

PURIFICATION DE L'ALCOOL DESHYDROGÉNASE DE TOMATE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

M. NICOLAS et J. CROUZET

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc 34060, Montpellier Cedex, France

(Reçu le 6 avril 1979)

Key Word Index—*Lycopersicon esculentum*; Solanaceae; tomato; alcohol dehydrogenase; purification; affinity chromatography; SDS electrophoresis.

Abstract—Tomato alcohol dehydrogenase has been purified 99-fold by affinity chromatography on Blue Sepharose CL-6B with 37% yield. The enzyme so obtained is homogenous in polyacrylamide gel electrophoresis. By adding 20% glycerol to the extraction and purification buffers, an enzyme is obtained which is stable for several months at 4°. The molecular weight values determined by gel filtration (Sephadex G 200) and polyacrylamide gradient gel electrophoresis on one hand and by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate on the other, show that the enzyme exists in dimeric form.

INTRODUCTION

On admet que chez les végétaux supérieurs, l'alcool-deshydrogénase est susceptible de jouer un rôle important dans des réactions conduisant à la formation d'alcools ou de composés carbonylés [1-3]. Dans le fruit de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) où une telle activité a été mise en évidence par Rhodes [4], les résultats obtenus par certains auteurs ([5-9] semblent indiquer que cette enzyme pourrait intervenir dans le sens de la réduction des composés carbonylés. Inversement, Meigh *et al.* [10] montrent que l'addition d'alcools à des tranches de tomate maintenues en survie, entraîne l'oxydation de ces composés.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude de l'alcool-deshydrogénase de tomate, afin de tenter de préciser le rôle qu'elle est susceptible de jouer dans la formation des alcools et des composés carbonylés présents parmi les constituants volatils isolés à partir de ce fruit. Le présent travail traite de la purification de l'alcool-deshydrogénase de tomate par chromatographie d'affinité et précise certaines caractéristiques de cette enzyme et en particulier de sa structure quaternaire. L'isolement de cette enzyme a déjà fait l'objet d'une note préliminaire [11].

RÉSULTATS

Purification

L'alcool-deshydrogenase a été précipitée à partir de l'extrait brut obtenu comme indiqué dans la Partie expérimentale pour une concentration en sulfate d'ammonium comprise entre 35 et 65% de saturation. La dialyse conduisant à une perte de l'activité nous avons été conduit à éliminer l'excès de sulfate d'ammonium par chromatographie sur Sephadex G 25.

La préparation enzymatique ainsi obtenue a été déposée sur une colonne de DEAE cellulose (2 × 20 cm) équilibrée en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 0,25 mM dithiothreitol, 20% glycérol. Le solvant d'élution est constitué par le même tampon additionné de NaCl à une concentration qui varie linéairement de 0 à 0,50 M. L'enzyme est éluee pour une concentration en NaCl de 0,12 M.

La préparation enzymatique a été fixée sur une colonne de Blue Sepharose CL-6B (0,9 × 30 cm) équilibrée avec le tampon utilisé pour la chromatographie d'échange d'ion. Nous n'avons pas noté de modification du taux de fixation de l'enzyme en opérant avec le même tampon à pH 7. L'élution de l'enzyme est obtenue par addition du coenzyme NAD⁺ à la concentration finale de 0,5 mM (Fig. 1). L'utilisation du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,2 nécessite une concentration en coenzyme 10 fois plus forte (5 mM) pour obtenir le même résultat.

Par ailleurs, il est possible d'éluer l'enzyme par addition de KCl 0,5 M mais dans ce cas le pic correspondant à l'activité alcool-deshydrogénase est très étalé. De plus, l'enzyme est contaminée par des protéines étrangères comme le montre l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et nous notons une perte d'activité de 15% par rapport à l'élution en présence de NAD⁺ 0,5 mM.

Les différentes étapes de la purification sont résumées dans le Tableau 1. Par chromatographie d'affinité nous obtenons une enzyme purifiée 99 fois avec un rendement de 37%. L'analyse électrophorétique, à différentes concentrations en polyacrylamide, appliquée à la préparation enzymatique purifiée par chromatographie d'affinité montre l'existence d'une seule bande après révélation des protéines et de l'activité enzymatique.

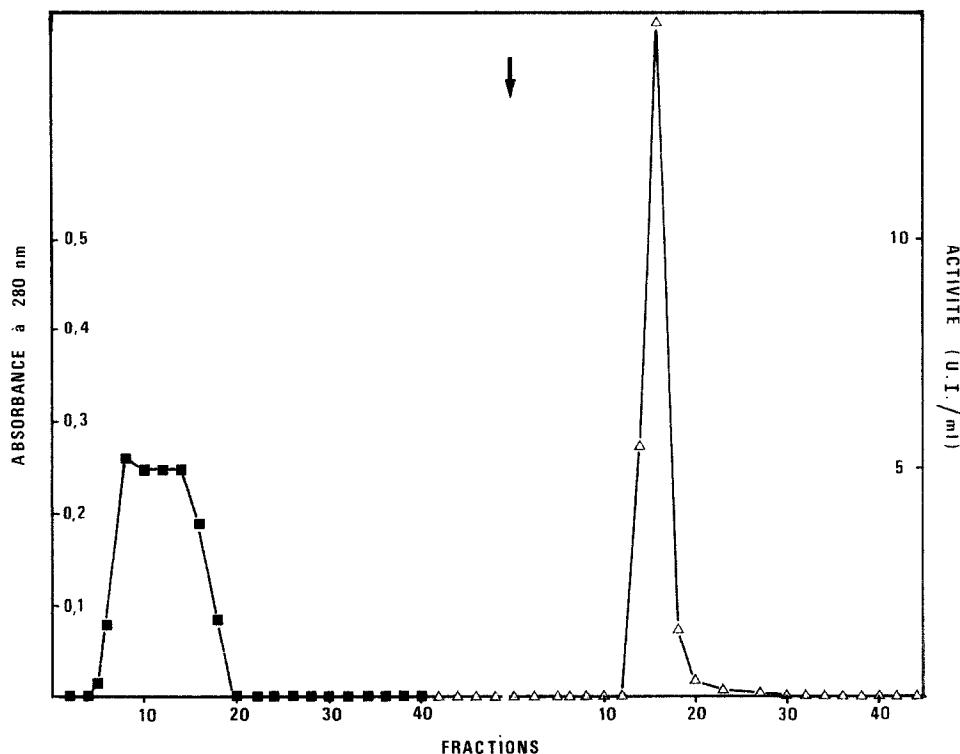


Fig. 1. Diagramme d'élution d'une solution d'alcool-deshydrogénase par chromatographie d'affinité sur Blue Sepharose CL-6B. ↓ Addition de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7, 4, 0, 25 mM dithiothréitol, 20% glycérat, contenant NAD⁺ 0,5 mM. ■—■, absorbance à 280 nm; △—△, activité alcool-deshydrogénase.

Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire apparent déterminé par chromatographie d'exclusion-filtration sur Sephadex G 200 [12] est de 100.000 ± 5.000 ($V_e/V_0 = 1,7$). Après électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide nous obtenons une seule bande dont le poids moléculaire est estimé à 95.000 ± 3.000 .

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été conduite selon les techniques de Weber et Osborn [13] et de Laemli [14]. Dans le premier cas nous obtenons des mobilités relatives par rapport au Blue Dextran qui sont respectivement de: inhibiteur trypsique (21.500) 0,71, α RNase (39.000) 0,56, alcool deshydrogénase monomère 0,54, ovalbumine (45.000) 0,53, sérum albumine bovine (68.000) 0,42, β RNase (155.000) 0,22, β' RNase (165.000) 0,20 ce qui conduit à une valeur du poids

moléculaire pour l'alcool deshydrogénase de tomate de 42.000 ± 2.000 . Dans le cas où on utilise la technique de Laemli les mobilités relatives pour les mêmes marqueurs sont respectivement 0,80, 0,58, 0,55, 0,40, 0,12, 0,11, la valeur obtenue pour l'alcool deshydrogénase est de 0,54 soit un poids moléculaire de 45.000 ± 2.000 .

L'addition simultanée aux tampons utilisés pour l'extraction et la purification de glycérat (20%) et de dithiothréitol (0,25 à 5 mM) nous a permis d'obtenir un effet protecteur supérieur à celui observé en présence d'un des substrats (éthanol 5%) et de dithiothréitol (0,25 à 5 mM [11]). Dans ces conditions, il est possible de conserver les préparations enzymatiques à 4° pendant plusieurs mois alors qu'en présence d'éthanol et de dithiothréitol nous avions à cette température une perte de 80% d'activité en 48 hr [11].

Tableau 1. Purification de l'alcool-deshydrogénase de tomate

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité totale (U.I.)	Activité spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	Rendement %
Extrait brut	581	484	0,83	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 35-65%	323,23	372	1,15	1,39	77
Sephadex G-25	284,2	330	1,16	1,4	68
DEAE-cellulose	59,98	254	4,23	5,1	53
Blue Sepharose Cl-6B	2,16	178	82,25	99,1	37

DISCUSSION

L'utilisation de colorants bleus à structure polyaromatique, possédant une conformation spatiale rappelant celle du NAD⁺ pour la purification de deshydrogénases, a été introduite depuis peu de temps [15-17]. En ce qui concerne les alcools deshydrogénases Thompson *et al.* [16] ont signalé que l'enzyme du foie de cheval était susceptible d'être liée par le Blue Dextran et qu'elle était éluee par le NAD⁺ ou l'AMP 1 mM ou bien par de fortes concentrations en sel (1.000 mM en NaCl).

Au cours du présent travail nous avons montré que l'alcool-deshydrogénase de tomate était susceptible de se lier au bleu de Cibacron à des pH compris entre 7 et 7,4 et qu'elle pouvait être éluee soit par NAD⁺ 0,5 mM soit par une solution de KCl 500 mM. Ces résultats sont en bon accord avec ceux observés par les auteurs précédemment cités [16] qui ont travaillé avec une alcool-deshydrogénase d'origine animale. Ils indiquent que l'alcool-deshydrogénase de tomate posséderait une super structure secondaire connue sous le nom de 'pli' dinucléotidique.

L'enzyme obtenue après élution en présence de NAD⁺ est homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Dans ces conditions, il nous est permis de déterminer le poids moléculaire par différentes méthodes.

Les techniques de gel filtration et d'électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide conduisent à des valeurs sensiblement voisines: 95.000-100.000. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium donne des valeurs comprises entre 42 et 45.000. Ces résultats semblent indiquer que l'alcool-deshydrogénase de tomate sous sa forme active serait un dérivé constitué de deux protomères possédant un poids moléculaire identique de 42 à 43.000. Ceci semble confirmé par les premiers résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de la composition en acides aminés de cette enzyme (Nicolas, M., résultats non publiés).

EXPÉRIMENTAL

Les tomates utilisées dans cette étude, cultivées en plein champ, nous ont été aimablement fournies soit par un producteur local (variétés Marmande-Saint-Pierre et F7) soit par la Station Expérimentale de la Conserve de Puyricard (variétés 24 a—et Roma VF). Le stade de maturité est le stade 'rouge' défini par Besford et Hobson [18]. Les substrats sont redistillés avant utilisation. Tous les réactifs ont été préparés avec de l'eau désionisée redistillée; la verrerie a été soumise à l'action d'un bain de HNO₃ dilué au demi (7 N) pour éliminer les traces de détergents.

Extraction de l'enzyme. Les tomates, préalablement rinçées à l'eau bidistillée et refroidies à 4°, sont homogénéisées à l'aide d'un ultra-turrax à vitesse maximale (30 sec × 2) dans un tampon Tris-HCl 1 M pH 7,4, 20% glycérol, 5 mM dithiothréitol, 1 mM EDTA, 2% Polyclar AT (P/V) (1 ml de tampon par gramme de fruit); le pH est ajusté à pH 7,4 si nécessaire.

L'homogénat obtenu est centrifugé à 5.000 g pendant 15 min, le surnageant est filtré sur gaze et traité par une solution de CaCl₂ 1 M (5% du volume) selon la méthode de Korach [19] afin d'éliminer les substances pectiques. Après

agitation et repos de 15 min, la solution est centrifugée à 5.000 g pendant 10 min. Le surnageant, filtré sur gaze, est utilisé pour la purification ultérieure de l'enzyme et constitue notre 'extrait brut'.

Essais enzymatiques. Les activités enzymatiques ont été déterminées en mesurant les variations d'absorbance du NADH à 340 nm (cellule de 1 cm de trajet optique) et à une température de 25°. La réaction directe correspond à la réduction de l'acétaldéhyde, le NADH agissant comme coenzyme, au cours de la réaction inverse l'éthanol est oxydé en présence de NAD⁺. Pour la réaction directe, on utilise pour chaque détermination de l'activité: 150 µ mol de tampon phosphates de sodium 50 mM pH 5,8, 0,3 µ mol d'acétaldéhyde, un volume d'extrait enzymatique (10-100 µ l) et de l'eau pour un volume final de 3 ml. Dans le cas de la réaction inverse, on utilise pour le même volume final, 150 µ mol de tampon glycine-NaOH 50 mM pH 9,4, 0,3 µ mol d'éthanol absolu, un volume d'extrait enzymatique (10 à 100 µ l).

La cuve témoin comprend les mêmes réactifs et un volume identique de solution enzymatique inactivée thermiquement. L'omission successive d'un des substrats ou de l'extrait enzymatique permet de vérifier que la réaction est nulle en leur absence. L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une micromole de substrat par minute, dans les conditions décrites ci-dessus.

Dosage des protéines. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry [20] après avoir préalablement réalisé une précipitation à l'acide trichloracétique 10% selon la méthode de Clark et Jakoby [21]. Après chromatographie, les protéines des éluats sont évaluées par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide. L'opération est réalisée à 4° en tampon Tris-glycine pH 8,3 suivant une technique modifiée de Davies [22], en utilisant des gels à 5,0 7,0 et 10% de polyacrylamide et contenant 20% de glycérol pour éviter une dénaturation de l'enzyme [23]. La révélation des protéines se fait par le Bleu de Coomassie. L'activité enzymatique est détectée selon la méthode décrite par Hatanaka [3] en utilisant le bleu de paranitrotétrazolium avec l'éthanol comme substrat et le NAD⁺ comme co-enzyme.

Détermination du poids moléculaire. Chromatographie d'exclusion—filtration sur Sephadex G-200. On utilise la méthode d'Andrews [12]. L'échantillon enzymatique est filtré à travers une colonne de gel Sephadex G-200 (1,5 × 90 cm) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 0,25 mM dithiothréitol, 20% glycérol. L'étalonnage de la colonne a été réalisé avec les protéines suivantes: cytochrome c (12500), ovalbumine (45.000) sérum albumine bovine monomère (67.000) et dimère (134.000), γ globuline (160.000).

Electrophorèse en gel avec gradient de polyacrylamide (P.A.A. 4/30-Pharmacia). La méthode décrite dans la documentation technique de Pharmacia a été appliquée dans cette étude. L'extrait enzymatique et les protéines étalons sont déposés au sommet du gel équilibré en tampon Tris-borate pH 8,35. La migration est effectuée à 4° durant 16 hr et sous une tension de 125 V. Les protéines et l'activité enzymatique sont révélées selon la technique décrite ci-dessus.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS). Deux techniques ont été utilisées: Méthode de Weber et Osborn [13] 'Disc electrophoresis'. 10 µ g de chaque protéine de référence et l'échantillon enzymatique, incubés 3 min à 90° avec 0,1% de SDS, 1,5% de dithiothréitol, 5%

de glycérol et 0,1% de bleu de bromophénol, sont déposés au sommet gel de polyacrylamide à 5% ($0,6 \times 8$ cm) en présence de tampon phosphates de sodium 0,1 M pH 7,2 contenant 0,1% de SDS. La migration est effectuée sous courant d'intensité constante et égale à 8 mA par tube à 15° pendant 3-4 hr.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% selon la méthode de Laemmli [14]. Les échantillons protéique et enzymatique sont au préalable précipités en présence d'acide trichloracétique à 10%, lavés 3 fois par un mélange Et₂O-EtOH (3:1), séchés dans un dessicateur pendant 1 hr et repris dans un petit volume de tampon de Laemmli (100 µl maximum). Ces échantillons reçoivent le même traitement thermique que celui décrit ci-dessus. Nous avons utilisé une plaque de polyacrylamide à 10% de 14 cm de longueur surmontée par un gel de concentration de 1 cm de hauteur. L'électrophorèse est réalisée à la température du laboratoire, pendant 5 hr et avec un courant d'intensité constante de 20 mA par gel. Après électrophorèse, les protéines sont révélées, pour ces deux méthodes, par le Bleu de Coomassie. Les protéines de référence utilisées sont: inhibiteur trypsique de soja (T.I. = 21.500), ovalbumine (OVA = 45.000), sérum albumine bovine (BSA = 68.000) et la RNA polymérase (core enzyme) d'*Escherichia coli* (sous unités: α = 39.000; β = 155.000; β^1 = 165.000).

Remerciements—Les auteurs remercient la Station Expérimentale de la Conserve de Puéricard [13] et Monsieur M. Clement pour la fourniture du matériel végétal utilisé dans cette étude.

REFERENCES

- Erikson C. (1968) *J. Food Sci.* **33**, 525.
- Bruemmer J. and Roe, B. (1971) *J. Agric. Food Chem.* **19**, 266.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Tomohiro, S. and Yamashita, H. (1974) *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1835.
- Rhodes, M. J. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 307.
- Schormuller, J. und Grosch, W. (1965) *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **126**, 38.
- Kazeniac, S. and Hall, R. (1970) *J. Food Sci.* **35**, 519.
- Stone, E., Hall, R. and Kazeniac, S. (1975) *J. Food Sci.* **40**, 1138.
- Sieso, V., Nicolas, M., Seck, S. and Crouzet, J. (1976) *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2349.
- Yu, M., Olson, L. and Salunkhe, D. (1968) *Phytochemistry* **7**, 561.
- Meigh, D., Pratt, H. K. and Cole, C. (1966) *Nature* **211**, 419.
- Nicolas, M. and Crouzet, J. (1976) *C.R.*, **t283** Sér. D, 559.
- Andrews, P. (1964) *Biochem. J.* **91**, 222.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406.
- Laemmli, U. (1970) *Nature* **227**, 680.
- Rothe, G., Corper, A. and Bacher, W. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1701.
- Thompson, S., Cass, K. and Stellwagen, E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 669.
- Stellwagen, E., Cass, R., Thompson, S. and Woody, M. (1975) *Nature* **257**, 716.
- Besford, R. and Hobson, G. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1255.
- Korach, S. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 335.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Clark, J. and Jakoby, W. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 6055.
- Davis, B. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404.
- Kautsky, M. and Hagerman, D. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1978.