

## ETUDE DE L'ACTIVITE DE L'ARGININE DECARBOXYLASE DANS LES JEUNES PLANTES DE *GLYCINE MAX* PRIVEES DE LEURS COTYLEDONS

D. LE RUDULIER et G. GOAS

Laboratoire de Physiologie végétale 1er cycle, Faculté des Sciences Biologiques, Université de Rennes,  
B.P. 25 A, 35031 Rennes Cedex, France

(Reçu le 4 janvier 1975)

**Key Word Index**—*Glycine max*; Leguminosae; soybean; decotylized plants; arginine; ornithine; decarboxylation; ammonium and nitrate nutrition.

**Abstract**—L-Arginine carboxy-lyase and L-ornithine carboxy-lyase activities were investigated in young decotylized *Glycine max* plants growing in the light on a liquid medium in the presence of ammonium chloride or nitrate. Only the first enzyme could be detected. It had pH optimum at 7.0 activity and there is much more activity in plants cultivated on ammonium chloride than in plants grown on nitrate.

### INTRODUCTION

Dans un travail antérieur [1], nous avons montré que la putrescine s'accumule, de façon spectaculaire, dans tous les organes des jeunes plantes de *Glycine max* (L.) Merr., privées de leurs cotylédons et cultivées en présence de chlorure d'ammonium comme seule source d'azote. Chez les bactéries, deux voies de biosynthèse de la diamine ont été décrites: l'une par décarboxylation directe de la L-ornithine [2], l'autre par décarboxylation de la L-arginine avec apparition transitoire d'agmatine [3–5]. Chez les plantes supérieures et chez l'Orge en particulier, la DL-ornithine-[2- $^{14}\text{C}$ ] est transformée très lentement en putrescine [6] tandis que l'arginine se révèle le précurseur essentiel de la diamine [7–8].

L'utilisation de DL-ornithine-[5- $^{14}\text{C}$ ] par les jeunes plantes de *Glycine max* privées de leurs cotylédons, montre que cet acide aminé se transforme très rapidement en arginine [9]. Des résultats obtenus il n'est pas possible de conclure à l'existence d'une décarboxylation directe de l'ornithine; mais, dans cette expérience, l'apparition d'agmatine radio-active est déjà en faveur de la présence d'une arginine décarboxylase. Nous nous sommes donc proposé d'essayer de mettre en

évidence, dans ces plantes, l'ornithine et l'arginine décarboxylases.

### RESULTATS ET DISCUSSION

*Essais de mise en évidence des deux décarboxylases.* L'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de jeunes plantes de *Glycine max* cultivées sur chlorure d'ammonium ou sur nitrates, mis en présence de DL-arginine-[1- $^{14}\text{C}$ ], provoque un dégagement de  $\text{CO}_2$  radio-active qui indique une activité arginine décarboxylasique. Ceci est confirmé par l'isolement de l'agmatine marquée, apparue au cours de l'utilisation de L-arginine-[U- $^{14}\text{C}$ ].

L'expérimentation, menée dans les mêmes conditions avec de la L-ornithine-[1- $^{14}\text{C}$ ], ne permet pas de mettre en évidence un dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$ . Une modification du pH du milieu réactionnel, de pH 5,4 à pH 8,0, ne donne de résultat positif pour aucun des extraits enzymatiques utilisés. Dans nos conditions expérimentales, il n'est donc pas possible de mettre en évidence une activité ornithine décarboxylasique, contrairement aux résultats obtenus par Hasse *et al.* [10] sur le Pois et par Mizusaki *et al.* [11] chez un certain nombre de Solanacées.

**Détermination du pH optimum d'action de l'arginine décarboxylase.** Pour cette détermination, réalisée en présence de DL-arginine-[1- $^{14}$ C], nous n'avons utilisé que l'extrait enzymatique brut, préparé à partir des plantes "chlorure d'ammonium". La radio-activité du CO<sub>2</sub> dégagé, mesurée pour des valeurs de pH comprises entre 5,4 et 8,0, (dpm/mg de protéines) 0 (5,4), 380 (6,0), 1780 (6,4), 2590 (6,8), 3770 (7,0), 2710 (7,2), 1320 (7,6), 300 (8,0).

L'activité enzymatique ne se manifeste que pour les valeurs de pH de 6,0–8,0 et montre un maximum très net à pH 7,0. Les essais réalisés à partir de la fraction protéique, purifiée par passage sur gel de Séphadex G 50 (fraction F<sub>1</sub>), donnent les mêmes résultats.

Ces données sont en conformité avec celles obtenues, pour les plants d'Orge, par Smith [12].

**Mesure de l'activité de l'arginine décarboxylase dans les différents lots de plantes.** Nous avons déterminé l'activité de l'arginine décarboxylase dans les racines et dans les organes aériens des plantes "chlorure d'ammonium" et des plantes "nitrates". Tous les essais sont réalisés à pH 7,0 à partir de l'extrait enzymatique brut. Les résultats obtenus sont exprimés en dpm/mg de protéines: Plantes NH<sub>4</sub>Cl, racines 3480, parties aériennes 4440; Plantes NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, racines 510, parties aériennes 370.

L'activité de l'arginine décarboxylase est beaucoup plus importante dans les organes des plantes "chlorure d'ammonium" que dans ceux des plantes "nitrates": elle est environ 7 fois plus élevée dans les racines et 12 fois plus dans les parties aériennes. Dans les plantes cultivées en présence de nitrates, l'activité de l'enzyme est légèrement plus forte dans les racines que dans les parties aériennes. En présence de chlorure d'ammonium, les faits sont inversés; toutefois, dans les racines, l'enzyme est encore très active contrairement à ce qui a été observé par Smith [12] chez l'Orge.

L'existence de l'arginine décarboxylase peut rendre compte de la présence de putrescine dans les plantes de *Glycine max* privées de leurs cotylédons et cultivées en présence de chlorure d'ammonium ou de nitrates; en effet, l'agmatine, produit de la décarboxylation, peut, par l'intermédiaire de la *N*-carbamylputrescine, se transformer en diamine [13]. Le fait que l'activité

décarboxylasique se révèle nettement plus importante dans les plantes obtenues en nutrition strictement ammoniacale expliquerait, en partie au moins, l'accumulation de putrescine seulement dans ce cas. Mais cette accumulation pourrait aussi relever d'un ralentissement de l'activité des amines oxydases; nous nous proposons de vérifier cette hypothèse dans un proche avenir.

## PARTIE EXPERIMENTALE

**Matériel végétal.** La recherche des décarboxylases est effectuée chez les jeunes plantes de *Glycine max* (L.) Merr. var. Chippewa, privées de leurs cotylédons. Les graines sont fournies par l'American Soybean Association, Hudson, Iowa, U.S.A. Les plantes sont cultivées pendant 15 jours, à la lumière, sur milieu liquide en présence de deux sources d'azote: le chlorure d'ammonium ou les nitrates [9–14]. Les milieux sont renouvelés tous les 5 jours, sous conditions stériles. Au moment de la récolte, les plantes sont lyophilisées puis conservées au réfrigérateur, dans un dessiccateur, sous vide partiel; lors de l'emploi, on procède à la pulvérisation à l'aide du broyeur Dangoumeau.

**Préparation et purification partielle des extraits enzymatiques.** Toutes les opérations d'extraction et de purification sont réalisées à des températures comprises entre 0° et 4°. Pour préparer les extraits enzymatiques, on agite mécaniquement, pendant 45 mn, 500 mg de poudre dans 20 ml de tampon phosphates mono- et di-K, 0,1 M de pH 7,5 renfermant 500 mg de Polyclar AT lavé et broyé, 1% de PEG, 0,2 mM de thioglycollate de Na et 2  $\mu$ M de dithiothréitol. On centrifuge ensuite 20 mn à 2600 g, puis 30 mn à 25000 g. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut. On purifie une fraction aliquote de cet extrait par passage sur colonne de Séphadex G 50 fine, équilibrée dans du tampon phosphates mono- et di-K, 0,1 M de pH 7,5; l'élution de la fraction protéique (F<sub>1</sub>) est réalisée par ce même tampon.

**Substrats radio-actifs.** La DL-arginine-[1- $^{14}$ C] (12 mCi/mM) est fournie par le CEA (France) et purifiée, avant l'emploi, par électrophorèse à haute tension sur papier Whatman 3 MM, dans une solution tamponnée de pH 5,3 (Pyr.-HOAc-H<sub>2</sub>O, 10:4:986). Les solvants sont éliminés par chauffage à 50° et l'arginine est éluée à l'aide d'une solution de HCl N/100. La L-arginine-[U- $^{14}$ C] (105 mCi/mM) est traitée de la même façon.

La L-ornithine-[1- $^{14}$ C] est préparée, au laboratoire, par action de la L-arginine uréohydrolase (poudre lyophilisée de foie de boeuf, Sigma) sur la DL-arginine-[1- $^{14}$ C]; la transformation est effectuée à 37°, pendant 1 hr, en milieu tampon phosphate-NaOH 0,2 M de pH 9,5. L'ornithine radio-active est isolée par électrophorèse à haute tension, dans la solution tamponnée de pH 5,3.

**Détermination de l'activité enzymatique.** On détermine l'activité de l'arginine et de l'ornithine décarboxylases par la méthode radio-isotopique. Les essais enzymatiques sont réalisés à 30°, en atmosphère d'N<sub>2</sub>, à l'appareil de Warburg. Dans l'espace annulaire de la fiole, on introduit 1 ml de tampon phosphate-citrate 0,2 M de pH 7,0, 0,1 ml de pyridoxal-5-phosphate à 0,5%, 0,8 ml de la solution enzymatique (extrait brut ou effluent protéique de la colonne de Séphadex, fraction F<sub>1</sub>) et 1 goutte de toluène. Dans l'espace central, on place 0,2 ml de KOH à 20% et un fragment de papier Whatman n° 1, (1,5 cm  $\times$  5 cm), finement plissé. Dans l'une des

ampoules latérales, on introduit 25  $\mu$ l (0,5  $\mu$ Ci) de DL-arginine-[1- $^{14}$ C] ou de L-ornithine-[1- $^{14}$ C] et 0,4 ml de tampon phosphate-citrate 0,2 M de pH 7,0, dans l'autre 0,2 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N. Après 4 hr, on arrête la réaction enzymatique en acidifiant le milieu par  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; ceci permet, en outre, de libérer le  $^{14}\text{CO}_2$  dissous dans le milieu. L'agitation des fioles est poursuivie pendant 15 mn, puis, les papiers plissés, imprégnés de KOH, sont soigneusement transférés dans des fioles de comptage où l'on ajoute 10 ml de mélange scintillant de Bray [15] additionné de soluène (3,3%). La mesure de la radio-activité est effectuée, 24 hr au moins après la préparation des fioles, par scintillation en milieu liquide, au spectromètre Tri-Carb, Packard 33-80. La radio-activité du  $\text{CO}_2$  dégagé est exprimée en dpm par mg de protéines.

Pour la recherche de l'agmatine formée, on remplace la DL-arginine-[1- $^{14}$ C] de l'ampoule latérale de la fiole de Warburg par de la L-arginine-[U- $^{14}$ C] (0,5  $\mu$ Ci). Après 4 hr de réaction, on isole l'agmatine du mélange réactionnel, par électrophorèse à haute tension, réalisée sur papier Whatman 3 MM, dans une solution tamponnée de pH 3,4 (Pyr.-HOAc- $\text{H}_2\text{O}$ , 1:10:90). L'appareil de combustion d'échantillons radio-actifs Packard, modèle 306, permet la transformation quantitative du radio-carbone en  $^{14}\text{CO}_2$  qui, en présence de Carbosorb (base organique), donne du carbamate solubilisé dans du Permafluor V. Les comptages sont effectués à l'appareil Packard 33-80, préalablement réglé pour un rendement de comptage de l'ordre de 75%.

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* [16].

## REFERENCES

1. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1971) *C. r. Acad. Sci., Paris* **273**, 1108.
2. Gale, E. F. (1940) *Biochem. J.* **34**, 392.
3. Miyaki, K. et Momiyama, H. (1956) *Seikagaku* **27**, 765.
4. Linneweh, F. (1932) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **205**, 126.
5. Moller, V. (1955) *Acta Path. Microbiol. Scand.* **36**, 158.
6. Coleman, R. G. et Hegarty, M. P. (1957) *Nature* **179**, 376.
7. Smith, T. A. et Richards, F. J. (1962) *Biochem. J.* **84**, 292.
8. Smith, T. A. et Garraway, J. L. (1964) *Phytochemistry* **3**, 23.
9. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1974) *C.R. Acad. Sci., Paris* **278**, 1039.
10. Hasse, K., Ratych, O. T. et Salnikow, J. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 843.
11. Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M. et Tamaki, E. (1973) *Plant and Cell Physiol.* **14**, 103.
12. Smith, T. A. (1963) *Phytochemistry* **2**, 241.
13. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1974) *C.R. Acad. Sci., Paris* **279**, 161.
14. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1969) *C.R. Acad. Sci., Paris* **269**, 1264.
15. Bray, G. A. (1960) *Analyt. Biochem.* **1**, 279.
16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.