

## **Evolution de l'activité auxines-oxydasique et peroxydasique lors de l'induction photopériodique et de la sexualisation de l'épinard**

Cl. Penel et H. Greppin

Laboratoire de Physiologie végétale, 1211 Université de Genève 4, Suisse

(Reçu le 14 Septembre 1971)

(Evolution of the auxin-oxidase and peroxidase activity during the spinach's photoperiodic induction and sexualisation)

Protein extracts, prepared from spinach leaves, are analysed after a gel chromatography on Sephadex G-100 and SE-Sephadex C-50. The photoperiodic induction seems related with a fall of the auxin-oxidase and peroxidase activities we observe a change in the isozyme number and pattern.

The female plants have more isozymes, but the enzymatic activity is higher in the male plants.

The destruction of the indole-3-acetic acid, in spinach, is not strictly related to the peroxidases.

L'étude des enzymes dégradant l'auxine a montré qu'il s'agissait selon toute vraisemblance de peroxydases, du moins chez les plantes supérieures (1, 2). L'activité auxines-oxydasique des peroxydases de raifort purifiées confirme ce fait (3, 4).

Les peroxydases existent dans une même plante sous diverses formes moléculaires. Ces isozymes peuvent être séparées par électrophorèse (5, 6) ou sur échangeur d'ions (7). Les bandes obtenues manifestent le plus souvent une activité auxines-oxydasique. Leur distribution varie d'un organe à l'autre. Elles diffèrent également en raison de l'âge de l'organe considéré et des conditions extérieures (6, 8). D'autre part, certaines de ces bandes peuvent être induites dans une culture de tissu par l'acide indolylacétique (9). Ces éléments ont conduit certains auteurs (5, 10) à penser que la spécificité et les variations ontogénétiques de ces isozymes étaient en relation avec la différenciation des tissus.

Chez l'épinard, Konishi (11) a étudié l'évolution de l'activité auxines-oxydasique globale des feuilles et des tiges. Il met en évidence, chez les plantes, en rosette, une activité importante qu'il ne retrouve que partiellement dans les plantes en montaison. Endo (12) arrive à séparer, par électrophorèse, neuf bandes peroxydasiques dans la racine de l'épinard. Ces bandes ne manifestent cependant aucune activité auxines-oxydasique.

Nous avons cherché, dans ce travail, à mettre au point une méthode de séparation permettant la mise en évidence de plusieurs fractions auxines-oxydasiques

distinctes. Pour cela, nous avons combiné la séparation selon la charge de la protéine (échangeur d'ions) avec la séparation selon le poids moléculaire. Nous avons ensuite examiné la distribution des fractions selon l'état physiologique de la plante.

### Matériel et méthodes

Des épinards (*Spinacia oleracea*, var. *Nobel*) sont cultivés sous une lumière blanche de 4 000 lux (tubes Sylvania) et à une température de 25°C. La photopériode est respectivement de 8 heures et 24 heures (40 plantes par série). Une série de plantes, placée en journées de 8 heures, reçoit en fin de traitement 48 heures de lumière continue (induction photopériodique). Ce temps est suffisant pour faire passer le méristème apical de l'état végétatif à l'état floral (13).

La difficulté d'extraire et de purifier les enzymes des plantes vertes réside dans l'abondance des substances phénoliques (flavonoïdes, tanins) présentes dans les tissus. Ces polyphénols forment avec les protéines des complexes insolubles. D'autre part certains d'entre eux sont des inhibiteurs de l'activité auxines-oxydasique. Le polyvinylpyrrolidone insoluble (PVP) Polyclar AT permet d'éliminer une grande partie des substances phénoliques grâce à la faculté de se lier fortement à elles. Une partie des polyphénols restants est enlevée par filtration sur gel Sephadex G-25.

L'extrait est préparé avec les feuilles 3 à 8 de l'épinard. Au moment du prélèvement, les plantes en rosette (jours courts) ont 18 à 20 feuilles. Les plantes sexuées (jours continus) ont 25 feuilles et 20 cm de hauteur.

Les feuilles (poids frais de 8 g) sont immédiatement congelées avec de la glace carbonique et broyées dans un mortier congelé. La poudre obtenue est agitée pendant une heure dans 80 ml de tampon phosphate 0,06 M, pH 7, contenant 12 g de PVP. Après filtration et centrifugation à  $6\,000 \times g$  le surnageant est concentré, soit par précipitation avec du sulfate d'ammonium (solution saturée) soit par ultrafiltration sous pression. L'extrait est ensuite passé sur une colonne de gel Sephadex G-25. Seules les protéines sont conservées. La solution recueillie est concentrée de la même façon que précédemment. Le précipité qui peut apparaître au cours des manipulations est éliminé par centrifugation.

Les 4 à 5 ml des solutions protéiniques (préalablement amenés à pH 5,4) sont introduits dans une colonne de 1,5 cm de diamètre, contenant 60 cm de gel Sephadex G-100 sur lequel a été placé 15 cm d'échangeur de cations SE-Sephadex C-50 préparé comme l'indiquent Sequeira et Mineo (7). Les deux gels sont séparés par une membrane Sartorius dont les pores ont 6 nm. L'échangeur d'ions est équilibré dans un tampon phosphate 0,06 M, pH 5,4; le gel G-100 dans un tampon phosphate 0,06 M, pH 7. L'élution est faite avec le tampon phosphate pH 5,4. La transmission de l'éluat est enregistrée à 280 nm. On recueille des fractions de 30 gouttes. Après 12 fractions, on ajoute du NaCl 0,2 M dans l'éluant.

#### Tests enzymatiques

*Auxines-oxydases*: 1 ml d'extrait (aliquote d'une fraction de 30 gouttes), 1 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 M, 1 ml de dichlorophénol 0,004%, 1 ml de  $\text{MnCl}_2$  0,01%, 1 ml d'acide indolylacétique (solution de 100 r/ml). Après incubation de 2 heures, 1 ml de ce mélange est ajouté à 4 ml de réactif de Salkowsky, préparé d'après Pilet (15).

La coloration est mesurée au bout de 15 minutes, à 535 nm sur un colorimètre.  
*Peroxydases*: 3 ml de tampon phosphate 0,06 M, pH 6,1, 1 ml de solution de gaiacol 0,5%, 0,1 ml d'extrait et 1 ml d'eau oxygénée 0,25% sont incubés pendant 30 minutes. La densité optique est lue à 470 nm.

### Résultats

Les activités enzymatiques obtenues se divisent en deux zones; la première est constituée par les protéines qui ne sont pas retenues par l'échangeur de cations; la seconde (décrochée en ajoutant du NaCl 0,2 M à l'éluant) est formée des protéines qui sont retenues par l'échangeur de cations. Au sein de ces deux zones, le gel Sephadex G-100 opère une deuxième séparation basée sur la taille des molécules.

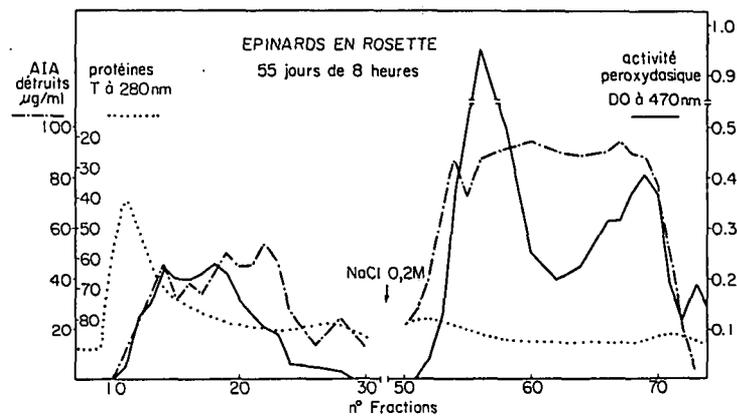


Fig. 1. Extrait protéinique d'épinards cultivés en jours courts, séparé sur un gel Sephadex G-100 et SE-Sephadex C-50. Mesure de l'activité auxines-oxydasique et peroxydasique.

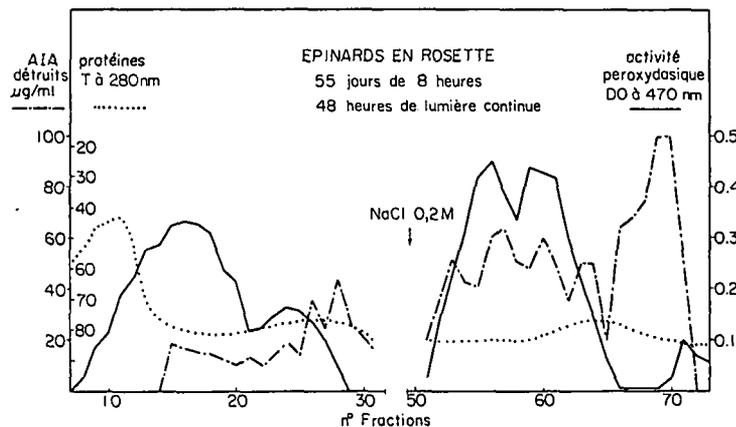


Fig. 2. Mesure de l'activité auxines-oxydasique et peroxydasique après 48 h. de passage en jours continus.

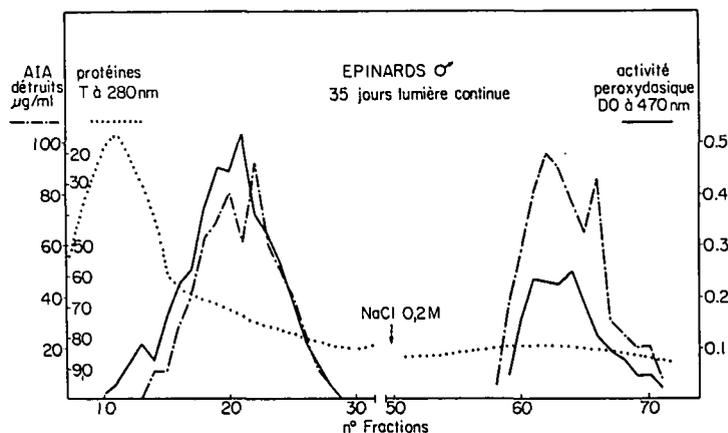


Fig. 3. Extrait protéinique d'épinards mâles cultivés en lumière continue, séparé sur un gel Sephadex C-100 et SE-Sephadex G-50. Mesure de l'activité auxines-oxydasique et peroxydasique.

Les pics et les épaulements ainsi obtenus peuvent être retrouvés d'une plante à l'autre, pour peu que les conditions de travail soient bien standardisées.

Les épinards cultivés en jours courts montrent une forte activité auxines-oxydasique et peroxydasique (9 à 10 fractions auxines-oxydasiques et au moins 7 isoperoxydases peuvent être mises en évidence). L'activité est surtout localisée au niveau des enzymes cationiques dont la première bande peroxydasique a une activité particulièrement élevée.

Si l'on expose, ces mêmes épinards, à 48 heures de lumière blanche continue, c'est-à-dire à des conditions de photoinduction, les activités auxines-oxydasiques et peroxydasiques baissent de moitié. La répartition entre les deux zones tend à

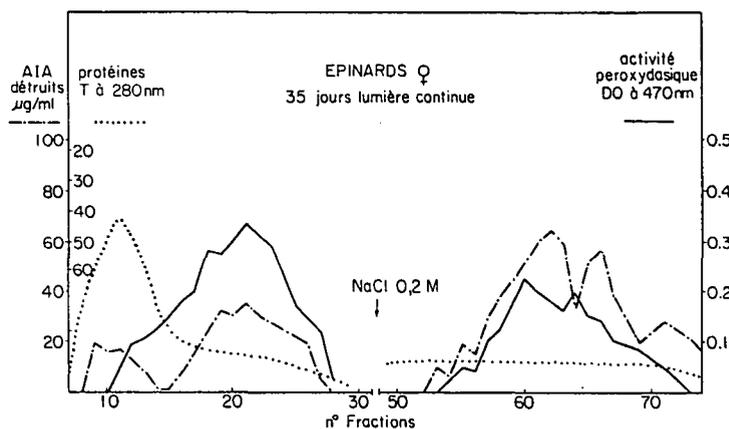


Fig. 4. Mesure, après séparation sur un gel Sephadex C-100 et SE-Sephadex C-50, de l'activité auxines-oxydasique et peroxydasique d'un extrait protéinique d'épinards femelles cultivés en lumière continue.

s'équilibrer. On constate, de plus, une augmentation des fractions auxines-oxydasiques et peroxydasiques. La première isoperoxydase cationique perd la moitié de son activité. Seule la dernière fraction auxines-oxydasique conserve une forte activité.

Les épinards cultivés en jours continus fleurissent au bout de 4 à 5 semaines. Il y a des plantes mâles et des plantes femelles. La comparaison des activités enzymatiques entre les sexes fait apparaître un certain nombre de différences. Les activités globales sont du même ordre de grandeur que celles d'un épinard de jours courts ayant subi 48 heures d'induction. Elles sont plus fortes pour le mâle que pour la femelle. Il y a moins d'isozymes chez le mâle. Les auxines-oxydases se trouvent également réparties dans les deux zones, tandis que l'activité peroxydasique est plus forte dans la deuxième partie.

Chez la femelle, le nombre des fractions est plus élevé (11 auxines-oxydases et 10 peroxydases). Les auxines-oxydases anioniques ont une assez faible activité, se rapprochant du profil obtenu avec des plantes de jours courts.

### Discussions

Si l'on admet que l'activité auxines-oxydasique est élevée dans un tissu, lorsque le taux en auxines y est faible et vice-versa, il est logique que les plantes en rosette manifestent une forte activité et que, la mise en jours continus provoquant la montaison fasse baisser cette activité. Notons que ce résultat est en contradiction avec le travail de Watanabe et Stutz (15) qui, chez le lupin, ne trouvent pas de différences d'activité dans les feuilles de plantes cultivées en jours courts et en jours longs. L'activité plus faible des femelles par rapport aux mâles, correspond à un taux en auxines plus élevé chez les premières; ceci se traduit d'ailleurs par une croissance beaucoup plus importante des rameaux latéraux ainsi que par des feuilles et des pétioles plus allongés.

L'évolution des fractions est également significative; Il y en a plus chez les femelles que chez les mâles: ce qui correspond à une différenciation plus poussée. L'augmentation de leur nombre, après 48 heures de passage en jours continus, indique une rapide mise en place d'un nouveau type de métabolisme lié au phénomène d'induction. Les changements spectaculaires dans l'activité de certaines fractions permettent de supposer qu'elles sont liées au phénomène de l'induction photopériodique.

Enfin, nos méthodes de séparation ne permettent pas de dissocier les activités auxines-oxydasiques et peroxydasiques. Des essais complémentaires nous ont montré que les polyphénols-oxydases ne sont que très partiellement superposées aux auxines-oxydases. On peut donc en conclure que le catabolisme auxinique chez l'épinard est assuré par les peroxydases.

Nous remercions vivement le professeur P. E. Pilet pour ses nombreux conseils. Ce travail est réalisé grâce à l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique (3. 177. 69).

## Bibliographie

- (1) Pilet, P-E, et P. Lavanchy: Purification d'extraits peroxydasiques (Racine de Lens) à activité "auxines oxydasique". *Physiol. Vég.* 7: 19-29 (1969).
- (2) Gaspar, Th., M. Hofinger et J. Lacoppe: Tamisage sur Sephadex G-100 des peroxydases, catalases, phénol-oxydases et acide indolylacétique-oxydases d'extraits radiculaires de Lens et de *Pisum*. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 463-465 (1969).
- (3) Bastin, M.: The active enzymatic center of indoleacetic acid peroxidation. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège* 34: 678-683 (1964).
- (4) Kenten, R. H.: The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. *Biochem. J.* 59: 110-121 (1955).
- (5) Yoneda, Y. et T. Endo: Peroxidase isoenzymes and their indoleacetate oxidase activity in the Japanese morning glory, *Pharbitis nil*. *Plant & Cell Physiol.* 11: 503-506 (1970).
- (6) Siegel, B. Z. et A. W. Galston: The isoperoxidases of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 42: 221-226 (1967).
- (7) Sequeira, L. et L. Mineo: Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from Tobacco roots. *ibid.* 41: 1200-1208 (1966).
- (8) Roberts, D. W. A.: A comparison of the peroxidase isoenzymes of wheat plants grown at 6°C and 20°C. *Can. J. Bot.* 47: 263-265 (1969).
- (9) Galston, A. W. et P. J. Davies: Hormonal regulation in higher plants. *Science* 163: 1288-1297 (1969).
- (10) Shannon, L. M.: Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19: 187-210 (1968).
- (11) Konishi, M.: Studies on development of flowering stalks in long day plants in relation to auxin metabolism. *Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ.* 75: 1-70 (1956).
- (12) Endo, T.: Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isoenzymes. *Plant & Cell Physiol.* 9: 333-341 (1968).
- (13) Auderset, G. et H. Greppin: Evolution du méristème apical de l'épinard lors de l'induction florale. *Col. Soc. Fr. Phys. Vég.* Lausanne (1971), pub. en préparation.
- (14) Pilet, P-E, et G. Collet: Méthode d'analyse du catabolisme auxinique. *Imp. Ch. Zwahlen*, Lausanne (1962).
- (15) Watanabe, R. et R. E. Stutz: Effect of gibberellic acid and photoperiod on indoleacetic acid oxidase in *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* 35: 359-361 (1960).