

L'ACTIVITÉ GLUTAMATE DESHYDROGÉNOSE DANS LES
TISSUS FOLIAIRES DE CHENOPODIUM QUINOA WILD.

par

M. F. LEFRANC

O. R. S. T. C. M. - Laboratoire de Physiologie végétale. Bondy.
Faculté des Sciences d'Orsay : Laboratoire d'Ecologie végétale

L'ACTIVITE GLUTAMATE DESHYDROGENASE DANS LES
TISSUS FOLIAIRES DE CHENOPodium QUINOA WILD

par

Marie-France LEFRANC

Rapport présenté pour obtenir le D.E.A de Biochimie

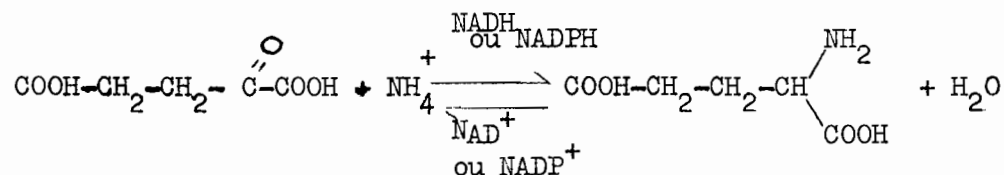
L'ACTIVITE GLUTAMATE DESHYDROGENASE DANS LES
TISSUS FOLIAIRES DE CHENOPODIUM QUINOA WILD

INTRODUCTION

La glutamate deshydrogénase des végétaux supérieurs a été relative-
ment peu étudiée. Parmi les auteurs qui se sont intéressés à cette en-
zyme nous pouvons citer Bulen¹⁹⁵⁶ et Pahlich et Joy¹⁹⁷¹ qui l'ont respectivement
étudiée sur les feuilles de maïs et sur les racines de pois.

Dans le cadre d'une étude des effets de l'environnement sur des en-
zymes du métabolisme azoté, nous avons abordé l'étude de la glutamate
deshydrogénase des tissus foliaires de Chenopodium quinoa Wild. Cette
enzyme est particulièrement intéressante car elle occupe une position clé
dans les voies du métabolisme azoté. En effet, elle sert de lien entre le
cycle de Krebs et le métabolisme des acides aminés en catalysant l'incor-
poration d'azote ammoniacal sous forme de composés organiques. Cette
étape constitue la porte d'entrée de l'ammoniac dans les acides aminés :
à partir de l'acide glutamique, tous les autres acides aminés pourront
être synthétisés soit suivant les voies métaboliques connues, soit par
transamination.

L'action de la glutamate deshydrogénase se fait suivant l'équation :



Dans cette étude, nous nous proposons de trouver les méthodes de
préparation d'un extrait de glutamate deshydrogénase (GIDH) de feuilles
de Chenopodium quinoa, qui nous permettraient d'étudier quelques caracté-
ristiques de l'enzyme.

possèdent
Ces composés/des groupes similaires à ceux des protéines et peuvent donc se substituer à celles-ci pour se lier à des composés phénoliques par des liaisons hydrogène. Les protéines sont donc ainsi protégées des tannins. Le PVP. inhibe l'O. diphénol/oxydase et adsorbe les phénols mais il semble qu'il ne peut lier les composés phénoliques de petit poids moléculaire (inférieur à celui de l'acide chlorogénique), alors que le polyclar AT est capable de lier l'acide chlorogénique (Anderson, 1968).
Le pH du milieu d'extraction est très important quand on utilise le PVP. En effet si les phénols sont ionisés, ils ne peuvent former de liaison hydrogène ni avec PVP ni avec les protéines mais ils s'oxyderont plus facilement en quinones. Il a été montré qu'on obtenait une meilleure activité à pH 7,15 qu'à pH 7,5 (Jones et Hulme, 1961). Pour les phénols de petit poids moléculaire, le pH optimum d'absorption est de 3,5. Il semble donc qu'aux pH physiologiques, les composés phénoliques de petit poids moléculaire ne soient pas liés par les polymères. Par contre les thiols et autres réducteurs sont efficaces.

Les Thiols inhibent l'activité de l'O. diphénol.: ~~oxydase~~.

Deux groupes sont à considérer:

1) Les thiols qui réduisent en phénols les quinones formées. Ce sont des inhibiteurs puissants de l'O. diphénol. ~~oxydase~~. Parmi eux, nous avons retenu le thioglycollate de sodium préconisé par Anderson. (1968)

2) Les thiols qui se combinent aux quinones. On obtient ainsi un produit qui ne peut être oxydé et n'inhibant plus les enzymes. Nous avons retenu :

- le mercaptoéthanol

- le glutathion réduit, qui sont des inhibiteurs de l'O. diphénol. ~~oxy-~~dase moins puissants que ceux du groupe 1.

Réducteurs autres que les thiols

- Acide ascorbique. Il réduit les quinones en régénérant les phénols. Son mécanisme d'action est semblable à celui du thioglycollate de sodium puisqu'ils empêchent tous deux l'accumulation des quinones. Mais les effets de l'acide ascorbique ne sont pas durables, celui-ci étant oxydé par les extraits de tissus.

-Métabisulfite de potassium ou de sodium. Ce sel offre une protection permanente, avec une concentration minimale qui ne varie pas avec l'état physiologique du tissu, ni avec la quantité de tissu par volume d'extrait. Cela est attribué à une totale inhibition de l'O. diphénolxydase. Cependant son efficacité diminue s'il est employé à pH >7,5.

Nous avons enfin testé l'activité de l'enzyme solubilisée d'une poudre acétonique, car l'acétone dissout les composés phénoliques alors qu'elle précipite les protéines bien que parfois d'une manière irréversible. Ce procédé permet ainsi de séparer la protéine enzymatique des composés phénoliques.

I- METHODES DE CULTURE ET D'EXTRACTION.

Les plantes sont semées dans des terrines contenant de la terre et placées :

-soit dans une chambre conditionnée à 20° C le jour (18h) et à 12° C la nuit (6h), l'éclairage étant d'environ 10 000 lux.

-soit en serre à 25° C sans éclairage artificiel, la lumière naturelle étant alors suffisante.

Les prélèvements en vue de l'extraction d'enzymes ont lieu à partir du trentième jour de culture. Afin de permettre l'éclatement des cellules et des organites en vue d'obtenir les enzymes solubles totaux, les feuilles sont congelées à l'azote liquide. Puis le broyage est réalisé à l'aide d'un ultra turrax, dans du tampon phosphate 0,1 M pH= 7 contenant le polymère ou le réducteur choisi (0,25g de tissu par ml de milieu d'extraction). Après filtration sur quatre couches de gaze et centrifugation à basse vitesse (4000 t/mn) pour éliminer les débris de tissus et les cellules entières, les homogénats sont centrifugés à haute vitesse (13000 t/mn= 20000 g ou 18000 t/mn = 40000 g selon les cas), puis dialysés contre du tampon phosphate 0,01 M pH =7 contenant du mercaptoéthanol 5m M, cela afin d'obtenir une protection permanente des enzymes. La poudre acétonique, préparée selon Strecker (1955), est dissoute dans du tampon phosphate 0,1 M pH = 7, cette solution centrifugée à grande vitesse puis dialysée contre le même tampon que pour les autres extraits. Toutes les opérations d'extraction sont réalisées dans une chambre froide à +4°C.

L'activité enzymatique de ces différents extraits est déterminée par la méthode de Schmidt (1963) :

Tampon de dosage : triéthanolamine 0,05 M pH=8
Concentrations dans l'essai: NADH ou NADPH: $1,5 \times 10^{-4}$ M
 $\text{NH}_4^+ (\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4)$: $10,5 \times 10^{-2}$ M
EDTA : $2,6 \times 10^{-3}$ M
 α ceto glutarate: 8×10^{-3} M

Le volume final est de 3 ml et l'oxydation du NADH ou du NADPH est suivie spectrophotométriquement à 340 nm. La température du milieu réactionnel n'a pas toujours pu être contrôlée mais on s'est efforcé d'opérer à température constante. Les activités sont données en unités internationales : 1 unité d'enzyme = quantité d'enzyme capable d'oxyder 1 μ M de NADH par minute.

Le tableau I rend compte des résultats obtenus. Deux valeurs sont parfois représentées; la première indique la pente à l'origine, lorsque l'activité variait avec le temps, et que les courbes pouvaient être assimilées à deux droites. Cette pente au départ est peu rigoureuse, sa détermination étant parfois effectuée avec seulement deux ou trois points.

Les protéines ont d'abord été dosées sous forme d'azote total par la méthode de Kjeldahl (protéine = $\text{Nx}6,25$) mais le PVP et le polyclar AT (qui se dissout partiellement au cours de l'extraction), contenant de l'azote et n'étant pas éliminés par la dialyse, les résultats se sont avérés aberrants en ce qui concerne ces deux extraits. Pour ce qui est des autres extraits, la méthode de Lowry (1951), donne des résultats en accord avec ceux trouvés par la méthode de Kjeldahl. Mais il faut auparavant précipiter les protéines par de l'acide trichloroacétique 10% (du volume final), laver les culots à l'acétone et redissoudre ces culots dans de la soude 0,1N pendant 2 heures à 50°C, cela en vue d'éliminer les composés phénoliques subsistants et le mercaptoéthanol qui perturberaient le dosage. Les activités spécifiques rapportées dans le tableau I sont obtenues à partir des protéines dosées par cette méthode. Mais une incertitude demeure pour les extraits contenant du PVP ou du polyclar AT car ces polymères précipitent aussi avec l'acide trichloroacétique; les phénols qui y sont liés précipitent en même temps et sont aussi redissouts par la soude à la fin de l'opération.

T A B L E A U I

Milieux testés	1ers extraits		2ème extraits			
	2g matière fraîche / 20ml tampon		5g matière fraîche /20ml tampon			
	ACTIVITE		immédiatement après l'extraction		24h après l'extraction	
	u/ml	u/mg de protéines	u/ml	u/mg de protéines	u/ml	u/mg de protéines
PVP 1%	0,011	0,008	0,103	0,046	0,132	0,059
Polyclar AT 1g/g tissus frais	0,009	0,008	0,128	0,071	0,110	0,060
Acide Ascorbique 20m M	0,015	0,024	0,030	0,017	0,029	0,016
Métabisulfite 5m M	0,004	0,008	0,035	0,024	0,030	0,021
Glutathion 20 m M	0,026	0,051	0,073	0,043	0,110	0,064
Mercaptoéthanol 20 m M	0,006	0,012	0,032	0,019	0,028	0,016
Thioglycollate 25 m M	0,012	0,022	0,110	0,087		
Poudre acétonique	0,008	0,010	0,086	0,067	0,154	0,120
	0,007	0,009	0,031	0,024	0,023	0,018
	0,026	0,025				
	0,007	0,007	0,026	0,014	0,018	0,009
					0,039	0,056
			0,018	0,026	0,005	0,007

1ers extraits : meilleurs résultats donnés par métabisulfite et thioglycollate

2ème extraits : meilleurs résultats donnés par PVP, Polyclar, métabisulfite, glutathion et mercaptoéthanol.

Les résultats confirment ceux de certains auteurs (Anderson, 1968, Loomis et Battaile, 1968). Les milieux contenant du PVP et du métabisulfite ont été retenus. Nous avons abandonné le milieu avec le polyclar AT, en raison des difficultés de broyage, et parce que l'activité en u/ml du milieu avec PVP était à peu près la même. Des extraits renfermant des concentrations plus importantes de PVP (à 2,5% et à 5%) ont été essayés mais aucune amélioration n'a été observée.

Essai de purification partielle.

L'extrait obtenu absorbe considérablement à 340 nm, ce qui rend les lectures difficiles. Une première purification de l'enzyme a été tentée par précipitation au sulfate d'ammonium. Toute l'activité précipite entre 30 et 50% de saturation (tableau II). On a vérifié qu'à 100% de saturation, rien ne précipitait et que d'autre part la solution finale ne possédait plus aucune activité.

T A B L E A U II

:(NH ₄) ₂ SO ₄ % : de saturation	: PVP 1%		: Métabisulfite 5m M		: PVP 1% + Métabisulfite 5 m M	
	: Activité : : u/ml	: Activité : : spécifique	: Activité : : spécifique	: Activité : : spécifique	: Activité : : u/ml	: Activité : : spécifique
: 30	: 0,055	: 0,046	: 0,036	: 0,026	: 0,061	: 0,066
: 50	: 0,031	: 0,015	: 0,041	: 0,016	: 0,024	: 0,007
: 80	: -	: -	: 0,009	: 0,014	: -	: -

Pour des raisons de sécurité, et de façon à être sûr de récolter un culot contenant toute l'activité enzymatique, les limites ont été étendues de 10 à 60% et on a vérifié que le culot 10% et le surnageant de 60% ne recélaient plus aucune activité.

La purification par abaissement de pH proposé par Pahlich et Joy (1971), n'a donné aucune activité mesurable et a donc été écartée.

Après purification par précipitation au sulfate d'ammonium, les droites $DO = f(t)$ n'ont plus qu'une seule pente, l'enzyme conservant pendant environ dix minutes la même activité.

Les résultats du tableau II appellent quelques remarques : les dosages ont tous été effectués sur 0,5 ml d'enzyme sauf en ce qui concerne la fraction 30% de saturation au sulfate d'ammonium des extraits incluant PVP et PVP + métabisulfite sur lesquels les dosages avec 0,5 ml d'enzyme étaient impossibles, la solution étant trop trouble. Il a fallu descendre jusqu'à 0,15 ml pour pouvoir faire les lectures. Or, il se trouve que justement ces deux valeurs sont les plus élevées. Si on compare les valeurs obtenues dans les trois extraits sur la fraction 50% de sulfate d'ammonium (ces trois déterminations étant effectuées dans les mêmes conditions), on constate que c'est dans l'extrait au métabisulfite que l'activité est la meilleure. On peut donc douter de la supériorité des extraits contenant du PVP, car l'activité plus élevée est certainement due à un effet de dilution, ce qui s'est confirmé par la suite.

L'extrait provenant de la dilution du culot de précipitation à 60% de sulfate d'ammonium et dialyse pendant une nuit contre du tampon phosphate 0,01 M pH 7 avec du métabisulfite 5 m M trois fois renouvelé a été utilisé pour l'étude des meilleures conditions de dosage.

Les dosages des protéines par la méthode de Lowry (1951), précédemment décrite ont alors été comparés avec ceux obtenus par la méthode de Potty (1969), sur l'extrait brut. Les résultats étant analogues, la méthode de Potty plus rapide a donc été adoptée. Il faut cependant noter que les extraits se conservent mieux lorsque le tampon de dialyse contient du mercaptoéthanol au lieu du métabisulfite. En effet, l'extrait (conservé à + 4°C) reste clair et garde de l'activité jusqu'à quinze jours après l'extraction alors qu'avec le métabisulfite, on observe au bout du troisième jour une précipitation importante. Cela est certainement dû aux composés phénoliques présents dans l'extrait qui, en se combinant au mercaptoéthanol ne deviennent plus gênants.

On peut suivre dans le tableau III l'évolution des activités obtenues avec le sulfate d'ammonium. L'extrait final est environ cinq fois plus concentré que les autres extraits et on pouvait s'attendre à une activité plus importante. La diminution de l'activité spécifique de l'extrait final nous démontre que nous n'avons pas purifié l'enzyme mais nous avons tout de même éliminé des composés gênants et d'autre part concentré l'enzyme ce qui facilite les mesures.

T A B L E A U III

Fraction	Protéines mg/ml	Volume ml	Activité u/ml	Unités totales. % retrouvé (entre parenthèses)	Activité spécifique
Extrait brut	1,85	150	0,053	7,95 (100)	0,029
Surageant de 10% (NH ₄) ₂ SO ₄	1,40	145	0,052	7,54 (95)	0,037
10-60% (NH ₄) ₂ SO ₄	6,44	38	0,135	5,13 (64,5)	0,023

II- RECHERCHE DES MEILLEURES CONDITIONS DE MESURE D'ACTIVITE

La technique de Schmidt (1963), prévue pour des mesures d'activité glutamate deshydrogénase extraite d'animaux, il nous a semblé intéressant de réexaminer les conditions de mesure :

nécessité ou non d'EDTA, tampon de mesure et pH optimum, spécificité stricte ou non du coenzyme.

1) EDTA . . .

La suppression de l'EDTA dans le milieu réactionnel nous a permis de mettre en évidence, (en accord avec Pahlich et Joy, 1971), une augmentation d'activité. La perte d'activité avec EDTA est de 28% par rapport au milieu sans EDTA.

2) Tampon de mesure et concentration de chlorure de sodium.

Pahlich et Joy (1971) ont trouvé que l'activité glutamate deshydrogénase, mesurée avec NADH comme coenzyme, est plus importante lorsque la dialyse a lieu contre du tampon tris plutôt que contre du tampon phosphate. Ils ont suggéré qu'il existe deux états de l'enzyme : un état dissocié en sous unités actives avec NADH, un état associé dont l'activité est NAD⁺ dépendante.

D'autre part Florkin et Schoffeniels (1969), ont établi que le chlorure de sodium augmente considérablement l'activité GLDH avec NADH comme coenzyme. Le chlorure de sodium aurait apparemment un effet dissociant.

Nous avons ainsi testé plusieurs tampons de dosage : Tris, phosphate et triéthanolamine à pH=8 avec différentes concentrations de chlorure de sodium. La figure 1 rend compte des résultats obtenus. Les activités sont exprimées pour chaque tampon en % de l'activité sans chlorure de sodium. On observe un petit effet activateur de 50 µ M de chlorure de sodium avec le tampon phosphate ce qui confirmerait l'hypothèse de Pahlich et Joy (1971). Cependant, cette activité (108 µu/ml) est encore inférieure à celle observée avec triéthanolamine sans chlorure de sodium (120 µu/ml).

3) pH optimum et spécificité du coenzyme

La gamme de pH testée (0,1 M) a été divisée comme suit :

Tampon phosphate : pH 6,5 ; 7 ; 7,5

" tris HCl : pH 7,5 ; 8 ; 8,5

" glycine NaOH: pH 9,5 ; 10 ; 10,5 ; 11

et les activités ont été mesurées avec NADH et avec NADPH comme coenzymes (fig.2).

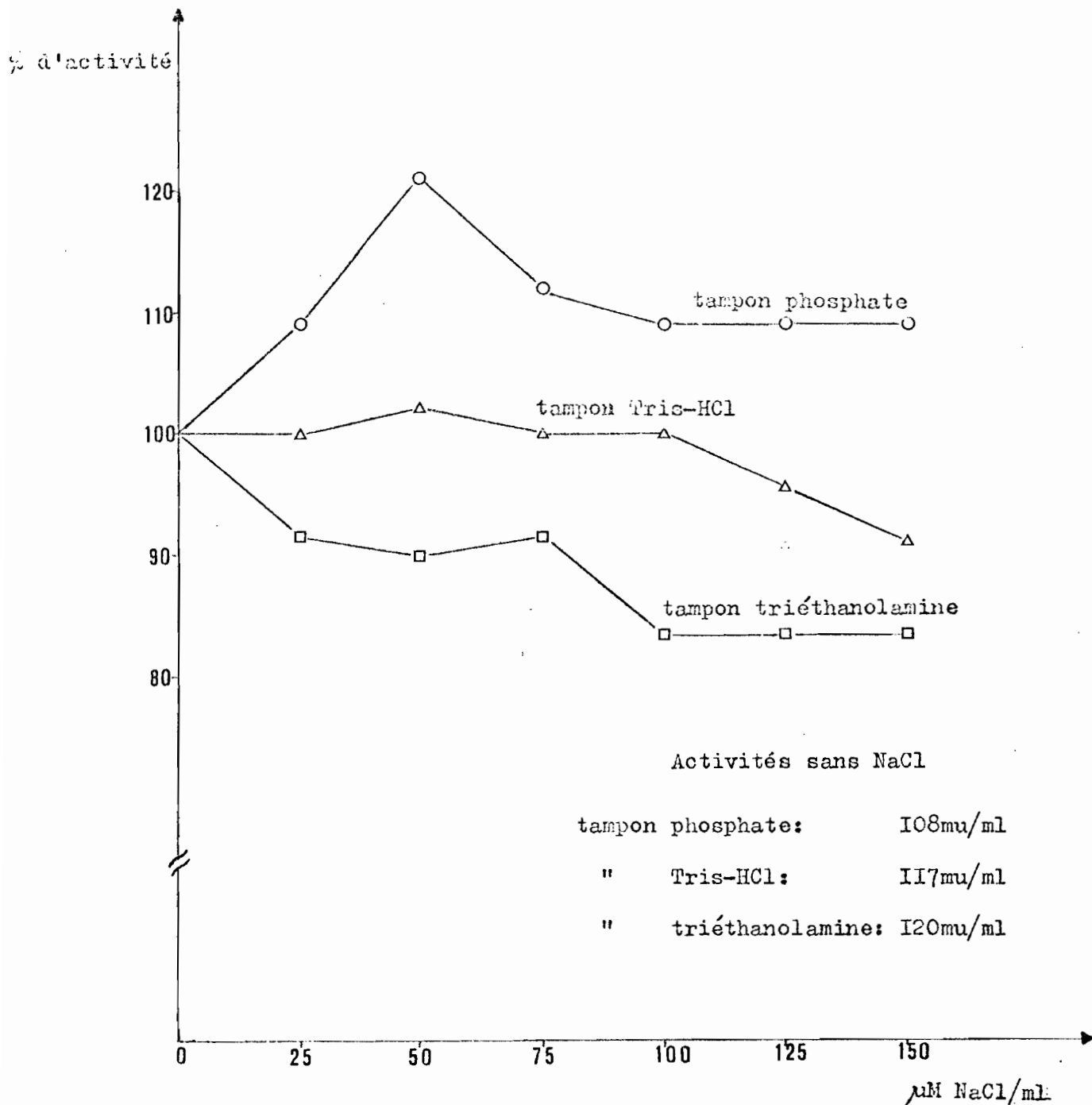


Fig. I Influence de NaCl

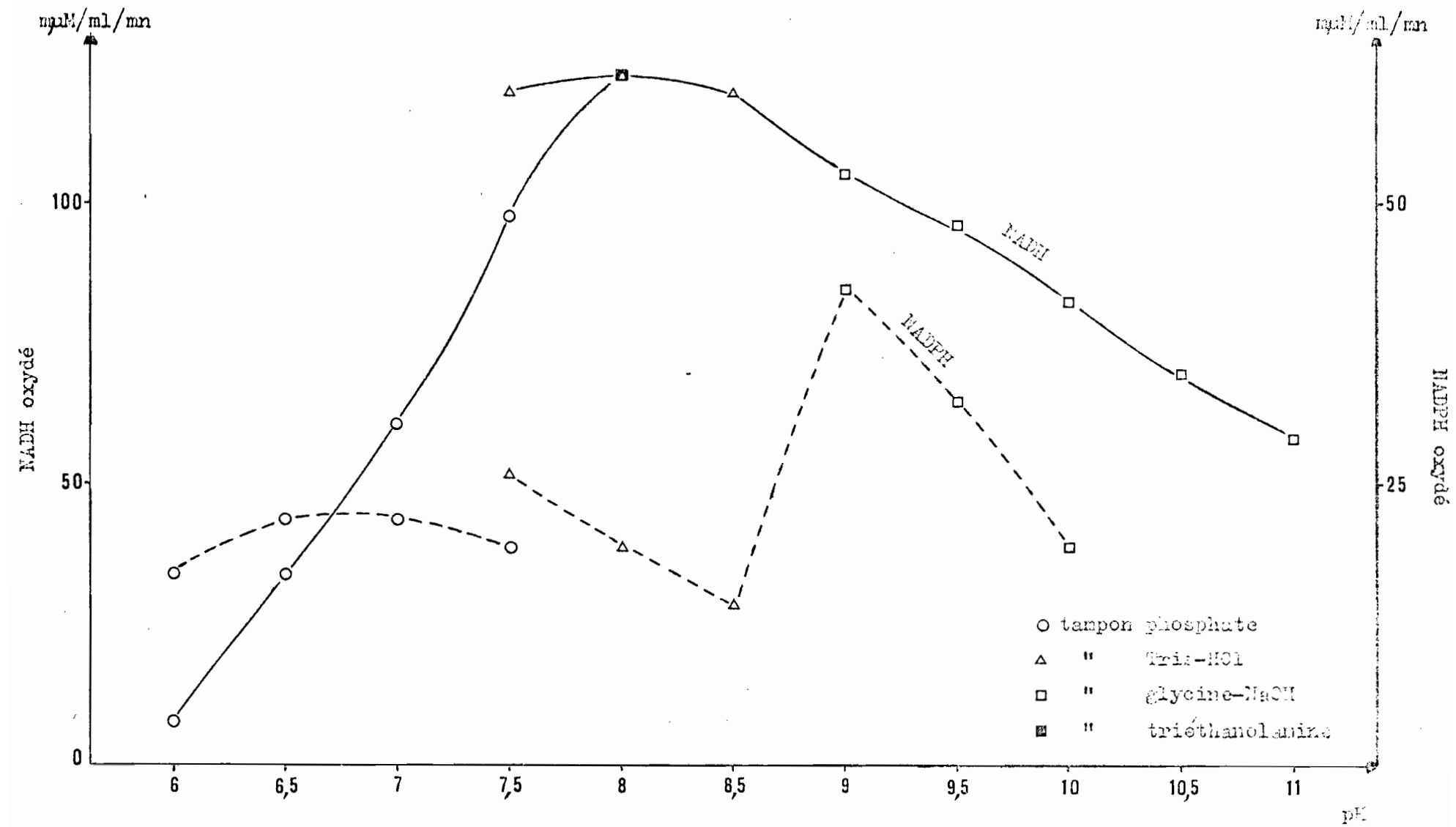


Fig.2 Courbes de pH

On constate que le pH optimum est 8 lorsque les mesures sont effectuées avec NADH et qu'il est de 9 lorsqu'elles sont faites avec NADPH, l'activité maximale avec ce dernier étant seulement 34% de celle obtenue avec NADH. Des mesures réalisées sur les différentes fractions (extrait brut, surnageant de 10% de saturation et culot 10-60% redissout) et dans les conditions de pH optimum pour les deux coenzymes (tampon triéthanolamine pH=8 pour NADH, tampon glycine pH=9 pour NADPH) font apparaître que ce rapport d'activité $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADH}} \times 100$ reste constant.

NADH

Nous voyons donc en accord avec différents auteurs que l'enzyme ne paraît pas avoir une spécificité stricte pour un seul coenzyme mais qu'elle accepte soit NADH, soit NADPH (bien que l'activité soit plus élevée avec NADH). L'optimum de pH pour NADPH est cependant différent de celui indiqué par Pahlich et Joy (1971), qui est de 7,6.

4) Le k_m apparent déterminé sur deux séries d'extraits nous donne une valeur de $3,5 \times 10^{-5} \text{M}$ (fig 3) qui concorde avec celle établie par Bulen (1956), sur les feuilles de maïs.

5) Vitesse de réaction initiale en fonction de la concentration d'enzyme :

Un premier essai, utilisant une concentration de NADH de $2 \times 10^{-4} \text{M}$, nous conduit à une courbe à deux pentes. Un deuxième essai avec une concentration de NADH de $5 \times 10^{-4} \text{M}$ donne des résultats comparables. Bien que les activités ne soient pas du même ordre de grandeur (les plantes étant plus âgées dans le 2ème essai), le changement de pente a lieu pour la même concentration d'enzyme dans les deux cas (fig.4).

Une explication rejoignant celle de Pahlich et Joy (1971), peut être avancée : la concentration de l'enzyme provoquerait une association, et l'enzyme sous cette forme serait moins active avec NADH. Au contraire la dilution favoriserait la dissociation ce qui entrainerait une activité plus importante avec NADH.

Le fait que l'activité obtenue par concentration de l'extrait (précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) est plus faible que celle attendue, est un argument en faveur de cette hypothèse. Nous avons trouvé à plusieurs reprises cette stimulation de l'activité avec la dilution.

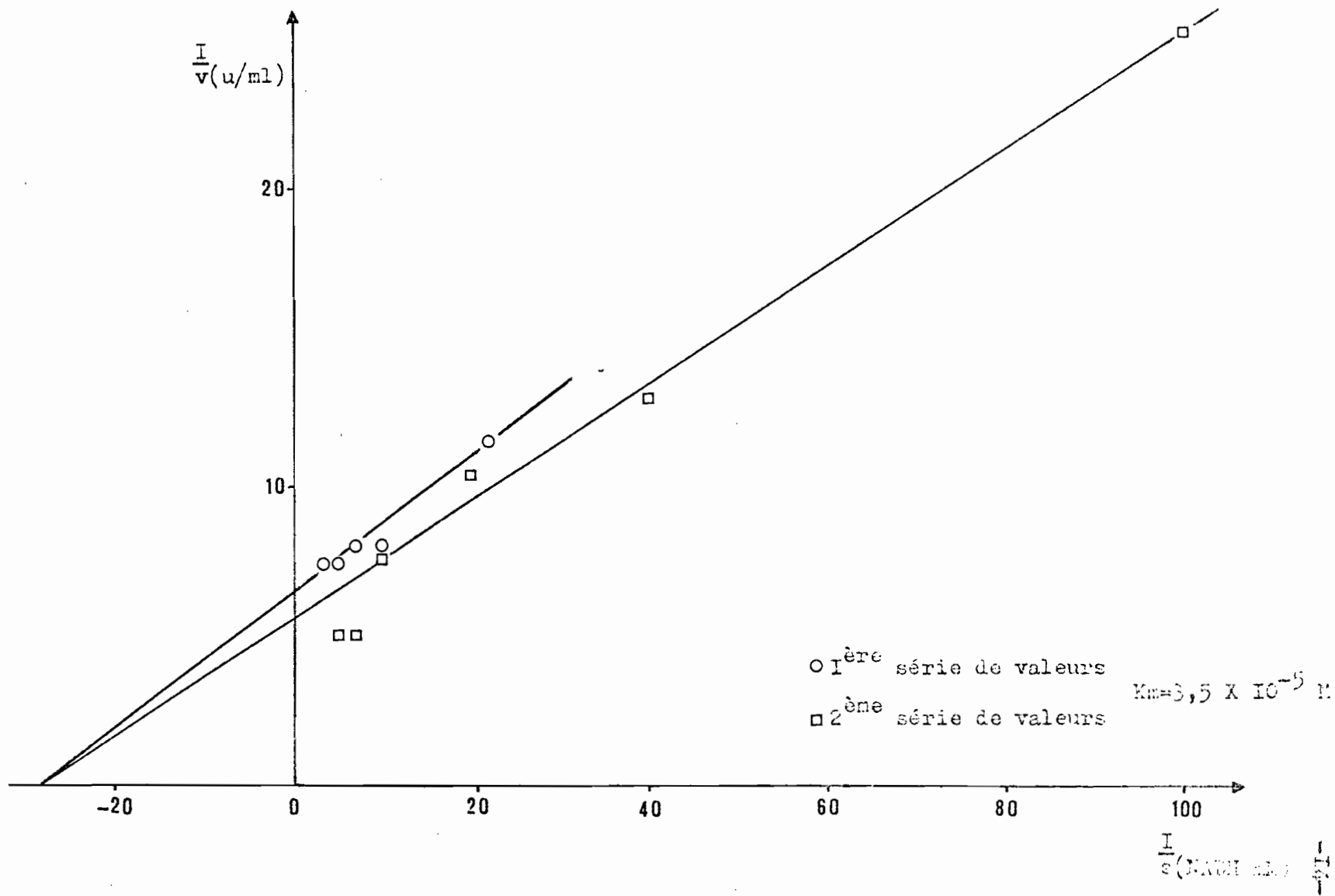


Fig.3 Détermination du Km apparent

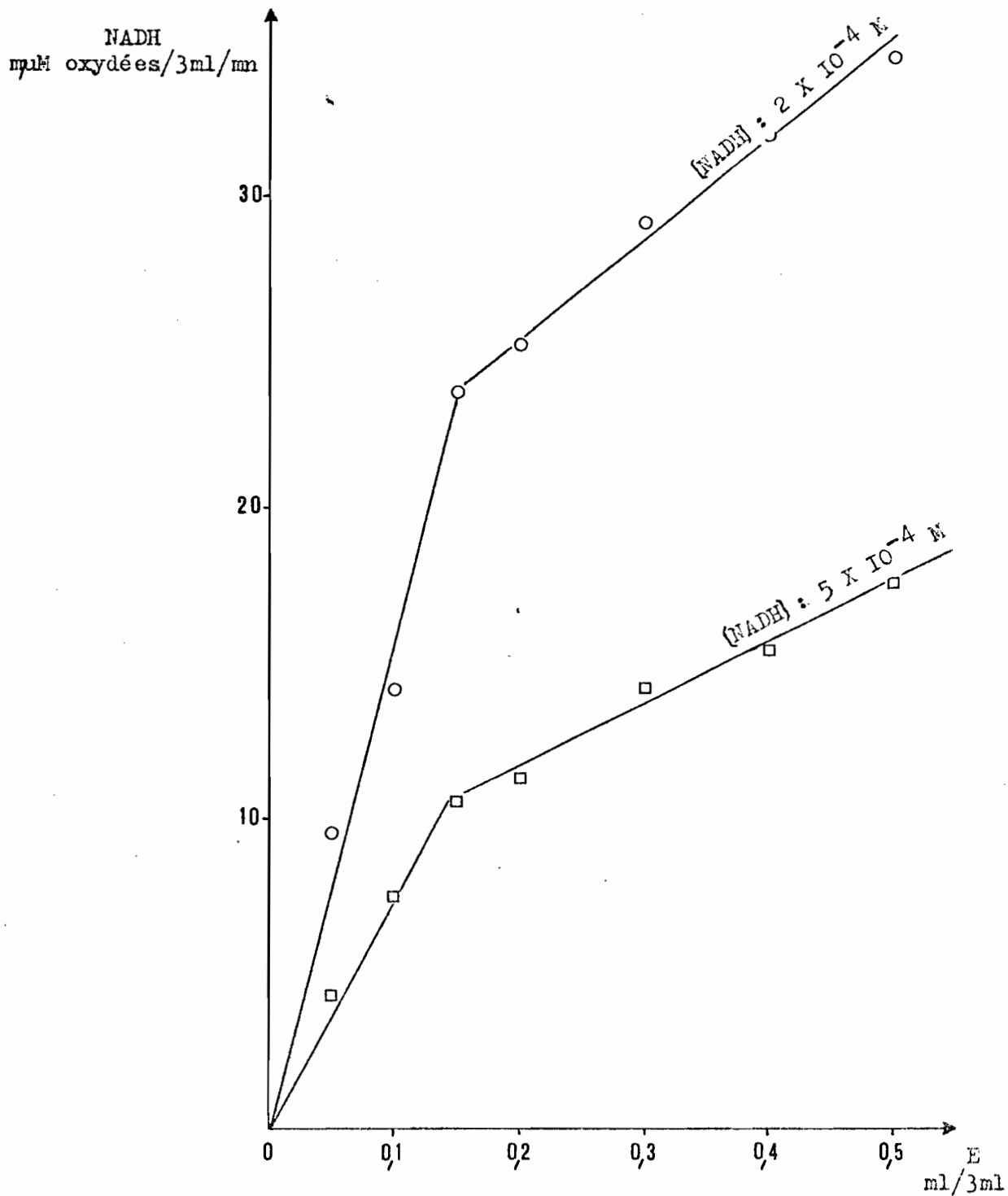


Fig.4 Vitesse initiale en fonction de la concentration d'enzyme

III-CARACTERISATION DE L'ENZYME PAR ELECTROPHORESE

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide est une méthode maintenant assez couramment employée par différents auteurs qui s'intéressent soit aux protéines totales (Steward et al, 1965, Mc Cowin et al., 1968), soit à la caractérisation d'enzymes particulières.

1) Méthodologie.

Des électrophorèses sur gel d'acrylamide ont été effectuées selon la méthode de Davis (1964), comme suit :

Les tubes étant inversés, environ 300 µl de saccharose à 40% sont introduits dans le bas de chaque tube, puis le gel à larges pores (2,5% d'acrylamide) contenant de la riboflavine est ajouté et recouvert par une couche d'eau. La photopolymérisation est réalisée à la lumière de tubes fluorescents au bout de 30 mn. L'eau est enlevée et les tubes rincés deux fois avec le gel de séparation (7% d'acrylamide), avant d'être rempli avec celui-ci. Afin d'avoir une extrémité du gel bien plate, et d'éviter l'action de l'oxygène, on ajoute quelques gouttes d'eau sur le sommet. La polymérisation chimique avec le persulfate d'ammonium se fait en une heure et les gels sont amenés à + 4°C avant d'être utilisés. La solution de saccharose est alors enlevée et les tubes sont retournés et installés dans l'appareil. Les échantillons sont dilués de telle façon que 0,1 µl contiennent environ 400 µg de protéines, et 40% de saccharose. L'échantillon (0,1 µl) est déposé sur le haut du gel et recouvert de tampon d'électrophorèse. L'électrophorèse est ensuite réalisée à + 4°C dans un appareil de Pleuger. La migration vers l'anode suivie grâce au bleu de bromophénol préalablement ajouté au tampon, dure de 1h30 à 2 heures.

Sur certains gels, sont mises en évidence les protéines totales, sur les autres la glutamate deshydrogénase.

2) Mise en évidence des protéines totales

Dès leur sortie des tubes, les gels sont fixés dans de l'acide trichloroacétique 12,5% pendant 30 mn. Puis ils sont colorés dans une solution de bleu de coomassie 1% diluée avec du TCA 12,5% à raison de 2 ml pour 20ml de volume final.

Ils sont laissés dans cette solution une heure, au cours de laquelle les bandes de protéines apparaissent. On décolore ensuite le fond en les laissant une nuit dans du TCA 10%.

3) Mise en évidence de la glutamate deshydrogénase

Le principe est fondé non plus sur l'oxydation du NADH comme c'était le cas dans les mesures d'activité faites au spectrophotomètre, mais au contraire sur une réduction du NAD^+ . La réaction se fait donc dans le sens de la désamination du glutamate. La méthode de Macko et al (1967), est employée pour visualiser la glutamate deshydrogénase.

Le milieu d'incubation contient :

tampon Tris.HCl pH 8,5 : 23,3 ml

glutamate de sodium 2 M : 1,5 ml

NAD^+ (30 mg/ml) : 0,6 ml

Phénazine méthosulfate= PMS (5mg/ml) : 0,12 ml

Nitro bleu de tétrazolium= Nitro BT (10 mg/ml): 1 ml

Dés leur sortie, les gels sont plongés dans les réactifs convenables pendant 15 mn au plus, puis rincés à l'eau distillée.

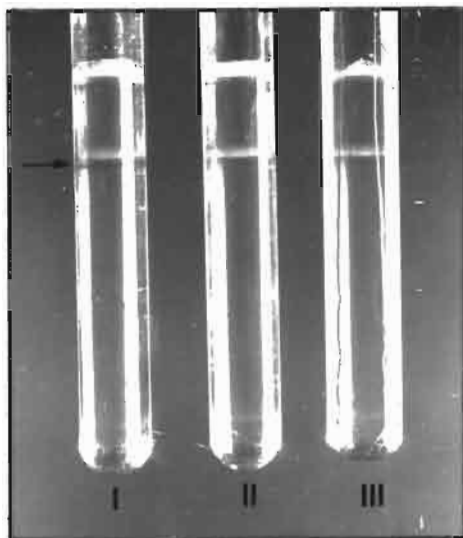
On vérifie que la coloration apparue est bien due à l'enzyme cherchée en réalisant des tubes témoins sans NAD^+ et sans glutamate.

Les gels présentant les bandes correspondantes aux protéines totales et à la glutamate deshydrogénase peuvent être conservés dans l'acide acétique 7%, de préférence à l'obscurité.

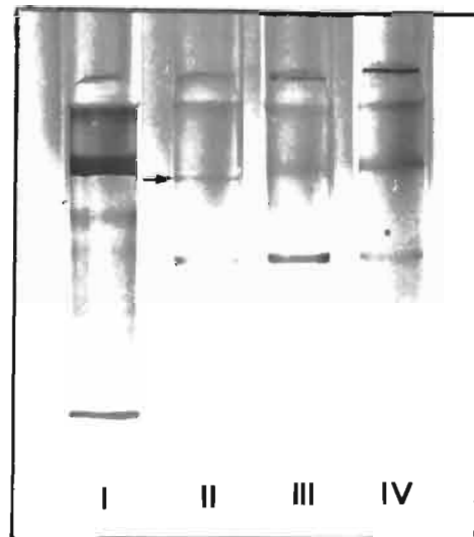
Résultats.

Les figures 5 et 6 rendent compte des résultats obtenus .

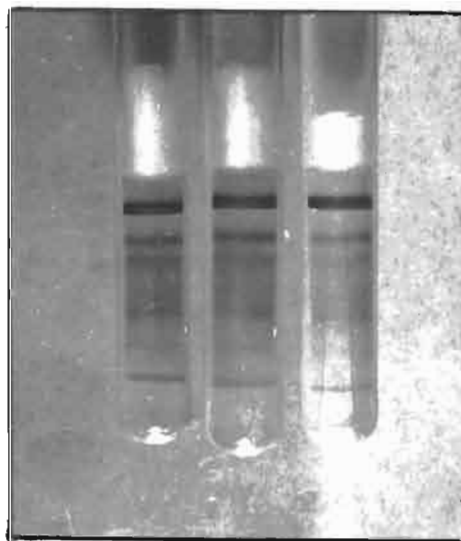
La figure 5 a) représente la mise en évidence de la glutamate deshydrogénase lorsque le tampon de dialyse de l'extrait est du mercaptoéthanol. Une seule bande de coloration violette est visible sur le seul tube contenant tous les réactifs, alors que les tubes témoins (sans NAD^+ et sans glutamate) ne possèdent pas cette bande. La figure 5b) nous montre également une seule bande de glutamate deshydrogénase mais cette fois, le tampon de dialyse de l'extrait contient du métabisulfite et une deuxième bande de même coloration mais ayant migrée davantage, est visible. Cette bande apparait aussi sur les tubes témoins. Elle est attribuable aux composés phénoliques, ceux-ci étant capables de réduire le phénazine méthosulfate qui sert de transporteur d'électron dans la réaction de coloration.



a) I.-Réactifs totaux
II.- " sans NAD
III.- " sans glutamate



b) I.-Protéines totales
II.-Réactifs totaux
III.- " sans NAD
IV.- " sans NAD
et sans glutamate



c) Protéines totales

Fig.5 Caractérisation de GldI par électrophorèse sur gel d'acrylamide
—p: bande colorée de (13E)

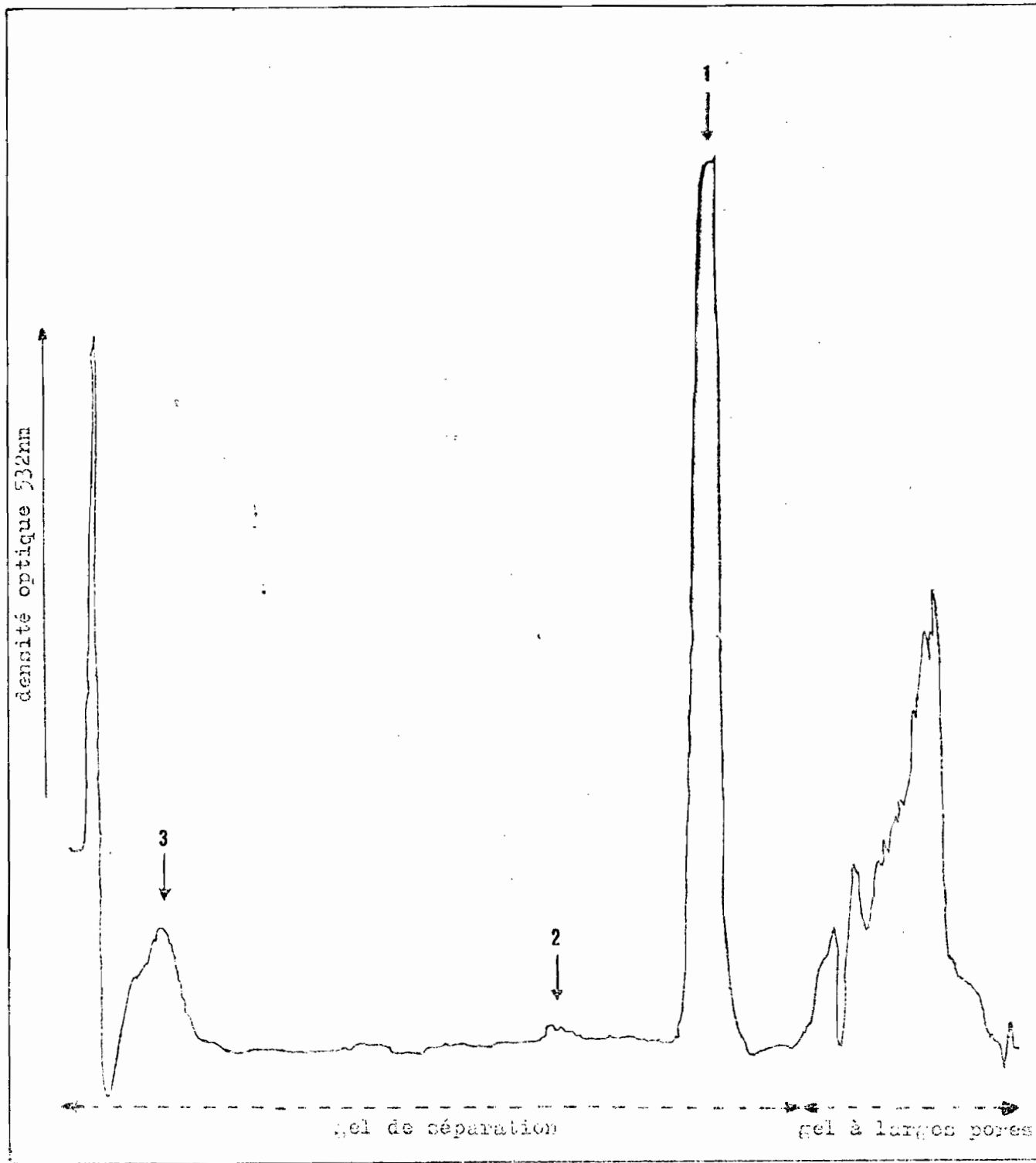


Fig. 6 Enregistrement au spectrophotomètre (Chromoscan) d'un gel ayant la coloration due à la glutamate déshydrogénase. 1: coloration due à GDM. 2: coloration non due à GDM. 3: bleu de bromophénol

Lorsque le tampon de dialyse renferme du mercaptoéthanol, celui-ci réagit avec les phénols et la deuxième bande n'apparaît pas.

La figure 5c) représente les bandes colorées en bleu des différentes protéines et elle nous témoigne de la bonne reproductibilité de la migration électrophorétique.

Il faut noter qu'il ne nous a pas été possible d'obtenir la coloration due à la glutamate deshydrogénase avec NADP^+ au lieu de NAD^+ . L'activité avec NADPH étant plus faible qu'avec NADH , il est possible qu'on ne trouve aucune activité mesurable avec NADP^+ . Bien qu'une seule bande d'activité glutamate deshydrogénase ait été observée, ceci n'est pas en contradiction avec l'hypothèse d'association-dissociation, l'état de l'enzyme dépendant de la concentration. En effet, chez d'autres plantes comme *Urtica dioica* (M. Welander, communication personnelle), l'extrait dilué donne naissance à deux bandes et l'extrait concentré à une seule.

Par ailleurs, il apparaît parfois une autre bande (bande 2 fig. 6) même sans NAD^+ mais pas sans glutamate et qui est vraisemblablement due à une enzyme oxydant le glutamate comme l'a trouvé Tsukanoto (1962).

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que la glutamate deshydrogénase des tissus foliaires de *Chenopodium quinoa* pouvait être extraite dans du tampon phosphate 0,1 M pH= 7 contenant du métabisulfite 5 mM. Elle précipite entre 10 et 60% de saturation de sulfate d'ammonium ce qui permet d'obtenir un extrait sans substance qui interfère sur la lecture. Notons que le tampon de dialyse, utilisé à la fin de l'opération d'extraction, à son importance. Finalement le tampon phosphate 0,01 M pH= 7 contenant du mercaptoéthanol 5 mM est satisfaisant car le mercaptoéthanol réagit avec les composés phénoliques, et permet ainsi une bonne conservation de l'extrait.

L'enzyme ne possède pas de spécificité stricte vis à vis de son coenzyme puisque dans le sens de formation du glutamate, elle admet NADH de même que NADPH bien qu'avec ce dernier, l'activité soit plus faible. Ses pH optima sont pH =8 et pH=9 selon que NADH ou NADPH est utilisé.

Aux concentrations des substrats utilisées en ce qui concerne l' α -ceto glutarate et l'ammoniaque, les activités maximales sont observées quand l'enzyme est suffisamment diluée (moins de 0,15 ml d'enzyme pour 3 ml de milieu réactionnel). Il nous paraît probable que la dilution dissocie l'enzyme et augmente son activité.

Bien que deux enzymes différents aient pu être mises en évidence (Leech et Kirk, 1968), l'une localisée dans les mitochondries fonctionnant avec NADH, et l'autre liée aux lamelles des chloroplastes fonctionnant avec NADPH, et que d'autres auteurs aient trouvé des isozymes (Yue, 1969, Thurman et al, 1965, Grimes et Pottrell, 1966, Pottrell, 1966), nous n'avons pu observer qu'une seule enzyme par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Toutefois, il est difficile de conclure à la présence d'une enzyme unique car on ne peut déceler aucune activité dans le sens de l'oxydation du glutamate avec NADP^+ comme coenzyme.

Cependant, une poudre acétonique du culot obtenu après extraction de l'enzyme soluble, réalisée avec les précautions nécessaires (et dissoute dans du tampon contenant 1% de triton x 100), nous a permis, non seulement d'observer à partir de ce culot une activité importante, ce qui n'avait pas été possible lors de nos premiers essais, mais surtout de vérifier que le rapport d'activité $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADH}}$ est le même que celui de l'enzyme soluble (tableau IV).

Dans ces conditions, il faut admettre ou une solubilisation proportionnelle aux enzymes dans les compartiments chloroplastiques et mitochondriales, ou, comme l'a récemment montré Nikolova Tsenova (1971), dans les chloroplastes, que la glutamate deshydrogénase possède une activité qui peut dépendre aussi bien de NAD^+ que de NADP^+ .

La localisation intracellulaire de la glutamate deshydrogénase et la caractérisation plus précise de l'identité du ou des enzymes responsables de cette activité méritent d'être poursuivies.

T A B L E A U IV

Mise en évidence de la glutamate deshydrogénase
dans l'insoluble

Fractions	Activité(μ/gtissus frais)		NADPH ———— x 100 NADH
	NADH	NADPH	
Insoluble (1) (poudre acéto- nique).	10,4	4,4	42
Extrait brut	96	40	42

(1) Les dilutions n'étant pas les mêmes (5ml pour l'extrait acétonique et 50 ml pour l'extrait brut), il ne faut pas comparer les deux activités entre elles mais seulement les rapports $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADH}}$

B I B L I O G R A P H I E

- ANDERSON, J.W., - 1968- Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. Phytochemistry, Vol.7, 1973-1988.
- BULEN, W.A., 1956- The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. Arch. Biochem. Biophys., 62, 173-183.
- Mc COWN, B.H., BECK, G.E., and HALL T.C., 1968- Plant leaf and stem proteins. I Extraction and electrophoretic separation of the basic, water-soluble fraction. Plant Physiol. 43 578-582.
- DAVIS, B.J., 1964- Disc electrophoresis-II-Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci 121, 404-427.
- FLORKIN, M. et SCHOFFENIELS, E., 1969- L-Glutamate : NAD oxidoreductase (E.N.1.4.1.2) Molecular Approaches to Ecology. Academic press, New York, 136-141.
- FOTRELL, P.F., 1966- Dehydrogenase isoenzymes from legumes root nodules. Nature 210, 198-199.
- GRIMES, H. et FOTRELL, P.F., 1966- Enzymes involved in glutamate metabolism in legume root nodules. Nature 212, 295-296.
- JONES, J.D. et HULME, A.C., 1961- Preparation of mitochondria from the peel of apples. Nature 191, 370.
- LEECH, R.M. et KIRK, P.R., 1968- An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of Vicia Faba L. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.32, N°4, 685-690.
- LOOMIS, W.D. et BATAILLE, J., 1968- Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry, 5, 423-438.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. et RANDALL, R.J., 1951- Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MACKO, V., HONOLD, G.R., et STAHMANN, M.A., 1967- Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. Phytochemistry, 6, 465-471.
- NIKOLOVA TSENOVA, E.- Biosynthesis of alanine and glutamate in isolated chloroplasts. II. International congress on photosynthesis research (Abstracts), Stresa, Italy, June 24th - 29th 1971 p.59.
- PAHLICH, E. et JOY, K.W., 1971- Glutamate dehydrogenase from pea roots : purification and properties of the enzyme. Can. j. Biochem. 49, 127-138.
- POTTY, W.H., 1969- Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. Anal. Biochem. 29, 535-539.

- SCHMIDT, E., 1963- Glutamic dehydrogenase in : Bergmeyer, H.U. (ed) Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 752-756.
- SLACK, C.R., 1966- Inhibition of UDP glucose : D- fructose 2- glucosyltransferase from sugar cane stem tissue by phenol oxidation products. Phytochemistry, 5, 397-403.
- STEWART, F.C., LYNDON, R.F., BARBER, J.T. 1965- Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins : a study on pea seedlings in relation to development. Amer jour. Bot. 52(2) : 155-164.
- STRECKER, H.J., 1955- L-Glutamic dehydrogenase from liver in, Colowick, S.P. et Kaplan, N.O. (ed) Methods in Enzymology, II, 221-225.
- THURMAN, D.A., PALIN, C., LAYCOCK, M.V., 1965- Isoenzymatic nature of L-glumatic dehydrogenase of higher plants. Nature 207, 193-194.
- TSUKAMOTO, A., 1962- Flavoproteins in the leaves of higher plants catalyzing the oxidation of L-glutamate. Plant & Cell Physiol., 3, 293-307
- YUE, S.B., 1969- Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants. Plant Physiol. 44, 453-457.