° immédiatement après leur obtention. Elles présentent, après décongélation, le même spectre quantitatif que celui obtenu sur des échantillons frais et ceci même après trois mois de conservation à -20° . Le cytochrome P₄₅₀ peut être transformé sous l'action d'agents chaotropiques (sels, détergents) en cytochrome P₄₂₀.^{7,8} La Fig. 2 montre une diminution du P₄₅₀ et une augmentation du P₄₂₀ accélérée s par l'addition de sulfocyanure de potassium.

S'il y a transformation intégrale du P₄₅₀ en P₄₂₀, les courbes de la Figure 2 indiquent un rapport des coefficients d'extinction différent de celui des coefficients donnés par Sato. Cette différence peut être réelle si les P₄₅₀ et P₄₂₀ de l'*Arum* ont des coefficients d'absorption différents de ceux des microsomes des tissus animaux. Elle peut aussi être due à des modifications de spectre sous l'influence de la diffusion de lumière dans les suspensions microsomales.

Les spectres de la Fig. 1 ont été obtenus à partir de spadices provenant de spathes non ouvertes mais présentant déjà un début de déroulement. Les microsomes de spadices plus jeunes (spathes non déroulées) ont une concentration en P₄₅₀ plus faible (70 p-mol/mg de protéines). Il n'est pas possible de dire si les différences de teneur sont dues aux états de développement différents ou à la conservation des échantillons. En effet, les spathes ont été récoltées le même jour, classées par stades de développement et conservées en chambre froide. Les spathes les moins développées ont été analysées en dernier. L'analyse des microsomes du spadice d'*Arum maculatum* a également montré la présence en quantité importante de P₄₅₀ accompagnée d'un peu de P₄₂₀.

La maturation de la spathe s'accompagne d'une exaltation considérable de l'intensité respiratoire du spadice. Les mitochondries ont également une forte activité oxydative. La concentration importante de P₄₅₀ que nous avons observée dans les microsomes laisse penser qu'un système microsomal de transfert d'électrons utilisant l'oxygène moléculaire peut également être actif lors de la maturation du spadice.

METHODES EXPERIMENTALES

Préparation. Les spathes d'*Arum italicum* ou *Arum maculatum* ont été récoltées en mai. Environ 200 g de masques sont broyées dans un milieu contenant: Saccharose 0,3 M, EDTA*, 0,003 M pH 7,4, chlorhydrate de cystéine 0,005 M. Toutes les manipulations se font à $2-3^{\circ}$. Le broyat est maintenu à pH 7 par addition de Tris M et passé ensuite sur un broyeur à triple rouleaux de porcelaine Pascall. La suspension est centrifugée d'abord 5 mn à 1000 g pour éliminer une grande quantité d'amidon, puis 20 mn à 10000 g pour sédimenter une fraction de mitochondries et enfin 1 hr à 33000 g. Le culot de cette dernière centrifugation repris avec du saccharose 0,3 M, constitue la fraction microsomale.

Dosages. Les protéines sont estimées par la méthode du Biuret.⁹ Le cytochrome b₅ est mesuré à partir d'un spectre de différence (oxydé-réduit à l'hydrosulfite de sodium) obtenu avec un spectrophotomètre qui permet d'éliminer en partie l'effet de la diffusion de lumière dans les suspensions troubles. Les cytochromes P₄₅₀ et P₄₂₀ sont mesurés par spectrophotométrie de différence après réduction à l'hydrosulfite, les échantillons étant traités l'un par l'oxyde de carbone et l'autre par l'azote pendant environ 30 sec.

Pour les calculs, nous avons utilisé les coefficients d'extinction d'Omura et Sato: pour le P₄₅₀ et le P₄₂₀ respectivement: $91 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $110 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en prenant 490 nm comme point isobestique; pour le cytochrome b₅: bande α : $28,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bande γ : $161 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en prenant respectivement 575 ou 410 nm comme point isobestique.

La conversion du cytochrome P₄₅₀ en P₄₂₀ est suivie en fonction du temps sur l'échantillon réduit et traité à l'oxyde de carbone. L'accélération de la conversion est obtenue par addition de sulfocyanure de K 0,8 M final.

* Acide éthylène diamino tétracétique.

⁷ IMAI, Y. et SATO, R. (1967) *European J. Biochem.* **1**, 419.

⁸ AMBIKE, S. H. et BAXTER, R. H. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1959.

⁹ STIEKLAND, L. H. (1951) *Microbiol.* **5**, 698.