

## Acide abscissique et activité transaminasique

Des recherches parallèles<sup>1</sup> devaient aboutir à la découverte des absciscines et de la dormine, hormones régulant respectivement les processus d'abscission et de dormance. En fait ces composés correspondent à une seule et même substance que l'on baptisa acide abscissique (ABA)<sup>2</sup>. D'emblée cet ABA – dont la présence est signalée chez un grand nombre de végétaux<sup>3</sup> – apparaît comme une substance essentielle, susceptible d'équilibrer les actions parfois contradictoires des diverses phytohormones engagées dans le contrôle de l'auxésis cellulaire<sup>4</sup>. C'est au niveau des systèmes enzymatiques que les effets biochimiques de l'ABA parurent d'abord les plus caractéristiques<sup>5</sup>, encore que les résultats publiés soient fort contradictoires<sup>6</sup>. Comme l'ABA intervient au niveau du RNA – freinant notamment son accumulation *in vivo*<sup>7</sup> – il a été imaginé<sup>8</sup> que cette hormone entraînait l'inhibition de la synthèse des m-RNA spécifiques engagés dans la mise en place d'enzymes réactionnelles dont l'activité était ainsi réduite<sup>1</sup>.

Les transaminases – dont l'importance, dans les cellules végétales, est reconnue depuis longtemps<sup>9</sup> – ont été choisies pour préciser, sur un complexe enzymatique donné, les effets de l'ABA. Seul le système GOT (glutamic-oxalo-acetic-transaminase), particulièrement actif dans les racines de Lentille<sup>10</sup> – matériel employé ici – a été retenu. Rappelons qu'il agit sur le substrat céto-glutarate + aspartate pour le transformer en oxalo-acétate + glutamate<sup>11</sup>.

Notre technique, décrite ailleurs<sup>12</sup>, consiste à déterminer par report sur une courbe standard – établie pour diverses concentrations de pyruvate – la valeur correspondant à l'extinction (492 nm) d'hydrazones colorés.

Tableau I. Action de l'ABA sur les transaminases – GOT de racines intactes

	Concentration d'ABA ( $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ )		
	0	0,1	1,0
Valeurs finales ( $V_{24}$ )	47,0	46,1	39,6
$\Delta V = V_0 - V_{24}$	12,8	13,7	20,2
$\pm$	2,9	3,1	3,5
$\% = \Delta V \times 10^2 / V_0$	21,4	22,9	34,9

Valeurs initiales ( $V_0$ ):  $59,8 \pm 1,2$ . Incubation de 24 h en présence ou non d'ABA. Chaque valeur est la moyenne de 32 déterminations faites pour 8 extraits distincts à raison de 4 analyses par extrait. Activité transaminasique en  $\mu\text{g} \times 10^{-3}$  d'équivalents de pyruvate pour 25 racines.

Tableau II. Action de l'ABA sur les transaminases – GOT de racines isolées

	Concentration d'ABA ( $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ )		
	0	0,1	1,0
Valeurs finales ( $V_{24}$ )	41,4	31,1	18,5
$\Delta V = V_0 - V_{24}$	20,6	30,9	43,5
$\pm$	3,1	4,3	4,9
$\% = \Delta V \times 10^2 / V_0$	33,2	49,8	70,1

Valeurs initiales ( $V_0$ ):  $62,0 \pm 1,4$ . Voir Tableau I.

Après une imbibition de 4 h (eau déionisée), les graines de *Lens culinaris* Med. (Var. Blonde) sont mises à germer (sur coton et papier filtre, obscurité, 22°C) imprégnés d'une solution-tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,4). Après 24 h, les plantules – dont les racines mesurent 4 mm  $\pm 1$  – sont seules conservées. Le matériel (plantules complètes aux racines intactes ou racines isolées) est mis à incuber (même solution-tampon + saccharose [1%]; obscurité, 22°C) en présence ou non d'ABA. Nous avons utilisé, dans ces essais, l'acide racémique ( $\pm$ ) cis-abscissique, aimablement fourni par J. W. CORNFORTH et G. RYBACK. Toutes les opérations se font en lumière verte. L'incubation achevée, les racines sont broyées (+ 2°C) en présence de la solution-tampon précédente (pH 6,0) et l'extrait est centrifugé (3000 g; 15 min). L'opération est répétée 3 fois. L'unité d'activité transaminasique (ATr) est définie<sup>13</sup> comme étant celle d'un extrait capable de donner, en 1 h (37°C) une quantité d'acides cétoniques correspondant à 1 µg de pyruvate.

Dans une première série d'essais (Tableau I), l'on peut constater que, sur des racines intactes, l'ATr baisse notablement, après 24 h d'incubation. Cette observation confirme nos précédents résultats<sup>10</sup>. L'ABA n'accélère cette diminution d'activité qu'à une forte concentration et son action demeure faible. Par contre, sur des racines isolées (Tableau II), la chute de l'ATr est plus importante et l'ABA, même à de faibles doses, favorise significativement cette perte d'activité. Or, ces racines isolées présentent, par rapport aux racines intactes, des signes caractéristiques de vieillissement, relevés en particulier au niveau du métabolisme de leur RNA<sup>14</sup>. Par ailleurs, il a été démontré<sup>15</sup> que les effets de l'ABA se

<sup>1</sup> F. T. ADDICOTT et J. L. LYON, Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 139 (1969).

<sup>2</sup> P. F. WAREING et G. RYBACK, Endeavour 29, 84 (1970).

<sup>3</sup> B. V. MILBORROW, Int. Conf. Plant Regul., Ottawa (1968), p. 1531.

<sup>4</sup> P. E. PILET, C. r. Acad. Sci., Paris 267, 1142 (1968).

<sup>5</sup> M. J. CHRISPEELS et J. E. VARNER, Plant Physiol. 42, 1008 (1967).

<sup>6</sup> T. HEMBERG, Acta chem. scand. 21, 1665 (1967). – D. C. WALTON et E. SONDEIMER, Plant Physiol. 43, 467 (1968).

<sup>7</sup> P. E. PILET, J. exp. Bot. 21, 446 (1970).

<sup>8</sup> T. A. VILLIERS, Planta 82, 342 (1968).

<sup>9</sup> A. I. VIRTANEN et T. LAINE, Biochem. J. 33, 412 (1938).

<sup>10</sup> P. E. PILET, C. r. Acad. Sci., Paris 271, 300 (1970).

<sup>11</sup> J. S. LADUE et F. WROBLEWSKI et A. KARMEN, Science 120, 497 (1954).

<sup>12</sup> P. E. PILET et M. ATHANASIADES, C. r. Acad. Sci., Paris 262, 1090 (1966).

<sup>13</sup> A. KARMEN, J. clin. Invest. 34, 131 (1955).

<sup>14</sup> P. E. PILET et R. BRAUN, Physiol. Plant. 20, 870 (1967).

<sup>15</sup> T. H. THOMAS, P. F. WAREING et P. M. ROBINSON, Nature, Lond. 205, 1269 (1965).

Tableau III. Action de l'ABA sur les transaminases – GOT de racines isolées et traitées par de la kinétine (10 µg/10 ml)

	Concentration d'ABA ( $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ )		
	0	0,1	1,0
Valeurs finales ( $V_{24}$ )	49,8	47,9	49,2
$\Delta V = V_0 - V_{24}$	8,4	10,3	9,0
$\pm$	2,7	3,2	2,8
$\% = \Delta V \times 10^2 / V_0$	14,5	17,6	15,4

Valeurs initiales ( $V_0$ ):  $58,2 \pm 1,2$ . Voir Tableau I.

marquaient moins nettement sur des feuilles attachées à leur pétiole que sur des disques foliaires. Une telle différence de réactivité peut être attribuée<sup>2</sup> au fait que les feuilles non sectionnées sont bien plus riches en cytokinines – dont on sait qu'elles freinent la sénescence cellulaire<sup>16</sup> – que les feuilles découpées. C'est pourquoi, dans une troisième série d'essais, une cytokinine synthétique, la kinétine (6-furfurylaminopurine) a été ajoutée (10 µg/10 ml) au milieu d'incubation. Les résultats (Tableau III) montrent que: 1. la diminution de l'ATr, pour des racines isolées, est nettement freinée par la kinétine; 2. les effets de l'ABA – particulièrement marqués pour des racines isolées – ne sont plus significativement observables lorsque ces racines ont subi l'action de la kinétine.

Ainsi l'ABA n'agit sur les transaminases – en accélérant la chute de leur activité – que lorsque les cellules, au niveau desquelles elles opèrent, présentent des caractères de sénescence. Ces observations permettent donc de rendre compte, dans une certaine mesure, des divergences relevées quant à l'intervention de l'ABA sur certains systèmes enzymatiques<sup>6</sup>. En effet, l'âge – rarement

précisé et souvent fort différent d'un type d'essai à l'autre – du matériel, employé dans l'extraction des enzymes testées et traité par l'ABA, est un facteur de variation non négligeable.

**Summary.** Abscisic acid (ABA) was found to increase the fall of the 'GOT' transaminase activity in the root tissues. In combination with ABA, kinetin counteracted the ABA inhibition of transaminase reaction, which was discussed in relation to cell aging.

P. E. PILET

*Institut de Biologie et de Physiologie végétales de l'Université de Lausanne, CH-1005 Lausanne (Suisse), 22 Janvier 1971.*

<sup>16</sup> F. Skooc et D. Y. ARMSTRONG, *A. Rev. Plant Physiol.* 21, 359 (1970).

## Further Studies on Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Water-soluble Proteolipid-Protein from Bovine Brain White Matter

Our previous studies<sup>1</sup> have shown the polyacrylamide gel electrophoretic pattern of lyophilized sample of water-soluble proteolipid-protein. The electrophoresis was carried out by the procedures of TAKAYAMA et al. with a little modification. This electrophoretic pattern of proteolipid-protein indicated the evidence of one broad band on either 5% or 7.5% acrylamide gel containing 8M urea (pH 3.8). However, we did not directly use water-soluble proteolipid-protein without lyophilization. In this report we shall describe the electrophoretic pattern of water-soluble proteolipid-protein without lyophilization.

Water-soluble proteolipid-protein was isolated from bovine brain white matter by the slightly modified procedure of TENENBAUM and FOLCH<sup>2</sup>. Fresh brain white matter was extracted with 19 volumes of chloroform-methanol (2:1, v/v) and the extracted solution was partitioned with 0.2 volume of distilled water. The lower phase was washed 3 times with theoretical upper phase. The extract containing proteolipid-protein was concentrated to  $\frac{1}{3}$  volume using a rotary evaporator. The concentrated extract was dialyzed against chloroform-methanol mixtures for 7 days and then against acidic

chloroform-methanol (chloroform-methanol-HCl, 200:100:1, v/v/v) for 6 days. The transfer of the lipid-free protein to aqueous solution was carried out by successive dialysis in solution of increasing methanol and water and finally in water alone. The pH of the final clear solution was just neutral. This final proteolipid-protein solution was concentrated to 300–500 µg/ml by vacuum evaporation or dialysis against 20% Arabia gum solution. The  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  of proteolipid-protein gave 10.5 at 278 nm wave length which showed the maximum absorption value. The concentrated proteolipid-protein was not lyophilized and stored at 4°C with a few drops of chloroform. Polyacrylamide gel electrophoresis of water-soluble proteolipid-protein obtained with above procedures was carried out at pH 8.3 according to the method of DAVIS<sup>3</sup>. Proteolipid-protein in 5% sucrose solution was used as a sample for the electrophoresis. Current was applied for 2 h at 4 mA per gel. Gels were stained for 60 min with 1% Amido Black in 7% acetic acid and destained by diffusion in 7% acetic acid.

Figure 1 illustrates the electrophoretic pattern on 7.5% polyacrylamide gel at pH 8.3 and its densitometric pattern. 2 sharp bands were observed. The electrophoretic

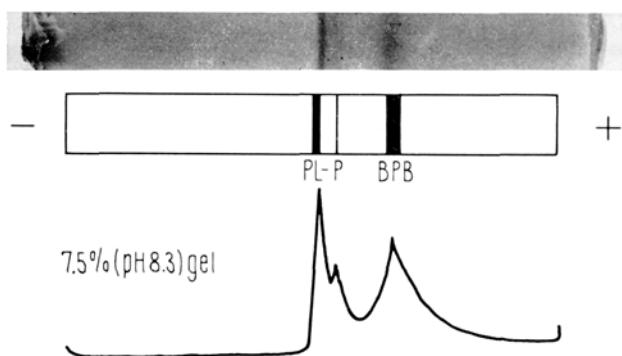


Fig. 1. Electrophoretic pattern of proteolipid-protein with 2 sharp bands.

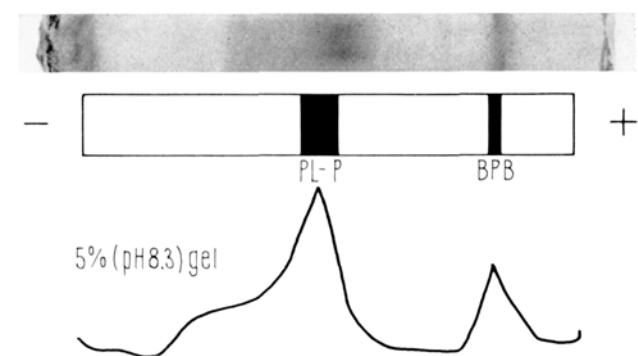


Fig. 2. Electrophoretic pattern of proteolipid-protein with 1 diffuse band on 5% polyacrylamide gel.