

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Les différents isoenzymes de la glutamate oxaloacétate transaminase du Mil (Pennisetum glaucum L.). II. Localisation intratissulaire et intracellulaire.* Note de Danièle Lavergne et Serge Tostain, présentée par Alexis Moyse.

L'étude de la compartimentation des isoenzymes de la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) ou aspartate aminotransférase des feuilles de Mil montre une répartition non homogène dans le mésophylle et dans les gaines périvasculaires. Les deux isoenzymes GOT A et GOT B mesurés dans les feuilles entières sont actifs dans les gaines périvasculaires. Seul GOT B a pu être détecté dans les chloroplastes. Dans le mésophylle, un seul isoenzyme est caractérisé, GOT B; il est présent dans les chloroplastes. L'observation des GOT de pollen permet de confirmer l'association de GOT B avec les organites.

PLANT PHYSIOLOGY. — Different isoenzymes of pearl millet (*Pennisetum glaucum L.*) glutamate oxaloacetate transaminase. II. Intratissular and intracellular localization.

Subcellular compartmentation studies showed that millet leaf glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) or aspartate aminotransferase isoenzymes were unevenly distributed between mesophyll and bundle sheath cells. Both isoenzymes GOT A and GOT B measured in the whole leaves were associated with bundle sheath. But only GOT B could be detected in the chloroplasts. Mesophyll tissue and mesophyll chloroplasts contained only the GOT B isoenzyme. The studies on pollen GOT isoenzymes showed GOT B isoenzyme to be associated with the organelles.

Wild and cultivated pearl millets exhibited  $C_4$  photosynthetic carbon metabolism. Substantial glutamate oxaloacetate transaminase activity, GOT (E.C. 2.6.1.1) was detected in the *Pennisetum* suggesting that there is a significant involvement of aspartate transfer between mesophyll and bundle sheath cells ([1], [2]). *Pennisetum* GOT was composed of two isoenzymes GOT A and GOT B coded by two nuclear genes [6]. Subcellular compartmentation studies of the GOT were conducted with isolated mesophyll protoplasts and bundle sheath cells, respectively. Mesophyll protoplasts were obtained by enzymatic digestion [3]. Bundle sheath strands were separated and collected after a second digestion of the mesophyll attack residu. Two types of chloroplasts were isolated respectively from mesophyll protoplasts and from bundle sheath cells [4]. Before studying the GOT distribution the purity of both types of tissues was checked. The marker enzymes were respectively phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme for mesophyll and bundle sheath ([7] at [10]). The cross-contamination of either mesophyll protoplasts by malic enzyme or of bundle sheath strands by phosphoenolpyruvate carboxylase was minimal. The degree of purity of both types chloroplasts was also analysed [11].

GOT isoenzymes (A, B) were unevenly distributed between mesophyll and bundle sheath tissue. Mesophyll cells possessed active GOT B, but lacked GOT A. Bundle sheath GOT zymogram was identical to the one of the whole leaf (GOT A and GOT B). GOT B was associated with both mesophyll and bundle sheath chloroplasts. Both types of chloroplasts lacked GOT A. The GOT isoenzymes distribution was compared to those of others  $C_4$  plants [12], [13]).

The cytoplasmic isoenzymes could be readily obtained from pollen by soaking it in buffer for 12 hrs [5]. GOT A was released during the soaking period. GOT A and GOT B were detected when the pollen was crushed. Therefore, the study of GOT isoenzymes from pollen and photosynthetic tissues led to the assumption that *Pennisetum* GOT B was the isoform associated with organelles.



**INTRODUCTION.** — Chez les Mils pénicillaires à chandelles, on observe un grand polymorphisme morphologique et enzymatique. Les Mils cultivés et spontanés présentent les caractéristiques des plantes de type métabolique  $C_4$  [1]. La fixation photosynthétique primaire de  $CO_2$  est effectuée dans le mésophylle. L'oxaloacétate qui en résulte est principalement réduit en malate, le reste est aminé en aspartate grâce à la glutamate oxaloacétate transaminase ou aspartate aminotransférase (GOT; E.C. 2.6.1.1). Malate et aspartate constituent les formes de transport de  $CO_2$  aux gaines. La compartimentation des isoenzymes de la GOT a été étudiée sur le *Pennisetum glaucum* L. cv 23 DB, lignée naine de Mil cultivé.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les plants de *Pennisetum glaucum* L. cv 23 DB sont cultivés en conditions contrôlées ([1], [2]).

Les protoplastes de mésophylle sont obtenus par digestion enzymatique (cellulase 2% m/v) des jeunes feuilles de plantules âgées de 18 jours. Ils sont purifiés sur Percoll (45% v/v) [3]. Les cellules de gaines périvasculaires sont obtenues par une deuxième digestion enzymatique (cellulase 1% m/v, pectinase 0,4% m/v) du résidu de feuilles collecté après séparation des protoplastes du mésophylle.

Les chloroplastes sont libérés des deux types de cellules après choc osmotique et mécanique. Ils sont isolés par centrifugation [4].

Les extraits de feuilles sont obtenus par écrasement au pilon des disques foliaires. Les grains de pollen sont immergés dans un tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8 (12 h à 4°C). Les enzymes solubles du pollen sont ainsi libérés. La totalité du stock enzymatique est obtenue après broyage énergique des grains de pollen [5].

Les isoenzymes de la GOT sont séparés par électrophorèse de zone sur gel d'amidon ([2], [6]).

Les isoenzymes sont désignés selon la nomenclature décrite [6].

Les enzymes marqueurs sont dosés selon Lavergne et coll. [4].

**RÉSULTATS.** — L'étude du déterminisme génétique des GOT de feuilles de Mil a permis d'établir l'existence de deux isoenzymes GOT A et GOT B codés par deux gènes nucléaires [6]. La répartition de GOT A et de GOT B est étudiée dans les deux tissus chlorophylliens des feuilles. Le mésophylle est séparé sous forme de protoplastes. Les gaines périvasculaires sous forme de cellules associées en chaînes.

La pureté des préparations de mésophylle et de gaines périvasculaires a été vérifiée par contrôle en microscopie photonique et tests enzymatiques caractéristiques de chaque

TABLEAU

Activités PEPC, NADP-ME et succinate cytochrome *c* oxydoréductase (succinate cyt *c* ox-réd) dans les protoplastes et chloroplastes de mésophylle et dans les cellules et chloroplastes de gaines périvasculaires de feuilles de Mil P. 23 DB ( $\mu\text{mole} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Chl). Les valeurs entre parenthèse donne le pourcentage de contamination des gaines périvasculaires par la PEPC, du mésophylle par la NADP-ME, des deux types de chloroplastes par la succinate cyt *c* ox-réd.

*Levels of PEPC, NADP-ME and succinate cyt c ox-red in mesophyll protoplasts and chloroplasts, in bundle sheath cells and chloroplasts isolated from leaves of P. 23 DB ( $\mu\text{mol substrate} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Chl). Values in brackets are percentage of cross-contamination of either bundle sheath strands by PEPC, of mesophyll protoplasts by NADP-ME or of two types chloroplasts by succinate cyt c ox-red.*

	Mésophylle		Gainés périvasculaires	
	Protoplastes	Chloroplastes	Cellules entières	Chloroplastes
PEPC.....	2 170	62	18	7
	(100)		(0,8)	
NADP-ME.....	5,4	4,8	5 787	4 832
	(0,1)		(100)	
Succinate cyt <i>c</i> ox-red. ....	35	4,2	25	3,1
	(100)	(12)	(100)	(11)

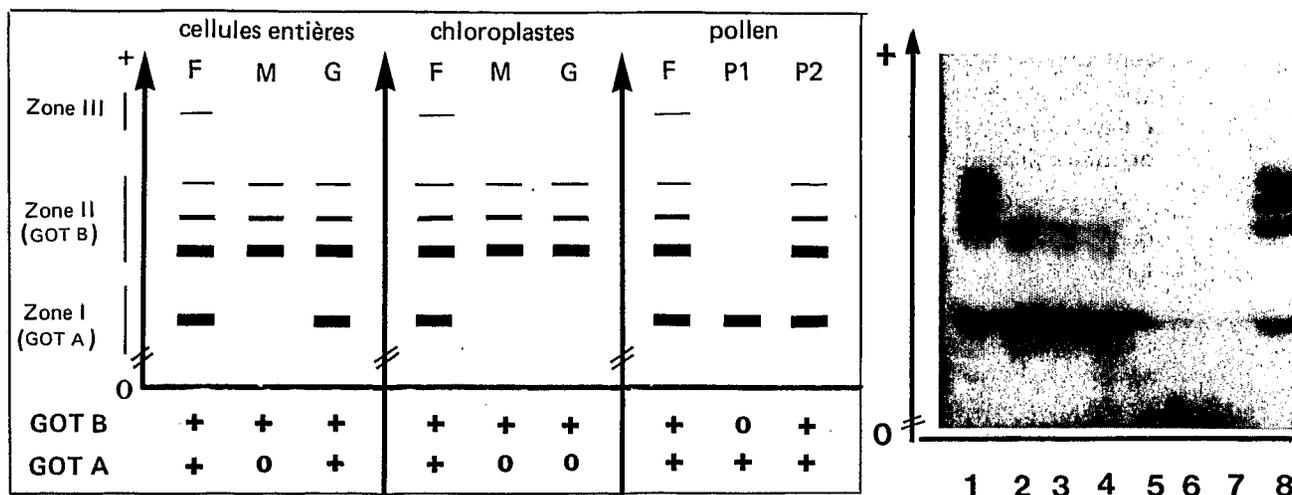


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1. — Répartition intracellulaire des isoenzymes GOT A et GOT B dans le Mil P. 23 DB. Zymogramme des GOT dans : la feuille (F), le mésophylle (M), les gaines périvasculaires (G), le pollen après diffusion (P1), après broyage (P2).

Fig. 1. — Leaf subcellular distribution in pearl millet P. 23 DB of GOT A and GOT B isoenzymes. Zymograms observed for the GOT: leaf (F), mesophyll (M), bundle sheath (G), soaked (P1) and crushed (P2) pollen extracts.

Fig. 2. — Zymogrammes des GOT (GOT A et GOT B) de feuille entière et de grains de pollen. (1), (8) : feuille entière; (2), (3), (4) : extrait de pollen après broyage, P2; (5), (6), (7) : extrait de pollen après diffusion, P1.

Fig. 2. — Zymograms observed for the GOT (GOT A and GOT B) of whole leaf and pollen. (1), (8): whole leaf; (2), (3), (4): crushed pollen extract, P2; (5), (6), (7): soaked pollen extract, P1.

tissus. La phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) a été choisie comme enzyme marqueur du cytosol du mésophylle ([7], [8]), l'enzyme malique à NADP (NADP-ME), comme marqueur des gaines périvasculaires ([9], [10]), la succinate-cytochrome *c* oxydase comme marqueur des mitochondries [11]. Les contrôles enzymatiques montrent une grande pureté pour chaque tissu séparé. Pour les deux types de chloroplastes, les préparations présentent un faible taux de contamination par les mitochondries (tableau).

Dans les protoplastes du mésophylle et dans les cellules de gaines périvasculaires l'activité des isoenzymes GOT A et GOT B n'est pas identique (fig. 1). Le zymogramme des GOT des gaines périvasculaires est le même, dans la zone I et II, que celui des GOT de feuilles entières (GOT A et GOT B). Le zymogramme des GOT de mésophylle est différent de celui des feuilles, seule la zone II est active (GOT B). Une répartition hétérogène des isoenzymes, entre le mésophylle et les gaines périvasculaires a été signalée chez *Atriplex spongiosa* et *Panicum miliaceum* [12]. Chez le Mil, l'isoenzyme GOT A absent du mésophylle pourrait être non synthétisé, ou bien synthétisé en quantité insuffisante ou encore inactivé.

Dans les deux types de chloroplastes (mésophylle et gaines périvasculaires) seule l'activité de la GOT B est détectée. Cette observation n'exclut pas la possibilité de l'existence de la GOT B dans les autres organites cellulaires des Mils. En effet chez le Maïs des isoenzymes de la GOT ont été mesurés dans les fractions mitochondriale, peroxisomale et soluble [13].

Les isoenzymes solubles de la GOT de pollen sont obtenus par simple diffusion, sans contamination par des organites [5]. La comparaison des zymogrammes de GOT obtenus après simple diffusion (P1) et après broyage des grains de pollen (P2), permet de conclure à l'absence de GOT B du cytosol des grains de pollen. GOT B serait donc lié aux seuls organites présents dans le pollen : mitochondries et peroxyosomes par exemple (*fig. 1, 2*).

«CONCLUSION. — Chez les Mils, les GOT sont répartis à la fois dans le mésophylle et dans les gaines périvasculaires. GOT A actif dans les gaines périvasculaires pourrait être localisé dans le cytosol ou dans des organites autres que les chloroplastes. GOT B est détecté dans les chloroplastes des deux tissus. D'après les analyses sur le pollen, GOT B est bien lié aux organites. Cette localisation de GOT B aux chloroplastes, pourrait être spécifique du Mil P. 23 DB. En effet l'isoenzyme n'a pas été trouvé dans les chloroplastes de *Panicum miliaceum* et de *Atriplex spongiosa* [12].

Remise le 27 janvier 1986.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. LAVERGNE, E. BISMUTH et M. L. CHAMPIGNY, *Z. Pflanzenphysiol.*, 91, 1979, p. 291-303.
- [2] S. TOSTAIN et M. F. RIANDEY, *Agronomie*, 5, 1985, p. 227-258.
- [3] D. LAVERGNE et A. HOARAU, *Sixth Int. Cong. Photosynth.*, C. SYBESMA éd., Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publ., Brussels, III, 6, 1983, p. 497-500.
- [4] D. LAVERGNE, M. DROUX, J. P. JACQUOT, M. MIGINIAC-MASLOW, M. L. CHAMPIGNY et P. GADAL, *Planta*, 166, 1985, p. 187-193.
- [5] N. F. WEEDEN et L. D. GOTTLIEB, *Plant Physiol.*, 66, 1980, p. 400-403.
- [6] S. TOSTAIN et D. LAVERGNE, *Comptes rendus*, 302, série III, 1986, (à paraître).
- [7] C. R. SLACK, M. D. HATCH et D. J. GOODCHILD, *Biochem. J.*, 114, 1969, p. 114-489.
- [8] C. PERROT-RECHENMANN, J. VIDAL, A. BURLET et P. GADAL, *Planta*, 151, 1981, p. 226-231.
- [9] C. K. M. RATHNAM et G. E. EDWARDS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 171, 1975, p. 214-225.
- [10] C. K. M. RATHNAM, *What's new in plant physiology*, 9, 1978, p. 1-4.
- [11] R. DOUCE, C. A. MANELLA et W. BONNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 292, 1973, p. 105-116.
- [12] M. D. HATCH et S. L. MAU, *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 1973, p. 195-206.
- [23] J. G. SCANDALIOS, J. C. SORENSON et L. A. OTT, *Biochem. Genet.*, 13, 1975, p. 759-769.

D. L. : *Laboratoire de Photosynthèse et Métabolisme*,  
U.A. n° 1128, C.N.R.S., Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, Bât. n° 430, 91405 Orsay Cedex;

S. T. : *Institut français de Recherche scientifique*  
pour le Développement en Coopération, O.R.S.T.O.M., B.P. n° 11416, Niamey, Niger.