

LA DIAMINE OXYDASE DANS LES JEUNES PLANTES DE *GLYCINE MAX*

D. LE RUDULIER et G. GOAS

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

(Revised received 5 November 1976)

Key Word Index—*Glycine max*; Leguminosae; soybean; decotylized plants; putrescine; agmatine; amine oxidase; ammonium and nitrate nutrition.

Resumé—L'activité de la diamine oxydase *vis-à-vis* de la putrescine et de l'agmatine est étudiée dans les jeunes plantes de *Glycine max*, privées de leurs cotylédons et cultivées aseptiquement sur milieu liquide, à la lumière, en présence de chlorure d'ammonium ou de nitrates. Les conditions d'action de l'enzyme sont définies. Les deux amines sont oxydées plus lentement dans les plantes cultivées sur chlorure d'ammonium que dans les plantes obtenues sur nitrates.

Abstract—Diamine oxidase activity against putrescine and agmatine is investigated in young decotylized *Glycine max* plants growing, in the light, under sterile conditions on a liquid medium in the presence of ammonium chloride or nitrates. Optimal conditions for the enzyme activity are determined. Both amines are oxidised more slowly in plants cultivated on ammonium chloride than in plants grown on nitrates.

INTRODUCTION

La putrescine s'accumule de façon spectaculaire dans les jeunes plantes de *Glycine max* (L.) Merr., privées de leurs cotylédons, lorsque l'azote ammoniacal remplace l'azote nitrique dans le milieu de culture [1]. L'emploi de molécules radio-actives montre que, dans ces plantes, la biosynthèse de la diamine est accélérée [2, 3] et suggère que son catabolisme est ralenti [4]. Au niveau enzymatique, nous avons pu montrer que l'activité de l'arginine décarboxylase se révèle nettement plus importante dans les plantes 'chlorure d'ammonium' que dans les plantes 'nitrates' [5]. Dans ce travail, nous nous proposons de comparer l'activité de la diamine oxydase des deux lots de plantes *vis-à-vis* de la putrescine et de son précurseur, l'agmatine.

RESULTATS

Une expérience préliminaire nous a permis de mettre en évidence, dans les extraits bruts de jeunes plantes de *Glycine max* privées de leurs cotylédons et cultivées en présence de chlorure d'ammonium ou de nitrates, une oxydation de la putrescine et de l'agmatine. Pour comparer l'activité enzymatique dans les deux lots de plantes, il était nécessaire de préciser, au préalable, les conditions d'action de la diamine oxydase.

Détermination des conditions d'action

Elle est effectuée sur des extraits bruts de plantes cultivées en présence de chlorure d'ammonium.

Oxydation de la putrescine

A 30°, le pH optimal d'action se place aux environs de 7,8 (Tableau 1); ceci confirme les données obtenues chez *Pisum sativum* L. par Kenten et Mann [6] puis par Smith [7].

L'étude de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat montre que, parmi les valeurs retenues, $16,5 \times 10^{-3}$ M est la plus favorable; des concentrations plus élevées n'entraînent pas de diminution significative de l'activité, contrairement à ce qui a été observée chez *Panus tigrinus* par Boldt *et al.* Le K_m approximatif, déterminé à pH 7,8, est voisin de 4×10^{-4} M.

La cinétique de la réaction a été suivie pendant 75 min, la réaction est d'ordre nul pendant 60 min au moins. L'addition de FAD (0,1 μ M) au milieu réactionnel ne provoque pas d'élévation notable de l'activité enzymatique.

Oxydation de l'agmatine

L'étude de l'activité en fonction du pH du milieu réactionnel donne des valeurs constantes entre les pH 7,0 et 7,8

Tableau 1. Activités de la diamine oxydase des jeunes plantes de *Glycine max* privées de leurs cotylédons, en fonction du pH du milieu réactionnel (activités exprimées en nkat/g protéines)

pH	4,3	5,2	6,2	7,0	7,4	7,8	8,2	9,0
Putrescine	0	60	85	122	142	170	138	45
Agmatine	0	13	35	52	52	52	35	30

Tableau 2. Activités de la diamine oxydase dans les différents organes des jeunes plantes de *Glycine max* privées de leurs cotylédons

		Putrescine		Substrats	
				Agmatine	
		Plantes 'chlorure d'ammonium'	Plantes 'nitrates'	Plantes 'chlorure d'ammonium'	Plantes 'nitrates'
nkat/g protéines	Tiges	172	200	57	220
	Racines	338	502	52	262
nkat/100 organes ou plantes	Tiges	16,3	39,9	5,5	44,0
	Racines	15,5	21,2	2,3	11,0
	Plantes	31,8	61,1	7,8	55,0

(Tableau 1). Une concentration de $3,3 \times 10^{-3}$ M en agmatine assure une saturation de l'enzyme; la vitesse de la réaction est constante pour des temps inférieurs à 75 min. Mais, l'oxydation de cette amine peut être inhibée par le substrat: l'inhibition, faible pour $16,5 \times 10^{-3}$ M, se révèle presque totale pour 66×10^{-3} M. Le K_m approximatif, déterminé à pH 7,8, est proche de 2×10^{-3} M.

Quel que soit le substrat utilisé, les essais réalisés à partir d'extraits purifiés par passage sur gel de Séphadex G 50, donnent des résultats semblables.

Activités de la diamine oxydase dans les différents lots de plantes

Tous les essais sont réalisés à partir d'extraits enzymatiques bruts; les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 2.

L'activité de l'oxydase, *vis-à-vis* de la putrescine est plus faible dans les plantes 'chlorure d'ammonium' que dans les plantes 'nitrates'. En ce qui concerne les activités spécifiques (nkat/g de protéines), les différences, peu importantes au niveau des tiges, le sont nettement plus au niveau des racines où la valeur sur chlorure d'ammonium représente environ les 2/3 de celle obtenue sur nitrates. Cependant, si l'on exprime les résultats pour 100 organes, les écarts sont, au contraire, beaucoup plus élevés dans les tiges que dans les racines et, pour les plantes entières, l'oxydation de la putrescine est presque deux fois plus lente sur chlorure d'ammonium que sur nitrates.

L'oxydase, *vis-à-vis* de l'agmatine se révèle également moins active dans les plantes 'chlorure d'ammonium'. En effet, les activités spécifiques, dans les racines et dans les tiges, sont respectivement 5 et 4 fois plus faibles que dans les organes analogues des plantes 'nitrates'. Si l'on tient compte de la croissance, les plantes 'chlorure d'ammonium' apparaissent douées d'une activité oxydasique 7 fois plus petite que les plantes 'nitrates'.

Pour les deux substrats, quelle que soit la nature de la source azotée, l'activité enzymatique, exprimée en nkat/100 organes, est toujours plus élevée dans les tiges que dans les racines.

Dans un même lot de plantes, l'activité de l'oxydase *vis-à-vis* de la putrescine est généralement plus élevée que *vis-à-vis* de l'agmatine, sauf dans les tiges des plantes 'nitrates' où les deux amines sont dégradées sensiblement à la même vitesse. Une affinité plus grande de l'oxydase

pour la putrescine a déjà été constatée chez *Pisum sativum* [9] et chez *Glycine max* [10].

De l'ensemble de ces résultats, il ressort clairement que l'activité diamine oxydasique, *vis-à-vis* de la putrescine et de l'agmatine, est plus faible dans les jeunes plantes de *Glycine max* cultivées en nutrition strictement ammoniacale. L'accumulation de la putrescine relève donc, en partie, du ralentissement de son oxydation, comme le laissait déjà prévoir une expérience réalisée en présence de putrescine- $[1,4-^{14}\text{C}]$ [4], mais aussi de celle de son précurseur, l'agmatine dont une plus grande proportion peut s'engager dans la biosynthèse de la putrescine.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal. Les jeunes plantes de *Glycine max* (L.) Merr. var. Chippewa, privées de leurs cotylédons, sont cultivées sur milieu liquide en présence d'azote ammoniacal ou nitrique (42 mg/l) selon une méthode déjà exposée [2, 5].

Origine des produits chimiques utilisés. La putrescine dihydrochlorure est fournie par Fluka AG, Suisse, l'agmatine sulfate par Aldrich Europe, Belgique et la catalase de foie de boeuf par Sigma Chemical Co., USA. La pureté chimique des deux amines a été vérifiée par électrophorèse en haute tension, associée à la chromatographie descendante sur papier [11] et par chromatographie sur résine échangeuse d'ions [1].

Préparation et purification partielle des extraits enzymatiques. Ces opérations sont effectuées suivant une technique décrite antérieurement [5].

Détermination des activités enzymatiques. Les activités enzymatiques sont déterminées, à 30°, par la méthode manométrique, en présence de catalase, selon le protocole expérimental de ref [9]. Dans l'espace annulaire de la fiole de Warburg, on introduit 1,3 ml de tampon KPi 0,2 M de pH 7,8, 0,1 ml de la soln de catalase (250 µg/ml) et 1,5 ml de l'extrait enzymatique brut. Dans l'espace central, on ajoute 0,2 ml de KOH 5 N et un fragment de papier Whatman n° 1 (1,5 × 5 cm) puis, dans l'ampoule latérale, 0,1 ml de la soln de putrescine 0,5 M ou d'agmatine 0,1 M. Après équilibration, on met en contact la soln de diamine avec le milieu réactionnel et on laisse la réaction se poursuivre pendant 1 hr. L'activité enzymatique est exprimée en nkat; un nkat correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions expérimentales retenues, catalyse la désamination oxydative de 1 nmol de putrescine ou d'agmatine par sec. L'activité spécifique est exprimée en nkat/g de protéines. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de ref. [12]. Comme les composés phénoliques présents dans les extraits bruts sont susceptibles de réduire le réactif de Folin, les dosages sont réalisés sur le précipité protéique obtenu par action du TCA (concentration finale 10% v/v) et solubilisé dans NaOH 0,36 N [13].

REFERENCES

1. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1971) *C.R. Acad. Sci. Paris* **273**, 1108.
2. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1974) *C.R. Acad. Sci. Paris* **278**, 1039.
3. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1974) *C.R. Acad. Sci. Paris* **279**, 161.
4. Le Rudulier, D. et Goas, G. soumis à *Physiol. Plantarum*.
5. Le Rudulier, D. et Goas, G. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1723.
6. Kenten, R. H. et Mann, P. J. G. (1952) *Biochem. J.* **50**, 360.
7. Smith, T. A. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1075.
8. Boldt, A., Miersch, J. et Reinbothe, H. (1971) *Phytochemistry* **10**, 731.
9. Hill, J. M. (1971) In *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. et Kaplan, N. O., eds.), Vol. 17B, pp. 730-735. Academic Press, New York.
10. Suzuki, Y. (1973) *Plant Cell Physiol.* **14**, 413.
11. Larher, F., Le Rudulier, D. et Goas, G. (1975) *J. Chromatogr.* **95**, 254.
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
13. Stewart, G. R. (1972) *J. Exp. Botany* **23**, 171.