

**Rapport de stage pour l'obtention
du
Diplôme d'Etudes Approfondies
de
Physiologie végétale.**

déposé le 20 mai 1966 à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE RENNES

par

François R. LARHER

**Contribution à l'étude du métabolisme azoté
de
Limonium vulgare Mill.**

INTRODUCTION

Dans le cadre de travaux effectués au laboratoire sur la physiologie des halophytes, je me suis proposé d'étudier le métabolisme azoté de *Limonium vulgare* Mill., appartenant à la famille des Plombaginacées.

Cette plante est abondante sur la rive gauche de l'estuaire du Frémur près du lieu-dit "La ville Gatorge" en Lancieux (Côtes-du-Nord) ; cette station a été parfaitement décrite par Corillion (1955). *Limonium vulgare* pousse sur les vases salées du schorre, en particulier dans les zones tabulaires limitées par les marigots et exposées aux vents dominants du nord.

C'est une héliophile, ses hampes florales se développent fin avril et dominent toute la végétation halophile des zones moyenne et supérieure de l'étage hygro-halin. La plante est très solidement fixée au sol par des racines tubérisées qui s'enfoncent à plus de 30 cm dans la vase. Ces racines sont tractrices, par suite les tiges se trouvent parfois entièrement enfouies. *Limonium vulgare* est pérennant par ces organes souterrains.

D'après Repp (1964), cette plante excrète le chlorure de sodium, ce qui lui permet de contrôler la valeur de sa pression osmotique ; elle se différencie ainsi de *Suaeda macrocarpa* Moq. qui devient succulente. Il paraissait donc intéressant de la retenir pour l'étude de son métabolisme azoté, des données étant déjà acquises sur celui de *Suaeda macrocarpa* Moq.

Dans ce travail, la détermination des acides aminés libres et des amides a montré l'importance de l'arginine ; j'ai donc été amené à suivre l'activité arginasique et uréasique pendant la période de la vie latente et à la reprise de la végétation.

Ce mémoire comportera deux parties :

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES

I. - RECOLTES.

II. - PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL.

III. - ETUDE QUALITATIVE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES.

IV. - ETUDE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'ARGINASE ET DE L'UREASE

I. -- ARGINASE.

II. — UREASE.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES

I. - RECOLTES.

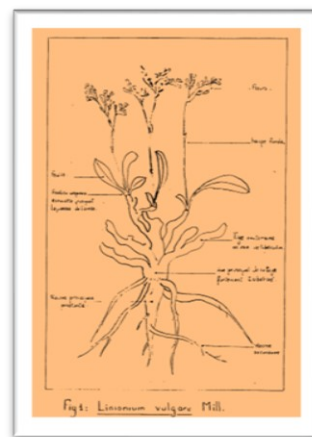
Ce travail a été poursuivi de juillet 1965 à fin mars 1966. ce qui m'a permis d'effectuer des récoltes à 6 stades différents:

- Récolte du 5 juillet 1965 :

- Stade I : les hampes florales bien développées portent des boutons floraux.
- Stade II : les hampes florales portent des fleurs épanouies.
- Récolte du 26 octobre 1965 :
- Stade III : les fruits sont mûrs et dans 50 % des cas les hampes florales sont sèches.
- Récolte du 2 décembre 1965 :
 - Stade IV : les hampes florales subsistent, mais toutes sont desséchées. Il reste en général sur chaque plant une ou deux feuilles vertes de la rosette de l'année. Il apparaît de plus dans cette rosette, de nouvelles feuilles dues aux conditions climatiques clémentes en octobre et en novembre(1965)
- Récolte du 6 janvier 1966 :
- Stade V : la dormance des deux bourgeons latéraux situés de part et d'autre de la hampe florale est levée.
- Récolte du 23 mars 1966 :
- Stade VI : les bourgeons se développent et donnent des feuilles assimilatrices.

II. - PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL.

J'ai étudié séparément les feuilles, les hampes florales, les fleurs, les bourgeons, la pousse de l'année (1965), la tige souterraine en voie de tubérisation, l'axe principal de la tige, la racine principale pivotante et enfin les racines secondaires (fig. 1). Après séparation, ces différentes parties sont soigneusement lavées à l'eau distillées et séchées entre deux feuilles de papier Joseph. Elles sont fragmentées grossièrement, puis placées dans une étuve sous vide, en présence de chlorure de calcium, à la température ambiante, pendant 48 heures. On les conserve ensuite au réfrigérateur, dans un dessiccateur sous vide partiel. Dans ces conditions, le matériel végétal se conserve intact pendant un mois au moins. Il n'est pulvérisé au broyeur Dangoumeau qu'au moment de son utilisation.



III. Etude qualitative des acides aminés et amides libres

J'ai détecté et déterminé les acides aminés et amides libres des différents organes par chromatographie bidimensionnelle sur papier.

A. - Préparation de l'extrait à chromatographier.

On réalise une extraction aqueuse à froid (0°). On précipite les protéines par

l'addition d'une solution d'acide trichloracétique, selon la méthode mise au point par GUITTON (1964).

On fixe les acides aminés et les amides par passage de l'extrait sur colonne de résine Dowex 50 x 8 H⁺, 100-200 mesh à la vitesse de 12 gouttes par minute. On lave la résine à l'aide de 250 ml d'eau, on élue avec 250 ml d'une solution 1N d'ammoniaque. On évapore l'éluat ammoniacal sous pression réduite et à 35 degrés à l'évaporateur rotatif. On dissout le résidu par une très petite quantité d'eau, puis on évapore à sec sous vide en présence de chlorure de calcium. Enfin, on reprend le résidu final par 1,5 ml d'eau distillée. Cet extrait aqueux est utilisable pour la chromatographie sur papier.

B. - Chromatographie.

1.- Essai de concentration. On détermine pour un organe donné la quantité optimale d'extrait à chromatographier pour obtenir des spots bien séparés et suffisamment colorés après révélation à la ninhydrine. Pour ce faire, on réalise une chromatographie monodimensionnelle pour des volumes de 20, 40 et 60 microlitres de l'extrait, on utilise comme solvant le système n-butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5).

2.- Mise en route, développement et révélation des chromatogrammes.

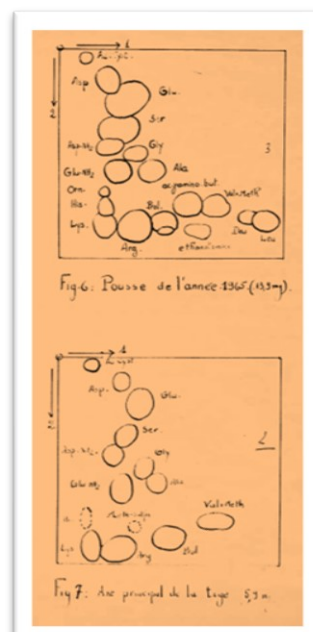
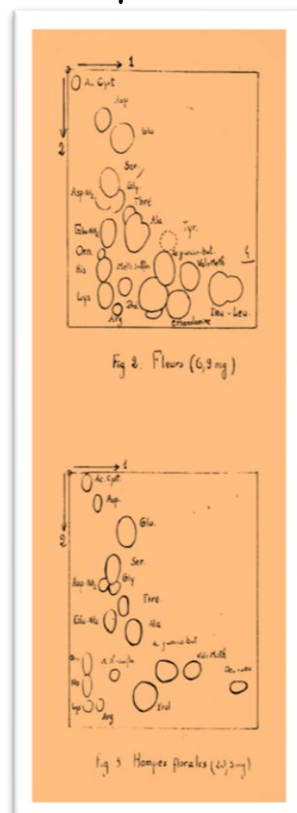
Pour chaque échantillon, on effectue une chromatographie bidimensionnelle descendante sur papier WHATMAN n° 1. On développe les chromatogrammes en utilisant pour la première dimension le solvant : n-butanol- acide acétique- eau (4 : 1 : 5) et pour la deuxième dimension le système: phénol / eau (1 : 1).

On révèle à la ninhydrine à 0,1 % dans le n-butanol, à la température de 80°c.

3. - Identification des acides aminés. On identifie les spots en se référant au chromatogramme témoin d'une solution de 22 acides aminés réalisé dans les mêmes conditions. Pour chaque chromatogramme, on donne la correspondance entre le volume d'extrait chromatographié et le poids sec initial de matériel végétal.

C- Résultats.

Les chromatogrammes obtenus pour les différents organes de la



plante sont reproduits dans les figures numérotées de 2 ... 9 (seules quatre sont représentées). J'ai obtenu 22 spots distincts. Vingt-et-un ont été déterminés avec certitude; il s'agit de l'acide cystéique, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la glycine, l'asparagine, la glutamine, la thréonine, l'alanine, l'ornithine, l'histidine, la lysine, l'arginine, la méthionine-sulfoxyde, la proline, l'acide γ -aminobutyrique, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine la tyrosine. Un seul reste non identifié, il se place au voisinage de la proline, son Rf dans le phénol est 0,93. On peut aussi signaler la présence de l'éthanolamine. L'ensemble de tous ces composés se retrouve à la floraison (fig. 2 et 3).

L'étude comparée de ces chromatogrammes permet déjà de se rendre compte de la répartition des acides aminés et amides libres dans la plante. D'une façon générale, les organes aériens présentent le plus grand nombre d'acides aminés (21 ou 22 spots) ; seule la tyrosine est parfois absente. L'acide glutamique, la sérine, l'alanine et la proline sont toujours dominants. La glutamine, l'arginine et l'ornithine sont faiblement représentées.

Au contraire, dans la partie souterraine, quatorze acides aminés sont seulement mis en évidence. La thréonine, l'ornithine, l'histidine, la lysine, la méthionine et l'acide γ -aminobutyrique ne sont pas retrouvés. Dans ce cas, l'acide glutamique et la proline demeurent importants mais l'arginine et la glutamine deviennent les acides aminés prépondérants. L'ornithine est à peine décelée dans les tiges en voie de tubérisation et dans les racines secondaires, et elle n'est pas décelable dans l'axe principal de la tige et la racine principale pivotante.

La pousse développée en 1965 mérite un examen particulier en effet, cette partie de la plante montre une richesse en acides aminés et amides libres comparable à celle des organes aériens. Mais, parmi les spots dominants, à ceux de l'acide glutamique, de la sérine, de l'alanine et de la proline s'ajoutent ceux de la glutamine et de l'arginine (Fig. 6 et 7) . Le spot de l'ornithine est également bien net.

IV. - ETUDE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES.

A. - Techniques et expression des résultats.

J'ai dosé les acides aminés et amides libres par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions, à l'analyseur automatique d'acides aminés BECKMAN, selon la technique définie par SPACKMAN, STEIN et MOORE en 1958.

1. - Préparation de l'extrait à chromatographier.

On prépare un extrait trichloracétique (GUITTON, 1964) à partir de 500 mg de poudre végétale. On en prélève, à la pipette, une fraction aliquote de 4 ml que l'on introduit dans une fiole jaugée de 10 ml. On ajuste au trait de jauge à l'aide d'une solution tampon de pH 2,2 (HCl - citrate de Na). Il suffit d'introduire une partie aliquote de cet extrait au sommet de la colonne choisie pour réaliser ultérieurement l'élution.

En ce qui concerne les extraits de *Limonium vulgare*, une difficulté surgit. En effet, en présence de la solution tampon de pH 2,2, il se forme un précipité blanchâtre très dense. Ce précipité risquant de colmater les colonnes, il est nécessaire d'éliminer le ou les composés responsables de cette réaction. Comme le précipité n'est pas retenu sur papier filtre, il convient de changer les conditions d'extraction, d'essayer une autre méthode d'extraction, d'employer un autre défécant, ou d'éliminer la substance qui provoque le précipité.

- *Conditions d'extraction.*

Au cours des premières extractions, les centrifugations étaient effectuées à la température du laboratoire ; le refroidissement préalable des pots de centrifugation à 4°C n'a apporté aucune amélioration. Un second essai à la centrifugeuse réfrigérée, à 47 000 g à - 5°C n'a pas donné de meilleurs résultats; au contraire, la ou les « substances gênantes » sont mieux extraites dans ces conditions et précipitent, ensuite, abondamment en présence de la solution tampon de pH 2,2.

- *Extraction alcoolique.*

Le ou les composés gênants se sont révélés très solubles dans l'alcool éthylique à 95° et précipitent en présence de la solution tampon de pH 2,2. Par refroidissement à 4°C il se forme un véritable agrégat brun-rosé, qui reste sur papier filtre, ce qui permet d'obtenir un filtrat limpide. Il est à craindre que le précipité d'apparence colloïdale ne retienne une fraction d'acides aminés. Il faudrait donc le laver plusieurs fois. Mais l'extraction par l'alcool nécessite déjà une évaporation à l'évaporateur rotatif ; le lavage du précipité entraînerait plusieurs centrifugations, toutes ces opérations sont longues et comportent des risques de perte. C'est pourquoi je n'ai pas retenu ce mode opératoire.

- *Emploi de différents défécants.*

Le métaphosphate naissant (H_2SO_4 0,66 N + Métaphosphate à 10 %) provoque le même inconvénient que l'acide trichloracétique : les composés gênants restent dans l'extrait et précipitent au contact du tampon de pH 2,2. Celui-ci s'est révélé un mauvais défécant...

- *Elimination des substances responsables de la précipitation.*

J'ai pensé à l'emploi de la résine Dowex 50 x 8, 100-200 mesh pour purifier l'extrait. Ce support permet d'exclure tant les composés acides que les neutres. Les acides aminés retenus sont ensuite élués à l'ammoniaque. Ce mode opératoire élimine les agents précipitants. Cependant des essais de chromatographie réalisés sur l'effluent montrent que les acides aminés ne sont pas retenus quantitativement sur le support. De plus, l'élution par fractions successives d'ammoniaque 1N (250 ml, puis 100 ml) ne permet qu'une récupération incomplète des amino-acides. J'ai alors remplacé l'éluant par de l'ammoniaque 2N. Il reste encore des acides aminés sur la colonne. En conséquence cette méthode, efficace pour éliminer les composés gênants ne peut être retenue du fait qu'elle n'est pas quantitative.

J'ai donc été amené à suivre le mode opératoire ci-après : l'extraction de l'azote soluble se fait dans les conditions définies par GUITTON (1964). La solution trouble obtenue en diluant la partie aliquote de l'extrait trichloracétique dans la solution tampon de pH 2,2 est centrifugée à la centrifugeuse réfrigérée * (-5°C, 47 000 g.). Au bout de 70 minutes de centrifugation, le précipité blanchâtre se dépose parfaitement et on recueille un surnageant limpide. Ce dernier ne précipite plus, ni en présence de solution tampon de pH 2,2, ni en présence des différentes solutions tampons utilisées pour l'élution des acides aminés. Il ne présente plus aucun danger de colmatage des colonnes de l'analyseur automatique BECKMAN. Cependant, pour ne pas modifier la dilution initiale, le culot de centrifugation n'est pas lavé, et il n'est donc pas exclu qu'une fraction des acides aminés puisse s'y adsorber plus ou moins sélectivement.

2. - Analyse. Les acides aminés basiques sont séparés par élution sur une colonne de 15 cm à 50°, à pH 5,28 ; les acides et les neutres sur une colonne de 150 cm, à 50°, par des solutions tampons de pH 3,26 et 4,25. Dans ces conditions, les amides sont éluées avec la sérine ; pour les obtenir séparément, on réalise une analyse à 30° sur colonne de 150 cm à pH 3,28. Enfin, l'acide γ -aminobutyrique et l'ornithine sont isolés sur une colonne de 50 cm, à 30°, et à pH 4,26.

3. - Expression des résultats.

On obtient des courbes d'élution, chaque acide aminé ayant son temps de rétention sur le support considéré et en présence de la solution tamponnée ad hoc. L'aire de chaque « pic », calculée par la méthode de la demi-hauteur, conduit au nombre de micromoles de l'acide aminé correspondant par référence à une « courbe étalon ». Les résultats sont donnés en micromoles d'acide aminé par gramme de matériel végétal sec.

**Je remercie Monsieur le Professeur VILLERET d'avoir bien voulu m'autoriser à utiliser la centrifugeuse réfrigérée du laboratoire (sic !)*

B. Résultats expérimentaux

J'ai effectué, au stade II, stade de la floraison, les dosages des acides aminés et amides libres des organes aériens, de la tige développée en 1965 et des tiges en voie

tubérisation.
résultats sont
réunis dans le
tableau 1 :

TABEAU 1
Acides aminés et amides libres des différents organes
de Limonium vulgare Mill. à la floraison

Acides aminés en micromoles par gramme de matière sèche	Tiges an- térieures à 1965	Tige dé- veloppée en 1965	Feuilles	Hampes florales	Fleurs
Acide aspartique	0,5	1,2	1,1	1,1	1,3
Thréonine	0,8	2,8	1,9	1,9	4,8
Sérine	1,3	3,5	5,0	5,0	<u>7,6</u>
Amides	<u>7,3</u>	<u>35,0</u>	1,3	4,7	<u>8,8</u>
Acide glutamique	2,4	<u>7,1</u>	1,5	4,1	5,0
Proline	<u>21,0</u>	<u>76,9</u>	<u>40,2</u>	<u>46,0</u>	<u>48,0</u>
Glycine	0,4	0,7	0,5	0,2	2,4
Alanine	1,3	3,6	<u>9,3</u>	5,0	<u>16,0</u>
Acide γ -aminobutyrique	0,5	3,7	4,3	3,9	<u>11,5</u>
Ornithine	-	-	0,3	0,5	0,2
Valine	traces	1,2	0,8	0,7	4,4
Méthionine	traces	traces	0,2	traces	0,6
Isoleucine	traces	0,6	0,3	0,4	2,5
Leucine	traces	0,4	0,2	0,2	3,1
Tyrosine	-	-	traces	traces	1,6
Phénylalanine	-	-	traces	traces	1,9
Lysine	0,9	0,7	0,8	0,5	3,1
Histidine	0,8	1,7	0,4	0,5	2,9
Arginine	<u>13,1</u>	<u>24,6</u>	-	0,6	1,8
Total	50,5	163,7	68,0	75,3	125,9

Les

L'examen des résultats de ces dosages permet

L'examen des résultats de ces dosages permet d'apprécier l'importance de la fraction aminée dans les différents organes étudiés et de préciser la prépondérance, sur le plan

quantitatif, de certains acides aminés.

- *Importance de la fraction aminée.*

Au stade de la floraison, si on classe les organes en tenant compte de leur richesse en acides aminés, la tige développée en 1965 se place la première. Puis, viennent les fleurs avec une fraction aminée légèrement inférieure. Ensuite, se rangent les hampes florales et les feuilles sensiblement moins riches et enfin les tiges souterraines.

Les acides aminés et amides libres sont donc plus abondants dans les organes jeunes et dans les organes en pleine activité métabolique que dans les tiges souterraines, organes en voie de tubérisation.

La fraction α -aminée et amidée se répartit, pour les organes aériens, entre les vingt composés identifiés par chromatographie sur papier. Dans les organes souterrains, on retrouve aussi les douze acides aminés et amides révélés dans l'analyse qualitative.

-

Pourcentage de la fraction totale aminée	Tiges antérieures à 1965	Tige développée en 1965	Feuilles	Fleurs	Hampes florales
Sérine	3,0	2,1	<u>7,4</u>	<u>6,0</u>	<u>6,6</u>
Amides	<u>14,5</u>	<u>21,5</u>	1,8	<u>7,0</u>	<u>6,2</u>
Acide glutamique	4,7	4,3	2,2	4,1	5,4
Proline	<u>41,5</u>	<u>47,0</u>	<u>59,3</u>	<u>38,2</u>	<u>61,0</u>
Alanine	2,6	2,2	<u>13,7</u>	<u>12,7</u>	<u>6,0</u>
Acide γ -aminobutyrique	1,0	2,3	<u>6,3</u>	<u>9,1</u>	<u>5,2</u>
Ornithine	0	0	0,4	0,2	0,7
Arginine	<u>26,0</u>	<u>15,0</u>	0	1,4	0,8

Importance relative de chaque acide aminé

Parmi les amino-acides libres, la proline, l'alanine, l'arginine et les amides sont les mieux représentés dans tous les organes étudiés. Toutefois, pour se rendre compte de l'importance relative de chaque composé on a exprimé sa teneur en pourcentage de l'ensemble des acides aminés et amides libres quantifiés selon cette méthode (Tableau 2).

Chez *Limonium vulgare*, 50 % de la fraction aminée totale sont représentés par la proline. Les teneurs maximales de 60 % sont observées dans les feuilles et les hampes florales. La teneur des tiges (41,5 % et 47 %) est légèrement plus élevée que celle des fleurs (38,2 %). L'alanine est abondante seulement dans les feuilles et les fleurs. Dans les tiges en voie de tubérisation et dans la tige de l'année, sa teneur est plus faible et n'atteint plus que 2,2 % de la fraction aminée totale.

La proportion de la sérine et de l'acide γ -aminobutyrique est aussi relativement importante dans les feuilles et les fleurs. Celles-ci sont aussi les plus riches en alanine. Ils sont en proportions très faibles dans les organes souterrains.

L'arginine et les amides ne constituent que 1,8% de la fraction aminée des feuilles, 7 % de celle des hampes florales et 8,4 % de celle des fleurs. Ils représentent 36,5 % et 40,5 % des acides aminés et amides libres de la tige développée en 1965, et de la tige en voie de tubérisation.

Seul, l'acide glutamique montre une répartition plus équilibrée entre les différents organes, la teneur des feuilles étant la plus faible. L'ornithine seulement décelée dans les parties aériennes est plus abondante dans la hampe florale.

C. - Discussion.

La teneur très élevée en proline de tous les organes de *Limonium vulgare* retient l'attention. Les études effectuées au laboratoire sur le métabolisme azoté des halophytes ont déjà mis en évidence l'abondance de la proline sous forme libre chez *Suaeda macrocarpa* Moq. et *Aster tripolium* L. Cette accumulation inhabituelle de proline semble être liée à la présence de chlorure de sodium dans le sol. Des résultats comparables sont obtenus par Strogonov et ses collaborateurs (1960) pour des tiges de *Vicia faba* maintenues dans des milieux de KNOP contenant des doses croissantes de chlorure de sodium. Ces auteurs ont montré que simultanément, les teneurs en valine et en arginine augmentent alors que la putrescine s'accumule dans les feuilles.

L'accumulation d'arginine dans les organes souterrains pérennants de *Limonium vulgare* se présente comme un fait singulier. 32,16 % de la masse molaire de l'arginine sont constitués d'azote et à ce titre, ce composé a vocation à se comporter comme une source d'azote réduit, utilisable par la plante. Dès 1896, SCHULZE interprète de cette façon la présence de cet acide aminé dans les graines. Cette idée est reprise en 1932 par G. KLEIN et K. TANOCK. E.W. YEMM et B.F. FOLKES (1958) qui ont, les premiers, émis l'hypothèse du rôle de l'arginine et des amides dans la mobilisation et le transfert de l'azote. GUITTON (1959) a mis en évidence ce rôle au cours de la germination des graines de *Pinus pinaster* Sol.

Dans les graines de vingt-cinq légumineuses, PRZYBYLSKA et HURICH (1960) retrouvent aussi de fortes proportions d'arginine. Cet acide aminé est accompagné de la canavanine pourvu elle-aussi d'un groupement guanidyle, aussi ces auteurs suggèrent-ils que ce groupement représente une forme d'azote utilisable lors de la germination.

DURANTON (1958) a également mis en évidence des quantités importantes d'arginine dans les tubercules de Topinambour. Il attribue à cet acide aminé un double rôle : celui de réserve azotée et celui de précurseur dans la synthèse des pigments. L'accumulation d'arginine dans ces différents organes de cette plante et en particulier dans le rhizome est à rapprocher de ce que nous observons chez *Limonium vulgare* Mill.

Si l'arginine constitue également pour cette halophyte une réserve d'azote, celle-ci doit pouvoir être mobilisée par voie enzymatique. Il paraissait alors intéressant de rechercher l'arginase et l'uréase et de suivre leur activité au cours de la période de vie ralentie et à la reprise de la végétation. En

effet, ces deux enzymes par leurs actions successives conduisent au « détachement » de l'ornithine et à la dégradation du groupement guanidyle de l'arginine en CO^2 et NH_4 . L'azote accumulé dans l'arginine serait ainsi libéré sous une forme réduite directement utilisable dans le métabolisme.

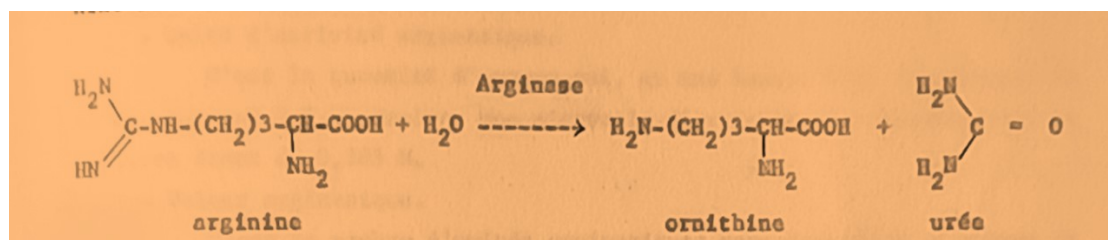
DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'ARGINASE ET DE L'UREASE

I. - ARGINASE.

A. - Méthode.

1. - Principe. L'arginase assure l'hydrolyse enzymatique de l'arginine selon la réaction :



Pour évaluer l'activité de cet enzyme, il suffit de doser l'urée apparue dans une solution d'arginine de concentration connue sous l'action du matériel végétal.

2. - Protocole expérimental. J'ai adopté le protocole de ARCHIBALD

et VAN SLYKE (1932) modifié par GUITTON (1957). L'urée provenant; de l'hydrolyse de l'arginine est dosée sous forme de dixanthyl-urée selon la méthode de FOSSE (1916). Pour chaque organe étudié on prépare les essais suivants :

	Essai N° 1	Essai N° 2	Témoin N° 1	Témoin N° 2
Solution d'arginine 0,285 M de pH 9,5 dans Tampon Clark et Lubs	5 ml	5 ml	-	5 ml
Matériel végétal	50 mg	50 mg	50 mg	-
Solution Tampon de Clark et Lubs de pH 9,5	-	-	5 ml	-
Toluène	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes
Temps de réaction	14 h	14 h	14 h	14 h
Température	43°C	43°C	43°C	43°C

Le témoin n°1 tient compte de l'urée libre contenue dans le matériel végétal. Il est toujours nul ; le matériel végétal ne contient donc pas d'urée libre. Le témoin n°2 est également nul indiquant la stabilité de l'arginine dans les conditions expérimentales retenues.

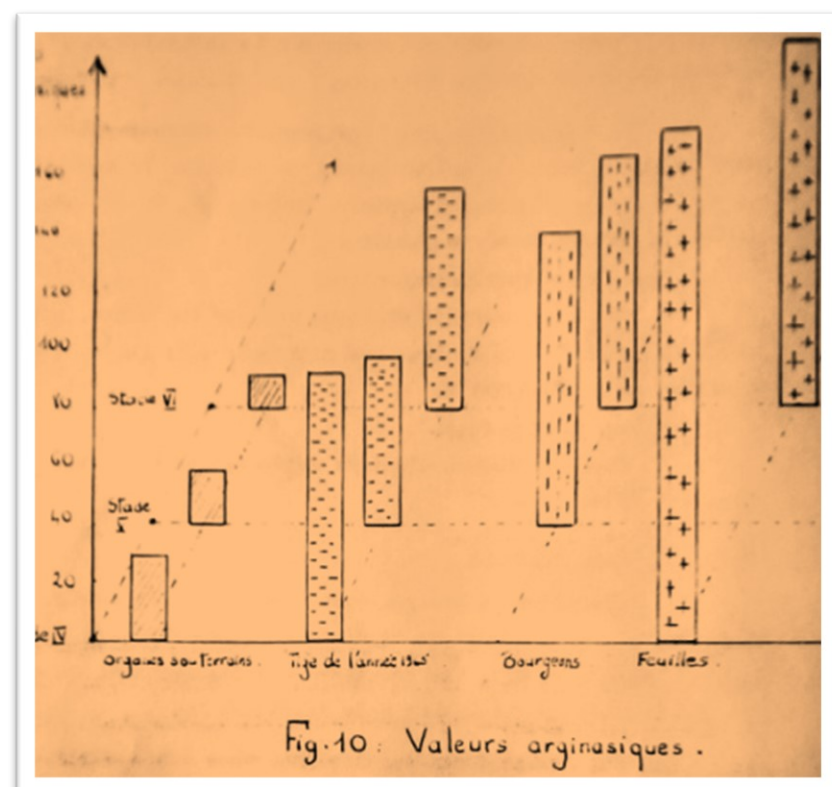
3. - Expression des résultats. La détermination de la masse du précipité de dixanthyl-urée obtenu permet de calculer la quantité d'urée formée, et par suite la quantité d'arginine hydrolysée. Il est nécessaire de définir une unité et une valeur arginasique.

- Unité d'activité arginasique. C'est la quantité d'enzyme qui, en une heure, à la température de 43°C, et au pH 9,5, hydrolyse une micromole d'arginine, la concentration du substrat étant de 0,285 M.
- Valeur arginasique. C'est le nombre d'unités arginasiques contenues dans un gramme de matériel végétal sec.

B. - Résultats obtenus.

L'arginase a été recherchée dans les différents organes de la plante à la fin du cycle annuel de végétation (stade IV) et à la reprise de la vie active (stades V, VI). Les résultats des dosages sont réunis dans le tableau 3, et représentés graphiquement dans la figure 10*

TABLEAU 3 Valeurs arginasiques			
Organes	Valeurs arginasiques		
	Stade IV	Stade V	Stade VI
Feuilles	171	-	123
Bourgeons et feuilles	-	138	115
Bourgeons	-	100	85
Tige développée en 1965	92	58	76
Tiges antérieures à 1965	29	18	7
Axe principal de la tige	30	16	10
Racine pivotante	25	22	12,5
Racines secondaires	32	18	14



**En ordonnées les valeurs arginasiques (de 0 à 100). En 3 è*

dimension les stades du développement

L'arginase est décelée dans tous les organes de *Limonium vulgare*. L'activité enzymatique est variable d'un organe à l'autre ; elle est la plus élevée dans les organes aériens, par contre elle est faible dans les organes souterrains.

A la fin du cycle annuel de végétation, l'activité arginasique se révèle importante dans la tige développée en 1965. Elle est relativement plus faible dans les organes de réserve. Il faut souligner, à ce stade, la valeur arginasique particulièrement élevée des jeunes feuilles qui se sont développées tardivement à la suite de conditions climatiques favorables

A la reprise de la vie active, les valeurs arginasiques diminuent de façon nette dans les organes pérennants de la plante et cette variation se poursuit dans le même sens après le débourrement des bourgeons. Au contraire, l'activité métabolique des bourgeons axillaires se traduit par des valeurs beaucoup plus élevées.

Parmi ces bourgeons, ceux qui présentent des feuilles déjà chlorophylliennes, révèlent une valeur arginasique nettement plus élevée. Cette valeur reste sensiblement du même ordre de grandeur dans les jeunes feuilles au cours de leur croissance (stade VI).

En résumé, les organes de réserve présentent toujours de faibles valeurs arginasiques. L'activité enzymatique y est cependant plus importante pendant la période de vie ralentie et diminue dès que les parties aériennes se développent. Celles-ci montrent les plus grandes valeurs enzymatiques ; il faut souligner que ce sont les organes en croissance active, les

bourgeons et les jeunes feuilles, qui présentent les valeurs maximum. De même, les racines secondaires qui sont le lieu de la rhizogénèse la plus intense possèdent aussi l'activité la plus élevée pour les organes souterrains.

II. - UREASE.

A. - Méthode.

1. **Principe.** L'action catalytique de l'uréase se traduit par la réaction globale :



Au pH 7 retenu pour l'étude de la réaction enzymatique, le carbonate d'ammonium produit est ionisé :



L'activité de l'uréase peut donc se déterminer en dosant la quantité d'ammoniac formé par action du matériel végétal sur une solution d'urée de concentration connue. En effet, l'ion ammonium peut être repris dans les réactions d'équilibre suivantes:



Dans ces conditions il suffit d'ajouter un excès d'ions OH^- au milieu pour déplacer l'équilibre vers la formation de l'ammoniac.

2. - Protocole expérimental.

J'ai suivi la méthode de YOVANOVITCH. Le carbonate de lithium est employé pour alcaliniser le milieu. L'ammoniac libéré est entraîné par la vapeur d'eau et recueilli dans une solution d'acide sulfurique de titre connu que l'on dose en retour par une solution de soude.

Pour chaque organe, on prépare directement dans des fioles de YOVANOVITCH les essais suivants :

	Essai N° 1	Essai N° 2	Témoin N° 1	Témoin N° 2
Solution d'urée 0,25 M dans Tampon Clark et Lubs de pH 7	5 ml	5 ml	-	5 ml
Matériel végétal	50 mg	50 mg	50 mg	-
Tampon de Clark et Lubs de pH 7	-	-	5 ml	-
Toluène	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes
Temps de réaction	2 h	2 h	2 h	2 h
Température	38°C	38°C	38°C	38°C

Le témoin N° 1 permet de tenir compte de l'ammoniac libre contenu dans le matériel végétal, il n'est jamais nul; par contre, le témoin N° 2 est toujours nul et démontre la stabilité du substrat dans les conditions expérimentales.

3. Expression des résultats. Comme pour l'arginase, on définit une unité d'activité et une valeur uréasique.

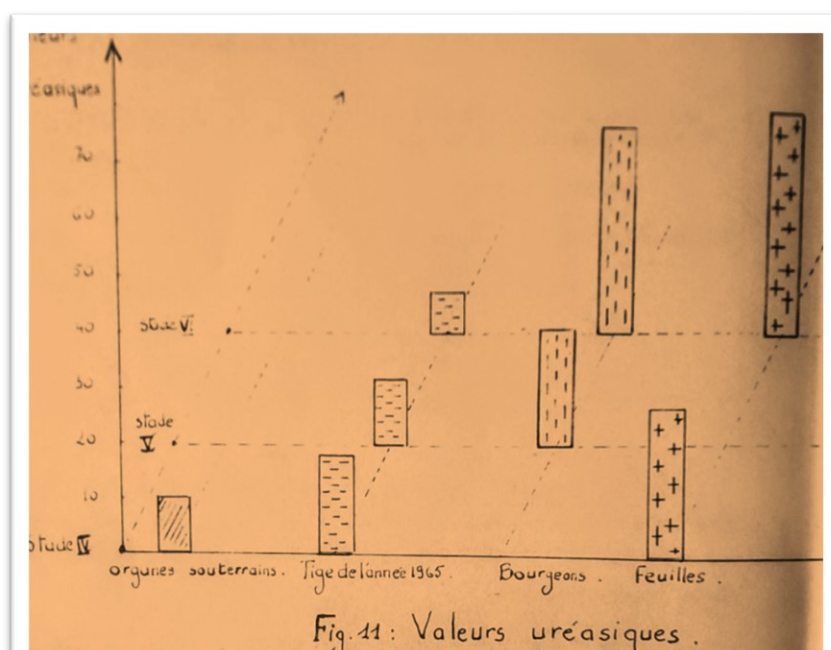
-Unité d'activité uréasique : c'est la quantité d'enzyme qui, en une heure, à la température de 38°C et au pH 7, transforme une micromole d'urée, à partir d'une solution d'urée 0,25M.

-Valeur uréasique : elle correspond au nombre d'unités uréasiques contenues dans un gramme de matériel végétal sec.

B .Résultats expérimentaux

Les valeurs uréasiques des différents organes ont été déterminées pour les stades IV, V et VI. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 4 et schématisées dans la figure 11.

Organes	Valeurs uréasiques		
	Stade IV	Stade V	Stade VI
Feuilles	27	-	39
Bourgeons et feuilles	-	29	44,4
Bourgeons	-	21	36,3
Tige développée en 1965	18	12	7,8
Tiges antérieures à 1965	non dosé	0	0
Axe principal de la tige	non dosé	0	0
Racine pivotante	non dosé	0	0
Racines secondaires	11	0	0



Dans

les

conditions expérimentales retenues, l'uréase n'est pas mise en évidence dans tous les organes de *Limonium vulgare*. Dans les organes aériens, son activité est toujours élevée. Quand on peut la détecter au niveau de la partie souterraine, elle se révèle peu active.

Au stade IV, correspondant au début de la période de vie ralentie, je n'ai recherché l'uréase que pour un seul organe souterrain. J'ai choisi les racines secondaires qui avaient manifesté l'activité arginasique la plus forte parmi les organes tubérisés de la plante. En fait, ces racines secondaires s'avèrent également pauvres en uréase. Par contre, la partie la plus jeune de la tige présente une valeur uréasique plus élevée, et ceci est sans doute en rapport avec le développement tardif de jeunes feuilles dans la rosette de l'année 1965. A ce stade, ces jeunes feuilles chlorophylliennes possèdent l'uréase la plus active.

Au début du cycle végétatif de 1966, la seule activité de l'uréase dans les organes pérennants se situe dans la tige développée en 1965. La valeur uréasique est cependant réduite par rapport au stade précédent. Les bourgeons latéraux montrent d'emblée une grande activité et celle-ci est encore plus accrue quand les ébauches foliaires apparaissent.

Au stade VI, dans les bourgeons et les feuilles en pleine croissance, l'uréase présente une activité très accrue par rapport au stade antérieur. Dans les feuilles qui ont déployé leurs limbes chlorophylliens, mais qui n'ont pas encore atteint leur développement maximum, l'uréase est active.

Du stade V au stade suivant, les valeurs uréasiques demeurent nulles pour les organes pérennants antérieurs à 1965 et diminuent pour la tige développée en 1965.

Au stade IV, correspondant au début de la période de vie ralentie, je n'ai recherché l'uréase que pour un seul organe souterrain. J'ai choisi les racines secondaires qui avaient manifesté l'activité arginasique la plus forte parmi les organes tubérisés de la plante. En fait, ces racines secondaires s'avèrent également pauvres en uréase. Par contre, la partie la plus jeune de la tige présente une valeur uréasique plus élevée, et ceci est sans doute en rapport avec le développement tardif de jeunes feuilles dans la rosette de l'année 1965. A ce stade, ces jeunes feuilles chlorophylliennes possèdent l'uréase la plus active.

Pour *Limonium vulgare* Mill., l'étude parallèle des activités de l'arginase et de l'uréase montre que l'uréase est présente dans tous les organes où l'arginase est active; ce qui suggère que l'uréase est directement impliquée dans la dégradation du groupement guanidyle de l'arginine.

Ces données rejoignent les résultats rapportés par SUZUKI (1952) pour des

germinations de Soja. On peut alors se demander si l'urée produite lors de l'hydrolyse enzymatique de l'arginine peut jouer un rôle inducteur vis-à-vis de l'uréase.

Les résultats des réactions enzymatiques réalisées *in vitro* montrent que l'uréase n'est plus décelable dans les organes de la plante dès que les

valeurs arginasiques deviennent inférieures à dix-huit. Ils font également apparaître que l'uréase n'a pas un pouvoir catalytique suffisant pour dégrader toute l'urée mise en liberté.

Cependant, il importe de remarquer que les deux réactions enzymatiques s'étudient expérimentalement à des pH très différents. De plus, ces pH ne sont sans doute pas ceux de la cellule vivante où les processus peuvent donc présenter d'autres aspects. Il faut également noter que la méthode de YOVANOVITCH ne permet pas de mettre en évidence de faibles quantités d'uréase.

In vivo, les faits peuvent être différents; en particulier MORAWSKA et collaborateurs (1963), après l'étude de l'arginase dans les graines, les germinations et les jeunes plantes appartenant à douze familles différentes, ont suggéré que l'activité arginasique, *in situ*, était déterminée par la concentration de l'arginine. Ainsi les quantités d'urée qu'on devrait attendre par suite de l'activité arginasique déterminée *in vitro*, n'apparaissent peut-être jamais dans la plante. Tout récemment, BENDECKIJ (1965) a montré que l'ornithine formée au cours de l'hydrolyse de l'arginine pouvait provoquer l'inactivation de l'arginase végétale, ce qui serait en faveur d'une libération plus faible d'urée dans le matériel vivant.

De plus, il n'est pas exclu que l'urée produite puisse être métabolisée par une voie qui n'implique pas l'intervention de l'uréase : en aucun cas, il n'y a accumulation de carbamide dans la plante. Quelle que soit la relation entre l'arginase et l'uréase, il faut rappeler les idées émises par WILLIAMS des 1950, 1954. Pour cet auteur, l'uréase n'aurait qu'un rôle secondaire dans l'utilisation de l'urée ; elle serait plutôt impliquée directement dans le contrôle de la croissance.

CONCLUSIONS

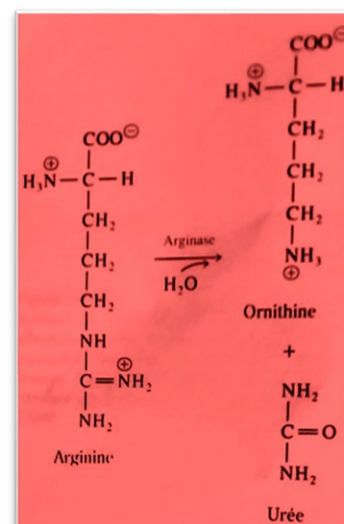
Pour différents auteurs, *Limonium vulgare* Mill., au moyen de glandes excrétrices foliaires, est capable d'éliminer l'excès de sel(s) qu'elle absorbe dans les sols salés où elle se développe.

Cependant, les fortes teneurs en chlorure de sodium auxquelles elle est soumise semblent marquer profondément son métabolisme aminé et amidé. Celui-ci se caractérise par une accumulation massive de proline dans tous les organes et un stockage important d'amides et d'arginine dans les organes de réserve.

Des cultures de *Suaeda macrocarpa* Moq. réalisées au laboratoire en présence de quantités croissantes de chlorure de sodium permettent d'attribuer l'abondance de proline à la présence de ce sel. Par ailleurs, STROGONOV et coll. (1956 , 1962) ont étudié l'action des sels et en particulier du chlorure de sodium sur des plantes non halophiles comme le Pois, la Fève, le Coton ; ils obtiennent des résultats comparables , mais ils observent un dépérissement de leurs plantes et concluent à un effet toxique.

Cependant, pour les halophytes qui présentent une grande tolérance au chlorure de sodium, cette toxicité n'apparaît pas dans les conditions de vie habituelles. Pour *Limonium vulgare*, l'abondance d'arginine des organes souterrains tubérisés ne semble pas un fait singulier. DURANTON (1958) a mis également en évidence des quantités importantes d'arginine dans les tubercules de Topinambour.

Cet acide aminé peut constituer une forme de réserve azotée, et l'une des voies connues pour sa réutilisation implique les interventions successives de l'arginase puis de l'uréase. Cette voie existe dans la plante; son activité, très basse dans les organes de réserve, est plus élevée dans les organes jeunes en croissance. Comme ces derniers sont pauvres en arginine, celle-ci doit alors migrer vers les organes à métabolisme actif où sa transformation serait rapide. Il reste à montrer la réalité de ce transport



par l'étude des variations de la teneur en arginine au cours du cycle végétatif ou par l'emploi de molécules marquées.

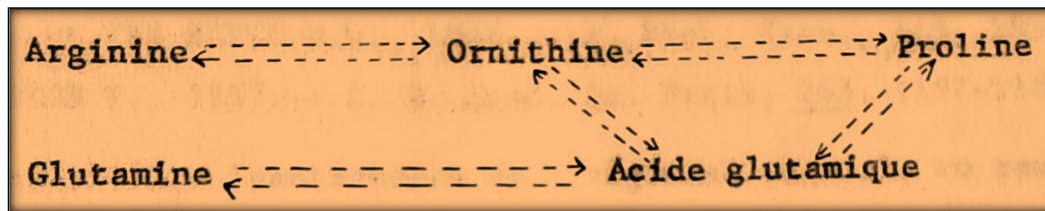
De toute façon, les produits de l'hydrolyse enzymatique de l'arginine, l'urée et l'ornithine ne s'accumulent pas (figure 12)

L'urée clivée par action de l'uréase libère du gaz carbonique et l'ion NH_4^+ . L'activité relativement faible de l'uréase laisse penser que cette dégradation enzymatique n'est peut être pas essentielle pour la plante, et il conviendra de rechercher d'autres voies d'utilisation de la carbamide.

L'ornithine est toujours faiblement représentée, elle est sans doute rapidement métabolisée. On sait qu'elle peut constituer l'un des composés intermédiaire du cycle de KREBS et HENSELEIT qui conduit à la biosynthèse de la citrulline et de l'arginine., On connaît également sa transformation enzymatique en proline et cette voie semble intéressante à rechercher, car chez *Limonium vulgare* les organes les plus riches en proline, sont aussi ceux qui présentent les valeurs arginasiques les plus fortes. L'ornithine peut aussi, sous l'action d'une décarboxylase, donner la putrescine. Cette diamine qui a déjà été mise en évidence par STROGOV (1962) dans les feuilles de Fève, parmi d'autres composés du même type, pourrait jouer un rôle dans l'intoxication des plantes cultivées en présence d'excès de chlorure de sodium.

Je me propose de rechercher cette enzyme chez *Limonium vulgare*. L'ornithine peut aussi apparaître par transamidation de l'arginine avec la glycine, elle peut encore provenir de l'acide glutamique par l'intervention de l'acétyl-coenzyme A et par amination. L'arginine, la glycine, l'acide glutamique sont présents dans la plante, il sera nécessaire de rechercher les enzymes impliquées dans leur métabolisme.

II



resterait aussi à interpréter l'importance des amides dans les organes de mise en réserve. Parmi ces composés, la glutamine semble dominante, les possibilités de sa réutilisation par la plante sont à déterminer. On peut alors se demander si l'arginine, l'ornithine, la proline, l'acide glutamique et la glutamine ne pourraient pas être reliés selon le schéma ci-dessus mis en évidence chez les animaux par STETTEN et SCHOENHEIMER (1944), chez les micro-organismes (*Neurospora*) par YEM et VOGEL (1955). Enfin, il a été retrouvé chez les végétaux par DURANTON (1960).

De toute façon, il ne saurait être exhaustif, en particulier en ce qui concerne l'arginine. Il faut en effet noter que ce composé, par des réactions de transamidation, peut être le précurseur des composés guanidylés. Il peut également constituer un donneur de groupement $-NH_2$ dans les réactions de transamination et, de ce fait, participer à la formation des autres acides aminés. Enfin, constituant fondamental des protéines, il est aussi impliqué directement dans la protéogenèse.

L'étude de ces nombreuses possibilités nous permettra peut être de déterminer celles qui sont caractéristiques des halophytes, contribuant à leur adaptation aux salinités élevées.

BIBLIOGRAPHIE

ARCHIBALD R.M. et VAN SLYKE D.D, 1946. - J. Biol. Chem., 165, 293. cité par GUITTON Y. 1957. - C. R. Acad. Sc. Paris, 245, 1157-1160.

BENDECKIJ K. M., 1965. - Inactivation de l'arginase végétale au cours du processus d'hydrolyse enzymatique de l'arginine. Biokhimija, S.S.S.R., 30, n° 4, 835-837.

CORILLION R., 1955. - Les espèces armoricaines du genre *Limonium* Mill. Extrait du Bull. de Mayenne Sciences.

DURANTON H., 1958. - La production d'arginine dans le tubercule du Topinambour pendant le cycle végétatif. C. R. Acad. Sc. Paris, 246, 2655-2657.

DURANTON H. 1960. - Sort des atomes de la molécule d'arginine au cours de sa dégradation par les tissus du Topinambour. Ann. Phys. vég. Fr. 1960 paru en 1961 2, n°4, 295-328

FOSSE R., 1916. - Ann. Inst. Pasteur , 30, 1-118. cité par BRUNEL A., 1949. Traité pratique de chimie végétale, III, 517, Ed. Georges Frère, Tourcoing (Nord).

GUITTON Y., 1957. - Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Présence de l'arginase dans les graines. C. R. Acad. Sc. Paris, 245, 1157-1160.

GUITTON Y., 1959. - Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Variation de l'activité arginasique et de la teneur en certains amino-acides au cours de la germination des graines de *Pinus pinaster* Sol. C. R. Acad. Sc. Paris, 248, 590-592.

GUITTON Y., 1964. -Métabolisme de l'azote chez *Pinus pinea*. Thèse Doct.Sc. Nat., Toulouse .

KLEIN G. et TAUBÖCK K., 1932. - Biochem Z., 251, 10 - Biochem Z., 255) 270; cité par GUITTON Y.; 1957. - C. R. Acad. Sc. Paris, 245, 1157-1160.

MOORE S., SPACKMAN D.A. et STEIN W.H., 1958. - Chromatography of amino acids on sulfonated polystyren resins. Ann. Chem., 30, 1185-1190.

MORAWSKA G.K., KLECZKOWSKI et REIFFER I., 1963. - The occurrence and activity of arginase in higher plants. Acta. Soc. Bot. Polon., 31,(1), 191-198.

PRZYBYLSKA J. et HURICH J., 1960. - Free amino acids in seeds of some leguminous plants. Bull.Acad.polon.Sc .ser.Sc.biol., 8, 50.

oooooooo

Epilogue

Au moment des faits le stagiaire, auteur de ce rapport, était Assistant à la Faculté des Sciences de Rennes (sise Place Pasteur) . Après avoir soutenu son mémoire, il fut déclaré admis au DEA . Il prépara ensuite le doctorat de 3è cycle avant de s'engager sur le chemin du Doctorat d'Etat. Il resta étudiant toute sa vie. Il apprit,entre autres, que dans le petit champ d'études scientifiques qui fut le sien, comme en d'autres lieux, rien n'est possible si on s'affranchit du passé en oubliant ceux qui ont contribué à faire émerger les principes fondateurs. Le parcours dont on rappelle ici les prémices fut à l'origine d'une aventure scientifique et humaine trouvant des prolongements en ce premier quart du 21è siècle.

Que soient remerciés toutes celles et ceux, notamment M.Goas, G.Goas, P.Lemesle et P.Hervochon qui, par leur travail,leur dévouement et leur amitié contribuèrent à l'initiation de ce qui devint un accomplissement pour un « fils de la terre ». Je rends hommage également à ma jeune épouse tant éprise de vérité et de justice ; sa patience y fut déjà soumise à rude épreuve . Ce n'était qu'un début !...



La mise en page de ce rapport de stage se retrouve au « goût du jour » grâce à Laurence C.-L, née à Rennes un certain 27 mai 1966 où se tenaient les épreuves écrites du diplôme universitaire mentionné...D'autres épreuves suivirent !...

Le document original a été « océrisé » par Philippe C.

Que tous trouvent ici l'expression de mon affectueuse gratitude.

F.R.Larher, 13 juillet 2024

