

Laboratoire de Biochimie de l'Institut de Botanique
Université de Neuchâtel

**PURIFICATION, CARACTERISATION
ET BIOSYNTHESE DE LA FRUCTOSE
1,6-BISPHOSPHATASE CHLOROPLASTIQUE
CHEZ EUGLENA GRACILIS, SOUCHE Z**

Thèse

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES

par

DANILO AFFOLTER

Licencié ès Sciences, orientation biologie expérimentale,
de l'Université de Neuchâtel

1982

Zentralstelle der Studentenschaft Zürich

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Purification, caractérisation et biosynthèse
de la fructose 1,6-bisphosphatase chloro-
plastique chez *Euglena gracilis*, souche Z

de Monsieur Danilo Affolter

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

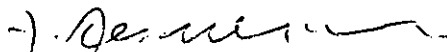
Messieurs E. Stutz, P. Schürmann et

P. Gedal (Paris-Sud)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 14 septembre 1982

Le doyen:



A. Aeschlimann

A mes Parents et à ma Soeur

A Monsieur le Curé Isenbart

"L'esprit scientifique, c'est aussi l'esprit d'accueil. On est accueillant devant le résultat des expériences : elles contiennent une part de vérité que nous ignorons encore et que nous allons peut-être découvrir si nous prêtons attention. Nous ne savons pas ce que nous allons trouver, mais nous en sommes heureux à l'avance. Si nous extrapolons cette attitude au reste de notre existence, nous garderons une bienveillance attentive devant tout ce qui nous entoure, les choses et les êtres, les hommes que nous rencontrerons et les événements que nous vivrons. C'est une attitude très positive qui rend heureux celui qui la possède et qui rend heureux ceux qu'il approche. C'est un élément d'intérêt pour le monde, pour son évolution, pour les frères hommes éloignés de nous, c'est une source de rayonnement.

Alors, notre existence se poursuivra dans une ambiance de constant progrès, de renouvellement, d'accueil au monde ..."

Louis LEPRINCE-RINGUET

REMERCIEMENTS

- Cette thèse de doctorat a été effectuée sous la direction de M. le Professeur E. Stutz et de M. le Docteur P. Schürmann, Privat Docent. Qu'il me soit permis de leur adresser mes plus chaleureux remerciements pour tous leurs conseils prodigués pendant la durée de ce travail.

- Mes remerciements s'adressent également à M. le Professeur P. Gadai qui a accepté de faire partie du jury de thèse.

- Je remercie également M. le Docteur P. Cuendet de ses conseils, M. le Docteur W. Ortiz de la préparation de chloroplastes d'Euglène, MM. M. Kazmaier d'avoir réalisé certaines expériences et A. Spielmann de m'avoir initié à la technique photographique, ainsi que Mlle M.-C. Bailly de la dactylographie du manuscrit.

ABREVIATIONS

Bis-acrylamide	: N, N'-méthylène-bis-acrylamide
chl	: chlorophylle
DTT	: dithiothreitol
FBP	: fructose 1,6-bisphosphate
FBPase	: fructose 1,6-bisphosphatase
F6P	: fructose 6-phosphate
MDH	: malate déshydrogénase
MET	: 2-mercaptoéthanol
PM	: poids moléculaire
RuBP	: ribulose 1,5-bisphosphate
SDS	: dodécylsulfate de sodium
TEMED	: N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
INTRODUCTION GENERALE	2
Chapitre 1. PURIFICATION ET PROPRIETES DE LA FBPase CHLOROPLASTIQUE D' <u>EUGLENA GRACILIS</u>	6
1.1. Introduction	6
1.2. Matériel et méthodes	7
1.2.1. Culture et stockage des cellules d' <u>Euglena gracilis</u>	7
1.2.2. Méthodes d'analyse enzymatique	7
1.2.2.1. Méthode colorimétrique	7
1.2.2.2. Méthode spectrophotométrique	8
1.2.3. Dosage des protéines	9
1.2.4. Electrophorèse sur gel natif	10
1.2.5. Méthodes de détermination du poids moléculaire de la FBPase	12
1.2.5.1. Estimation du PM par filtration sur gel	12
1.2.5.2. Estimation du PM par électrophorèse sur gel, gradient d'acrylamide	13
1.2.5.3. Estimation du PM de la sous-unité par électrophorèse sur gel dénaturant	14
1.2.6. Méthode de détermination du point isoélectrique de l'enzyme	15
1.3. Résultats et discussion	16
1.3.1. Purification de la FBPase chloroplastique d' <u>Euglena gracilis</u>	16
1.3.1.1. Extrait brut	16
1.3.1.2. Précipitation à l'acide	17
1.3.1.3. Précipitation au sulfate d'ammonium	18
1.3.1.4. Chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose	18

1.3.1.5. Chromatographie sur hydroxyapatite	20
1.3.1.6. Chromatofocusing	20
1.3.1.7. Filtration sur gel de Sephacryl	23
1.3.1.8. Relation activité spécifique - degré de pureté	23
1.3.2. Conditions optimales de test enzymatique pour la FBPase	26
1.3.3. Activité de la FBPase en fonction du temps	30
1.3.4. Activité de la FBPase en fonction de la température	32
1.3.5. Poids moléculaires de l'enzyme et de sa sous-unité	34
1.3.6. Point isoélectrique de la FBPase	37
1.3.7. Comparaison de quelques propriétés de la FBPase d' <u>Euglena gracilis</u> avec celles de la FBPase d'Épinard	37
1.4. Conclusion	40
Chapitre 2. ACTIVATION DE LA FBPase PAR LA LUMIERE <u>IN</u> <u>VIVO</u>	
2.1. Introduction	41
2.2. Matériel et méthodes	44
2.2.1. Culture et récolte des cellules	44
2.2.2. Obtention de chloroplastes intacts d'Euglène	44
2.2.2.1. Détermination de la concentration de chlorophylle	46
2.2.3. Dispositif expérimental et détermination de l'activité enzymatique	46
2.3. Résultats et discussion	48
2.3.1. Activation de la FBPase par la lumière dans des chloroplastes intacts	48
2.4. Conclusion	54
Chapitre 3. REGULATION DE LA FBPase <u>IN VITRO</u> ET PURIFICATION PARTIELLE DE THIOREDOXINES	
3.1. Introduction	55

3.2. Matériel et méthodes	59
3.2.1. Méthodes d'analyse enzymatique	59
3.2.1.1. Détermination de l'activité de la FBPase d' <u>Euglena gracilis</u>	59
3.2.1.2. Détermination de l'activité de la FBPase de l'Epinard	59
3.2.1.3. Détermination de l'activité de la MDH à NADP d'Epinard	59
3.2.2. Dosage des protéines	60
3.2.3. Electrophorèse sur gel dénaturant	60
3.3. Résultats et discussion	60
3.3.1. Régulation de la FBPase <u>in vitro</u>	60
3.3.2. Purification partielle de thiorédoxines	65
3.3.2.1. Premières étapes de purification	65
3.3.2.2. Filtration sur gel de Sephadex	65
3.3.2.3. Chromatographie sur diéthylamino- éthyl-cellulose	65
3.3.2.4. Chromatographie sur hydroxyapatite	68
3.3.2.5. Chromatographie sur carboxyméthyl- cellulose	70
3.3.2.6. Relation activité spécifique - degré de pureté	70
3.3.3. Activation de la FBPase par les thiorédoxines f et m de l'Epinard ; rôle de thiorédoxines <u>extra-muros</u>	76
3.4. Conclusion	76
Chapitre 4. BIOSYNTHESE DE LA FBPase	78
4.1. Introduction	78
4.2. Matériel et méthodes	79
4.2.1. Cultures, récoltes et extraits d' <u>Euglena</u> <u>gracilis</u> , souche Z(ICC)	79
4.2.1.1. Détermination de la concentration de chlorophylle	80
4.2.2. Culture, récolte et extrait d' <u>Euglena gracilis</u> , souche W ₃ BUL	81

4.2.3. Détermination de l'activité enzymatique	82
4.3. Résultats et discussion	82
4.3.1. Effet des antibiotiques sur la biosynthèse de la chlorophylle et la division cellulaire	82
4.3.2. Site de biosynthèse de la FBPase chloroplas- tique	84
4.4. Conclusion	91
CONCLUSION FINALE	93
BIBLIOGRAPHIE	95

RESUME

La fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique (EC 3.1.3.11) d'Euglena gracilis est purifiée jusqu'à l'homogénéité par précipitations à l'acide et au sulfate d'ammonium (30-50 %), chromatographies sur DEAE-cellulose et hydroxyapatite, chromatofocusing et filtration sur gel de Sephacryl. La FBPase est relativement thermostable, puisqu'elle est encore active à 50°C. Le poids moléculaire de l'enzyme, estimé par filtration sur gel de Sephacryl, se situe entre 190 et 210'000. Une bande unique, avec un PM d'environ 50'000, est détectée après électrophorèse sur gel dénaturant. Il en résulte que la FBPase chloroplastique d'Euglène est constituée de 4 sous-unités. Son point isoélectrique est de 4.9-5.0.

La courbe sigmoïde de l'activité de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis, dépendant du temps, suggère qu'il s'agit d'une enzyme de régulation. En effet, in vivo elle est activée par la lumière, qui peut être remplacée par le dithiothreitol. D'autre part, la FBPase purifiée est activée in vitro par le DTT et un extrait protéinique, partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium (50-90 %), filtration sur gel de Sephadex, chromatographies sur hydroxyapatite, DEAE- et CM- cellulose ; il renferme 3 protéines de PM 10'500, 11'000 et 16'000, détectées par électrophorèse sur gel dénaturant. On peut donc en déduire que l'activité de la FBPase est également régulée dans les chloroplastes d'Euglène par le système ferrédoxine-thiorédoxine.

Chez Euglena gracilis, la FBPase chloroplastique est synthétisée, comme d'ailleurs pratiquement toutes les autres enzymes du cycle de Calvin, au niveau des ribosomes cytoplasmiques puis est importée dans les chloroplastes.

INTRODUCTION GENERALE

"La Nature s'est donnée la tâche de capter au vol la lumière déversée sur le monde, et d'emmagasiner la plus mouvante de toutes les forces, après l'avoir immobilisée. Pour y parvenir, elle a recouvert l'écorce terrestre d'organismes qui, à l'état vivant, absorbent la lumière solaire et produisent continuellement, en utilisant cette force, une somme de différence chimique. Ces organismes sont les plantes ... Dans les plantes, il ne se produit qu'une transformation, non une création de matière."

Julius Robert MAYER

Die organische Bewegung in ihrem
Zusammenhange mit dem Stoffwechsel
Heilbronn (1845)

Les Végétaux sont le siège d'une fonction biologique fondamentale : la photosynthèse. Dans les Algues et les Végétaux supérieurs, elle est localisée dans des organites particuliers, les chloroplastes. Lorsque ceux-ci sont éclairés par de la lumière de longueur d'onde convenable, ils réduisent le gaz carbonique en glucides (réactions enzymatiques de la photosynthèse) et cette réduction s'accompagne d'un dégagement d'oxygène, provenant de la photolyse de l'eau (réactions photochimiques de la photosynthèse). Le dégagement d'oxygène est un phénomène très rapide (de l'ordre du millième de seconde), qui suit immédiatement l'éclairement et qui a lieu dans les thylakoïdes, tandis que la réduction du gaz carbonique est plus lente et se déroule dans le stroma. Les réactions photochimiques de la photosynthèse (Fig.1) sont fort complexes. Deux photo-systèmes captent les photons de la lumière solaire, qui excitent

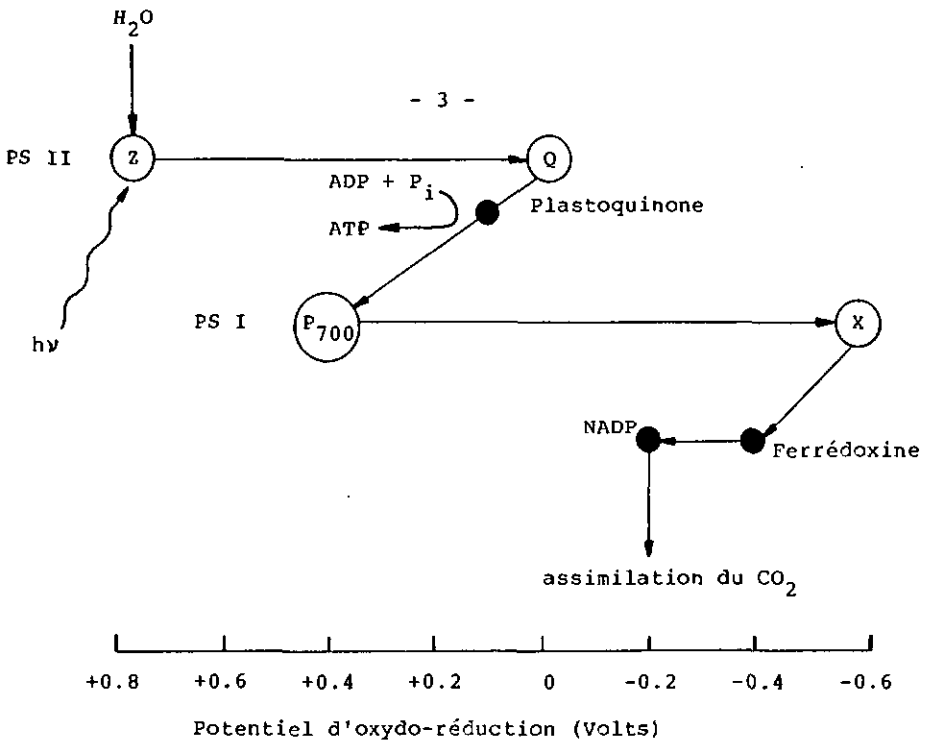


Fig.1. Réactions photochimiques de la photosynthèse : système transporteur d'électrons. Z, donneur primaire d'électrons du photosystème II (PS II) ; Q, accepteur d'électrons du PS II ; P₇₀₀, donneur d'électrons du photosystème I (PS I) ; X, accepteur d'électrons du PS I

Tiré de Maugh (1981)

les chlorophylles. Il en résulte une émission d'électrons qui sont pris en charge par un système transporteur d'électrons. Le bilan énergétique consiste en la formation d'ATP (photophosphorylation) et réduction du NADP, qui sont utilisés dans la seconde phase. Les réactions enzymatiques de la photosynthèse sont nombreuses. Elles constituent le cycle de Calvin-Benson-Bassham ou cycle réductif des pentoses phosphates (Fig.2).

Chez les Végétaux supérieurs, plusieurs réactions du cycle de Calvin sont activées par la lumière (réactions clef du cycle). Elles sont catalysées par les enzymes suivantes : la

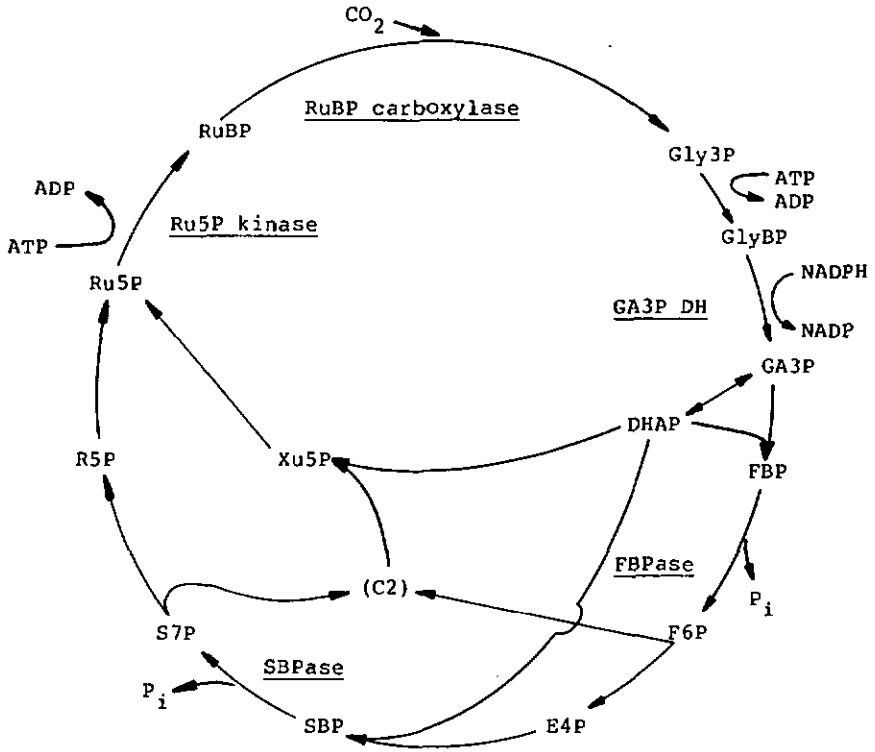


Fig.2. Réactions enzymatiques de la photosynthèse : cycle de Calvin-Benson-Bassham ou cycle réductif des pentoses phosphates (P). DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; E4P, érythrose 4-P ; FBP, fructose 1,6-bisphosphate ; FBPase, fructose 1,6-bisphosphatase ; F6P, fructose 6-P ; GA3P, glycéraldéhyde 3-P ; GA3P DH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; GlyBP, glycérate 1,3-bisphosphate ; Gly3P, glycérate 3-P ; RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate ; Ru5P, ribulose 5-P ; R5P, ribose 5-P ; SBP, sédoheptulose 1,7-bisphosphate ; SBPase, sédoheptulose 1,7-bisphosphatase ; S7P, sédoheptulose 7-P ; Xu5P, xylulose 5-P
Tiré de Marie-Louise Champigny (1976)

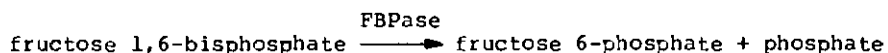
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, la fructose 1,6-bisphosphatase, la sédoheptulose 1,7-bisphosphatase et la ribulose 5-phosphate kinase. Parmi celles-ci, la FBPase de même que son mécanisme de régulation sont étudiés chez l'Epinard (Buchanan et al., 1971; Schürmann et al., 1976; Wolosiuk et Buchanan, 1977). Dans les chloroplastes, cette enzyme est activée par un mécanisme qui comprend des protéines régulatrices (ferrédoxine, ferrédoxine-thiorédoxine réductase et thiorédoxine) et qui dépend du flux d'électrons (cf. chap. 2). A un pH davantage alcalin et à une concentration plus élevée de magnésium, la FBPase démontre une activité, qui est indépendante du mécanisme de régulation chloroplastique. Il est dès lors intéressant d'examiner la question chez Euglena gracilis, algue unicellaire flagellée, faisant partie de l'embranchement des Euglénophytes, pour savoir si ce mécanisme de régulation enzymatique existe déjà chez les Végétaux inférieurs.

Nous allons donc passer en revue la purification et les propriétés de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis (chapitre 1), la mise en évidence de l'activation de la FBPase par la lumière in vivo (chapitre 2), la régulation de la FBPase in vitro et la purification partielle de thiorédoxines (chapitre 3) ainsi que la biosynthèse de l'enzyme (chapitre 4).

Chapitre 1. PURIFICATION ET PROPRIETES DE LA FBPase CHLORO- PLASTIQUE D'EUGLENA GRACILIS

1.1. INTRODUCTION

La fructose 1,6-bisphosphatase (D-fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase, EC 3.1.3.11) catalyse l'hydrolyse du fructose 1,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate et phosphate inorganique :



Chez les Végétaux, il existe deux sortes de fructose 1,6-bisphosphatase : une FBPase qui intervient dans le cytoplasme (FBPase cytoplasmique) lors de la néoglucogenèse (processus inverse de la glycolyse) et une FBPase qui agit dans les chloroplastes (FBPase chloroplastique) dans le cadre du cycle réductif des pentoses phosphates (cf. Introduction). La FBPase cytoplasmique d'Epinard a été purifiée (Zimmermann et al., 1978) et la FBPase chloroplastique correspondante a été fort bien étudiée : Racker et Schroeder (1958) proposèrent les premiers un procédé de purification de cette enzyme. Plusieurs années plus tard, deux nouveaux processus de purification sortirent conjointement : celui présenté par Preiss et Greenberg (1971) et celui de Buchanan, Schürmann et Kalberer (1971), dont une mise au point a été publiée dernièrement (Schürmann et Wolosiuk, 1978). Chez Euglena gracilis, une activité FBPasique dans le cytoplasme a été rapportée (Smillie, 1963) et une première méthode de purification de la FBPase chloroplastique a été présentée par App et Jagendorf (1964). Ce chapitre décrit un nouveau procédé de purification de la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis, en tenant compte des techniques actuelles.

1.2. MATERIEL ET METHODES

1.2.1. Culture et stockage des cellules d'Euglena gracilis

Les cellules d'Euglena gracilis utilisées sont de souche Z (ICC), elles proviennent donc de la collection de cultures d'algues de l'Université de l'Indiana, aux Etats-Unis (Indiana Culture Collection). Au laboratoire, elles sont conservées sur milieu solide d'agar.

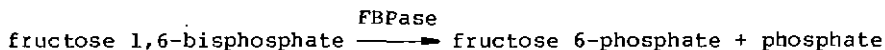
Le type de culture, choisi pour l'obtention de ces cellules en vue d'isoler la FBPase chloroplastique, est mixotrophe (le rendement des cellules étant 6 fois supérieur par rapport au type de culture autotrophe) : les Euglènes vont se développer à la lumière (environ 5'000 lux) à environ 25°C dans 6 bouteilles de 10 litres (20 x 45 cm), contenant chacune 8 litres de milieu hétérotrophe (Greenblatt et Schiff, 1959). L'air pénétrant dans les bouteilles de culture est filtré et les milieux nutritifs sont agités. La récolte a lieu six jours plus tard, en utilisant une centrifugeuse à débit continu à 17'000 x g. Après la récolte, les cellules sont lavées à deux reprises (5 min, 17'000 x g) avec 50 mM Tris-HCl pH 7.9, puis stockées au congélateur à - 20°C.

1.2.2. Méthodes d'analyse enzymatique

Au cours de la purification de la FBPase, la méthode colorimétrique est utilisée pour l'analyse de la colonne DEAE-cellulose et la méthode spectrophotométrique pour l'analyse des autres colonnes ainsi que pour la détermination de l'activité spécifique à chaque étape.

1.2.2.1. Méthode colorimétrique

Le principe de la méthode colorimétrique consiste à doser le phosphate libéré lors de la réaction catalysée par la fructose 1,6-bisphosphatase :

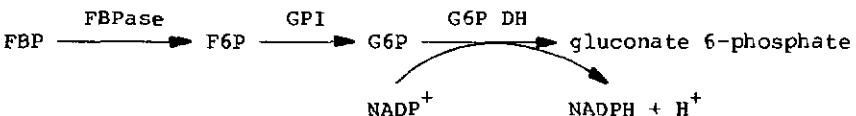


Pour analyser la colonne DEAE-cellulose, 50 μ l de fraction sont ajoutés au mélange réactionnel (volume final = 0.5 ml) renfermant (en μ moles) Tris-HCl pH 8.4, 50 ; EDTA-Na, 0.05 ; MgSO₄, 10. Le substrat (FBP-Na₃), 1.5 μ moles, est introduit en dernier pour faire démarrer la réaction. Le temps de réaction est de 15 minutes à 25°C dans un bain thermostaté. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 ml de mélange pour le dosage du phosphate, selon la méthode de Fiske et SubbaRow (1925) légèrement modifiée (mélange stable pendant une journée : eau distillée, 60 ml ; acide sulfurique (1/5 concentré) 10 ml ; solution d'heptamolybdate d'ammonium à 6.6 %, 10 ml ; sulfate de fer, 1.25 g). Le phosphate libéré forme avec l'heptamolybdate d'ammonium le complexe de phosphomolybdate d'ammonium qui est réduit par le sulfate de fer pour former le bleu de molybdène. Après 10 minutes, l'absorbance est lue à 660 nm contre un blanc (la fraction utilisée ne contenant pas de FBPase). La quantité de phosphate libéré est calculée par rapport à une courbe étalon établie avec des concentrations croissantes de phosphate inorganique (une absorbance de 1.25 correspond à 1 μ moles de phosphate).

1.2.2.2. Méthode spectrophotométrique

Au cours de la purification de la FBPase, la méthode spectrophotométrique est utilisée pour l'analyse des colonnes hydroxyapatite, chromatofocusing et Sephacryl, de même que pour la détermination de l'activité spécifique à chaque étape.

La FBPase hydrolyse le fructose 1,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate + phosphate. Par la présence de deux enzymes complémentaires dans le mélange réactionnel, le fructose 6-phosphate est isomérisé par la glucosephosphate isomérase (GPI) en glucose 6-phosphate (G6P), qui, à son tour, est transformé par la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6P DH) en gluconate 6-phosphate :



C'est donc la réduction du NADP qui est mesurée, en suivant la réaction enzymatique à 340 nm, ce qui correspond stoechiométriquement à l'hydrolyse du fructose 1,6-bisphosphate.

L'échantillon à tester (jusqu'à 50 μ l) est donc introduit dans une cuvette spectrophotométrique contenant le mélange réactionnel (0.95 ml) qui renferme (en μ moles) Tris-HCl pH 8.4, 100 ; EDTA-Na, 0.1 ; $MgSO_4$, 20 ; NADP, 0.3 ; FBP- Na_3 , 1 ; glucosephosphate isomérase, 1.75 unité ; glucose 6-phosphate déshydrogénase, 0.70 unité. Le changement d'absorbance à 340 nm est enregistré. La pente est mesurée, puis, connaissant le coefficient d'extinction molaire du NADPH, la quantité de substrat transformé est calculée et le résultat est donné en nmoles de FBP hydrolysé par minute. L'activité spécifique est exprimée en unités/mg (une unité enzymatique étant la quantité nécessaire d'enzyme pour transformer une micromole de substrat par minute à 25°C).

1.2.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon le procédé de Lowry et al. (1951). Le principe en est le suivant : la tyrosine et le tryptophane des protéines traitées réduisent en milieu alcalin le réactif de Folin (acide phosphomolybdotungstique) pour former le bleu de molybdène. Une solution de sulfate de cuivre est ajoutée, ce qui a pour résultat d'augmenter l'intensité de la coloration qui dépend de la quantité de protéines.

En pratique, cela se passe de la manière suivante : dans une éprouvette, mettre jusqu'à un volume de 0.5 ml l'échantillon à analyser (compléter avec de l'eau si nécessaire), ajouter 5 ml du premier mélange ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (2 %), 1 ml ; K-Na-tartrate $\cdot 4 H_2O$ (4 %), 1 ml ; Na_2CO_3 (3 %) dans NaOH 0.1 N, jusqu'à 100 ml), mélanger sur le vortex, attendre 10 min. Introduire 0.5 ml du second mélange (réactif de Folin-Ciocalteu 2 N, 5 ml ; eau bidistillée, 5 ml), remélanger, attendre à nouveau 10 min. Puis lire l'absorbance à 660 nm. La quantité de protéines dans l'échantillon est calculée par rapport à une courbe étalon établie avec

la sérum-albumine de boeuf. La concentration protéinique est donnée en mg de protéines/ml. Quand la quantité de protéines dans l'échantillon est supposée être assez faible (moins de 20 μg), un microdosage est effectué : au lieu des volumes de 0.5/5/0.5 ml par éprouvette, ce sont les volumes 0.2/2/0.2 ml qui sont utilisés. Dans ce cas, il faut attendre 30 minutes une fois le second mélange introduit, avant de pouvoir lire l'absorbance à 660 nm.

1.2.4. Electrophorèse sur gel natif

L'électrophorèse sur gel natif de polyacrylamide (système 6 ; Maurer, 1971) est utilisée pour suivre la purification pendant les différentes étapes. Ce système d'électrophorèse (concentration à pH 7.0, séparation à pH 8.0) a été choisi, car il est adéquat pour l'enzyme étudiée. Par contre, en utilisant le système plus courant (système 1 ; Davis, 1964), il a été réalisé que sous ces conditions (concentration à pH 8.3, séparation à pH 9.5), l'enzyme se dégrade sur le gel, provoquant des traînées de protéine. La FBPase d'Euglène se comporte donc d'une manière semblable à celle d'Epinard, où il a été observé qu'elle tombe en sous-unités sous ces mêmes conditions d'électrophorèse (Buchanan et al., 1971; Zimmermann et al., 1976).

Pour la réalisation d'une électrophorèse sur gel natif, les solutions suivantes sont utilisées :

- Solution d'acrylamide (pour 100 ml) : acrylamide, 30 g ; bis-acrylamide, 0.8 g.
- Tampon Tris-HCl pH 7.5 (pour 100 ml) : 1 N HCl, 48 ml ; Tris, 6.85 g ; TEMED, 0.46 ml.
- Tampon Tris-phosphate pH 5.5 (pour 100 ml) : 1 M H_3PO_4 , 39 ml ; Tris, 4.95 g ; TEMED, 0.46 ml.
- Solution de persulfate d'ammonium : 14 mg/ml.
- Solution de riboflavine (pour 100 ml) : 4 mg.
- TEMED.
- Solution d'échantillon (0.5 ml) : glycérol 50 %, 0.1 ml ; solution bleu de bromophénol 0.05 %, 0.05 ml ; eau bidistillée, 0.35 ml.
- Tampon d'électrophorèse (1 litre) : acide diéthylbarbiturique,

5.52 g ; Tris, 1 g.

- Bain de coloration (par litre) : bleu de Coomassie, 2.5 g ; méthanol 50 %, 908 ml ; acide acétique, 92 ml.

- Bain de décoloration (par litre) : acide acétique, 45 ml ; méthanol, 50 ml.

Le gel de séparation (10 cm de hauteur x 15 cm de largeur, 7.5 % d'acrylamide, 21 ml) est coulé le premier entre les deux plaques de verre de l'appareil d'électrophorèse. Elles sont distantes de 1.5 mm (épaisseur du gel) et positionnées verticalement. Il est à remarquer que pour les deux autres types de gel (cf. § 1.2.5.2 et 1.2.5.3), le même appareillage est utilisé et les dimensions des gels sont semblables (10 x 15 x 0.15 cm).

La composition du gel de séparation est la suivante :

- Tampon Tris-HCl pH 7.5	2.6 ml
- Solution d'acrylamide	5.2 ml
- Persulfate d'ammonium	1.0 ml
- Eau bidistillée	12.2 ml

Puis c'est le gel de concentration (3 % d'acrylamide, 7.2 ml) qui est versé. Voici sa composition :

- Tampon Tris-phosphate pH 5.5	0.9 ml
- Solution d'acrylamide	0.72 ml
- Riboflavine	0.9 ml
- TEMED	6 μ l
- Eau bidistillée	4.68 ml

Les échantillons (jusqu'à 15 μ l) sont dilués deux fois avec la solution d'échantillon, puis sont appliqués sur le gel dès que le tampon d'électrophorèse est versé dans les deux cuves de l'appareil. L'électrophorèse dure environ 3 heures, sous courant continu constant de 30 mA. Ensuite le gel est introduit dans le bain de coloration ; 20 à 30 min plus tard, il est transféré dans le bain de décoloration. Les protéines apparaissent chacune sous la forme d'une ligne distincte colorée en bleu sur le gel, à des hauteurs différentes suivant la migration qu'elles ont effectuée durant l'électrophorèse.

1.2.5. Méthodes de détermination du poids moléculaire de la FB Pase

1.2.5.1. Estimation du PM par filtration sur gel

Il est possible d'estimer le poids moléculaire des protéines par filtration sur gel, car l'élution des protéines a lieu dans un certain ordre, lui-même fonction logarithmique du poids moléculaire (Andrews, 1964 et 1965).

C'est une colonne Sephacryl S-300 (1.5 x 84 cm) qui est utilisée pour l'estimation du poids moléculaire de la FB Pase. La droite étalon a été établie avec les protéines de référence suivantes :

<u>Protéine étalon</u>	<u>Poids moléculaire</u>
RuBP carboxylase d'épinard	550'000
catalase de foie de boeuf	232'000
lactate déshydrogénase de muscle de lapin	140'000
sérum-albumine de boeuf (dimère)	134'000
sérum-albumine de boeuf (monomère)	67'000
désoxyribonucléase I de pancréas de boeuf	31'000
cytochrome c de coeur de cheval	12'500

L'échantillon (environ 1.5 ml), contenant à la fois les protéines étalon et la FB Pase chloroplastique d'Euglène, est appliqué sur la colonne Sephacryl S-300, équilibrée avec 30 mM Tris-HCl pH 7.3 + 200 mM NaCl + 14 mM MET. La colonne est éluée avec le même tampon. Le débit est d'environ 10 ml/h, maintenu constant par une pompe. A la sortie de la colonne, l'éluat passe par une cellule Uvicord (enregistrement de la transmission à 280 nm) et est recueilli dans des fractions (environ 1 ml/fraction) sur un collecteur. La position des protéines standard est déterminée d'après l'enregistrement, à l'exception de la lactate déshydrogénase. Sa position et celle de la FB Pase sont déterminées enzymatiquement.

1.2.5.2. Estimation du PM par électrophorèse sur gel, gradient d'acrylamide

Il existe une autre technique pour estimer le poids moléculaire des protéines (masse moléculaire relative) : une électrophorèse sur gel, avec un gradient de polyacrylamide, dans le cas particulier de 4 à 30 % (Pharmacia, 1980b).

Pour la réalisation d'une électrophorèse sur gel, gradient linéaire d'acrylamide, les solutions suivantes sont utilisées :

- Tampon d'électrophorèse (par litre) : Tris, 10.75 g ; acide borique, 5.04 g ; EDTA- Na_2 , 0.93 g ; pH final, 8.5.
- Solution d'acrylamide A : acrylamide, 2.3 g ; bis-acrylamide, 0.1 g ; tampon d'électrophorèse, jusqu'à 30 ml.
- Solution d'acrylamide B : acrylamide, 17.28 g ; bis-acrylamide, 0.72 g ; tampon d'électrophorèse, jusqu'à 30 ml.
- Solution de persulfate d'ammonium : 1 mg/ml.
- TEMED.
- Tampon d'échantillon (1 ml) : tampon d'électrophorèse, 0.6 ml ; glycérol 50 %, 0.25 ml ; solution bleu de bromophénol 0.1 %, 0.05 ml ; 2-mercaptoéthanol, 0.1 ml.

Le gel, gradient d'acrylamide 4 à 30 %, est réalisé par mixage de deux solutions (10 ml chacune), introduites entre les deux plaques de verre :

	<u>Solution I</u>	<u>Solution II</u>
- Solution d'acrylamide A	5 ml	
- Solution d'acrylamide B		5 ml
- Persulfate d'ammonium	2.5 ml	2.5 ml
- Tampon d'électrophorèse	2.5 ml	2.5 ml
- TEMED	2 μ l	2 μ l

Puis c'est le gel d'entrée (4 % d'acrylamide, 12 ml) qui est versé. Sa composition est la suivante :

- Solution d'acrylamide A	6 ml
- Tampon d'électrophorèse	3 ml
- Persulfate d'ammonium (3 mg/ml)	3 ml
- TEMED	10 μ l
- 2-mercaptoéthanol	2 μ l

Les échantillons (jusqu'à 15 μ l) sont dilués deux fois avec le tampon d'échantillon, puis sont appliqués sur le gel, dès que le tampon d'électrophorèse (950 ml + 950 μ l MET) est versé dans les deux cuves de l'appareil. Les protéines standard utilisées sont les suivantes : carboxylase, catalase, lactate déshydrogénase, sérum-albumine de boeuf et ovalbumine (43'000). Les conditions d'électrophorèse se présentent comme suit : préélectrophorèse (sans les échantillons) : 30 min à environ 70 volts ; électrophorèse : 15 à 20 min à 70 V jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel ; électrophorèse proprement dite : au moins 2'000 voltheures, par exemple 15 à 16 heures à 150 V. La coloration et la décoloration du gel sont identiques à celles d'un gel natif habituel (cf. § 1.2.4).

1.2.5.3. Estimation du PM de la sous-unité par électrophorèse sur gel dénaturant

L'électrophorèse sur gel dénaturant (emploi du dodécylsulfate de sodium) de polyacrylamide est utilisée pour estimer le poids moléculaire de la sous-unité de la FBPase. En effet, il existe une relation linéaire entre la mobilité relative de la substance considérée et son poids moléculaire (Weber et Osborn, 1969). Pour la réalisation de ce type de gel (Laemmli et Favre, 1973), les solutions suivantes sont utilisées :

- Solution d'acrylamide (pour 100 ml) : acrylamide, 30 g ; bis-acrylamide, 0.8 g.
- Tampon Tris-HCl pH 8.8 (pour 100 ml) : 1 N HCl, 38 ml ; Tris, 18.15 g.
- Tampon Tris-HCl pH 6.8 (pour 100 ml) : 1 N HCl, 40 ml ; Tris, 6 g.
- Solution de dodécylsulfate de sodium, à 10 %.
- Solution de persulfate d'ammonium : 14 mg/ml.
- TEMED.
- Tampon d'échantillon : tampon Tris-HCl pH 6.8, 0.25 ml ; glycérol 50 %, 0.25 ml ; solution SDS 10 %, 0.4 ml ; solution bleu de bromophénol 0.05 %, 0.05 ml ; 2-mercaptoéthanol, 0.1 ml.

- Tampon d'électrophorèse (par litre) : Tris, 6 g ; glycine, 28.8 g ; SDS, 1 g.

La composition du gel de séparation (9 % d'acrylamide, 24 ml) est la suivante :

- Tampon Tris-HCl pH 8.8	9.0 ml
- Solution d'acrylamide	7.2 ml
- Solution SDS 10 %	0.24 ml
- Persulfate d'ammonium	1.2 ml
- TEMED	6 μ l
- Eau bidistillée	6.36 ml

Le gel de concentration (5 % d'acrylamide, 6 ml) est composé des produits suivants :

- Tampon Tris-HCl pH 6.8	0.75 ml
- Solution d'acrylamide	1.0 ml
- Solution SDS 10 %	0.06 ml
- Persulfate d'ammonium	0.12 ml
- TEMED	6 μ l
- Eau bidistillée	4.07 ml

Les échantillons (jusqu'à 15 μ l) sont dilués deux fois avec le tampon d'échantillon, portés à ébullition pendant 3 minutes, puis appliqués sur le gel dès que le tampon d'électrophorèse est versé dans les deux cuves de l'appareil. La sérum-albumine de boeuf (67'000), la catalase (60'000), l'ovalbumine (43'000), la désoxyribonucléase I (31'000), le chymotrypsinogène (25'700), la trypsine (23'300), la ribonucléase (13'700) et le cytochrome c (12'500) sont les protéines standard utilisées. L'électrophorèse dure environ 4 heures, sous courant continu constant de 30 mA. La coloration et la décoloration du gel sont semblables à celles du gel natif (cf. § 1.2.4).

1.2.6. Méthode de détermination du point isoélectrique de l'enzyme

La détermination du point isoélectrique de la FBPase chloroplastique d'Euglène est effectuée par focalisation isoélectrique des protéines sur un gel de polyacrylamide, contenant un gradient d'ampholytes. Le principe de la méthode est que, dans

un gradient de pH dû à la présence d'ampholytes dans un champ électrique, les protéines en solution viennent à être placées au pH correspondant à leur point isoélectrique.

Les gels utilisés pour la détermination du pI, provenant de la firme LKB, sont prêts à l'emploi sur le Multiphor de LKB. Ce sont surtout les gels de la gamme de pH 4-6.5 qui sont utilisés, mais la gamme de pH 3.5-9.5 est également employée. Les instructions suivies pour la procédure de l'isoelectric focusing lui-même (disposition du gel sur la plaque, application des échantillons sur le gel, temps et condition de l'expérience), ainsi que pour le traitement du gel après coup (fixation, coloration, décoloration et conservation du gel) proviennent du fabricant (LKB).

1.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1.3.1. Purification de la FBPase chloroplastique d'*Euglena gracilis*

La procédure utilisée pour purifier la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'*Euglena gracilis* est établie en tenant compte des travaux de App et Jagendorf (1964) et de ceux de Schürmann et Wolosiuk (1978). Le schéma général est indiqué à la figure 3.

Toutes les étapes de purification se font en maintenant l'enzyme à une température de 4°C environ. Au cours du processus de purification, l'activité enzymatique est constamment contrôlée selon les méthodes décrites au paragraphe 1.2.2.

Les étapes de la purification de la FBPase chloroplastique d'*Euglena gracilis* sont les suivantes :

1.3.1.1. Extrait brut

500 g de cellules d'*Euglena gracilis* sont resuspendus dans 500 ml 50 mM tampon phosphate pH 7.0 (NaK_{P_i}) + 14 mM MET avec un mixer et cassés par ultrasons. Dès que les cellules sont

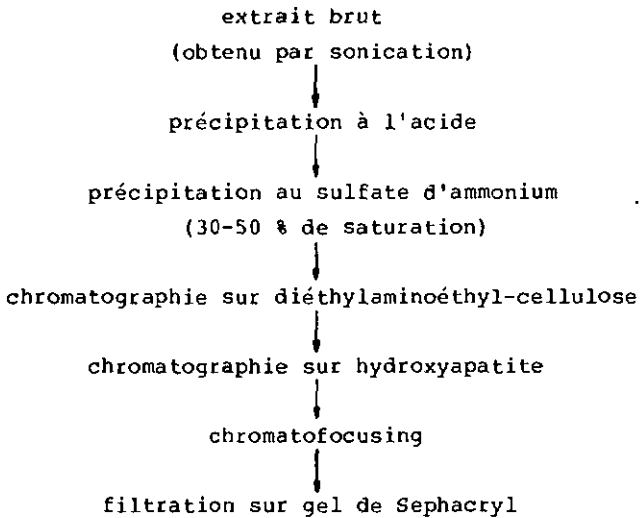


Fig.3. Procédé de purification de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis

cassées, un inhibiteur puissant des protéases, le PMSF (phényl-méthylsulfonylfluorure) est ajouté (1 mM). L'extrait brut est centrifugé 20 min à 27'000 x g, les surnageants sont filtrés à travers de la gaze pour éliminer des particules lipidiques, les culots sont resuspendus dans le même tampon pour récupérer de l'enzyme et recentrifugés. Les nouveaux surnageants sont aussi filtrés puis ajoutés aux premiers.

1.3.1.2. Précipitation à l'acide

Le pH du surnageant est ajusté à 5.0 avec de l'acide citrique 1 M puis l'extrait est centrifugé 20 min à 27'000 x g. Les culots sont éliminés car ils contiennent très peu d'enzyme. Contrairement à la FBPase chloroplastique d'Epinard, celle d'Eu-

glène reste en solution après la précipitation acide. Quant à la FBPase cytoplasmique, elle est éliminée par cette étape (cf. chap. 4).

1.3.1.3. Précipitation au sulfate d'ammonium

Du sulfate d'ammonium est ajouté pour atteindre 30 % de saturation dans l'extrait qui est centrifugé 10 min à 27'000 x g. Les culots sont éliminés. Du sulfate d'ammonium est rajouté jusqu'à 50 % de saturation, l'extrait est centrifugé comme précédemment. Le surnageant est mis de côté, tandis que les culots sont resuspendus dans 100 mM Tris-acétate pH 7.0 + 14 mM MET et le pH est ajusté à 7.0 avec 1 M Tris. L'extrait est dialysé contre 50 mM Tris-acétate pH 7.0 + 100 mM NaCl + 14 mM MET pendant la nuit, puis centrifugé 30 min à 48'000 x g.

Du sulfate d'ammonium jusqu'à 90 % de saturation est rajouté au surnageant mis de côté, car il contient des thio-rédoxines, protéines activatrices de la FBPase. L'extrait est centrifugé 10 min à 27'000 x g et les surnageants sont éliminés. Les culots sont resuspendus dans 100 mM Tris-acétate pH 7.0 et le pH est ajusté à 7.0 avec 1 M Tris. L'extrait est dialysé pendant une nuit contre 50 mM Tris-acétate pH 7.0 dans un tube à dialyse Spectrapor (retenant les protéines à PM supérieur à 8'000), centrifugé 30 min à 48'000 x g, puis congelé à - 20°C.

Ces 3 premières étapes (extrait brut, précipitation à l'acide, précipitation au sulfate d'ammonium) sont effectuées en série à 3 reprises, car ce sont 1'500 g de cellules d'Euglène qui sont utilisés pour la purification de l'enzyme ! Par conséquent, les 3 fractions de sulfate d'ammonium (30-50 %) obtenues, sont combinées pour être appliquées sur la première colonne.

1.3.1.4. Chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose

L'extrait, de couleur rougeâtre, est appliqué sur une colonne (2.5 x 36 cm) diéthylaminoéthyl-cellulose DE-23 (Whatman), équilibrée avec 50 mM Tris-acétate pH 7.0 + 100 mM NaCl + 14 mM MET (Fig. 4). La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluee

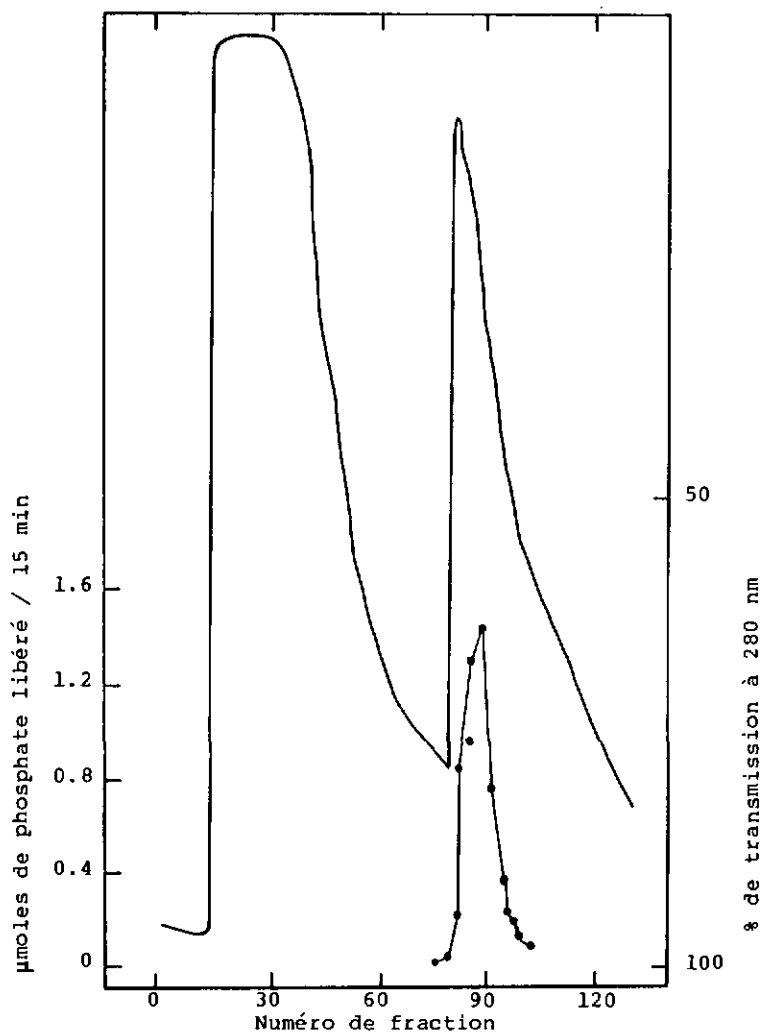


Fig.4. Chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose DE-23. 130 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne DE-23 (2.5 x 36 cm), équilibrée avec 50 mM Tris-acétate pH 7.0 + 100 mM NaCl + 14 mM MET. La colonne est lavée avec le même tampon, puis l'enzyme est éluée avec 50 mM Tris-acétate pH 7.0 + 170 mM NaCl + 14 mM MET. Les fractions (8.1 ml) sont testées pour détecter la FBPase (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

avec 50 mM Tris-acétate pH 7.0 + 170 mM NaCl + 14 mM MET. Le débit de la colonne est de 81 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions actives (8.1 ml/fraction) sont combinées et le volume est réduit par ultrafiltration dans une cellule Amicon, pourvue d'une membrane XM-50 (retenant les protéines à PM supérieur à 50'000). La solution protéinique est centrifugée 20 min à 48'000 x g.

Il est à remarquer que le cytochrome c_{552} , de couleur rose, est élué avec 250 mM NaCl et la ferrédoxine, de couleur brune, avec 600 mM NaCl.

1.3.1.5. Chromatographie sur hydroxyapatite

L'échantillon, qui vient de passer à travers une colonne Sephadex G-25 Medium (1.5 x 31 cm) pour se trouver dans le bon tampon (10 mM tampon phosphate pH 6.8), est appliqué sur une colonne hydroxyapatite (1.5 x 13 cm), équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 6.8 (Fig.5). La colonne est éluée avec un gradient de 10-200 mM tampon phosphate pH 6.8. Le débit de la colonne est d'environ 10 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions actives (3.5 ml/fraction) sont combinées et concentrées par ultrafiltration. La solution protéinique est centrifugée 30 min à 48'000 x g.

1.3.1.6. Chromatofocusing

L'échantillon est d'abord passé à travers une G-25 Medium pour se trouver dans le bon tampon (tampon phosphate pH 6.8 remplacé par 25 mM histidine-HCl pH 6.0), puis il est appliqué après centrifugation sur une colonne de chromatofocusing (1.5 x 14.4 cm), équilibrée avec 25 mM histidine-HCl pH 6.0 (Fig.6). La colonne est éluée avec le Polybuffer 74-HCl pH 4.0 (Pharmacia, 1980a). Le débit de la colonne est d'environ 17 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions actives (4.2 ml/fraction) sont combinées, le pH (4.2) est ajusté à 5.5 avec 500 mM Tris-acétate pH 7.0. Après centrifugation (5 min, 48'000 x g), le volume est réduit par ultrafiltration dans une

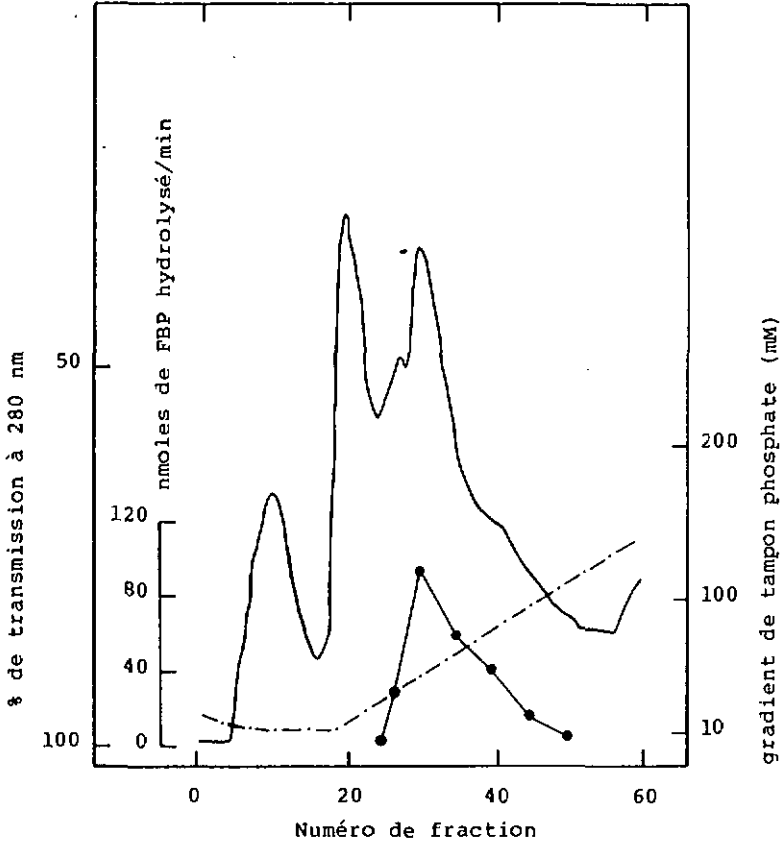


Fig.5. Chromatographie sur hydroxyapatite. 18 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne hydroxyapatite (1.5 x 13 cm), équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 6.8 et éluée avec un gradient de 10-200 mM tampon phosphate pH 6.8 (---). Les fractions (3.5 ml) sont testées pour détecter la FBPase (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

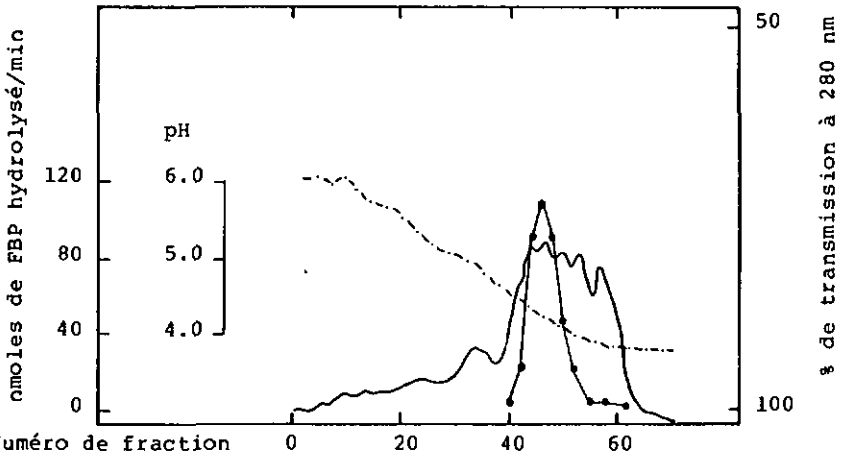


Fig.6. Chromatofocusing. 11 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne de chromatofocusing (1.5 x 14.4 cm), équilibrée avec 25 mM histidine-HCl pH 6.0 et éluee avec le Polybuffer 74-HCl pH 4.0. Le pH des fractions est mesuré (---) et la présence de la FBPAse est démontrée par son activité (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

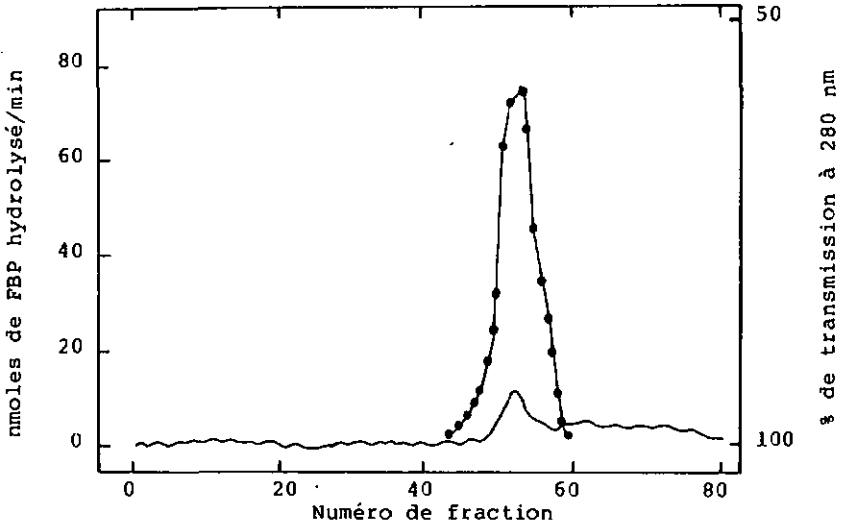


Fig.7. Filtration sur gel de Sephacryl S-200. 6.5 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne Sephacryl S-200 (2.6 x 98 cm), équilibrée avec 50 mM Na-acétate pH 5.5 et éluee avec le même tampon. Les fractions (5.1 ml) sont testées pour détecter la FBPAse (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

cellule Amicon. La solution protéinique est centrifugée 20 min à 48'000 x g.

1.3.1.7. Filtration sur gel de Sephacryl

L'échantillon est appliqué sur une colonne Sephacryl S-200 (2.6 x 98 cm), équilibrée avec 50 mM Na-acétate pH 5.5 (Fig.7). La colonne est éluée avec le même tampon. Le débit de la colonne est d'environ 25 ml/h, sous une pression hydrostatique de 140 cm. Les fractions actives (5.1 ml/fraction) sont combinées, puis le volume est réduit par ultrafiltration dans une petite cellule Amicon.

L'enzyme, obtenue à l'état pur, est stockée en petites aliquotes au congélateur à - 20°C.

1.3.1.8. Relation activité spécifique - degré de pureté

La FBPase est testée après chaque étape de purification et son activité spécifique est donc déterminée (Tableau I). L'activité spécifique de l'enzyme passe de 4.20 unités/mg de protéine après l'étape de chromatofocusing à 34.50 à la fin de la purification, après la colonne Sephacryl. Cela peut surprendre que l'activité spécifique augmente de presque 10 fois entre ces deux étapes, car le degré de pureté de l'enzyme y est comparable (Fig.8). Mais il faut souligner que l'extrait protéique, après la colonne de chromatofocusing, renferme des ampholytes (Polybuffer) qui interfèrent avec la méthode utilisée pour doser les protéines, ce qui a pour conséquence de simuler une concentration plus élevée de "protéines" et ainsi diminuer l'activité spécifique (unités enzymatiques / mg de protéine). D'autre part, les fractions actives de la chromatofocusing ont un pH de 4.2, ce qui a peut-être inactivé une partie de l'enzyme. Ainsi l'activité spécifique à la fin de cette purification n'est que de 34.50 unités/mg de protéine. Il est précisément à remarquer que, par deux fois, l'activité spécifique de la FBPase d'Euglène, à la fin d'une purification, a été plus élevée : 45.06 et même 62.84 unités par mg de protéine, l'étape de chromatofocusing n'ayant pas été uti-

TABLEAU I

Purification de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis

Etape de purification	Volume total (ml)	Concentration des protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (unités)	Rendement (%)	Activité spécifique (unités/mg)
Extrait brut	3235	19.3	62'435	1248.70	100	0.02
Précipitation à l'acide	3045	16.4	49'938	499.38	40	0.01
Précipitation au sulfate d'ammonium	130	69.5	9'035	542.10	43	0.06
DEAE-23	12	98.2	1'178	400.52	32	0.34
Hydroxyapatite	7.5	45.7	342	554.04	44	1.62
Chromatofocusing	6.5	6.2	40.3	169.26	14	4.20
Sephacryl S-200	1.3	0.7	0.9	31.05	2	34.50

Le procédé de purification à partir de 1'500 g de cellules d'Euglène est décrit dans le texte. A chaque étape, les protéines sont dosées (cf. § 1.2.3) et l'activité spécifique de l'enzyme est déterminée par l'utilisation de la méthode spectrophotométrique (cf. § 1.2.2.2)

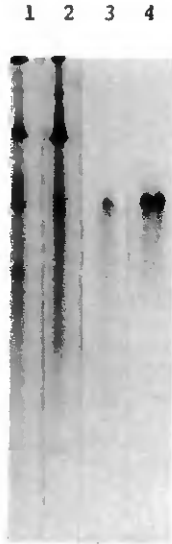


Fig.8. Dernières étapes de purification de la FBPase, visualisées sur un gel natif (7.5 % d'acrylamide) :

- diéthylaminoéthyl-cellulose (canal 1, 59 μg de protéines)
- hydroxyapatite (canal 2, 45 μg)
- chromatofocusing (canal 3, 30 μg)
- Sephacryl S-200 (canal 4, 10.5 μg)

lisée lors de ces deux purifications. App et Jagendorf (1964) ont, pour leur part, trouvé une activité spécifique pour la FBPase chloroplastique d'*Euglène* qui s'élève à 72 unités par mg de protéine. Cette valeur a été déterminée dans la fraction pic de la dernière colonne de purification (seconde DEAE) sous des conditions de test enzymatique différentes des nôtres.

La figure 8 visualise les dernières étapes de la purification de la FBPase, après électrophorèse sur gel natif d'acrylamide (7.5 %) : diéthylaminoéthyl-cellulose (canal 1), hydroxyapatite (canal 2), chromatofocusing (canal 3) et Sephacryl S-200 (canal 4). Après la DEAE-cellulose et l'hydroxyapatite, de nombreuses protéines se trouvent avec l'enzyme. L'étape de la chromatofocusing est décisive à cet égard, et, à la fin de la purification, après la Sephacryl S-200, on peut considérer que la FBPase est pure : en effet, sur le gel, apparaît la FBPase (la grande bande), accompagnée d'une seule autre bande protéinique, en très faible quantité d'ailleurs (sur le gel, petite bande au-dessus de la grande bande, à la limite du pouvoir de résolution). Il peut paraître surprenant que, bien qu'il y ait 3 fois plus de "protéines" appliquées sur le gel après la chromatofocusing qu'après la Sephacryl, la quantité de protéines sur le gel est bien plus faible. La raison en est que, comme décrit dans le paragraphe précédent, la présence du Polybuffer a faussé le dosage des protéines à l'étape de la chromatofocusing. App et Jagendorf ne donnent aucune précision visuelle sur le degré de pureté de leur enzyme ; il est donc hors de propos de comparer à ce niveau-là les deux enzymes.

1.3.2. Conditions optimales de test enzymatique pour la FBPase

C'est la méthode spectrophotométrique (cf. § 1.2.2.2) qui est utilisée pour déterminer les conditions optimales sous lesquelles la FBPase chloroplastique d'*Euglena gracilis* est testée : pH 8.4, 0.1 mM EDTA, 20 mM Mg²⁺ et 1 mM de fructose 1,6-bisphosphate.

Le pH optimal pour la FBPase est donc 8.4, dans le

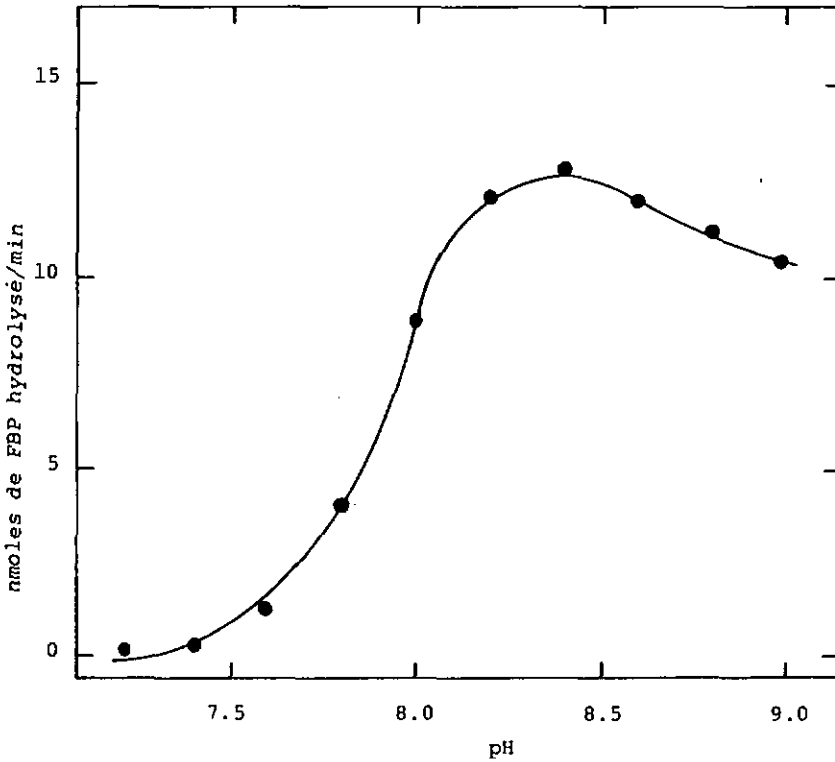


Fig.9. Effet du pH sur l'activité de la FBPase. Pour chaque réaction, 0.8 μ g de FBPase hautement purifiée est introduit dans une cuvette spectrophotométrique contenant le mélange réactionnel décrit au § 1.2.2.2, à l'exception du pH

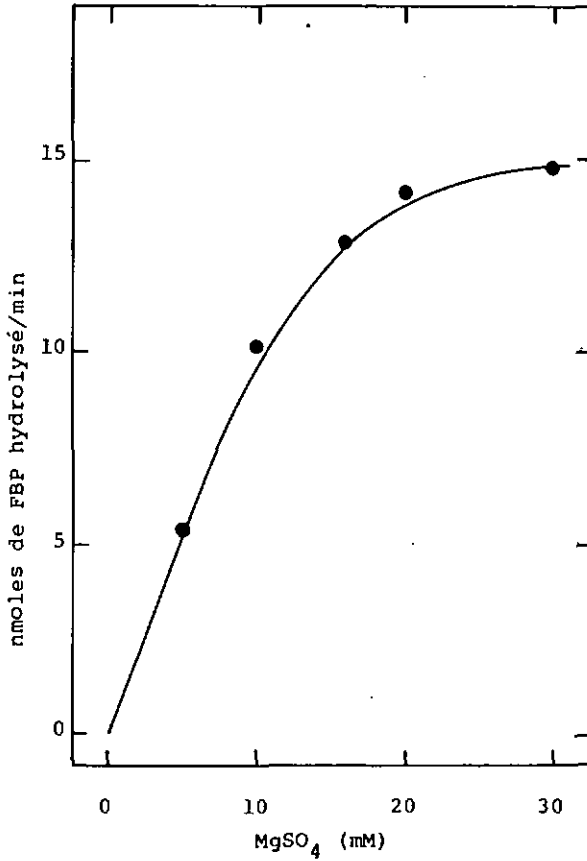


Fig.10. Effet de la concentration de magnésium sur l'activité de la FBPase. Pour chaque réaction, 0.8 μ g de FBPase hautement purifiée est introduit dans une cuvette spectrophotométrique contenant le mélange réactionnel décrit au § 1.2.2.2, à l'exception de la concentration de magnésium

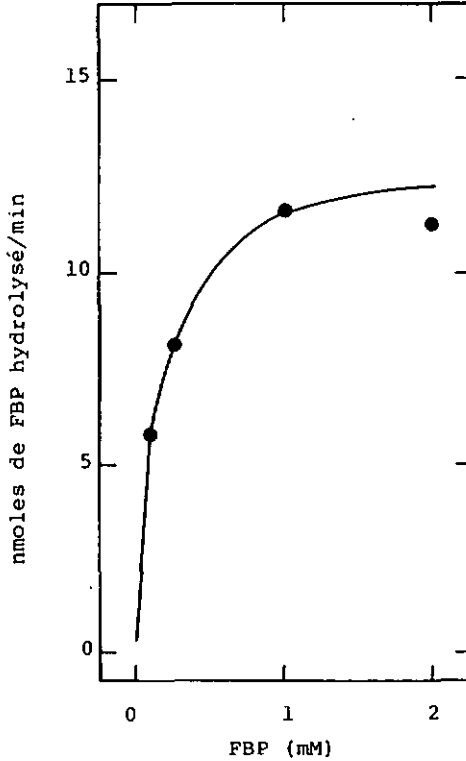


Fig.11. Effet de la concentration du substrat sur l'activité de la FBPase. Pour chaque réaction, 0.8 μ g de FBPase hautement purifiée est introduit dans une cuvette spectrophotométrique contenant le mélange réactionnel décrit au § 1.2.2.2, à l'exception de la concentration du substrat

tampon Tris-HCl. La courbe de pH (Fig.9), réalisée avec 0.8 μg de FBPase hautement purifiée par réaction, présente l'allure suivante : à pH 7.2, l'enzyme n'est pas active, puis l'activité enzymatique augmente graduellement pour atteindre son optimum à pH 8.4. Ensuite l'activité de la FBPase redescend progressivement jusqu'à pH 9. App et Jagendorf (1964) ont trouvé 8.25 pour le pH optimum de la FBPase d'Euglène. L'allure générale de la courbe de pH qu'ils ont présentée est davantage symétrique par rapport à l'axe passant par le sommet de la courbe (courbe de Gauss).

L'activité de la FBPase en fonction de la concentration en magnésium se présente comme suit (Fig.10) : elle augmente linéairement aux faibles concentrations pour atteindre un plateau de saturation vers 30 mM. A 20 mM Mg^{2+} , le plateau est presque atteint ; c'est donc cette concentration en magnésium qui est retenue pour tester l'enzyme. App et Jagendorf indiquent 10 mM de MgCl_2 .

L'activité de la FBPase varie rapidement aux faibles concentrations de substrat pour atteindre un palier vers 2 mM de FBP (Fig.11). A 1 mM, le palier étant presque atteint, c'est cette valeur qui est prise pour le test enzymatique. Quant au K_m , après utilisation de la méthode de Lineweaver et Burk, il est de 0.25 mM pour le fructose 1,6-bisphosphate. Le K_m est donc très proche de celui déterminé par App et Jagendorf (0.3 mM). Ces auteurs ont également mis en évidence un rapport de concentration optimal entre le magnésium et le substrat : il s'est avéré que leur enzyme présentait la meilleure activité avec un rapport $\text{Mg}^{2+}/\text{FBP}$ de 20. Il est à remarquer que les conditions optimales actuelles présentent aussi ce rapport (20 mM $\text{Mg}^{2+}/1$ mM FBP).

1.3.3. Activité de la FBPase en fonction du temps

La méthode colorimétrique (cf. § 1.2.2.1) est utilisée pour mesurer l'activité de la FBPase en fonction du temps. Deux conditions de test sont différentes dans cette expérience : pH 8.5 et 16 mM MgSO_4 . 50 μl d'enzyme hautement purifiée (40 μg) sont introduits dans le mélange réactionnel (volume final = 5 ml),

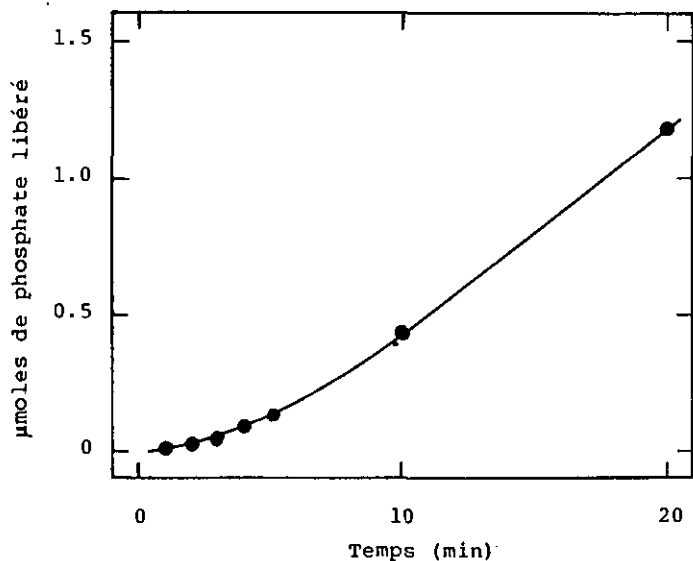


Fig.12. Activité de la FBPase en fonction du temps. 40 µg de FBPase hautement purifiée sont introduits dans 4.95 ml de mélange réactionnel (pH 8.5, 0.1 mM EDTA, 16 mM MgSO₄ et 3 mM FBP), maintenu à 25°C dans un bain thermostaté. A différents intervalles de temps, 0.5 ml est prélevé et l'activité enzymatique est déterminée comme décrit au § 1.2.2.1

maintenu à 25°C dans un bain thermostaté. A différents intervalles de temps, 0.5 ml est prélevé auquel sont ajoutés 2 ml de mélange pour le dosage du phosphate. La référence est le temps zéro. Il y a donc 4 µg d'enzyme par réaction et le résultat est donné en µmoles de phosphate libéré (Fig.12). La partie linéaire de la courbe se situe entre 10 et 20 minutes ; par contre, il existe un temps de latence dans les toutes premières minutes de la réaction. C'est une indication pour dire que la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis est une enzyme de régulation.

1.3.4. Activité de la FBPase en fonction de la température

C'est la méthode spectrophotométrique (cf. § 1.2.2.2) qui est employée. Trois variables sont différentes par rapport aux conditions standard de mesure de l'activité enzymatique : pH 8.5, 16 mM MgSO₄ et 0.38 mM FBP. Pour chaque réaction, 20 µl de FBPase hautement purifiée (1.2 µg) sont introduits dans 0.98 ml de mélange réactionnel et la réaction est enregistrée à la température indiquée (Fig.13). En effet, l'enzyme est testée à différentes températures, allant de 10 à 60°C. D'abord l'activité augmente rapidement : de 10 à 20° (élévation de la température de 10°) la vitesse de réaction est multipliée par 2 (c'est le coefficient de Van't Hoff). Il en va de même entre 20 et 30°. Puis le taux d'augmentation de la vitesse de réaction ralentit un peu pour atteindre la vitesse maximale à 50°C (température optimale). A 55°, la réaction enzymatique est nulle. Il faut cependant remarquer que, puisque c'est la méthode spectrophotométrique qui est utilisée, il se pourrait fort bien qu'à cette température une des deux enzymes complémentaires (glucosephosphate isomérase ou glucose 6-phosphate déshydrogénase) soit dénaturée et non la FBPase. Mais, de toute façon, il s'avère que la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis est active en tout cas jusqu'à 50°C. Il est à souligner que la FBPase chloroplastique d'Epinard est active après un traitement à la chaleur (62°C pendant 15 minutes ; Racker et Schroeder, 1958).

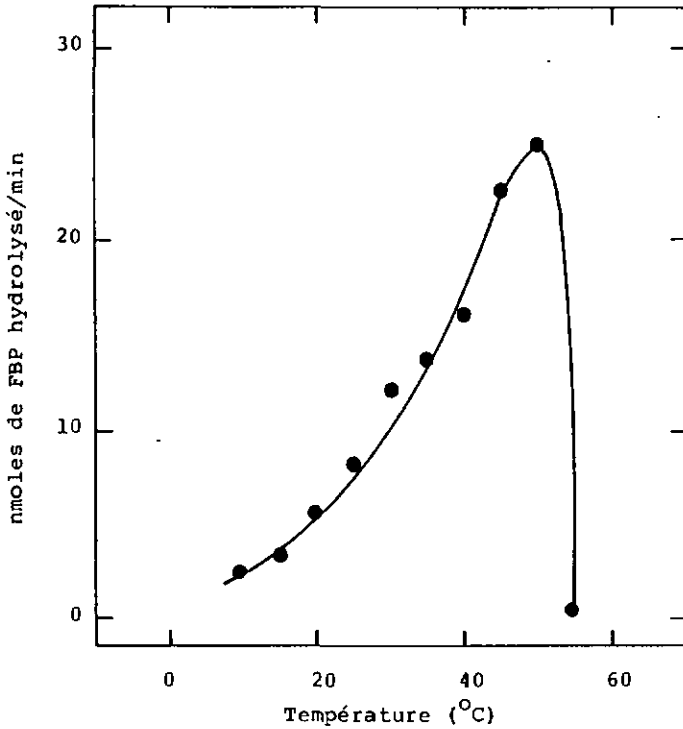


Fig.13. Influence de la température sur l'activité de la FBPase. Pour chaque réaction, 1.2 µg de FBPase hautement purifiée est introduit dans 0.98 ml de mélange réactionnel décrit au § 1.2.2.2, à l'exception du pH (8.5) et des concentrations de magnésium (16 mM) et de substrat (0.38 mM) ; la réaction est enregistrée à la température indiquée

1.3.5. Poids moléculaires de l'enzyme et de sa sous-unité

Le poids moléculaire de la FBPase est estimé par filtration sur gel (cf. § 1.2.5.1). Le résultat présenté à la figure 14 provient de la dernière expérience de détermination du PM de l'enzyme sur colonne Sephacryl S-300. Les protéines standard utilisées sont la carboxylase ($M_r = 550'000$), la catalase (232'000), la lactate déshydrogénase (LDH, 140'000), la sérum-albumine de boeuf (BSA) dimère (134'000) et monomère (67'000), la désoxyribonucléase I (DNase, 31'000) et le cytochrome c (Cyt. c, 12'500). La partie B de la figure représente l'enregistrement de l'absorbance de l'éluat à 280 nm. Le poids moléculaire de la FBPase est estimé graphiquement : la carboxylase, la catalase, la LDH et la DNase sont sur la droite, contrairement au BSA et au cytochrome c. Il en résulte que, dans cette expérience, le poids moléculaire de la FBPase s'élève à 210'000. En tenant compte des résultats obtenus lors d'autres expériences d'estimation de PM sur colonne, il s'avère que le poids moléculaire de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis est situé dans la gamme de poids moléculaires 190-210'000. La technique d'électrophorèse sur gel, gradient d'acrylamide (cf. § 1.2.5.2) confirme ce résultat.

Le poids moléculaire de la sous-unité de la FBPase est estimé par électrophorèse sur gel dénaturant SDS-9 % d'acrylamide (cf. § 1.2.5.3). La FBPase est appliquée sur le gel à la fin de sa purification, après la filtration sur gel Sephacryl S-200 (10.5 μ g de protéine ; Fig.15A, canal 2). La sous-unité apparaît dans la bande de R_f 0.56-0.58. En effet, la FBPase n'a qu'un seul type de sous-unité, car il s'est avéré que, après un gel bidimensionnel (isoelectric focusing - SDS), la FBPase ne donne qu'une seule bande ! Les protéines standard utilisées sont les suivantes (Fig.15A, canal 1) : la sérum-albumine de boeuf (BSA, 67'000), la catalase (Cat., 60'000), l'ovalbumine (Ov., 43'000), la désoxyribonucléase I (DNase, 31'000), le chymotrypsinogène (Chym., 25'700), la trypsine (Tryp., 23'300), la ribonucléase (RNase, 13'700) et le cytochrome c (Cyt. c, 12'500). Le poids moléculaire de la sous-unité de la FBPase est déterminé

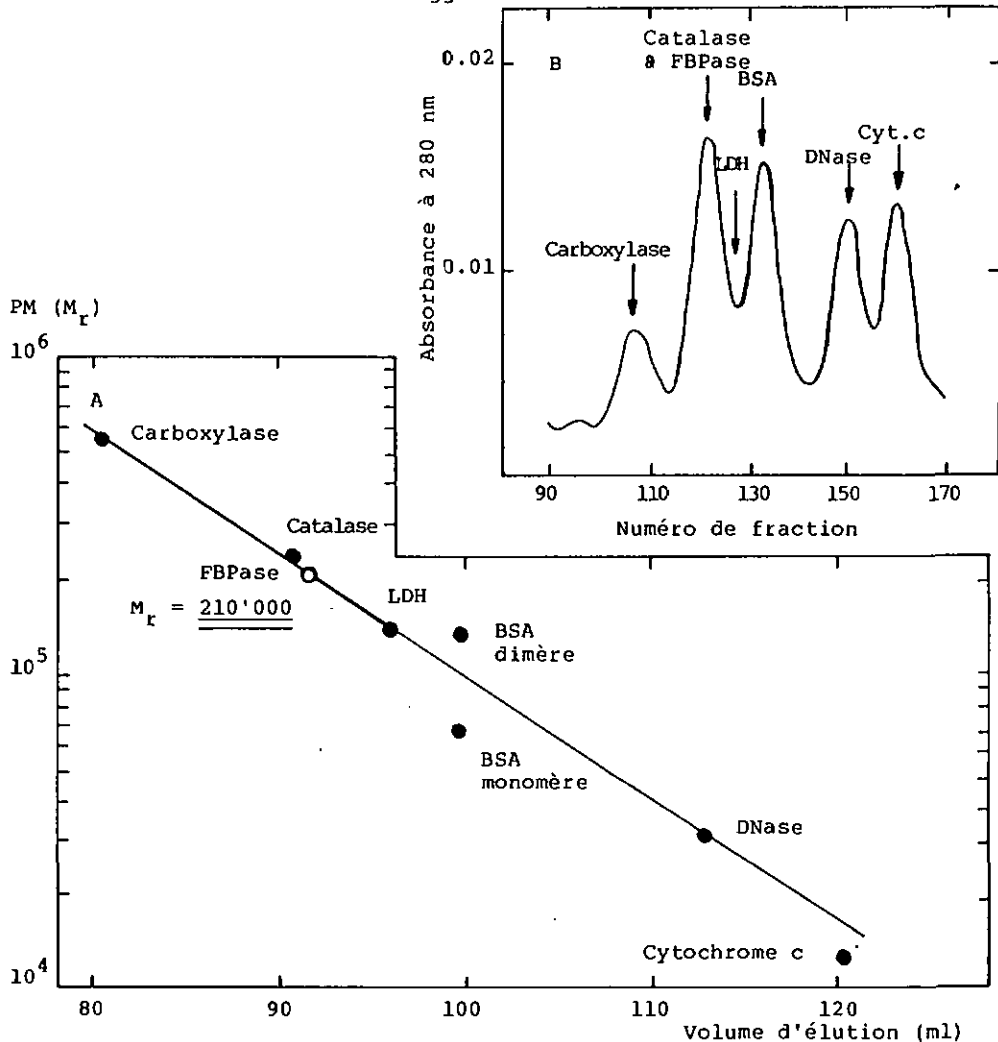


Fig.14. Détermination du PM de la FBPase par filtration sur gel de Sephacryl S-300 (1.5 x 84 cm). (A) Environ 1.5 ml d'échantillon, contenant les protéines standard et la FBPase chloroplastique d'Euglène, est appliqué sur la colonne Sephacryl S-300, équilibrée avec 30 mM Tris-HCl pH 7.3 + 200 mM NaCl + 14 mM MET et éluée avec le même tampon. (B) La position des protéines standard est déterminée d'après l'enregistrement de l'absorbance de l'éluat à 280 nm (—), à l'exception de la lactate déshydrogénase. Sa position et celle de la FBPase sont déterminées enzymatiquement

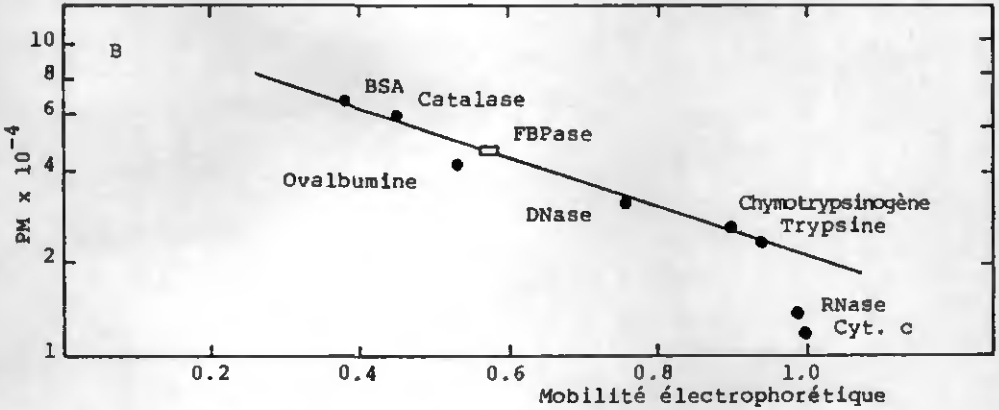
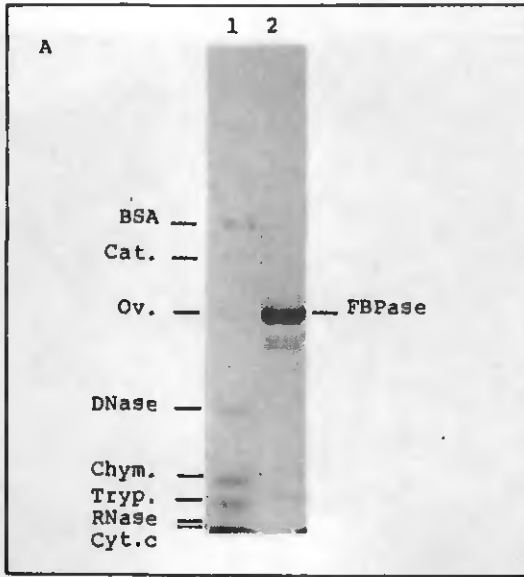


Fig.15. Détermination du PM de la sous-unité de la FBPase par électrophorèse sur gel dénaturant SDS-9 % d'acrylamide. (A) La FBPase est appliquée sur le gel à la fin de la purification, après la filtration sur gel Sephacryl S-200 (10.5 µg de protéine ; canal 2). Les protéines standard utilisées sont les suivantes (canal 1) : la sérum-albumine de boeuf, la catalase, l'ovalbumine, la désoxyribonucléase I, le chymotrypsinogène, la trypsine, la ribonucléase et le cytochrome c. (B) Le poids moléculaire de la sous-unité de la FBPase est déterminé graphiquement

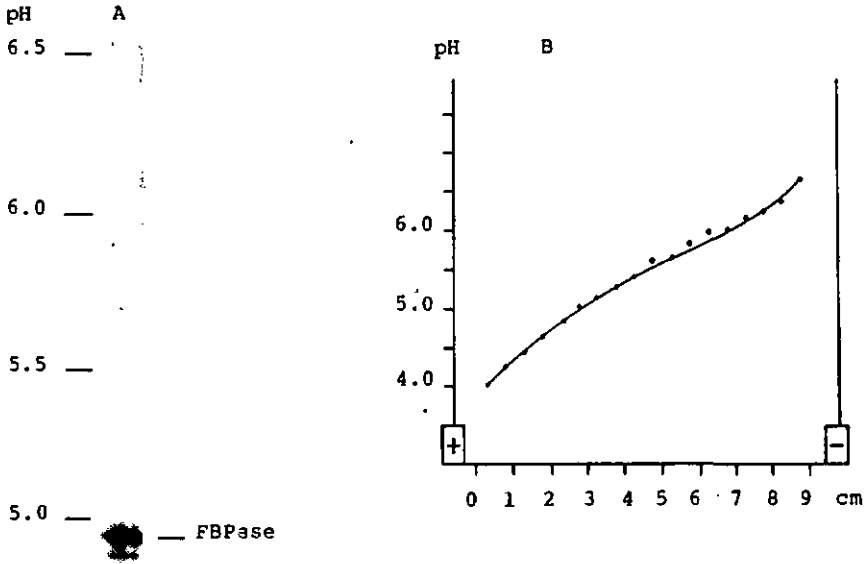
graphiquement (Fig.15B) en utilisant le BSA, la catalase, la DNase, le chymotrypsinogène et la trypsine qui sont disposés sur une droite ; le PM de la sous-unité est donc compris entre 45 et 47'000. Comme d'autres expériences de détermination de PM sur gel ont été effectuées, il en résulte que le PM de la sous-unité de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis se situe dans la gamme de poids moléculaires 45-51'000. Or, comme le PM de l'enzyme native est de 190-210'000, il s'avère que la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis est constituée de quatre sous-unités.

1.3.6. Point isoélectrique de la FBPase

Le point isoélectrique (pI) de la FBPase est déterminé par focalisation isoélectrique des protéines sur un gel de polyacrylamide, contenant un gradient d'ampholytes (cf. § 1.2.6). La FBPase est appliquée sur le gel à la fin de la purification, après la filtration sur gel Sephacryl S-200 (10.5 µg de protéine ; Fig.16A). Le gradient de pH s'étend de 4 à 6.5 (Fig.16B). Dans cette expérience, le pI de la FBPase est donc égal à 4.9. Il est à remarquer que ce gel confirme le très haut degré de pureté de l'enzyme puisqu'il n'y a sur le gel qu'une seule bande protéinique qui l'accompagne (résultat similaire au gel natif, cf.§ 1.3.1.8). D'autres expériences de détermination de pI ayant été réalisées, il s'avère que le point isoélectrique de la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis est de 4.9-5.0.

1.3.7. Comparaison de quelques propriétés de la FBPase d'Euglena gracilis avec celles de la FBPase d'Epinard

Dans le tableau II, quelques propriétés moléculaires de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis sont comparées avec celles correspondantes de la FBPase d'Epinard, obtenues dans notre laboratoire (Affolter et al.,1981). Le poids moléculaire de l'enzyme d'Epinard est, suivant les auteurs, de 145'000 (Buchanan et al.,1971) ou 160'000 (Zimmermann et al.,1976; Soulié,1981). Le PM de la sous-unité varie également : 40'000 (Zimmermann et al.,



Temps min	Tension V	Courant mA	Puissance W
Début 0	400	15	4
45	1000	4.8	4
65	750	6	4
125	1050	4.3	4
Fin 220	1200	3.9	4

Données de la focalisation isoélectrique

Fig.16. Détermination du pI de la FBPase. (A) L'enzyme est appliquée sur le gel LKB à la fin de la purification, après la filtration sur gel Sephacryl S-200 (10.5 µg de protéine). (B) Le gradient de pH s'étend de 4 à 6.5. Solution d'électrode à l'anode : 0.1 M acide glutamique dans 0.5 M H₃PO₄ ; solution d'électrode à la cathode : 0.1 M β-alanine. Circuit de refroidissement et mesure du pH à 8°C

TABLEAU II

Quelques caractéristiques moléculaires de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis et de celle d'Epinard

Propriété moléculaire	FBPase chloroplastique	
	<u>Euglena gracilis</u>	Epinard
Poids moléculaire de l'enzyme native	190-210'000	145'000 ^{a)} 160'000 ^{b)}
Poids moléculaire de la sous-unité	45-51'000	46'000 ^{c)} 40'000 ^{b)}
Point isoélectrique	4.9-5.0	4.9-5.1 ^{c)}

a) d'après Buchanan, Schürmann et Kalberer (1971)

b) d'après - Zimmermann, Kelly et Latzko (1976)

- Soulié (1981)

c) enzyme purifiée selon Schürmann et Wolosiuk (1978)

1976; Soulié, 1981) ou 46'000 (enzyme purifiée selon Schürmann et Wolosiuk, 1978). De ces valeurs, il a été établi que la FBPase chloroplastique d'Epinard possède 4 sous-unités identiques (Baier et Latzko, 1975; Zimmermann et al., 1976; Soulié, 1981). Nous avons vu qu'il en va aussi de même pour la FBPase d'Euglena gracilis. L'enzyme d'Epinard présente un point isoélectrique comparable à celui de l'enzyme d'Euglène, puisqu'il se situe dans la gamme de pH 4.9-5.1. De la comparaison de ces valeurs, il en résulte que les deux enzymes, concernant leurs propriétés moléculaires, ne sont pas fondamentalement différentes.

1.4. CONCLUSION

La fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis est isolée par les étapes suivantes : précipitations à l'acide et au sulfate d'ammonium, chromatographies sur DEAE-cellulose et hydroxyapatite, chromatofocusing et filtration sur gel de Sephacryl. Elle est ainsi obtenue à l'état pur. Les conditions optimales pour tester son activité sont les suivantes : pH 8.4, 0.1 mM EDTA, 20 mM de magnésium et 1 mM de fructose 1,6-bisphosphate. La courbe sigmoïde de l'activité de la FBPase, dépendant du temps, est un indice pour dire qu'il s'agit d'une enzyme de régulation. D'autre part, la FBPase est relativement thermostable, puisqu'elle est encore active à 50°C. Le poids moléculaire de l'enzyme est estimé autour de 200'000, tandis que la sous-unité présente un PM d'environ 50'000 : la FBPase est ainsi formée de 4 sous-unités identiques. Quant à son point isoélectrique, il se situe vers 5.0, pH où l'enzyme reste en solution.

Chapitre 2. ACTIVATION DE LA FBPase PAR LA LUMIERE IN VIVO

2.1. INTRODUCTION

Depuis les travaux de Pedersen, Kirk et Bassham (1966), nous savons que plusieurs enzymes chloroplastiques sont activées par la lumière *in vivo*. Parmi celles-ci, la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Épinard est activée par un mécanisme de régulation enzymatique, dépendant de la lumière (Fig.17). Dans ce mécanisme, interviennent la ferrédoxine réduite (Buchanan et al.,1967), qui fonctionne comme accepteur dans le système transporteur d'électrons de la photosynthèse, ainsi que deux facteurs protéiques (Schürmann et al.,1976), qui furent identifiés par la suite et désignés par les termes de ferrédoxine-thiorédoxine réductase et thiorédoxine (Wolosiuk et Buchanan, 1977). Une partie de la ferrédoxine réduite, détournée de la synthèse du NADPH, va réduire la thiorédoxine. Cette réaction est catalysée par la ferrédoxine-thiorédoxine réductase. La thiorédoxine peut réduire à son tour la FBPase. Cette réduction entraîne un changement de conformation dans la molécule de l'enzyme par rupture de ponts disulfures. En effet, la lumière provoque dans le stroma une augmentation de 1-3 mM dans la concentration du magnésium (Portis et Heldt,1976) et fournit ainsi, avec une augmentation de pH d'environ 1 unité pour atteindre pH 8 à la lumière (Werdan et al.,1975), l'environnement nécessaire pour une activité optimale de l'enzyme.

Il a été démontré que ce mécanisme d'activation, dépendant de la lumière (système ferrédoxine-thiorédoxine), active dans les Végétaux supérieurs, en plus de la FBPase, d'autres enzymes chloroplastiques (Fig.18) : la sédoheptulose 1,7-bisphosphatase (Schürmann et Buchanan,1975; Breazeale et al.,197B), la ribulose 5-phosphate kinase (Wolosiuk et Buchanan,197Ba), la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase à NADP (Wolosiuk et Buchanan,1978b), appartenant toutes les trois également au cycle réductif des pentoses phosphates, la malate déshydrogénase à NADP

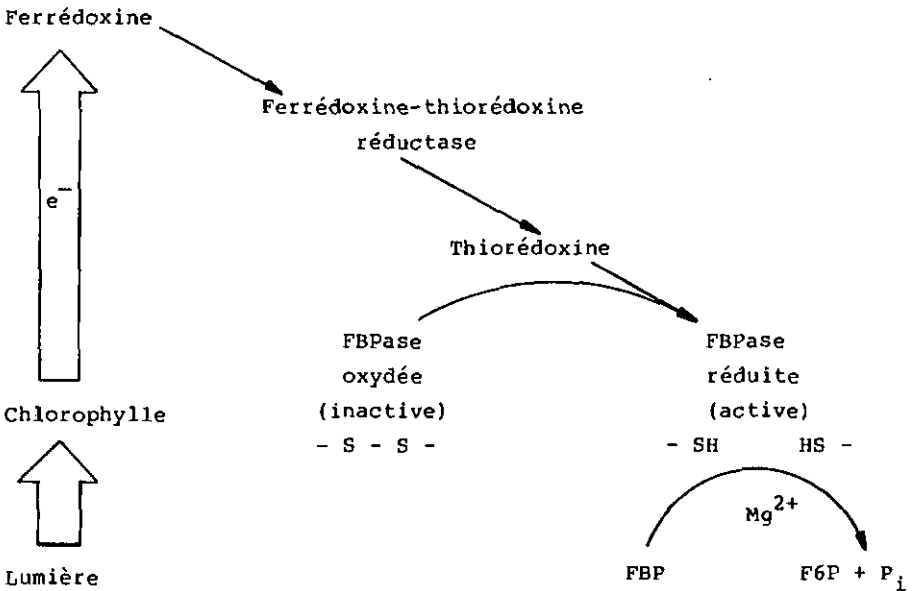


Fig.17. Mécanisme de la régulation in vivo de la FBPase chloroplastique d'Epineard : système ferrédoxine-thiorédoxine

(ne faisant pas partie du cycle de Calvin ; Wolosiuk et al., 1977), la phénylalanine ammoniacale lyase (enzyme du métabolisme secondaire ; Nishizawa et al., 1979) et l'adénosine triphosphatase (activation de l'activité ATPasique du facteur de couplage ; Mills et al., 1980).

Récemment, un autre modèle d'activation d'enzymes chloroplastiques par la lumière a été proposé : il s'agit du système ferral térine (Lara et al., 1980a; Lara et al., 1980b). Il s'avère que la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Epineard, activée par le système ferrédoxine-thiorédoxine, l'est également par le système ferral térine : la ferrédoxine, la ferrédoxine-thiorédoxine réductase et la thiorédoxine sont alors remplacées par un nouveau facteur protéique, réduit directement par

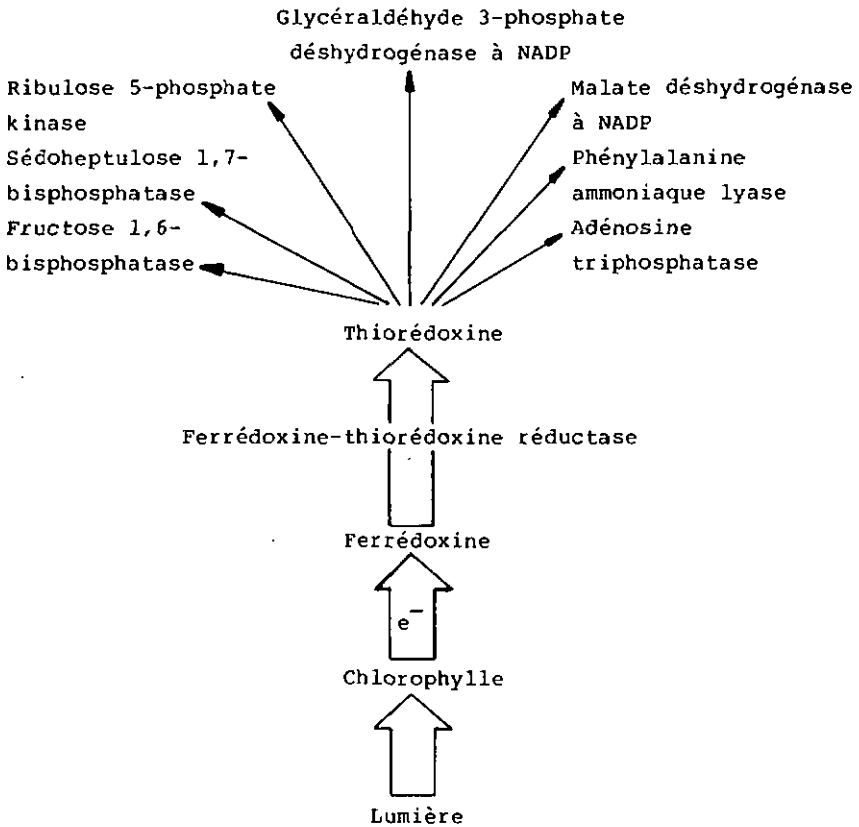


Fig.18. Enzymes chloroplastiques activées par le système ferrédoxine-thiorédoxine
D'après Buchanan et al. (1979)

un élément du photosystème I, en amont de la ferrédoxine. Du fait de sa ressemblance chimique et fonctionnelle à la ferrédoxine, ce facteur protéique a été désigné du nom de ferraltérine (protéine alternante, contenant du fer).

Il faut signaler l'existence d'un troisième mode d'activation enzymatique par la lumière : le système LEM (Light Effect Mediator) présenté par Louise Anderson (Anderson et Avron, 1976; Anderson et al., 1978). Ce système se caractérise par rapport aux deux autres par la présence d'un facteur protéique lié à la membrane thylakoïdale. Il est accompagné d'un facteur stromatique soluble (Anderson et al., 1981).

2.2. MATERIEL ET METHODES

2.2.1. Culture et récolte des cellules

Euglena gracilis, souche Z, se développe sous conditions mixotrophes dans une solution nutritive, le milieu modifié de Hutner (Ortiz et al., 1980) déficient en vitamine B 12 (50 ng/l). En diminuant la concentration de vitamine B 12 dans le milieu de culture, les cellules ainsi obtenues peuvent facilement se transformer en sphéroplastes (Tokunaga et al., 1976), probablement parce que leur volume augmente considérablement sous ces conditions de culture (Carell, 1969). C'est à partir de ces sphéroplastes que des chloroplastes intacts peuvent facilement être isolés (Shigeoka et al., 1980; cf. § suivant). 5 ml de préculture d'Euglène sont ajoutés en phase exponentielle de culture par litre de milieu nutritif (entre 1 et 1.7 litre suivant les besoins). Pour la culture, la température se situe entre 22 et 25°C pendant 4 à 5 jours. La récolte s'effectue lors de la phase exponentielle par centrifugation à 100 x g pendant 3 minutes pour éliminer le milieu de culture.

2.2.2. Obtention de chloroplastes intacts d'Euglène

Après la récolte, les cellules sont lavées (3 min, 100 x g) avec 50 mM K-phosphate pH 7.0 + 0.38 M sorbitol (tampon A)

et pesées. 6 g de cellules (poids frais) sont repris dans 10 ml de tampon A et incubés avec 50 mg de trypsine (trypsine de pancréas de boeuf, type III, de chez Sigma) pendant environ une heure à la chambre froide (env. 4°C). La trypsinisation rend la paroi cellulaire sensible (Kirk, 1964), les cellules deviennent sphériques (sphéroplastes). Après ce temps, le contrôle de la trypsinisation se fait au microscope à contraste de phase (pour effectivement observer si les cellules deviennent sphériques). La digestion est arrêtée par dilution de la trypsine en ajoutant 3 volumes du tampon A et centrifugation (3 min, 100 x g) pour éliminer la trypsine (lavage). Les cellules sont resuspendues dans une solution-tampon isotonique (25 mM Hepes-NaOH pH 7.4 + 0.33 M sorbitol + 0.5 mM EDTA-Na₂), brisées avec un broyeur à vitesse minimale pendant 5 secondes, puis centrifugées (1 min, 100 x g) pour éliminer les cellules entières et les débris cellulaires. Le surnageant est recentrifugé (5 min, 1'000 x g) pour sédimenter les chloroplastes : on obtient un culot brut de chloroplastes. Le culot est resuspendu avec 5 mM Hepes-NaOH pH 6.8 + 0.15 M sorbitol + 0.15 M saccharose + 1 % Ficoll + polyvinyl-sulfonate (2 µg/ml) + 15 mM NaCl (tampon B), en évitant de prendre le paramylon et les éventuelles cellules entières. Les chloroplastes sont déposés sur un gradient de Percoll de 10 à 80 % (tampon B + Percoll + polyéthylèneglycol 6000 + sérum-albumine de boeuf + quelques cristaux de glutathion réduit), reposant sur un coussin de Percoll de 80 %, et centrifugés (15 min, 6'000 x g) : les chloroplastes vont aller se mettre à leur densité. Ils sont récoltés par aspiration à l'aide d'une pipette (munie d'une propipette) et introduits dans des tubes à centrifuger ; 2 à 3 volumes du tampon B sont ajoutés. Après centrifugation (5 min, 3'000 x g), les chloroplastes vont se trouver sédimentés au fond du tube de centrifugation et sont lavés avec le tampon B (25-30 ml) pour éliminer le résidu de Percoll, en centrifugeant 3 min à 1'000 x g. Finalement la suspension chloroplastique est ajustée, après dosage de la chlorophylle, à 0.5 mg de chlorophylle par ml dans le tampon 50 mM tricine-KOH pH 8.4 + 0.33 M sorbitol. Les chloroplastes sont gardés à l'obscurité (papier d'aluminium autour de l'éprouvette contenant les chloroplastes) dans la glace.

2.2.2.1. Détermination de la concentration de chlorophylle

La concentration de la chlorophylle est déterminée selon la méthode d'Arnon (1949) :

- 10 ml d'acétone à 80 % + 50 μ l de chloroplastes
- filtrer puis lire l'absorbance à 652 nm
- concentration C (mg / ml de suspension chloroplastique) = $A_{652} \times 5.8$

2.2.3. Dispositif expérimental et détermination de l'activité enzymatique

Pour réaliser l'activation de la FBPase chloroplastique par la lumière in vivo, une aliquote de la suspension chloroplastique est introduite dans une cuvette spectrophotométrique de 2 mm d'épaisseur, qui est maintenue à 25°C. Les chloroplastes sont alors éclairés par une lumière rouge saturante (filtre rouge Schott RG 630 et filtre antichaleur Calflex Balzers).

A différents intervalles, 50 μ l de la suspension chloroplastique sont introduits dans une cuvette spectrophotométrique semi-micro, contenant 0.52 ml d'eau pour casser les chloroplastes par choc osmotique. Après avoir été rapidement mélangé, le volume dans la cuvette est complété à 1 ml en ajoutant 0.43 ml de mélange réactionnel contenant (en μ moles) Tris-HCl pH 7.9, 100 ; EDTA-Na, 0.1 ; $MgSO_4$, 20 ; NADP, 0.3 ; FBP- Na_3 , 1 ; glucosephosphate isomérise, 1.75 unité ; glucose 6-phosphate déshydrogénase, 0.70 unité. La réaction FBPasique est enregistrée immédiatement en suivant le changement d'absorbance à 340 nm (1 cm de chemin lumineux), dans un spectrophotomètre Perkin-Elmer modèle 555. Le résultat est donné en nmoles de FBP hydrolysé par min et par mg chl.

D'autre part, des chloroplastes sont incubés 5 minutes à l'obscurité en présence de 10 mM DTT à pH 7.9. Ils sont cassés dans l'eau et la FBPase est immédiatement testée comme décrit ci-dessus.

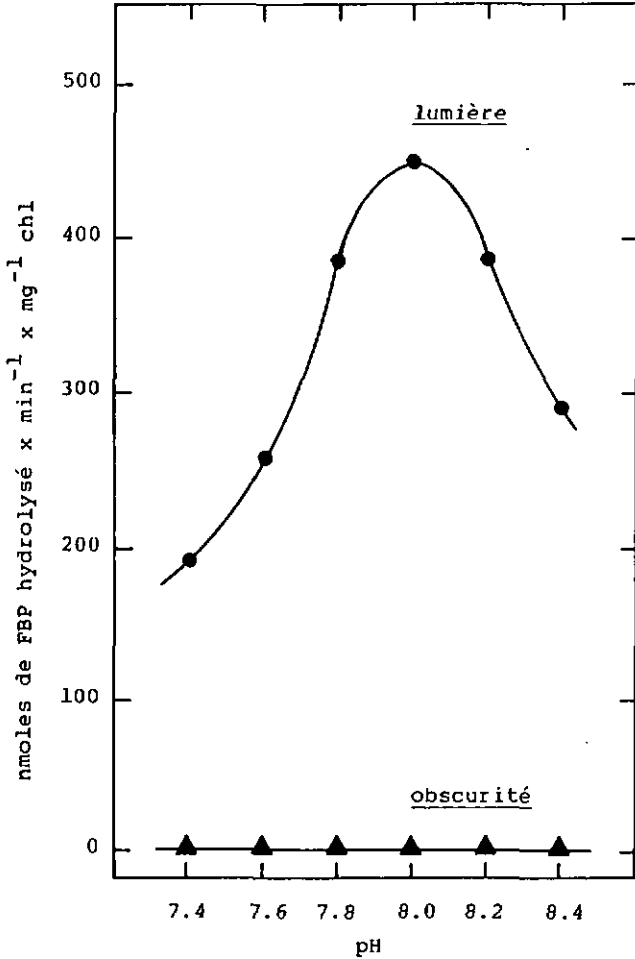


Fig.19. Activation de la FBPase par la lumière, mesurée à différents pH. Pour chaque pH choisi, une aliquote de la suspension chloroplastique est prélevée, l'activité enzymatique est testée avant d'éclairer les chloroplastes et après 5 minutes de lumière (avec 20 mM de magnésium dans le mélange réactionnel décrit au § 2.2.3). Les valeurs à pH 8.4 proviennent d'une autre expérience

2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

2.3.1. Activation de la FBPase par la lumière dans des chloroplastes intacts

Les chloroplastes d'Euglène qui sont utilisés pour mettre en évidence l'activation par la lumière de la FBPase chloroplastique sont intacts à plus de 95 % et photosynthétiquement actifs (Affolter et al., 1980).

D'abord il est intéressant de savoir à quel pH il faut tester la FBPase pour obtenir une activité optimale (Fig.19) : pour chaque pH choisi (7.4 à 8.4), une aliquote de la suspension chloroplastique est prélevée, l'activité enzymatique est testée avant d'éclairer les chloroplastes et après 5 min de lumière. Il s'avère qu'à l'obscurité la FBPase ne présente aucune activité, tandis qu'après le temps d'éclairement c'est vers pH 8 qu'elle atteint son activité optimale ; d'ailleurs 8 est la valeur du pH du stroma des chloroplastes intacts d'Epinard à la lumière (Werdan et al., 1975). Dorénavant, la FBPase activée par la lumière est testée à pH 7.9.

Il est maintenant intéressant d'étudier l'activation de la FBPase par la lumière au cours du temps, de voir ce qui se passe quand la lumière est coupée et quand elle est rétablie (activation-désactivation-réactivation, Fig.20) : l'activité enzymatique augmente rapidement, allant de 25 (temps zéro, donc à l'obscurité) à 418 nmoles de FBP hydrolysé $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ chl pendant la première minute, et atteignant le maximum (630 nmoles de FBP hydrolysé $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ chl) après 5 min d'illumination. L'activité reste d'ailleurs à son maximum et ne change pas de manière significative avec des temps d'éclairement plus longs (Fig.21), puis diminue lentement quand la lumière est éteinte ($T_{\frac{1}{2}} = 30$ min). Après réillumination d'une minute, l'activité augmente rapidement pour atteindre l'ancienne valeur. En ce qui concerne la valeur du $T_{\frac{1}{2}}$ de désactivation pour la FBPase chloroplastique d'Epinard, elle varie suivant les auteurs : de 2.4 minutes (Leegood et Walker, 1980; Laing et al., 1981) jusqu'à 30 minutes (Kelly et al., 1976).

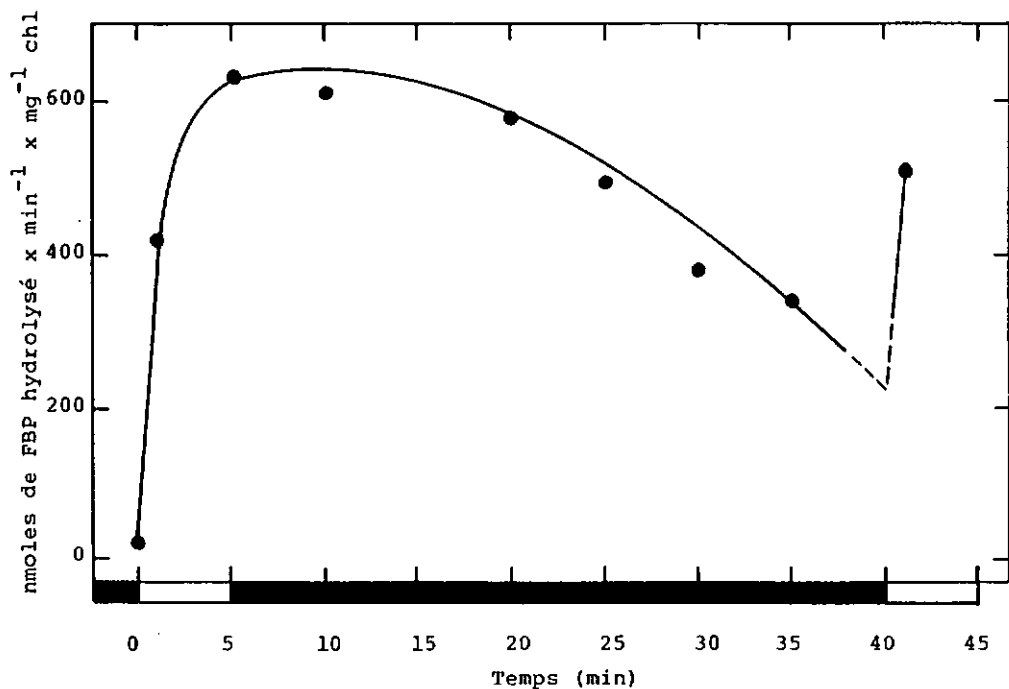


Fig.20. Activation de la FBPase par la lumière dans des chloroplastes intacts d'Euglène : activation-désactivation-réactivation. L'intensité lumineuse est de 30'000 lux. Les autres conditions expérimentales sont décrites au § 2.2.3. Les zones noires sur l'abscisse représentent les temps d'obscurité

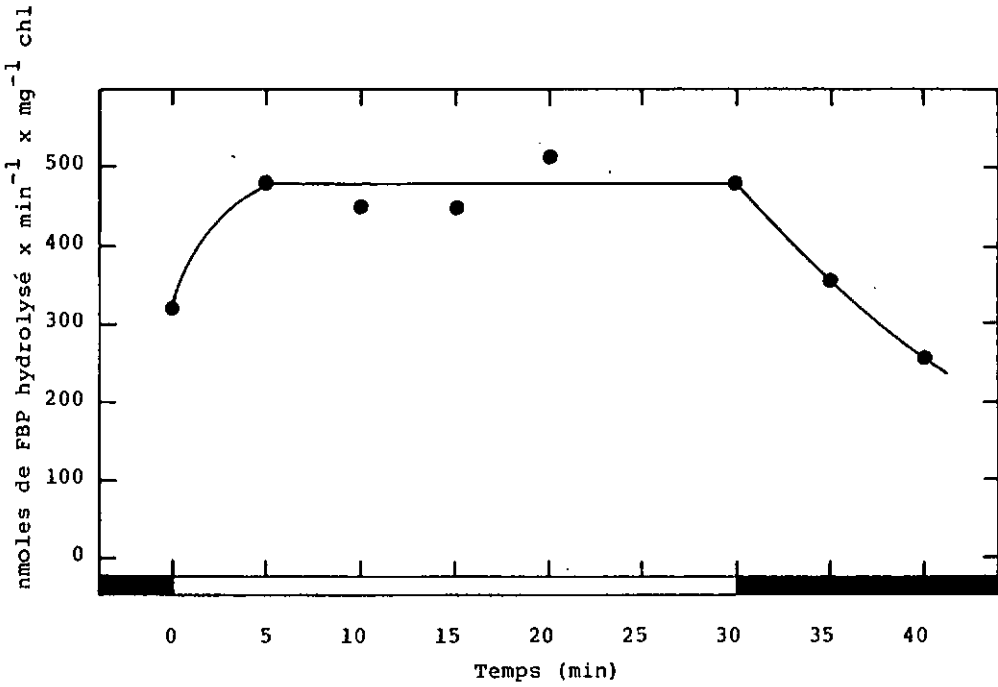


Fig.21. Activation par la lumière et désactivation de la FBPase dans des chloroplastes intacts d'Euglène au cours du temps. Les conditions expérimentales sont décrites au § 2.2.3. Les zones noires sur l'abscisse représentent les temps d'obscurité

D'autre part, quand les chloroplastes sont incubés à l'obscurité pendant 5 min en présence de 10 mM DTT à pH 7.9, on observe des activités FBPasiques correspondant à 70-80 % des valeurs obtenues pendant l'activation à la lumière (Fig.22).

Une grande demande pour le magnésium est observée dans le mélange réactionnel pour la FBPase activée par la lumière ou par le dithiothreitol dans les chloroplastes (Fig.22). L'activité de la FBPase, activée par la lumière dans les chloroplastes et testée en fonction de la concentration de magnésium, augmente avec cette concentration pour atteindre un optimum à 20 mM. La vitesse de réaction de l'enzyme reste constante en présence de 10-30 mM Mg^{2+} , tandis qu'à 3 mM, bien que la vitesse de réaction initiale présentée par l'enzyme activée corresponde à 55 % du maximum atteint avec 20 mM, elle diminue rapidement pour atteindre presque zéro en 2 minutes ; à 5 mM Mg^{2+} , le même phénomène est observé : l'enzyme perd son activité après 7 à 8 minutes dans la cuvette spectrophotométrique. A la vue de ces résultats, il semble donc que le magnésium puisse jouer un important rôle en stabilisant la FBPase activée, bien que l'activation de la FBPase par la lumière dans les chloroplastes semble être indépendante du magnésium, comme c'est le cas pour le système purifié chez l'Epinard (Schürmann et Jacquot, 1979). La FBPase, qui est testée dans des chloroplastes restés à l'obscurité, ne montre pas d'activité à pH 7.9, même avec 20 mM Mg^{2+} (Fig.22).

Les conditions requises pour la FBPase activée par la lumière, dans le mélange réactionnel, sont les suivantes (Tableau III) : le substrat et le magnésium sont absolument indispensables à l'activité de la FBPase, tandis que l'EDTA joue un rôle moins important que le magnésium. La valeur obtenue pour le mélange complet est relativement basse, ceci s'explique du fait que l'expérience en question a été réalisée le lendemain d'une isolation de chloroplastes, qui étaient donc moins actifs !

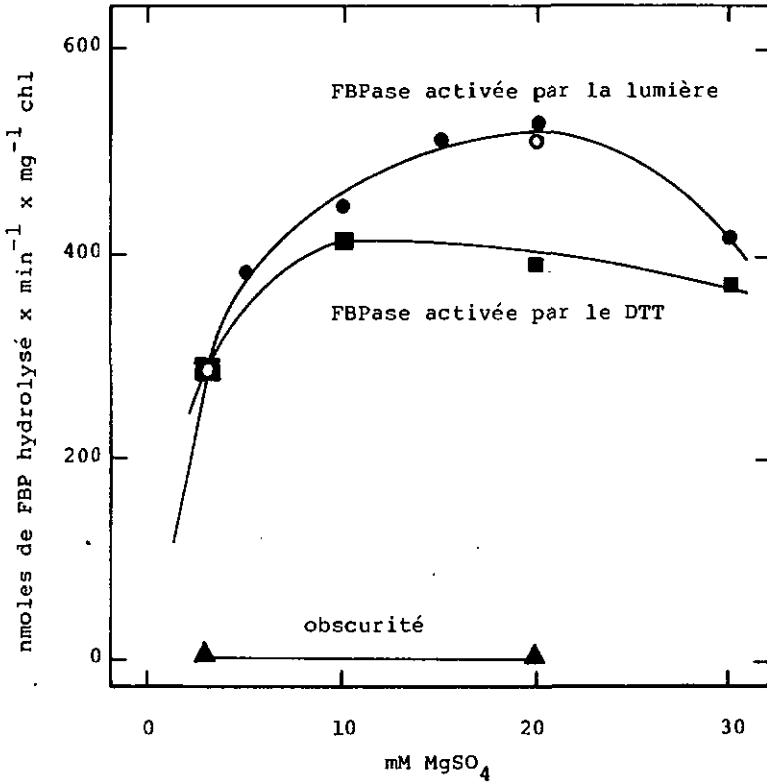


Fig.22. Besoin en magnésium de la FBPase activée par la lumière ou le DTT dans des chloroplastes intacts d'Euglène. L'intensité lumineuse pour l'activation par la lumière (5 min) est de 60'000 lux. Les autres conditions expérimentales sont décrites au § 2.2.3, à l'exception de la concentration de magnésium dans le mélange réactionnel. ● et ○ représentent deux expériences différentes

TABLEAU III

Conditions requises pour la FBPase activée par la lumière, dans le mélange réactionnel

Condition d'activation	Condition de réaction	Activité enzymatique (nmoles de FBP hydrolysé x min ⁻¹ x mg ⁻¹ chl)
obscurité	mélange complet	0
lumière (5 min)	mélange complet	79
"	sans FBP	0
"	sans Mg ²⁺	0
"	sans EDTA	18

Le dispositif expérimental et la détermination de l'activité enzymatique sont décrits au §

2.2.3

2.4. CONCLUSION

La FBpase alcaline dans les chloroplastes d'Euglena gracilis peut être activée par la lumière. L'éclairement peut être remplacé par le DTT. L'enzyme activée d'Euglène est instable, si la concentration de magnésium dans le mélange réactionnel n'est pas située entre 10 et 20 mM.

Chapitre 3. REGULATION DE LA FBPase IN VITRO ET PURIFICATION PARTIELLE DE THIOREDIXINES

3.1. INTRODUCTION

Une thiorédoxine a été mise en évidence pour la première fois dans la synthèse enzymatique des désoxyribonucléotides (dans le cadre de la biosynthèse du DNA) chez Escherichia coli (Laurent et al., 1964) : les désoxyribonucléotides sont formés par réduction des ribonucléotides correspondants. Cette réduction, qui porte au niveau du carbone 2' du ribose, a lieu au stade des ribonucléosides 5'-diphosphates, avec l'aide précisément de cette thiorédoxine, comportant deux groupements thiols, et d'une enzyme, la ribonucléoside diphosphate réductase (Fig.23). La thiorédoxine se trouve ainsi oxydée, puis est à nouveau réduite aux dépens du NADPH en présence d'une autre enzyme, la thiorédoxine réductase. La fonction biologique de la thiorédoxine dépend donc de l'oxydo-réduction cyclique des deux groupements thiols de la protéine (disparition-apparition d'un pont disulfure). C'est ainsi que cette protéine a été désignée sous le nom de thiorédoxine (Laurent et al., 1964).

La thiorédoxine d'E. coli a été fort bien étudiée. En effet, on connaît sa structure primaire (Holmgren, 1968) : la molécule contient 108 résidus formant une chaîne polypeptidique unique, d'un poids moléculaire de 11'657, calculé d'après la séquence des acides aminés. Le groupement fonctionnel de la protéine se situe à la position 32-35 ; il est constitué d'un pont disulfure, formé de deux résidus demi-cystine, séparés par un résidu glycine et un résidu proline (- Trp - Cys - Gly - Pro - Cys - Lys -). Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Holmgren et al., 1975). D'autre part, la thiorédoxine d'E. coli (et la thiorédoxine en général) possède une propriété typique : elle est stable à la chaleur ! Elle peut être chauffée pendant des heures à 80°C sans aucun dommage apparent (Reutimann et al., 1981). Cette stabilité est

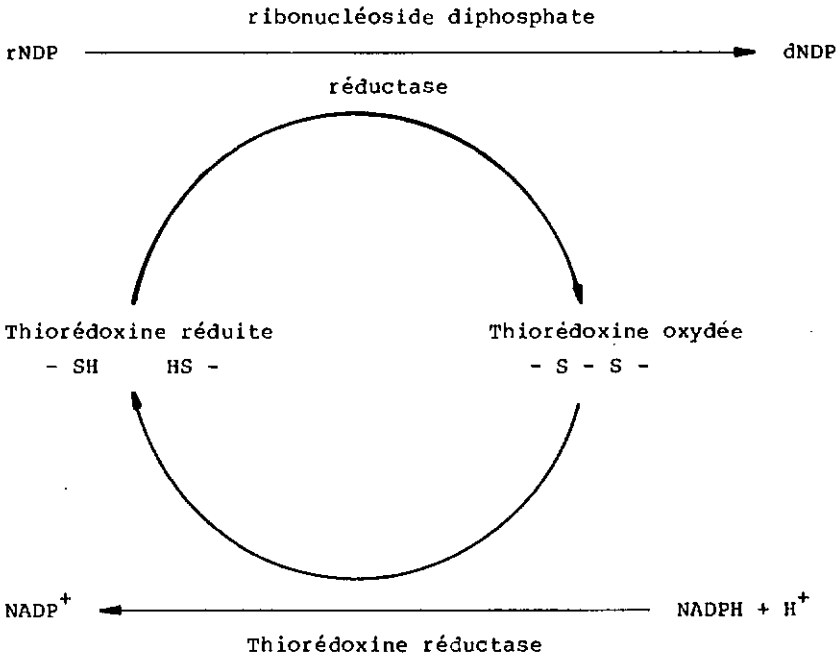


Fig.23. Système NADPH-thiorédoxine, permettant la réduction des ribonucléosides 5'-diphosphates (rNDP) en désoxyribonucléosides 5'-diphosphates (dNDP)

d'autant plus surprenante, si l'on considère qu'elle ne nécessite pas de ponts disulfures structuraux, mais qu'elle provient de forces intramoléculaires uniquement.

La thiorédoxine, intervenant dans le système NADPH-thiorédoxine, a ensuite été détectée dans la levure Saccharomyces cerevisiae (Porqué et al.,1970). Son poids moléculaire est de 12'600, calculé d'après la composition en acides aminés. Elle a aussi été mise en évidence chez les animaux, entre autres dans le foie de veau (Engström et al.,1974). Le poids moléculaire de

la thiorédoxine de foie de veau s'élève à 12'000, la protéine est constituée de 103 acides aminés. Si l'on compare la composition en acides aminés de cette thiorédoxine avec celle de la thiorédoxine d'E. coli, la différence la plus significative est la suivante : la thiorédoxine de foie de veau contient 4 résidus demi-cystine, alors que la thiorédoxine d'E. coli en comprend 2 (Laurent et al., 1964). Après oxydation in vitro de la forme réduite de la thiorédoxine de foie de veau, il s'avère que seulement 2 des 4 résidus demi-cystine forment un pont disulfure, doué d'une activité d'oxydo-réduction.

En 1975, le système NADPH-thiorédoxine est identifié chez Euglena gracilis (Munavalli et al., 1975). Une thiorédoxine réductase est isolée de même qu'une autre protéine (protéine I), présentant une activité comparable à une thiorédoxine et un poids moléculaire tout à fait inhabituel pour une thiorédoxine, puisqu'il s'élève à environ 240'000. Quelques années plus tard, une thiorédoxine est purifiée chez Scenedesmus obliquus (Wagner et Follmann, 1977). Elle intervient également dans la réduction des ribonucléotides, lors de la synthèse du DNA. Cette thiorédoxine présente un poids moléculaire de 12'600, estimé par filtration sur gel ; elle est stable à la chaleur.

Dans le mécanisme de la régulation in vitro de la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique de l'Épinard (Fig. 24), il s'est avéré que la protéine régulatrice d'assimilation b (ARP_b), qui agit sur l'enzyme en présence du dithiothreitol (Schürmann et al., 1976), est précisément une thiorédoxine (Wolosiuk et Buchanan, 1977) : en effet des préparations homogènes de thiorédoxine d'Escherichia coli purent remplacer l' ARP_b dans l'activation de la fructose bisphosphatase, soit activation photochimique avec la ferrédoxine et la protéine régulatrice d'assimilation a (ARP_a) réduites (cf. chap. 2), soit activation chimique en présence du dithiothreitol. Ces résultats suggèrent donc que la protéine régulatrice d'assimilation b est une thiorédoxine (Fig. 24) et que, sur la base de son aptitude à catalyser la réduction de l' ARP_b par la ferrédoxine réduite, la protéine régulatrice

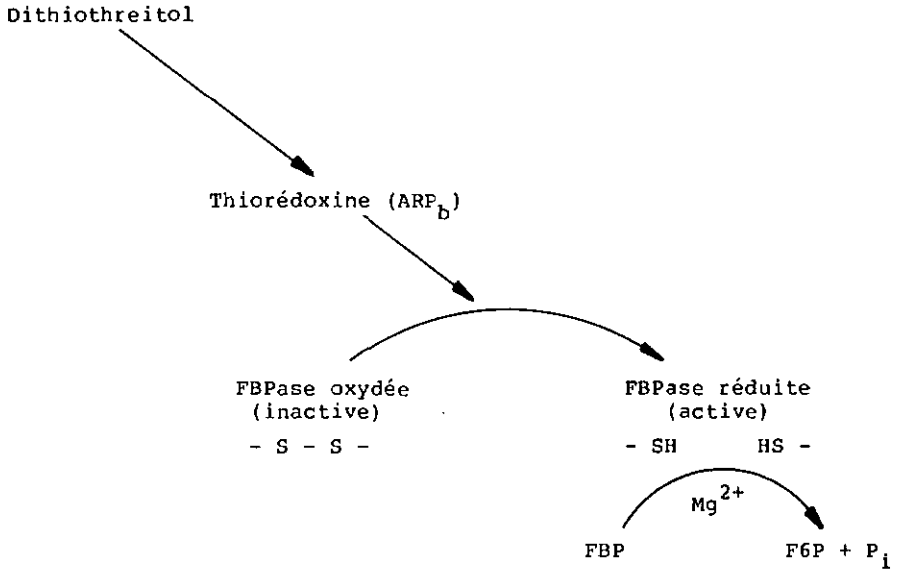


Fig.24. Mécanisme de la régulation in vitro de la FBPase chloroplastique d'Epinard : système DTT-thiorédoxine

d'assimilation a est appelée ferrédoxine-thiorédoxine réductase. Désormais le système mis en oeuvre pour activer entre autres la FBPase chloroplastique d'Epinard est appelé système ferrédoxine-thiorédoxine, par opposition au système NADPH-thiorédoxine qui intervient, comme nous l'avons vu, lors de la biosynthèse du DNA. D'ailleurs, dans les chloroplastes d'Epinard, il existe 3 thiorédoxines (Schürmann, 1981) : la thiorédoxine f, qui active la FBPase, et 2 thiorédoxines m (thiorédoxines mb et mc) qui agissent uniquement sur la malate déshydrogénase à NADP.

Puisque la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis est activée par la lumière (cf. chap. 2), il est justifié de chercher dans ces cellules un mécanisme de régulation comparable

à celui qui fut trouvé chez l'Épinard. Une première étape est la mise en évidence de thiorédoxines, capables d'activer la FBPase.

3.2. MATERIEL ET METHODES

3.2.1. Méthodes d'analyse enzymatique

3.2.1.1. Détermination de l'activité de la FBPase d'Euglena gracilis

Le mélange d'activation (50 μ l) contient Tris-HCl pH 7.9, 5 μ moles ; DTT, 0.25 μ mole ; l'extrait protéique activateur, jusqu'à 30 μ l ; la FBPase hautement purifiée, environ 10 μ g. Le temps d'activation est de 5 min à 25°C. Après ce laps de temps, le mélange d'activation est ajouté au mélange de réaction (0.95 ml) renfermant (en μ moles) Tris-HCl pH 7.9, 100 ; EDTA-Na, 0.1 ; MgSO₄, 2 ; NADP, 0.3 ; FBP-Na₃, 1 ; glucosephosphate isomérase, 1.75 unité ; glucose 6-phosphate déshydrogénase, 0.70 unité. La réaction enzymatique est immédiatement enregistrée en suivant le changement d'absorbance à 340 nm. Le résultat est exprimé en nmoles de FBP hydrolysé par minute.

3.2.1.2. Détermination de l'activité de la FBPase de l'Épinard

Le mélange d'activation (50 μ l) contient Tris-HCl pH 7.9, 5 μ moles ; DTT, 0.25 μ mole ; la thiorédoxine f pure d'Épinard, 4.4 μ g ; la FBPase pure d'Épinard, 10 μ g. Le temps d'activation est de 5 min à 25°C. Après cet intervalle de temps, le mélange d'activation est ajouté au mélange réactionnel (0.95 ml) identique à celui de la FBPase d'Euglène.

3.2.1.3. Détermination de l'activité de la MDH à NADP d'Épinard

La malate déshydrogénase catalyse la réaction suivante : oxaloacétate + NADPH \longrightarrow malate + NADP.

Le mélange d'activation (50 μ l) contient Tris-HCl pH 7.9, 5 μ moles ; DTT, 0.25 μ mole ; la thiorédoxine mb pure de

l'Epinard, 1.25 μg ; la malate déshydrogénase à NADP pure d'Epinard, 0.7 μg . Après un temps d'activation de 5 min à 25°C, une aliquote (5 μl) est ajoutée au mélange réactionnel (995 μl) renfermant (en μmoles) Tris-HCl pH 7.9, 100 ; oxaloacétate, 0.5 ; NADPH, 0.2. La réaction enzymatique est immédiatement enregistrée en suivant la décroissance de l'absorbance à 340 nm (oxydation du NADPH en NADP). Le résultat est exprimé en nmoles de malate formé/min, en tenant compte du volume total (50 μl) du mélange d'activation.

3.2.2. Dosage des protéines

Pour déterminer la concentration des protéines, c'est le microdosage qui est effectué (cf. § 1.2.3).

3.2.3. Electrophorèse sur gel dénaturant

Le type de gel dénaturant utilisé lors de la purification de thiorédoxines est le même que celui de la FBPase (cf. § 1.2.5.3), exceptés le pourcentage d'acrylamide du gel de concentration (6 % au lieu de 5) et celui du gel de séparation (15 %, pourcentage d'acrylamide identique à celui du gel de séparation pour le gel natif). Les protéines standard utilisées sont les suivantes : l'ovalbumine (43'000), la désoxyribonucléase I (31'000), le chymotrypsinogène (25'700), la trypsine (23'300), la ribonucléase (13'700) et le cytochrome c (12'500).

3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.1. Régulation de la FBPase in vitro

Puisque la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis est activée par la lumière (cf. chap. 2), il doit donc être possible de mettre en évidence le système DTT-thiorédoxine dans cette algue. Pour ce faire, l'activité de la FBPase est mesurée sous différentes conditions (pH et concentrations de magnésium) pour en trouver une où l'enzyme ne présente pas d'activité, sans être

TABLEAU IV

Activité de la FBPase en fonction de la concentration de magnésium

Condition de réaction	Activité enzymatique (nmoles de FBP hydrolysé/min)
pH 8.4, avec 20 mM Mg ²⁺	116
pH 7.9, " 20 mM "	114
" , " 5 mM "	100
" , " 2 mM "	4
" , " 1 mM "	0.16

La méthode spectrophotométrique (cf. § 1.2.2.2) est utilisée pour déterminer l'activité de l'enzyme

TABLEAU V

Conditions requises pour l'activation de la FBPase

Condition d'activation (pH 7.9, 5 min)	Activité enzymatique (nmoles de FBP hydrolysé/min)
mélange complet	60
sans dithiothreitol	3
sans l'extrait protéinique	6
sans la FBPase	0

La méthode d'analyse enzymatique utilisée pour déterminer l'activité de la FBPase est décrite au § 3.2.1.1

activée par le système DTT-thiorédoxine (Tableau IV) : l'enzyme est d'abord testée à pH 8.4 avec 20 mM Mg^{2+} (conditions standard, cf. chap. 1), puis à pH 7.9 (valeur du pH dans les chloroplastes à la lumière) en diminuant progressivement la concentration de magnésium ; pH 7.9 doit convenir pour tester l'activation de la FBPase par le système DTT-thiorédoxine puisqu'il s'agit d'un système de remplacement, commode expérimentalement, de l'activation de la FBPase par la lumière. La concentration de magnésium retenue pour activer la FBPase par un extrait protéique, renfermant des thiorédoxines, est de 2 mM à pH 7.9, car, sous ces conditions, l'enzyme ne présente qu'une faible activité sans activation (Tableau IV).

La FBPase sera donc testée à pH 7.9 et 2 mM Mg^{2+} , en présence de DTT et d'un extrait protéinique (fraction 50-90 % de sulfate d'ammonium, cf. chap. 1). A cet effet, la FBPase est mise à incuber 5 minutes (temps d'activation) avec le dithiothreitol et l'extrait protéique à différents pHs, pour trouver le pH d'activation optimal (Fig.25) : il s'avère que 7.9 est le meilleur pH d'activation de la FBPase par l'extrait protéinique.

Maintenant, les conditions d'essai enzymatique pour étudier la régulation de la FBPase in vitro sont définies : la FBPase est incubée 5 min à pH 7.9 en présence de DTT et d'un extrait protéique activateur (mélange d'activation), puis son activité enzymatique est testée également à pH 7.9, ainsi que 2 mM de magnésium (mélange de réaction).

Le tableau V indique les conditions requises pour la régulation de la FBPase in vitro : la FBPase, pour être activée in vitro, a besoin du dithiothreitol et d'un extrait protéinique. La régulation in vitro de la fructose bisphosphatase a aussi été étudiée en fonction du temps (Fig.26) : dans le mélange d'activation (50 μ l), il y a 9.6 μ g de FBPase hautement purifiée avec (courbe A) ou sans (courbe B) l'extrait protéinique (0.5 mg), en présence de DTT à pH 7.9. A différents intervalles, 5 μ l du mélange d'activation sont prélevés pour tester la FBPase (pH 7.9, 2 mM Mg^{2+}). Il y a une différence significative entre la présence ou l'absence de l'extrait protéique dans le mélange d'activation.

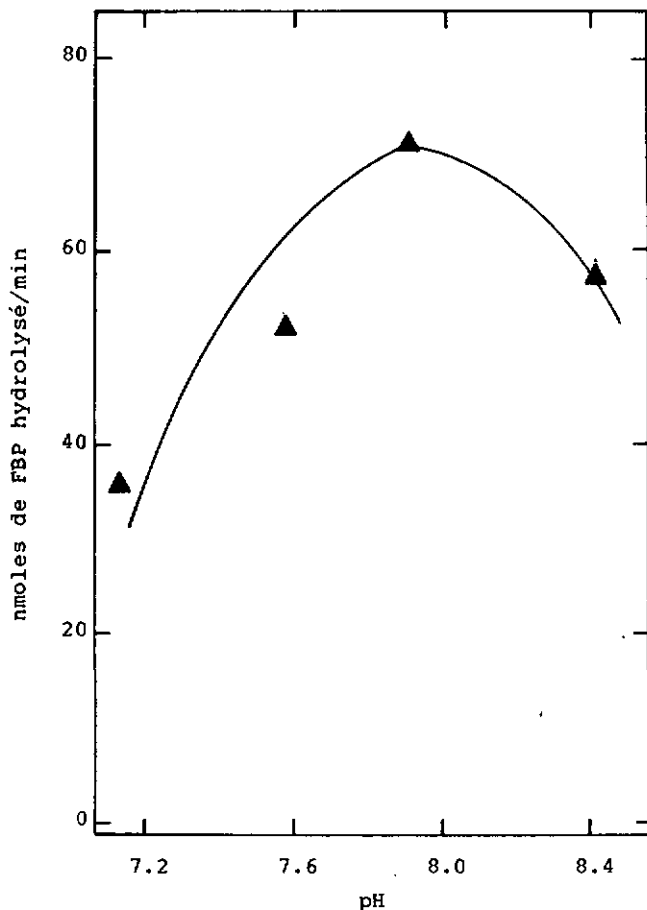


Fig.25. Activation de la FBPase en fonction du pH. Pour chaque pH d'activation testé, 9.6 μ g de FBPase hautement purifiée sont mis à incuber 5 minutes (temps d'activation) en présence de 5 mM DTT et d'un extrait protéique (fraction 50-90 % de sulfate d'ammonium). La détermination de l'activité enzymatique est décrite au § 3.2.1.1

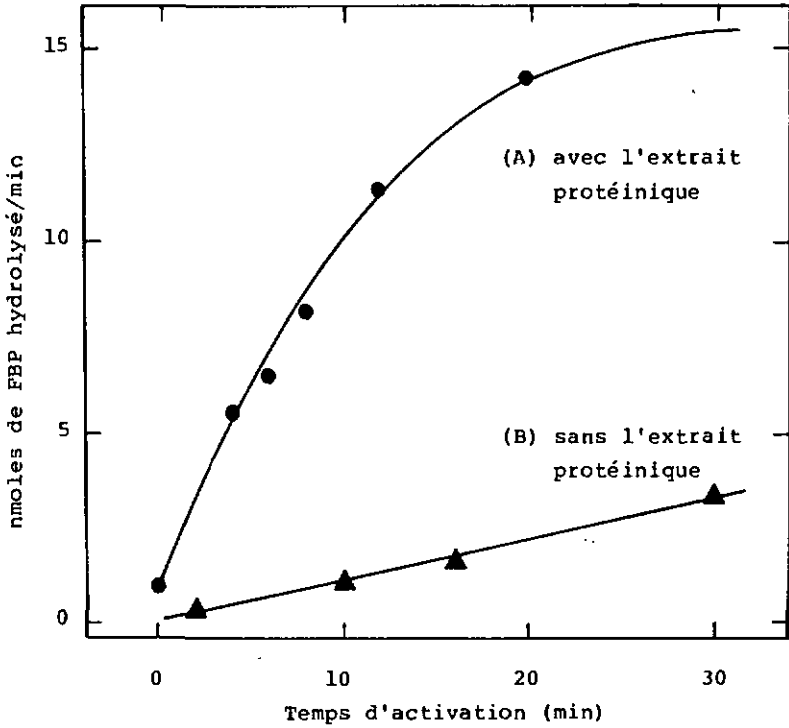


Fig.26. Activation de la FBPase en fonction du temps. 9.6 μg de FBPase hautement purifiée sont mis à incuber à pH 7.9 en présence de 5 mM DTT avec (courbe A) ou sans (courbe B) un extrait protéinique (0.5 mg ; fraction 50-90 % de sulfate d'ammonium). A différents intervalles, 5 μl sont prélevés pour tester la FBPase comme décrit au § 3.2.1.1

Par conséquent il résulte de ces 2 dernières expériences (conditions requises pour la régulation de la FBPase in vitro et son étude en fonction du temps), que l'extrait protéinique après précipitation au sulfate d'ammonium 50-90 % renferme des thiorédoxines et que ce sont elles qui sont responsables, en présence de DTT, de l'activation in vitro de la FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis. La purification de thiorédoxines peut donc se poursuivre.

3.3.2. Purification partielle de thiorédoxines

3.3.2.1. Premières étapes de purification

Les premières étapes de purification de thiorédoxines (extrait brut, précipitation à l'acide et précipitation au sulfate d'ammonium) sont décrites au premier chapitre, car les 2 premières étapes de purification sont identiques à la FBPase et aux thiorédoxines.

3.3.2.2. Filtration sur gel de Sephadex

Cet extrait protéique, d'une coloration rose due à la présence d'une grande quantité de cytochrome c_{552} et dont la concentration en sel est amenée à 400 mM NaCl, est appliqué sur une colonne de chromatographie (4 x 100 cm) Sephadex G-75 (séparation des poids moléculaires des protéines entre 3'000 et 80'000), équilibrée avec 30 mM Tris-acétate pH 7.0 + 200 mM NaCl (Fig.27). La colonne est éluée avec le même tampon. Le débit est d'environ 58 ml/h sous une pression hydrostatique de 50 cm. Les fractions, activant la FBPase (11.5 ml/fraction) et contenant également du cytochrome c_{552} , sont combinées. Le volume est réduit par ultrafiltration dans une grande cellule Amicon, munie d'une membrane YM-5 (retenant les protéines à PM supérieur à 5'000). La solution protéinique est centrifugée 20 min à 4B'000 x g.

3.3.2.3. Chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose

L'échantillon, qui vient de passer à travers une co-

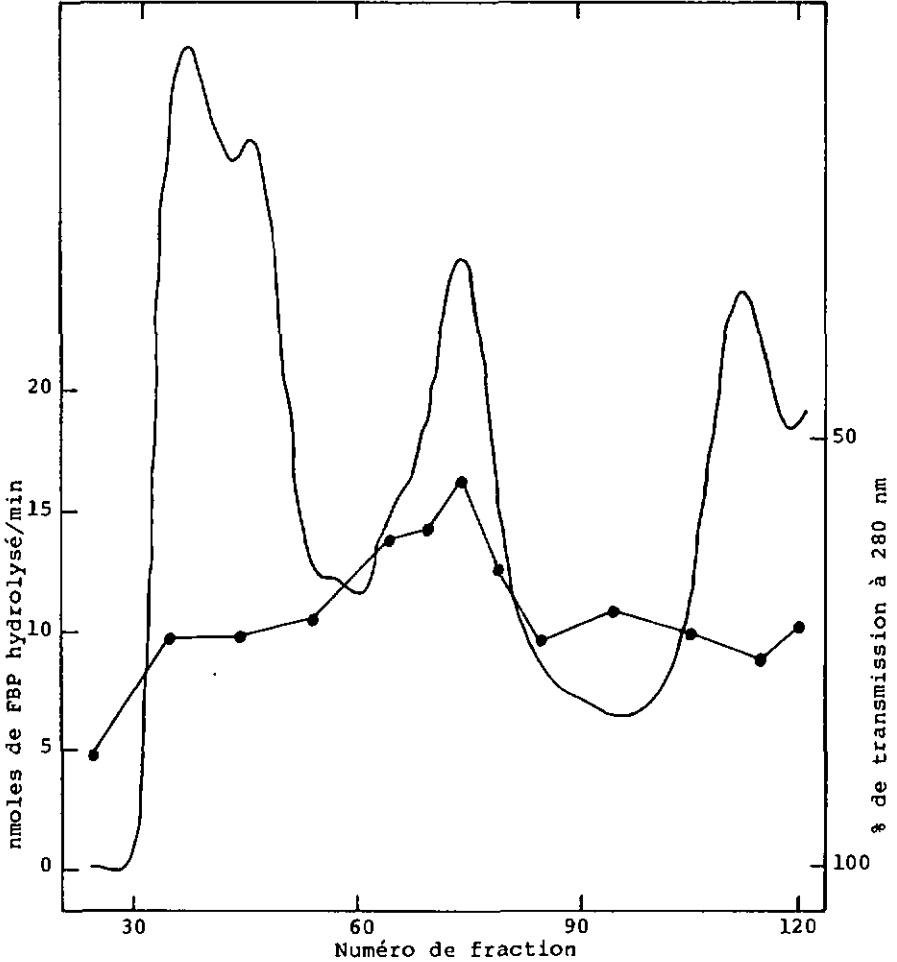


Fig.27. Filtration sur gel de Sephadex G-75. 30 ml d'échantillon, dont la concentration en sel est amenée à 400 mM NaCl, sont appliqués sur une colonne Sephadex G-75, équilibrée avec 30 mM Tris-acétate pH 7.0 + 200 mM NaCl et éluée avec le même tampon. Les fractions (11.5 ml) sont testées pour détecter celles qui activent la FBPase (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

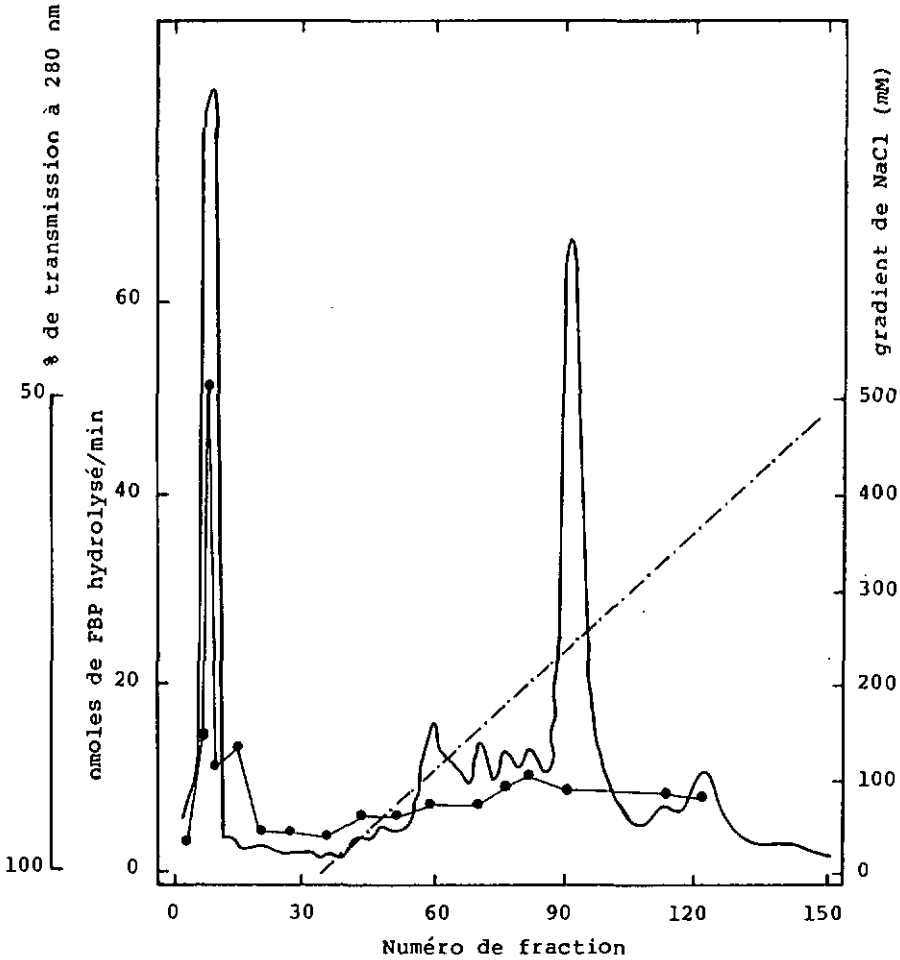


Fig.28. Chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose DE-52. 22 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne DE-52 (2.5 x 10.5 cm), équilibrée avec 25 mM Tris-acétate pH 7.0. La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluée avec 25 mM Tris-acétate pH 7.0 + gradient de sel 0-500 mM NaCl (---). Les fractions (6.3 ml) sont testées pour détecter celles qui activent la FBPase (●—●). (—) % de transmission à 280 nm

lonne Sephadex G-25 Medium (1.5 x 29 cm) pour être dessalé (colonne éluée avec 25 mM Tris-acétate pH 7.0) est appliqué sur une colonne diéthylaminoéthyl-cellulose (2.5 x 10.5 cm) DE-52 (Whatman), équilibrée avec 25 mM Tris-acétate pH 7.0 (Fig.28). La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluée avec 25 mM Tris-acétate pH 7.0 + gradient de sel 0-500 mM NaCl. Le débit de la colonne est de 54 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions activant la FBPase (6.3 ml/fraction), qui sont passées à travers la colonne sans être retenues, sont combinées. Le volume est réduit par ultrafiltration dans une petite cellule Amicon. La solution protéinique est centrifugée 20 min à 48'000 x g.

Après cette étape, l'extrait renfermant des thiorédoxines ne renferme plus le cytochrome c_{552} (sortant plus tard lors de l'éluition de la colonne), mais contient un autre cytochrome, le b_{558} (détecté grâce à un spectre d'absorption de l'extrait). Il est à signaler qu'une purification de thiorédoxines jusqu'à ce stade a déjà été effectuée dans notre laboratoire (Spielmann, 1980).

3.3.2.4. Chromatographie sur hydroxyapatite

L'échantillon, après être passé à travers une colonne G-25 Medium (1.5 x 31 cm) pour se trouver dans le bon tampon (Tris-acétate pH 7.0 remplacé par 10 mM tampon phosphate pH 6.8) est appliqué sur une colonne hydroxyapatite (1.5 x 8.5 cm), équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 6.8 (Fig.29). La colonne est éluée avec un gradient de 10-500 mM tampon phosphate pH 6.8. Le débit de la colonne est d'environ 11 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions activant la FBPase (3.8 ml/fraction) sont combinées, puis dialysées pendant la nuit contre 5 mM Tris-acétate pH 7.0 dans un tube à dialyse Spectrapor (retenant les protéines à PM supérieur à 8'000). Le volume est réduit par ultrafiltration dans une cellule Amicon. La solution protéinique est centrifugée 20 min à 48'000 x g.

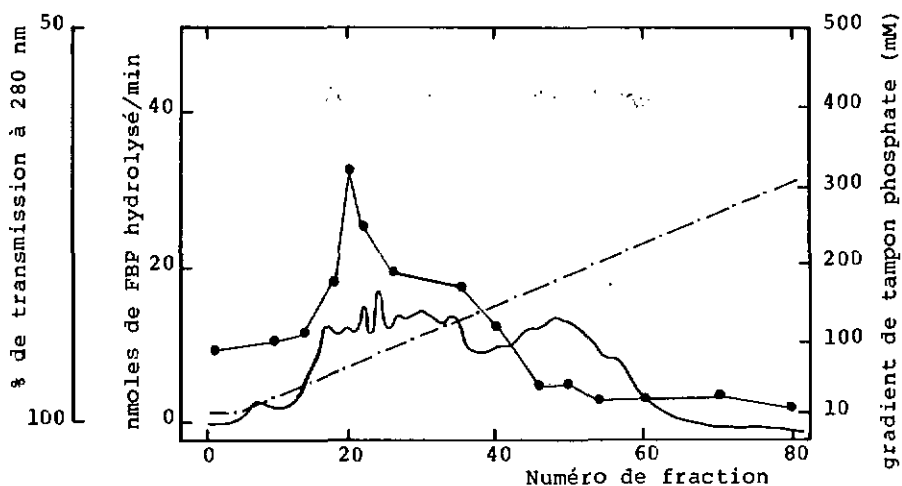


Fig.29. Chromatographie sur hydroxyapatite. 14.5 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne hydroxyapatite (1.5 x 8.5 cm), équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 6.8 et éluée avec un gradient de 10-500 mM tampon phosphate pH 6.8 (- - -). Les fractions (3.8 ml) sont testées pour détecter celles qui activent la FBPase (●-●). (—) % de transmission à 280 nm

gradient de Na-acétate (mM)

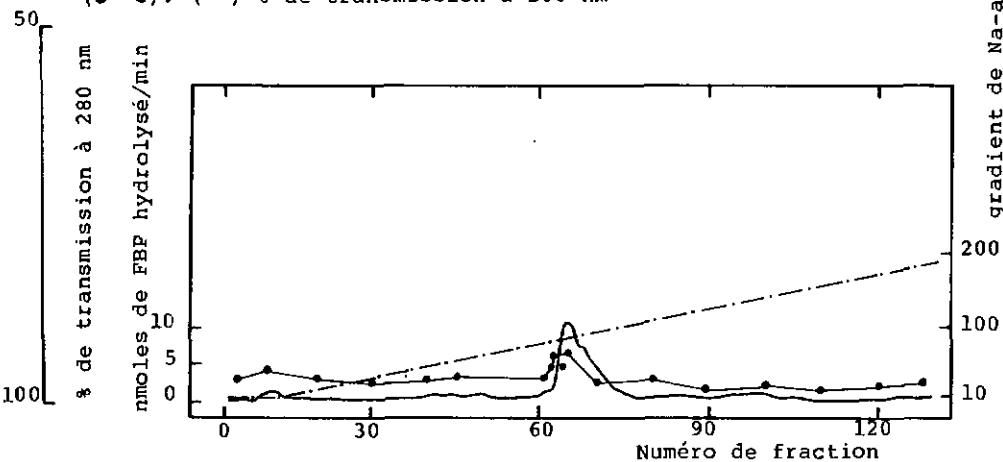


Fig.30. Chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose CM-23. 15.6 ml d'échantillon sont appliqués sur une colonne CM-23 (1.5 x 13.5 cm), équilibrée avec 10 mM Na-acétate pH 5.5. La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluée avec un gradient de 10-200 mM Na-acétate pH 5.5 (- - -). Les fractions (3 ml) sont testées pour détecter celles qui activent la FBPase (●-●). (—) % de transmission à 280 nm

3.3.2.5. Chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose

L'échantillon est d'abord passé à travers une G-25 Medium (1.5 x 31 cm) pour se trouver dans le bon tampon : le tampon Tris-acétate pH 7.0 remplacé par 10 mM Na-acétate pH 5.5. Les fractions, renfermant les protéines, sont combinées et appliquées sur une colonne carboxyméthyl-cellulose (1.5 x 13.5 cm) CM-23 (Serva), équilibrée avec 10 mM Na-acétate pH 5.5 (Fig.30). La colonne est lavée avec le même tampon, puis éluée avec un gradient de 10-200 mM Na-acétate pH 5.5. Le débit de la colonne est de 12 ml/h, maintenu constant par une pompe. Les fractions activant la FB Pase (3 ml/fraction) sont combinées, puis le volume est réduit par ultrafiltration dans une cellule Amicon.

3.3.2.6. Relation activité spécifique - degré de pureté

L'activité spécifique de thiorédoxines ne peut pas être déterminée, car elles ne sont pas des enzymes, elles n'agissent donc pas sur un substrat au sens habituel du terme. En effet, ces protéines activent la FB Pase (qui est une enzyme), qui devient donc leur substrat. L'activité spécifique de la FB Pase, activée par ces thiorédoxines, pourrait alors être calculée, apportant une information sur le rôle joué par l'extrait protéinique à chaque étape de purification de ces thiorédoxines. Ceci ne peut se faire, car la réaction d'activation de la fructose bisphosphatase par une thiorédoxine n'est pas stoechiométrique : une fois l'enzyme activée, et que cette thiorédoxine vienne à être retirée du milieu réactionnel, la FB Pase continue d'être active. Elle serait désactivée, si de la thiorédoxine oxydée était rajoutée (Soulié et al., 1981). Pour contrôler la purification de thiorédoxines, on procède comme suit : l'activité de la FB Pase, due à l'activation par des thiorédoxines, est donc mesurée à chaque étape et une électrophorèse sur gel dénaturant d'une aliquote de chaque étape est aussi effectuée.

Dans le tableau de purification de thiorédoxines (Tableau VI), les deux premières étapes (extrait brut et préci-

TABLEAU VI
Purification de thiorédoxines

Etape de purification	Volume total (ml)	Concentration des protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Quantité d'extrait (µg de protéine)	Activation de la FBPase (nmoles de FBP hydrolysé/min)
Précipitation au sulfate d'ammonium	33	51.0	1'683	511	60
Sephadex G-75	14	18.5	259	93	49
DEAE-52	8.9	11.6	103	fraction pic (20 µl)	47
Hydroxyapatite	6.9	3.5	24	18	39
CM-23	1.3	-	-	20 µl	14

Le procédé de purification à partir de 500 g de cellules d'Euglène est décrit dans le texte. A chaque étape, les protéines sont dosées (cf. § 3.2.2) et l'action de l'extrait protéique sur la FBPase est estimée en déterminant l'activité de l'enzyme comme décrit au § 3.2.1.1

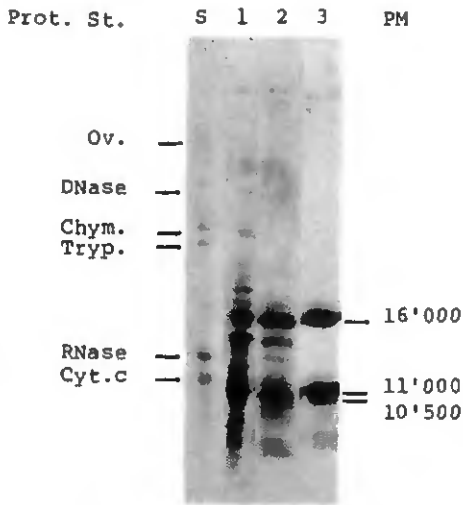


Fig.31. Etapes de purification de thioredoxines, visualisées sur un gel dénaturant (SDS-15 % d'acrylamide) : diéthylamino-éthyl-cellulose (canal 1), hydroxyapatite (canal 2) et carboxyméthyl-celluloae (canal 3). Le canal S renferme les protéines atandard (Prot. St.) : ovalbumine, 43'000 ; DNase I, 31'000 ; chymotrypsinogène, 25'700 ; trypsine, 23'300 ; RNase, 13'700 ; cytochrome c, 12'500

pitation à l'acide) n'y figurent pas, puisqu'elles renferment à la fois la FBPase et les protéines d'activation. Pour tester correctement l'activation de la FBPase par ces protéines d'activation, il faut que l'enzyme soit présente en quantité saturante (environ 10 µg de FBPase hautement purifiée), de telle sorte que toutes ces protéines qui se trouvent dans l'extrait puissent travailler. Il est à remarquer, qu'au cours de la purification, il faut toujours moins de µg de protéines pour activer l'enzyme dans le même ordre de grandeur, exception faite de la dernière étape, où l'activation de la FBPase est relativement faible. Ceci peut être dû au fait qu'après un certain temps de stockage la FBPase est plus difficilement activable. C'est du moins ce qui a été observé pour la FBPase chloroplastique d'Epinard (Schürmann, résultats non publiés).

La figure 31 visualise les étapes suivantes de la purification de thiorédoxines, après électrophorèse sur un gel dénaturant (SDS-15 % d'acrylamide) : chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose (canal 1), hydroxyapatite (canal 2) et carboxyméthyl-cellulose (canal 3). Le canal S contient les protéines standard : l'ovalbumine, la DNase I, le chymotrypsinogène, la trypsine, la RNase et le cytochrome c. Après la colonne DEAE, il y a encore beaucoup de protéines dans l'échantillon. Leur nombre a fort diminué après la colonne d'hydroxyapatite et après la carboxyméthyl-cellulose, il n'y a plus que trois bandes principales : une protéine dont le poids moléculaire s'élève à 16'000, et deux autres très proches l'une de l'autre, la première avec un PM de 11'000 et la seconde, dont le PM est estimé à 10'500. Comme il s'avère que de très nombreuses thiorédoxines possèdent un poids moléculaire autour de 12'000, entre autres la thiorédoxine f de l'Epinard (Schürmann et al., 1981), il se peut fort bien qu'une de ces deux protéines soit celle qui est responsable de l'activation de la FBPase, sans pour autant exclure que les autres bandes protéiniques sur le gel puissent également représenter des thiorédoxines.

En ce qui concerne la structure primaire de cette thiorédoxine, elle doit contenir au moins 2 résidus demi-cystine,

TABLEAU VII

Activation de la FBPase par les thiorédoxines f et m de l'Epinarđ ; rôle de thiorédoxines extra-muros

Enzyme	Activité enzymatique (nmoles de substrat transformé par minute)
<hr/>	
FBPase d' <u>Euglena gracilis</u>	
Contrôle	5
+ Thiorédoxines d' <u>Euglena gracilis</u>	47
+ Thiorédoxine f d'Epinarđ	37
+ Thiorédoxine mb d'Epinarđ	88
FBPase de l'Epinarđ	
Contrôle	6
+ Thiorédoxine f d'Epinarđ	164
+ Thiorédoxines d' <u>Euglena gracilis</u>	7
MDH à NADP de l'Epinarđ	
Contrôle	3
+ Thiorédoxine mb d'Epinarđ	32
+ Thiorédoxines d' <u>Euglena gracilis</u>	48

Les méthodes d'analyse enzymatique sont décrites au § 3.2.1

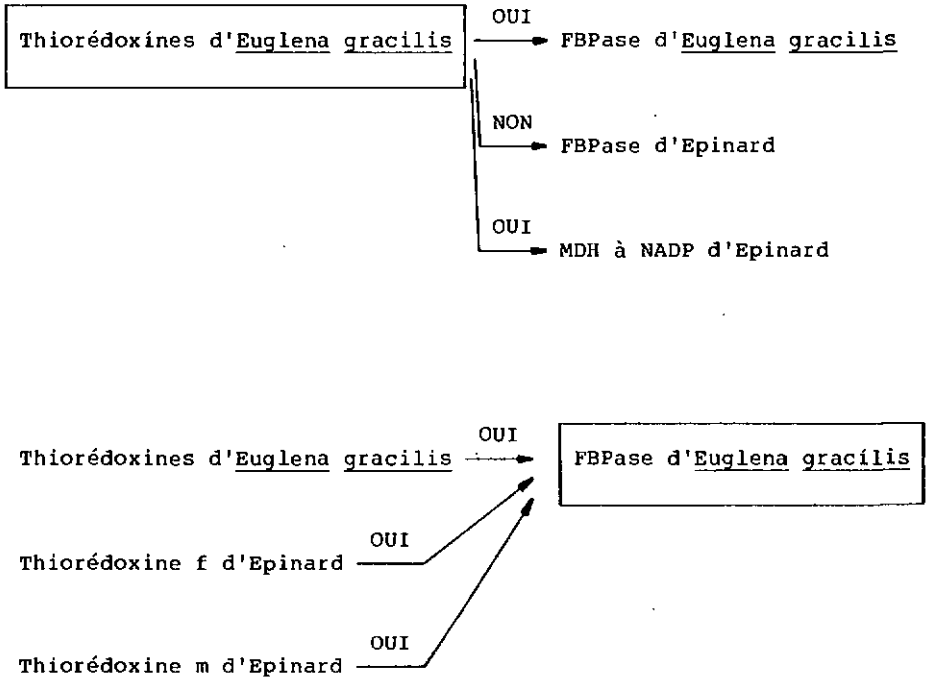


Fig.32. Tests croisés du système DTT-thioredoxine entre Euglena gracilis et l'Epinarde (schéma récapitulatif)

responsables de son activité biologique. Il serait donc par conséquent intéressant de poursuivre la purification de cette protéine, pour parvenir à l'homogénéité et déterminer ainsi sa teneur en acides aminés, sa séquence ou du moins celle du groupement fonctionnel (site actif).

3.3.3. Activation de la FBPase par les thiorédoxines f et m de l'Epinar ; rôle de thiorédoxines extra-muros

La fructose 1,6-bisphosphatase d'Euglena gracilis, activée par des thiorédoxines (fraction pic de la DEAE, 20 µl), est également activée par la thiorédoxine f pure (4.4 µg) et la thiorédoxine mb pure (5 µg) de l'Epinar (Tableau VII). Par contre, la FBPase d'Epinar, activée par sa protéine de régulation, ne l'est pas par celles provenant de l'Euglène, qui, en revanche, agissent sur la malate déshydrogénase à NADP de l'Epinar.

En résumé, les protéines de régulation chez Euglena gracilis agissent sur la FBPase d'Euglène, la MDH à NADP d'Epinar, mais n'activent pas la FBPase de l'Epinar (Fig.32). Quant à la FBPase d'Euglena gracilis, elle peut être activée par un certain nombre de thiorédoxines : les siennes ainsi que les thiorédoxines f et m de l'Epinar.

3.4. CONCLUSION

La FBPase chloroplastique d'Euglena gracilis est activée in vitro par le dithiothreitol et un extrait protéinique, renfermant des thiorédoxines. Cet extrait est partiellement purifié, après une précipitation au sulfate d'ammonium (50-90 % de saturation), par filtration sur gel de Sephadex et chromatographies sur hydroxyapatite, DEAE- et CM-cellulose. Il contient 3 protéines de PM 10'500, 11'000 et 16'000, détectées par électrophorèse sur gel SDS-15 % d'acrylamide. De ces résultats et de ceux du chapitre 2 (activation in vivo de la FBPase par la lumière), on peut en déduire que l'activité de la FBPase est régulée dans

les chloroplastes d'Euglène par le système ferrédoxine-thiorédoxine, à l'image de ce qui se passe chez l'Epinard. En plus de l'enzyme d'Euglène, les protéines de régulation d'Euglena gracilis agissent sur la MDH à NADP d'Epinard, mais n'activent pas la FBPase de l'Epinard. Les thiorédoxines f et m de l'Epinard activent également la FBPase d'Euglena.

Chapitre 4. BIOSYNTHESE DE LA FBPase

4.1. INTRODUCTION

"La vie sur la Terre dépend de l'aptitude des chloroplastes à effectuer la photosynthèse, de sorte qu'il n'est pas surprenant de trouver une littérature considérable sur le mécanisme photosynthétique. Mais un autre pôle d'attraction dans les chloroplastes peut être discerné : les chloroplastes, comme les mitochondries, renferment un système génétique complet en plus de celui qui est localisé dans le noyau et le cytoplasme. Un système génétique complet contient les quatre composants nécessaires à l'expression de l'information génétique : le DNA, la DNA polymérase, la RNA polymérase et un dispositif de synthèse protéinique. Il apparaît que la possession de tels systèmes génétiques extranucléaires est une caractéristique fondamentale du mode eucaryote d'organisation cellulaire. L'existence de tels systèmes pose des questions telles que, par exemple, connaître leur rôle précis dans la différenciation cellulaire. Par conséquent, il est aussi important de savoir dans quel compartiment cellulaire une protéine chloroplastique est synthétisée que de s'enquérir de sa fonction photosynthétique. Il est maintenant clairement établi que la formation des chloroplastes résulte d'une coopération complexe entre le système génétique nucléaire et celui contenu dans le plaste. L'attrait de ce sujet réside dans le démêlement des événements moléculaires de cette coopération. Des protéines chloroplastiques sont synthétisées à l'intérieur du plaste lors de son développement, tandis que beaucoup d'autres sont fabriquées dans le cytoplasme. Il n'y a donc pas de perspective pour cultiver les chloroplastes à la manière de cellules. L'évidence en cours indique que les protéines chloroplastiques, fabriquées en dehors du chloroplaste, sont codées au niveau du génome nucléaire, tandis que celles, produites par les ribosomes chloroplastiques, sont codées par le génome du chloroplaste. Il s'ensuit que les polypeptides, codés par le noyau, traversent l'enveloppe chloroplastique et sont

assemblés dans l'organite pour devenir fonctionnels. Ce processus d'assemblage nécessite des interactions entre des polypeptides, codés par le noyau, et d'autres, qui le sont par le chloroplaste" (tiré de Ellis, 1981).

Puisque le système de régulation ferrédoxine-thiorédoxine, dépendant de la lumière, est typiquement chloroplastique (cf. chap. 2), il est précisément intéressant de savoir si ses constituants, parmi lesquels la FBPase, sont synthétisés au niveau des ribosomes chloroplastiques ou s'ils sont élaborés, comme de nombreuses autres protéines chloroplastiques, sur les ribosomes cytoplasmiques et ensuite importés dans le chloroplaste. De toute façon, quelle que soit la réponse à cette question, le problème alors posé est digne d'intérêt : si la FBPase chloroplastique est synthétisée dans le cytoplasme, comment s'effectuent donc son transport et son assemblage dans le chloroplaste ? Si, par contre, son élaboration se déroule dans le chloroplaste, quel fragment de DNA chloroplastique est responsable de sa synthèse ?

4.2. MATERIEL ET METHODES

4.2.1. Cultures, récoltes et extraits d'*Euglena gracilis*, souche Z (ICC)

Un erlenmeyer, contenant 1 litre de milieu hétérotrophe (Greenblatt et Schiff, 1959; même milieu que celui utilisé pour la culture des cellules en vue d'isoler l'enzyme, cf. chap. 1), est inoculé avec 3 ml d'une culture stock d'*Euglena gracilis*, souche Z (ICC), dont les cellules se sont développées à l'obscurité pendant 7 jours dans le même milieu de culture.

L'erlenmeyer ainsi inoculé est laissé à l'obscurité à environ 25°C durant 6 jours avec un système d'agitation : les cellules étiolées se multiplient.

Après cette étape, 8 erlenmeyers de 1 litre, contenant chacun 400 ml de milieu autotrophe (Cramer et Myers, 1952), sont inoculés chacun avec 100 ml de cette culture à l'obscurité. Deux flacons (1 litre) sont utilisés pour la culture de contrôle, 2

autres pour le traitement à la cycloheximide (10 µg/ml), 2 autres pour la lincomycine (don de Upjohn, Zürich ; 2 mg/ml) et les 2 derniers pour le traitement au chloramphénicol (D-thréo-chloramphénicol, 2 mg/ml). Les 8 erlenmeyere sont mis à la lumière à environ 25°C avec un système d'agitation pendant 3 jours (72 heures) : alors que les cellules, qui ne se divisent presque plus, verdissent, les proplastes, quant à eux, deviennent des chloroplastes fonctionnels.

Pour chaque traitement (contrôle, cycloheximide, lincomycine et chloramphénicol) et pour le reste de la culture à l'obscurité qui n'a pas été utilisée pour l'inoculation de l'étape à la lumière (moins de 200 ml), la récolte s'effectue de la façon suivante : la culture est centrifugée 10 min à 4'000 x g et lavée à deux reprises avec 50 mM tampon phosphate pH 7.0 (resuspendre les culots de récolte dans ce tampon et centrifuger 10 min à 4'000 x g).

Pour réaliser l'extrait de chaque culture, la procédure est la suivante : le culot final est resuspendu avec un homogénéisateur Potter-Elvehjem dans 50 mM tampon phosphate pH 7.0 (ajouter autant de ml de tampon qu'il y a de g de cellules d'Euglène), passé 3 fois à travers la presse Yeda (70 atm), le même volume de tampon est ajouté pour laver la presse Yeda et l'erlenmeyer utilisé à la sortie de la presse, 50 µl sont prélevés pour déterminer la concentration en chlorophylle, puis l'extrait est finalement centrifugé 15 min à 48'000 x g.

Comme il s'agit de déterminer l'origine génétique de la FBPase chloroplastique et qu'il existe également une FBPase cytoplasmique, il faut détruire cette dernière. A cette fin, une aliquote de chacun des extraits est dialysée contre 50 mM Na-acétate pH 5.5 pendant la nuit. Puis les échantillons sont centrifugés 4 min pour être clarifiés.

4.2.1.1. Détermination de la concentration de chlorophylle

La teneur totale en chlorophylle est généralement utilisée comme critère de référence dans l'expression des acti-

vités photosynthétiques. La concentration de chlorophylle est donnée en mg de chlorophylle par milliard de cellules. La procédure suivante est utilisée :

a) D'abord c'est la quantité totale de chlorophylle dans l'extrait qui doit être connue. La concentration de chlorophylle est déterminée selon la méthode d'Arnon (1949) :

- 10 ml d'acétone à 80 % + 50 μ l d'extrait
- filtrer et lire l'absorbance à 652 nm
- concentration C (mg/ml d'extrait) = $A_{652} \times 5.8$

Le volume de l'extrait étant connu, la teneur totale de l'extrait en chlorophylle peut ainsi être calculée.

b) Puis il s'agit de savoir combien de cellules renferme la récolte (1 litre). Une cellule de Thomas est utilisée pour effectuer un comptage au microscope :

$$\text{nombre de cellules/ml} = \frac{\text{nombre de cellules dans les 16 carrés}}{\text{dilution}} \times 10^4$$

Ce nombre est alors multiplié par mille pour obtenir la quantité totale de cellules dans la récolte.

c) La concentration de chlorophylle peut ainsi être exprimée en mg de chlorophylle par 10^9 cellules.

4.2.2. Culture, récolte et extrait d'*Euglena gracilis*, souche W_3 BUL

La souche W_3 BUL (White n° 3 Bleached by UV by Lyman) est utilisée comme autre contrôle : en effet, elle ne contient pas de chloroplastes mais seulement des proplastés.

Quatre erlenmeyers, contenant chacun 250 ml de milieu hétérotrophe (Greenblatt et Schiff, 1959), sont inoculés chacun avec 1 ml d'une culture stock d'*Euglena gracilis*, souche W_3 BUL, dont les cellules se sont développées 6 jours à l'obscurité dans le même milieu de culture. Les erlenmeyers sont mis à la lumière (contrôle complet) avec un système d'agitation pendant une semaine. La souche W_3 BUL devient orange sous condition lumineuse, ceci est dû à la biosynthèse de caroténoïdes, c'est ainsi que l'Euglène se protège elle-même de la lumière.

Le mode opératoire de récolte (1 litre de culture), d'extrait et de dialyse est le même que celui de la souche Z(ICC).

4.2.3. Détermination de l'activité enzymatique

Pour détecter la présence de la FBPase chloroplastique dans les différents extraits, l'analyse spectrophotométrique à 340 nm est utilisée. 50 μ l d'extrait sont introduits dans une cuvette spectrophotométrique qui contient le mélange réactionnel (0.95 ml) renfermant (en μ moles) Tris-HCl pH 7.2 ou 8.6, 100 ; $MgSO_4$, 20 ; EDTA-Na, 0.1 ; NADP, 0.5 ; FBP- Na_3 , 4 ; glucosephosphate isomérase, 1.75 unité ; glucose 6-phosphate déshydrogénase, 0.70 unité. La réaction enzymatique est enregistrée immédiatement en suivant le changement d'absorbance à 340 nm. Le résultat est donné en nmoles de FBP hydrolysé par minute et par million de cellules.

4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1. Effet des antibiotiques sur la biosynthèse de la chlorophylle et la division cellulaire

Le tableau VIII montre les effets de la cycloheximide, de la lincomycine et du chloramphénicol sur la synthèse chlorophyllienne et la division cellulaire.

Dans l'extrait de contrôle, la concentration en chlorophylle totale s'élève à 10 mg de chlorophylle par milliard de cellules. Pour l'extrait traité à la cycloheximide (10 μ g/ml), la concentration de chlorophylle est de 2.81 mg $\times 10^{-9}$ cellules, ce qui correspond à une inhibition de 72 %. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par d'autres auteurs (Smillie et al., 1967) qui obtiennent une inhibition de 75 % sur la biosynthèse de la chlorophylle dans la culture traitée à la cycloheximide (15 μ g/ml). Par contre, la lincomycine (2 mg/ml), inhibant la biosynthèse des protéines dans les chloroplastes, a un effet moindre sur la biosynthèse chlorophyllienne : en effet, la con-

TABEAU VIII

Effet des antibiotiques sur la biosynthèse de la chlorophylle et la division cellulaire

Extrait de la souche 2 (ICC)	Volume de l'extrait		Concentration de chl		Quantité totale de chlorophylle		Quantité totale de cellules		Concentration de chl	
	(ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg)	($\times 10^9$)	(% d'inhibition)	($\times 10^9$)	(% d'inhibition)	($\text{mg} \times 10^{-9}$)	(% d'inhibition)
Contrôle	5.0	1.42	1.42	7.10	0.71	-	10.00	-		
+ Cycloheximide	1.1	0.41	0.41	0.45	0.16	77	2.81	72		
+ Lincomycine	3.8	1.08	1.08	4.10	0.53	25	7.74	23		
+ Chloramphénicol	3.5	0.78	0.78	2.73	0.38	46	7.18	28		

La détermination du nombre de cellules ainsi que de la concentration de chlorophylle est décrite au § 4.2.1.1

centration en chlorophylle dans l'extrait contenant cet antibiotique s'élève à 7.74 mg par milliard de cellules, l'inhibition n'est donc que de 23 %. Le troisième extrait traité aux antibiotiques renferme du chloramphénicol (2 mg/ml). La concentration de chlorophylle y est de $7.18 \text{ mg} \times 10^{-9}$ cellules, l'inhibition étant de 28 %. Smillie et al. (1967), quant à eux, indiquent 82 % d'inhibition pour 1 mg de chloramphénicol par ml de culture.

Les effets des antibiotiques sur la division cellulaire présentés ici sont différents de ceux obtenus par Smillie et al. (1967) : la cycloheximide inhibe la division cellulaire à 77 % alors que, pour ces auteurs, elle la stoppe complètement. Quant au chloramphénicol, il inhibe la division des cellules à 46 %. Smillie et al. ont trouvé que le chloramphénicol n'avait pas d'effet inhibiteur sur la division cellulaire, bien au contraire puisque le taux de division était légèrement augmenté par le chloramphénicol ! Dans l'extrait traité à la lincomycine, l'inhibition de la division cellulaire est moins élevée (25 %).

4.3.2. Site de biosynthèse de la FBPase chloroplastique

Les cellules d'Euglena gracilis, souche Z, ayant poussé à l'obscurité, ne présentent pas d'activité enzymatique due à la fructose bisphosphatase chloroplastique, le test enzymatique étant réalisé après dialyse de l'extrait à pH 5.5 (Fig.33). Par contre, d'autres auteurs ont trouvé que la FBPase chloroplastique présente une faible activité à l'obscurité chez le Pois (Graham et al., 1968), le Haricot (Bradbeer et al., 1969) et même chez Euglena gracilis (Smillie, 1963; App et Jägendorf, 1963).

L'activité de la FBPase chloroplastique (exprimée par un nombre constant de cellules) dans la culture de contrôle augmente progressivement au cours du verdissement des cellules à la lumière pour atteindre un certain seuil après 72 heures d'illumination (Fig.33). L'allure de la courbe permet deux hypothèses : soit la FBPase, effectivement absente à l'obscurité, est synthétisée à la lumière (synthèse de novo), soit elle est déjà présente à l'obscurité mais sous forme de précurseur inactif qui a besoin de la lumière pour être activé (activation in vivo).

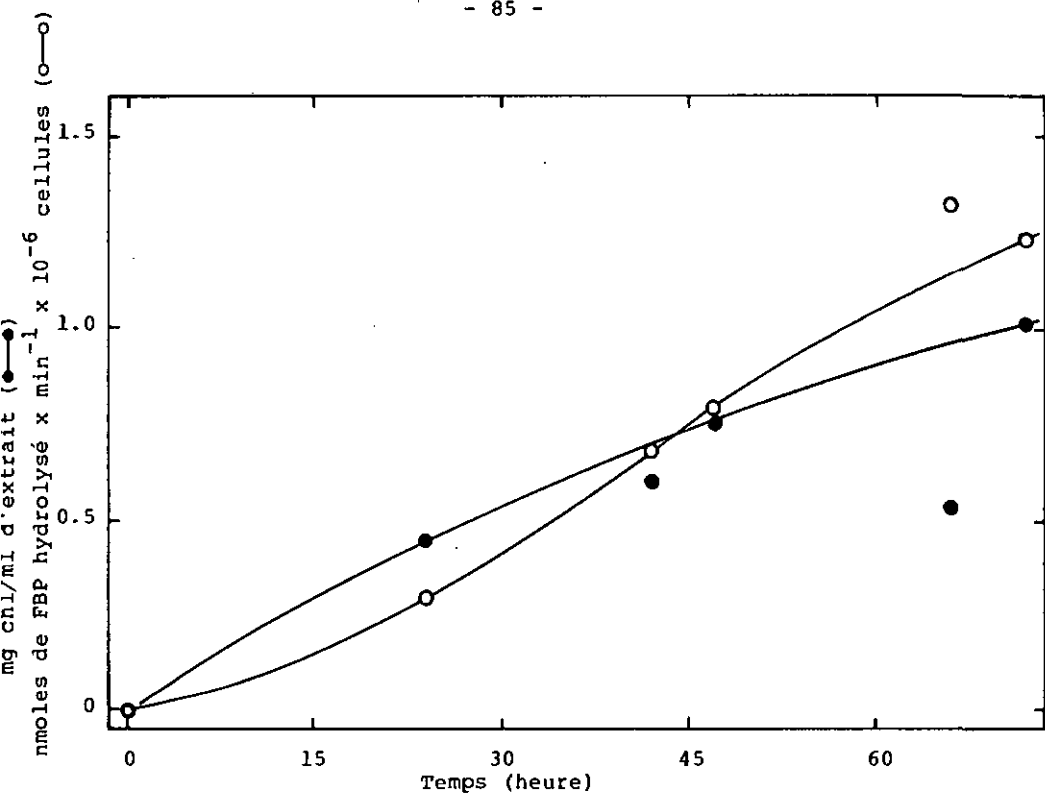


Fig.33. Augmentation de la concentration de la chlorophylle et de l'activité de la FBPase au cours du verdissement de la culture de contrôle. Pour réaliser cette expérience, une bouteille de 10 litres (20 x 45 cm), contenant 6 litres de milieu autotrophe (Cramer et Myers, 1952), est inoculée avec 1.5 l de culture à l'obscurité. A différents intervalles, 1 litre de milieu est prélevé, la récolte et l'extrait sont réalisés comme décrit au § 4.2.1, la concentration de chlorophylle (●-●, cf. § 4.2.1.1) et l'activité enzymatique (o-o, cf. § 4.2.3) sont déterminées

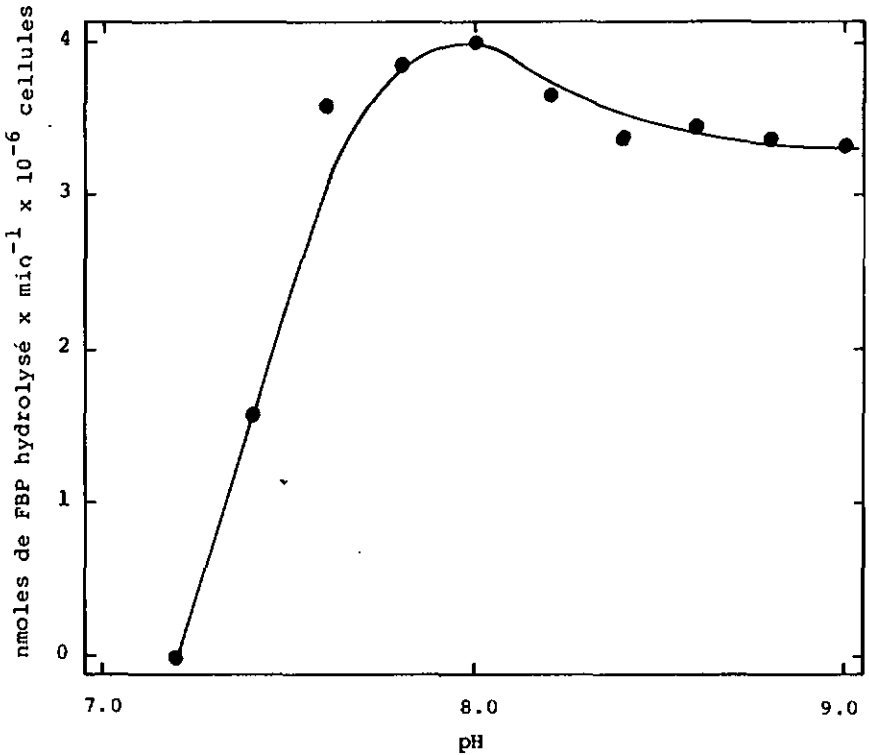


Fig.34. Activité de la FBPase en fonction du pH. L'extrait utilisé provient de la culture de contrôle, après dialyse contre 50 mM Na-acétate pH 5.5. La détermination de l'activité enzymatique est décrite au § 4.2.3, à l'exception du pH

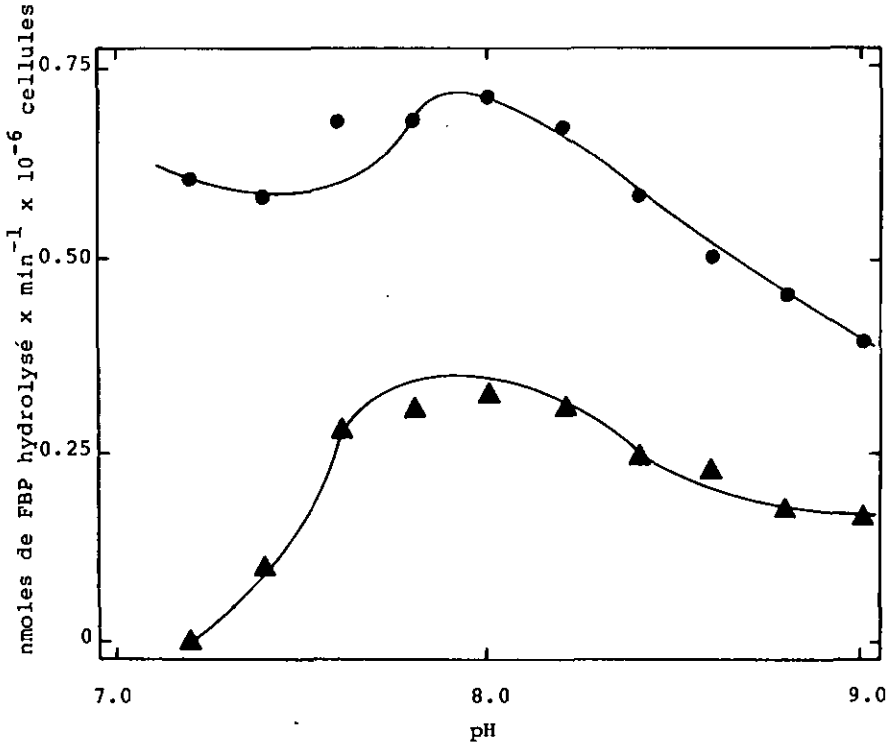


Fig.35. Activité des FBPases cytoplasmique et chloroplastique en fonction du pH. L'extrait utilisé provient de la culture d'Euglène, souche W₃BUL. Une aliquote est dialysée contre 50 mM Na-phosphate pH 7.0 (●—●) et une autre contre 50 mM Na-acétate pH 5.5 (▲—▲). La détermination des activités enzymatiques est décrite au § 4.2.3, à l'exception du pH

Il n'existe pas à ce jour d'information publiée au sujet des rôles respectifs de la synthèse de novo et de l'activation in vivo dans le développement de la fructose bisphosphatase. Bradbeer (1981) émet l'avis suivant au sujet de la biosynthèse des enzymes du cycle de Calvin (incluant la FBPase) chez les Végétaux supérieurs : ces protéines sont synthétisées à l'obscurité et sont présentes en faibles quantités, la lumière occasionne une synthèse de novo rapide, qui a pour conséquence d'augmenter de plusieurs fois la quantité de chaque enzyme, et les activités enzymatiques présentent une activation considérable, en réponse au développement de l'activité photosynthétique des thylakoïdes.

Après dialyse des extraits contre 50 mM Na-acétate pH 5.5 pendant la nuit, la courbe de pH de l'activité de la FBPase, avec son optimum à pH 8.0 et aucune activité à pH 7.2 et en-dessous (Fig.34), correspond approximativement au profil obtenu après purification de cette enzyme chloroplastique. C'est donc une bonne indication pour dire que les résultats présentés à la figure 33 sont dus spécifiquement à la FBPase chloroplastique.

Une indication supplémentaire en faveur du rôle joué uniquement par l'enzyme chloroplastique après dialyse à pH 5.5 provient d'expériences réalisées avec la souche d'Euglènes W_3 BUL, déficiente en chloroplastes et ne contenant donc que des proplastes, et qui présente une activité FBPasique due essentiellement à l'enzyme cytoplasmique. Tandis qu'un extrait, maintenu à pH 7.0, possède une activité de FBPase plus élevée à pH 7.2 qu'aux pH supérieurs à 8.0, une dialyse contre 50 mM Na-acétate pH 5.5 pendant la nuit élimine complètement l'activité à pH 7.2, détruisant ainsi la FBPase cytoplasmique et laissant seulement une petite activité enzymatique aux pH supérieurs à 8.0, probablement due à la présence d'un reliquat de la FBPase chloroplastique dans la souche W_3 BUL (Fig.35).

Le tableau IX résume les résultats obtenus avec des inhibiteurs de la synthèse protéinique dans le cytoplasme (emploi de la cycloheximide) et dans les chloroplastes (usage du chloramphénicol ou de la lincomycine).

Les extraits dialysés à pH 5.5 pendant la nuit (la

TABLEAU IX

Effet d'antibiotiques sur la biosynthèse de la FBPase chloroplastique

Souche	Activité enzymatique (nmoles de FBP hydrolysé $\times \text{min}^{-1} \times 10^{-6}$ cellules)	
	pH 7.2	pH 8.6
<hr/>		
Z(ICC), extraits dialysés		
obscurité, 6 jours	0	0
lumière, 3 jours		
contrôle	0	6.16
+ cycloheximide	0	0.92
+ lincomycine	0	4.82
+ chloramphénicol	0	6.58
W ₃ BUL		
extrait non dialysé	2.16	1.26
extrait dialysé	0	0.30

La détermination de l'activité enzymatique est décrite au § 4.2.3

FBPase cytoplasmique étant donc détruite) sont testés à pH 7.2 (pH de contrôle) et pH 8.6 (pH où la FBPase chloroplastique présente une bonne activité) ; en effet 7.2 est un pH de contrôle : la FBPase cytoplasmique présente une activité enzymatique à ce pH, contrairement à l'enzyme chloroplastique qui n'en a pas (Latzko et al., 1974). Les résultats sont donnés en nmoles de FBP hydrolysé par minute et par million de cellules, pour pouvoir ainsi comparer les valeurs obtenues d'un traitement de culture à l'autre, en raison des taux différents de division cellulaire (cf. § 4.3.1).

L'extrait dialysé, provenant de la culture à l'obscurité, ne présente pas d'activité à pH 7.2 ni à 8.6 : la FBPase chloroplastique soit n'est pas synthétisée à l'obscurité dans les proplastés, soit est présente mais pas encore active, ayant alors besoin de la lumière pour être activée. Les extraits dialysés des cultures à la lumière ne présentent pas non plus d'activité à pH 7.2 : la FBPase cytoplasmique est donc bien détruite et à pH 8.6 c'est uniquement la FBPase chloroplastique qui est ainsi testée. L'extrait de contrôle présente une activité enzymatique à pH 8.6 de 6.16 nmoles de FBP hydrolysé $\times \text{min}^{-1} \times 10^{-6}$ cellules. Dans l'extrait dialysé, traité à la cycloheximide, la FBPase chloroplastique hydrolyse 0.92 nmole de substrat par minute et million de cellules, ce qui correspond à une inhibition de 85 %. En ce qui concerne l'extrait dialysé, traité à la lincomycine, il y a 4.82 nmoles de FBP hydrolysé $\times \text{min}^{-1} \times 10^{-6}$ cellules (22 % d'inhibition) et pour l'extrait dialysé, traité au chloramphénicol, il y en a 6.58 (pas d'inhibition). Pour les extraits de la souche W₃BUL, les résultats sont les suivants : l'extrait non dialysé présente une activité enzymatique aux 2 pH. A 7.2, ce sont 2.16 nmoles de substrat qui sont hydrolysées par minute et par million de cellules et à 8.6, 1.26 nmoles. L'extrait dialysé ne présente pas d'activité à pH 7.2 (la FBPase cytoplasmique est donc détruite) mais une petite activité (0.30 nmole) à 8.6 (due à une faible présence de la FBPase chloroplastique, comparer avec la figure 35).

Le lieu de biosynthèse de la fructose biphosphatase

chloroplastique peut maintenant être donné. En présence de la cycloheximide, l'inhibition de la biosynthèse de l'enzyme est de 85 %, ce qui est considérable. Cette donnée ne permet pas de conclure, car 2 hypothèses se présentent :

a) La cycloheximide inhibe la synthèse des protéines dans le cytoplasme, donc la FBPase chloroplastique est synthétisée dans le cytoplasme.

b) Bien qu'en présence de la cycloheximide il y ait inhibition de la synthèse de la FBPase, cette enzyme est élaborée au niveau des ribosomes chloroplastiques, car ce que cet antibiotique inhibe c'est les protéines cytoplasmiques ainsi que des protéines chloroplastiques dont certaines sont nécessaires à la biosynthèse de la FBPase.

Quand les cultures sont traitées à la lincomycine, il y a 22 % d'inhibition, et quand elles contiennent du chloramphénicol, il n'y a pas d'inhibition. Ces deux informations nous permettent d'exclure la seconde hypothèse, car si la FBPase était élaborée dans les chloroplastes, le pourcentage d'inhibition serait très élevé, ce qui n'est pas le cas !

4.4. CONCLUSION

De ces résultats, il apparaît que, chez Euglena gracilis, souche Z, la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique est synthétisée, comme pratiquement toutes les autres enzymes du cycle de Calvin (Feierabend, 1979), au niveau des ribosomes cytoplasmiques et doit ensuite être importée dans les chloroplastes (Affolter et al., 1978). Cette conclusion a été confirmée dans notre laboratoire (Spielmann, 1980) en incluant un contrôle sur l'action des antibiotiques par la vérification du site de biosynthèse de deux autres enzymes du cycle de Calvin, la RuBP carboxylase (site chloroplastique pour sa grande sous-unité) et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase à NADP (site cytoplasmique). Feierabend et Schrader-Reichhardt (1976) ont également trouvé une origine cytoplasmique pour la FBPase chloroplastique en cultivant du Seigle à 32°C, cette température pro-

voquant une déficience dans la formation des ribosomes 70 S (ribosomes des plastes). La synthèse des protéines ne peut donc avoir lieu dans les plastes, tandis qu'elle se déroule normalement au niveau des ribosomes 80 S du cytoplasme. C'est donc un système adéquat pour évaluer la contribution nucléocytoplasmique à la biogenèse des chloroplastes, et en particulier à la biosynthèse des protéines chloroplastiques (Feierabend, 1978).

CONCLUSION FINALE

La fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euglena gracilis est purifiée par les étapes suivantes : extrait brut (obtenu par sonication), précipitations à l'acide et au sulfate d'ammonium (30-50 % de saturation), chromatographies sur DEAE-cellulose et hydroxyapatite, chromatofocusing et filtration sur gel de Sephacryl. Elle est ainsi obtenue à l'état pur. Les conditions optimales du test enzymatique sont établies : pH 8.4, 0.1 mM EDTA, 20 mM Mg²⁺, 1 mM FBP. Si nous calculons un rapport de concentration entre le magnésium et le substrat, nous obtenons une valeur de 20. Il est à remarquer que App et Jagendorf (1964) avaient déjà mis en évidence ce rapport de concentration et qu'ils avaient obtenu la même valeur. Ce rapport magnésium-substrat porte à penser qu'il existe un lien particulier entre le magnésium et le fructose 1,6-bisphosphate, le magnésium ayant un effet favorable sur l'activité de l'enzyme, comme s'il améliorait l'interaction enzyme-substrat ! La courbe sigmoïde de l'activité de la FBPase, dépendant du temps, est un indice pour dire qu'il s'agit d'une enzyme de régulation. Car, en effet, s'il s'agissait d'une enzyme qui travaillait sur un substrat sans mécanisme de régulation, la réponse de l'activité enzymatique en fonction du temps serait tout de suite linéaire (interaction immédiate enzyme-substrat). D'autre part, la FBPase est relativement thermostable, puisqu'elle est encore active à 50°C. Le poids moléculaire de l'enzyme se situe autour de 200'000, tandis que la sous-unité présente un PM d'environ 50'000. La FBPase est donc formée de quatre sous-unités identiques, comme d'ailleurs la FBPase chloroplastique de l'Epinard (Baier et Latzko, 1975; Zimmermann et al., 1976; Soulié, 1981). Le point isoélectrique de la FBPase d'Euglène est de 4.9-5.0, comparable à celui de l'enzyme d'Epinard. Après avoir comparé les poids moléculaires et les points isoélectriques de ces deux enzymes, il serait intéressant de connaître leur teneur en acides aminés, pour savoir s'il existe des différences appréciables, significatives entre les deux enzymes en comparant

le nombre de chacun des résidus, en particulier le résidu demi-cystine, qui peut donner une information sur le nombre de ponts disulfures de chaque enzyme. Ces expériences sont précisément actuellement en cours.

La FBPase chloroplastique d'Euclena gracilis est activée par la lumière in vivo, l'éclairement pouvant être remplacé par le dithiothreitol. D'autre part, la FBPase est activée in vitro par le DTT et un extrait protéinique, partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium (50-90 % de saturation), filtration sur gel de Sephadex, chromatographies sur hydroxyapatite, DEAE- et CM-cellulose ; il renferme 3 protéines de PM 10'500, 11'000 et 16'000, détectées par électrophorèse sur gel SDS-15 % d'acrylamide. Compte tenu des conditions dans les chloroplastes, on peut en déduire que la FBPase est régulée par le système ferrédoxine-thiorédoxine chez l'Euclène. Ainsi, ce mécanisme de régulation enzymatique, mis en évidence dans les Végétaux supérieurs, existe déjà dans les Algues, Végétaux inférieurs. Il a récemment été détecté dans d'autres Végétaux inférieurs, les Cyanobactéries (Yee et al., 1981). Ce système de régulation semble donc être universellement présent dans les organismes photosynthétiques, donc indépendant par rapport à l'évolution au cours des âges du règne végétal !

La fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique d'Euclena gracilis, comme beaucoup d'autres protéines chloroplastiques, est élaborée dans le cytoplasme puis transportée dans le chloroplaste. Il serait en outre intéressant de connaître le lieu de synthèse des autres constituants du système ferrédoxine-thiorédoxine. Il est connu que la ferrédoxine est également synthétisée au niveau des ribosomes cytoplasmiques (Feierabend, 1979) mais des résultats préliminaires n'excluent pas une synthèse chloroplastique pour la thiorédoxine (Spielmann, 1980). Il semble donc qu'il y ait collaboration entre le système génétique nucléocytoplasmique et son correspondant plastidial en vue de l'édification des composants du système ferrédoxine-thiorédoxine, à l'image du développement du chloroplaste.

BIBLIOGRAPHIE

- Affolter, D., Schürmann, P. et Stutz, E. (1978). Biosynthesis of Euglena gracilis chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase during greening. Abstracts of the Inaugural Meeting, Federation of European Societies of Plant Physiology, Edimbourg, pp. 45-46
- Affolter, D., Schürmann, P., Ortiz, W. et Stutz, E. (1980). Light activation and purification of Euglena gracilis chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. Abstracts of the Fifth International Congress on Photosynthesis, Halkidiki, Grèce, p. 2
- Affolter, D., Schürmann, P., Ortiz, W. et Stutz, E. (1981). Light activation and some properties of Euglena gracilis chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. Proceedings of the Fifth International Congress on Photosynthesis, Halkidiki, Grèce (Akoyunoglou, G., éditeur), 1980, Vol. IV, pp. 311-316, Balaban, Philadelphie
- Anderson, L.E. et Avron, M. (1976). Light modulation of enzyme activity in chloroplasts. Generation of membrane-bound vicinal-dithiol groups by photosynthetic electron transport. *Plant Physiol.* 57, 209-213
- Anderson, L.E., Mohamed, A.H., Ashton, A.R., Scheibe, R., Brennan, T. et Ben-Bassat, D. (1981). Light modulation : the light effect mediator (LEM) system. Proceedings of the Fifth International Congress on Photosynthesis, Halkidiki, Grèce (Akoyunoglou, G., éditeur), 1980, Vol. IV, pp. 293-302, Balaban, Philadelphie
- Anderson, L.E., Nehrlich, S.C. et Champigny, M.-L. (1978). Light modulation of enzyme activity. Activation of the light effect mediators by reduction and modulation of enzyme activity by thiol-disulfide exchange ? *Plant Physiol.* 61, 601-605

- Andrews, P. (1964). Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91, 222-233
- Andrews, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595-606
- App, A.A. et Jagendorf, A.T. (1963). Repression of chloroplast development in Euglena gracilis by substrates. *J. Protozool.* 10, 340-343
- App, A.A. et Jagendorf, A.T. (1964). Purification of alkaline fructose diphosphatase from Euglena gracilis. *Biochim. Biophys. Acta* 85, 427-434
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol.* 24, 1-15
- Baier, D. et Latzko, E. (1975). Properties and regulation of C-1-fructose-1,6-diphosphatase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396, 141-148
- Bradbeer, J.W. (1981). Development of photosynthetic function during chloroplast biogenesis. *The Biochemistry of Plants*, Vol. 8 Photosynthesis (Hatch, M.D. et Boardman, N.K., éditeurs), pp. 423-472, Academic Press, New York
- Bradbeer, J.W., Gyldenholm, A.O., Wallis, M.E. et Whatley, F.R. (1969). Studies on the biochemistry of chloroplast development. *Progress in Photosynthesis Research*, 1st (Metzner, H., éditeur), 1968, Vol. I, pp. 272-279
- Breazeale, V.D., Buchanan, B.B. et Wolosiuk, R.A. (1978). Chloroplast sedoheptulose 1,7-bisphosphatase : Evidence for regulation by the ferredoxin/thioredoxin system. *Z. Naturforsch.* 33c, 521-528

- Buchanan, B.B., Kalberer, P.P. et Arnon, D.I. (1967). Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 74-79
- Buchanan, B.B., Schürmann, P. et Kalberer, P.P. (1971). Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component, and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J. Biol. Chem.* 246, 5952-5959
- Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. et Schürmann, P. (1979). Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends in Biochem. Sci.* 4, 93-96
- Carell, E.F. (1969). Studies on chloroplast development and replication in Euglena. I. Vitamin B 12 and chloroplast replication. *J. Cell. Biol.* 41, 431-440
- Champigny, M.-L. (1976). La régulation du cycle de Calvin. *Physiol. Vég.* 14, 607-628
- Cramer, M. et Myers, J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of Euglena gracilis. *Arch. Mikrobiol.* 17, 384-402
- Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- Ellis, R.J. (1981). Chloroplast proteins : synthesis, transport, and assembly. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 111-137
- Engström, N.-E., Holmgren, A., Larsson, A. et Söderhäll, S. (1974). Isolation and characterization of calf liver thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 249, 205-210

- Feierabend, J. (1978). Cooperation of cytoplasmic and plastidic protein synthesis in rye leaves. Chloroplast Development (Akoyunoglou, G. et al., éditeurs), pp. 207-213, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Feierabend, J. (1979). Role of cytoplasmic protein synthesis and its coordination with the plastidic protein synthesis in the biogenesis of chloroplasts. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 92, 553-574
- Feierabend, J. et Schrader-Reichhardt, U. (1976). Biochemical differentiation of plastids and other organelles in rye leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes. Planta 129, 133-145
- Fiske, C.H. et Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400
- Graham, D., Grieve, A.M. et Smillie, R.M. (1968). Phytochrome as the primary photoregulator of the synthesis of Calvin cycle enzymes in etiolated pea seedlings. Nature 218, 89-90
- Greenblatt, C.L. et Schiff, J.A. (1959). A pheophytin-like pigment in dark adapted Euglena gracilis. J. Protozool. 6, 23-28
- Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from Escherichia coli B. Eur. J. Biochem. 6, 475-484
- Holmgren, A., Söderberg, B.-O., Eklund, H. et Brändén, C.-I. (1975). Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S₂ to 2.8 Å resolution. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2305-2309
- Kelly, G.J., Zimmermann, G. et Latzko, E. (1976). Light induced activation of fructose-1,6-bisphosphatase in isolated intact chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 193-199

- Kirk, J.T.O. (1964). The effect of trypsin on the pellicle of Euglena gracilis. J. Protozool. 11, 435-437
- Laemmlí, U.K. et Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T 4 I. DNA packaging events. J. Mol. Biol. 80, 575-599
- Laing, W.A., Stitt, M. et Heldt, H.W. (1981). Control of CO₂ fixation. Changes in the activity of ribulosephosphate kinase and fructose- and sedoheptulose-bisphosphatase in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 637, 348-359
- Lara, C., de la Torre, A. et Buchanan, B.B. (1980a). A new protein factor functional in the ferredoxin-independent light activation of chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 544-551
- Lara, C., de la Torre, A. et Buchanan, B.B. (1980b). Ferral-
terin : an iron-sulfur protein functional in enzyme regulation
in photosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1337-1344
- Latzko, E., Zimmermann, G. et Feller, U. (1974). Evidence for a
hexosediphosphatase from the cytoplasm of spinach leaves. Hoppe-
Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 321-326
- Laurent, T.C., Moore, E.C. et Reichard, P. (1964). Enzymatic
synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and character-
ization of thioredoxin, the hydrogen donor from Escherichia
coli B. J. Biol. Chem. 239, 3436-3443
- Leegood, R.C. et Walker, D.A. (1980). Modulation of fructose
bisphosphatase activity in intact chloroplasts. FEBS Lett. 116,
21-24
- LKB. Instruction LKB Ampholine PAGplates for analytical elec-
trofocusing on polyacrylamide gels

- 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
- Maugh II, T.H. (1981). A new light on photosynthesis. A pioneer in photosynthesis research proposes a new mechanism of photo-phosphorylation. His peers greet it with skepticism. Science 213, 994-996
- Maurer, H.R. (1971). Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, pp. 44-45, Walter de Gruyter, Berlin et New York
- Mills, J.D., Mitchell, P. et Schürmann, P. (1980). Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. FEBS Lett. 112, 173-177
- Munavalli, S., Parker, D.V. et Hamilton, F.D. (1975). Identification of NADPH-thioredoxin reductase system in Euglena gracilis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4233-4237
- Nishizawa, A.N., Wolosluk, R.A. et Buchanan, B.B. (1979). Chloroplast phenylalanine ammonia lyase from spinach leaves : Evidence for light mediated regulation via the ferredoxin/thioredoxin system. Planta 145, 7-12
- Ortiz, W., Reardon, E.M. et Price, C.A. (1980). Preparation of chloroplasts from Euglena highly active in protein synthesis. Plant Physiol. 66, 291-294
- Pedersen, T.A., Kirk, M. et Bassham, J.A. (1966). Light-dark transients in levels of intermediate compounds during photosynthesis in air-adapted Chlorella. Physiol. Plant. 19, 219-231
- Pharmacia Fine Chemicals (1980a). Chromatofocusing with Polybuffer and PBE

- Pharmacia Fine Chemicals (1980b). Polyacrylamide gel electrophoresis, laboratory techniques

- Porqué, P.G., Baldesten, A. et Reichard, P. (1970). Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* 245, 2363-2370

- Portis, A.R. et Heldt, H.W. (1976). Light-dependent changes of the Mg^{2+} concentration in the stroma in relation to the Mg^{2+} dependency of CO_2 fixation in intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 449, 434-446

- Preiss, J. et Greenberg, E. (1971). Spinach leaf D-fructose 1,6-diphosphate 1-phosphohydrolase (FDPase) EC 3.1.3.11. *Methods in Enzymology* (San Pietro, A., éditeur), Vol. 23, pp. 691-696, Academic Press, New York

- Racker, E. et Schroeder, E.A.R. (1958). The reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 phosphatases for fructose 1,6-diphosphate and sedoheptulose 1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 326-344

- Reutimann, H., Straub, B., Luisi, P.L. et Holmgren, A. (1981). A conformational study of thioredoxin and its tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 256, 6796-6803

- Schürmann, P. (1981). The ferredoxin/thioredoxin system of spinach chloroplasts. Purification and characterization of its components. *Proceedings of the Fifth International Congress on Photosynthesis, Halkidiki, Grèce* (Akoyunoglou, G., éditeur), 1980, Vol. IV, pp. 273-280, Balaban, Philadelphie

- Schürmann, P. et Buchanan, B.B. (1975). Role of ferredoxin in the activation of sedoheptulose diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 189-192

- Schürmann, P. et Jacquot, J.-P. (1979). Improved in vitro light activation and assay systems for two spinach chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 569, 309-312
- Schürmann, P., Maeda, K. et Tsugita, A. (1981). Isomers in thio-redoxins of spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 116, 37-45
- Schürmann, P. et Wolosiuk, R.A. (1978). Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 522, 130-138
- Schürmann, P., Wolosiuk, R.A., Breazeale, V.D. et Buchanan, B.B. (1976). Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO₂ assimilation in chloroplasts. *Nature* 263, 257-258
- Shigeoka, S., Yokota, A., Nakano, Y. et Kitaoka, S. (1980). Isolation of physiologically intact chloroplasts from Euglena gracilis Z. *Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B* 32, 37-51
- Smillie, R.M. (1963). Formation and function of soluble proteins in chloroplasts. *Can. J. Bot.* 41, 123-154
- Smillie, R.M., Graham, D., Dwyer, M.R., Grieve, A. et Tobin, N.F. (1967). Evidence for the synthesis in vivo of proteins of the Calvin cycle and of the photosynthetic electron-transfer pathway on chloroplast ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 604-610
- Soulié, J.-M. (1981). La régulation du cycle de Calvin par la lumière au niveau de la fructose 1,6-diphosphatase d'Epinaud. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique, Paris-Grignon
- Soulié, J.-M., Buc, J., Meunier, J.-C., Pradel, J. et Ricard, J. (1981). Molecular properties of chloroplastic thioredoxin f and the photoregulation of the activity of fructose 1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 119, 497-502

- Spielmann, A. (1980). Mise en évidence, isolation, régulation et biogenèse de thiorédoxines spécifiques à l'activation d'enzymes chloroplastiques dépendante de la lumière chez les Euglènes. Travail de licence, Université de Neuchâtel
- Tokunaga, M., Nakano, Y. et Kitaoka, S. (1976). Preparation of physiologically intact mitochondria from Euglena gracilis Z. Agric. Biol. Chem. 40, 1439-1440
- Wagner, W. et Follmann, H. (1977). A thioredoxin from green algae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1044-1051
- Weber, K. et Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- Werdan, K., Heldt, H.W. et Milovancev, M. (1975). The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark. Biochim. Biophys. Acta 396, 276-292
- Wolosiuk, R.A. et Buchanan, B.B. (1977). Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. Nature 266, 565-567
- Wolosiuk, R.A. et Buchanan, B.B. (1978a). Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. Arch. Biochem. Biophys. 189, 97-101
- Wolosiuk, R.A. et Buchanan, B.B. (1978b). Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. Plant Physiol. 61, 669-671
- Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B. et Crawford, N.A. (1977). Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-actuated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplasts. FEBS Lett. 81, 253-258

- Yee, B.C., de la Torre, A., Crawford, N.A., Lara, C., Carlson, D.E. et Buchanan, B.B. (1981). The ferredoxin/thioredoxin system of enzyme regulation in a Cyanobacterium. Arch. Microbiol. 130, 14-18
- Zimmermann, G., Kelly, G.J. et Latzko, E. (1976). Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. Eur. J. Biochem. 70, 361-367
- Zimmermann, G., Kelly, G.J. et Latzko, E. (1978). Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. J. Biol. Chem. 253, 5952-5956