

## PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS D'UNE PROTÉASE NEUTRE DE *TRICHOLOMA COLUMBETTA*

JEAN-LOUIS LAMAISSON, HENRI POURRAT\* et AIMEE POURRAT†

\* Chimie Végétale et Chimie des Fermentations, et † Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, B.P. 38, 63001 Clermont-Ferrand Cédex, France

(Reçu révisé le 1 novembre 1979)

**Key Word Index**—*Tricholoma columbetta*; Basidiomycete; fruiting bodies; proteolytic enzyme.

**Abstract**—An endopeptidase was partially purified from the fruiting bodies of *Tricholoma columbetta*. The enzyme, MW ca 14 500, pH optimum 7.0, hydrolyses the natural substrates, casein and fibrin, but is inactive with the usual synthetic substrates. It is relatively insensitive to most inhibitors of proteases except for high concentrations of KCN, whereas high concentrations of EDTA greatly increase its caseinolytic activity.

### INTRODUCTION

Nous avons précédemment trouvé des activités protéolytiques importantes dans les carpophores de nombreuses espèces de macromycètes sur plus de 400 étudiées [1–3]. Les protéases de deux champignons, *Tricholoma equestre* [4] et *Armillaria mellea* [5] avaient été purifiées par de précédents auteurs. L'enzyme de *A. mellea* a, depuis lors, fait l'objet de nombreuses études tant du point de vue de ses caractères que de sa spécificité [6–10]. Nous avons montré que l'activité protéolytique relative des carpophores de *A. mellea* est pourtant nettement inférieure à celle de *T. equestre* et à celles de nombreux autres champignons [2]. En raison de récoltes abondantes, l'un d'entre eux, *Tricholoma columbetta*, a été choisi dans le but de préparer une fraction à haute activité protéolytique dont nous avons étudié les propriétés.

### RÉSULTATS

L'enzyme de *T. columbetta* a été purifiée par dialyse de l'extrait aqueux suivie de deux chromatographies successives sur Sephadex A 50 et sur Sephadex G 100 (Fig. 1 et Tableau 1). Par chromatographie sur Sephadex A 50 la majeure partie de l'activité enzymatique est contenue dans des fractions incolores éluées entre 20 et 50 ml. Les fractions suivantes, très colorées, éluées par addition de NaCl à la solution tampon, sont pratiquement inactives. On doit noter que des essais de fractionnement effectués avec du Sephadex C 50 se sont soldés par des échecs. Sur Sephadex G 100 la presque totalité de l'activité enzymatique est comprise dans les fractions éluées entre 60 et 100 ml. Les fractions suivantes de 100 à 200 ml, qui renferment environ la moitié des protéines totales restantes, n'ont aucune activité et ont été éliminées.

L'enzyme purifiée a un PM de 14 500 environ, mesuré comparativement à ceux d'autres protéines sur colonne de Sephadex G100. Par électrofocalisation sur plaque de gel de polyacrylamide elle se sépare en une bande très nettement prépondérante de pI 9,3 et deux

bandes mineures de pI 7,3 et 7,0. La bande majeure de pI 9,3 renferme la totalité de l'activité protéolytique car l'enzyme purifiée a été soumise à une électrophorèse sur acétate de cellulose et après découpe du support seul le morceau correspondant à cette bande a montré une telle activité.

L'enzyme en solution aqueuse a comme maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  277–278 nm et comme extinction spécifique  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  à 280 nm = 7,20. Elle a un pH optimal de 7,0 et elle présente une activité demi-maximale à pH 5,5 et 9,0. La protéase de *T. columbetta* est donc une protéase neutre. Son énergie d'activation est  $\Delta E = 0,845$  kcal/sec mol et on observe une diminution d'environ 50% de son activité lorsqu'elle est exposée à 70° pendant 15 min.

L'enzyme a de très fortes activités caséinolytique et fibrinolytique. Après dessalage sur Sephadex G 25 son activité caséinolytique relative a pu être mesurée. Elle s'élève à 138 nkat/mg et s'avère très nettement supérieure à celle de la trypsine 12,5 nkat/mg et à celle de la nagarse 14,3 nkat/mg. Sur la fibrine son activité est environ 50 fois plus élevée que celle de la trypsine. Comme ces deux enzymes, elle s'est révélée totalement inactive sur l'albumine d'oeuf. Elle ne possède aucune activité estérasique sur le BAEE contrairement à la trypsine ni sur l'ATEE contrairement à la chymotrypsine.

La protéase neutre de *T. columbetta* est donc une endopeptidase mais elle ne réagit pas aux inhibiteurs usuels des protéases. Elle est insensible à des agents tels que le DFP, la *p*-nitraniline en solution saturée, le *p*-nitrophénol ou la cystéine à la concentration  $10^{-2}$ . Ses sites actifs ne comportent donc certainement pas de groupement —SH. Elle est seulement inhibée par CN<sup>−</sup> qui provoque une diminution d'activité d'environ 50% à la concentration  $10^{-3}$ . Par contre elle est insensible à l'action d'un réactif chélatant des métaux tel que l'EDTA jusqu'à la concentration  $10^{-2}$ , mais très curieusement de plus fortes concentrations en EDTA augmentent très notablement son activité caséinolytique. Celle-ci est en effet augmentée de près de 100% dans une solution d'EDTA 0,1 M.

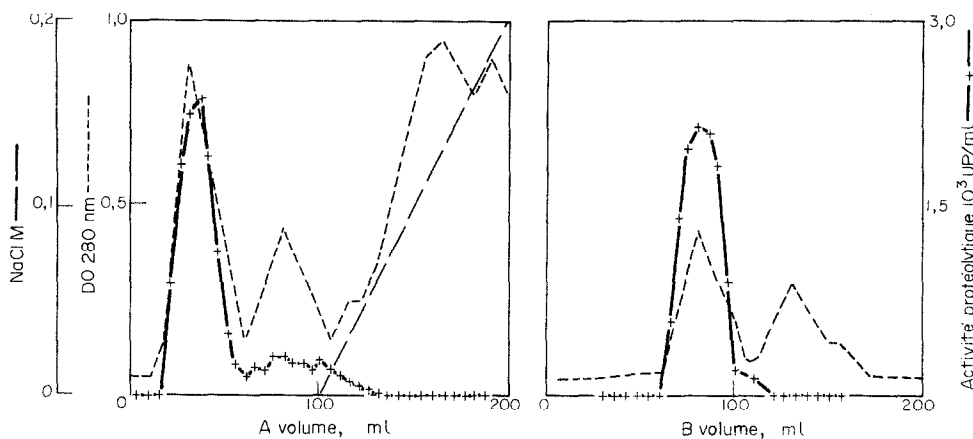


Fig. 1. Séparation de la protéase. A, Sephadex A 50; B, Sephadex G 100.

### DISCUSSION

L'endopeptidase de *T. columbetta* est relativement pure dans les carpophores car nous avons pu augmenter de 27 fois seulement son activité, avec un rendement de 50%. L'extrait non dialysable possède d'ailleurs une activité caséinolytique relative de 9 nkat/mg très comparable à celle d'enzymes commerciales telles que la trypsine et la nagarse. On pourrait arrêter la purification de la protéase de *T. columbetta* à ce premier stade si certaines de ses propriétés originales s'avéraient intéressantes en pratique. Certains de ses caractères sont très voisins de ceux de l'enzyme de *A. mellea*, endopeptidase à propriétés caséinolytiques et fibrinolytiques de PM 14 000 [10]. Mais son pI de 9,3 est particulier et elle n'est pas inhibée par l'EDTA contrairement à la protéase de *A. mellea*. Il sera nécessaire d'étudier par la suite sa spécificité d'action car elle pourrait être différente de celle de la protéase d'*A. mellea* qui est limitée au pont peptidique Pro-Lys.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

**Matières premières.** Les enzymes de référence sont des endopeptidases, une trypsine [EC 3.4.21.4] d'activité spécifique 20 nkat/mg de protéine (act. rel. 12,5 nkat/mg) et une BPN<sup>1</sup> [EC 3.4.21.14], la nagarse d'activité spécifique 36 nkat/mg de protéine (act. rel. 14,3 nkat/mg). Les champignons recueillis en bon état et identifiés par nos soins ont été congelés aussitôt après la récolte puis lyophilisés.

**Purification de l'enzyme.** 20 g de poudre de carpophores lyophilisés sont extraits par 300 ml d'H<sub>2</sub>O à 35–40° sous agitation pendant 15 min. L'extrait aq., clarifié par double filtration sur verre fritté, est dialysé avec de l'eau pendant 48 hr à 10–12°. La fraction non dialysable est filtrée, congelée puis lyophilisée. Le lyophilisat est repris par 5 ml de tampon A (phosphate 16,7 mM, pH 7,2). L'échantillon ainsi préparé est chromatographié sur colonne de Sephadex A50 (2,5 × 23 cm) équilibrée puis éluée avec du tampon A et des fractions de 5 ml sont recueillies. Les fractions actives sont collectées puis passées sur colonne de Sephadex G25 (2,5 × 18 cm). La fraction active dessalée, éluée entre 25 et 50 ml, est ensuite congelée, puis lyophilisée. L'activité enzymatique relative est alors calculée d'après le poids du lyophilisat. Le lyophilisat repris par 5 ml de tampon A est ensuite appliqué sur une colonne de Sephadex G100 (2,5 × 30 cm) équilibrée puis éluée par le tampon A et des fractions de 5 ml sont recueillies. Les fractions actives sont collectées, dessalées, congelées, lyophilisées et l'activité enzymatique relative calculée comme précédemment.

**Electrofocalisation.** L'électrofocalisation a été réalisée à l'aide d'un appareil LKB 2117 Multiphor sur plaque prête à l'emploi de gel de polyacrylamide-ampholine pH 3,5–9,5 selon la technique habituellement préconisée: solution anode H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, solution cathode NaOH 1 M, dépôts de 15 µl d'enzyme en solution à 5 mg/ml d'H<sub>2</sub>O; valeurs affichées sur le potentiomètre = P = 15 W; U = 0,75 kV; I = 25 mA; durée de l'expérience 1 hr. A la fin de l'expérience les pH ont été mesurés sur toute la largeur du gel à l'aide d'une électrode de surface. Les pI ont été déterminés en reportant sur la courbe des pH les distances de migration des protéines révélées par le bleu de Coomassie.

Tableau 1. Purification de la protéase

Etape	Extrait sec (mg)	Activité totale (unités) nkat	Activité relative (unités/mg)	Protéines totales (mg)	Act. sp. (unités/mg protéines)	Taux de purification	Rendement (%)
Extrait aqueux	8500	5200	0,6	960	5,4	1	100
Extrait non dialysable	480	4340	9,0	380	11,6	2	83
Fraction Sephadex A50	40	3100	77,5	35	88,5	16	60
Fraction Sephadex G100	19	2620	138	18	145	27	50

Unité = mol tyrosine libérée/sec. Le procédé de purification est décrit dans la Partie Expérimentale.

**Electrophorèse.** L'enzyme purifiée a été soumise, à la concentration de 50 mg/ml, à une électrophorèse sur acétate de cellulose en tampon véronal sodé 0,04 M, pH 9,25. Durée de la migration: 1 hr, ddp = 20 V/cm. Les bandes d'acétate de cellulose ont été découpées d'après une bande témoin révélée par le bleu de Coomassie et l'activité caséinolytique de tous les morceaux de support a été contrôlée.

**Dosages.** L'activité caséinolytique a été déterminée d'après la méthode décrite dans la réf. [1], mais la température d'incubation de 25° a été préférée à celle de 30°. L'unité protéolytique (UP) correspondant à 1 µg de tyrosine libérée par min a été convertie en Katal, soit 1 mol de tyrosine produite par sec selon la relation 1 nkat = 11,22 UP. Les dosages d'activités estérases ont été effectués d'après les techniques de la Pharmacopée française pour la trypsine [EC 3.4.21.4] avec le BAEE et pour la chymotrypsine [EC 3.4.21.1] avec l'ATEE [11]. Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry [12], après précipitation trichloracétique pour l'extrait brut et dans le cas des éluats de chromatographie par spectrophotométrie [3]. La sérum albumine bovine cristallisée, desséchée avant emploi, a été utilisée comme étalon.

**Détermination du poids moléculaire (PM).** Une colonne de Sephadex G100 (2,5×30 cm) équilibrée avec du tampon acétate (0,1 M; pH 6,8) a été calibrée avec la sérum albumine bovine (PM 67 000) l'ovalbumine (45 000), l'α-chymotrypsine (22 000) et le cytochrome c (12 500). Le volume de la colonne a été déterminé avec le bleu Dextran 2000. Des fractions de 5 ml ont été recueillies et les protéines

ont été détectées en mesurant l'absorption à 280 ou à 410 nm pour le cytochrome c.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Lamaison, J. L., Pourrat, H. et Pourrat A. (1975) *Ann. Pharm. Fr.* **33**, 701.
2. Lamaison, J. L. (1976) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **123**, 119.
3. Lamaison, J. L., Regerat, F. et Pourrat H. (1978) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **125**, 425.
4. Estola, E., Elo, J. et Karkkainen, V. J. (1955) *Ann. Med. Exp. Fenn.* **33**, 384.
5. Broadbent, D., Turner, R. W. et Walton, P. L. (1971) *Ger. Offen.* 2047, 317, 15 Apr. 1971 *Chem. Abstr.* **75**, 15513).
6. Doonan, S. et al. (1974) *FEBS Letters* **38**, 229.
7. Doonan, S. et Fahmy, H. M. A. (1975) *Eur. J. Biochem.* **56**, 421.
8. Hunneyball, I. M. et Stanworth, D. R. (1975) *Immunology* **29**, 921.
9. Lewis, W. G., Basford, J. M. et Walton, P. L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **522**, 557.
10. Walton, P. L., Jones, C. et Jackson, S. J. (1978) *Progr. Chem. Fibrinolysis Thrombolysis* **3**, 373.
11. (1965) *Pharmacopée française* 8ème éd., pp. 296 et 1241. Maisonneuve Ed., Moulins-lès-Metz.
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
13. Warburg, O. et Christian, W. (1948) *Biochem. Z.* **310**, 374.