

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *L'activité glutamate déshydrogénase dans les tissus foliaires du Chenopodium quinoa Wild.* Note (*) de M^{lle} Marie-France Lefranc, M^{me} Margareta Welander et M. Jorge Vieira da Silva, présentée par M. Lucien Plantefol.

Les conditions d'extraction et de dosage de la glutamate déshydrogénase des tissus foliaires du *Chenopodium quinoa* Wild., ont été déterminées. L'enzyme est sensible aux dilutions, qui augmentent l'activité spécifique, et au NaCl qui peut aussi l'augmenter. Par électrophorèse trois enzymes différentes ont été mises en évidence, dont deux sont NAD⁺ indépendantes. Leurs variations avec l'âge des tissus foliaires sont différentes.

La glutamate déshydrogénase (GDH) des végétaux supérieurs a été relativement peu étudiée [(²), (⁵), (⁹) à (¹¹)]. Dans le cadre d'une étude des effets de l'environnement sur des enzymes du métabolisme azoté, il est apparu nécessaire de déterminer les conditions d'extraction de l'enzyme ainsi que les variations de son activité, dans les tissus foliaires du *Chenopodium quinoa* Wild.

MÉTHODOLOGIE. — Les plantes sont semées dans des terrines contenant de la terre et placées : soit dans une chambre conditionnée à 20 °C le jour (18 h) et à 12 °C la nuit, l'éclairement étant d'environ 10 000 lx ; soit (pour des études concernant les séparations d'enzymes) dans une chambre conditionnée, aux mêmes températures, mais ayant un éclairement de 18 000 lx pendant 8 h ; soit encore en serre à 25 °C et à la lumière naturelle.

Les prélèvements des échantillons foliaires sont effectués entre 30 et 40 jours de culture. Pour la détermination électrophorétique des enzymes, deux lots sont recueillis : les feuilles supérieures (feuilles jeunes) et les feuilles inférieures (feuilles vieilles). Pour les autres études, un seul lot comprenant les feuilles moyennes est récolté.

Des études préliminaires (⁶) ont révélé la nécessité d'utiliser des procédés d'extraction protégeant les enzymes de l'action des composés phénoliques [(¹), (⁷)]. Ainsi, après congélation dans l'azote liquide, les échantillons sont broyés dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0 (0,25 g de matière fraîche par millilitre de tampon), contenant soit du polyclar AT (¹⁵) à raison de 1 g par gramme de tissu et du mercaptoéthanol à 20 mM (études sur les séparations d'enzymes), soit du métabisulfite de potassium ou de sodium à 5 mM. Après filtration sur deux couches de gaze et centrifugation entre 20 000 et 40 000 g, le surnageant est traité au sulfate d'ammonium et la fraction précipitant entre 10 et 60 % de la quantité de sulfate d'ammonium saturante est dialysée contre du tampon phosphate 0,01 M, pH 7,0 renfermant du mercaptoéthanol ou du métabisulfite à 5 mM. Pour l'étude électrophorétique des enzymes, le surnageant est directement purifié par passage sur une colonne de « Sephadex G 25 ».

Dans les déterminations des teneurs en protéines [(⁸), (¹²)], seuls les extraits dialysés contre du métabisulfite peuvent être utilisés directement. Les extraits obtenus

17 MARS 1972
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 5326 Biochim

LEFRANC

dans les autres conditions doivent être préalablement traités avec de l'acide trichloroacétique (10 %) pour précipiter les protéines.

L'activité enzymatique est décelée au spectrophotomètre selon la méthode proposée par Schmidt (¹³), mais sans utilisation d'EDTA, car celui-ci conduit, dans nos expériences, à une perte d'activité de 28 %.

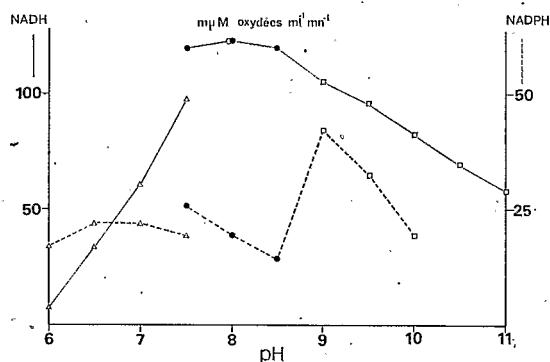


Fig. 1

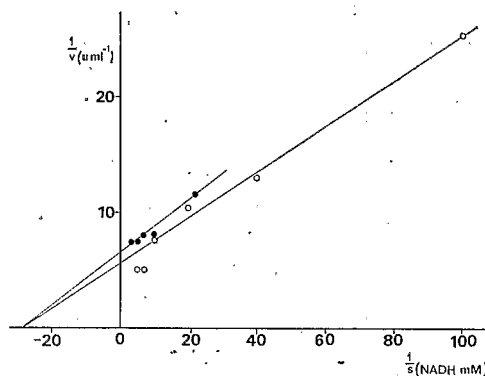


Fig. 2

Fig. 1. — Effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité de la GDH. Δ tampon phosphate ; \bullet tampon Tris-HCl ; \circ tampon triéthanolamine ; \square tampon glycine-NaOH.

Fig. 2. — Représentation de Lineweaver et Burk qui permet d'obtenir le K_m apparent pour le NADH : $3,5 \times 10^{-5}$ M. \bullet 1^{re} série de valeurs ; \circ 2^e série de valeurs.

RÉSULTATS SPECTROPHOTOMÉTRIQUES. — Pour vérifier l'influence du pH sur l'activité de la GDH (oxydation du NADH ou du NADPH), une gamme de tampons entre pH 6,0 et pH 11,0, a été utilisée et l'examen de la figure 1 montre que le pH optimal est, pour l'oxydation du NADH, de 8,0, et pour l'oxydation du NADPH, de 9,0 [ce dernier résultat est différent de celui trouvé par Pahlich et Joy (¹¹) dans des racines de Pois].

Le K_m apparent pour le NADH, établi dans deux expériences, est de $3,5 \times 10^{-5}$ M (fig. 2), ce qui concorde avec les résultats obtenus par Bulen (²).

La variation de l'activité de la GDH en fonction de la concentration de l'extrait présente deux pentes différentes (fig. 3), ce qui peut être dû à des variations de l'état d'association des monomères, comme Pahlich et Joy (¹¹) l'ont suggéré.

Florkin et Schoffeniels (⁴) avaient montré que le NaCl augmentait l'activité de la GDH des tissus de Crustacés euryhalins. Cet effet pourrait être dû à une dissociation de l'enzyme, les résultats variant avec le tampon utilisé (fig. 4).

EXPLICATION DE LA PLANCHE

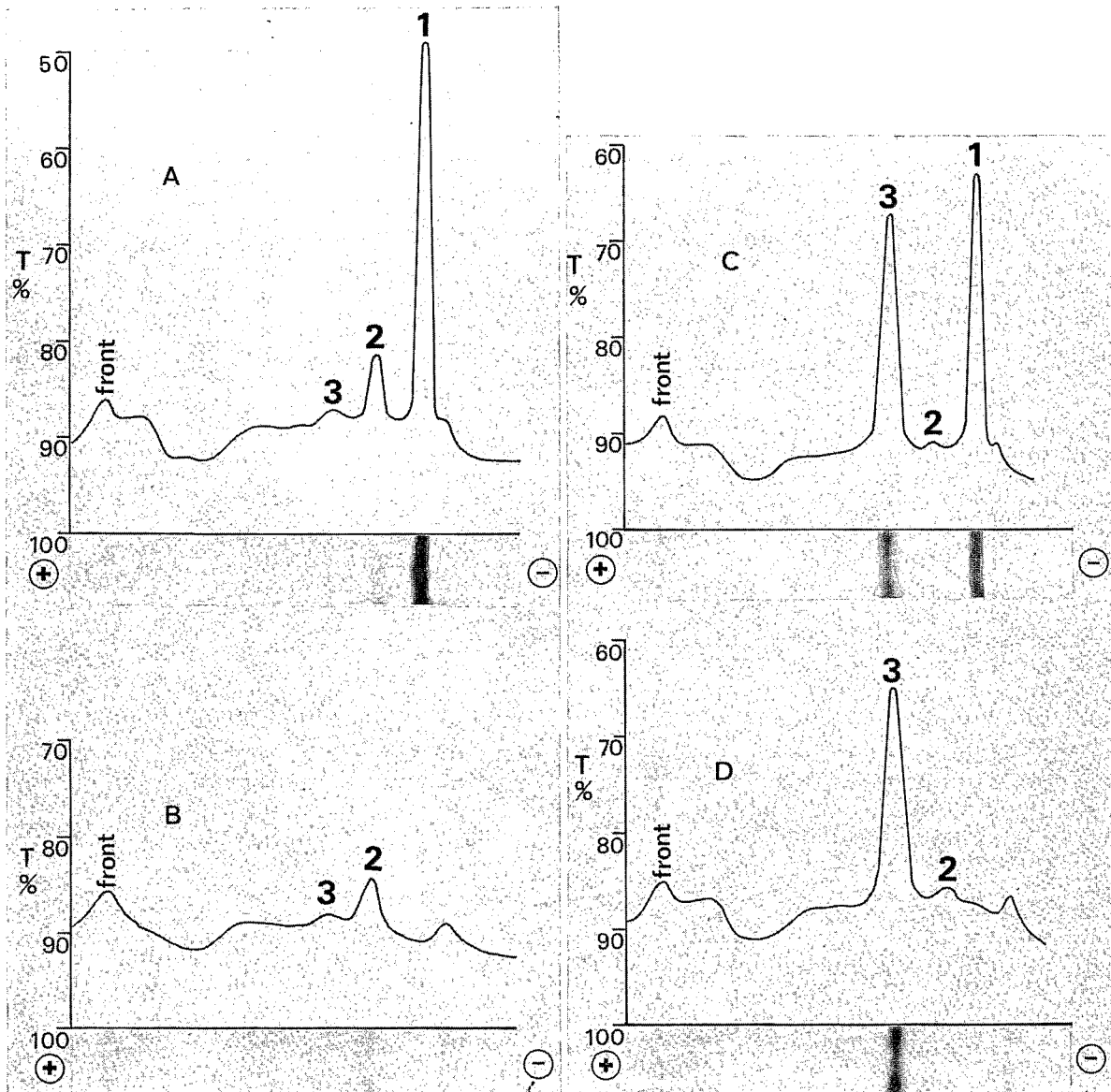
Photographies et tracés densitométriques des électrophorogrammes de GDH. Les gels ont reçu 100 μ l d'extrait chacun, ce qui correspond à 142,4 μ g de protéine pour les électrophorogrammes A et B; et à 75,2 μ g de protéine pour les électrophorogrammes C et D.

Fig. A. — Extrait de feuilles jeunes. Révélation avec NAD^+ .

Fig. B. — Extrait de feuilles jeunes. Révélation sans NAD^+ .

Fig. C. — Extrait de feuilles âgées. Révélation avec NAD^+ .

Fig. D. — Extrait de feuilles âgées. Révélation sans NAD^+ .



Dans le culot résultant de l'extraction de l'enzyme il est encore possible de retrouver une activité GDH, par préparation d'une poudre acétonique, redissoute dans du tampon contenant 1 % de « Triton X 100 ». Le rapport de l'activité avec NADPH et avec NADH comme coenzymes, est de 0,42, aussi bien dans l'extrait acétonique que dans le surnageant, ce qui paraît prouver que la GDH liée aux structures cellulaires est semblable à celle extraite par le tampon indiqué. Des résultats contradictoires ont été présentés par Leech et Kirk⁽⁵⁾ et Nikolova Tsenova⁽¹⁰⁾ quant à la GDH des chloroplastes et mitochondries.

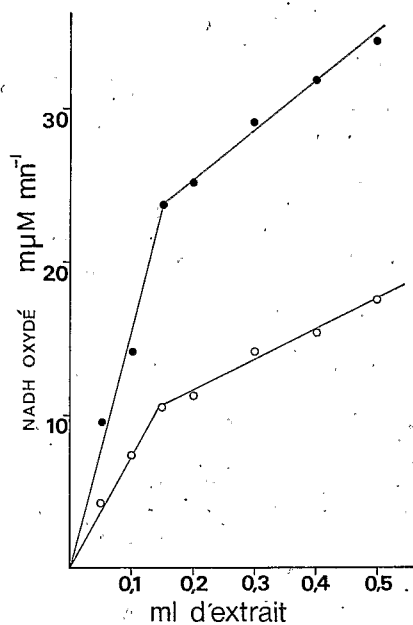


Fig. 3

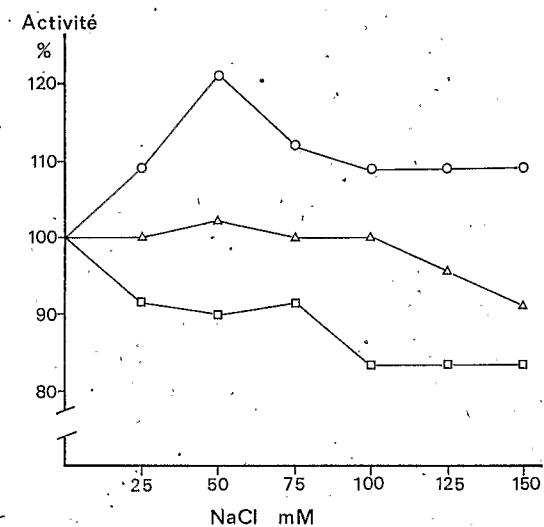


Fig. 4

Fig. 3. — Activité de la GDH en fonction de la quantité d'extrait dans un volume de réaction de 3 ml. ● plantes jeunes, concentration du NADH 2×10^{-4} M ; ○ plantes plus âgées, concentration du NADH 5×10^{-4} M.

Fig. 4. — Effet de la concentration en NaCl du milieu de réaction, sur l'activité de la GDH, en pourcentage des témoins sans NaCl. L'activité sans NaCl est : 108 m. unités. ml⁻¹ pour le tampon phosphate (○) ; 117 m. unités. ml⁻¹ pour le tampon Tris-HCl (△) ; et pour le tampon triéthanolamine (□) 120 m. unités. ml⁻¹.

ELECTROPHORÈSE DES ENZYMES EFFECTUANT L'OXYDATION DU GLUTAMATE (DÉSAMINATION). — L'électrophorèse des enzymes, réalisée selon Davis⁽³⁾, permet de révéler, par la méthode de Macko et coll.⁽⁹⁾, trois bandes distinctes correspondant à l'oxydation du glutamate (*pl.*). Deux de ces bandes peuvent cependant être mises en évidence sans addition de NAD⁺, ce qui montre l'existence de deux enzymes (NAD⁺ indépendantes) oxydant le glutamate, comme l'a trouvé Tsukamoto⁽¹⁴⁾.

L'activité relative de ces enzymes varie avec l'âge de la feuille. Ainsi la GDH (NAD⁺ dépendante), dont une seule bande est présente dans le gel, a une activité qui décroît proportionnellement à la diminution de protéine due à la sénescence

(pl., fig. A et C). Pour les deux autres enzymes, la situation est différente, l'une ayant le même comportement que la GDH (NAD^+), tandis que la plus mobile augmente considérablement d'activité avec le vieillissement.

CONCLUSIONS. — Ces études font apparaître que l'activité de la GDH peut être influencée par l'état des tissus et par les conditions de dosage : les différents tampons, le NaCl ou la dilution de l'extrait peuvent avoir des effets qui risquent de donner une fausse image des variations d'activité dans les tissus vivants. Il se peut ainsi que la régulation de l'enzyme *in vivo* soit, au moins en partie, sous l'influence de la concentration ionique et de la teneur en eau.

L'étude électrophorétique témoigne des variations importantes et indépendantes des enzymes, NAD^+ dépendante, et NAD^+ indépendantes, qui doivent être prises en considération dans les travaux concernant la synthèse et la destruction du glutamate.

(*) Séance du 10 janvier 1972.

- (1) J. W. ANDERSON, *Phytochemistry*, 7, 1968, p. 1973.
- (2) W. A. BULEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 1956, p. 173.
- (3) B. J. DAVIS, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 121, 1964, p. 404.
- (4) M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, *Molecular Approaches to Ecology*, New York, 1969.
- (5) R. M. LEECH et P. R. KIRK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 1968, p. 685.
- (6) M. F. LEFRANC, *Rapport du DEA de Biochimie*, Université de Paris VII, 1971.
- (7) W. D. LOOMIS et J. BATTAILE, *Phytochemistry*, 5, 1968, p. 423.
- (8) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.
- (9) V. MACKO, G. R. HONOLD et M. A. STAHMANN, *Phytochemistry*, 6, 1967, p. 465.
- (10) E. NIKOLOVA TSENOVA, *International congress on photosynthesis research (abstracts)*, Stresa, Italie, 1971, p. 59.
- (11) E. PAHLICH et K. W. JOY, *Can. J. Biochem.*, 49, 1971, p. 127.
- (12) W. H. POTTY, *Anal. Biochem.*, 29, 1969, p. 535.
- (13) E. SCHMIDT, in : H. U. BERGMAYER, *Methods of Enzymatic Analysis*, New York, 1963, p. 752.
- (14) A. TSUKAMOTO, *Plant Cell Physiol.*, 3, 1962, p. 293.
- (15) Polyclar AT = polyvinylpyrrolidone insoluble.

ORSTOM, Laboratoire de Physiologie Végétale,
70, route d'Aulnay, 93-Bondy, Seine-Saint-Denis ;
Université de Lund, Institut de Physiologie Végétale,
Sölvegatan, 35, Lund, Suède ;
Université de Paris-VII, Laboratoire d'Ecologie,
2, place Jussieu, 75-Paris, 5^e.