

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE
VEGETALE

FACULTE DES SCIENCES
PROFESSEUR
PAUL-ANDRE SIEGENTHALER

1210

**PHOSPHORYLATION DES PROTEINES DE
L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE D'EPINARD ET
ROLE POSSIBLE DES PROTEINES "HEAT-SHOCK"
COMME CATALYSEURS D'ACTIVITES PROTEINE-
KINASIQUES**

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE
NEUCHATEL POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES
OPTION PHYSIOLOGIE VEGETALE ET BIOCHIMIE

PAR LUCIEN BOVET

1993

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Phosphorylation des protéines de l'enveloppe
du chloroplaste d'épinard et rôle possible
des protéines "heat-shock" comme catalyseurs
d'activités protéine-kinasiques

de Monsieur Lucien Bovet

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. les Professeurs P.A. Siegenthaler,

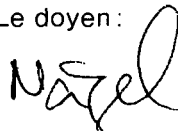
E. Stutz, C. Brunold (Berne) et R. Mache

(Grenoble)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 7 décembre 1993

Le doyen:



H.-H. Nägeli

**PHOSPHORYLATION DES PROTEINES DE
L'ENVELOPPE DU CHLOROPLASTE D'EPINARD ET
ROLE POSSIBLE DES PROTEINES "HEAT-SHOCK"
COMME CATALYSEURS D'ACTIVITES PROTEINE-
KINASIQUES**

*[...] ce n'est point dans
l'objet que réside le sens des
choses, mais dans la démarche.*

Saint-Exupéry, Citadelle

A Véronique

*Version corrigée après la soutenance de thèse à huis-clos qui a eu lieu le 14.7.93,
tenant compte des remarques proposées par le jury de thèse.*

TABLE DES MATIERES

Remerciements	9
Résumé	11
CHAPITRE 1	
Introduction générale	
1.1.	Les plastes 15
1.2.	Structure du chloroplaste 16
1.3.	Physiologie du chloroplaste 17
1.3.1.	Rôle du stroma 17
1.3.2.	Rôle des membranes thylacoïdales 18
1.3.3.	Rôle de l'enveloppe du chloroplaste 18
1.3.3.1.	Présence de translocateurs dans l'enveloppe 19
1.3.3.2.	Composition biochimique et rôle biosynthétique des membranes d'enveloppes 20
1.3.3.3.	Rôle de l'enveloppe comme régulateur de l'import des protéines dans le chloroplaste 22
1.4.	Phosphorylation et activités protéine-kinasiques dans les cellules animales et végétales 23
1.5.	Bibliographie 25
CHAPITRE 2	
Matériels et méthodes	
2.1.	Matériels 29
2.2.	Méthodes 29
2.2.1.	Préparation de membranes d'enveloppes et de stroma 29
2.2.2.	Préparation de fractions enrichies en membranes internes et externes d'enveloppes 30
2.2.3.	Préparation de chloroplastes intacts et de membranes thylacoïdales possédant un degré élevé de pureté 30
2.2.3.1.	Préparation des chloroplastes intacts 30
2.2.3.2.	Préparation des membranes thylacoïdales 31
2.2.4.	Dosage des chlorophylles 31
2.2.5.	Analyse des enveloppes par spectrophotométrie 31
2.2.6.	Analyse des lipides d'enveloppes 32
2.2.7.	Dosage des protéines 32
2.2.7.1.	Dosage des protéines par la méthode de Bradford 32
2.2.7.2.	Dosage des protéines par la méthode de Lowry 32
2.2.8.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 33

2.2.8.1.	Electrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE)	33
2.2.8.2.	Détermination des poids moléculaires (SDS-PAGE)	33
2.2.8.3.	Electrophorèse en conditions non-dénaturantes	33
2.2.8.4.	Détermination des poids moléculaires (gels natifs 4-30%)	34
2.2.9.	Focalisation isoélectrique (IEF)	34
2.2.10.	Gel en 2 dimensions: IEF X SDS-PAGE	34
2.2.11.	Analyse par Westernblot ou immunoblot	34
2.2.11.1.	Transfert des protéines sur papier de nitrocellulose	34
2.2.11.2.	Réactions immunologiques	34
2.2.12.	Préparation de sérums polyclonaux dirigés contre des protéines séparées par SDS-PAGE	35
2.2.13.	Purification des immunoglobulines G par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-protéine A	35
2.2.14.	Isolation d'une fraction protéique du stroma d'Epinard par affinité sur des billes d'agarose-ATP	36
2.2.15.	Traitement de membranes d'enveloppes à l'aide de détergents	36
2.2.15.1.	Solubilisation de membranes d'enveloppes à l'octylglucoside	36
2.2.15.2.	Séparation de phases au Triton X-114 (TX-114)	37
2.2.15.3.	Préparation d'une fraction "soluble" d'enveloppes après un traitement au Triton X-114	37
2.2.16.	Conditions pour la phosphorylation des protéines	37
2.2.16.1.	Phosphorylation <i>in vitro</i> des protéines	37
2.2.16.2.	Phosphorylation <i>in organello</i> de chloroplastes intacts	38
2.2.17.	Protéolyse partielle	38
2.2.18.	Hydrolyse des protéines en présence de CNBr	38
2.2.19.	Immunoprécipitation des protéines d'enveloppes en présence d'IgG spécifiques	39
2.2.20.	Détermination des acides aminés phosphorylés	39
2.2.20.1.	Elution des protéines séparées par SDS-PAGE	39
2.2.20.2.	Hydrolyse acide des phosphopolypeptides	40
2.2.21.	Détection d'activités protéine-kinasiques dans un gel de polyacrylamide	40
2.3.	Bibliographie	41

CHAPITRE 3

Etude sur la phosphorylation *in vitro* des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard

3.1.	Introduction	43
3.2.	But du chapitre	45
3.3.	Résultats	45
3.4.	Discussion	69
3.5.	Bibliographie	77

CHAPITRE 4

Etude sur la phosphoprotéine de 67 kDa du chloroplaste d'Épinard

4.1.	Introduction	81
4.2.	But du chapitre	82
4.3.	Résultats	83
4.4.	Discussion	93
4.5.	Bibliographie	95

CHAPITRE 5

Les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa des membranes internes de l'enveloppe sont-elles des pools distincts du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO?

5.1.	Introduction	97
5.2.	But du chapitre	97
5.3.	Résultats	98
5.4.	Discussion	116
5.5.	Bibliographie	122

CHAPITRE 6

Etude sur la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard

6.1.	Introduction	125
6.2.	But du chapitre	126
6.3.	Résultats	126
6.4.	Discussion	138
6.5.	Bibliographie	143

CHAPITRE 7

Identification de protéine-kinases virtuelles dans l'enveloppe et le stroma du chloroplaste d'Epinard

7.1.	Introduction	145
7.2.	But du chapitre	146
7.3.	Résultats	147
7.4.	Discussion	162
7.5.	Bibliographie	167

CHAPITRE 8

Rôle possible des protéines "heat-shock" comme catalyseurs d'activités protéine-kinasiques

8.1.	Introduction	171
8.2.	But du chapitre	172
8.3.	Résultats	172
8.3.1.	Caractérisation immunologique des protéines du stroma purifiées par affinité sur des billes d'agarose-ATP	172
8.3.2.	Détermination du rôle joué par les protéines du stroma, purifiées par affinité sur des billes d'agarose-ATP, sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes	179
8.3.3.	Phosphorylation des protéines d'enveloppes et des protéines "heat-shock" en présence de PKC du cerveau de rat	188
8.4.	Discussion	192
8.4.1.	La protéine de 75 kDa	193
8.4.2.	Les polypeptides de 60 kDa	194
8.4.3.	Le polypeptide de 18 kDa	196
8.4.4.	Commentaires additionnels	198
8.5.	Bibliographie	200

CHAPITRE 9

Projets futurs

9.1.	Quelques réflexions préliminaires	205
9.2.	Projets futurs	206
	Abréviations	209

REMERCIEMENTS

Arrivé au terme de cette étude, je tiens en tout premier lieu à remercier très sincèrement le Professeur Paul-André Siegenthaler, directeur du laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, qui m'a parfaitement suivi et dirigé tout au long du présent travail tout en ayant su me laisser explorer dans un climat de confiance mutuelle les champs d'investigations qui me tenaient à coeur. Il m'a proposé un sujet de thèse passionnant et donné la possibilité de m'intégrer à son laboratoire, au sein duquel règne d'ailleurs une atmosphère pleine d'application et de bonne humeur. Tout au long de ce chemin passé ensemble, j'ai eu le privilège de partager avec lui d'intenses moments de discussion à la suite desquels j'ai appris à rédiger un texte scientifique et gérer une recherche.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également au Professeur Erhard Stutz qui a effectué pour moi toutes les analyses de séquence présentées dans ce mémoire de thèse. J'ai toujours vu en lui un homme ouvert à la discussion et doté d'une franchise scientifique qui l'honore.

Je remercie Messieurs les Professeurs Régis Mache du Laboratoire de Biologie Moléculaire Végétale de Grenoble (France), Christian Brunold du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Berne et Erhard Stutz du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Neuchâtel d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire partie du jury de thèse.

Ma gratitude va également à Messieurs les Docteurs Peter Schürmann du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Neuchâtel -pour m'avoir aidé à séparer les protéines "heat-shock" du chloroplaste par FPLC et toujours répondu à mes questions les plus saugrenues -et André Rawyler du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel -qui m'a fait part, sans jamais compter, de ses riches connaissances scientifiques.

Un grand merci à Bénédicte l'Eplattenier et Laurence Ruffieux pour leur présence, les discussions partagées ensemble et l'intérêt qu'elles ont porté à leurs travaux de licence respectifs (*encore un merci à Bénédicte qui m'a bien aidé pour tirer les photos...*). Merci aussi à Marc-Olivier Müller et Jean-Claude Ruedin, dont les travaux de licence en cours, permettront, j'en suis sûr, de faire avancer cette recherche.

Je remercie également les apprenties et apprentis laborants qui, par leur assistance technique, ont largement contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail: Myriam Küffner, Cécile Pascalis-Seuret, Delphine Herrmann, Michelle Noirjean, Daniel Leeman et Xavier Denys.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui m'ont fourni des anticorps: soit les Professeurs R.J. Ellis (Warwick, Grande-Bretagne) et P.J. Parker (London, Grande-Bretagne) ainsi que les Docteurs E. Piatti (Urbino, Italie), P. Schürmann (Neuchâtel), C. Lehel (Szeged, Hongrie), M. Spangfort (Lund, Suède) et C.H. Hagedorn (Nashville, USA).

Ma gratitude va évidemment à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont toujours soutenu par leur gentillesse, leur bonne humeur et leur sourire. *Un merci particulier à Véronique Douet et Jana Smutny d'avoir réalisé certains graphes.*

Je remercie toute ma famille qui m'a toujours encouragé pour réaliser cette entreprise et en particulier ma femme Véronique d'avoir su partager mes états d'âme durant toute la durée de cette thèse. Je la remercie également d'avoir, avec mon père et ma belle-mère, accepté de corriger mon orthographe qui laisse parfois à désirer, mais s'améliore au fil du temps.

Merci à mon ami Christophe Peer pour son soutien informatique.

Enfin, je ne saurais oublier tous mes amis et "les autres" qui m'ont donné l'énergie nécessaire pour réaliser ce mémoire (parfois même, sans qu'ils le sachent vraiment!): Le bébé à naître, Maurice, Polar, Mickey, Daniela, Grégoire, D-Vox and Colors, The Bovet Brothers Quintet, le Saxtet chinois, Pidji, Sonor, The Yellow Jackets, Jack de Johnette (*pardon à ceux que j'aurais oublié de mentionner sur cette liste non-exhaustive*).

Je remercie enfin l'Office des bourses du Département de l'Instruction Publique et des Affaires Culturelles du Canton de Neuchâtel, ainsi que le Centre de formation du brevet secondaire de l'Université de Berne, d'avoir soutenu financièrement une partie des frais d'impression.

RESUME

Etude sur la phosphorylation *in vitro* des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard (CHAPITRE 3)

Plusieurs protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard incorporent *in vitro* du ^{32}P , à partir de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP. Les trois protéines majeures ont des poids moléculaires de 67, 26 et 14 kDa, alors que les autres, moins fortement marquées radioactivement, possèdent des Mr de 56, 51, 47, 35, 33, 32, 23 et 18 kDa. Les résultats obtenus par l'effet du pH, de l'EDTA (chélateur du Mg^{2+}), de l'EGTA (chélateur du Ca^{2+}), de l'ATP, de l'inhibiteur H7 et d'un "pulse-chase" en présence d'ATP non-radioactif montrent, sans équivoque, que les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa ont un comportement identique vis-à-vis de ces différents paramètres biochimiques. En outre, la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa est catalysée par une protéine-kinase dépendante du calcium qui est inhibée par l'hydrolyse de certains phospholipides de l'enveloppe. En conclusion, nous montrons que deux activités protéine-kinasiques distinctes, l'une impliquant les substrats protéiques endogènes de 67, 35, 32 et 23 kDa et l'autre ceux de 51, 26 et 14 kDa, sont présentes dans l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard.

Etude sur la phosphoprotéine de 67 kDa du chloroplaste d'Epinard (CHAPITRE 4)

Les résultats consignés dans ce chapitre révèlent que la phosphoprotéine de 67 kDa possède un caractère très hydrophile qui la confine dans l'espace intermembranaire (lumen) de l'enveloppe. Cette protéine est phosphorylée uniquement sur des résidus sérines et exhibe un Mr natif de 67 kDa. Ses propriétés biochimiques et sa reconnaissance (bien que faible) par un anticorps dirigé contre une phosphoglucomutase de l'érythrocyte humain, associées à des concordances bibliographiques, témoignent que cette protéine de 67 kDa exerce une activité phosphoglucomutase dans le lumen de l'enveloppe.

Les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa des membranes internes de l'enveloppe sont-elles des pools distincts du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO? (CHAPITRE 5)

L'hydrolyse des phosphoprotéines de 26 et 14 kDa de l'enveloppe révèle que l'incorporation des groupements phosphates s'opère exclusivement sur leurs résidus sérines. Des analyses par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) montrent que les phosphopolypeptides de 26 et 14 kDa co-migrent, respectivement, avec la forme de bas Mr du LHCII et la petite sous-unité de la RubisCO. L'immunoprécipitation de la phosphoprotéine de 14 kDa par un anticorps dirigé contre la RubisCO prouve bien qu'un pool de petites sous-unités de la carboxylase est phosphorylé dans l'enveloppe. Par contre, la même expérience visant à immunoprécipiter la protéine de 26 kDa avec un anticorps dirigé contre le LHCII n'a pas abouti, laissant encore planer un léger doute sur l'identité exacte et l'origine génomique de la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe.

Etude sur la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard (CHAPITRE 6)

Les résultats décrits dans ce chapitre révèlent que l'incubation *in organello* et *in vitro* de protéines d'enveloppes en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP engendre l'incorporation de ^{32}P dans une protéine de 51 kDa. Un anticorps dirigé contre cette phosphoprotéine montre qu'elle est localisée dans la membrane interne de l'enveloppe et qu'elle exhibe un point isoélectrique acide d'environ 5,8. Cet anticorps reconnaît également une phosphoprotéine de 47 kDa de pI presque équivalent. La dégradation protéolytique des phosphoprotéines de 51 et 47 kDa démontre leur même origine et parenté génomiques. Bien que la fonction de ces deux protéines n'ait pas encore été clairement établie, toutes deux semblent impliquées dans l'import de protéines d'origine nucléaire dans le chloroplaste.

Identification de protéine-kinases virtuelles dans l'enveloppe et le stroma du chloroplaste d'Epinard (CHAPITRE 7)

La mise en évidence de protéines d'enveloppes (130, 72 et 51 kDa) et du stroma (60 et 19 kDa) par des anticorps α -PKC, ainsi que les résultats présentés dans le chapitre 1, démontrent l'existence probable de protéine-kinases chloroplastiques dont les propriétés sont proches des PKC animales. Une des protéines détectée immunologiquement (60 kDa) est apparentée à la famille des chaperonines plastidiales et phosphoryle *in vitro*, sous forme native, la fraction III-S de l'Histone.

Rôle possible des protéines "heat-shock" comme catalyseurs d'activités protéine-kinasiques (CHAPITRE 8)

L'incubation de protéines du stroma avec des billes d'agarose-ATP permet d'isoler par chromatographie d'affinité plusieurs protéines de la famille des HSP70 et des chaperonines chloroplastiques, ainsi qu'une protéine de 18 kDa. En présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, la protéine "heat-shock" de 75 kDa (HSP70) et celle de 18 kDa s'autophosphorylent activement *in vitro*. Ces protéines du stroma, isolées par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-ATP, catalysent l'incorporation du phosphate sur les protéines de 26 et 14 kDa de l'enveloppe. Ce résultat souligne la complicité probable des protéines "heat-shock" dans les processus de régulation *in vivo* impliquant certaines protéine-kinases de l'enveloppe. Par contre, les chaperonines isolées par chromatographie sur gel n'ont plus d'effet sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes et de l'Histone, indiquant que c'est bien sous forme oligomérique que ces protéines fonctionnent comme catalyseurs d'activités protéine-kinasiques.

1210

CHAPITRE 1

Introduction générale

1.1. Les plastes

Les cellules végétales et animales sont fondamentalement très similaires. Bien qu'elles possèdent toutes deux des compartiments cellulaires communs comme: le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, une membrane cytoplasmique ou encore des ribosomes, une classe particulière d'organites, appelées plastes, partage cependant l'environnement intracellulaire des cellules végétales. Ces plastes existent sous formes non différenciées dans les cellules méristématiques; on les appelle alors des proplastés, vu leurs potentialités de transformation et leurs diamètres réduits (environ 0,5 à 1 μm). De génération en génération, ces organites primaires vont donner des plastés matures (étioplastés, chloroplastés, chromoplastés et amyloplastés) capables d'assurer le maintien d'activités métaboliques diverses.

Chez les plantes supérieures, les chloroplastés sont le siège de la photosynthèse. Ces organites, de tailles plus importantes (5-10 μm) que les proplastés dont ils dérivent, sont localisés dans le cytosol des cellules foliaires ou "vertes". Les chloroplastés sont fondamentaux pour assurer le métabolisme cellulaire et permettre le bon développement de la plante entière. Ils coordonnent la réduction du dioxyde de carbone pour permettre son assimilation en hydrates de carbone, acides aminés, acides gras ou autres terpénoïdes. Ils sont également le siège de la réduction des nitrites et des sulfates et rendent possible leur incorporation dans les acides aminés. Les étioplastés sont uniquement présents dans les feuilles des plantes supérieures croissant en pleine obscurité. Ils ont la capacité de se transformer en chloroplastés après illumination. Les plastés riches en caroténoïdes, de structure homologue aux chloroplastés, sont appelés chromoplastés, car c'est eux qui sont responsables de la couleur jaune, orange voire rouge adoptée par la plupart des fruits et des pétales. Les amyloplastés, enfin, sont des plastés matures, dont une grande partie du volume interne est remplie d'amidon. Ces organites se rencontrent essentiellement dans les racines, ainsi que dans les tissus de stockage comme les cotylédons, l'endosperme et les tubercules (Kirk et Tilney-Bassey, 1978).

1.2. Structure du chloroplaste

Les chloroplastes, à l'instar des mitochondries, dérivent assurément d'ancêtres procaryotiques (théorie endosymbiotique). Les mitochondries présentent des similitudes avec certains types de bactéries pourpres (Gabellini, 1988), alors que les chloroplastes ressemblent aux prochlorons (Gray et Doolittle, 1982). Ces deux types d'organites disposent de structures complexes, puisque les mitochondries ont quatre différents compartiments (*i.e.* la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice), alors que les chloroplastes en possèdent six (*i.e.* la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne, le stroma, les membranes thylacoïdales et le lumen thylacoïdal; Fig.1.1).

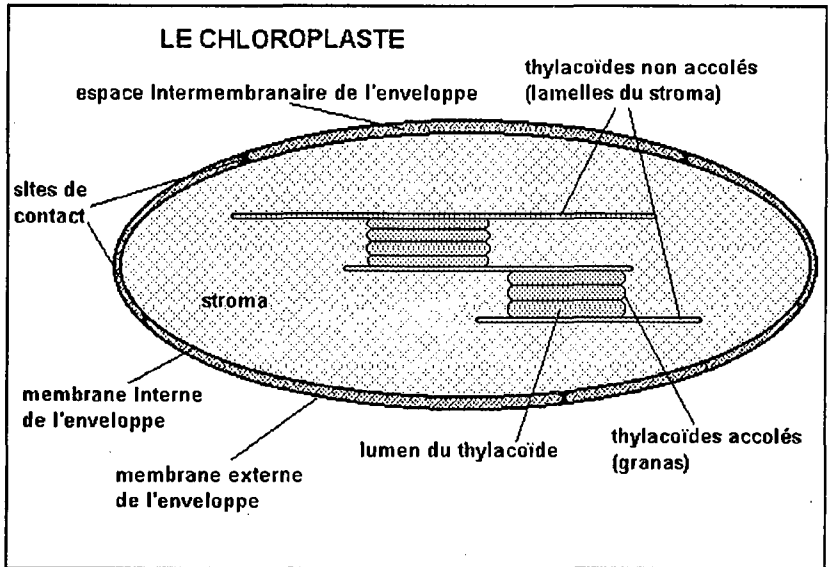


Fig.1.1. Représentation schématique de la structure du chloroplaste

Les chloroplastes sont entourés par une double membrane appelée enveloppe. Les membranes interne et externe de cette enveloppe sont séparées entre elles par un espace intermembranaire et fusionnent à certains points spécifiques nommés sites de contacts (Cremers et al., 1988; Cline et al., 1985). Elles délimitent le stroma et les thylacoïdes du reste de la cellule, en donnant au chloroplaste sa propre intégrité

structurale et fonctionnelle. Les membranes thylacoïdales sont arrangées en régions accolées (grana) et non-accolées (lamelles du stroma) (Staehlin, 1986; Fig.1.1).

1.3. Physiologie du chloroplaste

Plus de 250 spots sont mis en évidence après des analyses bidimensionnelles de protéines chloroplastiques sur gel d'électrophorèse. Environ 30 à 40% de ces protéines sont codées par le génome chloroplastique et synthétisées dans le stroma, alors que plus de 140 autres sont importées dans le chloroplaste à partir du cytoplasme (Dietz et Bogorad, 1987). Ces protéines nucléocytoplasmiques sont synthétisées sous la forme de précurseurs, de tailles généralement plus grandes que les formes matures localisées à l'intérieur du chloroplaste. Les acides aminés supplémentaires, qui constituent les peptides de transit, sont présents aux extensions amino-terminales et sont suffisants pour reconnaître le chloroplaste (Archer et Keegstra, 1990; van't Hof et al., 1993). Le passage à travers l'enveloppe requiert de l'énergie (ATP), alors que l'oligomérisation des protéines dans l'organite nécessite la présence de facteurs solubles internes (Flügge, 1990; Ellis et van der Vies, 1991).

A ce jour, les séquences nucléotidiques complètes codant pour quatre différents génomes chloroplastiques, *Marchantia Polymorpha* (Ohyama et al., 1986), le tabac (Shinozaki et al., 1986), le riz (Hiratsuki et al., 1989) et l'Euglène (Hallick et al., 1993) ont été déterminées. On dénombre environ 150 gènes structurels dans le génome chloroplastique du tabac. Ils codent pour 90 différentes protéines, dont 50 d'entre elles ont pu être assignées à des protéines chloroplastiques connues. Par contre, de plus en plus de gènes nucléaires codant pour des protéines chloroplastiques ont été isolés et séquencés, mais ils ne représentent encore qu'une très petite fraction du nombre de protéines effectivement présentes dans le chloroplaste (Douwe de Boer et Weisbeek, 1991)

1.3.1. Rôle du stroma

Les protéines du stroma (~140 spots après électrophorèse bidimensionnelle; Ellis R.J., 1981) prennent part aux diverses voies métaboliques biosynthétiques du chloroplaste (Danks et al., 1983), ainsi qu'aux mécanismes de réplication, transcription et traduction de l'ADN chloroplastique. Une des fonctions principales assurées par le stroma est la réduction et la fixation du dioxyde de carbone (cycle de Calvin-Benson). L'enzyme qui joue un rôle clé dans ce processus est la ribulose bisphosphate

carboxylase oxygénase (RubisCO). Ce complexe protéique, qui est considéré comme le plus abondant dans la biosphère, consiste, chez les plantes supérieures, en deux sous-unités respectives de 54 kDa (grande sous-unité; LS) et de 14 kDa (petite sous-unité; SS). La grande sous-unité de la RubisCO, portant le site catalytique, est synthétisée dans le chloroplaste, alors que la petite sous-unité est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur (Roy et al., 1988).

1.3.2. Rôle des membranes thylacoïdales

Assurant le transfert d'électrons (provenant de la photolyse de l'eau) et la photophosphorylation par le biais de la photosynthèse, les membranes thylacoïdales ont été déjà amplement étudiées (Hiller and Goodchild, 1981; Staehelin, 1986). En résumé, on peut dire que les thylacoïdes sont constitués de quatre grands complexes protéiques qui sont distribués entre les régions thylacoïdales granaires et agraires. Le photosystème I (PSI) associé à ses antennes collectrices et le complexe F_0/F_1 -ATP synthétase (site de synthèse de l'ATP couplé au flux d'électrons) sont essentiellement localisés dans les lamelles du stroma, alors que le photosystème II (PSII) et le "light harvesting complex II" (LHCII) sont principalement situés dans les grana.

Le LHCII consiste en un complexe pigments-protéines qui contient environ la moitié de la chlorophylle et un tiers des protéines du thylacoïde. Horton et Black (1981) ont montré qu'une partie de l'énergie d'excitation d'origine lumineuse qui est absorbée par le LHCII n'est en fait pas transférée sur le PSII, mais sur le PSI, par le biais de la phosphorylation du LHCII (Chapitre 1, introduction). La conclusion d'expériences plus approfondies (Allen, 1992) montrent que la phosphorylation du LHCII couple la distribution de l'énergie d'excitation entre PSI et PSII à l'état redox des transporteurs d'électrons qui les connectent. Ce couplage transductionnel, qui permet une régulation en "feed-back" de l'énergie photosynthétique (spillover), est admirablement véhiculé par une modification posttraductionnelle du LHCII (phosphorylation).

1.3.3. Rôle de l'enveloppe du chloroplaste

Comme indiqué ci-dessus (Fig. 1.1), la structure de l'enveloppe de chloroplaste est en soi relativement simple, puisqu'elle consiste en deux membranes (interne et externe) séparées par un espace intermembranaire. Ces membranes représentent environ 1-2% des protéines plastidiales totales (Douce et Joyard, 1979). Les enveloppes totales, ainsi que chacune des deux membranes interne et externe peuvent être

aisément isolées du stroma et des thylacoïdes par des techniques détaillées plus loin (voir "Matériels et méthodes").

La membrane externe est poreuse, puisqu'elle permet le passage de l'eau, de ions et diverses autres molécules du milieu ambiant vers l'espace intermembranaire (Függé et Benz, 1984). Ces pores ont un diamètre de 3 nm et une limite d'exclusion de 9 à 10 kDa. Malheureusement, l'identité des protéines impliquées dans la formation de ces pores reste encore inconnue. A l'inverse, la membrane interne est parfaitement imperméable aux ions et autres petites molécules. La membrane interne contient environ 1 mg de lipides/mg de protéines, alors que la membrane externe en contient 2.5-3. Il en résulte que les membranes d'enveloppes exhibent une densité relativement basse, respectivement 1.08 g/cm³ pour les membranes externes et 1.12-1.13 g/cm³ pour les internes, ce qui permet de les séparer facilement sur gradient de saccharose (Block et al., 1983). Au cours des étapes qui jalonnent le développement du chloroplaste, les deux membranes de l'enveloppe sont toujours séparées par un espace de 2 à 10 nm (Carde et al., 1982). Cet espace intermembranaire n'est pas continu, car les membranes interne et externe sont toujours reliées entre elles par des zones à forte densité formant les sites de contact (Cremers et al., 1988).

A propos des connaissances acquises liées aux propriétés biochimiques de l'enveloppe, deux fonctions majeures ont été attribuées à celle-ci. La première implique des translocateurs spécifiques, localisés dans la membrane interne, qui ont pour mission de contrôler le transport des métabolites entre le cytosol et le stroma. La seconde est en relation avec la biogenèse du chloroplaste, puisque l'enveloppe est impliquée dans la biosynthèse de plusieurs constituants plastidiaux (glycérolipides, pigments ou prénylquinones) et dans le transport des protéines du chloroplaste qui sont codées par le génome nucléaire et synthétisées sur des ribosomes cytosoliques (Joyard et al., 1991).

1.3.3.1. Présence de translocateurs dans l'enveloppe

Chez les plantes en C₃, le translocateur de phosphate est le constituant majeur de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste, puisqu'il représente environ 10-15% des protéines totales de cette membrane. Cette protéine de 30 kDa catalyse l'échange des triose-phosphates issus de la photoréduction du CO₂ (chaînes en trois carbones phosphorylées à l'extrémité terminale) avec du phosphate inorganique. Ce translocateur permet d'exporter le carbone fixé par le biais de l'acide 3-

phosphoglycérique ou du dihydroxyacétone-phosphate vers le cytosol, ou il pourra être intégré à d'autres molécules essentielles (acides aminés, saccharose...). En contre partie, le phosphate inorganique intracellulaire, résultant de l'activité métabolique du cytoplasme, sera acheminé dans l'organite, afin de favoriser la formation de l'ATP par l'ATP-synthétase thylacoïdale (Flügge et Heldt, 1984; Flügge et Heldt, 1991). La séquence entière d'un clone de cADN codant pour la protéine précurseur (44.234 kDa) du translocateur de phosphate de l'Épinard a été identifiée (Flügge et al., 1989), comme celle du Pois (Flügge et Heldt, 1991). La comparaison des séquences nucléotidiques (ou en acides aminés déduites de ces deux gènes) avec la banque de données EMBL révèle que ce translocateur de phosphate représente une classe de protéines distincte de celles des autres identifiées jusqu'à maintenant. D'autres translocateurs impliquant aussi des triose-phosphates ont également été mis en évidence dans les chloroplastes des plantes en C₄ et CAM, ainsi que dans les plastes racinaires (Flügge et Heldt, 1991).

La translocation d'autres composés cellulaires semble également assurée par l'enveloppe, puisqu'un nombre considérable de dicarboxylates, tels que le L-malate, l'oxaloacétate, l' α -cétoglutarate, le L-aspartate et le L-glutamate sont capables de la traverser (Lehner et Heldt, 1978; Flügge et Heldt, 1991; Menzlaff et Flügge, 1993). Un autre translocateur a également été identifié dans les chloroplastes des feuilles de Pois. Il est capable d'échanger l'ATP cytosolique avec de l'ADP, du pyrophosphate inorganique, ou encore du phosphoénolpyruvate (Heber et Heldt, 1981; Woldegiorgis et al., 1983). Robinson et Wiskich (1977) ont démontré que l'activité de ce translocateur est plus élevée dans les feuilles jeunes que dans les feuilles matures, révélant que ce translocateur sert surtout à suppléer le manque en ATP durant la biogenèse des chloroplastes, mais aussi durant les périodes nocturnes traversées par les feuilles matures.

1.3.3.2. Composition biochimique et rôle biosynthétique des membranes d'enveloppes

Comme pour les cyanobactéries, les membranes d'enveloppes du chloroplaste sont caractérisées par un contenu modéré en phospholipides, mais riche en glycolipides (sulfolipides et galactolipides). Dans les membranes externes et internes d'enveloppes, les galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, MGDG et digalactosyldiacylglycérol, DGDG) occupent respectivement 46% et 84% de la teneur totale en lipides (Joyard et al., 1991). Comme dans les thylacoïdes, ils contiennent une quantité élevée d'acide gras polyinsaturés. Chez certaines espèces, jusqu'à 95% des acides gras totaux sont de l'acide linoléique (18:3) (Heinz, 1977). Les phospholipides présents dans l'enveloppe des

chloroplastes sont essentiellement la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol. A l'inverse des mitochondries, on ne trouve pas de phosphatidyléthanolamine dans les membranes chloroplastiques, mais cependant un peu de phosphatidylinositol (presque exclusivement dans la membrane externe, ~4% des lipides totaux). La phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide majeur de l'enveloppe, puisqu'il représente 30-35% des glycérolipides totaux. Selon Dorne et al. (1985), la phosphatidylcholine ne serait concentrée que dans la membrane externe, à cause de son origine extraplastidiale. Le phosphatidylglycérol (PG) est par contre bien présent dans les membranes interne et externe puisqu'il partage environ 10% du contenu des glycérolipides présents dans chacune d'elles (Joyard et al., 1991). Certains pools de phosphatidylglycérol sont uniques, puisqu'ils possèdent un acide gras en C₁₆ *trans*-hexadécénoïque (Haverkate et van Deenen, 1965).

La biosynthèse des glycérolipides nécessite l'assemblage de trois parties: deux acides gras, un glycérol et une tête polaire. Il est maintenant admis que les plastes sont le siège principal de la synthèse des acides gras dans les cellules végétales (Ohlrogge et al., 1979), et sont capables d'acyler le glycérol 3-phosphate (Douce et Guillot-Salomon, 1970). Plusieurs travaux ont montré que les membranes d'enveloppes recèlent une batterie enzymatique imposante qui leur permet de jouer un rôle central dans la biosynthèse de ces lipides membranaires (Joyard et al., 1991).

Bien que totalement dépourvue de pigments chlorophylliens, la membrane externe de l'enveloppe semble toutefois participer activement à la synthèse des précurseurs de la chlorophylle. En effet, Joyard et al. (1990) ont pu mettre en évidence dans les feuillettes externes de la membrane externe du chloroplaste d'Épinard une protochlorophyllide réductase (37 kDa). Cette enzyme est capable de phototransformer la protochlorophyllide en chlorophyllide, en présence de NADPH. La membrane interne de l'enveloppe n'est pas en reste, puisqu'elle participe aussi à la synthèse d'autres molécules biologiques, telles que l' α -tocophérol et la plastoquinone-9 (fonctionnant dans la membrane thylacoïdale respectivement comme extincteur de l'oxygène singulet et transporteur d'électrons; Soll et al., 1985).

La présence de caroténoïdes (néoxanthine, violaxanthine, lutéine, zéaxanthine et β -carotène) dans les enveloppes des chloroplastes des plantes supérieures procure à ces membranes une ravissante teinte jaune-orange, qui contraste bien avec la couleur verte des thylacoïdes. Malgré le rôle clé joué par ces caroténoïdes dans les membranes photosynthétiques (comme extincteur de l'oxygène singulet et pigments accessoires des

antennes collectrices), aucune évidence ne montre en fait que les enveloppes sont le siège de la caroténogénèse. (Joyard et al., 1991). Ce serait apparemment plutôt les thylacoïdes qui assureraient cette fonction (Britton, 1988).

A propos des protéines qui composent les membranes interne et externe de l'enveloppe, des analyses électrophorétiques unidimensionnelles ont révélé que chacune des deux membranes a son propre équipement protéique, lequel diffère sensiblement de celui du stroma et des thylacoïdes (Siegenthaler et Nguyen, 1983; Siegenthaler et Dumont, 1990). Cette observation est confirmée par l'étude des propriétés enzymatiques caractéristiques de chacune des deux membranes. En effet, la membrane interne exhibe, par exemple, des activités ATPasiques dépendantes du Mg^{2+} (Nguyen et al., 1987) et recèle une monogalactosyldiacylglycérosynthase (Block et al., 1983), alors que la membrane externe contient une autre enzyme, également liée à la biosynthèse des glycérolipides, la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (Dorne et al., 1982). Toutefois, la comparaison des polypeptides des membranes internes et externes séparés par SDS-PAGE montre que plusieurs d'entre eux ont la même mobilité électrophorétique. Ainsi, seules des analyses électrophorétiques bidimensionnelles (Werner-Washburne et al., 1993; Dumont, 1991) et des partitions de phase au Triton X-114 (Siegenthaler et Dumont, 1990) ont permis d'affiner la cartographie des polypeptides d'enveloppes et de montrer que certains d'entre eux sont présents à la fois dans les membranes internes et externes. Cette observation n'est en soi pas surprenante puisque les membranes interne et externe sont reliées entre elles, comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, par des régions membranaires communes, les sites de contact (Cremers et al., 1988).

1.3.3.3. Rôle de l'enveloppe comme régulateur de l'import des protéines dans le chloroplaste

Certaines protéines nucléaires sont synthétisées dans le cytosol et importées de manière post-translationnelle dans le chloroplaste. Grâce aux informations contenues dans le peptide de transit, les protéines précurseurs peuvent apparemment reconnaître un récepteur protéique à la surface de la membrane externe (Keegstra, 1989). Curieusement, ces peptides de transit sont tous formés de structures primaires très différentes, mais présentent des homologies de structures secondaires (von Heijne et al., 1989), qui leurs permettent de traverser l'enveloppe. A l'opposé des protéines localisées dans les thylacoïdes, le stroma ou encore la membrane interne de l'enveloppe, les protéines de la membrane externe ne sont pas munies de peptides de transit

(Waegemann et Soll, 1991); dans ce cas, l'information contenue dans la séquence primaire mature de la protéine suffit à elle seule pour lui assurer son ancrage dans la membrane.

A propos du récepteur membranaire, son identité n'a pas encore été formellement établie, bien que Pain et al. (1988) aient identifié à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques, mais visiblement par erreur (Flügge et al., 1991), le translocateur de phosphate comme le récepteur du précurseur de la petite sous-unité de la RubisCO. De sorte qu'aujourd'hui, l'existence même d'un récepteur de nature protéique est remise en question (van't Hof et al., 1991). Plusieurs travaux montrent qu'aucun potentiel électrochimique transmembranaire n'est impliqué dans la translocation des protéines, mais que seul l'ATP intrachloroplastique est primordial pour faire passer les précurseurs à travers la double membrane de l'enveloppe (Flügge, 1990; Theg et al., 1989). Pain et Blobel (1987) proposent qu'une ATPase est impliquée dans ce processus, alors que Hinz et Flügge (1988) postulent que les cycles de phosphorylation/déphosphorylation d'une protéine de 51 kDa contrôleraient ce mécanisme. L'avance à petits pas dans ce domaine de recherche témoigne de la complexité de ce processus biologique.

1.4. Phosphorylation et activités protéine-kinasiques dans les cellules animales et végétales

La régulation de la fonction des protéines a été étudiée essentiellement sur des enzymes constitutives des cellules et tissus animaux. L'isocitrate déshydrogénase et la glycogène phosphorylase en sont des exemples clés puisque le contrôle de leurs activités enzymatiques résulte d'une modification covalente suite à l'incorporation de phosphate intramoléculaire (Hurley et al., 1990; Sprang et al., 1988). Dans la régulation du métabolisme des cellules, la sérine et la thréonine sont les acides aminés généralement phosphorylés (Edelman et al., 1987); toutefois la tyrosine et l'histidine le sont aussi, spécialement dans les systèmes de conversion de signaux cellulaires (Hunter et Cooper, 1985).

La phosphotransférase catalysant la fixation du phosphate sur le substrat est habituellement une protéine-kinase (le groupe donneur de phosphate peut être soit de l'ATP ou du GTP), alors que l'enzyme catalysant la déphosphorylation est appelée une protéine-phosphatase (Fig.1.2).

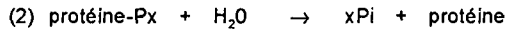
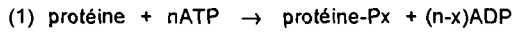


Fig.1.2. La réaction (1) est catalysée par une protéine-kinase et la réaction (2) par une protéine phosphatase

Des protéine-kinases animales de plusieurs types ont déjà été identifiées, caractérisées et même séquencées (Edelman et al., 1987; Hanks et al., 1988). Ces enzymes sont cataloguées dans la littérature en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, des réactions spécifiques qu'elles catalysent et des mécanismes moléculaires par lesquelles elles sont contrôlées. Les données accumulées à leur sujet représentent pour le phytophysiologiste une source intarissable d'informations, car chez les plantes les études réalisées sur les signaux de transductions cellulaires en sont encore à leur début. Comme dans tous les types de cellules végétales des protéines phosphorylées ont été découvertes (Ranjeva et Boudet, 1987; Trewavas et Gilroy, 1991), le système métabolique des cellules végétales semble aussi étroitement dépendant d'activités protéine-kinasiques que celui de leurs cousines animales.

Vu les propriétés métaboliques de l'enveloppe du chloroplaste et le rôle que l'enveloppe joue comme barrière intracellulaire sélective (voir ci-dessus), il est certain qu'une partie de son contenu en protéines, qui participent aux réactions biosynthétiques, est soumise à des modifications covalentes intramoléculaires. En effet, plusieurs expériences ont révélé que les protéines des plastes sont susceptibles d'incorporer du phosphate (Ranjeva et Boudet, 1987; Allen, 1992; Douce et Joyard, 1990; voir "Introduction du Chapitre 1") et particulièrement celles des enveloppes qui sont le siège d'une forte activité de phosphorylation (voir "Introduction du Chapitre 1"). Ainsi, le but de cette thèse s'inscrit dans un contexte général qui est de mieux comprendre le rôle que joue la phosphorylation des protéines d'enveloppes dans la physiologie du chloroplaste.

1.5. Bibliographie

- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Archer, E.K., Keegstra, K. (1990) Current views on chloroplast protein import and hypotheses on the origin of the transport mechanism. *J. Bioenerg. biomem.* 22: 769-810.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fraction enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. I. Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.* 258: 13273-13280.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fraction enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 13280-13286.
- Britton, G. (1988) Biosynthesis of carotenoids. *Dans Plant pigments*, ed T.W. Goodwin, London: Academic, pp 132-182.
- Carde, J.P., Joyard, J., Douce, R. (1982) Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids. *Biol. Cell.* 44: 315-324.
- Cline, K., Keegstra, K., Staehelin, L.A. (1985) Freeze-fracture electron microscopic analysis of ultrarapidly frozen envelope membranes on intact chloroplasts and after purification. *Protoplasma* 125: 111-123.
- Cremers, F.F.M., Voorhout, W.F., Van der Krieff, T.P., Leunissen-Bijvelt, J.J.M., Verkleij, A.J. (1988) Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 334-340.
- Danks, S.M., Evans, E.H., Whittaker, P.A. (1983) *Dans photosynthetic systems: structure, function and assembly*, ed John Whilley & Sons, New-York.
- Dietz, K.J., Bogorad, L. (1987) Plastid development in *Pisum sativum* leaves during greening. *Plant Physiol.* 85: 816-822.
- Dorne, A.J., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R. (1982) The galactolipid:galactolipid galactosyltransferase is located on the outer surface of the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.* 145: 30-34.
- Dorne, A.J., Joyard, J., Block, M.A., Douce, R. (1985) Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Cell Biol.* 100: 1690-1697.
- Douce, R., Guillot-Salomon, T. (1970) Sur l'incorporation de la radioactivité du sn-glycérol 3-phosphate-14C dans le monogalactosyldiglycérade des plastes isolés. *FEBS Lett.* 11: 121-126.
- Douce, R., Joyard, J. (1979) Structure and function of the plastid envelope. *Adv. Bot. Res.* 7: 1-116.
- Douce, R., Joyard, J. (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 173-216.
- Douwe de Boer, A., Weisbeek, P.J. (1991) Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 221-253.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radioactives associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'Épinard après protéosynthèse *in organello* en présence de ³⁵S-méthionine, Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.

- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987) Protein sérine/thréonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 567-613.
- Ellis, R.J. (1981) Chloroplast proteins: synthesis, transport, and assembly. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 111-138.
- Ellis, R.J., van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Flügge, U.I., Benz, R. (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *PEBS Lett.* 169: 85-89.
- Flügge, U.I. (1990) On the translocation of proteins across chloroplast envelope. *J. Bioenerg. Biomem.* 22: 769-787.
- Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1984) The phosphate triose phosphate-phosphoglycerate translocator of chloroplasts. *Trends Biochem. Sci.* 9: 530-533.
- Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 129-144.
- Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C. (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO. J.* 8: 39-48.
- Flügge, U.I., Weber, A., Fischer, K., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Waegemann, Soll, J. (1991) The major chloroplast envelope polypeptide is the phosphate translocator and not the protein import receptor. *Nature* 353: 364-367.
- Gabellini, N. (1988) Organization and structure of the genes for the cytochrome b/c1 complex in purple photosynthetic bacteria. A phylogenic study describing the homology of the b/c1 subunits between prokaryotes, mitochondria and chloroplasts *J. Bioenerg. Biomembr.* 20: 59-83.
- Gray, M.W., Doolittle, W.E. (1982) *Microbiol. Rev.* 46: 1-42.
- Hallick, R.B., Hong, L., Dräger, R.G., Farreau, M.R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A., Stutz, E. (1993) *Nucleic Acids Res.* sous presse
- Hanks, S.D.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241: 42-52.
- Haverkate, F., van Deenen, L.L.M. (1965) Isolation and chemical characterization of phosphatidylglycerol from spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 106: 78-92.
- Heber, U., Heldt, H.W. (1981) The chloroplast envelope structure, function and role in leaf metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 139-168.
- Heinz, E. (1977) *Dans* Lipids and lipid polymers. Eds Tevini, M. & Lichtenthaler, H.K., Springer-Verlag, Berlin, pp 102-120.
- Hillier, R.G., Goodchild, D.J. (1981) Thylacoid membrane and pigment organization. *Dans* The biochemistry of plants: Photosynthesis vol.8. Eds Hatch, M.D. et Boardman, N.K., Academic press, New-York, pp 2-46.
- Hinz, G., and Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.

Hiratsuki, J., Shimada, H., Whittier, R., Sakamoto, M., Ishibashi, T., Mori, M., Honji, Y., Kondo, C., Nishizawa, Y., Kanno, A., Hirai, A., Sun, C.R., Meng, B.Y., Li, Y.O., Shinozaki, K., Sugiura, M. (1989) *Mol. gen. Genet.* 217: 185-194.

Horton, P., Black, M.T. (1981) Light-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in pea chloroplasts induced by edenosine 5'-triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 635: 53-62.

Hunter, T., Cooper, J.A. (1985) Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 897-930.

Hurley, J.H., Dean, A.M., Sohl, J.L., Koshland, D.E., Stroud, R.M. (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249: 1012-1016.

Joyard, J., Block, M.A., Douce, R. (1991) Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. *Eur. J. Biochem.* 199: 489-509.

Joyard, J., Block, M., Pineau, B., Albrieux, C., Douce, R. (1990) Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH:Protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 265: 21820-21827.

Keegstra, K. (1989) Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 56: 247-253.

Kirk, J.T.O., Tilney-Basssey, R.A.E., eds (1978) *The plastids 2nd ed.. Their chemistry, structure, growth and inheritance.* Elsevier: Amsterdam. 960 pp.

Lehner, K., Heldt, H.W. (1978) Dicarboxylate transport across the inner membrane of the chloroplast envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 501: 531-544.

Menzlaff, E., Flügge, U.I., (1993) Purification and functional reconstitution of the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1147: 13-18.

Nguyen, T.D., Miquel, M., Dubacq, J.P., Siegenthaler, P.A. (1987) Localization and some properties of a Mg²⁺-dependent ATPase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Science* 50: 57-63.

Ohrogge, J.B., Kuhn, D.N., Srumpf, P.K. (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Sci. USA* 76: 1194-1198.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umehono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., Ozeki, H. (1986) *Nature* 322: 572-574.

Pain, D., Blobel, G. (1987) Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3288-3292.

Pain, D., Kanwar, Y.S., Blobel, G. (1988) Identification of a receptor for protein import into chloroplasts and its localization to envelope contact zones. *Nature* 331: 232-237.

Ranjewa, R., Boudet, A.M. (1987) Phosphorylation of proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 73-93.

Robinson, S.P., Wiskich, J.T. (1977) Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides. *Plant Physiol.* 59: 422-427.

Roy, H., Cannon, S., Gilson, M (1988) Assembly of rubisco from native subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 957: 323-334.

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakusugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986) *EMBO. J.* 5: 2043-2049.

Siegenthaler, P.A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, thylakoid and stroma polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.

Siegenthaler, P.A., Nguyen, T.D. (1983) Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts. 1. Isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis separations. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 226-233.

Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., Block, M.A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membrane from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290-299.

Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldschmidt, E.J., Stuart, D.I., Varvill, K., Fletterick, R.J., Madsen, N.B., Johnson, L.N. (1988) Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336: 215-221.

Stæhelin, L.A. (1986) *Dans Encyclopædia of plant physiology: new series, vol.19.* Eds Stæhelin, L.A. and Arntzen, C.J., Springer-Verlag, New-York, pp 1-84.

Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 6730-6736.

Trewavas, A., Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. *TIG* 7: 356-361.

Woldegiorgis, G., Voss, S., Shrago, E., Werner-Washburne, M., Keegstra, K. (1983) An adenine nucleotide-phosphoenolpyruvate counter-transport system in C3 et C4 plant chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 945-951.

van't Hof, R., Demel, R.A., Keegstra, K., de Kruijff, B. (1991) Lipid-peptide interactions between fragments of transit peptide of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase and chloroplast membrane lipids. *FEBS Lett.* 291: 350-354.

van't Hof, R., van Klompenburg, W., Pilon, M., Kozubek, A., de Korte-Kool, G., Demel, R.A., Weissbeek, P.J., de Kruijff, B. (1993) The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane lipids. *J. Biol. Chem.* 268: 4037-4042.

von Heijne, G., Steppuhn, J., Hermann, R.G. (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.

Waegemann, K., Soll, J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1: 149-158.

Werner-Washburne, M., Cline, K., Keegstra, K. (1983) Analysis of pea chloroplast inner and outer envelope membranes proteins by two-dimensional gel electrophoresis and their comparison with stromal proteins. *Plant Physiol.* 73: 569-575.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1. Matériels

Les feuilles d'Epinard (*Spinacia oleracea* L.) proviennent du marché local et le ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP 3000 Ci/mme est distribué par la maison Amersham-Rahn.

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation de membranes d'enveloppes et de stroma

Les opérations permettant l'isolement des membranes de l'enveloppe et du stroma ont été effectuées à 4°C, à partir de méthodes proches de celles décrites par Douce et Joyard (1982) et Nguyen (1984). Après le détachement de la nervure centrale, des feuilles d'Epinard (~800 g) sont broyées dans un mélangeur de type Waring-Blender pendant 10 s (à faible vitesse) dans environ 2000 ml de milieu de broyage (MB): 25 mM MOPS-KOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA-Na₂ et 2 mM isoascorbate. L'homogénéat est filtré à travers six couches de gaze et une couche de Miracloth, puis centrifugé à 1550 g pendant 1 min (3600 rpm, rotor GSA). Les surnageants sont écartés et les culots dilués dans 100 ml de MB. La suspension est ensuite déposée sur l'équivalent d'un volume et demi d'une solution de MB contenant 40% (v/v) de Percoll (Pharmacia), puis centrifugée à 2640 g (4000 rpm, rotor HB-4) pendant 15 min sous accélération lente. *L'utilisation du Percoll permet de séparer dans des conditions isoosmotiques les chloroplastes intacts des débris cellulaires et des chloroplastes brisés contenus dans l'homogénéat.* Après l'élimination des surnageants, les culots sont mis en suspension dans du MB, puis centrifugés à 1900 g (4000 rpm, rotor SS-34) pendant 3 min, afin d'ôter le Percoll résiduel. Les culots de chloroplastes intacts sont remis en suspension dans 40 ml final d'une solution hypotonique (ME: milieu d'éclatement) composé de: 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 5 mM MgCl₂ et 2 mM EDTA-Na₂. Après l'éclatement des chloroplastes (1-2 min), l'osmolarité est rétablie par l'adjonction de 4 ml de 3M sorbitol. Une centrifugation à 17200 g (12000 rpm, rotor SS-34) pendant 10 min permet de séparer les enveloppes et le stroma (surnageant) des thylacoïdes (culot). Pour isoler les enveloppes du stroma, 10 ml du mélange sont déposés sur un gradient discontinu composé de 2 couches de 10 ml de 0.65 et 1.0 M saccharose tamponné avec ME. Les gradients sont ensuite centrifugés à 92000 g (22500 rpm, Beckman rotor SW-27) pendant 90 min sous accélération lente. Le stroma (haut du tube) est récolté, tout comme la bande correspondant aux enveloppes localisées à l'interface des deux couches de sucre. Les enveloppes, diluées deux à trois fois avec du ME, sont lavées par sédimentation à 112500 g (25000 rpm, rotor SW-27) pendant 30 min, afin d'éliminer le sucre résiduel. Les culots de membranes d'enveloppes sont mis en suspension dans un volume minimum contenant 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), puis la teneur en protéine

dosée comme le stroma par la méthode de Bradford (voir 2.2.7.1). Les extraits d'enveloppes sont conservés à -30°C avant leur utilisation.

2.2.2. Préparation de fractions enrichies en membranes interne et externe d'enveloppes

Les membranes internes et externes d'enveloppes ont été purifiées selon la méthode décrite par Keegstra et Youssif (1986), adaptée dans notre laboratoire par Dumont (1991). Les chloroplastes, isolés comme indiqué sous 2.2.1, sont mis en suspension dans un milieu hypertonique contenant 10 mM Tricine-KOH (pH 7.6), 0.65 M saccharose, 2 mM EDTA-Na₂ et ajustés à 2.5 mg de chlorophylle/ml. Après 15 min d'incubation à 4°C, les chloroplastes sont brisés dans un homogénéisateur Dounce, à raison de 20 à 30 coups de piston pour 7 ml de suspension; le degré de lyse des chloroplastes est contrôlé au microscope à contraste de phase. La suspension est ensuite diluée deux fois dans une solution hypotonique contenant 10 mM Tricine-KOH (pH 7.6), 2 mM EDTA-Na₂, puis centrifugée sous accélération lente pendant 30 min à 23500 g (12000 rpm, rotor HB-4). Le surnageant contenant le stroma et les vésicules enrichies en membranes interne et externe d'enveloppes est déposé sur un gradient discontinu composé de trois couches (8 ml) de 0.4, 0.65 et 1.0 M saccharose tamponné avec ME (voir sous 2.2.1). Après une centrifugation à 100000 g (23500 rpm, rotor SW-27) pendant 6 h, les fractions enrichies respectivement en membranes interne et externe sont prélevées aux interfaces des couches de 0.65/1 M et 0.4/0.65 M saccharose, puis diluées trois fois dans du ME et finalement sédimentées à 112500 g (25000 rpm rotor SW-27) pendant 30 min. les culots de membranes internes et externes sont alors mis en suspension dans un volume minimum de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6) et dosés selon la méthode de Bradford (2.2.7.1). Les extraits sont conservés à -30°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.3. Préparation de chloroplastes intacts et de membranes thylacoïdales possédant un degré élevé de pureté

2.2.3.1. Préparation des chloroplastes intacts

La purification de chloroplastes intacts est effectuée selon la méthode décrite par Mourieux et Douce (1981). Des feuilles d'Epinard "dénervurées" (120 g) sont broyées pendant 15 s à faible vitesse, dans un mélangeur de type Waring Blender, dans 500 ml de milieu de broyage (MB*): 30 mM MOPS-KOH (pH 7.8), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA-Na₂ et 0.15% (p/v) BSA. L'homogénat est filtré sur quatre couches de gaze et une couche de Miracloth, puis centrifugé à 750 g (2200 rpm, rotor GSA) pendant 50 s. Le surnageant est éliminé par aspiration, et le culot (remis en suspension dans MB*) est déposé sur un gradient continu de Percoll 50 (solution de MB* contenant 50% (v/v) de Percoll préalablement centrifugé à 41000 g (18500 rpm, rotor SS-34) pendant 20 min). La suspension est ensuite centrifugée à 5050 g (6500 rpm, rotor SS-34) pendant 15 min sous accélération lente. La bande verte inférieure constituée des chloroplastes intacts est prélevée (la bande supérieure contient essentiellement des chloroplastes brisés),

diluée dans un milieu isoosmotique (MIO): 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol et 5 mM MgCl₂, puis centrifugée à 1900 g (4000 rpm, rotor SS-34) pendant 90 s. Le surnageant est écarté et le culot mis en suspension dans un volume minimum de MIO, puis ajusté à 2 mg chlorophylle /ml.

2.2.3.2. Préparation des membranes thylacoïdales

Une préparation de membranes thylacoïdales peut être obtenue après simple éclatement de chloroplastes intacts dans une solution tamponnée hypotonique (voir 2.2.1). Mais une préparation de membranes thylacoïdales exemptes de contaminants d'enveloppes n'est obtenue qu'après purification sur Percoll (Rawlyer et al., 1992). A l'équivalent d'un mg de chlorophylle d'une suspension de chloroplastes intacts, préparés comme sous 2.2.3.1, sont ajoutés 30 ml de milieu de lyse (ML) qui contient: 10 mM Tricine-KOH (pH 7.8) et 2mM EDTA-Na₂. Après une agitation douce pendant 1 min, l'osmolarité est restaurée par l'addition de 3.6 ml de 3 M sorbitol. La suspension est centrifugée à 16500 g (12000 rpm, rotor SS-34) pendant 5 min. Le surnageant est écarté et le culot dilué dans un volume final de 18 ml de milieu de suspension (MS) contenant 10 mM Tricine-KOH (pH 7.8) et 0.3 M sorbitol. A l'aide d'une seringue, 5 ml d'une solution de MS contenant 5% (v/v) de Percoll sont injectés au bas du tube. La suspension est alors centrifugée à 20000 g (11000 rpm, rotor HB-4) pendant 5 min, sous accélération lente. Le surnageant est écarté, alors que le culot, mis en suspension dans un petit volume de MIO (2.2.3.1), est centrifugé à 20000 g (11000 rpm, rotor HB-4) pendant 15 min. Les membranes thylacoïdales sont finalement remises en suspension dans environ 500 µl de MIO et la concentration en protéines déterminée par la méthode de Lowry (2.2.7.2).

2.2.4. Dosage des chlorophylles

Les quantités de chlorophylles sont estimées par la méthode de Bruinsma (1961). Une suspension de chloroplastes intacts (50 µl) est mélangée à 10 ml d'acétone (80%, v/v), puis filtrée à travers un papier filtre Whatman n°1. L'absorbance du filtrat est lue à 652 nm contre une référence contenant de l'acétone à 80%. La concentration des chlorophylles en mg/ml de suspension est obtenue en multipliant la valeur obtenue par un facteur de 5.55.

2.2.5. Analyse des enveloppes par spectrophotométrie

Un aliquote de membranes d'enveloppes (10 µg de protéines) est précipité/solubilisé dans 1 ml d'acétone (80%, v/v), puis filtré avant d'établir le spectre d'absorption entre 400 et 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5.

2.2.6. Analyse des lipides d'enveloppes

Des fractions de membranes d'enveloppes (30 µg) sont incubées pendant 20 min à 23°C, en présence de phospholipase C de *B. cereus* (0.65 sigma Unit), 4 mM MgCl₂ et 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), dans un volume final de 25 µl. L'activité exhibée par la phospholipase C est stoppée par l'addition de 5 µl de 30 mM EGTA et de 5 µl de 60 mM o-phenanthroline dissous dans du méthanol. L'extraction des lipides est effectuée par l'addition de 280 µl d'H₂O, puis 500 µl de chloroforme/méthanol (53:37, v/v). La phase lipidique est récupérée, puis déposée automatiquement sur des plaques de silica gel de type 60, à l'aide d'un applicateur Linomat (Camag). Les plaques sont développées dans un mélange acétone/toluène/eau/méthanol (90:27:12:7, v/v) et rapidement séchées. Après vaporisation d'une solution contenant 35% H₂SO₄ (diluée dans un mélange éthanol/eau; 1:1, v/v), les lipides sont carbonisés et immédiatement photographiés (Siegenthaler et al., 1989).

2.2.7. Dosage des protéines

La concentration des protéines d'enveloppes et du stroma est estimée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), alors que celle des protéines thylacoïdales l'est par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.2.7.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

A des protéines (5 à 20 µg) diluées dans 0.8 ml d'H₂O, on ajoute 0.2 ml de réactif concentré (Bio-Rad). Après 15 min, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre une référence contenant uniquement de l'eau et du réactif. Dans ces conditions (Spector, 1978), le rapport de la mesure de l'absorbance à 595 nm sur le produit du volume de la prise de protéine (µg) par un facteur de 0.06 donne la concentration des protéines en mg/ml.

2.2.7.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La méthode de Lowry (Lowry et al., 1951), modifiée par Markwell et al. (1981), est plus adaptée que celle de Bradford pour estimer la concentration des protéines thylacoïdales, car on évite dans ce cas toute interférence entre les pigments chlorophylliens et le colorant lui-même. La BSA est utilisée comme protéine de référence. Un échantillon contenant moins de 100 µg de protéines membranaires est ajusté à 1 ml avec H₂O. Un réactif (3 ml) constitué de cent volumes de la solution A (2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.16% tartrate de Na et 1% (p/v) SDS) et d'un volume de la solution B (4% CuSO₄ X 5 H₂O) sont ajoutés à l'échantillon. Après agitation et incubation pendant 10 min, 0.3 ml de réactif de Folin dilué 2 fois avec H₂O sont ajoutés. Après 45 min à l'obscurité, l'absorbance est lue à 750 nm contre un blanc constitué par l'ensemble des réactifs à l'exception des protéines.

2.2.8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Dans ce mémoire, nous considérons les termes polypeptide et protéine comme synonyme. Toutefois, nous tenons compte souvent de la nuance qui existe entre ces deux mots, puisqu'un polypeptide peut être, dans certain cas, la sous-unité d'une structure protéique de plus grande taille, alors que la protéine est fréquemment, en terme générique, un oligopeptide (structure quaternaire).

2.2.8.1. Electrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques, contenant jusqu'à 60 µg de protéines, sont dilués 1:1 avec du tampon pour échantillon SDS-PAGE (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% (p/v) bleu de bromophénol, 4% (p/v) SDS, 12.5% (v/v) glycérol et 10% (v/v) mercaptoéthanol), pour être ensuite dénaturés à 100°C pendant 3 min. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse selon la méthode classique de Laemmli (1970). Les gels de séparation (0.8 mm ou 1.5 mm d'épaisseur) contiennent: 13 ou 15% (p/v) d'acrylamide (le rapport acrylamide/bisacrylamide est de 30/0.8), 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% (p/v) SDS, 0.04% (v/v) TEMED et 0.015% (p/v) persulfate d'ammonium). Les gels contenant un gradient linéaire de 15 à 30 % (p/v) d'acrylamide sont accompagnés d'un gradient linéaire de saccharose de 0 à 15% (p/v). Le tampon d'électrophorèse contient 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 nM glycine et 0.1% (p/v) SDS. Après la migration des protéines, les gels sont fixés pendant 30 min dans une solution contenant 25% d'alcool dénaturé et 8% d'acide acétique, puis colorés au bleu de Coomassie R-250 (Weber et Osborn, 1969).

2.2.8.2. Détermination des poids moléculaires (SDS-PAGE)

Les poids moléculaires apparents sont estimés en calculant la mobilité relative des polypeptides par rapport aux protéines de référence suivantes: phosphorylase b (94 kDa), albumine sérique de boeuf (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur trypsique du soja (20.1 kDa) et α -albumine du lait (14.4 kDa).

2.2.8.3. Electrophorèse en conditions non-dénaturantes

Mise à part l'absence de SDS, les tampons utilisés pour les électrophorèses en conditions natives (7% (p/v) d'acrylamide) sont identiques à ceux utilisées pour les SDS-PAGE. Par contre, les gels natifs, contenant 4 à 30% d'acrylamide, sont préparés comme décrit par Pharmacia ou Affolter (1982). La migration des protéines s'effectue à 4°C et dure 4 à 5 h pour un gel de 1,5 mm d'épaisseur contenant 7% d'acrylamide et environ 15 h à 150 V pour les gradients de 4 à 30% d'acrylamide.

2.2.8.4. Détermination des poids moléculaires (gels natifs 4-30%)

Le poids moléculaire des protéines natives est estimé en calculant la mobilité relative des protéines, après leur migration dans un gel contenant 4 à 30% d'acrylamide, par rapport aux protéines de référence suivantes (Pharmacia): thyroglobuline (669 kDa), ferritine (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate déshydrogénase (140 kDa) et albumine sérique de boeuf (67 kDa).

2.2.9. Focalisation isoélectrique (IEF)

Les protéines (jusqu'à 100 µg) sont solubilisées selon la méthode décrite par Dunbar (1987). Par contre, la préparation du gel, la focalisation isoélectrique et la détermination des pH ont été effectuées comme décrit par Siegenthaler et Nguyen (1983) et Dumont (1991).

2.2.10. Gel en 2 dimensions: IEF X SDS-PAGE

Après fixation et équilibration des protéines (Jäckle, 1979), les gels IEF sont soumis à une séparation en seconde dimension sur gel SDS-PAGE 13%. Les gels en tube sont déposés horizontalement sur le gel-SDS et scellés avec une solution de 1% (p/v) agarose contenant 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (p/v) SDS et 0,001% (p/v) bleu de bromophénol.

2.2.11. Analyse par Westemblot ou immunoblot

2.2.11.1. Transfert des protéines sur papier de nitrocellulose

Les protéines séparées sur gel sont transférées sur papier de nitrocellulose (PNC; 0,2 µm, Schleicher et Schuell) à l'aide d'un appareil de transfert "semi-dry" (Sartorius). Le tampon de transfert contient 48 mM Tris, 39 mM glycine, 1,3 mM SDS et 20% (v/v) méthanol (Heegard et Bjerrum, 1986). Les protéines transférées sur le PNC sont colorées de manière réversible avec une solution de rouge Ponceau S (Fluka) diluée dans une solution contenant 3% (p/v) d'acide trichloracétique (TCA). Après trois minutes d'incubation puis rinçage à l'eau distillée, les protéines sont marquées, si nécessaire, avec un poinçon.

2.2.11.2. Réactions immunologiques

La méthode utilisée est proche de celle décrite par Towbin et al. (1979), excepté que les papiers de nitrocellulose sont saturés, ici, avec une solution de TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7,5) et 0,5 M NaCl) contenant 5% (p/v) de lait en poudre à la place de BSA. Après un rinçage au TBS, les papiers de nitrocellulose sont ensuite incubés dans une solution d'anticorps primaires, diluée dans une solution de TBS additionnée de 1% (p/v) de lait en poudre. Les anticorps secondaires (KPL, 15-15-16, Dynatech; anticorps

purifiés par affinités, dirigés contre les IgGs du lapin et marqués à la phosphatase alcaline), dilués à 1/500 dans du TBS additionné de 1% (p/v) de lait en poudre, sont ensuite couplés au complexe immun après une incubation de 90 min à température ambiante. La révélation colorimétrique est effectuée comme décrit par Leary et al. (1983).

2.2.12. Préparation de sérums polyclonaux dirigés contre des protéines séparées par SDS-PAGE

Les protéines contenant l'antigène choisi sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur papier de nitrocellulose. Après leur révélation au rouge Ponceau S, la bande polypeptidique est excisée, puis solubilisée dans 300 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO). Un volume égal d'adjuvant complet de Freund est ajouté au mélange juste avant l'injection intradermique ou sous-cutanée de l'antigène dans les flancs du lapin. Avant la récolte du sérum, deux injections supplémentaires sont effectuées à deux ou trois semaines d'intervalles en présence d'adjuvant incomplet de Freund (Knudsen, 1985). Le sang prélevé est laissé 2 h à température ambiante et une nuit à 4°C pour induire sa coagulation. Il est ensuite centrifugé 15 min à 1500 g pour séparer le sérum (surnageant incolore) des globules coagulés. Ce sérum est alors récolté et congelé à -30°C (ou dans l'azote liquide) avant utilisation.

2.2.13. Purification des immunoglobulines G par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-protéine A

Toutes les opérations qui suivent sont également décrites par L'Eplattenier (1991) et effectuées à 4°C. Un volume de sérum est ajouté à un même volume de NaCl 0,9%, puis deux volumes de sulfate d'ammonium froid saturé sont versés goutte à goutte, sous agitation, sur le premier mélange. Après 30 min, les protéines précipitées sont sédimentées par centrifugation à 750 g (2500 rpm, rotor SS-34), pendant 50 min. Le culot est mis en suspension dans une solution de NaCl 0,9%, de façon à obtenir la moitié du volume initial de sérum. La solution est ensuite dialysée trois fois contre un litre de tampon PBS (0.045 M K_2HPO_4 /0.009 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ /0.12 M NaCl à pH 7.4) pendant 24 h. Après la dialyse, la solution est centrifugée à 11'950 g (10'000 rpm, rotor SS-34) pendant 20 min et les protéines dosées par la méthode de Bradford (1976). Une seringue de 5 ml est remplie de billes d'agarose-protéine A (Sigma N°P2545), lavées avec 30 ml de 0.1 M Tris. Le sérum est ensuite déposé sur les billes et la colonne est lavée avec 25 ml de 0.1 M Tris. Les IgGs, fixées dans la colonne, sont éluées par l'adjonction de quatre fois 3 ml de 0.1 M d'acide citrique. Chaque volume d'éluat acide est immédiatement neutralisé par un demi-volume de 1 M Tris. Les fractions contenant les IgGs sont rassemblées, lavées dans 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), concentrées par centrifugation dans un tube microconcentrateur (Centricon-10, Amicon), dosées par la méthode de Bradford, et finalement congelées à -30°C avant d'être utilisées.

2.2.14. Isolement d'une fraction protéique du stroma d'Epinard par affinité sur des billes d'agarose-ATP

La purification de protéines "heat-shock" à partir de billes d'agarose-ATP a été effectuée selon une méthode mise au point par Welch et Feramisco (1985) et adaptée pour des protéines homologues présentes dans le stroma des plantes supérieures par J. Marshall (Madison, Université du Wisconsin, USA; communication personnelle). Des protéines stromatiques (90 mg), préparées comme sous 2.2.1, sont dialysées pendant une nuit à 4°C contre 3 litres de tampon TKM: 10 mM Tris-OAc (pH 7.6), 2 mM KOAc et 3 mM MgOAc. Les billes d'agarose-ATP (0.5 ml; Sigma N°A 2767) sont préalablement lavées deux fois avec 4 ml de tampon TKM, avant d'être incubées, à température ambiante et sous agitation douce pendant 60 min, en présence de 15 ml de protéines de stroma (6 mg/ml dans TKM) et 1 mM de dithiothréitol. Les billes d'agarose sont ensuite sédimentées à 6000 g (6000 rpm, rotor HB-4) pendant 5 min, puis mises en suspension dans 10 ml de TKM après l'élimination du surnageant. Cette opération de lavage est répétée deux fois. Les billes subissent ensuite 2 lavages supplémentaires de 5 min dans une solution de TKM contenant 0.5 M NaCl. Afin d'éliminer le sel, elles sont lavées encore une dernière fois dans 20 ml de TKM. Après leur sédimentation, les billes sont transférées dans un tube Eppendorf neuf et incubées pendant 20 min en présence de 0.5 ml d'une solution de TKM contenant 3 mM MgATP. Après une sédimentation à 8000 g (10000 rpm, Eppendorf centrifuge 5415c), le surnageant est récolté dans un nouveau tube. L'incubation des billes avec la solution de TKM-MgATP est répétée deux fois. A chaque fois les surnageants sont récupérés séparément ou ensemble dans un nouveau tube. *Les protéines du stroma ayant une affinité pour l'adénosine triphosphate sont éluées des billes par compétition, suite à l'addition d'un excès de MgATP libre.* La concentration des protéines éluées est estimée par la méthode de Bradford.

2.2.15. Traitement de membranes d'enveloppes à l'aide de détergents

2.2.15.1. Solubilisation de membranes d'enveloppes à l'octylglucoside

Les enveloppes solubilisées à l'octylglucoside ont été préparées selon la méthode décrite par Covès et al. (1988). Des protéines d'enveloppes (1,5 mg) sont solubilisées dans 3 ml d'une solution contenant 10 mM octylglucoside et 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), soit un rapport de 20 µmoles de détergent par mg de protéines d'enveloppes. La suspension est incubée sous agitation douce pendant 30 min à 0°C, puis centrifugée à 243000 g (44000 rpm, rotor SW 50.1) pendant 15 min. Le surnageant (protéines solubilisées) est récolté, estimé par la méthode de Bradford, puis déposé à la surface d'un gradient continu de saccharose (10-30%) contenant 25 mM MOPS-NaOH (pH 7.6) et 0.2 M NaCl. Les gradients sont alors centrifugés à 250000 g (45000 rpm, rotor SW 50.1) pendant 17 h, puis fractionnés en aliquotes de volume égal (600 µl).

2.2.15.2. Séparation de phases au Triton X-114 (TX-114)

Ce traitement induit une séparation de phase entre des protéines à caractères hydrophiles (phase supérieure) et d'autres de nature plus hydrophobes qui contaminent le détergent (phase inférieure). Cette technique (Bordier, 1981) a été adaptée dans notre laboratoire par Siegenthaler et Dumont (1990).

2.2.15.3. Préparation d'une fraction "soluble" d'enveloppes après un traitement au Triton X-114

Des enveloppes (720 µg) ont été traitées au Triton X-114 comme décrit par Siegenthaler et Dumont (1990). Toutefois, deux paramètres sont modifiés par rapport à la méthode proposée: premièrement, la condensation du TX-114 est effectuée à 23°C plutôt qu'à 30°C (un chauffage réduit préserve les protéines de toute dénaturation) et deuxièmement la séparation des phases est obtenue après une centrifugation à 15800 g (14000 rpm; Eppendorf microfuge 5415c) pendant 1 min. Après une seule extraction, la phase aqueuse est prélevée, puis dialysée pendant une nuit à 4°C contre trois litres contenant 10 mM MOPS-NaOH (pH 7.6). La dialyse est finalement répétée, mais cette fois contre 1 litre de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6) pendant 2 h à 4°C. Les protéines sont dosées selon Bradford (1976).

2.2.16. Conditions pour la phosphorylation des protéines

2.2.16.1. Phosphorylation *in vitro* des protéines

La phosphorylation de 30 µg de protéines est effectuée dans un volume final de 25 µl en présence de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 4 mM MgCl₂ et 33.33 nM ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP (3000 Ci/mole). Après une incubation de 5 min à 23°C, la réaction est stoppée par l'addition d'un volume identique de tampon pour échantillons SDS-PAGE (2.2.8.1) *. Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les protéines sont séparées par SDS-PAGE. *Le phosphate radioactif non-lié aux protéines migre par électrophorèse vers la cathode (cuve inférieure) et peut être ainsi éliminé facilement.* Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie, séchés et placés en autoradiographie (film Kodak X-OMAT AR) pendant une nuit à -80°C, parfois en présence d'un écran intensifiant (Lightning Plus, Dupont de Nemours). L'incorporation dans les polypeptides est quantifiée par la procédure de Cerenkov: les bandes marquées au ^{32}P sont excisées du gel-SDS et réhydratées, si nécessaire, avec 0.5 ml de H₂O distillée, puis placée dans le compteur à scintillation Kontron BETAmatic.

* Les activités protéine-kinasiques peuvent être également stoppées par l'addition de 0.5 ml de 12% (p/v) TCA. Les protéines précipitées (par le TCA) sont ensuite sédimentées par centrifugation à 15800 g (14000 rpm; Eppendorf microfuge 5415c) pendant 2 min, puis lavées avec 0.8 ml de 5% (p/v) TCA. Après une seconde centrifugation et un deuxième lavage avec 1 ml ETOH 96%, les culots sont séchés sous flux d'azote et finalement mis en suspension dans du tampon pour échantillons SDS-PAGE (2.2.8.1).

2.2.16.2. Phosphorylation *in organello* de chloroplastes intacts

Une suspension de chloroplastes intacts (2 mg chlorophylle/ml), contenant 4 mg de chlorophylle, est préincubée dans 50 mM MOPS-KOH pH 7.6, 330 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂ pendant 10 min à 23 °C et à l'obscurité. La phosphorylation est initiée par l'addition d'un mélange contenant 30 µCi de (γ³²P)ATP et 10 µl de 1 mM ATP froid (L'Eplattenier, 1991). L'incubation est réalisée à l'obscurité et à 23°C et dure 5 min. La réaction est arrêtée, à 4°C, par l'addition de 5 ml de la solution de préincubation additionnée de 20 mM Na₂MoO₄ et 30 mM NaF. Les chloroplastes sont ensuite lavés trois fois dans le même milieu et chaque fois sédimentés à 5900 g (7000 rpm pendant 30 s, rotor SS-34). Après la dernière centrifugation, les chloroplastes intacts sont brisés dans une solution hypotonique contenant 10 mM Tricine-KOH pH 7.6, 0.8 mM MgCl₂, 20 mM Na₂MoO₄ et 30 mM NaF. Les thylacoïdes sont sédimentés par centrifugation à 17200 g (12000 rpm, rotor SS-34) pendant 10 min et le surnageant, contenant le stroma et les enveloppes, est déposé sur un gradient de saccharose et traité comme sous 2.2.1.

2.2.17. Protéolyse partielle

La protéolyse partielle des protéines dans la matrice d'un gel est effectuée selon la méthode décrite par Cleaveland et al. (1977). Les protéines radioactives sont excisées dans un gel mère SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie), puis équilibrées pendant 20 min dans un tampon contenant 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% (p/v) SDS et 1 mM EDTA-Na₂. Les morceaux sont ensuite déposés dans les puits d'un gel-SDS contenant 15% d'acrylamide ou un gradient d'acrylamide de 15 à 30%, puis fixés avec une solution de 1% (p/v) agarose contenant 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% (p/v) SDS et 0.001% (p/v) bleu de bromophénol. La protéase V₈ de *Staphylococcus aureus* ou la papaïne sont diluées dans un tampon composé de 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 0.001% (p/v) bleu de bromophénol et 1 mM EDTA-Na₂, puis déposées dans les poches du gel contenant les protéines à hydrolyser. L'électrophorèse est stoppée temporairement, pendant 20 min, quand le front de migration atteint le bas du gel de concentration, afin de permettre à la protéase de scinder le polypeptide. Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie, séchés et mis en autoradiographie.

2.2.18. Hydrolyse des protéines en présence de CNBr

L'hydrolyse en présence de CNBr est effectuée *in situ* sur gel de polyacrylamide, selon la méthode décrite par Jahnen et al. (1990). Les protéines radioactives choisies sont localisées sur gel SDS-PAGE après une coloration en présence de 0.3 M ZnCl₂. Les morceaux de gel sont prélevés, puis lyophilisés dans des tubes Eppendorf. Ils sont ensuite traités au CNBr (2,5 mg) pendant 16h à 25°C et sous agitation douce en présence de 500 µl d'acide formique à 70%. La réaction est arrêtée par lyophilisation dans une centrifugeuse "Speed Vac Concentrator" Savant. Les morceaux de gel sont ensuite conditionnés et fixés dans un gel SDS-PAGE contenant 15 à 30% d'acrylamide (voir 2.2.17). Le gel est finalement coloré, séché et autoradiographié.

2.2.19. Immunoprécipitation des protéines d'enveloppes en présence d'IgG spécifiques

Toutes les opérations ont été effectuées selon le protocole expérimental décrit par Scherer et al. (1990). Des protéines d'enveloppes (90 µg) sont phosphorylées en présence de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 4 mM MgCl₂ et 20 µCi de (γ^{32} P)ATP dans un volume final de 50 µl. Après une incubation à 23°C pendant 5 min, les enveloppes sont lavées dans 0.8 ml de 50 mM MOPS-NAOH (pH 7.6), 45 mM NaF et 45 mM Na₂MoO₄, puis sédimentées par centrifugation à 15800 g (14000 rpm; Eppendorf microfuge) pendant 3 min. Le surnageant est éliminé soigneusement (les culots sont fragiles!). Le lavage est répété deux fois de suite de manière identique. Les membranes d'enveloppes sédimentées sont ensuite dénaturées par chauffage pendant 5 min à 95°C en présence de 50 µl d'une solution de 2% (p/v) SDS, puis diluées dans 1.1 ml de TNET (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA-Na₂). L'immunoprécipitation est induite par l'addition de 20 µl d'une solution d'IgGs purifiées. Après une incubation d'une nuit à 4°C, les complexes immuns sont ensuite absorbés sur des billes d'agarose-protéine A (Sigma A 2767; 50 µl d'une suspension de billes, rapport 1:1 (v/v) dans TNET) pendant 2 h à température ambiante. Les billes sont lavées cinq fois avec 1 ml d'une solution modifiée de TNET ne contenant que 0.05% de Triton X-100 et une fois avec du TNET sans Triton X-100. Entre chaque lavage, les billes sont récupérées par sédimentation à 8000 g (10000 rpm, Eppendorf microfuge 5415c). Les complexes immuns sont solubilisés des billes par chauffage, à 95°C pendant 5 min, dans 80 µl de tampon pour échantillons SDS-PAGE, puis séparés par électrophorèse et traités comme indiqué au point 2.2.16.

2.2.20. Détermination des acides aminés phosphorylés

2.2.20.1. Elution des protéines séparées par SDS-PAGE

Des membranes internes d'enveloppes (120 µg) sont phosphorylées, séparées par électrophorèse et autoradiographiées comme indiqué sous 2.2.16; puis les bandes radioactives sont excisées du gel mère. L'élution des protéines par électrophorèse (Extraphor, LKB) donnant des résultats variables, nous avons préféré la méthode décrite par Beemon et Hunter (1978). Les morceaux de gel préalablement séchés sont coupés en petits morceaux et réhydratés dans un petit volume de 0.05 M NH₄HCO₃ contenant 0.1% (p/v) SDS. Après l'élimination des papiers filtres, décollés du gel, les morceaux de gel sont homogénéisés dans un "potter" en verre muni d'un pilon en téflon. Le volume final de tampon utilisé (incluant le rinçage du "potter"), qui permet une élution optimale, ne doit pas dépasser environ 2 ml pour 100 mm² de gel. Pour éluer les protéines du gel, l'homogénat est additionné de 5% final (v/v) de 2-mercaptoéthanol, bouilli pendant 5 min, et placé pendant une nuit sous agitation à 37°C. Les fragments du gel sont centrifugés à 16500 g (10000 rpm, rotor HB-4) pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et additionné de 75 µg de BSA. La BSA joue le rôle de transporteur, car on précipite ensuite les protéines dans une solution de 20% (v/v) TCA pendant 4 h à 0°C. Les protéines sont alors récupérées par sédimentation à 16500 g (10000 rpm, rotor HB-4)

pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec quelques ml d'éthanol dénaturé à -10°C, puis avec un mélange éthanol/éther (1:1) également tempéré à -10°C.

2.2.20.2. Hydrolyse acide des phosphopolypeptides

L'hydrolyse acide des acides aminés phosphorylés est effectuée selon la méthode décrite par Hunter et Sefton (1980). Après élution (2.2.20.1), les protéines radioactives sont dissoutes dans 6 M HCl, chauffées à 100°C pendant 1 min, puis incubées pendant 2 h à 100°C sous azote. Les hydrolysats sont ensuite séparés en trois parties égales et l'acide chlorhydrique éliminé sous pression réduite (rotavapor). Chaque hydrolysat est dilué dans une solution aqueuse contenant 5 mg/ml des marqueurs suivants: phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine (Sigma). Les acides aminés sont séparés par électrophorèse unidimensionnelle sur couche mince de cellulose (100 µm, Macherey-Nagel) pendant 50 min à 1 kV dans un mélange d'acide acétique/pyridine/H₂O, 50;5;945 (v/v). Les marqueurs sont détectés à la ninhydrine et les acides aminés phosphorylés par autoradiographie à -70°C.

2.2.21. Détection d'activités protéine-kinasiques dans un gel de polyacrylamide

Cette procédure décrite par Geahlen et al. (1986) permet l'identification d'activités protéine-kinasiques dans des échantillons protéiques séparées par électrophorèse. Des aliquotes contenant 15 µg de protéines d'enveloppes, de membranes interne et externe d'enveloppes sont séparés par SDS-PAGE, alors que des échantillons de stroma contenant 70 µg de protéines sont séparés par électrophorèse non-dénaturante. La fraction III-S de l'Histone (Sigma H 5505), ou une fraction de Caséine déphosphorylée (Sigma C 8032) est préalablement incluse comme substrat dans la matrice du gel de séparation (10% p/v). Après l'électrophorèse, les protéines séparées par SDS-PAGE sont renaturées (à température ambiante et sous agitation douce) par six lavages dans MOPS-NaOH (pH 7.6) pendant 6 h, alors que le gel natif n'est lavé qu'une seule fois dans ce même tampon pendant 45 min. Les gels sont préincubés pendant 45 min dans une solution de MMC contenant: 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 10 mM MgCl₂ et 0.5 mM CaCl₂; ils sont ensuite placés dans 15 ml d'une solution de MMC fraîchement préparée et additionnée de 40 µCi (^γ³²P)ATP. Après une incubation de 3 h à température ambiante et sous agitation douce, l'excès en ATP radioactif est éliminé d'abord par un rinçage rapide des gels à l'eau distillée, puis par une incubation d'une nuit dans 300 ml de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6) contenant 15 g de résine échangeuse d'anions DOWEX 2 X 8 (20-50 mesh, Fluka 44375). Le lavage des gels est terminé par une dernière incubation de 3 h dans une solution de 1% (p/v) de pyrophosphate de sodium dilué dans 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6). Les protéines sont fixées dans le gel après une incubation dans 250 ml de 10% (v/v) 2-propanol, 5% (v/v) acide acétique et 1% (p/v) de pyrophosphate de sodium. Les gels sont finalement colorés au bleu de Coomassie et placés en autoradiographie pendant 3 à 4 jours comme indiqué sous 2.2.16.

2.3. Bibliographie

- Affolter, D. (1982) Purification, caractérisation et biosynthèse de la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique chez *Euglena gracilis*, souche z. Zentrastelle des Studentschaft, Zürich.
- Beemon, K., Hunter, T. (1978) Characterization of rous sarcoma virus src gene products synthesized in vitro. *J. Virol.* 28: 551-566.
- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bruinsma, J. (1981) A comment on spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 53: 576-578.
- Cleaveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.
- Covès, J., Pineau, B., Joyard, J., Douce, R. (1988) Solubilisation of chloroplast envelope membranes by detergents and its effects on activity of envelope marker enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 151-163.
- Douce, R. et Joyard, J. (1982) Purification of the chloroplast envelope. *Dans Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Edelman, M., Hallick, R.B. and Chua, N.-H., eds. Elsevier, Amsterdam, pp 239-259.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radioactives associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'Épinard après protéosynthèse *in organello* en présence de ³⁵S-méthionine, Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Suisse.
- Dunbar, B.S. (1987) Sample preparation and solubilization for one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Dans Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*, Plenum Press, New York.
- Geahlen, R.L., Anostario, M., Low, P.S., Harrison, M.L. (1986) Detection of protein Kinase activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 153: 151-158.
- Heegaard, N.H.H., Bjerrum, O.J. (1986) *Dans Handbook of immunoblotting of proteins*. Ed. Bjerrum et Heegaard. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hunter, T., Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1311-1315.
- Jäckle, H. (1979) Visualization of proteins after isoelectric focusing during two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 98: 81-84.
- Jahnen, W., Ward, L.D., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. (1990) Internal amino acid sequencing of proteins by *in situ* cyanogen bromide cleavage in polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 139-145.
- Keestra, K., Youssif, A.E. (1986) Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Methods Enzymol.* 118: 316-325.
- Knudsen, K.A. (1985) Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.* 147: 285-288.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leary, J.J., Brigati, D.J., Ward, D.C. (1983) Rapid and sensitive and colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4045-4049.
- L'Epattenier, B. (1991) Contribution à l'étude d'une phosphoprotéine de 51 kDa constitutive des membranes d'enveloppes du chloroplaste d'Epinard. Travail de diplôme réalisé au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Ferr, A.L., Randal, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E., Bieber, L.L. (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Dans Methods in Enzymology*, vol 72, Part D. Ed. Lowenstein. Academic Press, New York, pp 296-303.
- Mouriaux, G., Douce, R. (1981) Slow passive diffusion of orthophosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium. *Plant Physiol.* 67: 470-473.
- Nguyen, T.D. (1984) Les protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard: Identification et caractérisation de l'adénosine triphosphatase. Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Rawlyer, A., Meylan, M., Siegenthaler, P.A. (1992) Galactolipid export from envelope to thylakoid membranes in intact chloroplasts. I. Characterization and involvement in thylakoid lipid asymmetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 331-341.
- Scherer, P.E., Krieg, U.C., Hwang, S.T., Vestweber, D., Schatz, G. (1990) A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein. *EMBO J.* 9: 4315-4322.
- Siegenthaler, P.A., Nguyen, T.D. (1983) Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 228-233.
- Siegenthaler, P.A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, Thylakoid and stroma polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.
- Siegenthaler, P.A., Rawlyer, A., Smutny, J. (1989) The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of thylakoid membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 975: 104-111.
- Soll, J., Bennett, J. (1988) Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and the inner envelopes of pea chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 301-307.
- Spector, T. (1978) Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.* 86: 142-146.
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Valtorta, F., Schiebler, W., Jehn, R., Ceccarelli, B., Greengard, P. (1986) A solid-phase assay for the phosphorylation of proteins blotted on nitrocellulose membrane filters. *Anal. Biochem.* 158: 130-137.
- Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- Welch, W.J., Feramisco, J.D. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1229-1237.

CHAPITRE 3

Etude sur la phosphorylation *in vitro* des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard

3.1. Introduction

La phosphorylation des protéines peut être réalisée *in vitro* dans les trois compartiments majeurs du chloroplaste, soit les thylacoïdes, le stroma et les enveloppes (Bennett, 1991). Concernant les thylacoïdes, les phosphoprotéines les mieux décrites, en terme d'identité et de fonction, sont les apoprotéines de 23 et 25 kDa constitutives du LHCII (Bennett, 1984). D'autres protéines thylacoïdales sont également phosphorylables, notamment quatre phosphoprotéines du PSII, ayant respectivement comme poids moléculaire: 8, 32 (D1), 34 (D2) et 43 kDa (Michel et al., 1988).

La signification physiologique de l'incorporation du phosphore dans ces protéines commence seulement maintenant à être connue. Le LHCII, par exemple, est célèbre pour jouer un rôle important dans le "spill over" (mécanisme qui permet le transfert d'énergie entre les deux photosystèmes). Les propriétés adhésives de son extrémité N-terminale lui permettent en outre d'induire la formation de granas (régions accolées des membranes photosynthétiques) (Murphy, 1986; Mullet, 1983). Comme la phosphorylation du LHCII a lieu sur cette même extrémité N-terminale, il est fort probable que la phosphorylation affecte non seulement la structure des granas, mais aussi le transfert d'énergie entre les deux photosystèmes. Par contre, bien qu'on attribue à la phosphorylation des protéines du PSII des propriétés différentes, comme agent stabilisateur, par exemple, ou protecteur contre les herbicides et la photoinhibition (Shochat et al., 1982; Horton et Lee, 1985), son rôle précis reste encore à être déterminé.

Toutes les expériences de phosphorylation, effectuées sur les protéines du chloroplaste, ont montré qu'environ nonante pour cent de la radioactivité est incorporée dans les protéines thylacoïdales (Bennett, 1979). Cependant, il semble que le nombre de phosphoprotéines dans le stroma et les enveloppes confondus soit plus grand que dans les thylacoïdes isolés. Comparativement aux membranes photosynthétiques, seulement quelques protéines phosphorylées ont été identifiées dans le stroma: notamment la pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) dans les chloroplastes des

cellules du mésophylle des plantes en C₄, la RubisCO et deux protéines ribosomales du stroma, qui incorporent bien le ³²P lorsqu'on incube des chloroplastes d'Épinard à la lumière et en présence de (³²P) orthophosphate (Guitton et al., 1984). La PPDK, qui est une enzyme catalysant la conversion du pyruvate, ATP et Pi en PEP, AMP et P_{ii}, a la particularité d'être inactivée par la phosphorylation de résidus thréonines et réactivée par déphosphorylation des mêmes sites (Edwards et al., 1985). Par contre, les deux sous-unités de la RubisCO, qui ont la capacité d'incorporer du phosphate radioactif dans des chloroplastes d'Épinard énergétisés et incubés en présence de (³²P)Pi (Foyer, 1985), ne sont pas marquées *in vitro* par du (^γ³²P)ATP dans un extrait de stroma isolé (Cortez et al., 1987). Ce résultat suggère que ce processus, dans lequel la lumière et l'intégrité de l'organe jouent un rôle important, n'est pas dépendant de protéine-kinases du stroma, mais plutôt de l'enveloppe ou des thylacoïdes.

Dans la fraction du stroma du chloroplaste de Pois, la phosphoprotéine la plus marquée, qui est un polypeptide d'environ 64 kDa, a récemment été identifiée comme une phosphoglucomutase (Salvucci et al., 1990). D'après Soll et Bennett (1988), cette protéine serait cependant plutôt localisée dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe. Plusieurs caractéristiques biochimiques et biophysiques qui lui sont propres ont déjà été décrites par Soll et Bennett (1988) et Soll et al., (1989); mais de telles informations ne sont pas encore disponibles pour la phosphoprotéine équivalente de Mr 70 kDa présente dans le stroma des chloroplastes d'Épinard, par exemple (Cortez et al., 1987; Foyer, 1985).

Si une phosphoprotéine, présente dans l'espace entre les membranes interne et externe de l'enveloppe, a bien été identifiée, d'autres phosphoprotéines ont été localisées au sein même des membranes d'enveloppes (Soll, 1985). Dans celles du chloroplaste d'Épinard, les quatre principaux phosphopolypeptides possèdent des poids moléculaires d'environ 67 (Bovet et Siegenthaler, 1991), 51, 26 et 14 kDa (Laing et Christeller, 1984; Hinz et Flügge, 1988). La seule de ces quatre phosphoprotéines qui dispose d'une fonction définie est celle de 51 kDa, puisque Hinz et Flügge (1988) l'ont décrite comme un constituant typiquement membranaire impliqué dans l'import des protéines cytosoliques vers le chloroplaste. Ils ont observé que la phosphorylation *in organello* de cette protéine, en présence de (^γ³²P)ATP, est inversement proportionnelle à l'import de la petite sous-unité de la RubisCO. Le marquage dans la protéine de 51 kDa étant inhibé par un traitement préalable à la thermolysine, ces mêmes auteurs ont localisé cette protéine dans la membrane externe de l'enveloppe. Les informations disponibles sur les trois autres phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa, mentionnées ci-

dessus, sont encore plutôt rares. Leurs rôles dans le chloroplaste d'Epinard restent toujours à être démontrés, bien que Soll et Buchanan (1983) aient suggéré que la phosphoprotéine de 14 kDa puisse être un pool phosphorylé de petite sous-unité de la RubisCO lié aux membranes externes de l'enveloppe.

Les activités protéine-kinasiques sont plus fortes dans les membranes externes de l'enveloppe du chloroplaste de Pois que dans les internes. Cette intense activité se traduit par une abondance de phosphopolypeptides de poids moléculaires élevés. Leurs fonctions dans la physiologie du chloroplaste restent encore à être élucidées (Soll et Bennett, 1988). L'ATP radioactif n'est toutefois pas le seul substrat pour ces phosphoprotéines, puisque plusieurs d'entre elles sont phosphorylées par du ($\gamma^{32}\text{P}$)GTP (Soll et al., 1988).

3.2. But du chapitre

Aucune étude détaillée sur la phosphorylation des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard n'ayant été réalisée jusqu'à maintenant, nous nous proposons d'établir dans ce chapitre les conditions expérimentales optimales permettant de mettre en évidence les diverses activités protéine-kinasiques endogènes exhibées par l'enveloppe du chloroplaste.

Dans ce but, nous étudierons la phosphorylation *in vitro* des protéines dans les membranes internes et externes de l'enveloppe, en portant plus particulièrement notre attention sur les divers paramètres biophysiques ou biochimiques, capables d'influencer l'incorporation spécifique du phosphate dans les différentes protéines cibles. Nous espérons ainsi détecter la présence de certaines activités protéine-kinasiques (uniques ou multiples) dans l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard.

3.3. Résultats

Après la séparation de protéines d'enveloppes et de stroma par SDS-PAGE, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (Fig. 3.1A; gauche). L'image électrophorétique est très similaire à celle observée par Joyard et al. (1982) et Siegenthaler et Nguyen (1983). Quand les deux fractions sont incubées *in vitro* avec du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, les autoradiographies correspondantes révèlent la présence de plusieurs polypeptides marqués. Dans l'enveloppe, les principales phosphoprotéines ont des poids moléculaires d'environ 67, 26 et 14 kDa, alors que dans le stroma, on n'en détecte que deux dont le

Mr est d'environ 94 et 67 kDa (Fig.3.1B; gauche). Si on augmente le temps d'exposition du film autoradiographique, deux phosphoprotéines additionnelles de haut poids moléculaire (> 120 kDa) sont détectées dans le stroma d'Epinard (voir "Chapitre 7"), comme chez le Pois (Soll et Bennett, 1988). La phosphorylation de ces deux protéines de haut Mr varie en fonction de la nature de l'extrait utilisé (l'origine des Epinards et la maturité des feuilles étant à chaque fois différentes) et de sa durée de stockage au froid (l'activité protéine-kinasique responsable semble altérée par une congélation à -30°C de plus d'un mois) (résultats non présentés).

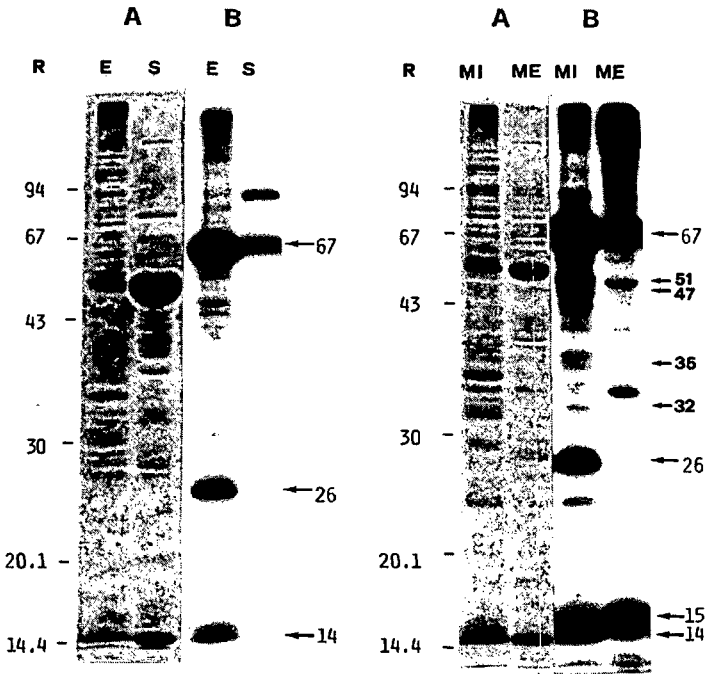


Fig.3.1. Comparaison du profil électrophorétique des polypeptides non-phosphorylés et phosphorylés dans les enveloppes, les membranes internes et externes de l'enveloppe, ainsi que dans le stroma. Les protéines d'un extrait total d'enveloppes (E), du stroma (S) et des membranes internes (MI) et externes (ME) d'enveloppes sont séparées par SDS-PAGE 13%, après incubation *in vitro* en présence de $(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$ (voir "Matériels et méthodes"). La coloration du gel au bleu de Coomassie est montrée sur la gauche (A) et son autoradiographie correspondante sur la droite (B). Les flèches indiquent la position dans le gel des principaux polypeptides marqués dans ces fractions. La colonne R mentionne la taille (M_r) des protéines de référence séparées dans le même gel.

Les mêmes expériences de phosphorylation ont été effectuées sur des fractions de membranes internes et externes d'enveloppes. La coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées sur gel-SDS (Fig.3.1A; droite) est similaire à celle publiée par Block et al. (1983) et Siegenthaler et Dumont (1990), bien que de légères différences apparaissent entre nos profils électrophorétiques et ceux publiés par Block et al. Ces variations proviennent assurément des méthodes utilisées pour la préparation des membranes (*i.e.* traitement des chloroplastes par l'homogénéisateur Dounce ou la presse de Yeda). L'autoradiographie correspondante (Fig.3.1B; droite) montre que, parmi les trois polypeptides radioactifs majeurs de l'enveloppe, seulement un d'entre eux (67 kDa), ou peut-être deux (67 et 14/15 kDa) sont présents dans les membranes externes, alors qu'on les détecte tous dans les membranes internes. Il est remarquable de constater que l'incorporation du ^{32}P , au même titre que la coloration au bleu de Coomassie est très différente dans les deux types de membrane d'enveloppes. Les membranes internes, par exemple, ne contiennent principalement que des phosphopolypeptides possédant un $\text{Mr} < 67$ kDa (67, 51, 47, 35, 32, 26, 23 et 14 kDa), alors que les protéines marquées dans les membranes externes de l'enveloppe ont des poids moléculaires beaucoup plus élevés (à l'instar de celles du Pois, Soll et al., 1988), mise à part une phosphoprotéine fortement radioactive de 15 kDa. Dans nos conditions expérimentales (voir "Matériels et méthodes"), les protéines des membranes d'enveloppes de l'Epinard incorporent le ^{32}P , à partir de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP de manière assez semblable à celles du Pois (Soll et Bennett, 1988). Ceci nous permettra de comparer nos résultats avec ceux publiés par ces auteurs.

La figure 3.2 montre que des quantités croissantes en ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP stimulent les activités protéine-kinasiques et influencent le degré de phosphorylation des phosphoprotéines d'enveloppes. En présence de 8 nM d'ATP radioactif (Fig.3.2; colonne A), seulement deux polypeptides de Mr 67 et 56 kDa incorporent bien le ^{32}P . L'adjonction de concentrations plus élevées en ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, respectivement 33.3, 133 et 500 nM (Fig.3.2; colonnes B, C, D) induit un marquage dans d'autres polypeptides, dont certains bien distincts de Mr 51, 35, 32, 26, 23 et 14 kDa. On notera que l'addition de 33.33 nM d'ATP radioactif suffit à mettre en évidence tous ces polypeptides phosphorylés.

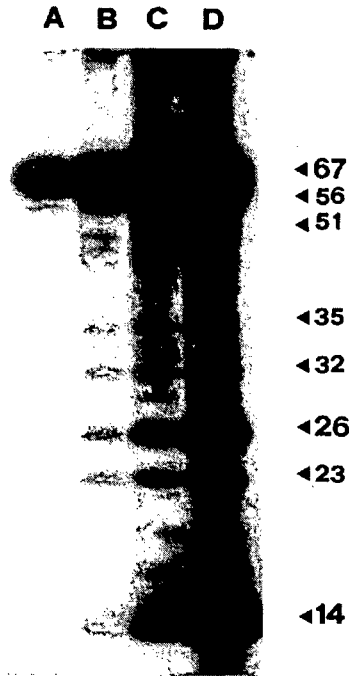


Fig.3.2. Phosphorylation des protéines d'enveloppes, en présence de quantités croissantes d'ATP radioactif. Dans des conditions standard (excepté pour le ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP; voir "Matériels et méthodes"), 30 μg de protéines d'enveloppes sont phosphorylées en présence de quantités croissantes de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, soit respectivement: 8nM (A), 33.33 nM (B), 133 nM (C) et 500 nM (D). Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE, colorées au bleu de Coomassie et autoradiographiées. Les chiffres mentionnent le poids moléculaire des phosphoprotéines.

Afin de déterminer l'incorporation du ^{32}P dans les trois phosphoprotéines majeures de l'enveloppe, nous avons estimé la radioactivité (cpm) par comptage Cerenkov, en fonction des quantités croissantes d'ATP radioactif ajoutées précédemment (voir "Fig.3.2"). La figure 3.3 montre clairement que les polypeptides phosphorylés de 26 et 14 kDa suivent la même courbe d'incorporation (cpm). Cette courbe est différente de celle caractérisant la phosphoprotéine de 67 kDa. Mis à part le fait que l'incorporation dans la protéine de 67 kDa est environ 30 fois supérieure à celle exhibée par les protéines de 26 et 14 kDa, la courbe montre que l'incorporation (au sens strict) dans les deux protéines de 26 et 14 kDa est plus forte, entre 0.133 et 0.5 μM de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP ajouté, que dans la protéine de 67 kDa. Par contre, cette pente est plus faible pour des

concentrations en ATP radioactif inférieures à 0.133 μM . Le même type d'analyse a aussi été effectué sur les autres phosphoprotéines mineures de 51, 35, 32 et 23 kDa (voir "Fig.3.2"). Les courbes qui résultent de cette analyse montrent que les trois phosphoprotéines de 35, 32 et 23 kDa suivent un profil d'incorporation identique à celui de la phosphoprotéine de 67 kDa (résultats non montrés). Par contre, le profil d'incorporation de la protéine de 51 kDa est plus proche de celui des phosphoprotéines de 26 et 14 kDa (résultats non montrés).

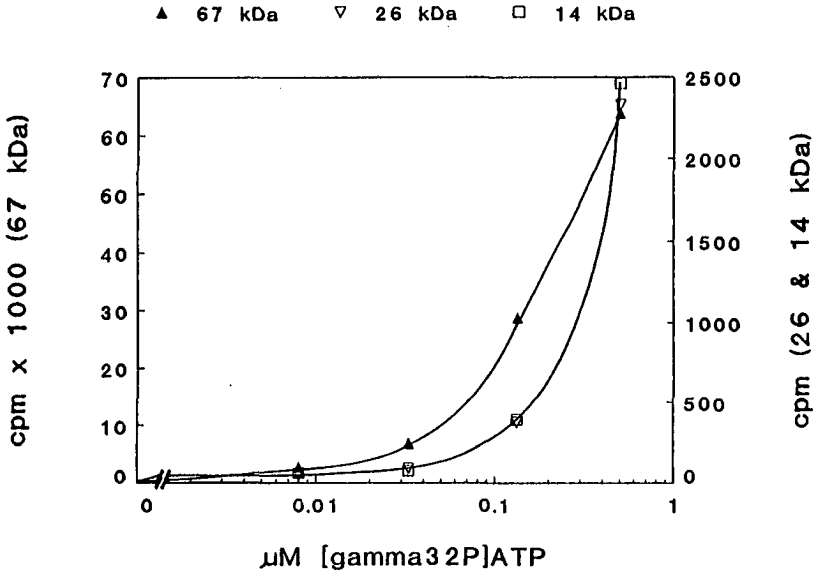


Fig.3.3. Analyse par comptage Cerenkov de l'incorporation du ^{32}P dans les 3 phosphoprotéines majeures de l'enveloppe, en fonction de quantités croissantes d'ATP radioactif ajoutées
Les conditions expérimentales sont pareilles à celles de la Fig.3.2.

La figure 3.4 montre l'autoradiographie résultant de la séparation par SDS-PAGE des protéines d'enveloppes, phosphorylées dans différentes conditions de températures. La phosphorylation des protéines a été réalisée comme indiqué dans "Matériels et méthodes", alors que les températures d'analyse ont été choisies de façon arbitraire (0, 10, 23, 37 et 50 °C). Cette expérience indique clairement que l'incorporation du phosphate radioactif dans la majeure partie des protéines d'enveloppes est optimale à 23 °C. Le profil des bandes marquées reste cependant identique entre 0 et 37 °C, mais

diffère sensiblement à 50°C. A cette température élevée, certaines bandes "disparaissent" (35 et 23 kDa, par exemple) au profit d'autres (33 et 94 kDa, par exemple), dont la capacité d'incorporation du ^{32}P augmente. Les activités protéine-kinasiques sont complètement abolies lorsqu'on incube les enveloppes pendant 3 min à 100°C (résultats non présentés).

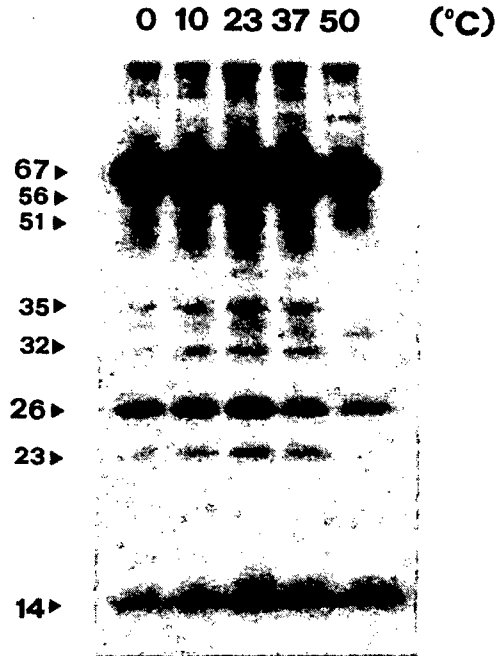


Fig.3.4. Phosphorylation des protéines d'enveloppes en fonction de la température

Les protéines d'enveloppes sont phosphorylées dans des conditions standard et à différentes températures: 10, 23, 37 et 50 °C. Les chiffres indiquent la position des phosphoprotéines dans le gel-SDS après autoradiographie.

La partition de phase du Triton X-114 à température ambiante, est utilisée ici dans le but de déterminer le caractère hydrophile et hydrophobe des protéines phosphorylées dans l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. Cette technique a été développée par Bordier (1981) et adaptée dans notre laboratoire par Siegenthaler et Dumont (1990) pour l'analyse des protéines chloroplastiques. La figure 3.5 révèle que la phosphoprotéine de 67 kDa exhibe de nettes propriétés hydrophiles, alors que les

polypeptides phosphorylés de 26 et 14 kDa "préfèrent" la phase détergente. On constate en outre que les polypeptides de 51 et 47 kDa restent plutôt dans la phase organique, alors que ceux de Mr respectifs de 56, 35, 32 et 23 kDa sont présents uniquement dans la phase aqueuse.

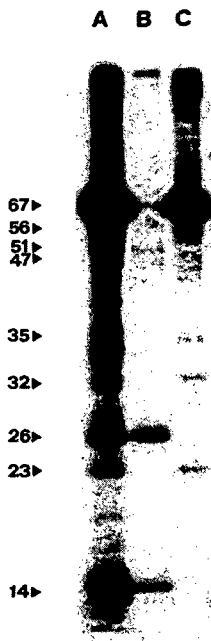


Fig.3.5. Partition de phase au Triton X-114 des phosphoprotéines d'enveloppes

Des protéines d'enveloppes (60 µg) sont phosphorylées dans des conditions standard en présence de 66.66 nM de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, puis traitées au Triton X-114 comme décrit dans "Matériels et méthodes". Après SDS-PAGE, la phase détergente (colonne B) et la phase aqueuse (colonne C) sont autoradiographiées. La colonne A montre le contrôle correspondant aux polypeptides phosphorylés dans des enveloppes non-traitées. Les Mr des phosphoprotéines majeures sont indiquées par des flèches.

Afin de déterminer le rôle du magnésium et l'effet du pH sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes, nous avons préincubé les membranes, avant l'adjonction de l'ATP radioactif, soit avec des concentrations croissantes en magnésium, soit à différents pH (Figs 3.6, 3.7 et 3.8).

L'incorporation du ^{32}P dans toutes les phosphoprotéines d'enveloppes est strictement dépendante des concentrations croissantes de magnésium ajoutées dans le

milieu d'incubation (Fig.3.6). Bien que les enveloppes contiennent déjà du magnésium, en quantité variable d'une préparation à l'autre (Gupta et Berkowitz, 1989), le marquage radioactif augmente sensiblement dans tous les polypeptides séparés sur le gel-SDS.

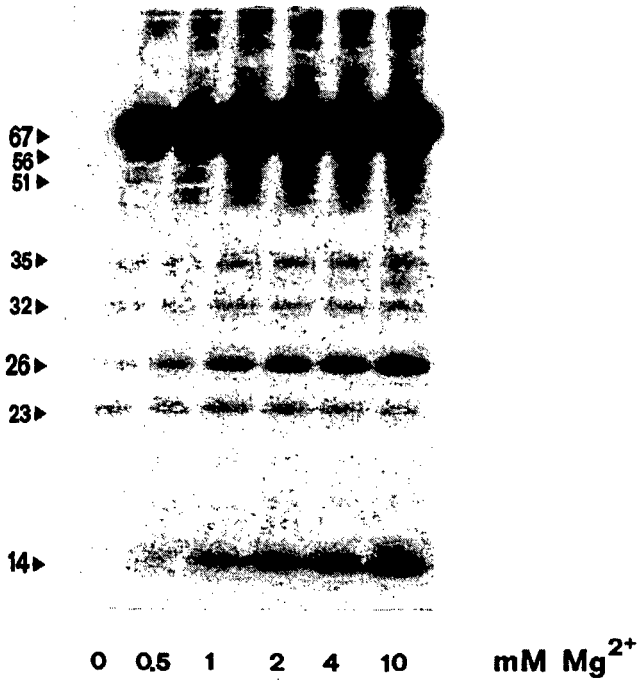


Fig.3.6. Effet du Mg²⁺ sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes

Des membranes d'enveloppes (30 µg) sont phosphorylées (voir "Matériels et méthodes") en présence de quantités croissantes de MgCl₂ (0.5;1;2;4 et 10 mM final de MgCl₂). Après séparation des protéines par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, le gel est séché et soumis à une autoradiographie pour l'identification précise (Mr) des bandes les plus radioactives: 67, 56, 51, 35, 32, 26, 23 et 14 kDa.

La figure 3.7 montre l'autoradiographie des polypeptides d'enveloppes séparés par SDS-PAGE, après leur phosphorylation à différents pH. De façon générale, les phosphoprotéines sont sensibles à la variation du pH. On constate cependant que la majorité des polypeptides est bien marquée surtout en milieu acide (5.5-6.5) et indépendamment du type de tampon utilisé (comparer MOPS ou MES à pH 6.0). Les variations du pH dans le milieu ambiant ne modifient pas seulement quantitativement le marquage des protéines, mais aussi qualitativement. En effet, le taux de ³²P incorporé dans les trois phosphoprotéines majeures de l'enveloppe (67, 26 et 14 kDa) est modulé

de manière significative par la concentration des ions H⁺, mais non par le type de tampon utilisé. On constate, par exemple, qu'une phosphoprotéine d'environ 33 kDa(*), qui est bien visible au bleu de Coomassie (résultat non montré), n'est pas marquée à pH 7.6, mais efficacement à des pH acides (5.0 - 6.0). L'intensité de sa phosphorylation est inversement proportionnelle à celle des autres protéines, excepté en milieu acide, indiquant qu'il s'agit peut-être d'une protéine-kinase s'autophosphorylant à des pH entre 5.0 et 6.0. Les sensibilités des phosphoprotéines de 23, 32 et 35 kDa aux variations du pH sont comparables entre elles.

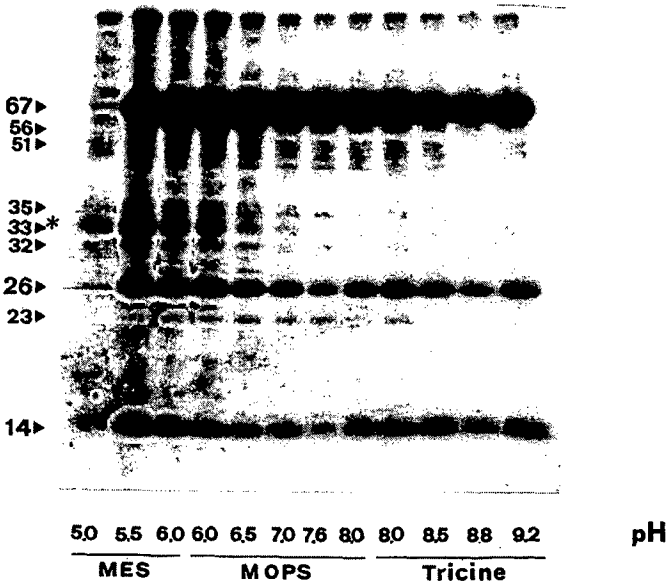
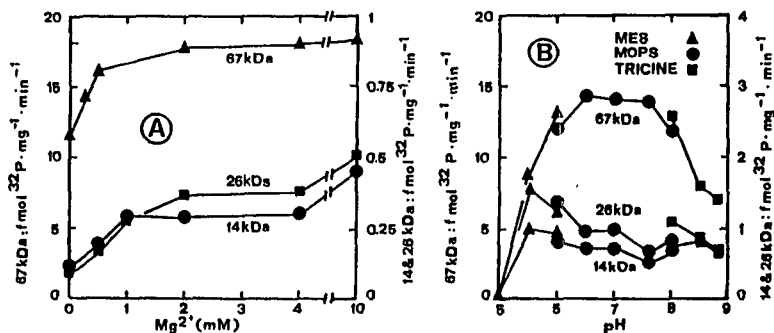


Fig.3.7. Effet du pH sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes
 Avant la phosphorylation des protéines d'enveloppes dans des conditions standard, des aliquotes de 30 µg de protéines sont équilibrés dans un volume de 120 µl de tampon pH approprié (MES, MOPS ou de Tricine), puis centrifugés à 15800g pendant 5 min dans une microcentrifugeuse Eppendorf.

Pour quantifier l'incorporation du ³²P dans les trois phosphoprotéines majeures de l'enveloppe (67, 26 et 14 kDa), en fonction des concentrations en magnésium ajoutées (Fig.3.6) et du pH (Fig.3.7), nous avons déterminé, par comptage Cerenkov, la radioactivité contenue spécifiquement dans ces trois phosphoprotéines (Fig.3.8). Le profil d'activation par le magnésium est pareil pour les deux protéines de 26 et 14 kDa. On observe une stimulation notoire de leurs phosphorylations jusqu'à environ 1 mM, suivie

d'un plateau et enfin d'une lente activation de 4 à 10 mM de Mg^{2+} ajouté. Pour la phosphoprotéine de 67 kDa, on remarque que le plateau d'activation dû au magnésium est atteint à environ 2 mM, et maintenu quasi constant (légère activation) jusqu'à 10 mM (Fig.3.8A). L'incorporation de ^{32}P dans la protéine de 67 kDa exhibe un large domaine de pH optimum (de pH 6 à 8), alors que les deux autres protéines arborent, qualitativement et quantitativement, des profils très proches avec un optimum aux environs de pH 5.5-6.0 (Fig.3.8B).



Figs 3.8 A-B. Effet de Mg^{2+} et du pH sur la phosphorylation des protéines de 67, 26 et 14 kDa. Les phosphoprotéines majeures de Mr 67, 26 et 14 kDa ont été excisées dans les gels des figures 3.6 et 3.7. La radioactivité spécifique de chaque bande ($f \text{ mol de } ^{32}P \text{ incorporés/mg de protéines d'enveloppes/min}$) a été déterminée après comptage Cerenkov.

L'incorporation du ^{32}P dans les protéines d'enveloppes a aussi été examinée en relation avec la présence d'agents chélateurs spécifiques du Mg^{2+} et du Ca^{2+} , soit EDTA soit EGTA (Fig.3.9). On constate que l'addition de 0.1 mM $CaCl_2$ dans le milieu d'incorporation (colonne B) ne modifie pas le profil des phosphoprotéines d'enveloppes mais induit, par rapport au contrôle (colonne A), une augmentation du marquage d'environ 15 à 20% dans certains polypeptides (ex: 51, 26 et 14 kDa). Nous avons ajouté 0.1 mM $CaCl_2$, car des concentrations plus élevées en calcium sont moins favorables à la phosphorylation des protéines d'enveloppes (résultats non présentés). La chélation du calcium avec EGTA (colonne C) aboutit à une abolition complète du marquage dans les phosphopolypeptides de 51, 26 et 14 kDa, sans avoir d'influence sur les autres de 67, 56, 35, 32 et 23 kDa. L'absence de $MgCl_2$ exogène diminue de 75% environ

l'incorporation du ^{32}P dans les phosphoprotéines de Mr 51, 26 et 14 kDa, mais d'environ 10% seulement dans celles de 67, 56, 35, 32 et 23 kDa (colonne D). Si on chélate le magnésium avec EDTA (5 mM), le marquage est supprimé dans toutes les phosphoprotéines d'enveloppes, à l'exception cependant d'une protéine de 18 kDa, qui n'apparaît que dans ces conditions (colonne E).

Le même type d'expérience a été effectué sur les protéines du stroma (résultats non présentés). Si l'EGTA n'a aucun effet, par contre, l'EDTA (5 mM) contrecarre, tout comme dans l'enveloppe (Fig.3.9), l'incorporation du ^{32}P dans toutes les phosphoprotéines constitutives du stroma. Dans ces conditions de marquage, une nouvelle bande protéique phosphorylée d'environ 18 kDa apparaît tout comme dans l'enveloppe (résultats non présentés).

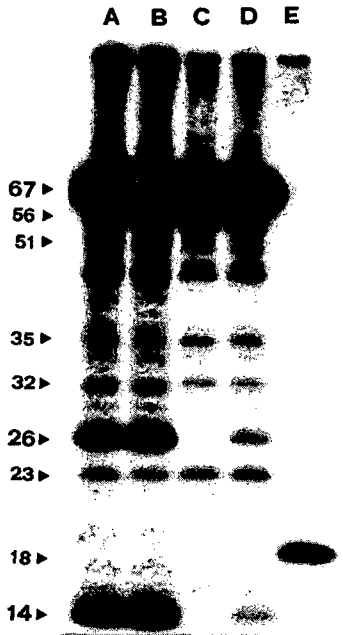


Fig.3.9. Effet des cations divalents (calcium et magnésium) sur la phosphorylation des polypeptides d'enveloppes

Les membranes d'enveloppes (30 μg) ont été phosphorylées, soumises à SDS-PAGE et enfin autoradiographiées. L'incubation des enveloppes dans un milieu réactionnel classique (voir "Matériels et méthodes") s'est déroulée comme suit: contrôle (colonne A), plus 0.1 mM CaCl_2 (colonne B), plus 5 mM EGTA (colonne C), sans addition de MgCl_2 (colonne D), plus 5 mM EDTA (colonne E). Les flèches indiquent la position dans le gel des polypeptides phosphorylés de 67,56,51,35,32,26,23,18 et 14 kDa.

Afin de déterminer avec certitude la nature de la dépendance vis-à-vis du Ca^{2+} et Mg^{2+} des protéine-kinases qui phosphorylent les protéines de 67, 26 et 14 kDa, des incréments croissants de MgCl_2 et CaCl_2 , en présence d'une concentration constante d'EDTA et d'EGTA (1 mM), ont été ajoutés avant la phosphorylation des enveloppes (Tableaux 3.1 et 3.2). La chélation du Mg^{2+} endogène avec 1 mM EDTA (Tableau 3.1) suffit à abolir complètement l'incorporation du ^{32}P dans les trois phosphoprotéines, alors que des concentrations croissantes en MgCl_2 exogène restaurent progressivement leurs marquages. Dans des conditions de contrôle, le ^{32}P incorporé dans ces trois protéines correspond à des valeurs obtenues après l'addition entre 5 et 10 mM de MgCl_2 .

Tableau 3.1. Influence de quantités croissantes de MgCl_2 , en présence de 1 mM EDTA, sur le marquage des phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa de l'enveloppe

Addition de $\text{MgCl}_2^{(a)}$ (mM)	Incorporation relative du ^{32}P (cpm)		
	67 kDa	26 kDa	14 kDa
0	0	0	0
0.05	0	0	0
0.1	348	0	0
0.5	3222	0	0
1	38292	255	669
5	51158	672	2028
10	42301	865	2859
Contrôle ^(b) sans EDTA	47084	838	2689

(a) Conditions expérimentales comme dans "Matériels et méthodes" (excepté que MgCl_2 n'est pas présent dans le milieu d'incubation standard, qui contient en outre 1 mM EDTA)

(b) Conditions expérimentales comme dans "Matériels et méthodes" (excepté que 5 millimoles/l de MgCl_2 , au lieu de 4 ont été ajoutées dans le milieu d'incubation)

La chélation du Ca^{2+} avec 1 mM EGTA (Tableau 3.2) induit une suppression complète du marquage dans les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa, mais une légère activation (environ 22%) dans la protéine de 67 kDa (jusqu'à 20% en présence de 5 mM EGTA, voir "Fig.3.9"). Des concentrations en CaCl_2 entre 1 et 5 mM, sont nécessaires

pour restaurer la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa, alors qu'à ces concentrations-là, la phosphorylation de la protéine de 67 kDa diminue progressivement. Dans des conditions de contrôle, le ^{32}P incorporé dans les trois protéines correspond à des valeurs mesurées après l'addition de 1 à 5 mM CaCl_2 .

Tableau 3.2. Influence de quantités croissantes de CaCl_2 , en présence de 1 mM EGTA, sur le marquage des phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa de l'enveloppe

Addition de $\text{CaCl}_2^{(a)}$ (mM)	Incorporation relative du ^{32}P (cpm)		
	67 kDa	26 kDa	14 kDa
0	47817	0	0
0.05	47165	0	0
0.1	52621	0	0
0.5	45893	0	0
1	40515	0	72
5	36485	1214	2258
10	13242	1202	2104
Contrôle ^(b) sans EGTA	39082	1080	2206

(a) Conditions expérimentales comme dans "Matériels et méthodes" (excepté que 5 mM MgCl_2 , au lieu de 4 ont été ajoutées dans le milieu d'incubation additionné de 1 mM EGTA)

A des concentrations relativement élevées (60 mM), le Na_2MoO_4 et le NaF ont de forts effets inhibiteurs sur le marquage des phosphoprotéines d'enveloppes (résultats non montrés). Le molybdate de sodium, comme le fluorure de sodium, altère cependant plus la phosphorylation *in situ* de la protéine de 67 kDa que celles des protéines de 26 et 14 kDa. A des concentrations croissantes d'inhibiteurs ajoutés (20, 40 et 60 mM), le NaF est toujours plus efficace que le Na_2MoO_4 . L'affaiblissement du marquage dans les deux protéines de 26 et 14 kDa est proportionnellement toujours semblable quelles que soient les concentrations de NaF et de Na_2MoO_4 (résultats non présentés).

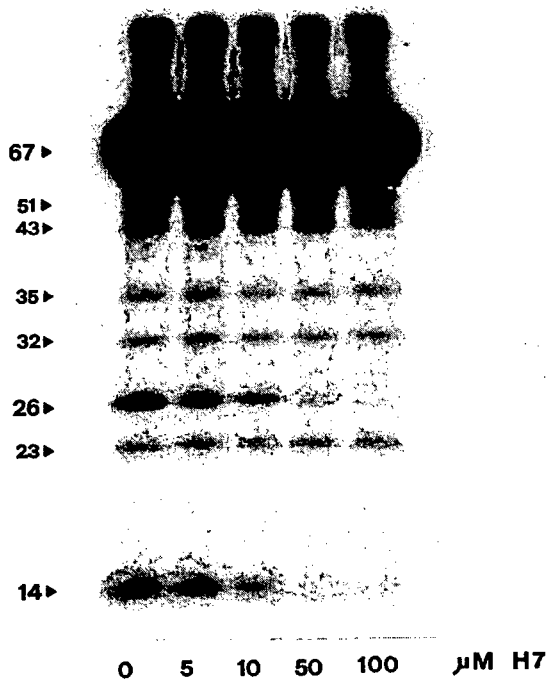


Fig.3.10. Effet de l'inhibiteur H7 sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes
 L'incorporation du ^{32}P dans les protéines d'enveloppes a été effectuée dans les conditions standard en présence de quantités croissantes de H7 (0, 5, 10, 50 et 100 μM). Après électrophorèse, les phosphoprotéines ont été colorées, soumises à autoradiographie et leurs poids moléculaires déterminés.

Dans le but de déterminer quels types de protéine-kinases sont responsables de la phosphorylation des protéines d'enveloppes, nous avons utilisé l'inhibiteur H7 (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-méthylpiperazine). Cette molécule a la propriété d'inhiber sélectivement les protéine-kinases de type C et dans une moindre mesure celles qui sont Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes ou activées par les dérivés cycliques de certains nucléotides (c-AMP, c-GMP). Les protéine-kinases dépendantes des nucléotides cycliques sont apparemment mieux inhibées par un autre composé appelé H8 ((N-(2-(méthylamino)éthyl)-5-isoquinoline-sulfonamide; Hidaka et al., 1984) que nous n'avons pas utilisé dans cette étude. Le potentiel inhibiteur de ces dérivés est dépendant de la position des charges positives présentes sur l'azote terminal de la molécule d'isoquinoline-sulfonamide. Ce composé interagit directement avec les sites actifs de l'enzyme (Hidaka et al., 1984). La figure 3.10 montre l'autoradiographie d'un gel-SDS de

protéines d'enveloppes, phosphorylées en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur H7 (0, 5, 10, 50 et 100 μM). Ce composé affecte de manière significative l'incorporation du ^{32}P , dans les trois protéines de Mr 51, 26 et 14 kDa, mais n'a cependant aucun effet sur la phosphorylation des autres protéines de Mr 67, 35, 32 et 23 kDa. On constate également que l'inhibiteur H7 provoque un effet différent sur certaines phosphoprotéines entre 40 et 50 kDa, puisqu'il semble même avoir un effet activateur entre 10 et 50 μM sur l'une d'elles d'environ 43 kDa. Le comptage Cerenkov des bandes radioactives principales (Fig.3.11) révèle que le composé H7 inhibe de manière sensiblement identique le marquage dans les protéines de 26 et 14 kDa (respectivement 62 et 53% pour 100 μM H7 ajouté). Par contraste, cet effet inhibiteur ne reste que très faible, voire nul, sur la phosphoprotéine de 67 kDa (18% au maximum pour 10 μM de H7 ajouté).

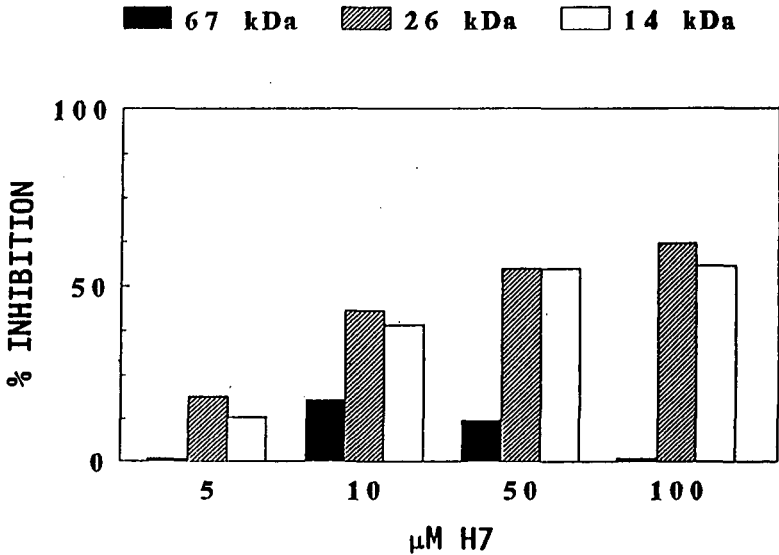


Fig.3.11. Inhibition de la phosphorylation des polypeptides de 67, 26 et 14 kDa par le composé H7. Ces trois protéines ont été excisées dans le gel dont l'autoradiographie est présentée dans la figure 3.10. En l'absence de H7, l'incorporation du ^{32}P dans les protéines de 67, 26 et 14 kDa correspond respectivement à 26270, 256 et 262 cpm.

Les résultats obtenus ci-dessus suggèrent fortement l'implication d'une protéine-kinase de type C ou d'une protéine similaire dans le processus de phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa. Par conséquent, nous avons testé

respectivement un activateur et un inhibiteur spécifiques des protéine-kinases C animales, soit: le phorbol 12-myristate 13-acétate (TPA: "Tumor promoting phorbol ester") et l' α -tocophérol (vitamine E) (Ashendel, 1985; Prof. A.Azzi, Université de Berne, communication personnelle). Mais comme ces deux composés (aux concentrations de 10 et 100 μ M) n'ont aucun effet sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes (résultats non présentés), ces expériences pourraient remettre en question le caractère distinctif de la protéine-kinase impliqué dans ce mécanisme (voir "Discussion").

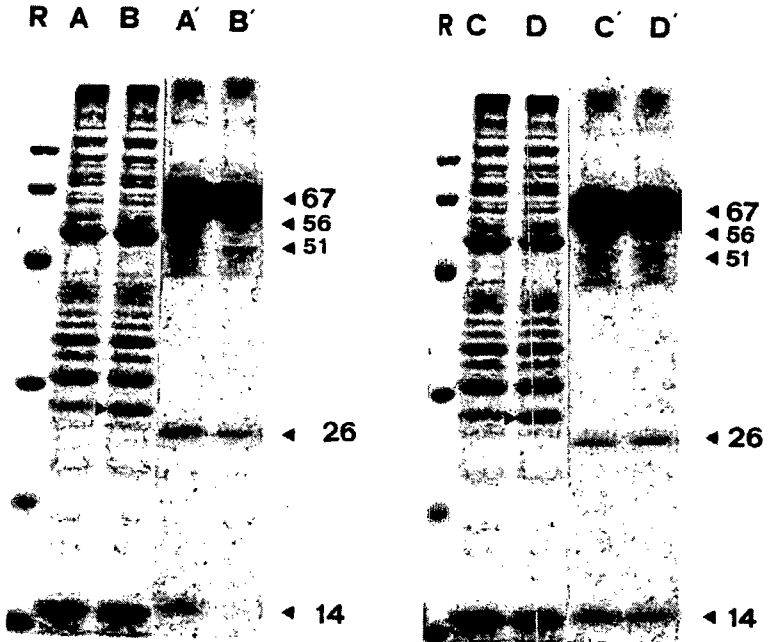


Fig.3.12. Effet d'un traitement à la phospholipase C sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes
Première série d'expériences: les enveloppes sont préincubées pendant 20 min dans un milieu d'incubation standard en absence (colonne A) ou en présence (colonne B) de phospholipase C (0,65 U), puis incubées avec du (γ^{32} P)ATP pendant 5 min.

Deuxième série d'expériences: les enveloppes sont d'abord préincubées pendant 5 min avec du (γ^{32} P)ATP dans des conditions standard, puis incubées pendant 20 min en absence (colonne C) ou en présence (colonne D) de phospholipase C.

La réaction est stoppée par l'addition de tampon pour échantillon SDS-PAGE et les protéines sont colorées au bleu de Coomassie après séparation par SDS-PAGE 13% (colonnes A,B,C,D). La présence de phospholipase C dans les échantillons est confirmées par la flèche \blacktriangleright (colonnes B et C). Les gels séchés sont finalement autoradiographiés (colonnes A'B'C'D'). Les flèches indiquent la position dans le gel des polypeptides de 67,56,51,26 et 14 kDa. Simultanément, des protéines de référence ont également été séparées dans le même gel (colonne R).

Afin de déterminer si les activités protéine-kinasiques exhibées par l'enveloppe sont dépendantes de la présence des phospholipides membranaires, nous avons traité les enveloppes, avant ou après la phosphorylation, avec la phospholipase C de *Bacillus cereus*. Notons que les protéine-kinases C animales (par exemple) sont bien connues pour être activées par des lipides spécifiques, tels que le diacylglycérol, la phosphatidylsérine ou encore des acides gras saturés à courtes chaînes aliphatiques ou polyinsaturés (Bell et Burns, 1991; Seifert et al., 1988; Morimoto et al., 1988). De telles expériences ont, en fait, déjà été tentées sur l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard par Muto et Shimogawara (1985). Ces auteurs affirment que la phosphorylation de la petite sous-unité de la RubisCO, qui est liée à l'enveloppe, est dépendante de la présence de phospholipides endogènes. Nous avons répété le même type d'expériences en veillant à effectuer des contrôles indispensables, afin de déterminer l'effet de l'hydrolyse des lipides sur le marquage des protéines d'enveloppes, spécialement sur celles de 67, 26 et 14 kDa (les conditions expérimentales utilisées sont décrites dans les légendes de la figure 3.12). Le traitement à la phospholipase C (avant ou après l'incubation avec l'ATP radioactif, Figs 3.12B et 3.12D) n'a aucune action protéolytique visible sur le profil des bandes colorées au bleu de Coomassie (comparaison avec les colonnes A et C. Mentionnons toutefois que certaines fractions enrichies en phospholipases D, disponibles sur le marché (Phospholipase D, *streptomyces chromofuscus*, Calbiochem 525200), exhibent des activités protéasiques non-négligeables sur les protéines de l'enveloppe. Le traitement à la phospholipase C, avant l'incubation en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, affecte visiblement plus l'incorporation du ^{32}P dans les phosphoprotéines d'enveloppes (Fig.3.12B') que le traitement avec l'enzyme qui suit tout de suite le marquage (Fig.3.12D'). Par rapport à l'échantillon non-traité (Fig.3.12A'), l'inhibition dans les cinq phosphopolypeptides majeurs de l'échantillon traité (Fig.3.12B') correspond à: 61% pour celui de 67 kDa, 50% pour celui de 14 kDa, 43% pour celui de 56 kDa, 29% pour celui de 26 kDa et enfin 7% seulement pour celui de 51 kDa). Comparativement, le traitement à la phospholipase C après l'incorporation (comparaison des colonnes C' et D') n'a pas d'effet inhibiteur aussi marqué sur l'incorporation du ^{32}P , soit: 20% d'inhibition pour le polypeptide de 67 kDa, 5% pour celui de 14 kDa, 14% pour celui de 56 kDa, mais respectivement 11% et 1% d'activation pour ceux de 26 et de 51 kDa.

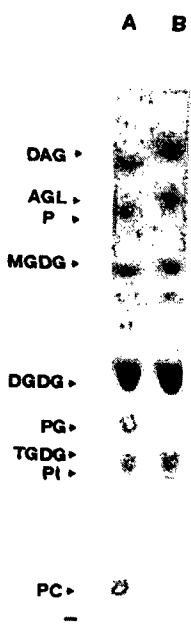


Fig.3.13. Effet du traitement à la phospholipase C sur les lipides d'enveloppes

Les enveloppes sont incubées pendant 20 min avec de la phospholipase C, puis les lipides sont extraits et séparés comme indiqués dans "Matériels et méthodes". A: enveloppes contrôles; B: enveloppes traitées à la phospholipase C. PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; TGDG, trigalactosyldiacylglycérol; PG, phosphatidylglycérol; DGDG, digalactosyldiacylglycérol; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol; P, pigments; AGL, acide gras libres; DAG, diacylglycérol.

Comme le traitement à la phospholipase C n'induit pas une inhibition complète de la phosphorylation dans les protéines d'enveloppes, on peut s'attendre à ce que l'hydrolyse des phospholipides par l'enzyme (0.65 U) ne soit pas complète non plus. Nous avons donc analysé, dans les mêmes conditions de préincubation (20 min) prévalant avant l'addition de l'ATP radioactif (idem "Fig.3.12"), l'effet de la phospholipase C sur la teneur en phospholipides. La figure 3.13 montre que la préincubation d'enveloppes avec l'enzyme induit une hydrolyse totale du pool de phosphatidylglycérol et de phosphatidylcholine, avec une augmentation concomitante de diacylglycérol. Par contre la teneur de tous les autres lipides reste remarquablement constante, notamment celle des acides gras libres et du phosphatidylinositol. Cette dernière observation est en parfait accord avec la spécificité des substrats lipidiques connus pour la phospholipase C de *bacillus cereus* (Shier, 1982). Ce résultat a été confirmé par un test safranine *in vitro* (Rawlyer et Siegenthaler, 1990), qui révèle que la phospholipase C de *bacillus cereus* n'est, en effet, pas capable d'hydrolyser le phosphatidylinositol de Soja (Sigma), qui est, par contre, efficacement hydrolysable par un traitement à la phospholipase D (résultats non présentés).

Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, certains auteurs ont montré que des acides gras libres pouvaient jouer le rôle de messagers secondaires dans l'activation des protéine-kinases C animales (Mc Phail et al., 1984). Nous avons par conséquent tenté de savoir si un traitement à la phospholipase A₂ de *vipera russelli* (0.1 U) pouvait induire un effet stimulateur sur les protéine-kinases de l'enveloppe. Les expériences révèlent qu'une préincubation d'environ vingt minutes avec l'enzyme avant l'incorporation du ³²P active indifféremment la phosphorylation dans la majorité des phosphoprotéines d'enveloppes: 24% dans celles de 67, 56 et 51 kDa, 22% dans celle de 26 kDa et enfin 16% dans celle de 14 kDa (résultats non montrés). Vu le manque de spécificité de la réponse (environ 20% d'activation pour toutes les protéines cibles considérées), on peut mettre en doute le rôle possible que joueraient les acides gras libres comme activateurs spécifiques des protéines kinases de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinarde. Pour démontrer cette hypothèse, cette expérience mériterait d'être répétée en utilisant, cette fois, la BSA pour extraire des dérivés "lyso" et les acides gras libres générés par l'hydrolyse des phospholipides avec la PLA₂ (*la BSA a le pouvoir d'adsorber les acides gras libres et les dérivés "lyso" qui restent dans la membrane*).

Dans le but d'établir les cinétiques de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines d'enveloppes, nous les avons soumises à des expériences de "pulse-chase". On relève qu'en présence de (γ^{32} P)ATP, le marquage dans les trois principales phosphoprotéines, tout comme dans les autres, est très rapide (Fig.3.14). On constate, par contre, que l'addition d'ATP non-radioactif chasse très rapidement le ³²P incorporé dans les polypeptides de Mr 67, 56, 35, 32 et 23 kDa (mais, aussi dans certains autres dont les poids moléculaires élevés n'ont pas été calculés), mais pas dans ceux de Mr 51, 47, 26 et 14 kDa. Certains polypeptides sont donc caractérisés par une capacité d'échange élevée de leur(s) phosphate(s) fixé de façon covalente (67, 56, 35, 32 et 23 kDa), alors que d'autres ne possèdent pas cette propriété (51, 47, 26 et 14 kDa).

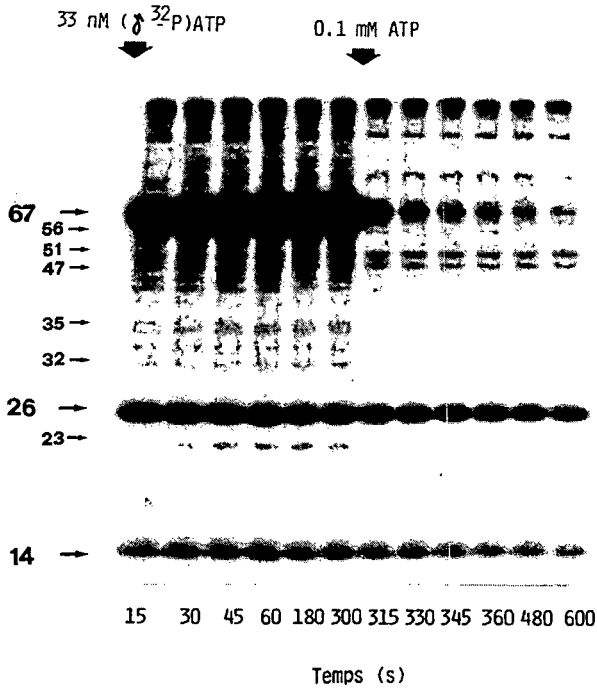


Fig.3.14. Expérience de "pulse-chase" sur les enveloppes du chloroplaste

La phosphorylation des enveloppes (180 μg de protéines) est effectuée dans des conditions standard. Des aliquotes de 15 μg de protéines sont collectés à différents temps pendant les 300 premières secondes, puis 0.1 mM d'ATP froid sont ajoutés au reste des membranes d'enveloppes, d'autres aliquotes sont enfin prélevés pendant les 300 dernières secondes de l'expérience. Les activités protéine-kinasiques sont stoppées par l'addition d'un volume égal de tampon pour échantillons SDS-PAGE. L'autoradiographie du gel est présentée sur cette figure. Le poids moléculaires des protéines phosphorylées les plus importantes sont indiqués sur la gauche: 67,56,51,47,35,32,26,23 et 14 kDa.

Dans la figure 3.15, nous avons reporté, en fonction du temps (s), la radioactivité (cpm) incorporée dans les trois phosphoprotéines majeures. L'incorporation est complète après soixante secondes pour la phosphoprotéine de 67 kDa, et trente secondes pour celles de 26 et 14 kDa. Après les quinze premières secondes qui suivent l'addition d'ATP non-radioactif, seulement 3% du marquage initial reste encore dans le polypeptide de 67 kDa. Par contre, le ^{32}P lié aux polypeptides de 26 et 14 kDa est chassé lentement, puisqu'après quinze et trente secondes, respectivement 95 et 70% du marquage initial persiste encore dans ces deux protéines. De plus, on remarque que

les cinétiques de phosphorylation et de déphosphorylation des deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa sont semblables, et que la protéine de 26 kDa atteint des maxima ou minima d'incorporation (à 45 s et 330 s) inverses de ceux propres à la protéine de 14 kDa. Ces deux observations, qui ont été faites dans toutes les expériences de "pulse-chase" que nous avons effectuées, suggèrent fortement que ces deux phosphoprotéines sont en compétition respective vis-à-vis de l'ATP radioactif présent dans le milieu réactionnel.

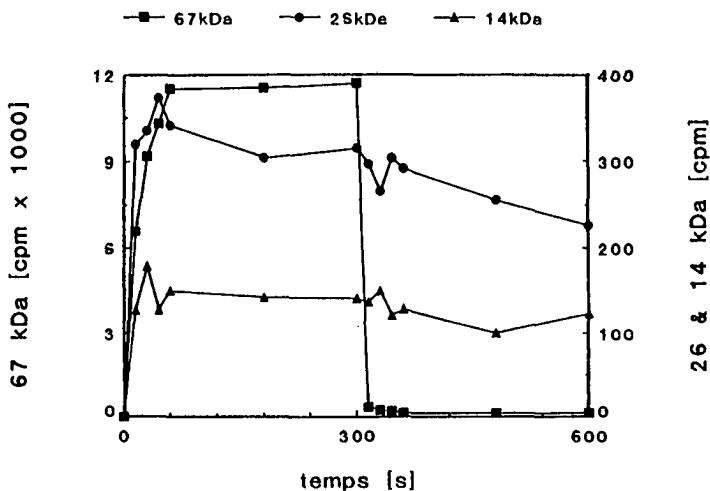


Fig.3.15. Effet du "pulse-chase" de l'ATP sur les polypeptides phosphorylés de 67, 26 et 14 kDa. Les phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa ont été excisées dans le gel autoradiographié, exposé à la figure 3.14. La radioactivité incorporée a été estimée par comptage Cerenkov.

Tableau 3.3. Influence de quantités croissantes de MgATP non-radioactif sur le marquage des phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa de l'enveloppe

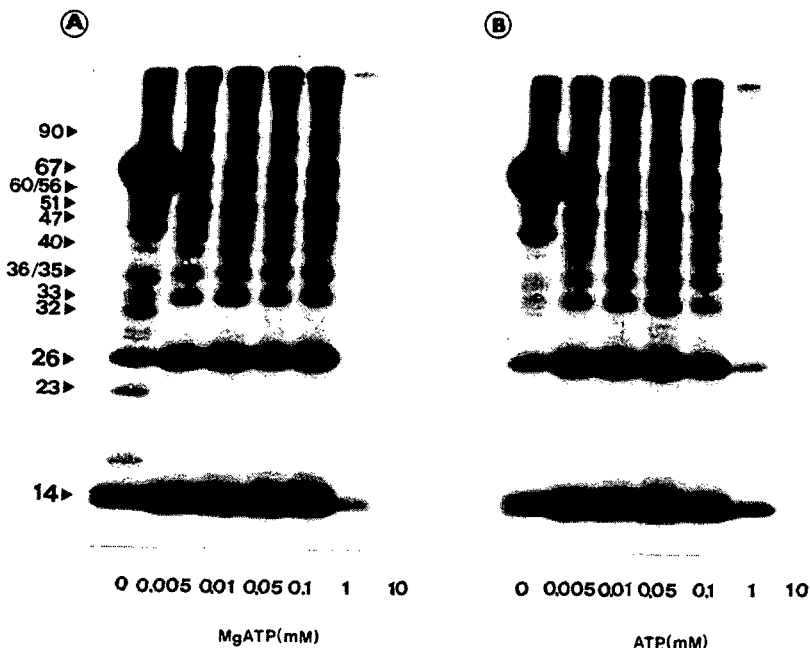
Addition de MgATP(*) (mM)	A				B	
	Incorporation relative de ³² P (cpm)				Phosphate incorporé (fmoles)	
	67 kDa		26 kDa		14 kDa	
	A	B	A	B	A	B
0	40067	6.0	530	0.08	417	0.06
0.005	420	0.9	938	2.1	865	1.9
0.01	393	1.8	1262	5.6	1154	5.2
0.1	396	18	1139	51	984	44
1	57	26	117	53	185	83

(*) Conditions expérimentales comme dans "Matériels et méthodes".

Dans des conditions standard, nous avons testé également l'effet de différentes concentrations en MgATP non-radioactif sur les activités protéine-kinasiques de l'enveloppe (Tableau 3.3). La réaction enzymatique a été initiée, dans ce cas, par l'addition des membranes d'enveloppes au lieu de l'ATP radioactif. Les résultats consignés dans le tableau 3.3 révèlent que l'incorporation relative du ³²P dans la protéine de 67 kDa diminue significativement en fonction des quantités croissantes de MgATP non-radioactif ajoutées. Ce résultat est en accord avec celui présenté sur la figure 3.14. Par contre, le marquage dans les protéines de 26 et 14 kDa augmente jusqu'à 0.01 mM MgATP, puis diminue pour atteindre un niveau proche de celui qui est caractéristique à la phosphoprotéine de 67 kDa. Des concentrations croissantes en MgATP exogène induisent une diminution puis une augmentation du phosphate total incorporé dans la phosphoprotéine de 67 kDa, et une phosphorylation parallèle croissante dans les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa. En présence de MgATP, les taux de phosphate total incorporé sont toujours environ deux à trois fois plus élevés dans les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa que dans celle de 67 kDa. Il est intéressant de noter que les résultats sont pareils quand le MgATP est remplacé par de l'ATP.

La présence de concentrations croissantes en MgATP (Fig.3.16A) ou ATP non-radioactif (Fig.3.16B) dans des enveloppes incubées avec du (³²P)ATP stimule l'incorporation relative dans plusieurs polypeptides de Mr 90, 60, 51, 47, 40, 36, 33, 26

et 14 kDa, mais par contre l'inhibe dans ceux de Mr 67, 56, 35, 32 et 23 kDa (Fig.3.16). La suppression du marquage dans ces cinq derniers polypeptides est en accord avec les résultats obtenus dans l'expérience précédente (Fig.3.15). On notera encore que certaines bandes radioactives (90, 60, 36 et 33 kDa par exemple) ne sont pas décelées dans des conditions de phosphorylation standard (Fig.3.1).



Figs 3.16 A-B. Influence du MgATP ou de l'ATP non-radioactif sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes

Les enveloppes sont phosphorylées dans les conditions indiquées dans "Matériels et méthodes", en présence de 0; 0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 1 et 10 mM de MgATP(A) ou d'ATP(B) non-radioactif. Dans ce cas, la réaction enzymatique est initiée par l'addition de membranes d'enveloppes et non par le ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP. Après électrophorèse (SDS-PAGE), les protéines sont autoradiographiées et leurs poids moléculaires respectifs déterminés comme suit: 90,67,60,56,51,47,40,36,35,33,32,26,23 et 14 kDa.

Nous avons répété l'expérience précédente, mais cette fois en présence de 0.05 mM EDTA. Nous constatons que, pour stimuler la phosphorylation des protéines de 90, 60, 51, 47, 40, 36, 34, 26 et 14 kDa, la concentration en ATP froid doit être aussi grande que la quantité en magnésium qui lui est liée. Le rapport magnésium/ATP doit apparemment rester toujours constant pour activer le ou les protéine-kinases impliquées dans ce processus de phosphorylation (résultats non présentés).

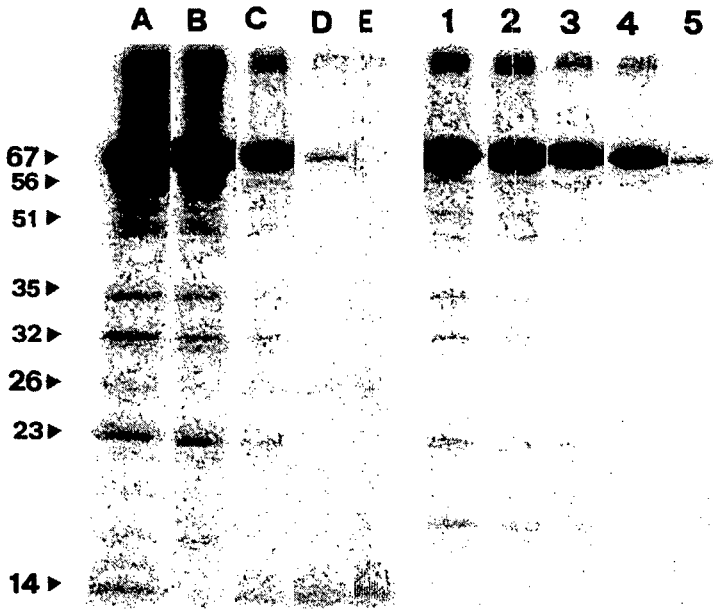


Fig.3.17. Comparaison du profil des polypeptides phosphorylés dans l'enveloppe et le stroma, en présence d'ATP non-radioactif et dans un volume réactionnel élevé

Des aliquotes de 60 µg de membranes d'enveloppes (A,B,C,D,E) ou de stroma (1,2;3;4;5) sont phosphorylés dans des conditions standard, mais dans un volume réactionnel de 500 µl, en présence d'une concentration croissante d'ATP non-radioactif, soit: 0 nM (A,1); 10 nM (B,2); 0.1 µM (C,3); 1 µM (D,4) et 10 µM (E,5). La réaction enzymatique est initiée par l'addition des enveloppes, alors que l'incorporation est stoppée par la précipitation des protéines au TCA (voir "Matériels et méthodes"). Les protéines sont finalement séparées par SDS-PAGE et autoradiographiées. Le poids moléculaire des phosphoprotéines importantes (67; 56; 51; 35; 32; 26; 23; 14) est indiqué par des flèches.

Une dernière expérience, proche de la précédente (voir "Fig.3.16"), a été effectuée dans un volume réactionnel final de 0.5 ml, et non pas 25 µl comme précédemment, toutes les concentrations des réactifs et des membranes d'enveloppes restant en proportions égales. Cette variation suffit à elle seule pour induire une modification du profil autoradiographique des phosphoprotéines d'enveloppes. Lorsqu'on compare la colonne A de la figure 3.17 avec la colonne E(B) de la figure 3.1, on remarque que les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa deviennent des phosphoprotéines mineures dans un volume d'incubation élevé, alors que la phosphoprotéine de 67 kDa reste indifféremment la plus marquée. Par contre, d'autres protéines (56, 35, 32 et 23 kDa) incorporent remarquablement mieux le ³²P dans des enveloppes et du stroma plus

dilués (Fig.3.17, colonnes A et 1; Fig.3.1 E et S(B)). La protéine de 67 kDa semble échanger plus facilement son phosphate radioactif dans les enveloppes (A,B,C,D,E) que dans le stroma (1,2,3,4,5), (ceci pour des concentrations identiques en ATP froid: 0 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M). Comme dans les conditions standard, son marquage basal (Fig.3.17, colonnes A et 1) reste toujours plus fort dans les enveloppes (2114 cpm) que dans le stroma (518 cpm)(observation qui est également valable pour les phosphoprotéines de 35, 32 et 23 kDa; voir "Fig.3.1"). Le marquage dans les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa (colonnes A, B, C, D, E) augmente lorsqu'on ajoute des concentrations élevées en ATP froid (voir "Tableau 3.3"); mais celui-ci est curieusement quasi aboli si on ajoute une concentration en ATP froid presque identique à celle du (γ^{32} P)ATP (Fig.3.17, colonne B). Cependant, il augmente à nouveau lorsqu'on ajoute respectivement 3, 30 ou enfin 300 fois plus d'ATP froid que d'ATP marqué (Fig.3.17, colonnes C, D, E).

3.4. Discussion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs activités protéine-kinasiques différentes et caractéristiques des membranes d'enveloppes isolées à partir de feuilles d'Épinard.

Les trois protéines majeures de l'enveloppe qui incorporent du phosphore radioactif ont des poids moléculaires de 67, 26 et 14 kDa, alors que les autres un peu moins marquées possèdent des Mr de: 56, 51, 47, 35, 33, 32, 23 et 18 kDa. Les résultats obtenus par l'effet du pH (Fig.3.8), de la concentration en magnésium exogène (Fig.3.8) et en (γ^{32} P)ATP (Fig.3.3), l'effet de l'ATP non-radioactif (Tableau 3.3) et de l'inhibiteur H7 (Fig.3.11) sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes, aussi bien que ceux impliquant la dépendance au Ca^{2+} et Mg^{2+} (Tableaux 3.1 et 3.2) et le "pulse-chase" du phosphate incorporé (Fig.3.15), montrent clairement que les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa ont un comportement identique vis-à-vis de tous ces différents paramètres biochimiques. Deux autres phosphoprotéines mineures de l'enveloppe suivent également un processus de phosphorylation proche de celles de 26 et 14 kDa: il s'agit de la protéine de 51 kDa (voir Figs 3.2, 3.4, 3.6, 3.7, 3.9, 3.12, 3.14, et 3.16) et dans une moindre mesure celle de 47 kDa (Fig.3.14). L'autre phosphoprotéine, facilement mesurable par comptage Cerenkov, est celle de Mr 67 kDa. La comparaison des profils d'incorporation, en fonction des paramètres mentionnés ci-dessus, indique clairement que le marquage de cette protéine n'est pas soumis aux mêmes "règles" que celui des deux autres protéines de 26 et 14 kDa (Figs 3.1, 3.3, 3.8,

3.9, 3.11, 3.15, 3.16, 3.17 et Tableaux 3.1, 3.2 et 3.3). D'autres phosphoprotéines mineures de l'enveloppe présentent des profils d'incorporation identiques à ceux de la 67 kDa, soit celles dont le Mr est égal à: 35, 32 et 23 kDa (voir Figs 3.2, 3.4, 3.6, 3.7, 3.9, 3.10, 3.14, 3.16, 3.17). Ces observations révèlent par conséquent qu'au moins deux activités protéine-kinasiques distinctes (a et b) sont localisées dans les enveloppes du chloroplaste d'Épinard; elles impliquent les substrats suivants:

- a. les protéines de 26 et 14 kDa (51 et 47 kDa?)
- b. les protéines de 67, 35, 32 et 23 kDa (56 kDa?)

La phosphorylation d'extraits enrichis en membranes internes ou externes d'enveloppes montre que les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa, qui manifestent des propriétés hydrophobes marquantes (Fig.3.5), sont présentes dans des préparations de membranes internes (Fig.3.1). Toutefois, ces deux phosphoprotéines pourraient tout aussi bien provenir des sites de contacts entre les membranes interne et externe de l'enveloppe, car Cremers et al. (1988) et Schnell et al. (1990) ont démontré récemment que les vésicules contenant les sites de contacts migrent avec les particules de haute densité des membranes internes d'enveloppes. Concernant la phosphoprotéine de 51 kDa, son appartenance à l'une ou l'autre des deux membranes d'enveloppes reste difficile à établir (Chapitre 6), car une bande phosphorylée de 51 kDa est visible à la fois dans les membranes internes et externes d'enveloppes (Fig.3.1). Quant à celle de 47 kDa, elle est phosphorylée uniquement dans les membranes internes (Fig.3.1). Ces deux phosphoprotéines possèdent, comme celles de 26 et 14 kDa, de fortes propriétés hydrophobes (Fig.3.5). Par contre la phosphoprotéine de 67 kDa, comme celles de 35, 32 et 23 kDa, exhibe un comportement hydrophile marqué après un traitement au Triton X-114.

La phosphoprotéine de 67 kDa, mise en évidence dans ces expériences, est l'homologue de celle de 64 kDa du Pois décrite par Soll et Bennett (1988). En effet, la sensibilité au pH et la dépendance vis-à-vis du magnésium sont identiques pour les deux protéines phosphorylées (Fig.3.8 et Tableau 3.1; Soll et al. (1989)) comme le marquage au ³²P et l'échange du phosphate incorporé (Fig.3.15; Soll et al. (1989)). De plus, les deux phosphoprotéines restent chacune dans la phase aqueuse après un traitement au Triton X-114 (Fig.3.5; Soll et Bennett, 1988). Cependant, une différence nette est observée lorsqu'on compare nos résultats avec ceux obtenus par Soll et Bennett (1988): en effet, la phosphoprotéine de 64 kDa du Pois ne reste pas attachée aux fractions enrichies en membranes internes et externes d'enveloppes, alors que celle de 67 kDa y reste

partiellement liée (Fig.3.1). Ce phénomène est probablement associé au fait que nous avons effectué moins de lavages sur ces membranes (voir "Chapitre 4").

Bien que plusieurs études mentionnent déjà que les deux protéines de 26 et 14 kDa sont phosphorylées par du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP dans des extraits d'enveloppes de chloroplastes d'Epinard (Soll et Buchanan, 1983; Laing et Christeller, 1984; Muto et Shimogawara, 1985; Hinz et Flügge, 1988), la nature précise de ces deux phosphoprotéines n'a toutefois pas encore été déterminée (voir "Chapitre 5").

Se basant sur des analyses immunologiques, à l'aide d'anticorps anti-RubisCO, sur des extraits d'enveloppes séparés par SDS-PAGE et transférés sur papier filtre (traité au bromure de cyanogène), Soll et Buchanan (1983) ont avancé que la phosphoprotéine de 14 kDa est une forme phosphorylée de la petite sous-unité de la carboxylase localisée dans la membrane externe de l'enveloppe. Nous pensons que cette affirmation est trop hâtive, car en fait, on trouve, dans les enveloppes externes, une phosphoprotéine de 15 kDa qui ne superpose pas la coloration au bleu de Coomassie du polypeptide de 14 kDa (Fig.3.1), lequel correspond effectivement à la petite sous-unité de la RubisCO (Pineau et al., 1979, Siegenthaler et Dumont, 1990). Cette observation n'est pas valable pour les membranes internes de l'enveloppe, puisque dans ce cas précis, le marquage autoradiographique épouse parfaitement la coloration au bleu de Coomassie sous-jacente (Fig.3.1). Le pool phosphorylé de petites sous-unités de la RubisCO (s'il existe!) serait par conséquent localisé dans les membranes internes, ou encore aux sites de contact des deux membranes, plutôt que dans les membranes externes. Nous n'excluons cependant pas que la phosphoprotéine de 15 kDa puisse être quand même une forme phosphorylée de la petite sous-unité de la carboxylase, car ces deux phosphoprotéines de 14 et 15 kDa ne semblent pas être dégradées dans un gel-SDS par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* (résultats non présentés). L'identification de la phosphoprotéine de 14 kDa sera présentée dans le chapitre 5.

Concernant la phosphoprotéine de 26 kDa, son identité n'a jusqu'à présent jamais été dévoilée. Soll prétend que cette protéine pourrait être un contaminant fortuit de LHCP thylacoïdal dans les membranes d'enveloppes (communication personnelle). Cependant, les résultats présentés dans ce chapitre infirment cette hypothèse, puisqu'ils montrent clairement que les phosphorylations respectives des protéines de 26 et 14 kDa sont sous le contrôle d'une activité protéine-kinasique identique. A l'appui de cette affirmation, aucune phosphoprotéine thylacoïdale ne contamine les préparations d'enveloppes et la phosphoprotéine de 14 kDa de l'enveloppe n'est jamais détectée dans

un extrait de thylacoïdes (Bennett, 1984). L'identité de la phosphoprotéine de 26 kDa sera discutée dans le chapitre 5.

Au sujet de la protéine-kinase(s) qui est impliquée dans la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa, plusieurs éléments décrits dans ce chapitre permettent de la caractériser.

Premièrement, la protéine-kinase(s) impliquée dans la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa est strictement dépendante du Ca^{2+} (Tableau 3.2).

Deuxièmement, la protéine-kinase(s) qui phosphoryle ces deux protéines hydrophobes est probablement localisée dans la membrane interne de l'enveloppe (Figs 3.1 et 3.5). Cependant, il est possible qu'elle soit de nature plus hydrophile et, par conséquent, compartimentée dans les phases aqueuses qui jouxtent les faces internes ou externes des membranes internes (à savoir, le stroma ou l'espace intermembranaire). Dans ce cas-là, certains composants des membranes internes, tels que les phospholipides (Figs 3.12 et 3.13) et les ions calcium qui lui sont liés (entre 0 et 4 mM, voir Tableau 3.2) fonctionneraient comme activateur potentiel de la kinase (Edelman et al., 1987; Ashendel, 1985).

Troisièmement, la phosphorylation et la déphosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa, qui sont respectivement très rapide et très lente (Fig.3.15), suggèrent fortement que le processus enzymatique qui catalyse cette réaction est géré non seulement par une protéine-kinase, mais aussi par une protéine-phosphatase spécifique (Chock et al., 1980, Shenolikar et Nairn, 1991).

Quatrièmement, la protéine-kinase(s), qui phosphoryle les protéines de 26 et 14 kDa, est très active à pH acide (5.5-6.0) et beaucoup moins à pH neutre (7.0-8.0). Une telle observation n'est, par exemple, pas du tout applicable à la phosphoprotéine de 67 kDa, puisqu'elle n'est bien phosphorylée qu'à pH neutre (Fig.3.8). La phosphoprotéine de 33 kDa marquée uniquement aux mêmes pH acides (Fig.3.7), pourrait bien être une des protéine-kinase de l'enveloppe. Elle ne s'autophosphorylerait qu'à de tels pH, car les conditions acides outrepasseraient ses besoins en calcium et en lipides pour lui permettre de s'autophosphoryler activement (de tels processus ont notamment été mis en évidence chez les protéine-kinases de type C, McFadden et al., 1989). A pH 7.6, le marquage dans les protéines de 26 et 14 kDa est grandement stimulé par l'addition de concentrations élevées en ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP (Fig.3.3) ou en ATP non-radioactif (Tableau 3.3).

Comme le pH physiologique du stroma ne varie qu'entre 7 et 8 environ, en fonction du degré d'illumination des chloroplastes (Heldt et al., 1973), l'activation de la protéine-kinase(s) ne doit être par conséquent optimale qu'à ces pH-là et, de ce fait, qu'en présence de concentrations élevées en ATP (on sait qu'il est nécessaire de dépasser une concentration de 0.1 μM ATP pour activer la protéine-kinase(s), elle-même (Fig.3.3)). La phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa dépend ainsi étroitement du degré de couplage et d'énergétisation du chloroplaste, car la source en ATP indispensable à leurs marquages ne provient apparemment que des thylacoïdes (voir "Chapitre 6"). Malheureusement, nous ne savons pas si à pH acide l'addition de quantités importantes en ATP stimule autant cette activité protéine-kinasique, ce qui démentirait notre hypothèse. Mais, on peut très bien imaginer que l'enzyme qui utilise $\text{Mg}(\text{ATP})^2$ (Tableau 3.3), et probablement pas $\text{Mg}(\text{HATP})^+$ comme substrat, ne fonctionnerait pas à pH acide, car, à de tels pH et en solution aqueuse, $\text{Mg}(\text{ATP})^2$ se transforme en $\text{Mg}(\text{HATP})^+$ (Sigel, 1987).

Cinquièmement, Buchanan (1980) relate que le transport de protons à travers les membranes thylacoïdales, qui découle de l'illumination des chloroplastes, induit une augmentation de la teneur en Mg^{2+} dans le stroma. La différence de concentration en magnésium stromatique dans des chloroplastes placés à l'obscurité puis à la lumière atteindrait jusqu'à 1 mM (Krause, 1977) voir même 15 mM (Barber, 1976). Comme le mécanisme de phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa est étroitement dépendant de la teneur intrachloroplastique en magnésium et en ATP (Chapitre 6), et que ces derniers composés ne sont abondants dans le stroma que si les chloroplastes sont illuminés (Barber, 1976), on peut ainsi stipuler que la protéine-kinase(s) responsable de la phosphorylation de ces deux protéines est indirectement dépendante de la lumière.

Sixièmement, en plus de la dépendance étroite envers le Mg^{2+} , le Ca^{2+} et les phospholipides, la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa est fortement inhibée par H7 (Kawamoto et Hidaka, 1984). Ce résultat suggère qu'une protéine-kinase de type C ou une enzyme similaire est impliquée dans ce mécanisme de phosphorylation (Kikkawa et al., 1982; Nishizuka, 1986). Cependant le TPA (phorbol ester) et l' α -tocophérol (vitamine E), qui sont respectivement des activateurs et inhibiteurs spécifiques des protéine-kinases C animales aux concentrations que nous avons utilisées (10 et 100 μM), n'ont aucun effet sur l'incorporation du phosphate dans les protéines d'enveloppes. Comme ces deux molécules sont connues pour être actives sur le domaine régulateur des protéine-kinases C (Ashendel, 1985; Prof. A. Azzi, Université de Berne, communication personnelle), alors que l'inhibiteur H7 se lie directement sur le site actif

de celle-ci (Hidaka et al., 1984), il est fort probable que la protéine-kinase(s) qui phosphoryle les protéines de 26 et 14 kDa dans les membranes internes de l'enveloppe, soit proche des protéine-kinases de type C, davantage par son site actif que par sa partie régulatrice (voir "Chapitre 7"). Les récents travaux publiés par Park et Chae (1990), témoignent que cet inhibiteur des protéine-kinases C animales (Kawamoto et Hidaka, 1984) a également un effet sur les protéine-kinases des cellules de protoplastes d'Avoine.

En fait, ces six considérations rappellent que la protéine-kinase(s) qui phosphoryle les protéines de 26 et 14 kDa est hautement contrôlée par des facteurs hydrosolubles, tels que le Mg^{2+} , le Ca^{2+} , l'ATP et les protons. On peut affirmer, en guise de conclusion intermédiaire, qu'un tel niveau de régulation sert, sans aucun doute, aux fonctions vitales du chloroplaste.

Un autre point intéressant concerne l'effet stimulateur de l'ATP non-radioactif sur l'incorporation du phosphate total dans les protéines de 26 et 14 kDa, aussi bien que dans celle de 67 kDa (Tableau 3.3). Le graphe illustrant le phosphate total incorporé par rapport au log de la concentration en MgATP montre une relation linéaire de 0.01 à 1 mM MgATP pour les trois phosphoprotéines, révélant ainsi un comportement identique des deux protéine-kinases par rapport à l'ATP exogène (résultats non montrés). Ce processus d'activation par l'ATP pourrait être lié à quatre mécanismes enzymatiques bien distincts:

1. Les ATPases présentes dans les membranes internes d'enveloppes (McCarty et al., 1984; Nguyen et al., 1987), fourniraient une énergie additionnelle permettant un changement conformationnel des protéine-kinases impliquées dans ces processus de phosphorylation.
2. Une autre protéine-kinase stimulerait directement celle impliquée dans la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa. Cette seconde protéine-kinase posséderait implicitement un K_m beaucoup plus élevé que la première, afin de n'être activée que par des concentrations élevées en ATP. De telles processus régulateurs sont couramment observés chez les mammifères, surtout dans les mécanismes impliquant l'activation de protéine-kinases C (Kikkawa et al., 1986).
3. Une lipide-kinase catalyserait la phosphorylation de constituants lipidiques de l'enveloppe. Les lipides phosphorylés, résultants de cette activité, stimuleraient

directement une protéine-kinase(s) spécifique. De telles lipides-kinases ont été décrites aussi bien chez les animaux (Shinomura et al., 1991), que chez les végétaux (Boss, 1989). Récemment, Ruffieux (1991) a mis en évidence, dans notre laboratoire, des activités de ce type dans les membranes d'enveloppes du chloroplaste, notamment une forte activité DAG-kinasique dans les membranes internes d'enveloppes du chloroplaste d'Epinard. La formation d'acide phosphatidique (PA) et de lyso-PA (L-PA), via probablement une phospholipase endogène de type A, résulte de cette activité. Ces deux lipides pourraient bien fonctionner comme modulateurs endogènes des protéine-kinases de la membrane interne de l'enveloppe, car des protéine-kinases, dont l'activité dépend du phosphatidate, ont été, par exemple, détectées dans des extraits solubles de foie, de cerveau, de poumon et de testicule de rat (Bocckino et al., 1991).

4. Enfin, la conformation du substrat protéique (26 et 14 kDa) serait lui-même modulé par la présence de concentrations élevées en ATP dans le milieu environnant. En d'autres termes, une forte concentration en ATP modifierait, par l'intermédiaire d'autres protéines (HSP70 ou chaperonine, par exemple; Ellis et Van der Vies, 1991), la structure interne des protéines phosphorylables et permettrait alors l'exposition optimale de son ou ses sites de phosphorylation. Ce mécanisme ATP-dépendant permettrait de maintenir les protéines de 26 et 14 kDa dans une conformation dépliée (structure secondaire ou tertiaire), plus favorable à l'incorporation du phosphate par la protéine-kinase (voir "Chapitre 8")

En guise de conclusion à ces quatre points, on peut dire que le processus, dépendant de l'ATP, qui conduit à la stimulation de l'incorporation du phosphate dans les protéines de 26 et 14 kDa est probablement couplé à un mécanisme enzymatique différent de celui impliquant la protéine-kinase(s) elle-même.

La phosphorylation de certaines protéines d'enveloppes (51, 26, 14 kDa) est aussi étroitement liée à la présence de phospholipides. Au vu des expériences réalisées avec la phospholipase C et A_2 , c'est probablement davantage la nature de la tête polaire du phospholipide que ses propres chaînes aliphatiques qui sont impliquées dans l'activation de la phosphorylation de ces protéines. Cette observation suggère les commentaires suivants:

a) D'autres lipides acylés (galactolipides, sulfolipides ou phosphatidylinositol) qui ne sont pas des substrats pour la phospholipase C sont peut-être aussi impliqués dans la phosphorylation des trois protéines majeures de l'enveloppe.

b) Bien que les protéines de 26 et 14 kDa soient certainement phosphorylées par une même kinase, leurs interactions respectives avec certains domaines phospholipidiques de la membrane sont suffisamment distincts pour subir des effets inhibiteurs différentiels. On ne peut cependant pas exclure que l'ablation des têtes polaires modifie suffisamment la topographie de surface des membranes, et inhibe ainsi les interactions de la protéine-kinase avec sa protéine cible.

Tous les résultats discutés ci-dessus font l'objet d'une publication récente qui résume l'essentiel du travail consigné dans ce chapitre (Siegenthaler et Bovet, 1993). En guise de conclusion générale, on peut dire qu'une seule activité protéine-kinasique est responsable de la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa dans l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard, et qu'elle est différente de celle impliquant la phosphoprotéine de 67 kDa.

3.5. Bibliographie

- Ashendel, C.L. (1985) The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 219-242.
- Barber, J., ed. (1976) The intact chloroplast. Elsevier/North-Holland Biomed. Press. Netherlands, pp 89-134.
- Bell, M.B., Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 4661-4664.
- Bennett, J. (1979) Chloroplast Phosphoproteins. *Eur. J. Biochem.* 99: 133-137.
- Bennett, J. (1984) Chloroplast protein phosphorylation and the regulation of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 60: 583-590.
- Bennett, J. (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 281-311.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fraction enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. *J. Biol. Chem.* 258: 13273-13280.
- Bocchino, S.B., Wilson, P.B., Exton, J.H. (1991) Phosphatidate-dependent protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6210-6213.
- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607.
- Boss, W.F. (1989) Phosphoinositides metabolism: Its relation to signal transduction in plants. *Dans Boss WF, Morré DJ ed, Second messengers in plant growth and development.* A.R. Lyss, New York, pp 145-168.
- Bovet, L., Siegenthaler, P.A. (1991) Biochemical and physiological studies of the 14 and 28 kDa phosphorylated polypeptides located in the envelope of spinach chloroplast. *Experientia* 47: A21.
- Buchanan, B.B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 341-374.
- Chock, P.B., Rhee, S.G., Stadtman, E.R. (1980) Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 813-843.
- Cortez, N., Lucero, H.A., Vallejos, R.H. (1987) Stromal serine protease protein kinase activity in spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 504-508.
- Cremers, F.F.M., Voorhout, W.F., Van der Krift, T.P., Leunissen-Bijvelt, J.J.M., Verkleij, A.J. (1988) Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 334-340.
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987) Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 567-813.
- Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N., Hatch, M.D. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C4 photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36: 255-286.
- Ellis, R.J., van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Foyer, C.H. (1985) Stromal protein phosphorylation in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 231: 97-103.

- Guitton, C., Dorne, A.-M., Mache, R., (1984). *In organello* and *In vitro* phosphorylation of chloroplast ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 297-303.
- Gupta, A.S., Barkowitz, G.A. (1989) Development and use of chlorotetracycline fluorescence as a measurement assay of chloroplast envelope-bound Mg^{2+} . *Plant Physiol.* 89: 753-781.
- Haldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G. (1973) alkalization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta* 314: 224-41.
- Hideka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem.* 23: 5036-5041.
- Hinz, G., Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- Horton, P., Lee, P. (1985) Phosphorylation of chloroplast membrane proteins partially protects against photoinhibition. *Planta* 165: 37-42.
- Joyard, J., Grossman, A., Barlett, S.G., Douce, R., Chua, N.H. (1982) Characterization of envelope membranes polypeptides from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 257: 1095.
- Kawamoto, S., Hidaka, H. (1984) 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 258-264.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., Nishizuka, Y. (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257: 13341-13348.
- Kikkawa, U., Kitano, T., Saito, N., Kishimoto, A., Taniyama, K., Tanaka, C., Nishizuka, Y. (1986) Role of protein kinase C in calcium mediated signal transduction. *Dans Wiley, ed, Calcium and the cell, Ciba Foundation Symposium* 122. Chichester, pp 197-211.
- Krause, G.H. (1977) Light induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with eriochrome blue sa. *Biochim. Biophys. Acta* 465: 50-51 .
- Laing, W.A., Christeller, J.T. (1984) Chloroplast phosphoproteins: distribution of phosphoproteins within spinach chloroplasts. *Plant Sci. Lett.* 36: 99-104.
- McCarty, D.R., Keagstra, K., Salman, B.R. (1984) Characterization and localization of the ATPase associated with pea chloroplast envelope membranes. *Plant physiol.* 76: 584-588.
- McFadden, P.N., Mandpe, A., Koshland, D.E. (1989) Calcium- and lipid-independent protein kinase C autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 264: 12785-12771.
- McPhail, L.C., Clayton, C.C., Snyderman, R. (1984) A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca^{2+} -dependent protein kinase. *Science* 224: 622-625.
- Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Bennett, J. (1988) Tandem mass spectrometry reveals that the three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH2 termini. *J. Biol. Chem.* 263: 1123-1130.
- Morimoto, Y.M., Nobori, K., Edashiga, K., Yamamoto, M., Kobayashi, S., Utsumi, K. (1988) Activation of protein kinase C by fatty acids and its dependency on Ca^{2+} and phospholipid. *Cell struct. Funct.* 13: 45-49.
- Mullet, J.E. (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segments which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 258: 9941-9948.

Murphy, D.J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membrane in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 864: 33-94.

Muto, S., Shimogawara, K. (1985) Calcium and phospholipid-dependent phosphorylation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by a chloroplast envelope-bound protein kinase in situ. *FEBS* 193: 88-92.

Nguyen, T.D., Miquel, M., Dubacq, J-P., Siegenthaler, P.A. (1987) Localization and some properties of a Mg²⁺-dependent ATPase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant sci.* 50: 57-63.

Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312.

Park, M-H., Chae, Q. (1990) Intracellular protein phosphorylation in oat (*avena sativa* L.) protoplasts by phytochrome action: involvement of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 1185-1190.

Pineau, B., Ledoigt, G., Maillefer, C. and Lefort-Tran, M. (1979) Présence de sous-unités de la RubpCase dans les enveloppes des chloroplastes d'épinard. *Plant Sci. Lett.* 25: 331-343.

Rawlyer, A., Siegenthaler, P.A. (1989) A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1004: 337-344.

Ruffieux, L. (1991) Contribution à l'étude de la phosphorylation des lipides des membranes de l'enveloppe de chloroplaste d'Épinard. Travail de certificat au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.

Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Haley, B.E., Hanson, K.R., McHale, N.A. (1990) Identification of the 64 kDa chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 93: 105-109.

Schinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K., Nishizuka, Y. (1991) Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5149-5153.

Schnell, D.J., Blobel, G., Pain, D. (1990) The chloroplast import receptor is an integral membrane protein of chloroplast envelope contact sites. *J. Cell Biol.* 111: 1825-1838.

Seifert, R., Schächtele, C., Rosenthal, W., Schultz, G. (1988) Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 20-26.

Shenolikar, S., Nairn, A.C. (1991) Protein phosphatases: recent progress *Dans Advances in second messenger and phosphoprotein research* 23, eds, Greengard, P., Robinson, G.A., Raven Press, New York, pp 1-121.

Shier, W.T. (1982) *Journal of Toxicology. Dans Toxins reviews vol.1*, eds. Shier, W.T. and Dekker, M., New York.

Shochat, S., Owens, G.C., Hubert, P., Ohad, I. (1982) The dichloromethylurea-binding site in thylakoids of *chlamydomonas reinhardtii*: role of photosystem II reaction center and phosphorylation of the 32-35 kilodalton polypeptide in the formation of the high affinity binding site. *Biochim. Biophys. Acta* 681: 21-31.

Sigel, H. (1987) Isometric equilibria in complexes of adenosine 5'-triphosphate with divalent metal ions. *Eur. J. Biochem.* 165: 65-72.

Siegenthaler, P.A., Bovet, L. (1993) A unique protein-kinase activity is responsible for the phosphorylation of the 28- and 14-kDa proteins but not of the 67 kDa protein in the chloroplast envelope membranes of spinach. *Planta* 190: 231-240.

Siegenthaler, P.A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, Thylakoid and stroma polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.

Siegenthaler, P.A., Nguyen, T.D. (1983) Proteins and polypeptide of envelope membrane from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 226-233.

Soll, J. (1985) Phosphoproteins and protein-kinase activity in isolated envelopes of pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 166: 394-400.

Soll, J., Bennett, J. (1988) Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and the inner envelopes of pea chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 301-307.

Soll, J., Berger, V., Bennett, J. (1989) Adenylate effects on protein phosphorylation in the interenvelope lumen of pea chloroplasts. *Planta* 177: 393-400.

Soll, J., Buchanan, B.B. (1983) Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by an envelope-bound protein kinase in situ. *J. Biol. Chem.* 258: 6686-6689.

Soll, J., Fisher, I., Keegstra, K. (1988) A guanosine 5'-triphosphate-dependent protein kinase is localized in the outer envelope membrane of pea chloroplasts. *Planta* 176: 488-496.

CHAPITRE 4

Etude sur la phosphoprotéine de 67 kDa du chloroplaste d'Epinarid

4.1. Introduction

Les protéines majeures de l'enveloppe, qui sont phosphorylées *in vitro* par du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, possèdent des Mr de 67, 26 et 14 kDa. La variation de paramètres tels que le pH, la concentration en calcium et en magnésium, ainsi qu'en ATP montre clairement que le comportement des phosphoprotéines de 26 et 14 kDa est profondément différent de celui de la 67 kDa. Les protéines de 26 et 14 kDa sont vraisemblablement phosphorylées par une même protéine-kinase (Siegenthaler et Bovet, 1993). Leur identité sera étudiée dans le chapitre 5.

Les phosphoprotéines de 67 kDa du stroma et de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinarid, mentionnées dans le chapitre 3, sont les mêmes que celles déjà décrites par Foyer (1985), Cortez et al. (1987), Laing et Christeller (1984) et Hinz et Flügge (1988); leurs mobilités électrophorétiques apparentes sur gel-SDS oscillent entre 61 kDa et 70 kDa.

La phosphoprotéine de 67 kDa de l'enveloppe est l'homologue de celle de 64 kDa du Pois étudiée par Soll et Bennett (1988) et Soll et al. (1989), car ces deux protéines fixent et recyclent le phosphate incorporé très rapidement et exhibent les mêmes dépendances vis-à-vis du pH et du magnésium ("Chapitre 3" et Soll et al., 1989). De plus, les partitions de phase au Triton X-114 montrent qu'elles possèdent toutes deux de fortes propriétés hydrophiles ("Chapitre 3" et Soll et Bennett, 1988).

La phosphorylation de la protéine de 64 kDa du Pois est plus intense dans les chloroplastes intacts que dans les brisés. Ces résultats associés à d'autres, relatant, par exemple, la "sonication" d'enveloppes mixtes avant la phosphorylation, ont permis à Soll et Bennett (1988) de situer cette protéine dans l'espace (6 nm) délimité par les membranes interne et externe de l'enveloppe (Carde et al., 1982). La présence de la protéine de 64 kDa dans le stroma serait due, selon les mêmes auteurs, aux techniques de lyses hypotoniques des chloroplastes utilisées pour séparer les enveloppes du stroma (Douce et Joyard, 1982). Les méthodes de préparation de membranes d'enveloppes (voir "Matériels et méthodes") conduiraient par conséquent inévitablement à contaminer le

stroma avec la protéine soluble de 64 kDa du lumen de l'enveloppe (Soll et Bennett, 1988). En ce qui concerne la protéine de 67 kDa de l'Épinard, aucun rapport publié à ce jour ne fait mention de telles observations. De plus, aucune information n'a été donnée dans les publications précédentes sur l'intensité de la phosphorylation de cette protéine en fonction de sa localisation dans le chloroplaste.

Dans la fraction soluble du chloroplaste de Pois, une phosphoprotéine de 64 kDa, équivalente à celle décrite dans l'enveloppe par Soll et Bennett (1988), présente toutes les caractéristiques d'une phosphoglucomutase (Salvucci et al., 1990). Elle est phosphorylée non seulement par du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, mais également par du (^{32}P) glucose-1-phosphate. Les propriétés biochimiques de la phosphoprotéine de 67 kDa, décrites dans le chapitre 3, ne sont pas en contradiction avec le concept que cette protéine pourrait bien être une phosphoglucomutase similaire à celle de 64 kDa décrite par Salvucci et al. (1990).

4.2. But du chapitre

Premièrement, nous allons tenter de montrer par traitement au Triton X-114, dégradation protéolytique et électrophorèse bidimensionnelle (IEF X SDS-PAGE) que la phosphoprotéine de 67 kDa présente dans le stroma est identique à celle de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard.

Deuxièmement, nous déterminerons, après une hydrolyse acide de la phosphoprotéine de 67 kDa, la nature des résidus aminés qui incorporent du phosphore lorsque la protéine est phosphorylée dans l'enveloppe.

Troisièmement, les phosphoprotéines chloroplastiques solubles (67 kDa) seront séparées sur gel non dénaturant, afin d'estimer leurs poids moléculaires natifs.

Quatrièmement, deux anticorps dirigés contre des phosphoglucomutases de l'érythrocyte humain seront utilisés pour révéler la phosphoglucomutase chloroplastique par immunoblot.

4.3. Résultats

Dans les membranes d'enveloppes (Fig.4.1, colonne A) et le stroma (Fig.4.1, colonne 1), incubés en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, séparés par SDS-PAGE, puis autoradiographiés, on observe l'apparition d'une protéine phosphorylée d'environ 67 kDa (Chapitre 3). Après un traitement au Triton X-114, la protéine phosphorylée de 67 kDa se sépare exclusivement dans la phase aqueuse (Fig.4.1, colonnes C et 3).

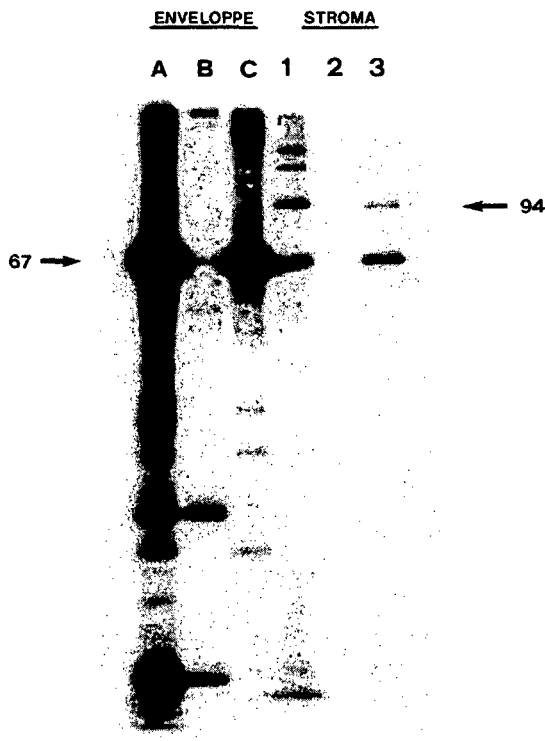


Fig.4.1. Partition de phase au Triton X-114 des protéines phosphorylées dans le stroma et les enveloppes
Des protéines d'enveloppes ou de stroma (60 μg) ont été préalablement phosphorylées en présence de 66.66 nM ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, puis séparées par partition de phase au Triton X-114, comme décrit dans "Matériels et méthodes". Après une séparation par SDS-PAGE, les phases détergentes des enveloppes (colonne B) et du stroma (colonne 2), ainsi que les phases aqueuses des enveloppes (colonne C) et du stroma (colonne 3), ont été autoradiographiées. Les colonnes A et 1 montrent les contrôles qui correspondent respectivement aux polypeptides phosphorylés dans les enveloppes et le stroma non-traités. La position dans le gel des phosphoprotéines de 67 et 94 kDa (stroma) est indiquée par des flèches.

Pour mieux préciser le degré d'homologie existant entre ces deux phosphopeptides de 67 kDa, nous les avons soumis, durant une seconde électrophorèse (SDS-PAGE), à un traitement à la protéase V_8 de *S. aureus*. Cette expérience, qui permet de déterminer si les produits issus de la dégradation protéolytique de deux protéines sont identiques, montrent en effet que les deux phosphopeptides engendrés sont tout à fait identiques. On peut ainsi affirmer que la phosphoprotéine de 67 kDa du stroma (Fig.4.2, colonne A) est équivalente à celle de l'enveloppe (Fig.4.2, colonne B).

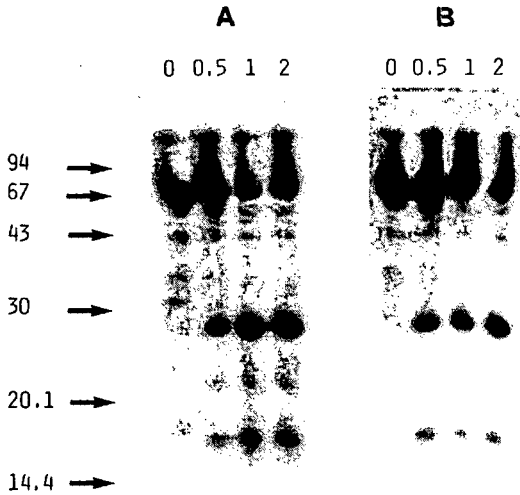


Fig.4.2. Comparaison des phosphopeptides issus de la digestion protéolytique de la phosphoprotéine de 67 kDa de l'enveloppe et du stroma.

Les portions de gel contenant les phosphopolypeptides de 67 kDa de l'enveloppe (A) et du stroma (B) ont été préalablement excisées dans un gel-SDS coloré au bleu de Coomassie (Fig.4.1, colonnes A et 1). Ces bandes ont été à nouveau séparées par SDS-PAGE, mais en présence cette fois de quantités croissantes (0.5; 1 et 2 μ g) de protéase V_8 de *S. aureus* (voir "Matériels et méthodes"). Après la migration des phosphopeptides, le gel, coloré au bleu de Coomassie (non montré), a été autoradiographié.

Ces deux premiers résultats (Figs 4.1 et 4.2) appuient pleinement ceux obtenus par Soll et Bennett (1988), qui ont décrit des caractéristiques équivalentes pour la protéine de 64 kDa présente dans le stroma et l'enveloppe du chloroplaste de Pois. Cependant, nous constatons que contrairement aux affirmations émises par Soll et

Bennett (1988) pour la protéine de 64 kDa, la protéine de 67 kDa reste emprisonnée, en partie tout au moins, dans les fractions de membranes internes et externes d'enveloppes, tout comme dans celle de membranes d'enveloppes totales (voir "Chapitre 3"). La présence de la phosphoprotéine de 67 kDa dans les membranes internes et externes d'enveloppes est corrélée au nombre de lavages qu'on effectue sur les fractions membranaires. En effet, si on les lave de façon extensive, on peut alors éliminer presque complètement la protéine de 67 kDa dans les fractions d'enveloppes (résultats non présentés) et confirmer ainsi les résultats publiés par Soll et Bennett (1988) pour la phosphoprotéine de 64 kDa. Dans notre cas, la phosphoprotéine de 67 kDa reste partiellement associée aux enveloppes, car les vésicules de membranes ne sont lavées qu'une seule fois après leur isolement (voir "Matériels et méthodes"). La "sonication" des vésicules d'enveloppes totales (résultats non montrés) libère également complètement la protéine de 67 kDa, entérinant ainsi le caractère fortement hydrophile de la protéine (Fig.4.1).

La phosphorylation de la protéine de 67 kDa dans le stroma des chloroplastes d'Epinard est un processus déjà fort bien décrit par la littérature (Cortez et al., 1987 et Foyer, 1985). En effet, Cortez et al. (1987) ont montré que cette protéine soluble lie de façon covalente le phosphate radioactif sur des résidus sérines. Afin de déterminer si la phosphorylation de la protéine de 67 kDa présente la même spécificité de substrat, nous avons séparé les résidus aminés phosphorylés de la protéine, après une hydrolyse acide. La figure 4.3 montre que seule la sérine incorpore du phosphore dans la protéine de 67 kDa de l'enveloppe.

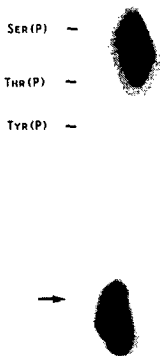


Fig.4.3. Identification de la sérine comme site de phosphorylation unique de la protéine de 67 kDa

Après révélation d'un gel SDS-PAGE dans une solution contenant 0.3 M $ZnCl_2$, la phosphoprotéine de l'enveloppe de 67 kDa a été excisée du gel, puis éluée par électrophorèse (Extraphor, LKB) dans une solution contenant 50 mM Tris pH 8.9, 50 mM glycine et 0.1% SDS, pendant 50 min et sous une tension de 100 V. La protéine, collectée dans une solution de rétention contenant en plus 3M NH_4HCO_3 , a été précipitée par l'addition d'une solution de TCA 20% (p/v). Après lavages, hydrolyse et séparation par électrophorèse sur plaque cellulosique en présence des marqueurs suivants: [Ser(P)] phosphosérine, [Thr(P)] phosphothréonine, [Tyr(P)] phosphotyrosine, les acides aminés ont été détectés par autoradiographie, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". L'endroit où a été déposé l'hydrolysate avant l'électrophorèse est indiqué par une flèche.

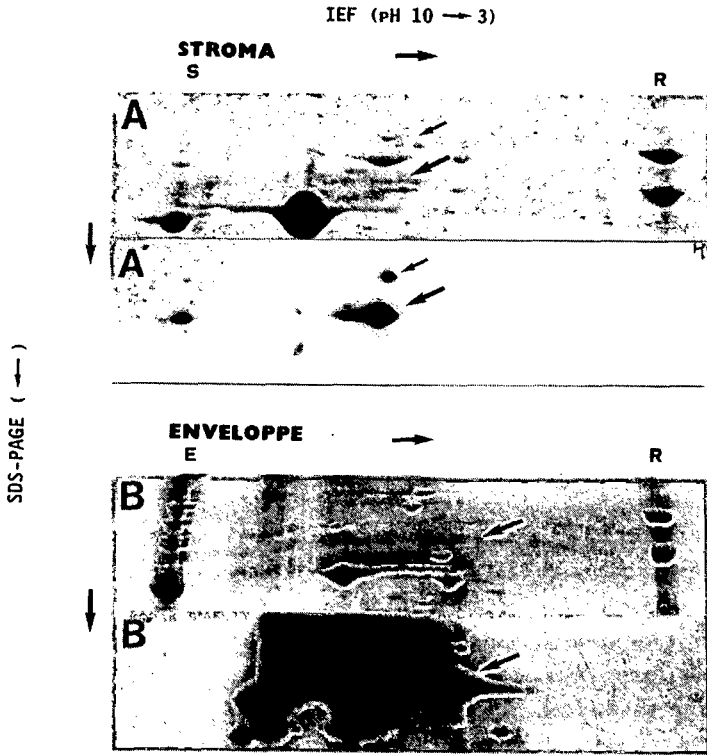


Fig.4.4. Détails de la région phosphorylée de 67 kDa dans un gel 2D (IEF X SDS-PAGE) de stroma et d'enveloppe

Après phosphorylation dans des conditions standard, les protéines du stroma (A/A') et celles d'enveloppes (B/B') ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle (IEF X SDS-PAGE) comme décrit dans "Matériels et méthodes". La région de la phosphoprotéine stromatique de 67 kDa a été colorée au bleu de Coomassie (A) et autoradiographiée (A'); (B) et (B') correspondent respectivement aux mêmes régions du gel mais pour la phosphoprotéine de 67 kDa de l'enveloppe. Des protéines de référence (colonne R) ont été séparées par SDS-PAGE uniquement, tout comme des membranes d'enveloppes non-marquées dans le gel B (colonne E) et du stroma marqué dans le gel A (colonne S). La petite et la grande flèches indiquent respectivement les positions dans le gel des polypeptides phosphorylés de 94 et de 67 kDa.

Après le marquage des protéines du stroma ou d'enveloppes, la phosphoprotéine de 67 kDa peut être mise en évidence par électrophorèse en deux dimensions (IEF x SDS-PAGE; Fig.4.4). Dans les deux cas, la tâche autoradiographique n'a cependant pas d'homologue visible sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Figs 4.4(A) et 4.4(B)). La courbe de pH du gel IEF nous a permis d'assigner un point isoélectrique approximatif d'environ 6.3 - 6.4 à la phosphoprotéine de 67 kDa du stroma;

cette protéine est donc chargée négativement à des pH physiologiques. L'autre phosphoprotéine soluble, qui migre en SDS-PAGE avec un poids moléculaire de 94 kDa (Fig.4.1, colonnes 1 et 3), exhibe un point isoélectrique similaire à celui de la protéine de 67 kDa (Fig.4.4(A')). Par contre, le même type d'expérience révèle qu'il n'est pas possible d'attribuer un point isoélectrique aussi bien défini à la phosphoprotéine de 67 kDa de l'enveloppe (Figs 4.4(B) et 4.4(B')); car la protéine marquée est distribuée autour d'un domaine très large d'isoformes qui, semble-t-il, possèdent toutes des points isoélectriques différents.

Pour déterminer le poids moléculaire natif des phosphoprotéines solubles du chloroplaste, nous les avons séparées par électrophorèse non-dénaturante sur gel continu de polyacrylamide 4-30% (Fig. 4.5). L'examen autoradiographique du gel (colonne B) révèle quatre bandes radioactives importantes de Mr apparent: 550, 200, 140 et enfin 67 kDa. La protéine marquée de plus haut poids moléculaire superpose parfaitement la bande colorée au bleu de Coomassie correspondant à l'holoenzyme de la RubisCO (550 kDa environ; Dumont, 1991). Comme cette protéine n'incorpore pas de façon covalente le phosphore lorsqu'on incube *in vitro* du stroma isolé avec de l'ATP radioactif (Foyer, 1985; "Chapitre 3"), on peut considérer que le ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP est lié principalement de façon électrostatique à l'holoenzyme de la RubisCO (bien que Guillon et Mache (1987) aient publié un résultat opposé, démontrant que la grande sous-unité de la RubisCO pouvait être phosphorylée).

Pour établir le poids moléculaire natif de la phosphoprotéine de 67 kDa, nous avons soumis la bande phosphorylée de 67 kDa à une seconde électrophorèse en présence de SDS. Le résultat montre qu'elle possède invariablement le même poids moléculaire dans les deux systèmes de gel (*, colonnes B et C). Par contre, les trois autres protéines natives marquées radioactivement, de Mr 550, 200 et 140 kDa (Fig.4.5B), ne sont constituées d'aucun polypeptide phosphorylé (résultats non présentés). Ainsi, aucun atome de phosphore radioactif ne semble fixé de manière covalente aux protéines de 550, 200 et 140 kDa. Cependant, un temps d'exposition prolongé de l'autoradiographie révèle toutefois qu'un polypeptide très faiblement phosphorylé de 18 kDa est parfois résolu après une séparation sur gel-SDS de la protéine native d'environ 200 kDa (résultats non présentés). Un examen attentif de la colonne C (Fig.4.5) montre également que quatre phosphopolypeptides mineurs de Mr 40, 35, 32 et 23 kDa sont associés à la bande native de 67 kDa du stroma.

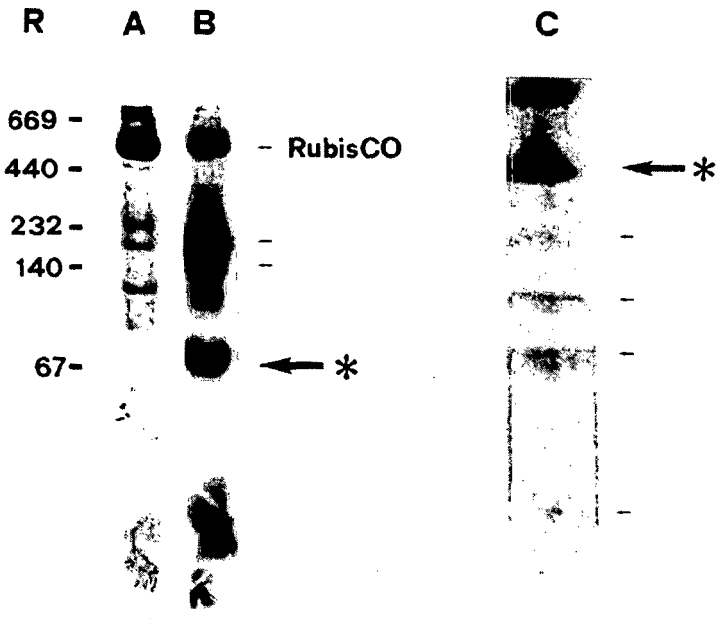


Fig.4.5. Séparation des phosphoprotéines du stroma après électrophorèse non dénaturante et détermination du Mr natif du phosphopolypeptide de 67 kDa

Après phosphorylation dans des conditions standard, les protéines du stroma (100 µg) ont été séparées sur gel natif 4-30% (voir "Matériels et méthodes"). Les colonnes A et B montrent respectivement la coloration du gel au bleu de Coomassie et son autoradiographie. Les protéines de référence sont indiquées sur la gauche (R). Après équilibration, pendant 20 min dans une solution contenant 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% (p/v) SDS et 1 mM EDTA- Na_2 , La bande native ("*"; colonne B) a été excisée du gel mère et séparée par SDS-PAGE 13%. La phosphoprotéine de 67 kDa "*" se retrouve dans le gel SDS-PAGE (colonne C), avec d'autres phosphopolypeptides de plus bas Mr (←).

L'incorporation du ^{32}P dans les protéines d'enveloppes et du stroma a été comparée après une précipitation au TCA. La quantification des cpm mesurés dans les quatre phosphoprotéines les plus importantes de 94, 67, 26 et 14 kDa est présentée dans le tableau 4.1. Dans le cas de l'enveloppe, les valeurs correspondant à la quantité totale de ^{32}P incorporé concordent parfaitement entre elles, soit: 57301 cpm pour les quatre phosphopolypeptides pris séparément et 62393 cpm après la précipitation des protéines au TCA. Notons que la petite différence observée trouve son origine dans les

cpm propres aux autres phosphopolypeptides moins marqués de l'enveloppe qui n'ont pas été comptabilisés (>67, 56, 51, 47, 35, 32 et 23 kDa; voir "Chapitre 3"). Par contre, la somme de la radioactivité mesurée dans les protéines du stroma après SDS-PAGE (1928 cpm), qui correspond essentiellement au phosphate fixé sur les deux phosphopolypeptides de 94 et 67 kDa (voir "Chapitre 3"), ne correspond pas du tout à la valeur déterminée après la précipitation des protéines au TCA (35369 cpm). Ce résultat atteste qu'une partie importante du phosphate radioactif (certainement sous forme de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP non-hydrolysé) n'est pas fixée de façon covalente, mais seulement électrostatiquement, sur les protéines du stroma, renforçant ainsi les observations effectuées sur le gel natif de la figure 4.5.

Si on compare la radioactivité incorporée spécifiquement dans la protéine de 67 kDa de l'enveloppe (55895 cpm) avec celle du stroma (1248 cpm), on remarque que pour une même quantité de protéine (30 μg) chargée dans chaque puits du gel, l'incorporation du phosphate est environ 50 fois plus importante dans l'enveloppe que dans le stroma. Comme il n'est pas possible de quantifier cette protéine (système Bioimage, Millipore) dans un gel coloré au bleu de Coomassie (Chapitre 3) ou à l'argent (résultats non présentés), on ne peut pas déterminer si la forte intensité du marquage mesurée dans l'enveloppe est due à une quantité élevée de cette protéine emprisonnée dans les vésicules ou uniquement à l'activation de la kinase par des constituants membranaires (Chapitre 3).

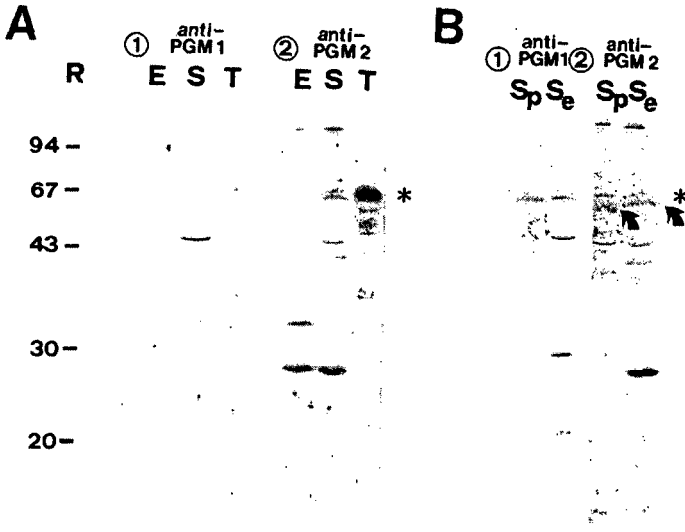
Tableau 4.1. Estimation par comptage Cerenkov des protéines phosphorylées dans le stroma et l'enveloppe

INCORPORATION DU ^{32}P DANS LES PROTEINES DE L'ENVELOPPE ET DU STROMA APRES PRECIPITATION AU TCA (valeurs en cpm; n=3)		
	<u>ENVELOPPE</u>	<u>STROMA</u>
	62393 \pm 1073	35369 \pm 2492
INCORPORATION DU ^{32}P DANS LES PROTEINES MAJEURES DE L'ENVELOPPE ET DU STROMA APRES SEPARATION PAR SDS-PAGE (valeurs en cpm; n=3)		
	<u>ENVELOPPE</u>	<u>STROMA</u>
94 kDa	318 \pm 40	491 \pm 15
67 kDa	55895 \pm 1723	1248 \pm 135
26 kDa	681 \pm 48	132 \pm 78
14 kDa	407 \pm 21	57 \pm 36
cpm totaux	57301	1928

La phosphorylation des protéines (30 μg) est effectuée trois fois, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". L'incorporation du ^{32}P est stoppée, soit par précipitation des protéines au TCA, soit, avant l'électrophorèse, par l'addition de tampon pour échantillon SDS-PAGE.

Salvucci et al. (1990) ont montré que la phosphoprotéine stromatique du *Pois* possédant un Mr de 64 kDa est, en fait, une phosphoglucomutase. Cette protéine présentant des caractéristiques biochimiques identiques à celle de 67 kDa (voir "Chapitre 3"), il est fort probable que la protéine d'Epinard exhibe aussi cette même activité enzymatique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis trois extraits chloroplastiques d'Epinard (E,S,T: enveloppe, stroma et thylacoïdes) à des anticorps

polyclonaux dirigés spécifiquement contre deux isoenzymes de la phosphoglucomutase de l'érythrocyte humain (PGM1 et PGM2; Fig.4.6). La phosphoglucomutase (PGM) des mammifères, possède un Mr d'environ 62 kDa; elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 561 résidus aminés, dont on connaît la séquence (Ray et al., 1983). Ces deux anticorps nous ont été gracieusement fournis par le Dr. Elena Piatti (Institut de chimie biologique, Urbino, Italie).



Figs 4.6 A-B. Révélation par immunoblot des protéines chloroplastiques qui sont reconnues par des anticorps polyclonaux dirigés contre deux phosphoglucomutases de l'érythrocyte humain. La séparation des polypeptides par SDS-PAGE et les immunoblots ont été effectués comme indiqué dans "Matériels et méthodes".

A: Les protéines (30 µg) d'enveloppes (E), du stroma (S) et des thylacoïdes (T), séparées par SDS-PAGE sont transférées sur papier de nitrocellulose, puis incubées avec des anticorps dirigés contre deux isoenzymes de la phosphoglucomutase (PGM1(1) et PGM2(1)) de l'érythrocyte. Dans cette expérience, les anticorps sont dilués 100 fois.

B: Les protéines stromatiques du Pois (Sp) et d'Épinard (Se) sont incubées avec les mêmes anticorps (α-PGM1 (1) et α-PGM2 (2)), après transfert sur papier de nitrocellulose. Dans cette expérience, les anticorps sont dilués 50 fois.

Les protéines de référence sont indiqués sur la gauche (R). L'étoile indique la position de la "zone" de Mr 67 kDa dans le gel. Les deux flèches signalent la présence des polypeptides de 64 (Sp) et 67 (Se) kDa reconnus par les anticorps α-PGM2 (B2).

On constate que plusieurs protéines chloroplastiques inconnues et de différents Mr réagissent de façon croisée avec ces deux anticorps α -PGM1(1) et α -PGM2(2)(Fig.4.6A). L'anticorps α -PGM2 reconnaît notamment très bien une protéine de 67 kDa dans les thylacoïdes (T) et d'environ 28 kDa dans l'enveloppe (E) et le stroma (S). Malheureusement, aucune protéine de 67 kDa n'apparaît dans les enveloppes ou le stroma du chloroplaste d'Epinard (Fig.4.6A,"").

La concentration relative en phosphoglucomutase d'Epinard étant probablement trop faible dans les extraits analysés ci-dessus pour être détectée par immunoblot, nous avons incubé les polypeptides (30 μ g) du stroma de chloroplastes de Pois (Sp) et d'Epinard (Se) en présence d'une concentration plus élevée d'anticorps (Fig.4.6B). Plusieurs polypeptides de Mr différents sont à nouveau révélés dans les deux extraits par les anticorps α -PGM1 et α -PGM2; deux d'entre eux, qui possèdent des Mr respectifs de 64 kDa (Sp) et 67 kDa (Se; voir "flèches et ""), sont faiblement reconnus, et ceci uniquement par l'anticorps anti-PGM2 (Fig.4.6B). Il s'agit assurément des phosphoglucomutases du chloroplaste de Pois (Salvucci et al., 1990) et de l'Epinard (Mühlbach et Schnarrenberger, 1978).

4.4. Discussion

L'analyse des fragments peptidiques, après la protéolyse partielle des phosphoprotéines de 67 kDa du stroma et de l'enveloppe (Fig.4.2), indique clairement que ces deux protéines sont identiques. De plus, ces deux phosphoprotéines présentent un fort caractère hydrophile quelle que soit leur localisation dans le chloroplaste (Fig.4.1). On observe encore que l'incorporation du phosphate a lieu uniquement sur des résidus sérines, indépendamment de leur localisation originelle avant le marquage (Fig.4.3, Cortez et al., 1987). En outre les caractéristiques biochimiques de la phosphoprotéine de 67 kDa (Chapitre 3) étant identiques à celles exhibées par la phosphoprotéine de 64 kDa décrite par Soll et Bennett (1988) et Soll et al. (1989), nous pouvons donc affirmer que la protéine de 67 kDa de l'Epinard est véritablement l'homologue de celle de 64 kDa du Pois localisée dans le lumen de l'enveloppe du chloroplaste.

Malgré une concentration relativement faible en protéine de 64 ou de 67 kDa dans des extraits bruts de stroma de Pois ou d'Epinard (Soll et Bennett, 1988; "Chapitre 3"), les anticorps α -PGM2, dirigés contre une des phosphoglucomutases de l'érythrocyte humain, reconnaissent, faiblement il est vrai, ces deux protéines, alors que les anticorps α -PGM1 ne les discernent pas (Fig.4.6B). Les deux phosphoglucomutases de

l'érythrocyte humain (PGM1 et PGM2) possèdent des spécificités de substrat différentes, puisque la PGM1 (58.5 kDa) ne peut que muter des glucoses monophosphates, alors que la PGM2 (69 kDa) possède, en plus, des activités phosphoribomutasiqes et peut induire la synthèse de glucose-1,6-bisphosphate (Piatti et al., 1990). Il a été en effet montré que certaines phosphoglucomutases peuvent catalyser l'interconversion entre des isomères de phosphate 1- et 6- de plusieurs α -D-hexoses autres que le glucose, tel que le mannose, le galactose, l'allose, le fructose et la N-acétyl glucosamine (Ray et Peck, 1972), tandis que d'autres catalysent même l'interconversion entre le phosphate 1- et 5- de l' α -D-ribose (Ray et Peck, 1972). Il est donc vraisemblable que les protéines de 64 et 67 kDa possèdent en plus de leurs activités phosphoglucomutasiqes propres (Salvucci et al., 1990), d'autres activités phosphomutasiqes multifonctionnelles.

En plus des analyses effectuées par Westernblot, plusieurs observations suggèrent fortement que la protéine de 67 kDa est assimilable à une phosphoglucomutase:

(1) le Mg^{2+} est nécessaire pour stimuler à la fois la phosphorylation de la protéine de 67 kDa et les activités phosphoglucomutasiqes ("Chapitre 3"; Ray et Peck, 1972).

(2) la phosphorylation de la protéine de 67 kDa et l'activité des phosphoglucomutases sont optimales à pH neutre et inhibées par le calcium ("Chapitre 3"; Mühlbach et Schnarrenberger, 1978; Ray et Peck, 1972).

(3) les deux protéines possèdent des Mr proches (Fig.4.1; Ray et al., 1983, Piatti et al., 1990) et leur structure holoenzymatique est monomérique (Fig.4.5; Ray et Peck, 1972).

(4) l'incorporation du phosphate intervient toujours sur une sérine (Fig.4.3; Ray et al., 1983).

Cette phosphoglucomutase conditionne donc les hexoses et pentoses phosphorylés, en mutant le phosphate à partir d'un autre sucre-phosphate, pour leur permettre d'entrer dans les voies métaboliques classiques du chloroplaste et du cytosol (Cycle de Calvin, synthèse de l'amidon ou glycolyse, par exemple). Sa localisation dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe n'est sans doute pas le fruit du hasard, puisqu'elle permet probablement au chloroplaste de contrôler subtilement les échanges des dérivés sucrés phosphorylés entre le stroma et le cytosol (bien qu'aucun translocateur de glucose n'ait été identifié à ce jour dans les membranes internes de

l'enveloppe (Flügge et Heldt, 1991)).

Le recyclage très rapide du phosphore fixé dans les protéines de 64 kDa (Soll et Bennett, 1988) et de 67 kDa (Chapitre 3) suggère que la protéine échange elle-même directement son phosphate à partir de l'ATP et non pas, comme elle le fait certainement *in vivo*, par l'intermédiaire de dérivés phosphorylés comme le glucose-6-phosphate, le glucose-1,6-bisphosphate ou encore le fructose-1,6-bisphosphate (Salvucci et al., 1990). Soll et al. (1989) ont d'ailleurs observé que l'incubation d'ADP en présence de la protéine de 64 kDa du Pois, marquée radioactivement, induit la synthèse de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP. Par cette expérience, ces auteurs confirment que la protéine possède effectivement une activité d'autophosphorylation réversible. Il est certain que le magnésium lié aux membranes d'enveloppes (Gupta et Berkowitz, 1989; Siegenthaler et Bovet, 1993), ainsi que la phosphatidylcholine et/ou le phosphatidylglycérol (Chapitre 3), stimulent directement sa phosphorylation autocatalytique. Ceci expliquerait pourquoi le nombre d'isoformes phosphorylées de la protéine de 67 kDa est beaucoup plus élevé dans l'enveloppe que dans le stroma (Fig.4.4).

Certaines phosphoprotéines mineures de l'enveloppe de Mr 35, 32 et 23 kDa, qui possèdent les mêmes propriétés biochimiques et biophysiques que la phosphoprotéine de 67 kDa (voir "Chapitre 3"), dérivent d'un autre oligomère de même poids moléculaire (Fig.4.5, colonne C). Il s'agit soit d'autres phosphomutases chloroplastiques (phosphopentomutases, phosphodéoxyribomutases, phosphoglycérate mutases, Ray et Peck, 1972; une phosphopentomutase d'environ 32 kDa a été, par exemple, identifiée dans un extrait de *Salmonella typhimurium* (Hammen-Jepersen et Munch-Petersen, 1970), soit de produits de dégradation de la phosphoglucomutase elle-même, qui posséderaient encore leurs propriétés d'autophosphorylation.

4.5. Bibliographie

- Carde, J.P., Joyard, J., Douce, R. (1982) Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids. *Biol. Cell* 44: 315-324.
- Cortez, N., Lucero, H.A., Vallejos, R.H. (1987) Stromal serine protease protein kinase activity in spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 504-508.
- Douce, R., Joyard, J. (1982) Purification of the chloroplast envelope. *Dans Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Edelman, M., Hellick, R.B. and Chua, N.-H., eds. Elsevier, Amsterdam, pp 239-259.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radioactives associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'Epinard après protéosynthèse *in organello* en présence de ³⁵S-méthionine, Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 129-144.
- Foyer, C.H. (1985) Stromal protein phosphorylation in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 231: 97-103.
- Guillon, C., Mache, R. (1987) Phosphorylation *in vitro* of the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 166: 249-254.
- Gupta, A.S., Berkowitz, G.A. (1989) Development and use of chlorotetracycline fluorescence as a measurement assay of chloroplast envelope-bound Mg²⁺. *Plant Physiol.* 89: 753-761.
- Hammer-Jespersen, K., Munch-Petersen, A. (1970) Phosphodeoxyribomutase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 17: 397-407.
- Hinz, G., Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- Laing, W.A., Christeller, J.T. (1984) Chloroplast phosphoproteins: distribution of phosphoproteins within spinach chloroplasts. *Plant Sci. Lett.* 36: 99-104.
- Mühlbach, H., Schnarrenberger, C., (1978) Properties of intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves. *Planta* 141: 65-70.
- Piatti, E., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Fazi, A. (1990) Immunological studies on erythrocyte phosphoglucomutase isoenzymes. *Biochem. Int.* 21: 155-163.
- Ray, W.J., Hermodson, M.A., Puvathingal, J.M., Mahoney, W.C. (1983) The complete amino acid sequence of rabbit muscle phosphoglucomutase. *J. Biol. Chem.* 258: 9166 -9174.
- Ray, W.J., Peck, E.J. (1972) Phosphomutases. *Dans* PD Boyer, ed, *The enzymes*, Vol. 6, Academic Press, New York, pp 407-477.
- Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Heley, B.E., Hanson, K.R., McHale, N.A. (1990) Identification of the 64 kDa chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 93: 105-109.
- Siegenthaler, P.A., Bovet, L. (1993) A unique protein kinase activity is responsible for the phosphorylation of the 26 and 14 kDa proteins but not of the 67 kDa protein in the chloroplast envelope membranes of spinach. *Planta* 190: 231-240.

Soll, J., Bennett, J.(1988) Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and the inner envelopes of pea chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 301-307.

Soll, J., Berger, V., Bennett, J. (1989) Adenylate effects on protein phosphorylation in the interenveloppe lumen of pea chloroplasts. *Planta* 177: 393-400.

CHAPITRE 5

Les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa des membranes internes de l'enveloppe sont-elles des pools distincts du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO ?

5.1. Introduction

Dans le chapitre 3, nous avons démontré que la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa de la membrane interne de l'enveloppe est dépendante de mêmes paramètres biochimiques, tels que la concentration en protons, Mg^{2+} , Ca^{2+} et ATP. L'influence de composés, tels que l'EDTA, l'EGTA, H7, ainsi que des expériences de "pulse-chase", révèlent que les mécanismes qui contrôlent cette réaction enzymatique sont identiques pour les deux phosphoprotéines. Ils sont cependant très différents pour la phosphorylation de la protéine de 67 kDa (Siegenthaler et Bovet, 1993). Comme l'identité de la phosphoprotéine de 67 kDa de l'Epinard, discutée dans le chapitre 4, ne fait aucun doute (Salvucci et al., 1990), nous avons entrepris, dans le présent chapitre, de caractériser les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa. D'après les travaux préliminaires réalisés par Soll et Buchanan (1983), la protéine de 14 kDa ferait partie d'un pool de petites sous-unités de la RubisCO, phosphorylées et emprisonnées dans les membranes de l'enveloppe. Cependant, les arguments en faveur d'une telle hypothèse sont loin d'être convaincants. Quant à l'origine génomique de la phosphoprotéine de 26 kDa, elle n'a pas encore été élucidée.

5.2. But du chapitre

Pour identifier les deux protéines phosphorylées de 26 et 14 kDa, nous utiliserons des méthodes d'électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) associées à des techniques immunologiques (immunoprécipitation à l'aide d'anticorps polyclonaux).

Nous déterminerons également la nature de(s) l'acide(s) aminé(s) accepteur de phosphate, sur les deux protéines de 26 et 14 kDa des membranes internes de l'enveloppe.

5.3. Résultats

La figure 5.1A montre le profil des protéines d'enveloppes phosphorylées, séparées par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) et colorées au bleu de Coomassie. La grande (LS) et la petite (SS) sous-unité de la carboxylase sont clairement visibles sur ce gel, comme dans des fractions de membranes internes ou externes d'enveloppes (Siegenthaler et Dumont, 1990). Sur l'autoradiographie correspondante (Fig.5.1B), les trois phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa, qui ont été étudiées dans les deux chapitres précédents, sont parfaitement décelables. La phosphoprotéine de 67 kDa possède plusieurs isoformes distribuées tout le long du gradient de pH. Ces différents points isoélectriques correspondent probablement à des états de phosphorylation de la phosphoglucomutase (Chapitre 4).

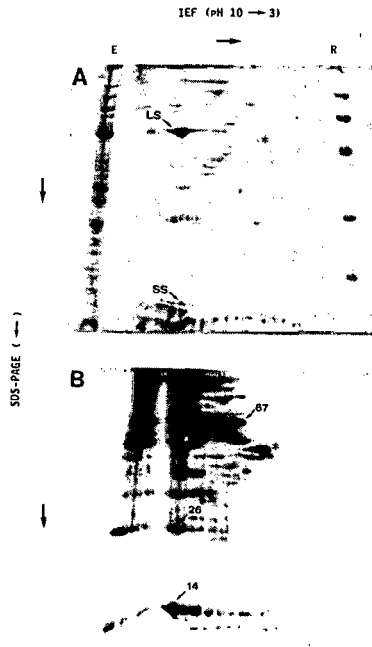
Les phosphopolypeptides de 26 et 14 kDa possèdent des points isoélectriques très proches de ceux de la RubisCO (Fig.5.1B). Toutefois, plusieurs isoformes mineures, propres à ces deux phosphoprotéines, migrent à différents pH dans un gel IEF, témoignant que différents pools phosphorylés sont présents dans les membranes d'enveloppes. Les autres phosphoprotéines qui ont été identifiées sur gels-SDS unidimensionnels (Chapitre 3), peuvent aussi être détectées par électrophorèse en deux dimensions (IEF x SDS-PAGE). La phosphoprotéine de 51 kDa (*), par exemple, qui est impliquée dans l'import des protéines d'origine nucléaire dans le chloroplaste (Hinz et Flügge, 1988; Chapitres 3 et 6), possède un des pI les plus acides (Fig.5.1B; Chapitre 6). On remarque aussi un curieux halo radioactif qui circonscrit la LS, indiquant qu'un petit pool de ce polypeptide pourrait être phosphorylé dans les membranes d'enveloppes. Ceci ne serait pas surprenant, puisque la grande sous-unité de la RubisCO est connue pour incorporer du phosphate dans des chloroplastes énergétisés (Foyer, 1985; Guitton et Mache, 1987).



Figs 5.1 A-B. Analyse de protéines d'enveloppes phosphorylées, par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE)

Les protéines d'enveloppes (120 µg) sont phosphorylées, puis analysées par électrophorèse en deux dimensions, comme décrit dans "Matériels et méthodes". La figure A correspond à la coloration du gel 2D au bleu de Coomassie et la figure B à l'autoradiographie correspondante. Comme contrôle, des membranes d'enveloppes non marquées radioactivement (E) et des marqueurs de poids moléculaire connus (R) ont été séparés par SDS-PAGE uniquement. La position des polypeptides phosphorylés de 67, 26 et 14 kDa est indiquée par des flèches et par un * pour la phosphoprotéine de 51 kDa.

L'adjonction d'une concentration élevée en ATP (µM) a pour effet d'activer l'incorporation du ³²P dans les protéines de 26 et 14 kDa notamment (Chapitre 3). C'est la raison pour laquelle nous avons effectué une séparation bidimensionnelle de protéines d'enveloppes, après les avoir phosphorylées dans des conditions standard mais en présence de 0.01 mM d'ATP froid (Figs 5.2A et 5.2B). Dans ce cas, la phosphoprotéine de 14 kDa se résout en plusieurs formes de points isoélectriques de plus en plus acides (voir Fig.5.2B). La présence de l'ATP froid dans le milieu réactionnel favorise aussi la phosphorylation de la protéine de 51 kDa (*), mais par contre inhibe sensiblement celle de la protéine de 67 kDa, confirmant ainsi les résultats présentés dans le chapitre 3.



Figs 5.2 A-B. Analyse de protéines d'enveloppes, phosphorylées en présence d'ATP froid, par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE)

L'analyse a été effectuée exactement comme indiqué dans la légende de la figure 5.1, excepté que la phosphorylation des protéines a été initiée en présence de 0.01 mM d'ATP non-radioactif.

L'agrandissement de la zone qui montre la région phosphorylée de 14 kDa sur l'autoradiographie d'un gel 2D (Fig.5.1) indique que la bande détectée par SDS-PAGE uniquement (Chapitre 3), est en fait composée d'au moins trois phosphopolypeptides bien distincts qui possèdent des différents mais néanmoins proches points isoélectriques (Fig.5.3C). Le phosphopolypeptide qui a été marqué d'une flèche (Fig.5.3C) superpose exactement le polypeptide de 14 kDa coloré au bleu de Coomassie (Fig.5.3A) et celui reconnu par un anticorps dirigé contre la RubisCO (ce sérum nous a été gracieusement fourni par le Dr. P. Schürmann de l'Université de Neuchâtel; Fig.5.3B). Ce spot radioactif correspond probablement à un pool de petites sous-unités de la RubisCO phosphorylée dans les enveloppes. En fait, cette observation n'est pas totalement surprenante puisqu'il

est admis qu'une partie de l'holoenzyme de la RubisCO est fortement liée à ces membranes (Pineau et al., 1979; Joyard et al., 1982; Siegenthaler et Dumont, 1990). Concernant les deux autres polypeptides phosphorylés de 14 kDa, le plus basique -qui est aussi le plus marqué -et le plus acide sont présents en quantités plus faibles dans les enveloppes car aucun des deux ne superpose de spots colorés au bleu de Coomassie.

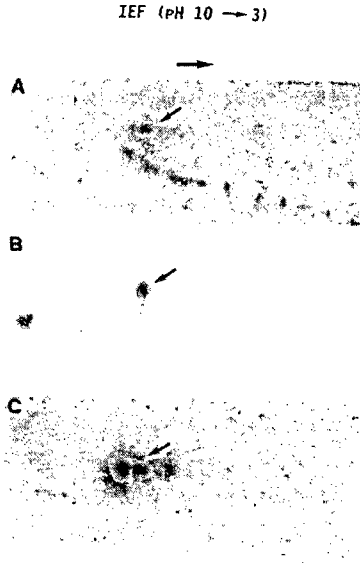


Fig.5.3. Détails de la région phosphorylée de 14 kDa après électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE). Les enveloppes phosphorylées ont été analysées par IEF x SDS-PAGE, comme exposé dans la légende de la figure 5.1. La région de 14 kDa du gel, colorée au bleu de Coomassie (A), révélée par immunoblot avec un anticorps anti-RubisCO (dilution 1/200; B) ou autoradiographiée (C) est détaillée dans cette figure. Les flèches indiquent la position de la phosphoprotéine de 14 kDa dans le gel, laquelle co-migre avec le polypeptide coloré au bleu de Coomassie et celui reconnu par l'anticorps.

Pour garantir l'identité de la protéine de 14 kDa, une préparation d'enveloppes phosphorylées a été immunoprécipitée par des IgGs polyclonaux anti-RubisCO, aimablement fournis par le professeur R.J. Ellis de l'Université de Warwick en Grande-Bretagne (Fig.5.4). L'anticorps a été préparé à partir de l'holoenzyme purifiée, extraite de chloroplastes de Pois. Le résultat révèle, sans équivoque, qu'une protéine de 14 kDa marquée au ^{32}P est immunoprécipitée par l'anticorps, confirmant ainsi que la petite sous-unité de la RubisCO subit une phosphorylation intense dans les enveloppes du chloroplaste d'Épinard. Toutefois, bien que cette technique fonctionne parfaitement

puisqu'elle nous a permis notamment d'immunoprécipiter la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe à l'aide d'anticorps α -51 kDa (Travail de licence en cours dans notre laboratoire réalisé par M.O. Müller; voir "Chapitre 6"), nous devons encore répéter cette expérience d'immunoprécipitation avec, cette fois-ci, comme contrôle du sérum préimmun (que le professeur Ellis ne nous a pas encore fait parvenir). Notons que les anticorps anti-RubisCO que nous avons reçus reconnaissent parfaitement par Westernblot les deux sous-unités de la carboxylase de l'Epinard (résultat non montré).



14

Fig.5.4. Immunoprécipitation de protéines phosphorylées dans une préparation d'enveloppes à l'aide d'un sérum anti-RubisCO

Après la phosphorylation de membranes d'enveloppes en présence de 0.01 mM MgATP, les complexes immuns ont été séparés par SDS-PAGE (voir "Matériels et méthodes"), colorés au bleu de Coomassie et autoradiographiés. La flèche indique la position d'une protéine phosphorylée de 14 kDa sur l'autoradiogramme.

Quand des thylacoïdes sont phosphorylés en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, les phosphoprotéines les plus fortement marquées sont les deux formes majeures constitutives du LHCII, soit LHCIIA (27 kDa) et LHCIIB (25 kDa) (Larsson et al., 1987). La bande marquée de 26 kDa de l'enveloppe migre avec une mobilité électrophorétique comparable à celle de bas poids moléculaire du LHCII provenant du thylacoïde (LHCII B; Fig.5.5). Dans nos conditions expérimentales, les autres protéines thylacoïdales qui incorporent le phosphate à partir du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP sont identiques à celles qui ont déjà été décrites par Bennett (1984), excepté une phosphoprotéine supplémentaire d'environ 60 kDa qui correspond vraisemblablement à la forme autophosphorylée de la LHCII-kinase (Coughland et Hind, 1986). Il est remarquable de constater qu'on ne détecte pas de phosphoprotéines de 67 kDa et de 14 kDa dans des extraits phosphorylés de membranes thylacoïdales, et pas de LHCIIA et de protéines de 9 kDa phosphorylés dans les enveloppes marquées (Fig.5.5). Ces observations, qui sont aussi valables si on compare des enveloppes avec des thylacoïdes fraîchement phosphorylés (voir la légende de la Fig.5.5; résultats non montrés), démontrent que les contaminations croisées entre ces deux compartiments membranaires sont très faibles.

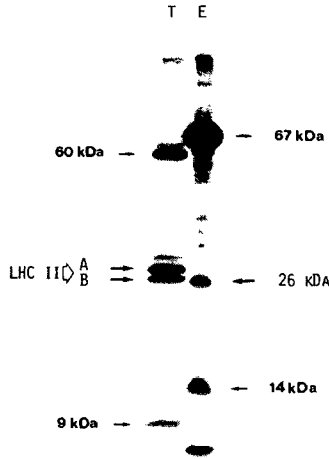
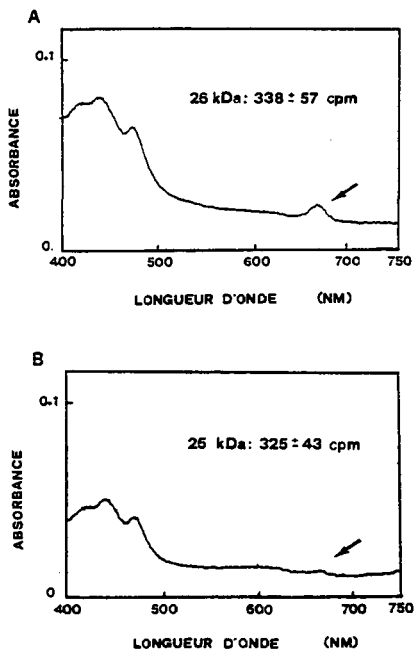


Fig.5.5. Comparaison du profil électrophorétique des polypeptides phosphorylés *in vitro* dans les thylacoïdes et les enveloppes

Les protéines (30 μg) d'une fraction de thylacoïdes (T) et de membranes d'enveloppes (E) ont été séparées par SDS-PAGE après leurs phosphorylations dans des conditions standard. Afin de comparer qualitativement ces deux profils électrophorétiques, les membranes thylacoïdales fraîchement marquées ont été conservées à -20°C dans du tampon pour échantillon, durant les deux semaines précédant l'électrophorèse. Les positions dans le gel de la phosphoprotéine de 26 kDa, des deux formes phosphorylées du LHCII (LHCIIA et B) et des phosphoprotéines de 67, 60, 14 et 9 kDa sont indiquées par des flèches.

On sait que les préparations thylacoïdales que nous avons utilisées ne contiennent pas de contaminants provenant de l'enveloppe, car jusqu'à 99% de membranes d'enveloppes prémarquées radioactivement peuvent être extraites des thylacoïdes (Rawlyer et Siegenthaler, 1992). De plus, des analyses spectrophotométriques montrent que la plupart des préparations d'enveloppes purifiées sont presque complètement dépourvues de pigments chlorophylliens (Fig.5.6B et Dumont, 1991), confirmant ainsi le degré de pureté élevé des membranes d'enveloppes que nous avons sélectionnées pour nos expériences. Toutefois, on constate parfois que certaines préparations d'enveloppes restent légèrement vertes (Fig.5.6A), même après une séparation sur gradient discontinu de saccharose (voir "Matériels et méthodes"). Afin de déterminer l'effet d'une contamination thylacoïdale sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes, nous avons phosphorylé des enveloppes exemptes (Fig.5.6B) ou contenant (Fig.5.6A) une certaine proportion de contaminants d'origine thylacoïdale. On ne détecte aucune phosphoprotéine thylacoïdale typique (LHCIIA, 60 kDa et 9kDa, Fig.5.5) dans des enveloppes légèrement vertes (résultats non présentés), indiquant probablement que les pigments chlorophylliens contaminant parfois les préparations d'enveloppes ne sont pas liés à des protéines thylacoïdales, mais plutôt présents sous formes libres. De plus, la quantification par comptage Cerenkov de la protéine phosphorylée de 26 kDa dans les deux types de membranes d'enveloppes atteste que l'incorporation dans cette protéine n'est pas influencée par la présence de la chlorophylle (Figs 5.6A et 5.6B).

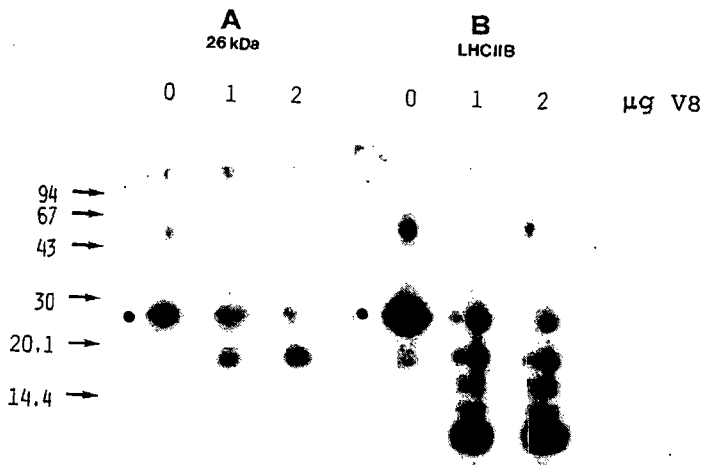


Figs 5.6 A-B. Comparaison de l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 26 kDa constitutive d'enveloppes exemptes ou contaminées par de la chlorophylle

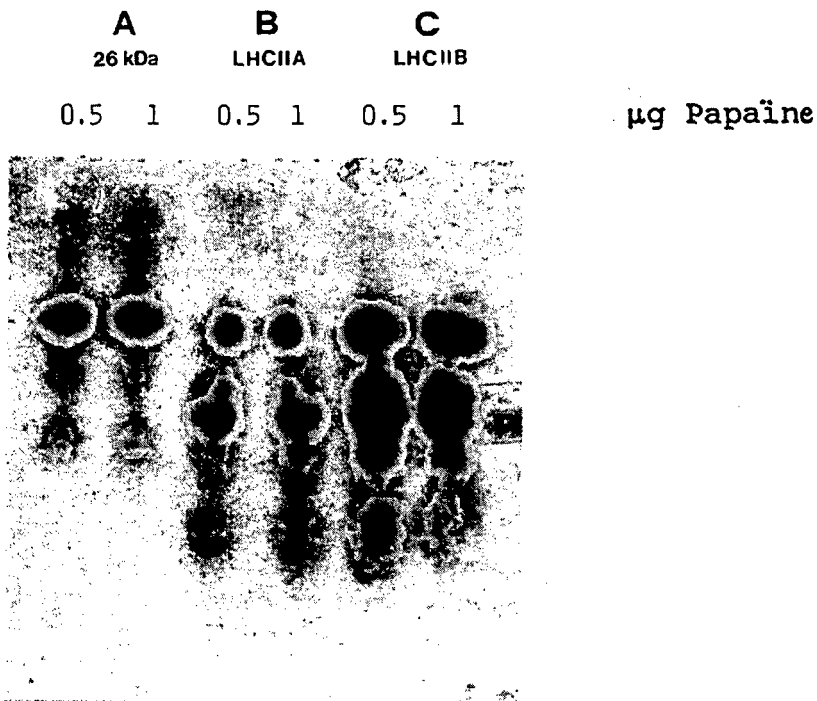
Les spectres d'absorption d'enveloppes "vertes" (A) ou sans contaminants chlorophylliens visibles à l'oeil nu (B) ont été mesurés entre 400 et 750 nm. Les échantillons analysés contiennent 10 μg de protéines précipitées dans 1 ml d'acétone 80%. Simultanément, ces deux fractions d'enveloppes (15 μg) ont été phosphorylées, séparées par électrophorèse et enfin autoradiographiées dans des conditions standard. Après l'excision de la phosphoprotéine de 28 kDa dans le gel d'électrophorèse, l'incorporation du ^{32}P a été mesurée par comptage Cerenkov (cpm). En guise de contrôle, l'expérience a été réalisée à double ($n=2$).

Dans le but de comparer les phosphoprotéines de Mr-26 kDa originaires des membranes thylacoïdales (LHCIIB; Fig.5.5) ou des membranes d'enveloppes, une expérience de protéolyse partielle, en présence de la protéase V_8 de *S. aureus*, a été effectuée. Les profils autoradiographiques, issus des dégradations de la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe (Fig.5.7A) et de la forme phosphorylée du LHCIIB (Fig.5.7B), sont très différents. Le même type d'expérience, mais effectuée cette fois-ci avec de la papaine, livre la même information puisque les phosphopeptides, qui dérivent respectivement de la protéolyse de la phosphoprotéine de 26 kDa (Fig.5.8A) et du LHCIIB (Fig.5.8B), exhibent à nouveau des Mr et des intensités de marquage très

différents. Ce résultat atteste que nous sommes en présence de deux protéines phosphorylées sur différents résidus d'acide aminé, ce qui n'empêche pas qu'elles puissent être identiques. Par contraste, les phosphopeptides qui dérivent des deux formes du LHCII (Figs 5.8B et 5.8C) exhibent des profils similaires. Ceci n'est pas étonnant puisque toutes les protéines du LHCII possèdent des séquences similaires en acides aminés (Allen, 1992). Les deux formes LHCIIA et LHCIIB sont codées par un gène nucléaire de la même famille, appelé *cab* (Demmin et al., 1989), et phosphorylées dans les thylacoïdes par une même protéine-kinase (Coughlan et Hind, 1986 et 1987; Allen, 1992). L'effet du CNBr sur les phosphoprotéines de 26 kDa et du LHCIIB confirment les expériences de protéolyse mentionnées ci-dessus, puisque les produits de dégradation marqués au ^{32}P arborent des Mr différents, bien que la mobilité des deux fragments phosphopeptidiques de l'enveloppe soit assez proche de celle des thylacoïdes (Figs 5.9A et 5.9B).



Figs 5.7 A-B. Cartographie des phosphopeptides constitutifs de la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe et du LHCIIB thylacoïdal, après électrophorèse en présence de protéase V_8 de *S.aureus*. Le polypeptide de 26 kDa (A), phosphorylé *in vitro* dans les membranes d'enveloppes, et celui du LHCIIB (B), phosphorylé *in vitro* dans une fraction de thylacoïdes, ont été excisés dans un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (voir Fig.5.5). Ces deux polypeptides marqués au ^{32}P ont été placés ensuite dans les puits d'un second gel-SDS à gradient continu d'acrylamide (15-30%) en présence de 0, 1 et 2 μg de protéase V_8 , comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Après électrophorèse, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (pour visualiser les marqueurs de poids moléculaires connus; résultat non montré), séché et enfin autoradiographié.



Figs 5.8 A-B-C. Cartographie des phosphopeptides constitutifs de la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe et des formes LHCIIA et LHCII B des thylacoïdes, après électrophorèse en présence de papaïne

Le polypeptide de 26 kDa (A), phosphorylé *in vitro* dans les membranes d'enveloppes, et ceux du LHCIIA (B) et LHCII B (C), phosphorylés *in vitro* dans une fraction de thylacoïdes, ont été excisés dans un gel-SDS après électrophorèse (voir Fig.5.6). Ces trois polypeptides marqués au ^{32}P ont été placés ensuite dans les puits d'un second gel-SDS, à gradient continu d'acrylamide (15-30%), en présence de 0.5 et 1 µg de papaïne, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Après électrophorèse, le gel a été placé directement en autoradiographie.

Pour déterminer l'identité de la phosphoprotéine de 26 kDa, nous avons comparé, après électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE), les points isoélectriques de la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe et du LHCII thylacoïdal (Fig.5.10). Pour ce faire, des membranes thylacoïdales non-marquées au ^{32}P et contenant les deux apoprotéines du LHCII ont été ajoutées comme marqueurs à des enveloppes phosphorylées *in vitro*. La comparaison de polypeptides proches dans un gel 2D n'est jamais aisée, car il est toujours nécessaire d'ajouter un marqueur dans la matrice du gel afin d'évaluer précisément leur mobilité électrophorétique. Après

électrophorèse, le gel a été coloré au bleu de Coomassie pour déterminer la position des deux formes du LHCII (Fig.5.10A) et ensuite autoradiographié, pour localiser précisément la phosphoprotéine de 26 kDa (Fig.5.10B). Ce résultat montre clairement que la phosphoprotéine de 26 kDa superpose la coloration au bleu de Coomassie du LHCII sur un large domaine de valeurs de pH.

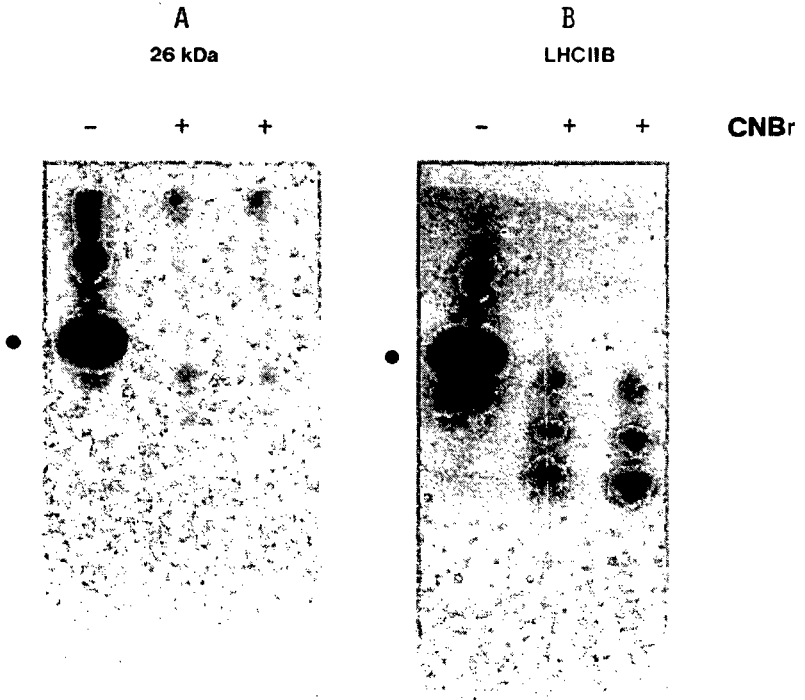
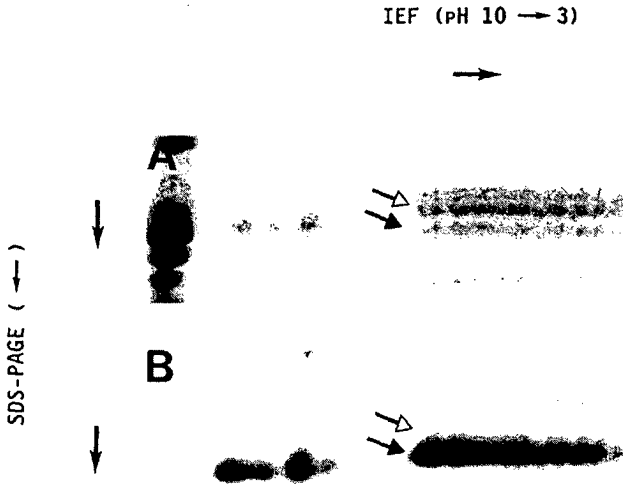


Fig.5.9. Traitement au CNBr des formes phosphorylées de la protéine de 26 kDa et du LHCII B
 Le polypeptide de 26 kDa (A), phosphorylé *in vitro* dans les membranes d'enveloppes, et celui du LHCII B (B), phosphorylé *in vitro* dans une fraction de thylacoïdes, ont été excisés dans un gel-SDS après électrophorèse. Les deux phosphopolypeptides ont été ensuite hydrolysés en présence de CNBr et séparés par SDS-PAGE, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Pour chaque phosphoprotéine analysée, un témoin sans CNBr (-) et deux échantillons traités au CNBr (+) ont été séparés par électrophorèse et autoradiographiés.

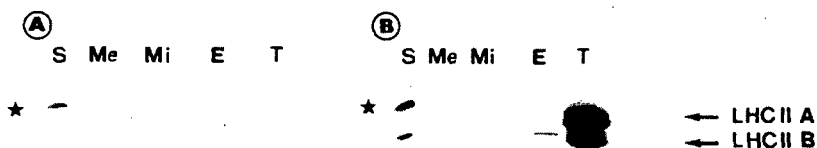


Figs 5.10 A-B. Détails de la région phosphorylée de 26 kDa dans un gel 2D

Dans des conditions standard, des protéines d'enveloppes (90 µg) ont été phosphorylées en présence de 0.01 mM MgATP, puis lavées trois fois avec 50 mM MOPS-NaOH pH 7.6. Entre chaque lavage, les protéines ont été sédimentées pendant 3 min à 15800 g (14000 rpm; Eppendorf microfuge). Avant de solubiliser les protéines d'enveloppes dans du tampon pour échantillon IEF, 60 µg de protéines thylacoïdales ont été ajoutées comme marqueur. Après IEF x SDS-PAGE, le gel-SDS a été coloré, séché, puis autoradiographié. Les détails de la région phosphorylée de 26 kDa dans le gel coloré au bleu de Coomassie (A) et son autoradiographie correspondante (B) sont montrés ici. Les flèches vides et pleines indiquent respectivement la position du LHCIIA et LHCIIIB dans le gel 2D.

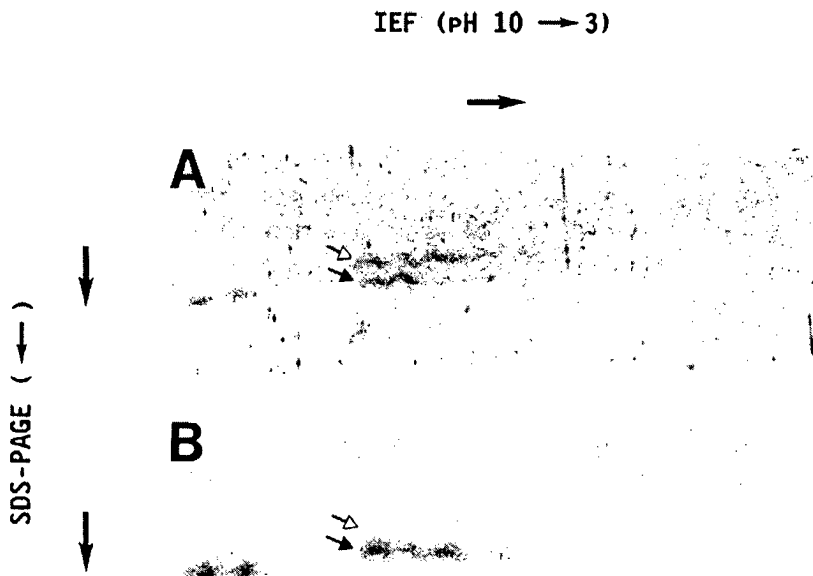
Pour rendre ce résultat plus crédible, nous avons répété la même expérience, mais au lieu de colorer le gel au bleu de Coomassie avant l'autoradiographie, nous l'avons soumis à une analyse par immunoblot avec des anticorps dirigés spécifiquement contre LHCIIIB (Fig.5.12). Ces anticorps, préparés comme indiqué dans "Matériels et méthodes", ont été préalablement testés par immunoblot sur cinq fractions chloroplastiques brutes (stroma (s), thylacoïdes (T), enveloppes (E), membranes internes (Mi) et externes d'enveloppes (Me); Fig. 5. 11). L'anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre l'apoprotéine b du LHCII (LHCIIIB) réagit aussi avec l'apoprotéine a (LHCIIA). Ce

résultat n'est pas étonnant, puisque Darr et al. (1986) ont déjà montré que des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre une des deux apoprotéines du LHCII reconnaissent, en fait, les deux formes de ce complexe. Cet anticorps polyclonal réagit faiblement avec une autre protéine d'environ 26 kDa de l'enveloppe. Des analyses par électrophorèse bidimensionnelle indiquent que cette protéine, qui possède un point isoélectrique très acide, n'a rien à voir avec une protéine du LHCII (résultats non montrés). On notera encore qu'une bande d'environ 29 kDa réagit non-spécifiquement aux IgGs des sérums préimmuns (Fig.5.11A) et immuns (Fig.5.11B) dans l'extrait de stroma (S: voir *). Après une électrophorèse bidimensionnelle, le résultat montre sans ambiguïté que la protéine de 26 kDa marquée radioactivement (Fig.5.12B) superpose parfaitement l'apoprotéine b du LHCII (LHCIIb) reconnue par l'anticorps (Fig.5.12A), éterninant ainsi les résultats présentés sur la figure 5.10.



Figs 5.11 A-B. Immunodétection du LHCII dans les compartiments majeurs du chloroplaste avec un anticorps dirigé contre LHCIIb

Des protéines thylacoïdales purifiées (640 µg) ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur une feuille de papier de nitrocellulose. La protéine correspondant à la forme de bas poids moléculaire du LHCII (LHCIIb; voir Fig.5.6) a été excisée, solubilisée, puis injectée dans les flancs d'un lapin (comme indiqué dans "Matériels et méthodes"). Après la récolte des anticorps, les fractions du stroma (S), des thylacoïdes (T), de l'enveloppe (E) et des membranes internes (Mi) et externes de l'enveloppe (Me) ont été analysées par Westernblot en présence d'une dilution 1/200 des sérums préimmun (A) et anti-LHCIIb (B). Les zones des deux immunoblots, comprises entre environ 20 et 30 kDa, sont présentées sur cette figure.



Figs 5.12 A-B. Détails de la région phosphorylée de 26 kDa dans un gel 2D, après un immunoblot en présence de sérum anti-LHCIIb

Dans des conditions standard, des protéines d'enveloppes (90 µg) ont été phosphorylées, puis lavées trois fois avec 50 mM MOPS-NaOH pH 7.6. Entre chaque lavage, les protéines ont été sédimentées pendant 3 min à 15800 g (14000 rpm; Eppendorf microfuge). Avant de solubiliser les protéines d'enveloppes dans du tampon pour échantillon IEF, 40 µg de protéines thylacoïdales ont été ajoutées comme marqueur. Après IEF x SDS-PAGE, le gel-SDS a été transféré par électrophorèse sur du papier de nitrocellulose, soumis à des anticorps polyclonaux dirigés contre la forme B du LHCII (voir "Matériels et méthodes"), puis autoradiographié. Les détails de la région phosphorylée de 26 kDa sur l'immunoblot (A) et son autoradiographie correspondante (B) sont montrés ici. Les flèches vides et pleines indiquent les positions respectives du LHCIIa et du LHCIIb dans le gel 2D.

L'immunoprécipitation de la phosphoprotéine de 26 kDa avec l'anticorps α -LHCIIb (voir Fig.5.11) ainsi qu'un autre anticorps dirigé contre la protéine du LHCII du chloroplaste de Pois (aimablement fourni par le Dr. M. Spangfort de l'Université de Lund (Suède)) n'a malheureusement pas encore abouti (résultat non montré). Nous pensons toutefois que la phosphoprotéine de 26 kDa correspond bien à un pool de LHCII phosphorylé dans l'enveloppe du chloroplaste, mais ne s'y trouve pas en quantité suffisante pour être immunoprécipitée par des anticorps spécifiques.

Comme l'incorporation du ^{32}P dans les deux protéines d'enveloppes de 26 et 14 kDa est dépendante de mêmes paramètres biochimiques (Chapitre 3), il est impératif de déterminer si la nature des acides aminés phosphorylés sur ces deux protéines est également identique. La figure 5.13 montre effectivement que l'incubation de membranes internes d'enveloppes avec du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP induit la phosphorylation des deux protéines sur des résidus sérines. Les composés phosphorylés non-identifiés, qui migrent sur la plaque cellulose avec de plus faibles mobilités électrophorétiques, correspondent certainement à des peptides parents partiellement hydrolysés.

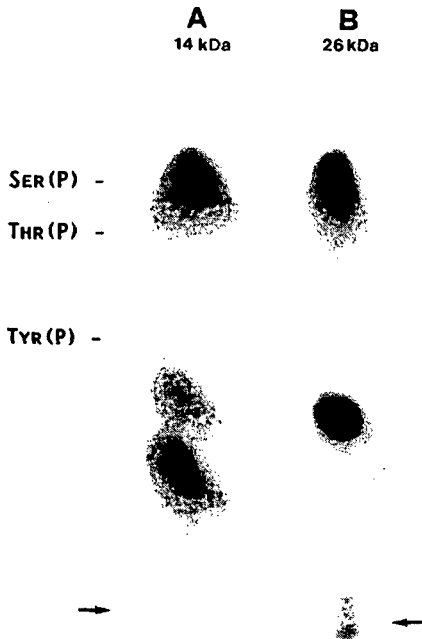


Fig.5.13. Identification de la sérine comme site de phosphorylation commun aux deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa

Les acides aminés phosphorylés, issus de l'hydrolyse acide des phosphoprotéines de 14 kDa(A) et 26 kDa(B) constitutifs des membranes internes, ont été séparés par électrophorèse sur plaques de cellulose en présence des marqueurs suivants: phosphosérine (Ser(P)), phosphothréonine (Thr(P)), phosphotyrosine (Tyr(P))(voir "Matériels et méthodes"). Les dérivés aminés radioactifs ont été visualisés par autoradiographie et identifiés par coloration des marqueurs avec de la ninhydrine. Les spots originels, déposés manuellement sur la plaque cellulose, sont indiqués par des flèches.

A. Petite sous-unité de la RubisCO

(1) MQVWPLGLKKFETLSYLPPLTTEQLLAEVNYLLVKGWIPPLEFEVKDGF
(51) VYREHDKSPGYDGRYWTMWKLPMPGGTDPAQVVNEVEEVKKAYPDAFVR
(101) FIGFDNKREVQCISFIAYKPAGY

B. "Chlorophyll a/b binding protein"

(1) MRKTAGKPKTVQSSSPWYGPDRVKYLGPFSGESPSYLTGFEFPGDYGWDTA
(51) GLSADPETFAKNRELEVIHCRWAMLGALGCVFPELLARNGVKFG~~E~~AVWFK
(101) AGSQIFSEGLDYLGNPSLVHAQSILAIWACQVILMGAVEGVRIAGGPLG
(151) EVVDPLYFGGSFOPPLGLADDPEAFAEELKVKEIKNGRLAMFSMFGFFVQAI
(201) VTGRGPLENLADHLADPNNNAWNFAATNFVPGK

Tableau 5.1. Séquences en acides aminés des polypeptides matures du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO

Afin de déterminer le(s) site(s) possible(s) de phosphorylation (sérine), nous avons reporté dans le tableau 5.1 les séquences en acides aminés (sans peptides de transit), déduites des gènes nucléaires codant pour la petite sous-unité de la RubisCO et pour le LHCII de l'Épinard (Martin, 1979 et Mason, 1989). On constate que treize sérines sont des sites de phosphorylation potentiels sur la molécule de LHCII, alors qu'on n'en dénombre que trois sur celle de SS. Une des trois sérines de la SS est située à peu près au centre de la molécule et les deux autres aux extrémités N- et C-terminales du polypeptide.

Vu le nombre réduit de sérines sur la SS (Tableau 5.1), nous avons confronté les séquences en acides aminés de la SS qui contiennent une sérine avec la structure complète du LHCII, dans le but de mettre en évidence des sites de phosphorylation hypothétiques qui seraient homologues aux deux protéines. Ces analyses comparatives ont été aimablement effectuées par le professeur E. Stutz (Université de Neuchâtel) à l'aide du logiciel GCG (Genetics Computer Group, Université du Wisconsin, Madison, USA). Comme consensus de base, nous avons choisi une séquence de sept ou huit acides aminés dans laquelle la sérine se trouve au centre, flanquée de trois ou quatre acides aminés placés en amont et en aval de la protéine (l'addition de la proline, par exemple, du côté C-terminal de la séquence n°1 de la SS ne permet pas au programme de reconnaître une séquence homologue sur le LHCII identique à celle présentée ci-dessous (voir Tableau 5.2, n°1)).

1.	SS	ETLSYLP	(ser16)
		:. III.	
	LHCII	...FSG ESPS YLTGEF...	(ser35)
2.	SS	EHDKSPGY	(ser58)
		:.II:I	
	LHCII	...LGPF SGESPS YLTG...	(ser56)
3.	SS	QCISFIAY	(ser115)
		.:I:::	
	LHCII	...GRL AMFSMFG FFVP...	(ser191)

Tableau 5.2. Comparaison hypothétique des sites de phosphorylation homologues entre SS et LHCII
L'homologie parfaite est symbolisée par le signe [.] un degré élevé de similarité par le signe [:] et un degré de similarité moindre par le signe [.]

L'analyse comparative de ces séquences par le logiciel GCG permet de définir des degrés d'homologie qu'on peut exprimer en pour cent d'identité (1. 57%, 2. 37.5% et 3. 12.5%) ou pour cent de similarité (1. 57%, 2. 62.5% et 3. 75%)(Tableau 5.2). Ce résultat montre que les pour cent d'identité sont soit égaux soit inversement proportionnels à ceux de similarité, mais toujours relativement bas, révélant ainsi de faibles degrés d'homologie entre les peptides analysés excepté toutefois pour la séquence numéro 1.

Pour tenter de mettre en évidence le site de phosphorylation, nous avons fait synthétiser deux peptides de 11 aa possédant une succession en acides aminés identiques à celles des régions N-terminales du LHCII et SS et disposant du pour cent d'identité le plus élevé (voir "Tableau 5.2, séquences 1" et "Tableau 5.1, en gras"). Les séquences propres à ces deux peptides de synthèse (P1 et P2) sont consignées dans le tableau 5.3. Elles ont été aimablement synthétisées et purifiées à notre intention par le Dr. G. Corradin (ISREC, Lausanne).

Peptide 1 (SS):	FETLS S YLPPLT
Peptide 2 (LHCII):	GESP S YLTGEF

Tableau 5.3. Peptides de synthèse mimant les sites de phosphorylation hypothétiques, proches de l'extrémité N-terminale du LHCII (P2) et de la petite sous-unité de la carboxylase (P1)

La stratégie choisie pour cette expérience est la même que celle décrite par Bennett et al. (1987), qui a permis de phosphoryler des peptides de synthèse analogues au LHCII par une fraction de thylacoïdes. Après l'incubation des deux peptides (P1 et P2) en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP et d'enveloppes, les polypeptides ont été séparés par SDS-PAGE 15-30%. L'autoradiographie du gel n'a cependant pas permis de mettre en évidence le moindre marquage dans les peptides P1 et P2 (résultats non présentés). Les mêmes résultats ont été obtenus en présence d'un détergent doux (10 mM octylglucoside; résultats non montrés). *Nous avons utilisé de l'octylglucoside, en espérant améliorer l'accessibilité des peptides aux sites catalytiques de la protéine-kinase, car ce détergent n'a pas d'effet inhibiteur sur le marquage des protéines d'enveloppes (Chapitre 7).*

Les deux peptides de synthèse ne subissant aucun marquage apparent, nous avons reporté sur la figure 5.14 les pour cent de phosphorylation des polypeptides de 67, 26 et 14 kDa en fonction des quantités croissantes de P1 et P2 ajoutées. On constate que les deux peptides ont un effet différent sur le marquage des trois phosphoprotéines majeures de l'enveloppe, puisque P1 a un effet inhibiteur sur la phosphorylation des trois phosphoprotéines, alors que P2 induit à de faibles concentrations (2 et 4 μg) une stimulation de 30% environ du marquage de la protéine de 26 kDa et de 10% environ du marquage de celle de 14 kDa (Fig.5.14). La signification de l'inhibition et de l'activation par les peptides P1 et P2 reste obscure mais mérite que l'on poursuive ce type d'investigation pour identifier le site de phosphorylation des protéines de 26 kDa (LHCII B) et de 14 kDa (SS) de l'enveloppe.

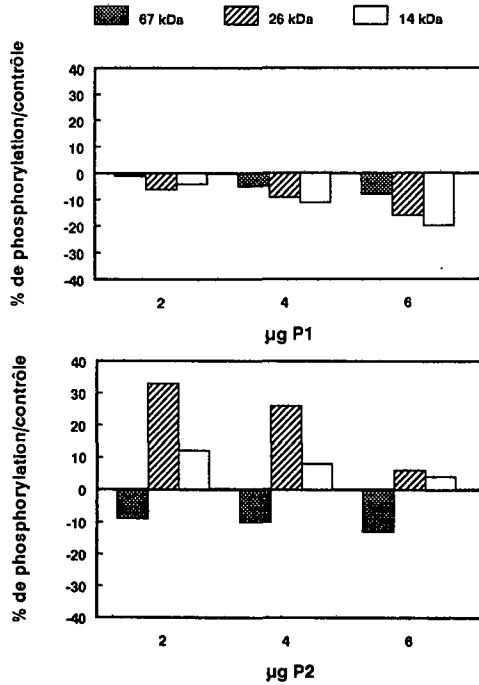


Fig.5.14. Phosphorylation des protéines de 67, 26 et 14 kDa de l'enveloppe en présence des peptides de synthèse P1 et P2

La phosphorylation des protéines a été effectuée dans des conditions standard, mais en présence de 10 mM octylglucoside, 0.01 mM ATP, 66.66 nM ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP et des quantités croissantes de peptides P1 et P2 (2,4 et 6 μg). L'incorporation du ^{32}P a été arrêtée par la précipitation des protéines au TCA, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Les protéines ont été analysées ensuite par SDS-PAGE, autoradiographie et comptage Cerenkov.

5.4. Discussion

Concernant la phosphoprotéine de 14 kDa de l'enveloppe, nos résultats montrent sans ambiguïté que cette protéine correspond à un pool de petite sous-unité de la RubisCO. En effet:

(a) une forme isoélectrique phosphorylée de la protéine de 14 kDa de l'enveloppe co-migre parfaitement sur gel 2D (IEF x SDS-PAGE) avec la petite sous-unité de la carboxylase (Fig.5.3); (b) la protéine phosphorylée de 14 kDa est immunoprécipitée par des IgG polyclonaux anti-RubisCO (Fig.5.4).

Ces deux observations attestent que les expériences préliminaires effectuées par Soll et Buchanan (1983) étaient correctes, puisque la phosphoprotéine de 14 kDa est effectivement un pool phosphorylé de petite sous-unité de la RubisCO lié à l'enveloppe. Toutefois, d'après nos résultats, ce pool de SS phosphorylé est localisé plutôt dans les membranes internes (Chapitre 3) que dans les membranes externes de l'enveloppe (Soll et Buchanan, 1983).

La présence de plusieurs formes isoélectriques de 14 kDa marquées au ^{32}P résulte certainement du degré variable de phosphorylation de la SS dans les membranes d'enveloppes (Figs 5.1, 5.2 et 5.3). Sobel (1991) et Lozano et al. (1990) ont montré que le niveau de phosphorylation élevé d'une protéine peut faire varier son point isoélectrique et même son poids moléculaire apparent.

Concernant la phosphoprotéine de 26 kDa de l'enveloppe, nos résultats montrent que cette protéine correspond probablement à l'apoprotéine b du LHCII (LHCIIb), considérée comme une sous-population mobile du LHCII localisée dans les membranes thylacoïdales non-accollées (Kyle et al., 1984; Larsson et al., 1987). Cette affirmation repose sur les observations suivantes: (a) les deux protéines exhibent des Mr très proches (Fig.5.5); (b) la phosphoprotéine de 26 kDa migre de façon identique à l'apoprotéine b du LHCII (LHCIIb), quand des protéines thylacoïdales sont utilisées comme marqueurs pour localiser LHCIIa et LHCIIb dans un gel 2D (Figs 5.10 et 5.12). Ainsi, la coloration au bleu de Coomassie, le marquage radioactif aussi bien que la détection immunologique attestent de la correspondance existant entre le LHCIIb et la phosphoprotéine de 26 kDa. Il est toutefois regrettable que l'immunoprécipitation de cette protéine avec différents anticorps α -LHCII n'ait pas abouti.

Bien que la phosphoprotéine de 26 kDa originaire des membranes d'enveloppes et thylacoïdales (LHCIIb) exhibe les mêmes propriétés électrophorétiques dans un gel 2D, il est remarquable qu'un traitement à la protéase V_8 , à la papaïne ou au CNBr, livre une cartographie des phosphopeptides complètement différente (Figs 5.7, 5.8 et 5.9). Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'on sait que la protéine de 26 kDa est phosphorylée dans l'enveloppe exclusivement sur des résidus sérine (Fig.5.13), alors que la phosphorylation de l'apoprotéine b du LHCII s'effectue, dans les thylacoïdes, principalement sur une thréonine (Michel et al., 1991; Bennett, 1991). Ces différences dans la cartographie des peptides phosphorylés et dans la nature des acides aminés phosphorylés sont probablement dues à des états conformationnels du substrat (LHCIIb) qui varient suivant la membrane hôte (enveloppe ou thylacoïde) et/ou à la nature des

protéine-kinases "spécifiques" qui sont présentes dans l'enveloppe ou les thylacoïdes. On peut donc s'attendre à ce que le LHCIIb présent dans l'enveloppe possède une structure tridimensionnelle plus "linéaire" que celle qui est adoptée par la forme "mature" du thylacoïde (Allen, 1992), ouvrant ainsi des sites de phosphorylation originaux. D'autre part, nos résultats, associés à d'autres études, suggèrent que la kinase thylacoïdale du LHCII n'est pas la même que celle présente dans les enveloppes. Premièrement, la kinase du LHCII (64 kDa) n'a été isolée et caractérisée qu'à partir de membranes thylacoïdales (Coughlan et Hind, 1986 et 1987). Deuxièmement, cette kinase, stimulée *in situ* par la lumière, semble tout à fait indépendante du Ca^{2+} (Allen, 1992), alors que la kinase qui catalyse l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 26 kDa de l'enveloppe fonctionne bien à l'obscurité et est strictement dépendante du Ca^{2+} (Chapitre 3). Troisièmement, la protéine-kinase de l'enveloppe phosphorylerait seulement LHCIIb et non LHCIIa (Figs 5.10 et 5.12), ce qui n'est pas le cas de la kinase thylacoïdale qui utilise les deux formes de LHCII comme substrat (Coughlan et Hind, 1987).

Bien que nous n'ayons pu confondre la sérine 16 et 35 comme le site de phosphorylation de la SS et du LHCII dans les membranes d'enveloppes, nous espérons néanmoins découvrir rapidement la position de la sérine qui incorpore le phosphate dans les phosphoprotéines de 26 et 14 kDa. Des expériences, utilisant d'autres peptides de synthèse mimant les séquences en acides aminés de la SS contenant les sérines 58 et 115, sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

Comme des pools de SS et de LHCII semblent subir une phosphorylation spécifique dans les membranes internes de l'enveloppe, on peut se demander quel est le rôle physiologique d'une telle activité protéine-kinasique. La petite sous-unité de la RubisCO et l'apoprotéine b du LHCII sont des protéines codées par le génome nucléaire, traduites dans le cytosol, puis transloquées à travers les membranes d'enveloppes (Smeekens et al., 1990). Leur phosphorylation respective pourrait être une étape obligatoire, leur permettant de passer à travers l'enveloppe, car ces deux protéines semblent suivre les mêmes voies d'import. En effet, Perry et al. (1991) ont montré récemment que des peptides synthétiques, originaires de la région centrale du peptide de transit du précurseur de la petite sous-unités de la carboxylase, inhibent de manière identique la fixation et le transport de la SS et du LHCII à travers le chloroplaste. De plus, si on remplace sur une protéine chimère, le peptide de transit du LHCII par celui de la SS, la molécule de LHCII est importée dans le chloroplaste et intégrée dans les thylacoïdes avec la même efficacité (Lamppa, 1988).

Cette hypothèse, indiquant que la phosphorylation de protéines en cours d'import dans le chloroplaste serait une étape obligatoire pour leur permettre de traverser l'enveloppe, semble confirmée par plusieurs autres résultats:

(a) la plupart des protéines importées dans le chloroplaste et analysées jusqu'à maintenant sont synthétisées sous forme de précurseurs de tailles plus élevées, possédant une extension amino-terminale supplémentaire appelée peptide de transit. Ces peptides de transit sont indispensables, d'abord pour cibler les protéines importées vers les organites spécifiques (i.e. le chloroplaste), puis pour favoriser leur translocation à travers la membrane de l'enveloppe (Keegstra, 1989; Flügge, 1990). Le clivage du peptide de transit est réalisé par une endopeptidase stromatique non-spécifique qui opère aussi bien sur les protéines thylacoïdales que stromatiques (Robinson et Ellis, 1984; Abad et al., 1989; Musgrove et al., 1989). D'après nos résultats, la maturation des précurseurs du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO devrait intervenir avant leur phosphorylation, puisque seules les protéines ayant perdu leur peptide de transit sont phosphorylées dans les membranes d'enveloppes. *Par ailleurs, on notera que des précurseurs phosphorylés (21 kDa pour la petite sous-unité de la RubisCO, Chua et Schmidt, 1978 et 31 kDa pour le LHCII, Schmidt et al., 1981) n'ont jamais été détectés à ce jour sur des autoradiogrammes de protéines d'enveloppes séparées par SDS-PAGE (Soll et Bennett, 1988; Soll et al., 1989; Chapitre 3).*

(b) L'import de protéines dans le chloroplaste nécessite seulement de l'ATP et n'implique pas de potentiel membranaire à travers l'enveloppe (Flügge et Hinz, 1986; Flügge, 1990). Le site précis où s'effectue la consommation d'ATP n'est cependant pas encore défini et reste très controversé (Flügge, 1990; de Boer and Weissbeek, 1991). Toutefois, il est maintenant admis que seules de fortes concentrations en ATP intrachloroplastique permettent la translocation effective des protéines (Theg et al., 1989), de faibles concentrations en ATP ne favorisant que la fixation des protéines précurseurs sur l'enveloppe (Olsen et Keegstra, 1992). Comme de fortes concentrations en ATP (Chapitres 3 et 8) stimulent la phosphorylation de la protéine de 26 kDa (apoprotéine b du LHCII?) et de celle de 14 kDa (petite sous-unité de la RubisCO), il est très probable que cette intense activité phosphorylante se produit uniquement dans des chloroplastes énergétisés (voir "Chapitre 6"), et est en corrélation avec l'import des protéines.

(c) Comme en témoignent des séparations de phases au Triton X-114, les formes phosphorylées de la petite sous-unité de la RubisCO (14 kDa) et du LHCII (26 kDa?) manifestent un comportement fortement hydrophobe (Chapitre 3). On sait pourtant que le pool principal de petites sous-unités de la RubisCO, originaire de membranes d'enveloppes non-phosphorylées, possède un caractère beaucoup plus hydrophile, à l'instar des deux sous-unités de l'holoenzyme de la RubisCO du stroma (Siegenthaler et Dumont, 1990; Dumont, 1991). Par contre, ces deux sous-unités de la carboxylase présentent un comportement beaucoup plus hydrophobe après un traitement dénaturant à 100°C pendant quelques minutes (Dumont, 1991). Ce résultat sous-entend qu'il existe au moins deux pools de petites sous-unités de la RubisCO dans les enveloppes du chloroplaste: un premier, non-phosphorylé, hydrophile et dérivant directement de l'holoenzyme de la RubisCO (Pineau et al., 1979, Dumont, 1991) et un second, phosphorylé, hydrophobe, résultant de la SS en cours d'import. En conséquence, le premier pool de SS serait dans un état globulaire (dû à son origine holoenzymatique) et le second dans un état plutôt linéaire, car des protéines en cours de translocation n'adoptent pas encore de structures secondaires ou tertiaires élaborées (Glick et Schatz, 1991; Rassow et al., 1990). Ainsi, l'état aglobulaire de la SS phosphorylée (probablement aussi celui du LHCII) est vraisemblablement indispensable pour se fixer sur des chaperonines (Ellis et Hemmingsen, 1989; Gatenby et Ellis, 1990; Chapitre 8) ou HSP70 chloroplastiques (Bovet et al., 1990; Marshall et al., 1990; Ko et al., 1992; Chapitre 8) afin de lui permettre une maturation stérique et un assemblage oligomérique futurs corrects (Lubben et al., 1989; Ellis et van der Vies, 1991).

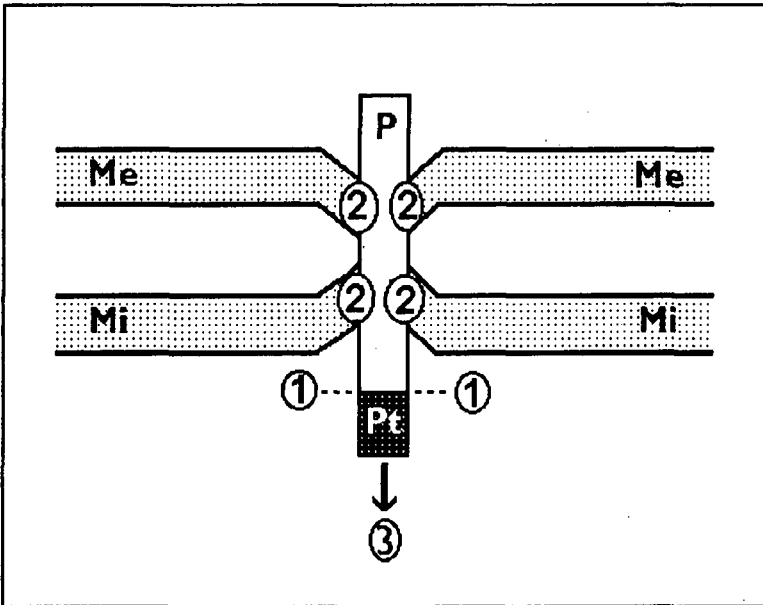


Fig.5.15. Représentation schématique et hypothétique illustrant les étapes ultimes permettant la translocation de la petite sous-unité de la RubisCO (ou LHCII) à travers un site de contact de l'enveloppe

1: Clivage du peptide de transit 2: Phosphorylation 3: Internalisation (Me= Membrane externe; Mi= Membrane interne; p= Protéine; Pt= Peptide de transit).

La séquence d'événements impliqués dans la translocation de la SS (ou LHCII) à travers l'enveloppe, principalement les étapes de phosphorylation, est schématiquement illustrée sur la figure 5.15. Après la fixation des protéines précurseurs sur l'enveloppe (Waegemann et Soll, 1991), nous proposons que la phosphorylation n'intervient qu'après l'ablation du peptide de transit. Cette étape est apparemment indispensable à l'internalisation des deux protéines dans le chloroplaste. Pour que le mécanisme soit opérant, il faut donc que la protéine-kinase soit localisée au site de contact.

L'essentiel des résultats présentés dans ce chapitre est consigné dans une publication à paraître (Bovet et Siegenthaler, 1993).

5.5. Bibliographie

- Abad, M.S., Clark, S.E., Lamppa, G. (1989) Properties of a chloroplast enzyme that cleaves the chlorophyll a/b binding protein precursor. *Plant Physiol.* 90: 117-124.
- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Bennett, J. (1984) Chloroplast protein phosphorylation and the regulation of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 60: 583-590.
- Bennett, J. (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Physiol* 42: 281-311.
- Bennett, J., Shaw, E.K., Bakr, S. (1987) Phosphorylation of thylakoid proteins and synthetic peptide analogs. *FEBS Lett.* 210: 22-28.
- Bovet, L., Dumont, N., Siegenthaler, P.A. (1990) Possible presence of a 75 kDa heat shock polypeptide in the stroma of spinach chloroplast. *Experientia* 46: A85.
- Bovet, L., Siegenthaler, P.A. (1993) Are the 26 and 14 kDa phosphoproteins found in the inner envelope membranes of spinach chloroplast distinct membrane-bound pools of LHCII and of RubisCO small subunit? *Soumis à Planta.*
- Chua, N.M., Schmidt, G.W. (1978) Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 75: 6110-6114.
- Coughlan, S.J., Hind, G. (1986) Purification and characterization of a membrane-bound protein kinase from spinach thylakoids. *J. Biol. Chem.* 261: 11378-11385.
- Coughlan, S.J., Hind, G. (1987) Phosphorylation of thylakoid proteins by a purified kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 8402-8408.
- Darr, S.C., Somerville, S.C., Arntzen, C.J. (1986) Monoclonal antibodies to the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II. *J. Cell Biol.* 103: 733-740.
- De Boer, A.D., Weissbeek, P.J. (1991) Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 221-253.
- Demmin, D.S., Stockinger, E.J., Chang, Y.C., Walling, L.L. (1989) Phylogenetic relationships between the chlorophyll a/b binding protein (CAB) multigena family: an intra- and interspecific study. *J. Mol. Evol.* 29: 266-279.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radioactives associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'Épinard après protéosynthèse *in organello* en présence de ³⁵S-méthionine, Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Ellis, R.J., Hemmingsen, S.M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of macromolecular structures. *TIBS* 14: 339-342.
- Ellis, R.J., Van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Flügge, U.-I. (1990) On the translocation of proteins across the chloroplast envelope. *J. Bioenerg. Biomem.* 22: 789-787.
- Flügge, U.I., Hinz, G. (1986) Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 160: 563-570.

- Foyer, H.C. (1985) Stromal protein phosphorylation in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 231: 97-103.
- Gatenby, A.A., Ellis, R.J. (1990) Chaperone function: the assembly of ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 125-149.
- Glick, B., Schatz, G. (1991) Import of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Genet.* 25: 21-44.
- Guitton, C., Mache, R. (1987) Phosphorylation in vitro of the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 166: 249-254.
- Hinz, G., Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- Joyard, J., Grossman, A., Barlett, S.G., Douce, R., Chua, N.H. (1982) Characterization of envelope membrane polypeptides from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 257: 1095-1101.
- Keegstra, K. (1989) Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 58: 247-253.
- Ko, K., Bornemisza, O., Kourtz, L., Ko, Z.W., Plaxton, W.C., Cashmore, A.R. (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a cognate 70-kDa Heat Shock Protein of the chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.* 267: 2986-2993.
- Kyle, D.J., Kuang, T.Y., Watson, J., Arntzen, C.J. (1984) Movement of a subpopulation of LHCII from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 765: 89-96.
- Lamppa, G.K. (1988) The chlorophyll a/b-binding protein inserts into the thylakoids independent of its cognate transit peptide. *J. Biol. Chem.* 263: 14996-14999.
- Lersson, U.K., Sundby, C., and Andersson, B. (1987) Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII): polypeptide composition, phosphorylation pattern, end association with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 894: 59-68.
- Lozano, L., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T., Vives, J. (1990) Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur. J. Biochem.* 193: 469-477.
- Lubben, T.H., Donaldson, G.K., Viitanen, P.V., Gatenby, A.A. (1989) Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the groEL-related chloroplast molecular chaperone. *Plant Cell* 1: 1223-1230.
- Olsen, L.J., Keegstra, K. (1992) The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 267: 433-439.
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, K., Vierling, E. (1990) Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 374-378.
- Martin, P.G. (1979) *Aust. J. Plant Physiol.* 6: 401-408.
- Mason, J.G. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 5387-5387.
- Michel, H., Griffin, P.R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Bennett, J. (1991) Tandem mass spectrometry identifies sites of three post-translational modifications of spinach light-harvesting chlorophyll protein II. *J. Biol. Chem.* 266: 17584-17591.
- Musgrove, J.E., Elderfield, P.P., Robinson, C. (1989) Endopeptidases in the stroma and thylakoids of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 90: 1616-1621.

- Perry, S.E., Buvinger, W.E., Bennett, J., Keegstra, K. (1991) Synthetic analogues of a transit inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 11882-11889.
- Pineau, B., Lédoult, G., Maillefer, C., Lefort-Tran, M. (1979) Présence de sous-unités de la Rubpcase dans les enveloppes des chloroplastes d'épinard. *Plant Sci. Lett.* 25: 331-343.
- Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N., Neupert, W. (1990) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.* 275: 190-194.
- Rawlyer, A., Meylan, M., Siegenthaler, P.A. (1992) Galactolipid export from envelope to thylakoid membranes in intact chloroplasts. I. Characterization and involvement in thylakoid lipid asymmetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 331-341.
- Robinson, C., Ellis, J. (1984) Transport of proteins into chloroplasts: partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 142: 337-342.
- Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Haley, B.E., Hanson, K.R., McHale, N.A. (1990) Identification of the 64 kDa chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 93: 105-109.
- Schmidt, G.W., Børlett, S.G., Grossman, A.R., Cashmore, A.R., Chua, N.H. (1981) Biosynthetic pathways of two polypeptides subunits of the light-harvesting chlorophylli a/b protein complex. *J. Cell. Biol.* 91: 468-476.
- Siegenthaler, P.A., Bovet, L. (1993) A unique protein kinase activity is responsible for the phosphorylation of the 28 and 14 kDa proteins but not of the 67 kDa protein in the chloroplast envelope membranes of spinach. *Planta* 190: 231-240.
- Siegenthaler, P.A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, Thylakoid and stroma polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.
- Sobel, A. (1991) Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction. *TIBS* 16: 301-304.
- Soll, J., Bennett, J. (1988) Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and the inner envelopes of pea chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 301-307.
- Soll, J., Buchenen, B.B. (1983) Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by an envelope-bound protein kinase in situ. *J. Biol. Chem.* 258: 6686-6689.
- Soll, J., Berger, V., Bennett, J. (1989) Adenylate effects on protein phosphorylation in the interenvelope lumen of pea chloroplasts. *Planta* 177: 393-400.
- Smeekens, S., Weisbeek, P., Robinson, C. (1990) Protein transport into and within chloroplasts. *TIBS* 15: 73-78.
- Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 6730-6738.
- Waegmann, K., Soll, J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1: 149-158.

CHAPITRE 6

Etude sur la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard

6.1. Introduction

La phosphorylation des protéines est un mécanisme métabolique ubiquitaire, présent à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Elle permet à ces organismes de moduler l'expression des gènes, de réguler des activités post-translationnelles, ainsi que de contrôler des réponses aux changements du milieu extérieur (Edelman et al., 1987; Bennett, 1991). Chez les plantes supérieures, un des problèmes fondamentaux est de mieux comprendre les relations existant entre le chloroplaste et le reste de la cellule. Les fortes activités protéine-kinasiques, mesurées dans l'enveloppe du chloroplaste, témoignent de l'importance de la phosphorylation des protéines dans la physiologie du chloroplaste (Laing et Christeller, 1984; Soll, 1985; Chapitre 3). Au vu des résultats obtenus par différents groupes de chercheurs, trois activités de phosphorylation bien distinctes ont été identifiées jusqu'à maintenant:

(a) Une activité phosphoglucomutase localisée dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe (Salvucci et al., 1990; Soll et Bennett, 1988; Chapitre 4).

(b) Une activité protéine-kinasique menant à la phosphorylation de pools de LHClI(?) et de SS dans la membrane interne de l'enveloppe (voir "Chapitre 5"; Soll et Buchanan, 1983).

(c) Une activité protéine-kinasique impliquant une protéine de 51 kDa, confondue dans la translocation des protéines à travers l'enveloppe du chloroplaste (Hinz et Flügge, 1988).

Hinz (1988) a montré que la phosphorylation d'une protéine de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard, de Mr 51 kDa, est inversement proportionnelle à l'import de la petite sous-unité de la RubisCO dans le chloroplaste. Ce résultat atteste qu'une protéine de l'enveloppe, constitutive de l'appareil permettant l'import des protéines d'origine nucléocytoplasmique, est la cible d'une protéine-kinase de l'enveloppe. Selon Hinz et Flügge (1988), la phosphoprotéine de 51 kDa serait non seulement un composé

régulateur de l'import des protéines, mais aussi un élément du récepteur permettant de fixer les précurseurs protéiques sur l'enveloppe. Nous tenterons de montrer dans ce chapitre que la phosphoprotéine de 51 kDa identifiée par Hinz et Flüggé (1988) est la même que celle que nous avons mise en évidence dans les enveloppes (Chapitre 3). Elle est probablement aussi équivalente à celle de 52 kDa des membranes internes et externes d'enveloppes, marquée par le peptide de transit de la petite sous-unité de la RubisCO rendu photoactivable par dérivation (Kaderbhai et al., 1988), ainsi qu'à celle de 52 kDa, récemment purifiée dans les mitochondries du foie de rat (Ono et Tuboi, 1991).

6.2. But du chapitre

Dans ce chapitre, nous nous proposons de caractériser la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe, mentionnée dans le chapitre 3 et d'établir une correspondance éventuelle entre cette protéine et celle identifiée par Hinz et Flüggé (1988).

Nous élèverons des anticorps polyclonaux contre cette protéine afin de déterminer avec précision sa localisation dans les membranes d'enveloppes. Puis nous la purifierons par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps comme ligand.

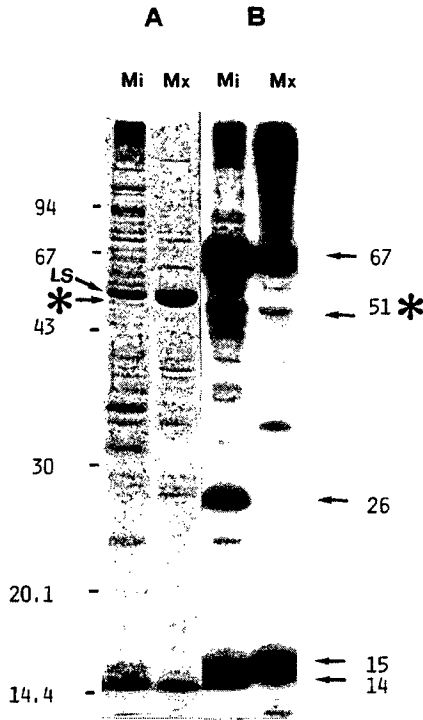
D'autre part, nous déterminerons la nature de l'acide(s) aminé(s) accepteur(s) de phosphate sur la protéine de 51 kDa de l'enveloppe.

Finalement, nous séparerons par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) la phosphoprotéine de 51 kDa, issue de la phosphorylation *in organello* de chloroplastes intacts en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, d'après la technique mise au point par Hinz (1988).

6.3. Résultats

La figure 6.1B montre qu'une protéine d'environ 51 kDa (*) est phosphorylée à la fois dans des préparations de membranes internes et externes d'enveloppes (voir aussi "Chapitre 3"). L'incorporation du ^{32}P dans la bande de 51 kDa des membranes internes (DOI = 4.73) est environ 10 fois supérieure à celle mesurée dans les membranes externes (DOI = 0.495; analyse densitométrique du spot radioactif effectuée par Bioimage Millipore; DOI = Densité Optique Intégrée). Dans les membranes internes, cette radioactivité intense semble corrélée avec la présence d'une protéine relativement

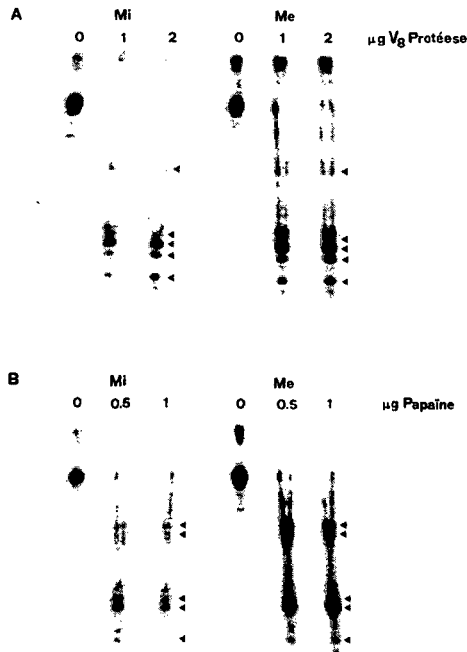
abondante puisque le spot radioactif superpose parfaitement une bande de même Mr colorée au bleu de Coomassie (Fig.6.1A,*). Cette protéine représente environ 2 % des protéines totales de l'enveloppe et 3 à 4 % de celles de la membrane interne (Analyse densitométrique des polypeptides colorés au bleu de Coomassie effectuée par Bioimage Millipore). Par contre, on ne voit pas de polypeptides colorés au bleu de Coomassie (Fig.6.1A, Mx) qui correspondent à la bande de 51 kDa phosphorylée dans les membranes externes (il est toutefois possible que ce ou ces polypeptides soient masqués par la LS).



Figs 6.1 A-B. Mise en évidence de la phosphoprotéine de 51 kDa dans les membranes internes et externes d'enveloppes

Les protéines des membranes internes (Mi) et externes (Mx) d'enveloppes (30 µg) ont été séparées par SDS-PAGE 13%, après une incubation *in vitro* en présence de ($\gamma^{32}P$)ATP (voir "Matériels et méthodes"). Le gel coloré au bleu de Coomassie est montré sur la gauche (A) et son autoradiographie correspondante sur la droite (B). Les flèches rappellent la position dans le gel des principaux polypeptides marqués dans ces deux fractions, ainsi que de la LS. La phosphoprotéine de 51 kDa est indiquée par une étoile.

Afin de déterminer si les deux phosphoprotéines de 51 kDa identifiées dans les membranes internes (Mi) et externes (Me) sont identiques, nous avons effectué une protéolyse partielle de ces deux protéines. Les figures 6.2A et 6.2B montrent les autoradiographies respectives des gels, après clivage en présence de la protéase V_8 de *Staphylococcus aureus* (V_8 protéase) et de papaïne. Ces analyses montrent clairement que ces deux protéines présentent de grandes similitudes, car plusieurs peptides phosphorylés (◄) co-migrent, indépendamment du type de protéase utilisé (*les phosphopeptides qui dérivent de la phosphoprotéine de 51 kDa de la membrane externe semblent exhiber une radioactivité plus soutenue que ceux de la membrane interne; cette observation n'est pas en opposition avec les résultats décrits sur la figure 6.1, mais résulte simplement d'une prolongation du temps d'exposition du film autoradiographique pour les fragments de la protéine de 51 kDa de Mx*).



Figs 6.2 A-B. Autoradiographie des gels obtenus après une protéolyse de la protéine de 51 kDa, phosphorylée dans les membranes internes (Mi) et externes (Me) d'enveloppes. Les enzymes utilisées pour la protéolyse partielle sont la protéase V_8 de *Staphylococcus aureus* (A) et la papaïne (B) (voir "Matériels et méthodes"). Le position dans le gel des peptides marqués au ^{32}P est indiqué par ◄.

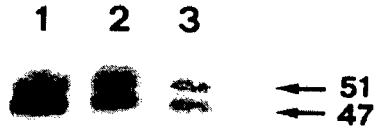
L'abondance relative de la protéine de 51 kDa dans les membranes internes d'enveloppes (3 à 4 % des protéines totales, voir ci-dessus) nous a permis d'élever des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre elle. L'antisérum a été préparé, comme indiqué dans "Matériels et méthodes", après trois injections successives de la protéine dans les flans d'un lapin. La figure 6.3A montre clairement que ces anticorps polyclonaux anti-51 kDa (dilution du sérum: 1/200) réagissent vigoureusement avec la protéine injectée (Mi), alors qu'ils ne reconnaissent aucune protéine de Mr identique dans les membranes externes d'enveloppes (Mx), le stroma (S) et les thylacoïdes (T). Cette protéine de 51 kDa n'est que faiblement reconnue par l'anticorps dans des membranes d'enveloppes totales (E), car la protéine est parfois masquée sur le papier de nitrocellulose par la grande sous-unité de la RubisCO. Une autre protéine de la membrane interne (Mi), mais de plus grande mobilité électrophorétique (47 kDa), est aussi très bien reconnue par l'anticorps. Cette protéine de 47 kDa est également présente dans les membranes d'enveloppes totales (E). Un dernier polypeptide de 60 kDa, présent dans le stroma (S) et les membranes externes (Mx), réagit aussi faiblement avec cet anticorps.

Une analyse par immunoblot des protéines de la membrane interne de l'enveloppe, traitées préalablement au Triton X-114, montre que les protéines de 51 et 47 kDa, reconnues par l'anticorps dirigé contre la protéine de 51 kDa (dilution du sérum: 1/200), s'associent de préférence avec la phase détergente (Fig.6.3B, colonne 2). Deux extractions au Triton X-114 ne sont pas suffisantes pour extraire un petit pool hydrophile de protéines de 51 et 47 kDa qui restent encore dans la phase aqueuse (Fig.6.3B, colonne 3). A gauche, des membranes internes non traitées ont simplement été ajoutées comme contrôle immunologique (Fig.6.3B, colonne 1). Par contre, on constate que les protéines de 51 et 47 kDa ne sont pas révélées par l'antisérum dans une préparation de membranes externes traitées préalablement au Triton X-114 (phase détergente et aqueuse; résultats non présentés), confirmant ainsi que cette protéine est très peu abondante dans des vésicules d'enveloppes enrichies en membranes externes (Fig.6.1).

A



B

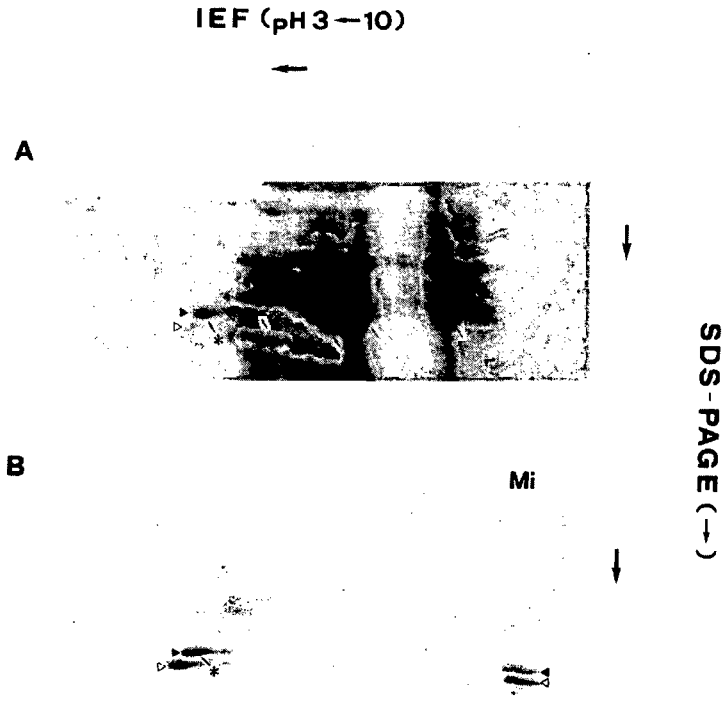


Figs 6.3 A-B. Révélation par le sérum anti-51 kDa de protéines chloroplastiques (A) et de membranes internes d'enveloppes traitées au Triton X-114 (B)

Des polypeptides (30 µg) constitutifs des cinq fractions majeures du chloroplaste (E: enveloppes, Mi et Mx: membranes internes et externes d'enveloppes, S: stroma, T: thylacoïdes) ont été révélés, par immunoblot, en présence d'anticorps dirigés contre la protéine de 51 kDa des membranes internes (A). Des protéines de la membrane interne de l'enveloppe (100 µg), traitées au Triton X-114 comme décrit dans "Matériels et méthodes" (1: échantillon contrôle non-traité (30 µg), 2: phase détergente, 3: phase aqueuse), ont été analysées par immunoblot en présence du sérum anti-51 kDa (B).

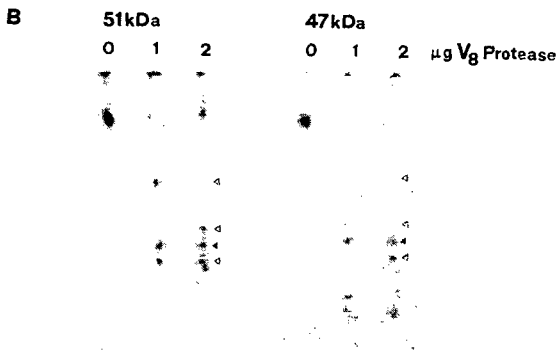
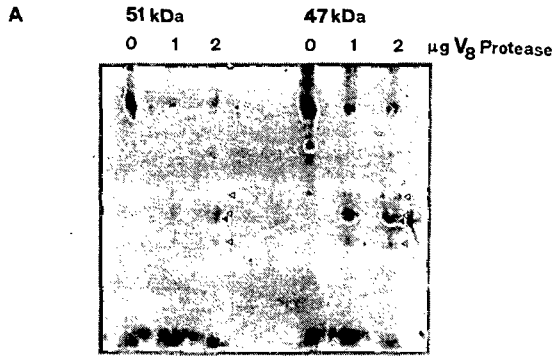
La figure 6.4A montre une partie des empreintes autoradiographiques des protéines marquées au ^{32}P dans la membrane interne de l'enveloppe, après séparation par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE). Avant d'être autoradiographié, le gel a été révélé par immunoblot en présence d'une dilution 1/200 d'anticorps anti-51 kDa (Fig.6.4B). On constate que la protéine phosphorylée de 51 kDa (Fig.6.4A,*) possède exactement les mêmes pI et M_r que celles reconnues par l'anticorps (Fig.6.4B,*). L'examen des figures 6.4A et 6.4B met à jour encore deux autres éléments intéressants: (a) la migration dans le gel IEF (étalement faiblement radioactif) d'un petit

pool de protéines phosphorylées de 51 kDa vers des pH plus basiques (Fig.6.4A, voir "petites flèches"); (b) l'incorporation du ^{32}P dans une protéine de 47 kDa reconnue également par l'anticorps anti-51 et qui possède un pI légèrement plus acide que celle de 51 kDa (▷).



Figs 6.4 A-B. Séparation par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) de protéines phosphorylées dans la membrane interne de l'enveloppe et localisation par immunoblot des protéines de 51 et 47 kDa. La figure A montre l'auto-radiographie d'un gel 2D et la figure B l'immunoblot correspondant, révélé en présence de l'anticorps α -51 kDa. Avant d'être transférées sur papier de nitrocellulose, les protéines de la membrane interne de l'enveloppe (80 μg) ont été phosphorylées dans des conditions standard, mais en présence de 0.01 mM MgATP, puis séparées par SDS-PAGE. Des protéines de membranes internes froides (Mi; 30 μg) ont été séparées comme contrôle par SDS-PAGE uniquement. La position dans le gel des phosphoprotéines de 51 kDa et 47 kDa est indiquée respectivement par ▷ et ◀. Le point isoélectrique apparent de la phosphoprotéine de 51 kDa est d'environ 5.8 (*).

Suite à plusieurs séparations bidimensionnelles de protéines d'enveloppes et de membranes internes (n=5), nous avons pu assigner à la protéine de 51 kDa un point isoélectrique acide d'environ 5.8 (pI = 5,8 \pm 0,3; Fig.6.4,*).



Figs 6.5 A-8. Protéolyse partielle des phosphoprotéines de 51 et 47 kDa à l'aide de la protéase V₈ de *Staphylococcus aureus* et révélation des digestats par immunoblot. Après digestion *in situ* (voir "Matériels et méthodes"), les protéines de 51 et 47 kDa, marquées préalablement au ³²P dans une préparation de membranes internes, ont été révélées par immunoblot en présence du sérum anti-51 kDa (dilution 1/200; A). L'autoradiographie correspondant à l'immunoblot est présentée sur la figure B.

Comme les deux phosphoprotéines de 51 et 47 kDa sont reconnues par le même anticorps et, semble-t-il, phosphorylées par une même protéine-kinase (voir "discussion du Chapitre 3"), nous les avons comparées à l'aide d'un traitement à la protéase V₈ de *staphylococcus aureus*. Après leur phosphorylation *in vitro* dans une préparation de membranes internes, les deux protéines ont été excisées dans un gel-SDS coloré au bleu de Coomassie, puis digérées dans un second gel-SDS. La comparaison des peptides immunogènes (après Westernblot en présence d'anticorps

anti-51 kDa, Fig.6.5A, ◀), des phosphopeptides (Fig.6.5B, ◀) et des peptides colorés au bleu de Coomassie (résultats non présentés), indique sans ambiguïté que les deux phosphoprotéines de 51 et 47 kDa sont d'origine génétique proche. On notera qu'un peptide commun aux deux phosphoprotéines, et d'environ 27 kDa, embrasse à la fois un site antigénique et un site de phosphorylation (Figs 6.5A et 6.5B, ◀).

L'acide aminé phosphorylé sur la protéine de 51 kDa a également été déterminé. La figure 6.6 montre que l'incubation de membranes internes d'enveloppes avec du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP stimule exclusivement la phosphorylation de la protéine de 51 kDa sur des résidus sérines. Le composé phosphorylé qui ne migre quasiment pas sur la plaque de cellulose correspond certainement à un peptide partiellement hydrolysé, originaire de la phosphoprotéine de 51 kDa.

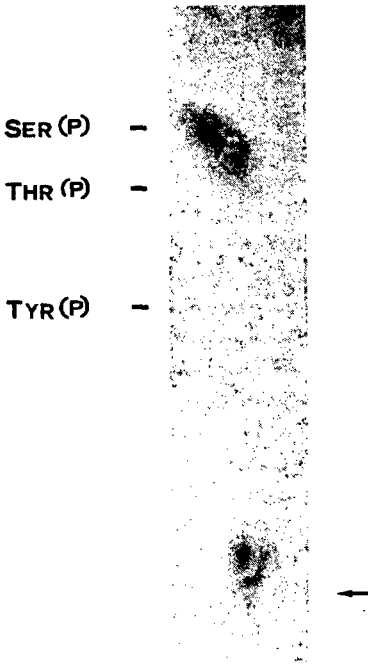


Fig.6.6. Identification de la sérine comme site de phosphorylation de la phosphoprotéine de 51 kDa. L'acide aminé marqué au ^{32}P et issu de l'hydrolyse acide de la phosphoprotéine de 51 kDa constitutive des membranes internes a été identifié par électrophorèse sur plaques de cellulose en présence des marqueurs suivants: phosphosérine (Ser(P)), phosphothréonine (Thr(P)), phosphotyrosine (Tyr(P)); voir "Matériels et méthodes". Le spot original, déposé manuellement sur la plaque de cellulose, est indiqué par une flèche sur l'autoradiographie.

L'incubation de membranes internes d'enveloppes avec des quantités croissantes d'anticorps anti-51 kDa, avant l'adjonction d'ATP radioactif, ne modifie en rien l'intensité du marquage dans la phosphoprotéine de 51 kDa (Fig.6.7). Les IgGs préimmuns, collectés avant l'injection des lapins, n'ont également aucun effet sur sa phosphorylation (Fig.6.7). En outre, on constate que les incorporations de ^{32}P dans les autres protéines majeures de la membrane interne (67, 47, 26 et 14 kDa) ne subissent aucun changement significatif en présence d'IgGs anti-51 kDa ou préimmuns (B. L'Eplattenier, 1991). Tous ces résultats sont également valables lorsqu'on phosphoryle des membranes d'enveloppes totales dans des conditions similaires (B. L'Eplattenier, 1991).

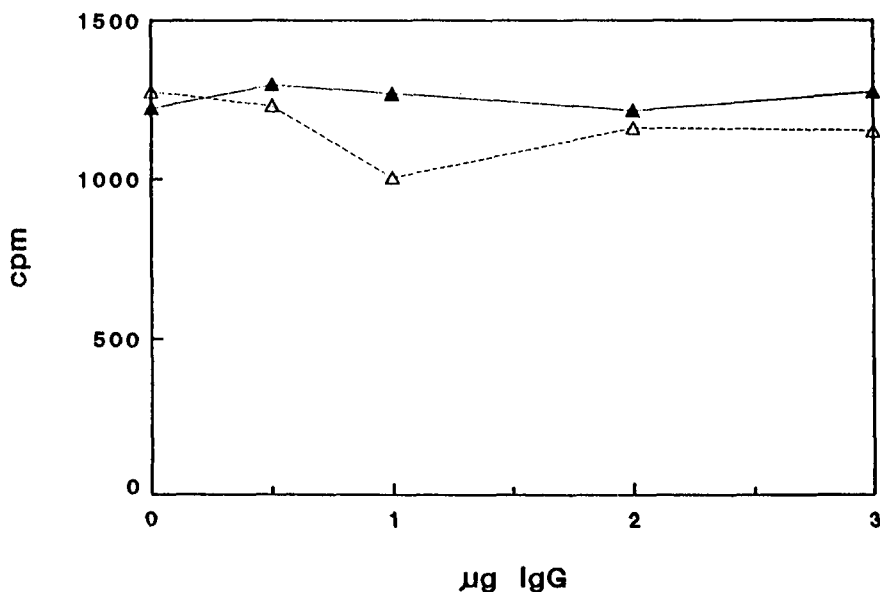


Fig.6.7. Phosphorylation *in vitro* de la protéine de 51 kDa, dans un extrait de membranes internes d'enveloppes en présence de quantités croissantes d'IgG anti-51 kDa

La phosphorylation de membranes internes d'enveloppes (30 µg) a été effectuée dans des conditions standard, après 20 min de préincubation en présence de concentrations croissantes en IgGs préimmuns (Δ) et anti-51 kDa (▲). Les IgGs ont été préalablement purifiés à partir du sérum brut par colonne d'agarose-protéine A, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". L'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 51 kDa (cpm) a été estimée par comptage Cerenkov après excision de la bande de gel.

Afin de déterminer si la protéine de 51 kDa que nous avons identifiée peut être phosphorylée par de l'ATP d'origine extrachloroplastique, nous avons incubé des chloroplastes intacts en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, avant d'en extraire les enveloppes (E), le stroma (S) et les thylacoïdes (T) (voir "Matériels et méthodes"). La révélation des trois fractions chloroplastiques, par l'anticorps anti-51 kDa (Fig.6.8A) corrobore parfaitement celle obtenue précédemment (Fig.6.3A), puisque les protéines de 51 et 47 kDa sont présentes dans l'enveloppe (E), et la protéine d'environ 60 kDa dans le stroma. Toutefois, on remarque ici que les protéines de 51 et 47 kDa sont aussi faiblement révélées par l'anticorps dans la fraction thylacoïdale (T; Fig.6.8A), attestant, dans ce cas, une contamination d'enveloppes dans les thylacoïdes. Cette contamination n'est pas surprenante puisque les thylacoïdes n'ont pas été, dans ce cas-là, purifiés sur gradient de Percoll après la lyse des chloroplastes phosphorylés (Rawlyer et al., 1992). L'autoradiographie de l'immunoblot montre que seule la protéine de 51 kDa de l'enveloppe (E) incorpore fortement le ^{32}P (Fig.6.8B). Par conséquent, cette phosphoprotéine marque aussi légèrement les thylacoïdes (T), puisqu'elle les contamine. L'absence totale de phosphorylation dans les protéines du LHClI atteste de la bonne intégrité des chloroplastes. On peut donc affirmer que le passage du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP à travers l'enveloppe, durant les 10 min d'incubation, est insignifiant; ce résultat est en accord avec ceux publiés par Robinson et Wiskich (1977) qui ont démontré la très faible activité du translocateur d'ATP dans l'enveloppe du chloroplaste mature.

Une autre protéine de 39 kDa est également légèrement marquée radioactivement dans les enveloppes issues de chloroplastes phosphorylés *in organello* (Fig.6.8B, colonne E). Comme elle n'incorpore pas ou peu de ^{32}P dans des préparations de membranes internes ou externes marquées *in vitro* (Fig.6.1), ce résultat dévoile que sa phosphorylation n'est possible que dans des membranes d'enveloppes bien orientées ("right side out"). Lorsqu'on double les temps d'autoradiographie, la phosphoglucomutase de 67 kDa apparaît légèrement phosphorylée dans la fraction du stroma (résultats non présentés). C'est assurément la présence d'ATP froid (1 mM) dans le milieu d'incubation qui empêche cette protéine de se marquer davantage (voir "Chapitre 3"). Il est remarquable de constater que les deux phosphoprotéines de 26 et 14 kDa, ainsi que celle de 47 kDa, (Chapitre 3) ne sont pas ou très peu (47 kDa) marquées *in organello*. On peut donc en déduire que la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa (47 kDa?) est dépendante d'un pool d'ATP intrachloroplastique. Ces résultats (Fig.6.8) sont en parfait accord avec ceux publiés précédemment par Hinz et Flügge (1988).

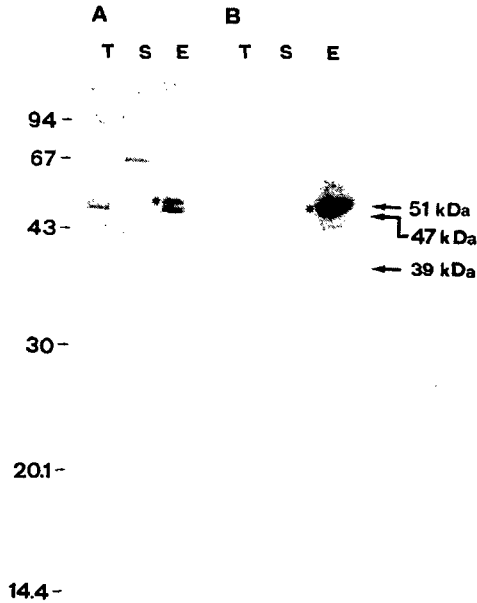
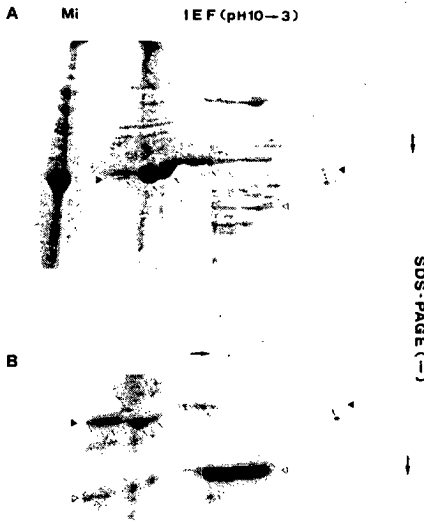


Fig.6.8. Révélation, à l'aide d'anticorps anti-51 kDa, des protéines de l'enveloppe, de stroma et du thylacoïde, isolées à partir de chloroplastes Intacts préalablement incubés avec du [γ^{32} P]ATP

La figure A montre la révélation par immunoblot (en présence d'une dilution 1/200 d'anticorps anti-51 kDa) de protéines (30 μ g) thylacoïdales (T), stromatiques (S) et d'enveloppes (E), préalablement séparées par SDS-PAGE 13%. L'autoradiographie de l'immunoblot est présentée sur la figure B. La protéine de 51 kDa est marquée d'un astérisque.

Un examen approfondi de l'autoradiographie présentée sur la figure 6.8 (mais avec un temps d'exposition réduit) montre que la bande radioactive de 51 kDa (Fig. 6.8B, colonne E) ne superpose cependant pas exactement celle reconnue par l'anticorps (Fig.6.8A, colonne E). En fait, les spots immunologiques et radioactifs apparaissent souvent légèrement décalés (< 1kDa) l'un par rapport à l'autre (Figs 6.8A et 6.8B). Afin d'élucider l'origine de ce décalage, nous avons séparé, par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE), des membranes d'enveloppes phosphorylées *in organello* (Fig.6.9). La figure 6.9B révèle que la phosphoprotéine de 51 kDa se répartit sur un grand domaine de pH lors de l'IEF (voir "► ◄ et petites flèches"). L'hyperphosphorylation, *in organello*, de la protéine de 51 kDa de l'enveloppe (Fig.6.8B) entraîne probablement un déplacement de celle-ci vers des pIs supérieurs à 5,8 (comparer avec la figure 6.4A). Ceci n'empêche toutefois pas que la forme isoélectrique

de pI 5,8 (*), qui est bien visible au bleu de Coomassie (Fig.6.9A) et qui est reconnue par l'anticorps anti-51 kDa (Fig.6.4B), soit aussi phosphorylée *in organello*, mais beaucoup plus faiblement qu'*in vitro* (Fig.6.4A). Le phénomène d'étalement d'une protéine sur un grand domaine de pH, en fonction de son degré de phosphorylation n'est pas un phénomène inconnu, puisque la stathmine, par exemple, qui est une phosphoprotéine animale cytoplasmique, existe souvent sous plusieurs formes isoélectriques différentes en fonction de son état de phosphorylation (Sobel, 1991). Ce degré variable de phosphorylation peut modifier à la fois le Mr et le pI de la stathmine et lui permettre de jouer un rôle de relais entre des messagers secondaires et différentes fonctions de prolifération-différentiation cellulaires. Sur la figure 6.9B, on retrouve la protéine phosphorylée d'environ 39 kDa (◄), déjà détectée sur la figure 6.8B et mentionnée par Hinz et Flügge (1988). Cette protéine est également bien visible au bleu de Coomassie (Fig.6.9A); ce qui atteste de sa relative abondance dans les membranes de l'enveloppe.



Figs 6.9 A-B. Séparation par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) de membranes d'enveloppes phosphorylées *in organello*

Des protéines d'enveloppes phosphorylées *in organello* (50 µg; voir "Matériels et méthodes") ont été dopées avec des membranes internes froides (50 µg), séparées par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE), colorées au bleu de Coomassie (A) et enfin autoradiographiées (B). Comme contrôle, des membranes internes froides (Mi) ont été séparées par SDS-PAGE uniquement. La position de la phosphoprotéine de 51 kDa, dans le gel 2D, est indiquée par ► ◀ et petites flèches. Le pool principal de la phosphoprotéine de 51 kDa (pI=5,8) est signalé par *. La position d'une phosphoprotéine de 39 kDa est indiquée par ► ◄.

L'incubation de chloroplastes intacts avec des quantités croissantes d'anticorps anti-51 kDa, avant l'adjonction d'ATP radioactif, ne modifie en rien l'intensité du marquage dans la phosphoprotéine de 51 kDa (B. L'Eplattenier, 1991), corroborant ainsi les résultats présentés sur la figure 6.7.

Nous avons également tenté de purifier la protéine de 51 kDa des membranes externes par chromatographie d'affinité, en utilisant les IgGs anti-51 kDa comme ligand (B. L'Eplattenier, 1991). La méthode utilisée et les résultats obtenus sont résumés comme suit:

Les IgGs anti-51 kDa ont été préalablement purifiés du sérum brut, par agarose-protéine A (voir "Matériels et méthodes"), puis fixés sur des billes de sépharose (CNBr-activated sepharose 6MB, Pharmacia, No 17-0820-01). Les protéines de membranes internes d'enveloppes (10 mg) ont été solubilisées dans une solution tamponnée (pH 7.6) contenant 1% d'octylglucoside et 0.5% de cholate, puis séparées par centrifugation sur un gradient continu de saccharose. Les fractions contenant la protéine de 51 kDa (mais également celle de 47 kDa) ont été collectées et enfin chargées sur la colonne d'IgG-sépharose. La protéine de 51 kDa (47 kDa) ne s'est cependant pas fixée sur la matrice de la colonne. Il est probable que les affinités de l'anticorps pour la protéine de 51 kDa non-dénaturée (solubilisation par un détergent doux: octylglucoside-cholate) ne sont pas aussi fortes que lorsque la protéine est dénaturée par du SDS; en effet, des contrôles effectués par Westernblot montre clairement que la protéine de 51 kDa, comme celle de 47 kDa, sont éluées de la colonne IgG-sépharose sans y avoir été préalablement fixées.

6.4. Discussion

La figure 6.1 montre que l'incubation *in vitro* de membranes internes ou externes d'enveloppes avec du ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP induit la phosphorylation d'une protéine de Mr d'environ 51 kDa (voir aussi "Chapitre 3"). Cette phosphoprotéine est identique dans les deux compartiments membranaires, puisque la digestion protéolytique des deux protéines marquées au ^{32}P engendre, après électrophorèse, des profils de phosphopeptides parfaitement semblables (Fig.6.2). La phosphorylation *in vitro* de cette protéine est cependant environ dix fois plus active dans les membranes internes que dans les membranes externes (Fig.6.1).

Une protéine de 51 kDa, constitutive de l'enveloppe, incorpore également le ^{32}P dans des chloroplastes intacts phosphorylés *in organello* (Fig.6.8). Cette phosphoprotéine étudiée précédemment par Hinz et Flügge (1988) est impliquée dans l'import des protéines du chloroplaste d'Épinard. Ces auteurs ont montré que la présence de pyridoxal 5'-phosphate dans le milieu d'incubation favorise l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 51 kDa, mais inhibe simultanément l'import de protéines précurseurs dans le chloroplaste. Nous n'avons pas répété ces expériences-là, car la phosphoprotéine de 51 kDa est la seule protéine de l'enveloppe hautement phosphorylée *in organello* (Figs 6.8 et 6.9) dans des conditions d'incorporation identiques à celles utilisées par Hinz et Flügge (1988; voir "Matériels et méthodes"). Des analyses par électrophorèse bidimensionnelle (Figs 6.4 et 6.9), ainsi qu'un traitement à la protéase V_8 de *Staphylococcus aureus* (B. L'Éplatténier, 1991), indiquent que les protéines de 51 kDa phosphorylées *in organello* et *in vitro* dans l'enveloppe du chloroplaste sont tout à fait analogues.

Nous avons élevé, avec succès, des anticorps contre une protéine de 51 kDa (Fig.6.3) qui représente environ 3 à 4 % des protéines totales des membranes internes d'enveloppes et qui co-migre parfaitement en gel-SDS avec la protéine phosphorylée de même Mr (Fig.6.1). Ces anticorps anti-51 kDa réagissent aussi fortement avec une autre protéine de 47 kDa, localisée également dans les membranes internes de l'enveloppe (Fig.6.3A). Des séparations par électrophorèse bidimensionnelle attestent que les protéines de 51 et 47 kDa, reconnues par les anticorps anti-51 kDa, subissent concrètement une incorporation de ^{32}P dans une préparation de membranes internes de l'enveloppe (Fig.6.4). Le point isoélectrique de la phosphoprotéine de 51 kDa est d'environ 5,8, alors que celui de la phosphoprotéine de 47 kDa est légèrement plus acide (Fig.6.4). Ces deux phosphoprotéines possèdent une origine génomique commune, car elles partagent entre elles plusieurs caractéristiques:

(a) Une analyse protéolytique partielle des deux phosphoprotéines montre que les peptides engendrés, colorés au bleu de Coomassie, révélés par l'anticorps ou encore détectés par autoradiographie sont identiques (Fig.6.5).

(b) Un traitement au Triton X-114 révèle que les phosphoprotéines de 51 et 47 kDa sont intimement liées à des zones fortement hydrophobes de la membrane interne de l'enveloppe (Fig.6.3B). Les deux phosphoprotéines se retrouvent toujours essentiellement dans la phase détergente, qu'elles soient dans leurs états phosphorylés (Chapitre 3) ou reconnues par l'anticorps (Fig.6.3B).

(c) Un prétraitement de chloroplastes intacts avec du pyridoxal-phosphate, avant la phosphorylation, provoque une augmentation significative de l'incorporation du ^{32}P dans les protéines de 51 et 47 kDa de l'enveloppe (Hinz et Flügge, 1988).

(d) Les phosphoprotéines de 51 et 47 kDa sont toutes deux immunoprécipitées par l'anticorps anti-51 kDa (Travail de diplôme en cours, effectué par M.O. Müller dans notre laboratoire)

L'anticorps polyclonal, dirigé spécifiquement contre la protéine de 51 kDa de la membrane interne de l'enveloppe isolée sur gel-SDS, n'a aucun effet inhibiteur sur la phosphorylation de la protéine, que les enveloppes soient phosphorylées *in vitro* (Fig.6.7) ou *in organello* (B. L'Epplattenier, 1991). Ainsi, aucun site de phosphorylation de la protéine native de 51 kDa n'est confondu à un des sites antigéniques. Des expériences proches effectuées sur des thylacoïdes montrent par contre clairement que la phosphorylation des deux sous-unités principales du LHCII est inhibée par la présence d'anticorps polyclonaux dirigés contre la LHCII-kinase (Coughlan et Hind, 1987). Dans ce cas précis, on sait cependant que les résidus thréonines, qui sont phosphorylés sur l'apoprotéine du LHCII, sont localisés à l'extrémité N-terminale stromatique de la protéine et deviennent par conséquent non-phosphorylable suite à la fixation de l'anticorps sur les sites actifs et antigéniques de la protéine-kinase (Allen, 1992). Ainsi, l'inaccessibilité des sites de phosphorylation sur la protéine de 51 kDa par l'anticorps α -51 kDa indique, soit que les sérines phosphorylées sur la protéine sont localisées dans des poches hydrophiles enfouies dans les membranes de l'enveloppe, soit que les épitopes ne sont pas exposés par la protéine native.

La localisation précise de la phosphoprotéine de 51 kDa dans l'enveloppe du chloroplaste est très controversée, car cette protéine, qui semble appartenir à la membrane interne de l'enveloppe (Figs 6.1, 6.3 et 6.4), est aussi phosphorylée dans une préparation de membranes externes (Figs 6.1 et 6.2). Peu abondante dans une préparation de membranes externes (Fig.6.3A), la protéine de 51 kDa possède ainsi une capacité à fixer le phosphate plus élevée dans les membranes externes que dans les internes. On peut tout à fait exclure que cette protéine soit un contaminant des membranes internes dans les externes, car ces dernières sont presque à 100% pures (Douce et al., 1984, Keegstra et Youssif, 1986). Mais on peut aisément considérer que la présence de cette protéine de 51 kDa dans des préparations de membranes internes est due à la contamination de parties proprement spécifiques aux membranes externes, car il est admis que 10 à 15% de membranes externes environ contamine les vésicules

de membranes internes (Douce et al., 1984; Keegstra et Youssif, 1986). Cette dernière hypothèse est entièrement corroborée par des expériences de phosphorylation *in organello*, puisque l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 51 kDa est grandement stimulée par de l'ATP radioactif d'origine extrachloroplastique, soit directement accessible aux protéines de la face externe de la membrane externe (Figs 6.8 et 6.9). De plus, le traitement de chloroplastes intacts à la thermolysine, avant le marquage en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, abolit complètement l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 51 kDa (Hinz et Flügge, 1988). Cette dernière expérience intéressante confirme que la protéine de 51 kDa est plutôt localisée dans la membrane externe, puisqu'un préconditionnement de chloroplastes intacts à la thermolysine péle les protéines de la face externe de la membrane externe (Cline et al., 1984), donc probablement aussi celle de 51 kDa.

Si la protéine de 51 kDa était localisée uniquement dans des préparations de membranes externes isolées, orientées à 90% dans le même sens que dans les chloroplastes intacts ("outside-out", Waegmann et Soll, 1991), on devrait retrouver une intensité de marquage correspondante à celle qu'on détecte *in organello* (comparer la Fig.6.1 avec la Fig.6.8). Ce n'est cependant pas le cas. Pourquoi cette protéine de 51 kDa est-elle plutôt enrichie dans une préparation de membranes internes (Figs 6.1, 6.3 et 6.4)? Nous pensons que la protéine de 51 kDa fait partie des sites de contacts existant entre les membranes interne et externe de l'enveloppe du chloroplaste, car ils sont co-purifiés avec des préparations de membranes internes (Cremers et al., 1988; Schnell et al., 1990). Dans le but de confirmer cette hypothèse, des expériences de marquage immunologique à l'or colloïdal sur des coupes de chloroplastes intacts sont en cours à l'Université de Lausanne (collaboration avec le laboratoire du Prof. R.M. Hofer de l'Université de Lausanne, Suisse).

A l'instar des trois autres phosphoprotéines majeures de l'enveloppe (67, 26 et 14 kDa), la protéine de 51 kDa incorpore également du ^{32}P sur des résidus sérines (Fig.6.6; Chapitres 4 et 5); de sorte que les activités protéine-kinasiques menant à la phosphorylation des protéines de la membrane interne et du lumen de l'enveloppe sont essentiellement dépendantes de sérine/protéine-kinases. A propos de telles protéine-kinases aucune information précise n'a cependant encore été décrite dans la littérature. Cependant, nous pensons, au vu des résultats présentés dans le chapitre 3 (expérience de "pulse-chase", notamment), que la protéine de 51 kDa ne s'autophosphoryle pas directement mais est phosphorylée par la même sérine/protéine-kinase, dépendante du Ca^{2+} , qui phosphorylerait les protéines de 26 kDa (LHCII?) et 14 kDa (SS). Nous avons ainsi l'intime conviction que ces trois phosphoprotéines font partie de zones de contact

situées entre les membranes interne et externe de l'enveloppe et que leurs phosphorylations respectives sont étroitement liées à l'import des protéines dans le chloroplaste.

6.5. Bibliographie

- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Bennett, J. (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 281-311.
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Andrews, J., Keegstra, K. (1984) Thermolysine is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 75: 875-878.
- Coughlan, S., Hind, G. (1987) Phosphorylation of thylakoid proteins by a purified kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 8402-8408.
- Cremers, F.F.M., Voorhout, W.F., Van der Krift, T.P., Leunissen-Bijvelt, J.J.M., Verkleij, A.J. (1988) Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 334-340.
- Douce, R., Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J. (1984) The plastid envelope membranes: their structure, composition and role in chloroplast biogenesis. *Subcell. Biochem.* 10: 1-64.
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 567-613.
- Hinz, G., (1988) Proteintranslokation in chloroplasten aus spinat: untersuchungen zur energitisierung und identifizierung einer am transport beteiligten membrankomponente. Thèse de doctorat de l'Université de Göttingen (D).
- Hinz, G., Flügel, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- Kaderbhai, M.A., Pickering, T., Austen, B.M., Kaderbhai, N. (1988) A photoactivable synthetic transit peptide labels 30 kDa and 52 kDa polypeptides of the chloroplast inner envelope membrane. *FEBS Lett.* 232: 313-316.
- Keegstra, K., Youssif, A.E. (1986) Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Methods Enzymol.* 118: 316-325.
- Leing, W.A., Christeller, J.T. (1984) Chloroplast phosphoproteins: distribution of phosphoproteins within spinach chloroplasts. *Plant Sci. Lett.* 36: 99-104.
- L'Eplattenier, B. (1991) Contribution à l'étude d'une phosphoprotéine de 51 kDa constitutive des membranes d'enveloppes du chloroplaste d'Epinard. Travail de diplôme réalisé au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Ono, H., Tuboi, S. (1991) Purification of a 52 kDa protein: a putative component of the import machinery for the mitochondrial protein-precursor in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 450-454.
- Rawlyer, A., Meylan, M., Siegenthaler, P.A. (1992) Galactolipid export from envelope to thylakoid membranes in intact chloroplasts. I. Characterization and involvement in thylakoid lipid asymmetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 331-341.
- Robinson, S.P., Wiskich, J.T. (1977) Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides. *Plant Physiol.* 59: 422-427.
- Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Haley, B.E., Hanson, K.R., McHale, N.A. (1990) Identification of the 64 kDa chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 93: 105-109.

Schnell, D.J., Blobel, G., Pain, D. (1990) The chloroplast import receptor is an integral membrane protein of chloroplast envelope contact sites. *J. Cell Biol.* 111: 1825-1838.

Sobel, A. (1991) Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction. *TIBS* 18: 301-304.

Soll, J. (1985) Phosphoproteins end protein-kinase activity in isolated envelopes of pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 166: 394-400.

Soll, J., Bennett, J.(1988) Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and the inner envelopes of pea chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 301-307.

Soll, J., Buchanan, B.B. (1983) Phosphorylation of chloroplast ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by an envelope-bound protein kinase in situ. *J. Biol. Chem.* 258: 6688-6689.

Waegemann, K., Soll, J., (1991) Characterization of the import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1: 149-158.

CHAPITRE 7

Identification de protéine-kinases virtuelles dans l'enveloppe et le stroma du chloroplaste d'Épinard

7.1. Introduction

La phosphorylation des protéines est l'une des modifications posttranslationnelles les plus étudiées, car l'allostérie d'une protéine cible peut être simplement transformée par l'ajout ou le rejet réversible d'un groupement phosphate. La régulation de l'isocitrate déshydrogénase en est un exemple frappant, puisque, dans ce cas, la phosphorylation empêche directement la fixation du substrat sur le site actif de l'enzyme. Cette inhibition est uniquement possible parce que le site de phosphorylation (ser113) fait partie intégrante du site catalytique de l'enzyme (Hurley et al., 1990). Par contre, l'activation de la glycogène phosphorylase découle de modifications allostériques plus complexes, car la phosphorylation a lieu, ici, à l'extrémité N-terminale de la protéine. L'adjonction de la charge négative modifie suffisamment les interactions électrostatiques entre les acides aminés chargés pour que la structure spatiale de l'enzyme s'en trouve changée et le site actif ouvert (Sprang et al., 1988).

Les activations ou désactivations de protéines par phosphorylation sont catalysées de façon ubiquiste par des protéine-kinases et des protéines-phosphatases (Edelman et al., 1987; Cohen, 1989; voir "Introduction générale"). Bien que les activités propres à certaines protéines-phosphatases soient facilement décelables dans un extrait cellulaire, la caractérisation d'une protéine-phosphatase spécifique pour un substrat donné reste toujours assez laborieuse. Par contre, sans être techniquement beaucoup plus aisée, l'identification de protéine-kinases s'avère tout-de-même plus commode, surtout si l'on tient compte des connaissances acquises à leur sujet (Hanks et al., 1988) et des méthodes permettant leur détection (Roskoski, 1983; Gaehlen et al., 1986). Comme l'activation de protéine-kinases exige souvent la présence de messagers secondaires (Ca^{2+} , cAMP, lysolipides, diacylglycérol), engendrés par des signaux transductionnels complexes (Edelman et al., 1987; Kikkawa et al., 1986; Taylor, 1989; Exton, 1990; Bell et Burns, 1991), leur mise en évidence s'en trouve favorisée.

Les échanges intervenant entre le chloroplaste et le reste de la cellule (voir "Introduction générale") sont certainement contrôlés par des mécanismes qui contrôlent

les signaux de transduction accomplis par phosphorylation et déphosphorylation transitoires de protéines d'enveloppes. Certaines découvertes récentes suggèrent fortement que de tels processus ont cours dans l'enveloppe du chloroplaste: (1) régulation d'activités protéine-kinasiques par le calcium (Siegenthaler et Bovet, 1993), (2) présence d'ATPase(s) Ca^{2+} et calmoduline dépendantes (Nguyen et al., 1987), (3) mise en évidence de protéines liant le GTP dans les membranes externes de l'enveloppe (Sasaki et al., 1991), (4) présence de lipides-kinases phosphorylant apparemment le phosphatidylinositol (PI), son lysodérivé (L-PI), ainsi que le phosphatidylinositolmonophosphate (PIP) dans les membranes externes de l'enveloppe (Ruffieux, 1991). Toutes ces informations non-exhaustives, mentionnées ci-dessus, indiquent assurément que les systèmes de transduction, qui agissent classiquement dans les cellules animales (Berridge, 1984; Berridge et Irvine, 1989) et végétales (Einspahr et Thompson, 1990; Trewavas et Gilroy, 1991), opèrent aussi dans le chloroplaste.

Plusieurs protéine-kinases dépendantes du Ca^{2+} ont déjà été identifiées dans différents extraits membranaires et solubles d'origine végétale (Klucis et Polya, 1988; Bögre et al., 1988 et Battey, 1990), cependant aucune d'elles ne semble appartenir au chloroplaste. Bien qu'une protéine-kinase indépendante du calcium ait déjà été purifiée dans les membranes externes d'enveloppes du chloroplaste de Pois (Soll, 1988), nous savons qu'il en existe une autre dans l'enveloppe, puisque la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa nécessite la présence de calcium (Chapitre 3).

7.2. But du chapitre

Nous allons tenter de mettre en évidence des protéine-kinases constitutives de l'enveloppe et du stroma du chloroplaste d'Épinard:

- i) directement après électrophorèse, à l'aide d'un substrat exogène inclus dans la matrice d'un gel de polyacrylamide
- ii) à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéine-kinases animales
- iii) dans des fractions d'enveloppes solubilisées, puis enrichies sur gradient de saccharose

7.3. Résultats

Le but de la première expérience est de déterminer si l'Histone est un bon substrat de phosphorylation pour diverses fractions de l'enveloppe, afin de disposer d'un substrat facile à obtenir pour suivre la purification d'une protéine-kinase de l'enveloppe. A cet effet, nous avons incubé la fraction III-S de l'Histone en présence de quatre extraits d'enveloppes (Fig. 7.1): un extrait "soluble" d'enveloppes, préparé par fractionnement de membranes d'enveloppes aux Triton X-114 (TX), des membranes d'enveloppes totales (E) et des membranes internes (Mi) et externes d'enveloppes (Mx). Un examen des protéines marquées au ^{32}P , sans (TX, E, Mi et Mx) ou en présence d'Histone (TX', E', Mi', Mx'), révèle que les polypeptides de haut Mr de l'Histone III-S (H) sont phosphorylés par des protéine-kinases originaires soit des membranes interne et externe ou encore d'une fraction de protéines hydrosolubles d'enveloppes. Sans Histone (TX, E, Mi, Mx) et dans des conditions de phosphorylation standard, l'intensité du marquage dans la phosphoglucomutase (67 kDa), la protéine de 26 kDa (LHCP?) et la petite sous-unité de la RubisCO (14 kDa) correspond à des valeurs déjà obtenues précédemment (voir "Chapitre 3"). La protéine la mieux phosphorylée dans un extrait "soluble" de protéines d'enveloppes a un poids moléculaire d'environ 18 kDa (TX) et n'est pas phosphorylée dans une préparation d'enveloppes totales (E), sauf en présence d'EDTA (pour autant qu'il s'agisse du même polypeptide? Voir "Chapitre 3"). La quantification de la radioactivité incorporée dans une bande de l'Histone (H) révèle par Bioimage (Millipore) que l'activité protéine-kinasique la plus forte est exhibée sur ce substrat par la membrane externe (DOI = 3.2). La phosphorylation de cette même protéine de l'Histone (H) par la ou les protéine-kinases des membranes internes d'enveloppes (DOI = 1.3), des enveloppes totales (DOI = 1.1) ou de l'extrait "soluble" de protéines d'enveloppes (DOI = 0.9) est comparativement moins soutenue. Des expériences similaires effectuées avec la Caséine déphosphorylée, comme substrat exogène, ont montré que contrairement à l'Histone la protéine majeure du lait n'est pas un accepteur de phosphate valable pour les protéine-kinases de l'enveloppe (résultats non montrés).

La fraction III-S de l'Histone peut être également phosphorylée dans un extrait de stroma (Cortez et al., 1987). Cette activité protéine-kinasique est cependant beaucoup plus faible que celle exhibée par l'enveloppe, car la phosphorylation du polypeptide H ne devient visible sur l'autoradiographie A de la figure 7.1 qu'après surexposition du film (résultats non montrés). Par contre, comme pour les protéine-kinases de l'enveloppe, la Caséine déphosphorylée n'est pas un bon substrat pour les kinases du stroma (Fig. 7.1B; Cortez et al., 1987). La diminution de l'incorporation du ^{32}P dans la protéine stromatique

de 94 kDa est corrélée avec l'adjonction de la fraction III-S de l'Histone, mais pas avec celle de la Caséine déphosphorylée (Figs 7.1A et 7.1B); ce résultat témoigne des propriétés compétitives de la fraction III-S de l'Histone pour la protéine-kinase qui phosphoryle la protéine de 94 kDa du stroma.

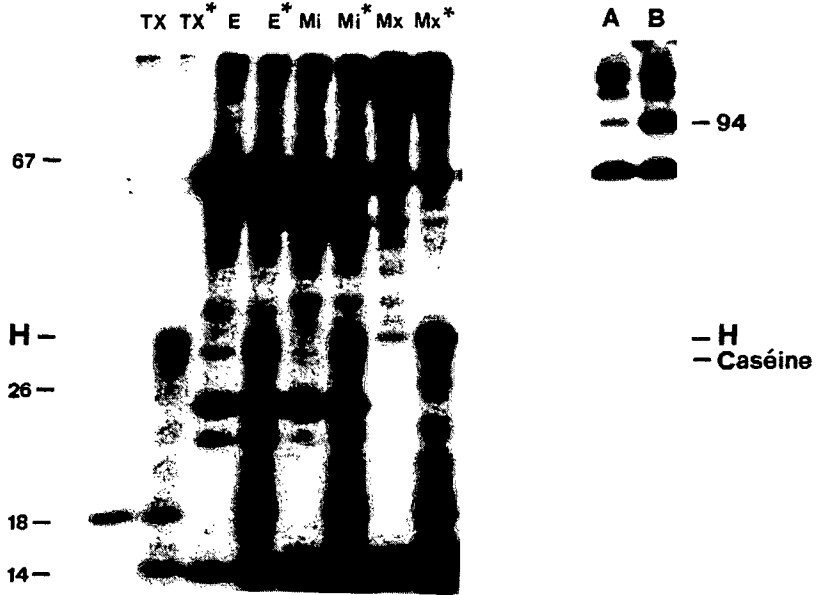


Fig.7.1. Phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone par diverses préparations d'enveloppes
 Dans des conditions standard, des aliquotes contenant 10 µg de protéines d'un extrait "soluble" de protéines d'enveloppes (TX), d'enveloppes (E) et de membranes internes (Mi) ou externes d'enveloppes (Mx) ont été phosphorylées, soit seuls (TX, E, Mi et Mx), soit en présence de 5 µg de la fraction III-S de l'Histone (Sigma H 5505; TX', E', Mi' et Mx'). L'extrait "soluble" de proléines d'enveloppes a été obtenu après traitement d'enveloppes au Triton X-114, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Des protéines du stroma (30 µg) ont été phosphorylées, comme indiqué dans "Matériels et méthodes", avec en plus 3 µg de protéines d'Histone III-S (colonne A) ou de Caséine déphosphorylée (Sigma C 4032, colonne B). Tous les extraits ont été séparés par SDS-PAGE et autoradiographiés. Le polypeptide, le mieux marqué de la fraction III-S de l'Histone, est indiqué par la lettre H.

Dans le but d'identifier les protéine-kinases de l'enveloppe qui phosphorylent la fraction III-S de l'Histone (Fig.7.1), nous avons choisi la procédure (voir "Matériels et méthodes") mise au point par Geahlen et al. (1986) permettant de détecter des activités protéine-kinasiques dans un gel-SDS, en présence d'un substrat donné (fraction III-S de l'Histone) inclus dans la matrice du gel. Si on n'ajoute pas de substrat dans le gel de séparation, les propriétés d'autophosphorylation de la kinase peuvent également être mise en évidence. Cette méthode très attrayante donne souvent de bons résultats puisqu'elle a permis, par exemple, au professeur G.F.E Scherer (Université de Bonn, Allemagne, communication personnelle) de détecter des protéine-kinases dans un extrait de membranes plasmiques de cellules végétales. Malheureusement, dans notre cas, nous n'avons pu ni mettre en évidence de protéine-kinases dans l'enveloppe ni retrouver dans une préparation de membrane externe d'Epinard l'homologue de la protéine-kinase purifiée par Soll (1988) chez le Pois (résultats non montrés). De même, aucune autophosphorylation dans des protéines d'enveloppes, de membranes internes et externes d'enveloppes, séparées sur gel-SDS puis transférées sur papier de nitrocellulose, n'a été détectée selon la méthode décrite par Valtorta et al. (1986; résultats non montrés). Toutefois, des protéine-kinases chloroplastiques solubles peuvent être identifiées par une méthode proche de celle proposée par Geahlen et al. (1986). En effet, trois protéine-kinases stromatiques "a, b et c" phosphorylent bien la fraction III-S de l'Histone incluse dans un gel natif (Fig.7.2, colonne 1). Par contre ces protéine-kinases "a, b et c" ne phosphorylent pas la Caséine déphosphorylée (Fig.7.2, colonne 2). La protéine-kinase "c" possède la même mobilité électrophorétique que l'holoenzyme de la RubisCO, alors que les bandes radioactives "a" et "b" superposent parfaitement deux autres protéines qui comme la RubisCO sont bien visibles par coloration au bleu de Coomassie (Fig.7.2, colonne 0). *Les autres tâches perceptibles sur les autoradiographies de la figure 7.2 (colonnes 1 et 2) résultent de ($\gamma^{32}P$)ATP qui reste encore emprisonné dans les mailles du gel de polyacrylamide, malgré les lavages effectués après l'incubation du gel entier dans l'ATP radioactif (voir "Matériels et méthodes").*



Fig.7.2. Mise en évidence de protéine-kinases dans le stroma du chloroplaste d'Epinard

Des protéines du stroma (70 µg) ont été séparées sur des gels natifs 7%, contenant 10% (p/v) de la fraction III-S de l'Histone (colonne 1) ou 10% de Caséine déphosphorylée (colonne 2) insérée dans la matrice du gel. Après électrophorèse, le gel a été incubé en présence de 40 µCi de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP et traité comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Trois protéine-kinases (a,b,c) qui phosphorylent la fraction III-S de l'Histone sont mises en évidence après autoradiographie. La colonne 0 montre des protéines de stroma (70 µg) séparées sur gel natif et colorées au bleu de Coomassie.

Vu que la fraction "soluble" de protéines d'enveloppes (préparées par la méthode du Triton X-114) est susceptible de phosphoryler l'Histone (Fig.7.1, TX'), nous avons testé l'influence qu'elle fait subir à l'incorporation du ^{32}P dans les protéines des membranes internes et externes (Fig.7.3). En règle générale, on constate que cet extrait a un effet inhibiteur sur leur phosphorylation (comparer Mx avec Mx' et Mi avec Mi'). Toutefois, une analyse détaillée de l'autoradiographie révèle des changements dans l'intensité du marquage de certaines bandes radioactives, ce qui suggère l'existence de plusieurs processus enzymatiques complexes. En effet, c'est apparemment la protéine de 67 kDa (phosphoglucomutase?) présente dans l'extrait de protéines "solubles" d'enveloppes (TX) qui stimule, d'environ 5%, l'incorporation du ^{32}P dans la phosphoprotéine de 67 kDa constitutive des membranes internes et externes d'enveloppes. Par contre, on constate que l'autre protéine de 18 kDa, également phosphorylée dans l'extrait de protéines "solubles" d'enveloppes (TX), n'apparaît plus du tout marquée en présence de membranes internes et externes (voir Mi' et Mx').

Cependant, la réaction la plus surprenante se situe au niveau de la phosphorylation des protéines de 51 et 14/15 kDa, puisque leur marquage subit 40% d'inhibition dans les membranes internes d'enveloppes (comparer Mi et Mi') et jusqu'à 90% dans les externes (comparer Mx et Mx'). A l'opposé, l'incorporation du ³²P est stimulée d'environ 10% dans la protéine de 26 kDa des membranes internes (Analyses quantitatives effectuées par comptage Cerenkov et Bioimage Millipore).

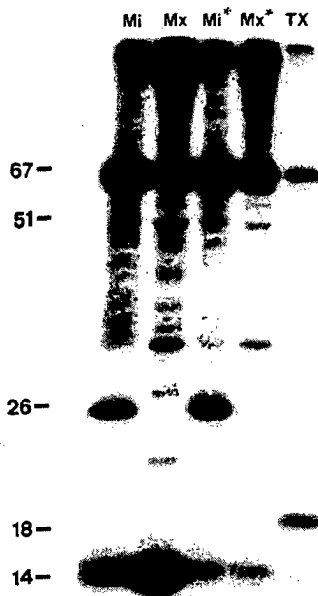


Fig.7.3. Phosphorylation de protéines des membranes internes et externes d'enveloppes en présence d'une fraction "soluble" de protéines d'enveloppes

Un extrait "soluble" de protéines d'enveloppes (5 µg), obtenu par traitement de membranes d'enveloppes au Triton X-114 (comme indiqué dans "Matériels et méthodes"), a été phosphorylé dans des conditions standard, soit seul (TX), soit en présence de protéines (20 µg) des membranes internes (Mi) ou externes (Mx) d'enveloppes. Comme contrôle, les protéines (20 µg) des membranes internes (Mi) et externes (Mx) ont été phosphorylées seules. Après SDS-PAGE, les phosphoprotéines ont été révélées par autoradiographie et leurs Mr déterminés.

La mise en évidence d'activités protéine-kinasiques liées à l'enveloppe (Figs 7.1, 7.2 et 7.3) et la dépendance de certaine(s) vis-à-vis du Ca²⁺ et des phospholipides ainsi que leur sensibilité à l'inhibiteur H7 (Siegenthaler et Bovet, 1993), indiquent que des protéine-kinases de type C (PKC) pourraient être impliquées dans la phosphorylation de certaines protéines d'enveloppes (notamment celles de 26 et 14 kDa; Chapitre 3;

Nishizuka, 1986). Nous avons donc révélé par Westernblot les protéines d'enveloppes (E), des membranes internes (Mi) et externes (Mx) d'enveloppes, du stroma (S) et des thylacoïdes (T) avec des anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide de la partie régulatrice des protéine-kinases C α du cerveau de boeuf (α -PKC(ab545); Fig.7.4). Ces anticorps nous ont été gracieusement offerts par le Professeur P.J. Parker du "Ludwig Institute for Cancer Research" de Londres. Ils sont dirigés contre une séquence de 13 aa (QEEGEYYNVPIPE) située en bordure d'une zone régulatrice hydrophobe et conservée de la protéine, appelée C2 (Parker et al., 1986; Coussens et al., 1986). Nous avons choisi cet antisérum, car il a déjà permis à Elliot et Kokke (1987) de mettre en évidence dans un extrait de protéines de pousses d'*Amaranthus tricolor* trois protéines solubles de 84.5, 65 et 40 kDa qui réagissent avec lui. Deux de ces trois protéines (84.5 et 40 kDa) semblent même être l'objet de phosphorylation dans ces extraits. La figure 7.4 révèle que quatre protéines chloroplastiques (130, 72, 60 et 19 kDa) sont reconnues sur les immunoblots par l'anticorps α -PKC(ab545). Une seule d'entre elles, de Mr 72 kDa, est typiquement membranaire. Elle est localisée dans les membranes internes de l'enveloppe (Mi) (Fig.7.4). Cette protéine est bien sûr également mise en évidence dans une préparation d'enveloppes totales (E). Les trois autres protéines de 130, 60 et 19 kDa possèdent toutes des caractéristiques hydrophiles, puisqu'on les trouve exclusivement dans le stroma (S), à l'exception toutefois du polypeptide de 130 kDa qu'on décele aussi dans une préparation d'enveloppes (E).

Le poids moléculaire des différents types de protéine-kinases C animales (α , β I, β II, γ , δ , ϵ) oscillant entre environ 70 et 80 kDa (Kikkawa et al., 1989), nous nous sommes essentiellement intéressés aux protéines qui se rapprochent le plus de ces Mr et qui réagissent de façon croisée avec l'anticorps α -PKC(ab545) dans les membranes internes d'enveloppes et le stroma, soit celles de 72 et 60 kDa (Fig.7.4).

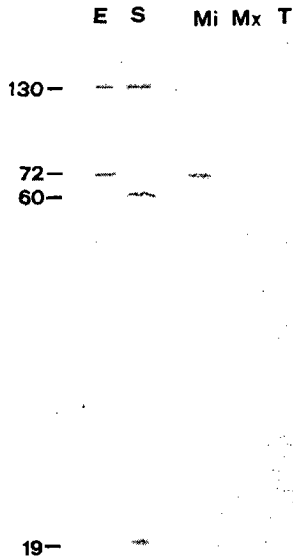
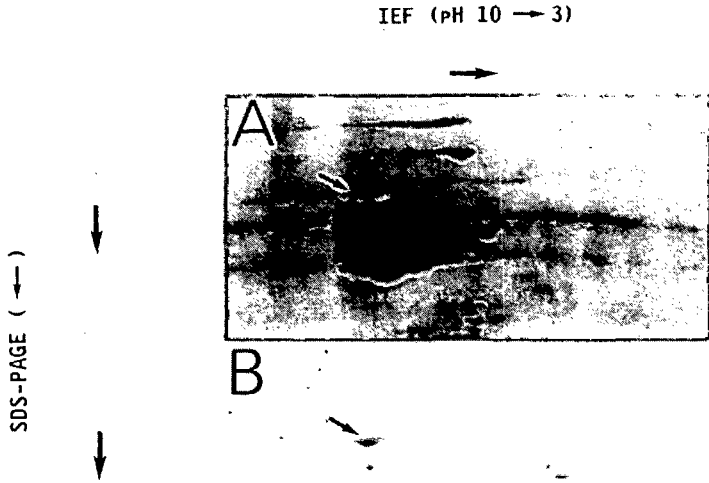


Fig.7.4. Révélation, par immunoblot, de protéines chloroplastiques à l'aide d'un sérum (α -PKC(ab545)) dirigé contre la partie régulatrice des protéine-kinases C. Des protéines (30 μ g) provenant d'enveloppes (E), de stroma (S), de membranes internes (Mi) et externes (Mx) d'enveloppes et de thylacoïdes (T) ont été incubées avec l'anticorps (α -PKC(ab545)); dilution 1/400) puis révélées comme indiqué dans "Matériels et méthodes".

Concernant la protéine de 72 kDa, des analyses quantitatives effectuées par Bioimage (Millipore) sur plusieurs gels-SDS colorés au bleu de Coomassie montrent qu'il s'agit d'une protéine relativement abondante, puisqu'elle constitue environ 2% des protéines totales d'enveloppes. La séparation d'enveloppes en phase aqueuse et organique par le Triton X-114, suivi d'un immunoblot en présence d'anticorps α -PKC(ab545), révèle que cette protéine, bien que membranaire, possède une très forte affinité pour la phase aqueuse (résultats non montrés). Des séparations bidimensionnelles (IEF x SDS-PAGE) de protéines d'enveloppes (n=3), suivies d'analyses par Westernblot en présence d'anticorps α -PKC(ab545), nous ont permis d'assigner à cette protéine un point isoélectrique d'environ 7.3 ± 0.4 (Fig.7.5). La relative abondance de cette protéine dans les enveloppes et son excellente résolution sur gel 2D en font un bon candidat d'étude (Fig.7.5), quoique cette protéine ne subisse pas de phosphorylation ou d'autophosphorylation apparente dans des préparations de membranes internes d'enveloppes ou d'enveloppes totales (voir "Chapitres 3, 4 et 5") contrairement aux protéine-kinases C, par exemple, dans des préparations de cerveau

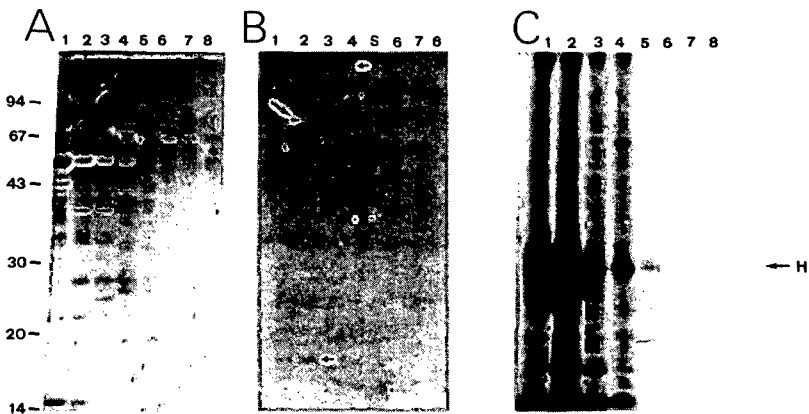
de rat (Kikkawa et al., 1982) ou sous forme isolée (Mochly-Rosen et Koshland, 1987; voir "Chapitre 8").



Figs 7.5 A-B. Localisation, par immunoblot, sur une séparation bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE) de protéines d'enveloppes (A) du polypeptide de 72 kDa reconnu par le sérum α -PKC(ab545). Un gel 2D, contenant 80 μ g de protéines d'enveloppes, a été soit coloré au bleu de Coomassie (A), soit analysé par immunoblot (B) en présence d'une dilution 1/750 d'anticorps α -PKC(ab545).

Dans le but de déterminer si la reconnaissance de cette protéine de 72 kDa par les anticorps α -PKC(ab545) est non-spécifique ou effectivement liée à l'expression d'une activité protéine-kinasique, nous avons séparé des protéines d'enveloppes (solubilisées à l'octylglucoside) sur gradient de saccharose 10-30%, puis phosphorylé, en présence d'Histone (H III-S), chacune des huit fractions collectées sur ce gradient (Fig.7.6). La coloration, au bleu de Coomassie, des protéines séparées sur gel-SDS montre que la majorité des protéines solubilisées sont localisées dans les fractions 1 (bas du tube; ~30% de saccharose) à 5 (Fig.7.6A). La protéine de 72 kDa n'est détectée par immunoblot que dans la fraction 2 (Fig.7.6B, grande flèche), alors que celles de 19 kDa et 130 kDa ne le sont que très faiblement dans les fractions 3 et 4 (Fig.7.6B, petites flèches). On constate, après la précipitation des protéines au TCA, que la radioactivité totale incorporée dans la fraction 2 (47430 cpm), en présence d'Histone comme

accepteur de phosphate exogène, est environ deux à trois fois plus forte que dans les fractions 1 (14859 cpm) et 3 (18628 cpm) et même cinq à six fois plus forte que dans la fraction 4 (8456 cpm). Cette forte activité protéine-kinasique, exhibée par la fraction 2, peut être également mise en évidence par l'autoradiographie des huit fractions phosphorylées, préalablement séparées par SDS-PAGE (Fig. 7.6C). En effet, le comptage Cerenkov du polypeptide le mieux phosphorylé de la fraction III-S de l'Histone (H), donne une valeur de 502 cpm en présence de la fraction 2 et respectivement 300, 120, 97 et 45 cpm en présence des fractions 1, 3, 4 et 5. Dans la fraction 2, la forte activité protéine-kinasique mesurée coïncide tout à fait avec la présence du polypeptide de 72 kDa, mais aussi d'autres protéines d'enveloppes (Fig. 7.6A) et de l'Histone.



Figs 7.6 A-B-C. Mesure d'activités protéine-kinasiques dans des membranes d'enveloppes solubilisées à l'octylglucoside puis séparées sur gradient de saccharose 10-30% et révélation des fractions récoltées, par immunoblot, en présence d'anticorps α -PKC(ab545)

Le solubilisation à l'octylglucoside de protéines d'enveloppes (1,5 mg) et leurs séparations sur gradient de saccharose ont été effectuées exactement comme décrit dans "Matériels et méthodes". Deux aliquotes (120 μ l) de chacune des huit fractions récoltées (600 μ l) ont été précipitées à l'acétone 80% et séparées par SDS-PAGE. La fraction 1 correspond au bas du tube dans le gradient. Le gel-SDS a été, soit directement coloré au bleu de Coomassie (A), soit révélaté par immunoblot en présence d'une dilution 1/800 des anticorps α -PKC(ab545) (B). La phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone (1 μ g) a été effectuée en présence de 200 μ l de chacune des huit fractions, 4 mM $MgCl_2$ et 20 μ Ci de ($\gamma^{32}P$)ATP. Après 10 min d'incubation à 23°C, l'activité protéine-kinasique a été stoppée par l'addition de 500 μ l de TCA 12%. Les phosphoprotéines ont été ensuite séparées par SDS-PAGE 13% et révélées par autoradiographie. Le polypeptide, le mieux marqué de la fraction III-S de l'Histone, est indiqué par la lettre H, alors que les poids moléculaires de référence sont mentionnés sur la gauche.

L'anticorps α -PKC(ab545) étant dirigé uniquement contre un peptide de la partie régulatrice des protéine-kinases C α (Fig.7.4), nous avons fait réagir les protéines d'enveloppes (E), des membranes internes (Mi) et externes (Mx), du stroma (S) et des thylacoïdes (T) avec un autre anticorps α -PKC, un peu moins spécifique que le premier (Fig.7.7). Cette expérience a été réalisée dans le but de corroborer les résultats obtenus par le premier anticorps. Ce second anticorps polyclonal, élevé contre un mélange des trois formes α , β et γ des protéine-kinases C (α -PKC(mix)), nous a été, comme le précédent, aimablement fourni par le Professeur P.J. Parker. Deux protéines de 60 et 51 kDa faisant partie respectivement du stroma (S) et des membranes internes d'enveloppes (Mi), réagissent fortement avec cet anticorps. Le polypeptide de 51 kDa est naturellement présent dans la préparation d'enveloppes totales (E), alors que la protéine de 60 kDa semble contaminer la fraction enrichie en membranes externes d'enveloppes (Mx). Cette dernière observation n'est pas surprenante, puisqu'on sait que les protéines du stroma contaminent principalement les vésicules de membranes externes d'enveloppes (Block et al., 1983; Siegenthaler et Dumont, 1990). Comme pour l'anticorps α -PKC(ab545)(Fig.7.4), l' α -PKC(mix) ne reconnaît aucun polypeptide dans les membranes thylacoïdales (Fig.7.7).

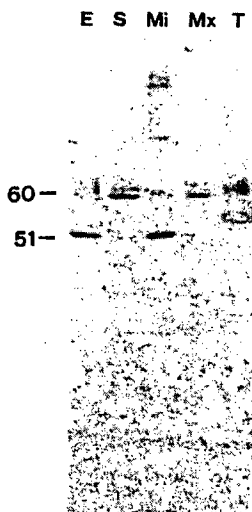
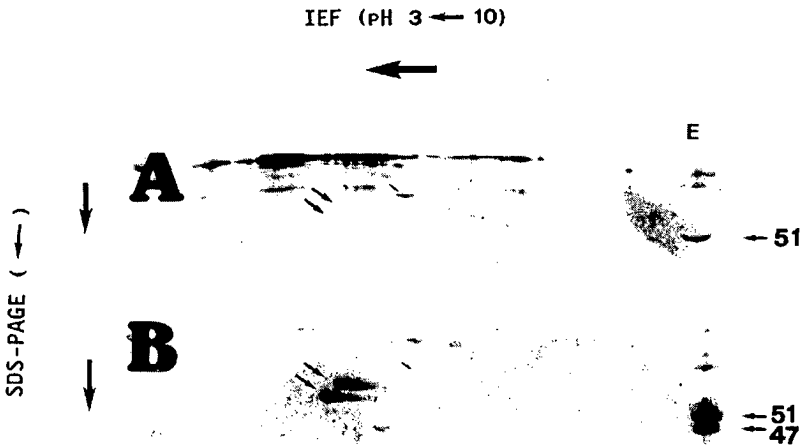


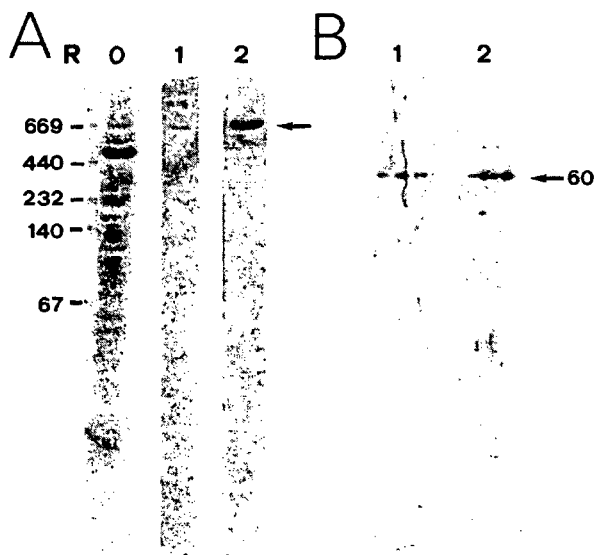
Fig.7.7. Révélation, par Immunoblot, de protéines chloroplastiques à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre les trois formes α , β et γ des protéine-kinases C (α -PKC(mix))
Des protéines (30 μ g) d'enveloppes (E), de stroma (S), de membranes internes (Mi) et externes (Mx) d'enveloppes et de thylacoïdes (T) ont été incubées avec l'anticorps (α -PKC(mix), dilution 1/700) puis révélées comme indiqué dans "Matériels et méthodes".

Afin de déterminer si la protéine de 51 kDa identifiée par l'anticorps α -PKC(mix) est la même que celle étudiée dans le chapitre 6, nous avons comparé des séparations bidimensionnelles (IEF x SDS-PAGE) de membranes d'enveloppes, après transfert sur papier de nitrocellulose et révélation en présence des deux sérums α -PKC(mix) (Fig.7.8A) et α -51kDa (Fig.7.8B). La forte bande révélée sur l'immunoblot de la figure 7.8A résulte, semble-t-il, d'une réaction du sérum α -PKC(mix) avec la kératine provenant de l'épiderme du manipulateur (P. Schürmann, communication personnelle). Les deux polypeptides de 51 et 47 kDa reconnus par l'anticorps α -51 kDa (Fig.7.8B) ne réagissent pas aux anticorps α -PKC(mix) (Fig.7.8B, voir "flèches"). Par contre, le polypeptide de 51 kDa, qui réagit de façon croisée avec anti-PKC(mix) (Fig.7.8B; petite flèche), n'est lui que très faiblement reconnu par l'anticorps α -51kDa. Ainsi, cette expérience montre, sans équivoque, que la protéine de 51 kDa, identifiée par Hinz et Flügge (1988) et étudiée dans le chapitre 6, est différente de celle révélée par l'anticorps α -PKC(mix).



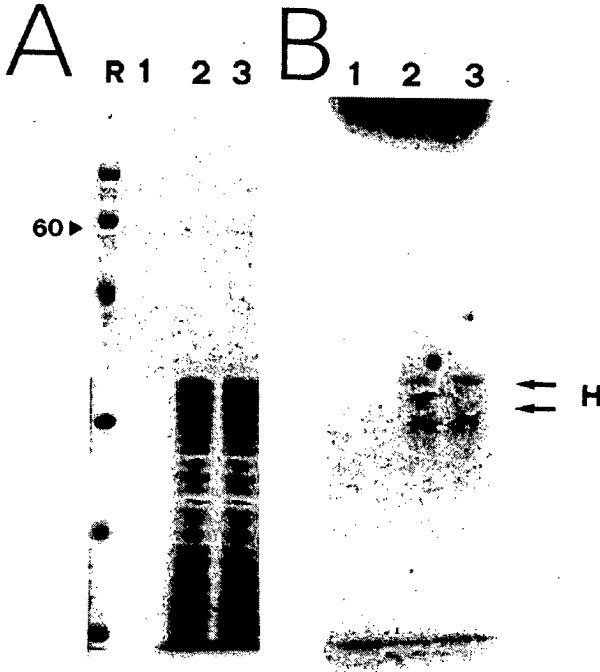
Figs 7.8 A-B. Localisation, par immunoblot, du polypeptide de 51 kDa reconnu par les sérums α -PKC(mix) et α -51 kDa, sur des séparations bidimensionnelles (IEF x SDS-PAGE) de protéines d'enveloppes. Des gels 2D, contenant 80 μ g de protéines d'enveloppes, ont été révélés par immunoblot en présence d'une dilution 1/700 d'anticorps α -PKC(mix) (A) et 1/100 d'anticorps α -51kDa (B). Comme contrôle, des protéines (30 μ g) de membranes d'enveloppes (E) ont été séparées, dans les deux cas, par SDS-PAGE uniquement.

Le seul polypeptide qui réagit positivement à la fois aux anticorps α -PKC(ab545) et α -PKC(mix) migre à environ 60 kDa sur gel-SDS (Figs 7.4 et 7.7) et 800 kDa sur gel non-dénaturant (Fig.7.9A, colonnes 1 et 2, voir \leftarrow). La coloration au noir Amido du gel natif, transféré sur papier de nitrocellulose, révèle que la protéine d'environ 800 kDa est très abondante dans un extrait de stroma (Fig.7.9A, colonne 0). Pour démontrer que la forme oligomérique d'environ 800 kDa est véritablement constituée de monomères polypeptidiques de 60 kDa, cette protéine a été excisée dans un gel natif 4-30%, séparée par SDS-PAGE et enfin révélée par immunoblot en présence des deux anticorps α -PKC. Le résultat (Fig.7.9B) montre que le polypeptide de 60 kDa est bien un monomère constitutif de la protéine de 800 kDa, qui réagit de façon croisée avec les anticorps anti-PKC (colonnes 1 et 2).



Figs 7.9 A-B. Révélation, par immunoblot, de protéines natives du stroma à l'aide d'anticorps α -PKC(ab545) et α -PKC(mix)

Des protéines (60 μ g) de stroma, ont été séparées par électrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide 4-30%. Après transfert sur papier de nitrocellulose, les protéines ont été soit colorées au noir Amido (colonne 0), soit révélées par immunoblot en présence d'une dilution 1/500 d'anticorps α -PKC(ab545) (colonne 1) ou 1/800 d'anticorps α -PKC(mix) (colonne 2). Les poids moléculaires de référence sont mentionnés sur la gauche (A). La protéine native du stroma, reconnue par les deux anticorps α -PKC (Fig.7.9A, \leftarrow), a été excisée dans un gel natif 4-30%, puis soumise à une seconde électrophorèse dénaturante en présence de SDS (comme indiqué dans "Matériels et méthodes" au point 2.2.17, mais sans l'adjonction de protéase). Après transfert du gel-SDS sur papier de nitrocellulose, les protéines ont été incubées en présence d'une dilution 1/400 d'anticorps α -PKC(ab545) (colonne 1), ou 1/800 d'anticorps α -PKC(mix) (colonne 2), puis révélées par des méthodes standard (B).



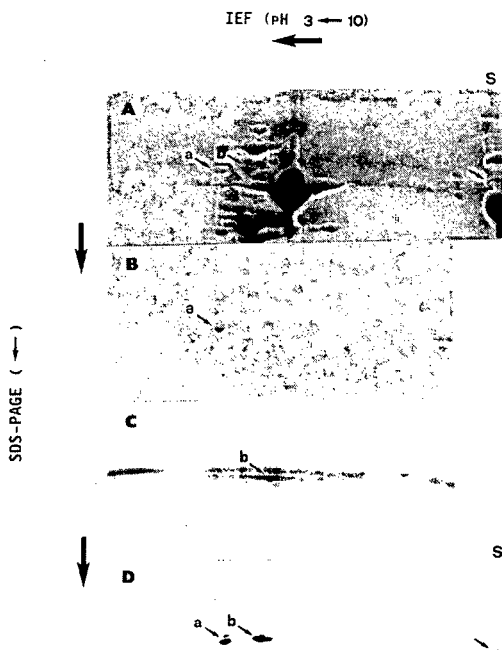
Figs 7.10 A-B. Phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone par la protéine d'environ 800 kDa reconnue par les anticorps anti-PKC

La protéine native du stroma, d'environ 800 kDa (Fig.7.9A) et reconnue par des anticorps anti-PKC, a été excisée dans un gel natif 4-30%, puis éluée du gel par électrophorèse non-dénaturante (Extraphor, Pharmacia) pendant 50 min à 4°C. Le tampon d'élué est composé de 50 mM Tris-HCl (pH 8.9), 50 mM glycine, alors que le tampon de rétention contient en plus 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Après deux dialyses contre 3 l de 10 mM MOPS-NaOH (pH 7.6) et une contre 1 l de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), l'éluat a été concentré sur Percoll 35000, et les protéines dosées au Biorad. Un aliquote de la protéine éluée, correspondant à environ à 0.2 μg , a été incubé en présence de 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 4 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , et 30 nM $(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$, soit sans (colonne 1) ou avec 5 μg de la fraction III-S de l'Histone (colonne 2). La colonne 3 est identique à la colonne 2, excepté que le milieu d'incubation a été, dans ce cas, complété de 30 mM final de mercaptoéthanol. Les trois échantillons ont été séparés par SDS-PAGE 13%, colorés au bleu de Coomassie (A), puis autoradiographiés (B). La lettre H indique la position dans le gel des deux peptides phosphorylés de la fraction III-S de l'Histone.

Après la coloration au bleu de Coomassie ou la révélation par immunoblot, en présence d'anticorps α -PKC (ab545 ou mix), de protéines de stroma séparées sur gel non-dénaturant à gradient continu (4-30%) ou discontinu (7%) de polyacrylamide, la comparaison des profils indique que la protéine de 800 kDa (Fig.7.9) correspond à la bande radioactive appelée "b" sur la figure 7.2 (colonne 1). Cette observation montre que

la protéine d'environ 800 kDa, reconnue par les deux anticorps α -PKC, possède une activité protéine-kinasique qui lui permet de phosphoryler la fraction III-S de l'Histone emprisonnée dans la matrice d'un gel. Pour confirmer ce résultat, la protéine de 800 kDa a été éluée à partir d'un gel natif 4-30% et phosphorylée, après dialyse, en absence ou en présence de la fraction III-S de l'Histone (Fig. 7.10). La coloration du gel-SDS et son autoradiographie respective révèlent que la protéine éluée ($\sim 0.2 \mu\text{g}$) n'est qu'à peine visible au bleu de Coomassie (Fig. 7.10A, colonnes 1, 2 et 3) et qu'elle ne s'autophosphoryle pas en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP (Fig. 7.10B, colonne 1). Par contre, elle stimule la phosphorylation de deux polypeptides de la fraction III-S de l'Histone (H) (Fig. 7.10B, colonne 2). L'adjonction de 2-mercaptoéthanol (30 mM), décrit pour agir comme un stimulant de l'activité des protéine-kinases C contenues dans un extrait soluble de cerveau de rat (Zabrenetzky et al., 1981), a le même effet sur la phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone par la protéine de 800 kDa (H) (Fig. 7.10B, colonne 3). On notera qu'en présence de l'agent réducteur, les deux polypeptides de l'Histone (H) incorporent deux fois mieux le ^{32}P qu'en son absence (analyses quantitatives effectuées par Bioimage Millipore).

Des séparations bidimensionnelles (IEF x SDS-PAGE) de protéines de stroma, soit colorées au bleu de Coomassie (Fig. 7.11A), soit analysées par Westernblot en présence d'anticorps α -PKC(ab545) (Fig. 7.11B) ou α -PKC(mix) (Fig. 7.11C) révèlent que la protéine stromatique de 60 kDa, identifiée comme un seul polypeptide par SDS-PAGE (Figs 7.4, 7.7 et 7.9), est, en fait, composée de deux isomères de charges différentes (a et b) reconnus spécifiquement par chacun des deux anticorps (Figs 7.11A-B-C). En effet, les IgGs dirigées contre le peptide (QEEGEYYNVPIPE), mimant une partie de la zone régulatrice des protéine-kinases C, reconnaissent uniquement la forme a (Fig. 7.11B), alors que les anticorps polyclonaux dirigés contre une mixture des trois PKC α , β et γ réagissent essentiellement avec la forme b (Fig. 7.11C). *La bande d'environ 67 kDa révélée sur l'immunoblot par l'anticorps α -PKC(mix) résulte d'une réaction du sérum avec la kératine provenant de l'épiderme du manipulateur (P. Schürmann, communication personnelle; Fig. 7.11C).*



Figs 7.11 A-B-C-D. Localisation, par immunoblot, du polypeptide de 60 kDa reconnu par des anticorps α -PKC(ab545), α -PKC(mix) et α -chaperonines, sur des séparations bidimensionnelles (IEF x SDS-PAGE) de protéines du stroma

Des protéines de stroma (100 μ g) ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (IEF x SDS-PAGE), puis, soit colorées au bleu de Coomassie (A), soit révélées par immunoblot avec des anticorps α -PKC(ab545; dilution 1/750)(B), α -PKC(mix; dilution 1/1000)(C) et dirigés contre les chaperonines α et β du chloroplaste de Pois (dilution 1/500)(D). Comme contrôle, un aliquote (30 μ g) de protéines de stroma a été séparé, dans deux cas (A et D), par SDS-PAGE uniquement (S).

Grâce aux observations décrites ci-dessus, associées à nos connaissances acquises sur la taille de l'oligomère des polypeptides "a" et "b" (Fig.7.9), nous avons déduit, par comparaison avec d'autres informations bibliographiques, que les deux polypeptides "a" et "b" font partie de la famille des chaperonines plastidiales (Hemmingsen et al., 1988; Ellis et Van der Vies, 1991; Gatenby, 1992). Cette hypothèse s'est avérée correcte puisque les deux polypeptides "a" et "b" (Fig.7.11D) sont parfaitement reconnus par un antisérum dirigé spécifiquement contre les formes α et β des chaperonines chloroplastiques du Pois. Cet anticorps nous a été gracieusement offert par le Professeur R.J. Ellis de l'Université de Warwick en Grande-Bretagne. Le

polypeptide le plus acide "a" correspond à la chaperonine α (homologue du produit du gène *groEL* chez *Escherichia coli*; Hemmingsen et al., 1988; voir "Chapitre 8") et le polypeptide "b" à la chaperonine β (Martel et al., 1990; Musgrove et al., 1987; voir "Chapitre 8"). Bien que le rôle cellulaire précis joué par ces protéines ubiquistes ne soit pas encore totalement clarifié, il est toutefois admis que cette catégorie de protéines fonctionne comme un médiateur dans l'assemblage correct d'autres polypeptides de la cellule, via l'hydrolyse de molécules d'ATP (Ellis, 1990). Le terme d'assemblage embrasse, ici, à la fois le repliement de chaînes polypeptidiques linéaires et l'oligomérisation de polypeptides en structures polymériques plus complexes (Ellis et Hemmingsen, 1989; Gatenby et Ellis, 1990).

7.4. Discussion

La phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone par trois sous-fractions de l'enveloppe du chloroplaste (les membranes internes, externes et une préparation enrichie en protéines "solubles" d'enveloppes après une séparation de phase au Triton X-114) montre que les trois compartiments de l'enveloppe (membrane interne, externe et espace intermembranaire) contiennent chacun leur(s) propre(s) protéine(s)-kinase(s) (Fig.7.1; on admet ici, qu'une partie des protéines solubles qui n'ont pas d'affinité pour le Triton X-114 sont issue de biomolécules originaires du lumen de l'enveloppe, comme, par exemple, la phosphoprotéine de 67 kDa, Fig.7.3(TX) et Chapitre 4). La protéine-kinase de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard qui phosphoryle le mieux la fraction III-S de l'Histone est probablement semblable à l'enzyme de 70 kDa déjà purifiée par Soll (1988) à partir de préparations équivalentes de Pois. L'isolement de cette protéine-kinase a été réalisée par chromatographie d'affinité sur Histone III-S Sepharose 4B (Soll, 1988). Nos résultats (Fig.7.1) indiquent par conséquent qu'on pourrait aussi envisager, en utilisant la même méthode, la purification d'une protéine-kinase constitutive des membranes externes du chloroplaste d'Epinard.

L'addition de protéines d'enveloppes à caractère hydrophile (extraites d'enveloppes après séparation de phase au Triton X-114) à des préparations de membranes internes ou externes d'enveloppes stimule légèrement l'incorporation du ^{32}P dans les protéines de 67 et 26 kDa, mais l'inhibe dans les polypeptides de 51 et 14/15 kDa (Fig.7.3). L'intensification du marquage dans la phosphoglucomutase de 67 kDa résulte sans équivoque de la contamination préalable de cette protéine dans la phase aqueuse du Triton X-114 (Fig.7.3; Chapitre 3). Par contre, l'inhibition mesurée dans les protéines de 51 et 14/15 kDa des membranes internes et externes découle, soit de

l'activité d'une protéine-phosphatase (Shenolikar et Nairn, 1991), soit d'un inhibiteur spécifique contenu dans l'extrait "soluble" des protéines d'enveloppes. On notera encore que l'augmentation du marquage dans la phosphoprotéine de 26 kDa des membranes internes résulte probablement de l'activité de la protéine-kinase présente dans l'extrait "soluble" des protéines d'enveloppes (Fig.7.1).

La protéine-kinase(s) liée à l'enveloppe, qui est inhibée par H7 et dont l'activité possède une dépendance étroite envers le calcium et les phospholipides (Siegenthaler et Bovet, 1993), pourrait bien faire partie de la superfamille des protéine-kinases C (Ashendel, 1985; Castagna et al., 1982; Nishizuka, 1986; Kikkawa et al., 1989; Bell et Burns, 1991; Hannun et al., 1986; Houslay, 1991; Parker et al., 1992). En effet, plusieurs protéines du chloroplaste sont bien reconnues par des anticorps polyclonaux dirigés, soit contre un peptide de la partie régulatrice des PKCs (Fig.7.4; α -PKC(ab545)), soit contre un mélange des trois formes α , β et γ des protéine-kinases C (Fig.7.7; α -PKC(mix)). Par contre, d'autres anticorps polyclonaux, aimablement fournis par le Dr C.H. Hagedorn de l'Université Van der Bilt de Nashville (USA), qui sont dirigés contre un oligopeptide synthétique (GTPEYLAPE) analogue à une séquence de neuf résidus aminés situés dans le domaine catalytique des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique (Hagedorn et al., 1990), ne reconnaissent aucune protéine du chloroplaste (résultats non montrés). Cependant, nous devons rester prudent dans l'interprétation de tels résultats, car l'utilisation de H7 comme inhibiteur spécifique des protéine-kinases C a récemment été mise à controverse; en effet, ce composé, vu son action directe sur le site actif de l'enzyme (Hidaka et al., 1984), n'est apparemment pas uniquement sélectif pour les PKCs, mais aussi pour beaucoup d'autres protéine-kinases (Nixon et al., 1991; Parker et al. 1992).

Aucune protéine thylacoïdale n'étant révélée par les deux anticorps α -PKC sus-mentionnés, ce résultat montre bien que les protéine-kinases liées aux photosystèmes appartiennent à une catégorie d'enzyme très spécifique (i.e. LHCII-kinase; Coughlan et Hind, 1986, Allen, 1992). Par contre, deux protéines d'enveloppes de Mr 130 et 72 kDa réagissent de façon croisée avec α -PKC(ab545) et une autre de Mr 51 kDa avec α -PKC(mix). Bien que ne présentant aucun signe d'autophosphorylation dans un extrait de membranes internes ou d'enveloppes totales, la protéine de 72 kDa apparaît toutefois comme un bon candidat en vue d'une purification future, car cette protéine abondante (Fig.7.5) est uniquement enrichie dans la fraction d'enveloppes, séparée sur gradient de saccharose, qui phosphoryle le mieux l'Histone (H-III) (Fig.7.6). Les protéines de 130 et 51 kDa n'en restent pas pour autant de moins bons postulants

pour être des protéine-kinases. Il est cependant regrettable, dans le cas de la protéine de 51 kDa, qu'elle ne partage aucun épitope avec la protéine identifiée par Hinz et Flügge (1988) (Fig.7.8; Chapitre 6).

La révélation par immunoblot de protéines du stroma, séparées par électrophorèses bidimensionnelles, montre qu'une bande protéique de Mr 60 kDa (en SDS-PAGE classique) est en fait composée de deux isomères de charges différentes, reconnus spécifiquement par α -PKC(ab545) pour le plus acide et par α -PKC(mix) pour le plus basique. Ces deux polypeptides appartiennent à la famille des chaperonnes moléculaires, car ils réagissent l'un et l'autre à des anticorps dirigés contre les chaperonines chloroplastiques du Pois (Fig.7.11) et de l'Epinard (Chapitre 8) et sont, tous deux, constitutifs d'un oligomère de Mr typique d'environ 800 kDa (Fig.7.9; Gatenby et Ellis, 1990; Hemmingsen, 1990; Pushkin et al., 1982). Le polypeptide le plus acide correspond à la sous-unité α des chaperonines chloroplastiques (cpn-60 α) et l'autre à la sous-unité β (cpn-60 β ; voir Fig.7.11 et "Chapitre 8"). Les séquences polypeptidiques déduites des clones de cADN codant pour les deux sous-unités α et β des chaperonines étant relativement divergentes (*elles ne partagent entre elles que 49% d'identité chez B.napus; Hemmingsen, 1990*), on comprend mieux que deux anticorps polyclonaux dirigés contre différents épitopes propres aux protéine-kinases C animales ne confondent pas les deux formes α et β des chaperonines plastidiales (Fig.7.11).

L'isolement et le séquençage de clones de cADN qui codent pour les sous-unités α des protéines leucoplastiques de *Ricinus communis* et chloroplastiques de *Triticum aestivum* ont permis de démontrer que la sous-unité α des chaperonines est un homologue évolutif de la protéine groEL de *E. coli* (Hemmingsen et al., 1988). La fonction majeure de cette protéine, appelée couramment groEL ou cpn60, est apparemment de stabiliser d'autres protéines non-pliées dans une conformation qui manquerait encore de structure tertiaire ordonnée. D'autres protéines de plus petits Mr (~10 kDa), appelées groES ou cpn10, qui sont capables de se lier électrostatiquement aux groEL, régulent également ce processus (Martin et al., 1991). Vitaanen et al. (1991) ont montré que les phénomènes complexes qui aboutissent à la formation oligomérique et fonctionnelle de certaines protéines sont dépendants de l'ATP et nécessitent la libération de molécules d'ATP fixées de façon transitoire aux chaperonines.

Les chaperonines plastidiales, à l'instar des protéines groEL de *E.coli*, manifestent aussi de faibles mais surprenantes activités ATPasiques, inhibées singulièrement par l'addition de protéines groES (Chandrasekhar et al., 1986). Martel et

al.(1990) ont observé qu'une séquence consensus présente dans la plupart des ATPases identifiées à ce jour (K/RxxxxGxxxxGK(T/G/S)xxxxxxI/V) (Serrano, 1988) se rencontre aussi dans toutes les chaperonines confondues, ceci bien que l'espacement des acides aminés intermédiaires (x) ne soit pas conservé (RVGRKGVVTLEEGKSAEANALYV, par exemple, dans la cpn-60 β de *B.napus*).

En plus d'être reconnue par des anticorps α -PKC (Fig.7.9), une protéine d'environ 800 kDa, correspondant à la forme oligomérique des chaperonines α et β du chloroplaste d'Epinard (Chapitre 8), exhibe clairement des activités protéine-kinasiques puisqu'elle est capable de phosphoryler *in vitro* et dans la matrice d'un gel natif la fraction III-S de l'Histone (Figs 7.2 et 7.10). Suite à ce résultat, nous avons comparé les séquences polypeptidiques complètes des deux chaperonines plastidiales α et β du chou (Martel et al., 1990) avec celle de la protéine-kinase C(β) du cerveau de boeuf (Parker et al. 1986). Dans cette étude, nous nous permettons de confondre les séquences inconnues des chaperonines α et β du chloroplaste d'Epinard avec celles connues de *B.napus* et de *A.thaliana*, car les séquences des cpn60- α déduites des clones de cADN de *T.aestivum* et *B.napus* (Martel et al., 1990) partagent entre elles de fortes homologies (82%), alors que les cpn-60 β possèdent un niveau élevé de conservation (90%) dans toutes les plantes supérieures, conformément au degré d'hybridation élevé des ARNm de différentes plantes avec une sonde de *A.thaliana* (Zabaleta et al., 1992). Ces résultats (non montrés) rapportent que les deux types de protéines confrontées (cpn-60 α ou cpn-60 β avec PKC(β)) ne partagent entre elles qu'un pourcentage très faible d'homologie (~15%), confirmant leur appartenance à deux familles d'origine génomique très différente. Seule une région très semblable de 6 aa, placée en aval de l'aa 358 de la PKC(β)(LSERKG) et en aval de l'aa 280 de la sous-unité β des chaperonines(FGERKS), pourrait être à l'origine de la reconnaissance immunologique croisée mise en évidence sur la figure 7.11, car ces deux séquences sont constituées d'un trio identique d'acides aminés hydrophiles fortement chargés (ERK).

Les analyses de séquences effectuées ci-dessus, montrant l'absence d'homologie entre la PKC et les cpn60 α et β , ont été toutefois affinées afin de déterminer si la phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone (Figs 7.2 et 7.9) est réellement catalysée par la chaperonine elle-même ou bien par une protéine-kinase qui serait assemblée de façon transitoire à l'oligomère de 800 kDa. En effet, il a été démontré que des protéines dont la structure tertiaire n'est pas encore complètement établie se fixent électrostatiquement aux cpn60 ou groEL (Ellis et Van der Vies, 1991;

Viitanen et al., 1991; Gatenby, 1992). Ces études comparatives approfondies révèlent que trois séquences polypeptidiques consensus, qui sont ultraconservées dans la plupart des domaines catalytiques des protéine-kinases séquencées à ce jour (Hanks et al., 1988, Soderling et al., 1990), sont aussi identifiables dans la sous-unité β des chaperonines plastidiales de *B.napus* (Martel et al., 1990); on constate par contre qu'une seule l'est dans la sous-unité α (Tableau 7.1).

PK (consensus)	: (10) GxGxxxxxV	(30) AxKxV	(184) SxGV
Cpn-60 β	: (86) GDGTTTSV	(310) AGKEV	(373) SGGV
		(320) AAKVV	
Cpn-60 α	: (466) GIGGEVVV		

Tableau 7.1. Comparaison de séquences consensus propres aux sites catalytiques des protéine-kinases (PK) avec les séquences des chaperonines α et β de *B.napus* (cpn60).

La position du premier acide aminé du début de chaque séquence par rapport aux extrémités N-terminales des protéines matures est notée entre parenthèses

En conclusion, la sous-unité β des chaperonines du chloroplaste (*B.napus*), reconnue chez l'Épinard par les anticorps α -PKC(mix) et constitutive d'un oligomère de 800 kDa exhibant des activités protéine-kinasiques, dispose d'éléments structuraux (séquence primaire) typiques des protéine-kinases (Tableau 7.1) qui lui confèrent potentiellement beaucoup d'atouts pour être le vecteur d'activités kinasiques dans le chloroplaste. Le fait que les trois suites d'acides aminés consensuelles soient toujours placées en aval de l'extrémité N-terminale corrobore cette hypothèse. Les espacements (x) sont également invariablement conservés. Toutes ces analyses comparatives ont été effectuées par le logiciel GCG (voir "Chapitre 5"), avec la précieuse collaboration du Professeur E. Stutz.

7.5. Bibliographie

- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Ashendel, C.L. (1985) The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 219-242.
- Batley, N.H., (1990) Calcium-activated protein kinase from soluble and membrane fractions of maize coleoptiles. *Biochem. Biophys. Res. comm.* 170: 17-22.
- Bell, M.B., Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 4661-4664.
- Berridge, M.J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205.
- Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 258: 13273-13280.
- Bögre, L., Olah, Z., Dudits, D. (1988) Ca²⁺-dependent protein kinase from alfalfa (*medicago varia*): Partial purification and autophosphorylation. *Plant Sci.* 58: 135-144.
- Cestagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
- Chandrasekhar, G.N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R., Georgopoulos, C. (1986) Purification and properties of the *groES* morphogenetic protein of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 261: 12414-12419.
- Coughlan, S.J., Hind, G. (1986) Purification and characterization of a membrane bound protein kinase from spinach thylakoids. *J. Biol. Chem.* 261: 11378-11385.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 453-508.
- Cortez, N., Lucero, H.A., Vallejos, R.H. (1987) Stromal serine protease protein kinase activity in spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 504-508.
- Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., Ullrich, A. (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling. *Science* 233: 859-868.
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987) Protein serine/threonine kinases. *Arch. Rev. Biochem.* 56: 567-613.
- Einspahr, K.J., Thompson, G.A. (1990) Transmembrane signalling via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in plants. *Plant physiol.* 93: 361-366.
- Ellis, R.J. (1990) Molecular chaperones: the plant connection. *Science* 250: 954-959.
- Ellis, R.J., Hemmingsen, S.M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *TIBS* 14: 339-342.
- Ellis, R.J., van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.

- Elliot, D.C., Kokke, Y.S. (1987) Cross-reaction of a plant protein kinase with antiserum raised against a sequence from bovine brain protein kinase C regulatory sub-unit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1043-1047.
- Exton, J.H. (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265: 1-4.
- Geahlen, R.L., Anostario, M., Low, P.S. and Harrison, M.L., (1986). Detection of protein Kinase activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 153: 151-158.
- Gatenby, A.A. (1992) Protein folding and chaperonins. *Plant Mol. Biol.* 19: 677-687.
- Gatenby, A.A., Ellis, R.J. (1990) Chaperone function: the assembly of ribulose biphosphate carboxylase oxygenase. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 125-149.
- Hagedorn, C.H., Tettelbach, W.H., Panella, H.L. (1990) Development and characterization of polyclonal antibodies against a conserved sequence in the catalytic domain of protein kinases. *FEBS Lett.* 264: 59-62.
- Hanks, S.D.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241: 42-52.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation in mixed micelles. *J. Biol. Chem.* 261: 7184-7190.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334.
- Hemmingsen, S.M. (1990) The plastid chaperonin. *Dans Molecular chaperones*, Ellis R.J. ed, *Seminars Cell Biology* 1, Philadelphia, Saunders, pp 47-54.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23: 5036-5041.
- Hinz, G. and Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- Houslay, M.D. (1991) "Crosstalk": a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* 195: 9-27.
- Hurley, J.H., Dean, A.M., Sohl, J.L., Koshland, D.E., Stroud, R.M. (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249: 1012-1016.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., Nishizuka, Y. (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257: 13341-13348.
- Kikkawa, U., Kitano, T., Saito, N., Kishimoto, A., Taniyama, K., Tanaka, C., Nishizuka, Y. (1986) Role of protein kinase C in calcium mediated signal transduction. *Dans Calcium and the cell*, Ciba Foundation Symposium 122, Wiley, Chichester, pp 197-211.
- Kikkawa, U., Kishimoto, A., Nishizuka, Y. (1989) The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 31-44.
- Klucis, E., Polya, G.M. (1988) Localization, solubilization and characterization of plant membrane-associated calcium-dependent protein kinases. *Plant Physiol.* 88: 164-171.
- Martel, R., Cloney, L.P., Pelcher, L.E., Hemmingsen, S.M. (1990) Unique composition of plastid chaperonin-60: alpha and beta polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene* 94: 181-187.

- Martin, J., Langer, T., Bateva, R., Schramel, A., Horwich, A.L., Hartl, F.U. (1991) Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature*, 352: 36-42.
- Machly-Rosen, D., Koshland, D.E. (1987) Domain structure and phosphorylation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262: 2291-2297.
- Musgrave, J.E., Johnson, R.A., Ellis, R.J. (1987) Dissociation of the ribulose bisphosphate-carboxylase large-subunit binding protein into dissimilar subunits. *Eur. J. Biochem.* 163: 529-534.
- Nguyen, T.D., Miquel, M., Dubacq, J.P., Siegenthaler, P.A. (1987) Localization and some properties of a Mg²⁺-dependent ATPase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Sci.* 50: 57-63.
- Nishizuka, Y. (1988) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312.
- Nixon, J.S., Wilkinson, S.E., Davis, P.D., Sedgwick, A.D., Wadsworth, J., Westmacott, D. (1991) Modulation of cellular processes by H7, a non-selective inhibitor of protein kinases. *Agents and Actions* 32: 188-193.
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* 233: 853-859.
- Parker, P.J., Cook, P.P., Olivier, A.R., Pears, C., Ways, D.K., Webster, C. (1992) Second messenger systems as pharmacological targets. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 415-418.
- Pushkin, A.V., Tsuprun, V.L., Solovjeva, N.A., Shubin, V.V., Evstigneeva, Z.G., Kretoich, W.L. (1982) High molecular weight pea leaf protein similar to the groE protein of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 704: 379-384.
- Roskaski, R., (1983) Assays of protein kinase. *Methods in enzymology*. 99 (part F-CH.1): 3-8.
- Ruffieux, L. (1991) Contribution à l'étude de la phosphorylation des lipides des membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. Travail de certificat au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- Sasaki, K., Sekiguchi, K., Nagano, Y., Matsuno, R. (1991) Detection of small GTP-binding proteins in the outer envelope membrane of pea chloroplasts. *FEBS* 293: 124-126.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 1-28.
- Shenolikar, S., Nairn, A.C. (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Dans Advances in second messenger and phosphoprotein research* vol. 23, Greengard and Robison eds, Raven Press, New York.
- Siegenthaler, P.A., Bovet, L. (1993) A unique protein-kinase activity is responsible for the phosphorylation of the 26- and 14-kDa proteins but not of the 67-kDa protein in the chloroplast envelope membranes of spinach. *Planta* 190: 231-240.
- Siegenthaler, P.A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, Thylakoid and strama polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.
- Soderling, T.R. (1990) Protein kinases. *J. Biol. Chem.* 265: 1823-1826.
- Soll, J. (1988) Purification and characterization of a chloroplast outer-envelope-bound, ATP-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 87: 898-903.
- Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldschmidt, E.J., Stuart, D.I., Varvill, K., Fletterick, R.J., Madsen, N.B., Johnson, L.N. (1988) Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336: 215-221.

Taylor, S.S. (1989) cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 264: 8443-8446.

Trewavas, A., Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. *TIG* 7: 356-360.

Valtorta, F., Schieblar, W., Jahn, R., Ceccarelli, B., Greengard, P. (1986) A solid-phase assay for the phosphorylation of proteins blotted on nitrocellulose membrane filters. *Anal. Biochem.* 158: 130-137.

Viitanen, P.V., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H., Lubben, T.H., Gatanby, A.A. (1991) Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase. *Biochem.* 30: 9716-9723.

Zabaleta, E., Oropeza, A., Jimenez, B., Salerno, G., Crespi, M., Herrera-Estrella, L. (1992) Isolation and characterization of genes encoding chaperonin 60 beta from *arabidopsis thaliana*. *Gene* 111: 175-181.

Zabrenatzky, V.S, Bruckwick, E., Lovenberg, W. (1981) Calcium stimulation of protein kinase C in the absence of added phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 135-141.

CHAPITRE 8

Rôle possible des protéines "heat-shock" comme catalyseurs d'activités protéine-kinasiques

8.1. Introduction

Dans les cellules animales 80% du pool global des protéine-kinases C baignent dans le cytosol, alors que les 20% restant sont fixés aux membranes cytoplasmiques (Kraft et Anderson, 1983). Seules les protéine-kinases C liées aux membranes sont actives, car leurs zones régulatrices s'attachent aux membranes par l'intermédiaire du calcium, de phorbolesters et de lipides membranaires (phosphatidylsérine ou diacylglycérol), libérant ainsi le site catalytique de l'enzyme (Ashendel, 1985). Au vu des résultats présentés dans le chapitre 7, qui montrent qu'une préparation de protéines hydrophiles d'enveloppes (fractionnement au Triton X-114) est capable de phosphoryler à la fois des protéines d'enveloppes (26 kDa) et la fraction III-S de l'Histone, nous sommes tentés de postuler que des protéine-kinases solubles, probablement proches des PKC (voir "Chapitre 3 et 7"), ont pour cible des protéines de l'enveloppe du chloroplaste. Par analogie aux PKC, ces protéine-kinases chloroplastiques seraient, par conséquent, plutôt présentes dans les compartiments solubles qui jouxtent les enveloppes (stroma ou espace intermembranaire de l'enveloppe), et actives seulement sur les faces interne et externe de la membrane interne, voire sur la face interne des membranes externes. Cette hypothèse est tout à fait vraisemblable puisque plusieurs protéines de l'enveloppe ou du stroma (130, 72, 60 et 51 kDa) sont reconnues par des anticorps anti-PKC (Chapitre 7).

Les chaperonines chloroplastiques, qui empêchent la formation de structures incorrectes au cours de l'assemblage de protéines oligomériques (Ellis et Hemmingsen, 1989), catalysent apparemment aussi la fixation de phosphate sur l'histone à partir d'ATP (Chapitre 7). Cette nouvelle fonction surprenante des chaperonines, associée aux homologies de séquences existant entre la sous-unité β des chaperonines et les protéine-kinases C (Chapitre 7), nous ont incité à purifier partiellement de ces protéines "heat-shock", pour étudier plus en profondeur leurs effets sur la phosphorylation des protéines de l'enveloppe.

8.2. Buts du chapitre

Tout d'abord, nous purifierons les protéines du stroma qui se fixent par affinité sur des billes d'agarose-ATP et déterminerons leur Mr par SDS-PAGE.

Deuxièmement, nous les caractériserons immunologiquement, en élevant des anticorps polyclonaux contre chacune d'elles.

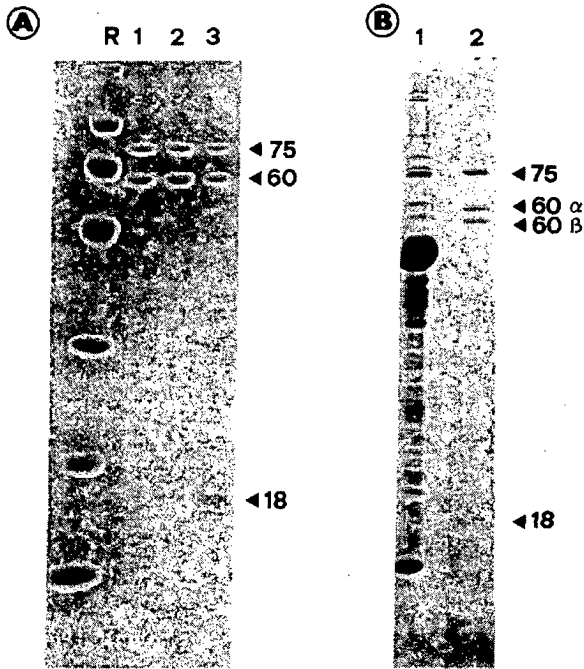
Troisièmement, nous tenterons de déterminer le(s) rôle(s) joué(s) par ces protéines sur la phosphorylation des protéines de l'enveloppe.

Enfin, nous étudierons l'incorporation du ^{32}P dans les protéines d'enveloppes et dans les protéines du stroma isolées par agarose-ATP, en présence de protéine-kinase C.

8.3. Résultats

8.3.1. Caractérisation immunologique des protéines du stroma purifiées par affinité sur des billes d'agarose-ATP

Dans le but d'enrichir une fraction chloroplastique en protéines "heat-shock", nous avons incubé les protéines du stroma en présence de billes d'agarose-ATP (voir "Matériels et méthodes"). Cette méthode permet de purifier partiellement les protéines homologues des HSP70 ("Heat Shock Protein 70"), présentes dans le stroma des chloroplastes des plantes supérieures (Marshall et Keegstra, 1992). Le gel de la figure 8.1A révèle que trois lavages successifs des billes (colonnes 1, 2 et 3), avec une solution contenant 3 mM MgATP, libèrent distinctement trois protéines solubles du chloroplaste d'Epinard. Après une électrophorèse en présence de SDS, ces protéines, qui possèdent une forte affinité électrostatique pour l'ATP, exhibent des Mr d'environ 75, 60 et 18 kDa. On notera que les protéines de 75 et 60 kDa apparaissent déjà après le premier lavage des billes (Fig.8.1A, colonne 1), alors que celle de 18 kDa n'est libérée distinctement qu'après le troisième lavage (Fig.8.1A, colonne 3).



Figs 8.1 A-B. Séparation par électrophorèse (SDS-PAGE) de protéines chloroplastiques solubles (provenant du stroma) isolées par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-ATP

Les protéines ont été séparées du stroma par affinité sur billes d'agarose-ATP, comme indiqué dans "Matériels et méthodes". Après trois lavages successifs des billes avec 3 mM MgATP, une quantité correspondant à 1 µg de protéines éluées (colonnes 1, 2 et 3) ont été séparées par SDS-PAGE 13% tout comme des protéines de référence (R). Le gel a été ensuite coloré au bleu de Coomassie (R, colonnes 1, 2 et 3; A). Les flèches (→) indiquent la position dans le gel A des protéines de 75, 60 et 18 kDa. Dans une autre expérience (gel B), les protéines collectées après le lavage des billes ont été rassemblées. Une quantité correspondant à 1 µg de protéines (colonne 2; B) ont été séparées par "SDS-PAGE 15%" et colorée au bleu de Coomassie; (le gel de séparation est composé ici d'une solution d'acrylamide/bisacrylamide de rapport plus élevé que la normale (25:0.25)). Comme contrôle, des protéines de stroma (20 µg) ont été également séparées dans ce même gel (colonne 1; B). Les flèches (→) indiquent la position dans le gel B des protéines de 75, 60α, 60β et 18 kDa.

Concernant l'origine génomique de la protéine de 75 kDa, on sait, d'après des analyses immunologiques approfondies (Bovet et al., 1990; Dumont, 1991; J. Marshall, Université du Wisconsin, USA, communication personnelle), qu'elle est très proche d'une protéine identifiée et caractérisée dans le stroma du chloroplaste de pois par Marshall et al. (1990) et Marshall et Keegstra (1992). Cette protéine du Pois est l'homologue d'une catégorie de protéines "heat-shock" de 70 kDa (abrégée: HSP70), présentes dans les mitochondries (Craig et al., 1989; Leustek et al., 1989), les chloroplastes (Amir-shapira et al., 1990) et le réticulum endoplasmique (Munro et Pelham, 1986) des cellules

eucaryotes. Chez les procaryotes, la protéine analogue est désignée par l'abréviation DnaK (Morimoto et al. 1990). Cette catégorie de protéines est localisée dans tous les compartiments cellulaires, puisque récemment un clone de cADN codant pour une protéine de la famille des HSP70 appartenant à l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard a même été séquencé (Ko et al., 1992).

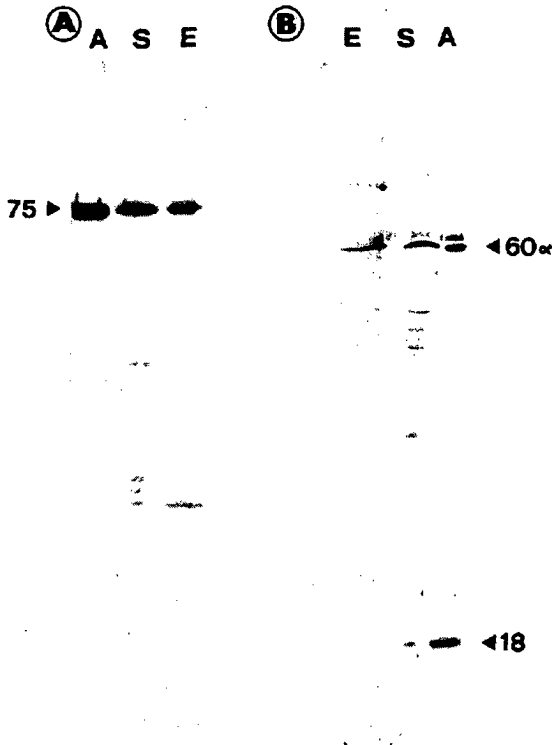
Vu sa forte affinité pour l'ATP (Goloubinoff et al., 1989), la protéine de 60 kDa pourrait, par contre, appartenir à la famille des HSP60 (GroEL) ou chaperonne moléculaire (Vierling, 1991; Ellis, 1990), alors qu'à notre connaissance la structure et la fonction de la protéine de 18 kDa n'ont pas encore été répertoriées dans la littérature.

Pour préciser la nature de la protéine de 60 kDa, nous avons soumis la fraction purifiée par agarose-ATP à une électrophorèse dénaturante un peu particulière, puisque le gel-SDS est ici préparé à partir d'une solution de polyacrylamide à pourcentage plus bas de bisacrylamide (25:0.25; Hemmingsen et Ellis, 1986). Ce type de gel ("*SDS-PAGE 15%*") permet de séparer les deux sous-unités α et β des chaperonines chloroplastiques du Pois (appelées précédemment "protéines liant la grande sous-unité de la carboxylase"; Musgrove et al., 1987). La coloration du gel au bleu de Coomassie montre que la protéine de 60 kDa est effectivement dissociée en deux sous-unités α et β , alors que les protéines de 75 et 18 kDa ne le sont pas.

Pour caractériser immunologiquement ces quatre protéines, nous avons dirigé spécifiquement des anticorps polyclonaux contre chacune d'elles. Les antigènes ont été préparés comme indiqué dans "Matériels et méthodes", à partir d'extraits de stroma purifiés sur billes d'agarose-ATP puis séparés par "*SDS-PAGE 15%*" (voir Fig.8.1B).

La figure 8.2A révèle que l'anticorps α -75 kDa réagit bien avec la protéine de 75 kDa contenue dans le stroma (S), la fraction enrichie par chromatographie d'affinité (A), mais aussi dans une préparation d'enveloppes (E). L'anticorps est bien spécifique, puisqu'aucune autre protéine du stroma ne réagit avec lui. Cet anticorps-là, que nous avons donné à Marshall et Keegstra (1992), a permis à ces auteurs d'isoler et de séquencer un clone de cADN codant pour une protéine homologue dans le stroma du Pois. Ce clone de cADN code pour une protéine de 75'490 Da, qui est très proche des HSP70 présentes chez les cyanobactéries (*Synechocystis*) et différentes algues chlorophylliennes.

D'autre part, on constate que l'anticorps α -18kDa reconnaît bien une protéine de 18 kDa dans le stroma (S) et la fraction enrichie en protéines liant l'ATP (A), mais pas dans l'enveloppe (E; Fig.8.2B). Cependant, cet antisérum réagit de façon croisée avec une protéine de 60 kDa dans les trois fractions examinées. Des analyses par Westernblot, effectuées ultérieurement à partir de gels à rapports plus élevés d'acrylamide/bisacrylamide (voir "Fig.8.1") ou IEF x SDS-PAGE, montrent que cette protéine de 60 kDa correspond à la sous-unité α des chaperonines (résultats non présentés).



Figs 8.2 A-B. Révélation par Westernblot des protéines de 75 kDa (HSP70) et 18 kDa à l'aide d'anticorps polyclonaux monospécifiques

Les entisérum (dilution 1/200) dirigés contre les protéines de 75 (A) et 18 kDa (B)(voir Fig.8.1B) et préparés comme indiqué dans "Matériels et méthodes", ont été incubés par immunoblot sur trois fractions de protéines chloroplastiques séparées par SDS-PAGE: des protéines solubles purifiées par agarose-ATP (3 μ g; A), des protéines stromatiques (25 μ g; S) et d'enveloppes (25 μ g; E). Les flèches (\blacktriangleright \blacktriangleleft) indiquent la position dans le gel des protéines de 75, 60 α et 18 kDa détectées immunologiquement sur le papier de nitrocellulose.

Les antisérums élevés spécifiquement contre chacune des deux sous-unités α et β des chaperonines (60 α et 60 β) reconnaissent parfaitement ces deux protéines (colonne A, Figs 8.3A-B). Ces deux protéines contaminent fortement les préparations d'enveloppes (colonne E), mais non de membranes thylacoïdales (colonne T; Figs 8.3A-B). En outre, il est remarquable de constater que l'anticorps polyclonal anti-60 α ne reconnaît pas la chaperonine β , et que vice-versa le sérum anti-60 β ne réagit pas avec la sous-unité α . De tels résultats n'ont pas été obtenus par Musgrove et al. (1987) pour les deux sous-unités présentes dans le stroma du chloroplaste de Pois, puisque leurs anticorps respectifs, vraisemblablement mal préparés mais élevés cependant comme les nôtres, ne réagissent pas spécifiquement sur chacun des deux polypeptides mais de façon parfaitement croisée. Par contre, nos analyses immunologiques sont en parfait accord avec les résultats obtenus par Martel et al. (1990), puisque ces auteurs démontrent que les séquences en acides aminés déduites des clones de cADN codant pour les chaperonines α et β de *Brassica napus* ne partagent entre elles qu'environ 50% d'homologie (voir "Chapitre 7). Des anticorps dirigés contre la protéine GroEL de *Synechocystis* (aimablement fournis par les docteurs L. Vigh et C. Lehel de l'Académie des Sciences de Hongrie, Szeged) reconnaissent aussi très bien les deux sous-unités des chaperonines d'Epinaud (Fig.8.3C; colonne A), au même titre que d'autres anticorps, gracieusement fournis par le professeur R.J. Ellis et dirigés contre un mélange des chaperonines α et β du chloroplaste de Pois (résultats non montrés; voir "Fig.7.11, Chapitre 7").



Figs 8.3 A-B-C. Révélation par Westemblot des chaperonines α et β du chloroplaste d'Epinaud à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre chacune d'elles et contre la protéine GroEL de *Synechocystis*

Les anticorps (dilution 1/200) dirigés contre les chaperonines α (A) et β (B) ont été préparés comme indiqué dans "Matériels et méthodes", à partir de protéines du stroma purifiées par agarose-ATP et préalablement séparées par "SDS-PAGE 15%" (voir "légendes de la Fig.8.1"). Les protéines d'enveloppes (E), du stroma (S), des thylacoïdes (T) (25 μ g) et de la fraction de protéines du stroma isolée par agarose-ATP (A; 3 μ g) ont été révélées par immunoblot en présence des deux anticorps. Comme contrôle les chaperonines chloroplastiques présentes dans la fraction agarose-ATP (A) ont été révélées par un anticorps (dilution 1/200) dirigé contre la protéine groEL de *Synechocystis* (C). Les flèches (\blackleftarrow) indiquent la position dans le gel des cpn60 α et cpn60 β détectées immunologiquement sur le papier de nitrocellulose. Les points rappellent leur position sur les immunoblots A et B.

Les sérums préimmuns, récoltés avant l'injection des lapins avec les protéines de 75, 60 α , 60 β et 18 kDa, sont tous négatifs et ne réagissent pas ou que très faiblement avec les protéines du chloroplaste (résultats non montrés).

Dans le but d'estimer le poids moléculaire des protéines natives enrichies par affinité sur billes d'agarose-ATP, nous les avons séparées sur gel non-dénaturant (gradient de polyacrylamide 4-30%), puis révélées par immunoblot (Figs 8.4 et 8.5). La coloration du gel au bleu de Coomassie montre que trois oligomères principaux d'environ 800, 200 et 140 kDa sont constitutifs de l'extrait purifié par agarose-ATP (Fig.8.4, colonne A). On notera que la protéine de Mr la plus élevée n'est parfois pas présente dans cet extrait (résultats non présentés) et que les protéines du stroma, séparées sur le même gel, exhibent aussi ces trois bandes de même Mr (Fig.8.4, colonne S).

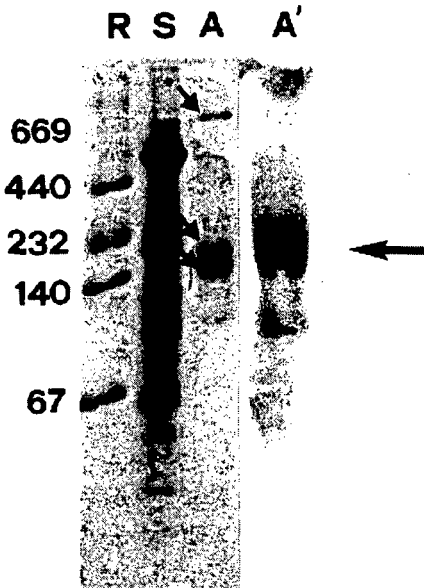
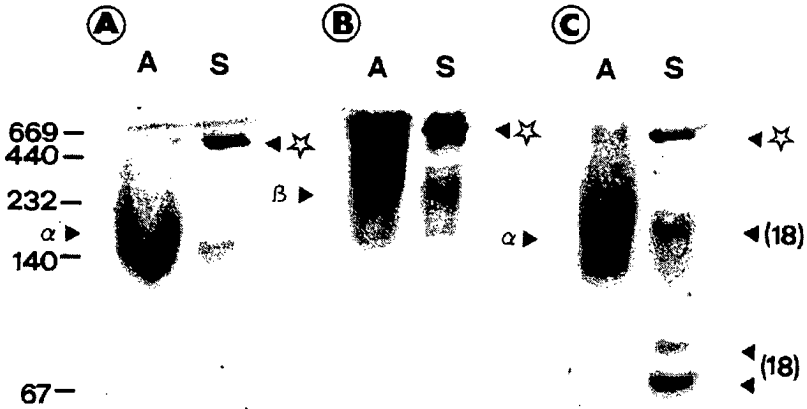


Fig.8.4. Séparation des protéines du stroma par électrophorèse non dénaturante, et détermination du Mr natif de la protéine de 75 kDa (HSP70) par immunoblot.

Les protéines du stroma (S; 60 μ g), de la fraction isolée sur billes d'agarose-ATP (A; 7.5 μ g) et de référence (R) ont été séparées sur gel natif 4-30%, puis colorées au bleu de Coomassie (voir "Matériels et méthodes"). Juste après l'électrophorèse, la colonne A (qui correspond à la colonne A) a été révélée par immunoblot à l'aide de l'anticorps (α -75 kDa) dirigé contre l'homologue de la protéine "heat-shock" de 70 kDa présente dans le stroma du chloroplaste d'Epineard (dilution 1/200). Le poids moléculaire des protéines de référence est mentionné sur la gauche, alors que les protéines de ~800, 200 et 140 kDa sont signalées par des flèches.

Les analyses immunologiques révèlent que les anticorps α -75 kDa (HSP70) réagissent bien avec la protéine native de 140 kDa de la fraction purifiée sur billes d'agarose-ATP (Fig.8.4, colonne A) et du stroma (Bovet et al., 1990). *Notons que la protéine de 140 kDa diffuse passablement dans un gel natif.* Les trois autres anticorps, α -cpn60 α , α -cpn60 β et α -18kDa, reconnaissent dans un extrait de stroma une protéine oligomérique d'environ 800 kDa (Figs 8.5A-B-C, colonne S (étoile)). Cette protéine de haut Mr est un oligomère formé autant par les chaperonines du chloroplaste d'Epinard, que celles du Pois ("Chapitre 7"; Hemmingsen et Ellis, 1986). *Les anticorps α -18 kDa se fixent également sur trois autres protéines du stroma avoisinant des Mr de 160, 85 et 67 kDa (Fig.8.5C, colonne S, flèches (18)).* Par contre, le profil des protéines révélées par Westernblot dans l'extrait purifié par agarose-ATP (Fig.8.4, colonne A) diffère sensiblement pour les trois anticorps puisqu'une protéine d'environ 130-200 kDa est reconnue par les α -cpn60 α et α -18 kDa, alors qu'une autre de Mr>200 kDa l'est par les α -cpn60 β (Figs 8.5A-B-C). *La mauvaise définition des bandes révélées par immunoblot trouve son origine dans la résolution médiocre des protéines natives sur gel non-dénaturant.*

Ces résultats immunologiques montrent que la protéine de 75 kDa (HSP70) migre dans un gel natif à ~140 kDa et les chaperonines α et β à 800 kDa. La purification par agarose-ATP induit sur les chaperonines α et β une rupture des affinités électrostatiques, puisque les deux protéines possèdent ainsi des Mr natif différents de respectivement 130-200 kDa et >200 kDa. Concernant la protéine de 18 kDa, son poids moléculaire natif est plus difficile à établir.



Figs 8.5 A-B-C Estimation du Mr natif des protéines de 60 kDa (chaperonines α et β) et 18 kDa
 Les protéines du stroma (S) et de la fraction isolée sur billes d'agarose-ATP (A) ont été séparées sur gel natif 4-30%, puis révélées, par immunoblot, à l'aide d'une dilution 1/100 des anticorps suivants: anti-chaperonines α (A), anti-chaperonines β (B) et anti-18 kDa (C). Le poids moléculaire des protéines de référence est mentionné sur la gauche et la position de la protéine du stroma reconnue indifféremment par les trois anticorps à l'aide d'une étoile. α , β et (18) indiquent la position dans le gel des protéines révélées par chacun des trois anticorps sur l'immunoblot.

8.3.2. Détermination du rôle joué par les protéines du stroma, purifiées par affinité sur des billes d'agarose-ATP, sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes

La sous-unité β des chaperonines qui dispose de séquences en acides aminés la rapprochant des protéine-kinases animales peut, sous sa forme oligomérique, phosphoryler *in vitro* la fraction III-S de l'Histone (Chapitre 7). Vu sa présence dans la fraction des protéines stromatiques purifiées sur billes d'agarose-ATP (Figs 8.1 et 8.3), nous avons mesuré, dans l'expérience qui suit, l'effet de cet extrait sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes. Après SDS-PAGE, l'autoradiographie du gel révèle les points suivants (les protéines solubles du chloroplaste d'*Epinard* à forte affinité pour

l'ATP (1 µg) ne sont, ici, que faiblement colorées au bleu de Coomassie (Fig.8.6, colonne 3), par opposition aux protéines d'enveloppes (Fig.8.6, colonne 1)):

(1) Le profil des protéines phosphorylées dans l'enveloppe correspond tout à fait à celui décrit dans le chapitre 3 (Fig.8.6, colonne 1').

(2) Les protéines de 75(HSP70) et 18 kDa du stroma, purifiées sur les billes d'agarose-ATP, sont fortement phosphorylées, alors que les sous-unités des chaperonines (60 kDa) ne le sont pas (Fig.8.6, colonne 3').

(3) Les protéines "heat-shock" séparées du stroma par agarose-ATP stimulent de 30 et 35% l'incorporation du ³²P dans les protéines de 26 et 14 kDa de l'enveloppe. Elles n'ont, par contre, aucun effet sur le marquage des autres protéines de 67, 56, 32 et 23 kDa (comptage des cpm effectué par la méthode de Cerenkov; Fig.8.6, comparer les colonnes 1' et 2'). Concernant la protéine de 51 kDa, les résultats semblent indiquer que le marquage dans cette protéine est stimulé par la fraction agarose-ATP. *L'incorporation inchangée dans la protéine de 67 kDa, en présence ou en l'absence de protéines purifiées par agarose-ATP, certifie que nous avons complètement éliminé, par lavage, tout le MgATP libre (voir "Chapitre 3"). L'addition d'une quantité inférieure (0,5 µg) ou supérieure (2 µg) de protéines purifiées par agarose-ATP ne stimule pas de façon aussi marquante la phosphorylation dans les protéines de 26 et 14 kDa et n'a toujours aucun effet sur le marquage des protéines de 67, 56, 32 et 23 kDa (résultats non présentés).*

(4) La seule phosphoprotéine d'enveloppes dont le marquage est singulièrement inhibé par les protéines purifiées par agarose-ATP, possède un Mr d'environ 40 kDa (Fig.8.6, comparer les colonnes 1' et 2').

(5) La phosphorylation des protéines de 75 et 18 kDa (colonne 3') est complètement annihilée par l'addition de membranes d'enveloppes (Fig.8.6, comparer les colonnes 2' et 3').

En conclusion, ces résultats suggèrent que les protéines de 75 et 18 kDa s'autophosphorylent sous formes isolées, alors qu'elles agissent peut-être comme catalyseurs de la phosphorylation des protéines de 26 et 14 kDa de l'enveloppe.

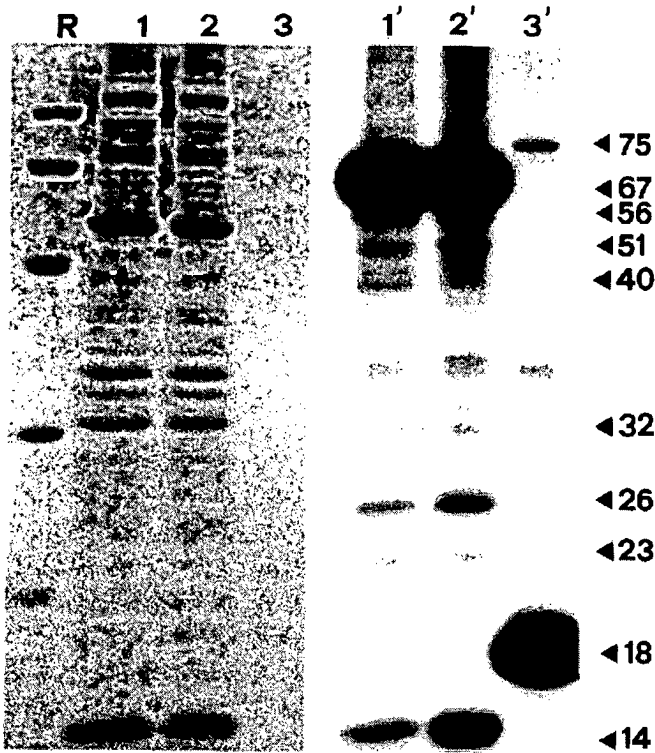


Fig.8.6. Effet des protéines du stroma isolées par agarose-ATP sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes

Des quantités correspondant à 30 µg de protéines d'enveloppes (colonnes 1, 1'), 1 µg de protéines du stroma purifiées par agarose-ATP (lavées préalablement trois fois avec MOPS-NaOH pH 7.6 sur concentrateur Centricon-10 (Centricon), afin d'éliminer le MgATP libre; colonnes 3, 3') et les deux mélangées (colonnes 2, 2') ont été phosphorylés dans des conditions standard en présence de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP. Ces fractions ont été ensuite séparées sur gel-SDS et autoradiographiées. Les colonnes 1, 2 et 3 montrent les protéines colorées au bleu de Coomassie, alors que les colonnes 1', 2' et 3' correspondent à l'autoradiographie du gel. Le poids moléculaire des principaux phosphopolypeptides est indiqué à droite (*).

Pour tenter de démontrer cette éventualité, nous avons séparé par chromatographie sur gel (Superose 12; FPLC; Pharmacia) les protéines du stroma isolées sur billes d'agarose-ATP, avant de les phosphoryler en absence ou en présence de membranes d'enveloppes ou de la fraction III-S de l'Histone. Les séparations de protéines par FPLC ont été réalisées avec l'aide précieuse du Dr. P. Schürmann de l'Université de Neuchâtel.

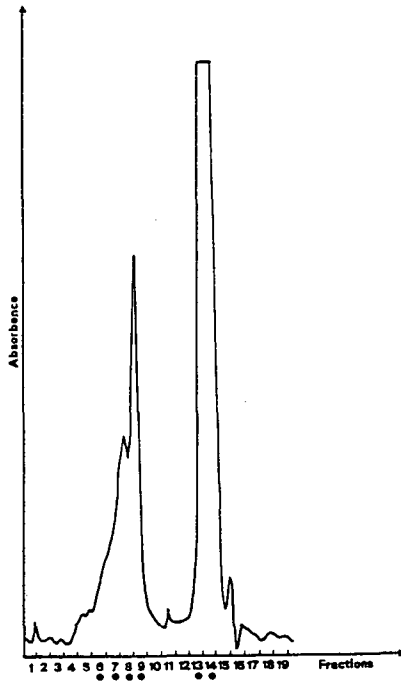


Fig.8.7. Tamisage moléculaire sur colonne Superose 12 (FPLC, Pharmacia) de protéines isolées préalablement du stroma par affinité sur billes d'agarose-ATP

Après deux lavages sur concentrateurs Centricon-10 en présence de MOPS-NaOH pH 7.6 (afin d'éliminer le MgATP libre, voir "Matériels et méthodes"), les protéines purifiées par affinité sur billes d'agarose-ATP (~100 µg) ont été séparées par chromatographie sur gel (FPLC, colonne Superose 12, Pharmacia) dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 7.6 et 150 mM NaCl (flux 0.5 ml/min). Des fractions protéiques de 1 ml (abscisse) ont été collectées automatiquement après la détection du profil chromatographique à 280 nm (ordonnée).

La figure 8.7 montre le profil des protéines après le tamisage moléculaire sur colonne Superose 12. La courbe de calibration (M_r) de la colonne a été établie à partir de: bleu de dextrane (2'000 kDa), immunoglobuline (155 kDa), albumine sérique de boeuf (66 kDa), anhydrase carbonique, aprotinine (6 kDa), vitamine B12 (1.32 kDa) et cytidine (0.243 kDa). Elle permet d'estimer le poids moléculaire des composés séparés dans les pics détectés à la sortie de la colonne (fractions 7, 8 et 13). Les protéines de ces trois pics ont des M_r approximatifs et respectifs d'environ 140, 84 et 4,3 kDa.

Pour déterminer la nature des protéines extraites de la colonne, nous avons séparé par SDS-PAGE 13% un aliquote récolté dans chacune des huit fractions les plus intéressantes, soit celles portant les numéros 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15 et 16 (voir figure 8.7). La coloration du gel au bleu de Coomassie révèle que la protéine de 75 kDa (HSP70) est présente dans les fractions 7 et 8, les protéines de 60 kDa (cpn60 α et β) dans la fraction 8 et enfin la protéine de 18 kDa dans la fraction 9 (Fig.8.8). Le pic majeur chevauchant essentiellement les fractions 13 et 14 (Fig.8.7) ne contient aucun polypeptide marquant (même dans le front de migration); seules deux bandes très diffuses de Mr avoisinant 25 et 14 kDa sont détectées dans la fraction 13.

6 7 8 9 10 13 14 15 16 R

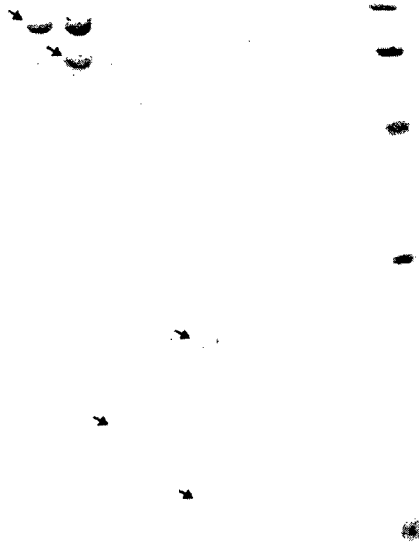
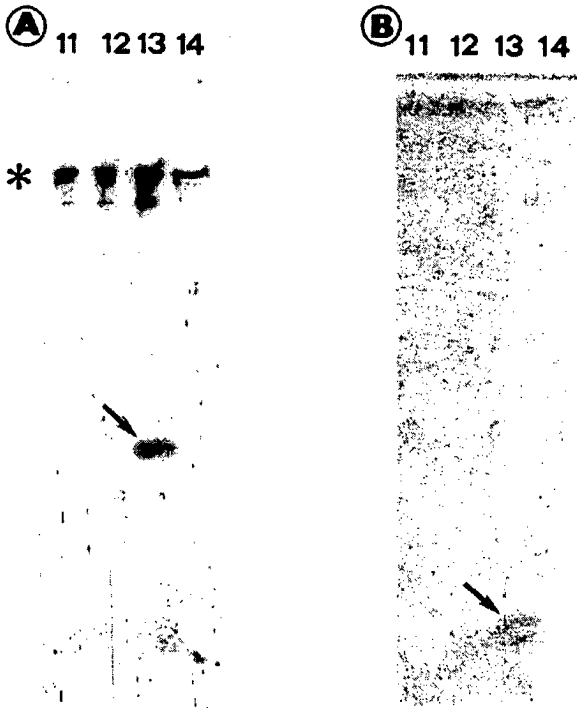


Fig.8.8. Séparation par SDS-PAGE 13% des fractions 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, collectées après le tamisage moléculaire des protéines du stroma purifiées sur billes d'agarose-ATP. Après la précipitation à l'acétone 80% (v/v, -20°C) d'un aliquote de 200 μ l de chacune des fractions séparées par chromatographie sur gel (Superose 12, FPLC, voir "Fig.8.7"), les protéines ont été séparées par SDS-PAGE 13% et colorées au bleu de Coomassie. Les colonnes 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 et R correspondent respectivement aux fractions récoltées et aux protéines de référence. La position dans le gel des protéines colorées au bleu de Coomassie est signalée par des flèches.

L'absence de protéines dans les fractions 13 et 14 nous a singulièrement surpris. Quelle est donc la molécule qui absorbe aussi fortement dans l'UV (280 nm) et qui n'est pas de nature peptidique? Nous avons immédiatement pensé à de l'ATP, car cette molécule détient à la fois la propriété de se fixer aux homologues des protéines "heat-shock" du chloroplaste (Amir-shapira, 1990) et d'absorber en UV. Comme le pic d'absorbance de l'ATP ne se situe, en fait, pas à 280 nm, mais à 260 nm, nous avons déterminé le spectre UV de la fraction 13 de 240 à 300 nm. Le profil de celui-ci montre que le composé générant ce pic absorbe exactement à 260 nm (résultat non montré). Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'ATP, nous avons également mesuré, au moyen du test luciférine/luciférase (voir solutions et protocoles de bioluminescence mis au point par Boehringer/mannheim), l'effet d'une Apyrase de pomme de terre (Sigma A-6132) sur un aliquote de la fraction 13. Cette expérience montre que la molécule présente dans les fractions 13 et 14 est parfaitement hydrolysée par l'Apyrase; ce qui prouve sans équivoque que cette molécule est bien de l'ATP (résultats non montrés).

Pour caractériser les bandes protéiques diffuses d'environ 25 et 14 kDa présentes dans la fraction 13 contenant l'ATP libre (Figs 8.7 et 8.8), nous avons soumis les fractions 11, 12, 13 et 14 à une révélation par immunoblot en présence d'anticorps dirigés contre la forme de bas Mr du LHCII (α -LHCII_B, Chapitre 5) et contre la RubisCO (anticorps aimablement fournis par le Dr. P. Schürmann de l'Université de Neuchâtel). Nous avons choisi ces anticorps, car les Mr des protéines cibles sont très proches des protéines de 26 et 14 kDa dont nous avons parlé dans les chapitres 3 et 5. De plus, certaines protéines importées dans le chloroplaste (par exemple, le LHCII et la petite sous-unité de la RubisCO) sont apparemment prises en charge par des protéines "heat-shock", avant et après leur translocation dans l'organite (Wæegmann et al., 1990; Yalovsky et al., 1992; Gatenby, 1992). Les résultats révèlent, sans ambiguïté, que les protéines de 25 et 14 kDa, présentes dans la fraction 13, sont reconnues respectivement par les anticorps α -LHCII_B (Fig.8.9A, colonne 13) et α -RubisCO (Fig.8.9B, colonne 13). On peut déduire de cette expérience que des molécules de LHCII et de petite sous-unité de la RubisCO sont libérées des protéines stromatiques purifiées par agarose-ATP en même temps que de l'ATP.

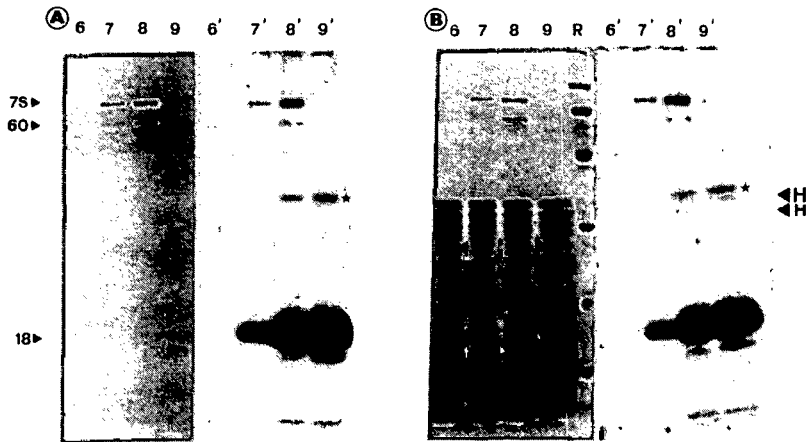


Figs 8.9 A-B. Mise en évidence par Westernblot du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO dans la fraction 13

Des aliqotes (130 μ l) de chacune des fractions 11, 12, 13 et 14 (voir "Fig.8.7") ont été précipités à l'acétone 80% (v/v, -20°C), puis séparés par SDS-PAGE 13%. Les protéines ont été ensuite révélées par Westernblot en présence d'une dilution 1/100 d'anticorps α -LHCII (A) et α -RubisCO (B). Les flèches indiquent la position des protéines reconnues sur le papier de nitrocellulose et * la présence d'une réaction non-spécifique du sérum anti-LHCII sur une bande de 67 kDa, correspondant vraisemblablement à de la kératine (A).

Les fractions 6, 7, 8 et 9, récoltées après le tamisage moléculaire sur Superose 12 (voir Fig.8.7), ont été lavées sur cellules Centricon-10 et phosphorylées dans des conditions standard en absence (Fig.8.10A) ou en présence d'Histone III-S (Fig.8.10B). Après SDS-PAGE, les fractions colorées au bleu de Coomassie (Fig.8.10A, gauche) sont tout à fait conformes à celles observées précédemment (Fig.8.8). L'autoradiographie du gel (Fig.8.10A, droite) révèle que la protéine homologue des HSP70 (75 kDa), enrichie dans les fractions 7 et 8, est bien phosphorylée, surtout dans la fraction 8 où elle est d'ailleurs la plus abondante (Fig.8.10A, gauche). Par contre, les chaperonines 60 α et β (60 kDa), confinées presque essentiellement dans la fraction 8 (Fig.8.10A, gauche), n'incorporent que très faiblement du 32 P (Fig.8.10A, colonne 8').

La protéine de 18 kDa subit cependant une phosphorylation spectaculaire (Fig.8.10A, droite). L'intensité de son marquage semble proportionnelle à son abondance relative (bleu de Coomassie) dans les fractions analysées (Fig.8.10A, gauche). On notera encore qu'une protéine d'environ 33 kDa (*), de très faible abondance dans les fractions 8 et 9 (vu quelle n'est pas colorée au bleu de Coomassie, Fig.8.10A, gauche), incorpore aussi efficacement du ^{32}P à partir de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP (Fig.8.10A, droite).



Figs 8.10 A-B. Phosphorylation des protéines contenues dans les fractions 6, 7, 8 et 9 en l'absence ou en présence d'Histone III-S

Après le tamisage moléculaire (voir "Fig.8.7"), les fractions 6,7,8 et 9 ont été lavées deux fois sur cellules Centricon-10, concentrées, puis resuspendues dans 180 μl de 50 mM MOPS-NaOH pH 7.6. Un aliquote correspondant à 30 μl de chacune des fractions a été phosphorylé en l'absence (A) ou en présence (B) de 5 μg de la fraction III-S de l'Histone dans un milieu de marquage standard (45 μl) additionné de 10 μM CaCl_2 . Dans les deux cas, les quatre fractions protéiques ont été séparées par SDS-PAGE, colorées au bleu de Coomassie (colonnes 6, 7, 8 et 9) et révélées par autoradiographie (colonnes 6', 7', 8' et 9'). Dans le gel B, des protéines de poids moléculaire connu ont été séparées simultanément comme référence (R). H et * indiquent respectivement la position dans le gel des polypeptides phosphorylés de la fraction III-S de l'Histone et du phosphopolypeptide de 33 kDa.

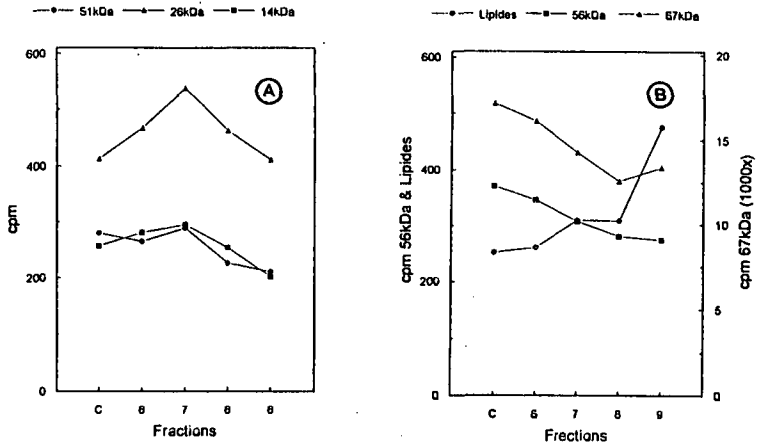
La phosphorylation des mêmes fractions 6, 7, 8 et 9, mais en présence d'Histone III-S (dont les bandes sont visibles au bleu de Coomassie entre ~12 et 33 kDa; Fig.8.10B, gauche), ne modifie pas de manière sensible l'incorporation du ^{32}P dans

la protéine de 75 kDa (HSP70), dans les chaperonines α et β (60 kDa), ainsi que dans celles de 33 et 18 kDa (Fig.8.10B, droite). On constate cependant que les trois polypeptides de plus haut Mr, constitutifs de la fraction III-S de l'Histone, subissent un très léger marquage progressif en présence des fractions 7, 8 et 9 (voir "4 H").

En conclusion, les protéines de 75 et 18 kDa ne semblent pas catalyser l'incorporation de ^{32}P sur l'Histone III-S qui ne s'avère, de plus, qu'un piètre substrat kinasique pour les chaperonines α et β , partiellement dissociées de leur complexe oligomérique par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-ATP (Fig.8.5) et tamisage moléculaire (Fig.8.7).

Pour déterminer si la phosphorylation des protéines d'enveloppes du chloroplaste est modifiée par la présence des protéines "heat-shock" stromatiques partiellement purifiées, nous avons incubé un extrait d'enveloppes en présence des fractions 6, 7, 8 et 9. L'autoradiographie du gel (résultat non montré) révèle que le profil classique des phosphoprotéines d'enveloppes (voir "Chapitre 3") ne subit aucune modification qualitative par rapport à des enveloppes contrôles (résultats non montrés). Par contre, certains composants présents dans la fraction membranaire de l'enveloppe annihilent complètement l'incorporation du ^{32}P dans les protéines de 75 kDa (HSP70), 60 kDa (HSP60), 33 et 18 kDa (idem "Fig.8.6"). Par la méthode de Cerenkov, nous avons estimé quantitativement la radioactivité incorporée dans les phosphoprotéines majeures de l'enveloppe (67, 56, 51, 26 et 14 kDa) et dans les lipides. Les résultats de ce comptage, qui sont consignés dans les graphes des figures 8.11A et 8.11B, révèlent que deux groupes de protéines d'enveloppes incorporent différemment le ^{32}P en présence des fractions 6 à 9. Le premier groupe comprend les protéines de 51, 26 et 14 kDa. Ces trois protéines arborent un maximum de marquage en présence de l'homologue de la HSP70 (fraction 7, Fig.8.11A) et un minimum en présence de la protéine de 18 kDa (fraction 9, Fig.8.11A). Le deuxième groupe inclut, par contre, les autres phosphoprotéines de 67 et 56 kDa. A l'opposé des trois autres, ces deux protéines subissent une inhibition concomitante et progressive de leur marquage respectif en présence des fractions 6, 7, 8 et 9 (Fig.8.11B). Inversement, la phosphorylation des lipides d'enveloppes, localisés sous le front de migration du gel, semble particulièrement stimulée par la protéine de 18 kDa (fraction 9, Fig.8.11B).

Confirmant les résultats présentés sur la figure 8.6, les protéines "heat-shock" du stroma (HSP70) semblent effectivement catalyser la phosphorylation des protéines de (51), 26 et 14 kDa de l'enveloppe.



Figs 8.11 A-B. Phosphorylation des protéines de membranes d'enveloppes en présence des fractions 6, 7, 8 et 9

Après la chromatographie sur gel (voir "Fig.8.7"), les fractions 6, 7, 8 et 9 ont été lavées deux fois sur cellules Centricon-10, concentrées, puis resuspendues dans 180 μ l de 50 mM MOPS-NaOH pH 7.8. Un aliquote correspondant à 30 μ l de chacune des fractions a été phosphorylé dans un milieu de marquage standard (45 μ l), additionné de 10 μ M CaCl₂ et 30 μ g d'enveloppes. Après séparation par SDS-PAGE, coloration du gel au bleu de Coomassie et révélation par autoradiographie, les protéines phosphorylées de 67, 56, 51, 28 et 14 (ainsi qu'une bande phosphorylée située dans front de migration et correspondant à des lipides d'enveloppes phosphorylés; Ruffieux, 1991) ont été excisées dans le gel séché et leur radioactivité estimée par comptage Cerenkov. Le profil du marquage des protéines de 51, 26 et 14 kDa est reporté sur la figure 8.11A et celui des protéines de 67, 56 et des lipides sur la figure 8.11B.

8.3.3. Phosphorylation des protéines d'enveloppes et des protéines "heat-shock" en présence de PKC du cerveau de rat

Pour mieux comprendre les résultats immunologiques obtenus dans le chapitre 7, concernant la révélation de protéines d'enveloppes par des anticorps dirigés contre des protéine-kinases C, nous avons phosphorylé une préparation d'enveloppes en

présence de deux concentrations différentes de PKC (22 et 44 ng). L'enzyme utilisé dans cette expérience a été purifiée à partir de cerveau de rat et obtenue chez Calbiochem (539494, 2100 U/mg, pureté > 95%). Une concentration correspondant à 0.1 mM CaCl₂ a été ajoutée au milieu d'incorporation (*un apport en calcium étant nécessaire au fonctionnement optimum des protéine-kinases de type C (Kikkawa et al., 1986)*). Après l'identification des phosphopolypeptides par autoradiographie, nous avons sectionné le gel pour en extraire les bandes de 67, 51, 26 et 14 kDa et déterminé leur radioactivité respective par comptage Cerenkov (Fig.8.12). Le résultat indique que l'incorporation du ³²P dans la protéine de 51 kDa (et de deux autres protéines d'environ 40 et 150 kDa, résultats non montrés) est grandement stimulée par la présence de PKC. Par contre, cette observation n'est pas valable pour les phosphoprotéines de 67, 26 et 14 kDa, puisque leur marquage n'est que légèrement affecté par l'enzyme. En présence de 44 ng de PKC, on remarque toutefois une faible inhibition de l'incorporation du ³²P dans ces trois protéines, due certainement à une compétition pour le (γ³²P)ATP.

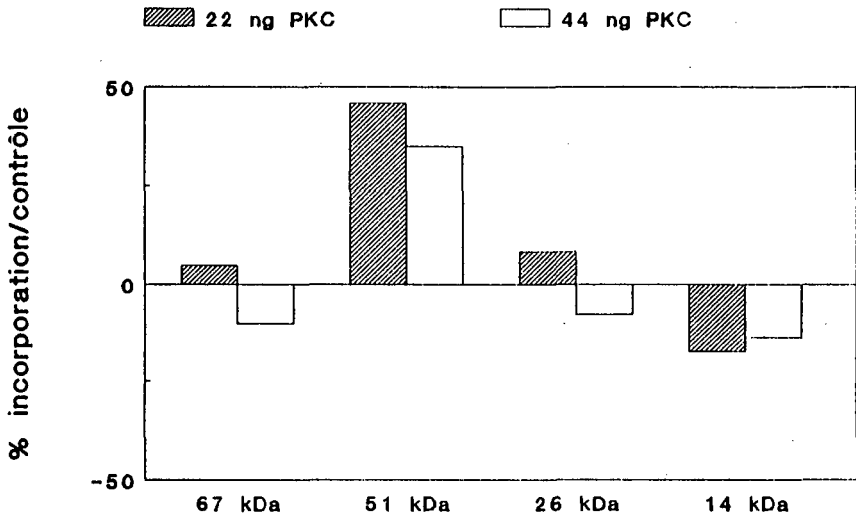


Fig.8.12. Effet de la PKC de cerveau de rat sur le marquage des phosphoprotéines majeures de l'enveloppe. Des protéines d'enveloppes (30 µg) ont été phosphorylées dans des conditions standard en présence de 0.1 mM CaCl₂, 22 ou 44 ng de PKC (Calbiochem 539494). Après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, les protéines ont été excisées dans le gel et leur radioactivité estimée par comptage Cerenkov. L'incorporation du ³²P dans les protéines de 67, 51, 26 et 14 kDa est reportée en % par rapport à leurs marquages respectifs dans des enveloppes phosphorylées en absence de PKC (contrôle).

Le même type d'expérience a été effectué avec les protéines du stroma purifiées par agarose-ATP (Fig.8.13). Le résultat montre de façon surprenante que les chaperonines solubles (HSP60) du chloroplaste (ou uniquement l'une d'entre elles) ainsi que la protéine "heat-shock" de 75 kDa (HSP70) sont d'excellents substrats pour les protéine-kinases C. Leurs phosphorylations intrinsèques augmentent respectivement de 600 et 400% en présence de l'enzyme. *Tout à fait logiquement, l'autophosphorylation de la PKC diminue en présence du substrat.* Par contre, l'incorporation du ^{32}P dans la protéine de 18 kDa n'est absolument pas modifiée par l'enzyme, ce qui confirme ainsi la spécificité des protéine-kinases C pour un type de substrat bien défini (Houslay, 1991).

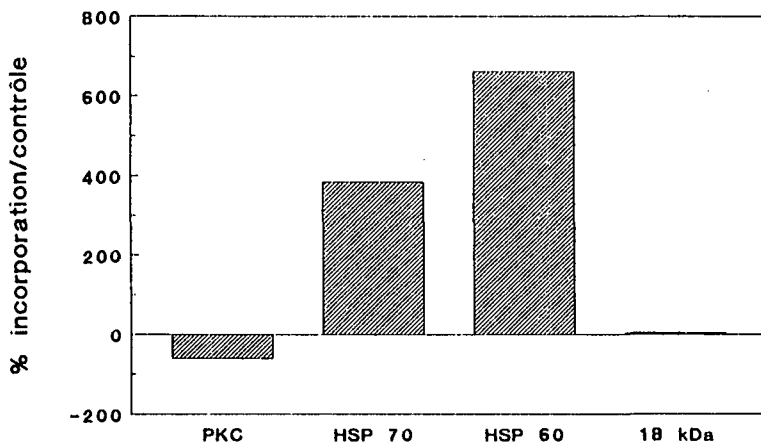
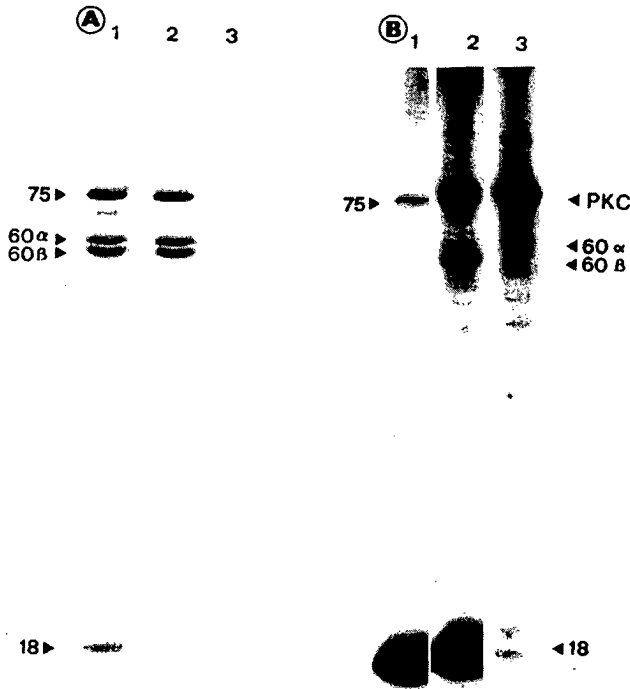


Fig.8.13. Effet de la PKC de cerveau de rat sur la phosphorylation de protéines chloroplastiques solubles purifiées sur billes d'agarose-ATP

Des protéines stromatiques purifiées sur billes d'agarose-ATP (1 μg) et lavées comme indiqué dans la légende de la "Fig.8.6" ont été phosphorylées en l'absence ou en présence de 44 ng de PKC (Calbiochem 539494), dans un milieu d'incubation standard additionné de 0.1 mM CaCl_2 . Après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, la PKC, les protéines "heat-shock" de 75 et 60 kDa (HSP70 et HSP60 "cpn60 α et β ") ainsi que la phosphoprotéine de 18 kDa ont été excisées dans le gel et leurs radioactivités estimées par comptage Cerenkov. L'incorporation du ^{32}P dans ces protéines est reportée en % par rapport à leur marquage en absence de PKC (contrôle).



Figs 8.14 A-B. Identification de la chaperonine β fonctionnant comme substrat de phosphorylation pour la PKC de cerveau de rat

Des protéines de stroma purifiées sur billes d'agarose-ATP (1 μ g; colonne 1), un aliquote de 22 ng de PKC (Calbiochem 539494; colonne 2) ou les deux fractions ensemble (colonne 3) ont été phosphorylés dans un milieu d'incubation standard additionné de 0.1 mM CaCl_2 (volume final de 10 μ l). Les protéines ont été ensuite séparées par SDS-PAGE, colorées au bleu de Coomassie (A) et autoradiographiées (B). Les abréviations suivantes, 75, 60 α , 60 β , 18 et PKC signalent les positions respectives dans le gel de la phosphoprotéine de 75 kDa (HSP70), des chaperonines α et β (HSP60), de la phosphoprotéine de 18 kDa et de la protéine-kinase C.

Afin de déterminer quel type de chaperonine est phosphorylé par la protéine-kinase C du cerveau de rat, nous avons répété l'expérience précédente, mais en séparant cette fois les phosphoprotéines par "SDS-PAGE 15%" (Fig.8.14). Ce type de gel permet, comme nous l'avons observé précédemment (voir "Fig.8.1B"), de séparer les formes α et β des chaperonines. La coloration du gel au bleu de Coomassie révèle la présence des protéines de 75 kDa (HSP70), des sous-unités α et β des chaperonines (60 α et 60 β) ainsi que de celle de 18 kDa (Fig.8.14A, colonnes 1 et 2). On constate que la fixation du bleu de Coomassie sur la protéine de 18 kDa varie parfois indépendamment de la quantité de protéines séparées par SDS-PAGE (Fig.8.14A,

comparer les colonnes 1 et 2). Par contre, la quantité de PKC (22 ng) chargée sur le gel d'électrophorèse n'est pas assez élevée pour être visualisée par ce type de coloration (Fig.8.14A, colonne 3). L'analyse autoradiographique du gel montre clairement que c'est la sous-unité β des chaperonines qui sert de substrat pour la PKC (Fig.8.14B, colonne 2). Un comptage Cerenkov subséquent révèle que l'intensité du marquage dans la chaperonine α augmente peu par rapport au contrôle (moins de 100 cpm) comparé à celui de la chaperonine β (plus de 500 cpm). Sur ce type de gel, il est difficile de séparer la PKC de l'homologue des HSP70 (Fig.8.14B. comparer les colonnes 1, 2 et 3), et par conséquent de visualiser l'augmentation du marquage dans la phosphoprotéine de 75 kDa, comme décrite sur la figure précédente.

8.4. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la méthode de purification par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-ATP qui a déjà fait ses preuves pour préparer des extraits enrichis en protéines "heat-shock" (HSP70) à partir de fractions cellulaires solubles d'origine animale (Welch et Feramisco, 1985), de mitochondries (Mizzen et al., 1989), de mitochondries et de chloroplastes d'*Euglena gracilis* (Amirshapira et al., 1990), ou encore de chloroplastes de Pois (Marshall et Keegstra, 1992). Cette méthode appliquée aux protéines solubles du chloroplaste d'Epinard rend possible l'isolement de fractions contenant quatre protéines solubles de Mr: 75, 60 α , 60 β et 18 kDa (Fig.8.1).

Le pool de ces fractions, lavé de tout excès en MgATP libre, stimule de manière significative (~30%) la phosphorylation *in vitro* des protéines d'enveloppes de Mr 26 et 14 kDa (Fig.8.6). Ce type d'activation rappelle tout à fait certains résultats obtenus précédemment qui démontrent que des concentrations élevées en ATP froid, même jusqu'à 3000 fois supérieures aux concentrations de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP, favorisent le marquage radioactif de ces mêmes protéines (Chapitre 3). Pour étudier indépendamment le rôle de ces quatre protéines sur la phosphorylation des protéines d'enveloppes et déterminer leurs structures oligomériques, nous les avons séparées par chromatographie sur gel (FPLC) et SDS-PAGE (Figs 8.7 et 8.8) et élevé contre chacune d'elles des anticorps polyclonaux monospécifiques (Figs 8.2 et 8.3).

8.4.1. La protéine de 75 kDa

Concernant la protéine de 75 kDa purifiée par agarose-ATP, des analyses comparatives par Westernblot, à l'aide d'anticorps élevés contre cette même protéine (Fig.8.2) et d'autres protéines "heat-shock" procaryotiques (DnaK) et eucaryotiques, ont établi avec certitude son appartenance à la superfamille des protéines "heat-shock" de 70 kDa (HSP70)(Bovet et al., 1990; Dumont, 1991; Marshall et Keegstra, 1992). La révélation de protéines non-dénaturées de stroma (Bovet et al., 1990) ou enrichies par agarose-ATP (Fig.8.4) à l'aide d'anticorps α -75 kDa atteste que l'homologue des HSP70 du chloroplaste possède une structure dimérique à l'état natif (140 kDa). Ce résultat coïncide parfaitement avec celui obtenu après la filtration sur gel des protéines du stroma purifiées sur billes d'agarose-ATP (Figs 8.7 et 8.8). D'autres travaux relatent également qu'en présence de MgATP, les protéines de la familles des HSP70 sont présents sous forme de dimères ou même d'oligomères de plus grande taille (Guidon et Hightower, 1986; Heuser et Steer, 1989). Par contre, les HSP70 sont apparemment sous formes monomériques en l'absence de nucléotides. Toutefois, ces dimères ou trimères se dissocient parfaitement après une incubation à 37°C en présence de MgATP, mais non de MgADP et encore moins de MgATP[γ S] (Palleros et al., 1991). Cette désagrégation des complexes qui n'est pas réalisable en présence de MgATP non-hydrolysable (MgATP[γ S]), révèle que l'ATP lié aux HSP70 est probablement utilisé comme substrat pour des activités ATPasiques faibles (Rothman et Schmid, 1986) ou d'autophosphorylation (Welch, 1990) qui modulerait la structure native de la protéine. Curieusement, les similitudes de structure entre le domaine ATPasique des HSP70, de l'actine, voire même de l'hexokinase suggèrent que les HSP70 fonctionnent par le biais de mécanismes qui favorisent l'oligomérisation, car l'actine est connue pour former des filaments, alors que la plupart des hexokinases sont actives uniquement sous forme de dimères (Hubbard et Sander, 1991).

L'homologue des HSP70, purifiée à partir de stroma de chloroplastes d'Epinaud, subit une autophosphorylation marquante en présence de Mg²⁺ et de Ca²⁺ (Figs 8.6 et 8.10). Cette phosphorylation autocatalytique est comparable à celle déjà répertoriée pour les protéines de la même famille appartenant à la mitochondrie, au chloroplaste de diverses plantes supérieures, à *Escherichia coli*, ou encore au réticulum endoplasmique (Leustek et al., 1992; Amir-shapira et al., 1990; Dalie et al., 1990). L'autophosphorylation *in vitro*, mais également *in vivo* de la DnaK (Rieul et al., 1987), suggère que les modifications posttranslationnelles survenant à la surface de ces protéines ont des significations physiologiques bien précises. Selon Leustek et al. (1992),

les HSP70 subiraient d'abord un changement de conformation en présence de Ca^{2+} , qui aurait pour conséquence directe d'exposer le site accepteur de phosphate. Au niveau du chloroplaste, l'autophosphorylation de la HSP70 stromatique favorise peut-être la prise en charge, voire la libération, de protéines importées dans l'organite, car Yalovsky et al. (1992) ont montré récemment que la présence de HSP70 stimule l'intégration du LHCI1 dans les membranes thylacoïdales.

Cette protéine (HSP70) qui s'autophosphoryle, mais ne phosphoryle pas l'Histone III-S (Fig.8.10), s'offre contre toute attente comme un excellent substrat pour les protéine-kinases C (Fig.8.13). Ce résultat suggère que l'homologue chloroplastique des HSP70 est certainement phosphorylé *in vivo* par une protéine-kinase endogène. Curieusement, l'addition de cette protéine purifiée à un extrait d'enveloppes avive l'incorporation du phosphate dans les protéines de 51, 26 et 14 kDa (Fig.8.11A). Cette stimulation du marquage à la surface de protéines transloquées à travers l'enveloppe (26 kDa=LHCII(?) et 14 kDa=SS; Chapitre 5) ou impliquées directement dans l'import de protéines nucléocytoplasmiques (51 kDa; Hinz et Flügge, 1988) sous-tend que les HSP70 chloroplastiques associées à l'ATP jouent un rôle fondamental comme médiateur secondaire dans la réorganisation structurale des protéines importées dans le chloroplaste.

8.4.2. Les polypeptides de 60 kDa

Concernant les deux polypeptides de 60 kDa purifiés par agarose-ATP (Fig.8.1B), ils appartiennent à la famille des chaperonines (cpn-60) ou HSP60 chloroplastiques, car ils sont reconnus à la fois par des anticorps élevés contre les chaperonines du chloroplaste de Pois (Chapitre 7) et la protéine GroEL de *Synechocystis* (Fig.8.3). Deux anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre chacune d'elles permettent de les caractériser immunologiquement comme les sous-unités α et β des chaperonines du chloroplaste d'Epinarid (Fig.8.3). Nos résultats immunologiques sont en parfait accord avec les analyses comparatives effectuées sur la séquence des gènes codant pour les deux protéines homologues de *B. napus*, puisqu'elles révèlent que l'identité entre ces deux polypeptides n'est que d'environ 50% (Hemmingsen, 1990; voir "Chapitre 7"). Après une électrophorèse non dénaturante, la révélation de ces protéines par Westernblot indique que leur forme oligomérique respective avoisine un Mr approximatif de 800 kDa (Fig.8.5). Le poids moléculaire de la forme native correspond tout à fait à celui établi pour d'autres chaperonines plastidiales, mitochondriales ou encore bactériennes (Ellis et van der Vies, 1991). La structure de l'oligomère, considérée

pour être tétradécamérique, a été déterminée assez récemment par microscopie électronique (Tsuprun et al., 1991; McMullin et Hallberg, 1988; Hutchinson et al., 1989). La présence dans le chloroplaste de deux sous-unités distinctes (Fig.8.3), mais de même Mr (Fig.8.1), a aussi interpellé Hemmingsen (1990) qui propose que le tétradécamère pourrait être, en fait, formé de trois façons possibles: $\alpha_7\alpha_7$, $\alpha_7\beta_7$ ou encore $\beta_7\beta_7$. Nos résultats semblent indiquer que les constituants de la bande native de 800 kDa sont apparemment unis sous deux formes dissemblables $\alpha_7\alpha_7$ et $\beta_7\beta_7$. En effet, la présence de MgATP qui conduit à la désagrégation complète du complexe oligomérique chez le Pois (Musgrove et al., 1987) ne le dissocie pas totalement chez l'Epinard, puisque de plus petits oligomères de Mr différents pour les deux sous-unités sont engendrés (trimériques ou dimériques pour cpn-60 α (130-200kDa) et plus grand que trimériques pour cpn-60 β (>200kDa); Figs 8.5A et 8.5B). *Ces trimères ou dimères sont également présents dans un extrait brut de stroma, mais en quantités beaucoup plus faibles (Figs 8.5A et 8.5B).* Par contre, le largage de l'ATP fixé sur les protéines "heat-shock" semble induire la dissociation complète du complexe, car les chaperonines exhibent, après un tamisage moléculaire, des Mr très proches de 60 kDa (~84 kDa; Fig.8.7). Ces résultats montrent que le degré de complexité des tétradécamères ($\alpha_7\alpha_7$ et $\beta_7\beta_7$) dépend de la charge en ATP liée aux chaperonines α et β .

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les formes tétradécamériques des chaperonines α et β (~800kDa) sont capables de phosphoryler la fraction III-S de l'Histone. Par contre, si on dissocie ces oligomères par chromatographie sur gel (Fig.8.10), les sous-unités α et β ne catalysent plus ou très mal la fixation du phosphate sur l'Histone (*dans cette dernière expérience, la très faible augmentation du marquage sur l'Histone est apparemment plutôt corrélée à la présence des phosphoprotéines de 33 et 18 kDa (Fig. 8. 10)*). Par conséquent, la phosphorylation de la fraction III-S de l'Histone ne semble stimulée par les chaperonines que si elles sont sous forme native ou encore "chargées" en ATP (ce qui n'est plus le cas après la chromatographie sur gel). En fait, il est possible que les chaperonines utilisent directement l'ATP lié électrostatiquement à leur structure pour favoriser l'incorporation covalente du phosphate sur les protéines cibles, soit par elles-mêmes, soit par une tierce protéine-kinase. Ce processus semble bien fonctionner sur certains substrats de l'enveloppe, puisque seules les chaperonines "chargées en ATP" catalysent l'incorporation du phosphate sur les protéines de 26 et 14 kDa (comparer les résultats présentés sur la Fig.8.6 et dans le chapitre 7 avec ceux détaillés sur la Fig.8.11A). *In vivo*, les chaperonines permettent probablement au chloroplaste intact de compenser des manques occasionnels en ATP dans le stroma ou le lumen de l'enveloppe pour satisfaire

à des pH physiologiques le K_m de protéine-kinases de l'enveloppe qui sont dépendantes du calcium et des lipides (voir "Chapitre 3").

La phosphorylation intense de la chaperonine β par une protéine-kinase C du cerveau de rat (Figs 8.13 et 8.14), associée aux résultats présentés dans le chapitre 7, suggère que:

1) les interactions électrostatiques entre les protéines importées dans le chloroplaste et les chaperonines (Lubben et al., 1989), voire entre les chaperonines elles-mêmes, sont dépendantes de modifications structurales induites par l'incorporation du ^{32}P .

2) la sous-unité β des chaperonines est sans doute phosphorylée *in vivo* par une protéine-kinase du chloroplaste, car elle-même ne s'autophosphoryle que très mal (Figs 8.6 et 8.10). L'incorporation du phosphate dans sa structure intime contrôlerait l'ouverture de sites protéine-kinasiques (Chapitre 7) ou permettrait le stockage d'ATP qui habiliterait la chaperonine β à participer, comme protéine-kinase hautement régulée ou donneuse d'ATP, à des réactions de phosphorylation en cascades (Trewavas et Gilroy, 1991; Ranjeva et Boudet, 1987).

8.4.3. Le polypeptide de 18 kDa

Concernant la troisième protéine (18 kDa) isolée par affinité sur billes d'agarose-ATP (Fig.8.1), son poids moléculaire natif est plus difficile à déterminer (Fig.8.5C), car l'anticorps polyclonal α -18 kDa que nous avons élevé reconnaît aussi très bien la sous-unité α des chaperonines (Fig.8.2B). Il en découle que l'anticorps α -18 kDa réagit bien avec plusieurs protéines natives du stroma de Mr: 800 kDa (chaperonines), ~160 kDa (trimères de cpn-60 α ?), 85 et 67 kDa (18 kDa ?) (Fig.8.5C). Comme les protéines de 800 et 160 kDa sont des oligomères de la chaperonine α (Fig.8.5A), il est vraisemblable que la protéine de 18 kDa possède un Mr natif d'environ 85 ou 67 kDa. Bien que ces deux formes oligomériques ne soient pas révélées par immunoblot dans un extrait de stroma purifié par agarose-ATP (Fig.8.5C), l'estimation du Mr de cette protéine par chromatographie sur gel (Figs 8.7 et 8.8), semble confirmer que la protéine de 18 kDa présente effectivement sous forme native un poids moléculaire situé entre 85 et 67 kDa (forme tétramérique ou trimérique ?).

La protéine de 18 kDa peut être convenablement purifiée par affinité sur billes d'agarose-ATP suivie d'une chromatographie sur gel (>90%; Figs 8.6 et 8.10).

Cependant, il est possible d'améliorer encore sa purification (> 95%, après un gel 2D) en soumettant directement la fraction agarose-ATP à une chromatographie sur support de phényl-superose (colonne de type hydrophobe, FPLC, Pharmacia; résultats non montrés). On constate ainsi que la protéine ne se fixe pas sur la phase stationnaire et sort tout de suite dans le "volume mort" de la colonne. Ces résultats révèlent, en accord avec ceux qui montrent qu'un seul lavage des billes d'agarose-ATP avec MgATP ne suffit pas pour libérer la protéine du ligand (Fig.8.1A), que la protéine de 18 kDa n'expose à sa surface que des régions fortement chargées et peu hydrophobes.

La particularité première de cette protéine est d'être fortement phosphorylée lorsqu'elle est isolée à partir du stroma (Figs 8.6 et 8.10); cette phosphorylation s'effectue sans l'apport d'une protéine-kinase exogène (Figs 8.13 et 8.14). La conclusion qui s'impose est que la protéine s'autophosphoryle activement (Fig.8.10). Quelques propriétés relatives à son autophosphorylation méritent d'être discutées ici:

(1) La non-phosphorylation de cette protéine dans un extrait de stroma suggère qu'une autre molécule chloroplastique soluble l'empêche de s'autophosphoryler (Chapitre 3).

(2) *In vitro*, le lysophosphatidylinositol (mais pas le phosphatidylinositol) incorpore bien le ^{32}P à partir de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP en présence de protéines stromatiques purifiées par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose-ATP (Ruffieux, 1991). Cet extrait contient, comme on le sait, la phosphoprotéine de 18 kDa (Fig.8.1). Comme l'autophosphorylation de cette protéine subit une inhibition concomitante au marquage du lipide, Laurence Ruffieux (1991) suggère que la protéine de 18 kDa pourrait bien être une lysophosphatidylinositol-kinase. Cette hypothèse paraît corroborée par les résultats de la figure 8.11B montrant que la phosphorylation des lipides de l'enveloppe est stimulée en présence de la protéine de 18 kDa (fraction 9). Cette protéine est certainement proche d'un autre polypeptide de même Mr, présent dans un extrait de membranes plasmiques de Pois, qui phosphoryle aussi des dérivés du phosphatidylinositol (Blowers et Trewavas, 1988).

(3) Curieusement, la chélation du magnésium par l'EDTA (>1 mM) stimule l'incorporation du phosphate dans une protéine de 18 kDa présente à la fois dans des préparations d'enveloppes et de stroma (Chapitre 3). Des études sont en cours dans notre laboratoire pour démontrer qu'il s'agit, dans les deux cas, de la même protéine que celle purifiée par agarose-ATP. Un résultat positif indiquerait que c'est seulement le magnésium complexé à un autre composé inconnu (voir point (1)) qui opérerait comme inhibiteur sur

l'autophosphorylation de la protéine de 18 kDa, car la protéine purifiée s'autophosphoryle parfaitement bien même en présence de 4 mM $MgCl_2$ (Fig.8.10).

8.4.4. Commentaires additionnels

Les deux derniers points que nous désirons commenter dans cette discussion traitent de:

- a) la libération de LHCII (25 kDa) et de petites sous-unités de la RubisCO (14 kDa) après la chromatographie sur gel d'une fraction de protéines chloroplastiques solubles purifiées par agarose-ATP (Fig.8.9).
- b) la phosphorylation intense d'une protéine de 51 kDa de l'enveloppe par une protéine-kinase C du cerveau de rat (Fig.8.12).

a) Dans la figure 8.9, nous constatons que des protéines de LHCII et de petites sous-unités de la RubisCO sont éluées de la colonne "Superose 12" en même temps qu'un pool d'ATP fortement lié aux protéines "heat-shock". Ainsi, nous pensons que ces deux protéines sont fixées aux HSP70/HSP60 chloroplastiques par l'intermédiaire de molécules d'ATP juste après leur translocation à travers l'enveloppe (Ellis et van der Vies, 1991; Ellis, communication personnelle). Cette hypothèse est basée sur le fait que des interactions électrostatiques se produisent effectivement entre des protéines en cours d'import et encore non pliées et certaines protéines "heat-shock" de soutien (HSP70/HSP60; Simon et al. 1992). Ce processus permet apparemment à l'organe de contrôler les erreurs qui pourraient survenir, d'abord dans le mauvais plissage des protéines importées (HSP70), puis dans leur oligomérisation (HSP60) (Hubbard et Sander, 1991; Itoh et Tashima, 1991; Gatenby, 1992). Comme ce type de mécanisme, qui dépend de l'hydrolyse de molécules d'ATP, opère dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Kang et al. 1990; Pfanner et Weinzierl, 1992, Langer et Neupert, 1991), il n'y pas de raison pour qu'un tel phénomène ne se manifeste pas dans le chloroplaste. *Nous pensons que le degré de phosphorylation de certaines protéines en cours d'import dans l'enveloppe du chloroplaste (LHCII? et SS; Chapitre 5) fonctionne comme un signal pour permettre à ces protéines d'être prises en charge par les HSP70 et HSP60; ceci d'autant plus que les HSP70/HSP60 chloroplastiques stimulent clairement la phosphorylation de ces protéines dans l'enveloppe (Chapitres 7 et 8).*

b) La phosphorylation intense d'une protéine de 51 kDa de l'enveloppe par une PKC du cerveau de rat indique que des protéines chloroplastiques homologues aux PKC sont certainement actives dans l'enveloppe. Ces résultats valident, en quelque sorte, ceux obtenus dans le chapitre précédent, puisque nous avons démontré que certaines protéines de l'enveloppe (51 kDa) et du stroma (cpn-60 β) ont des épitopes communs avec les protéine-kinases C α , β et γ . Ils corroborent aussi ceux publiés par Feng et Kung (1991) et Feng et al. (1992) qui ont démontré par PCR ("Polymerase Chain Reaction") que des homologues de protéine-kinases animales sont certainement actives dans les cellules et organites végétales. Des expériences sont actuellement en cours dans notre laboratoire pour déterminer si la protéine de 51 kDa phosphorylée par la protéine-kinase C est identique au polypeptide de même Mr reconnu par l'anticorps anti-PKC(mix) (Chapitre 7) ou plutôt à la protéine impliquée dans l'import des protéines nucléaires dans le chloroplaste (Hinz, 1988; Hinz et Flügge, 1988; Chapitre 6). Dans le cas où la protéine phosphorylée de 51 kDa serait proche des PKC, ce résultat ne nous surprendrait pas outre mesure, puisque les protéine-kinases C sont à la fois capables de s'autophosphoryler entre elles (autophosphorylation intermoléculaire; Mitchell et al., 1989) et de phosphoryler un pseudosubstrat interne à la protéine (autophosphorylation intramoléculaire; House and Kemp, 1987; Pears et al., 1990). Par contre, si cette protéine est la même que celle caractérisée immunologiquement dans le chapitre 6, ce résultat prouverait qu'une phosphoprotéine qui contrôle le passage de polypeptides à travers l'enveloppe peut être phosphorylée *in situ* par une "protéine-kinase C" cytosolique ou chloroplastique. Une telle information signifierait que des protéine-kinases de type C jouent un rôle de pivot en modulant l'import de protéines nucléocytoplasmiques dans le chloroplaste.

8.5. Bibliographie

- Amir-Shapira, D., Leustak, T., Dalie, B., Waissbach, H., Brot, N. (1990) Hsp70-proteins, similar to *Escherichia coli* DnaK, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1749-1752.
- Ashendel, C.L. (1985) The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. Biochim. Biophys. Acta 822: 219-242.
- Blowers, D.P., Trewavas, A.J. (1988) Phosphatidylinositol kinase activity of a plasma membrane-associated calcium-activated protein kinase from pea. FEBS Lett. 238: 87-89.
- Bovet, L., Dumont, N., Marshall, J.S., Siegenthaler, P.A. (1990) Possible presence of a 75 kDa heat shock polypeptide in the stroma of spinach chloroplast. Experientia 46: A65.
- Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosic-Smithers, J., Nicolet, C.M. (1989) SSC1, an essential member of the yeast hsp70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. Mol. Cell. Biol. 9: 3000-3008.
- Dalie, B.L., Skaleris, D.A., Kohle, K., Weissbach, H., Brot, N. (1990) Interaction of DnaK with ATP: binding, hydrolysis and Ca²⁺-stimulated autophosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166: 1284-1292.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radioactives associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'Épinard après protéosynthèse *in organello* en présence de ³⁵S-méthionine, Thèse de Docteur-ès-Sciences, Université de Neuchâtel, Suisse.
- Ellis, R.J. (1990) Molecular chaperones: the plant connection. Science 250: 954-958.
- Ellis, R.J., Hemmingsen, S.M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. TIBS 14: 339-342.
- Ellis, R.J., van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 60: 321-347.
- Feng, X.H., Bottino, P.J., Kung, S. (1992) Molecular identification of a soybean protein kinase gene family by using PCR. Plant Mol. Biol. 18: 581-584.
- Feng, X.H., Kung, S. (1991) Diversity of the protein kinase gene family in rice. FEBS Lett. 282: 98-102.
- Gatenby, A.A. (1992) Protein folding and chaperonins. Plant Mol. Biol. 19: 677-687.
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H. (1989) Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. Nature 342: 884-889.
- Guidon, P.T., Hightower, L.E. (1986) Purification and initial characterization of the 71 kDa rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding proteins. Biochemistry 25: 3231-3239.
- Hemmingsen, S.M. (1990) The plastid chaperonin. Dans Molecular chaperones, ed. R.J. Ellis Seminars Cell Biology 1, Philadelphia, Saunders, pp 47-54.
- Hemmingsen, S.M., Ellis, R.J. (1986) Purification and properties of Ribulose biphosphate carboxylase large subunit binding protein. Plant physiol. 80: 269-276.
- Heuser, J., Steer, C.J. (1989) J. Cell Biol. 109: 1457-1466.

- Hinz, G., (1988) Proteintranslokation in chloroplasten aus spinat: untersuchungen zur energitisierung und identifizierung einer am transport beteiligten membrankomponente. Thèse de doctorat de l'Université de Göttingen (D).
- Hinz, G., Flügge, U.I. (1988) Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 649-659.
- House, C., Kemp, B.E. (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain *Science* 238: 1726-1728.
- Houslay, M.D. (1991) Crosstalk: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* 195: 9-27.
- Hubbard, T.J.P., Sander, C. (1991) The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein engineering* 4: 711-717.
- Hutchinson, E., Tichelaar, W., Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K.R. (1989) Identification and electron microscope analysis of a chaperonin oligomer from *neurospora crassa* mitochondria. *Embo J.* 8: 1485-1490.
- Itoh, T., Tashima, Y. (1991) The stress (heat shock) proteins. *Int. J. Biochem.* 23: 1185-1191.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A., Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348: 137-143.
- Kikkawa, U., Masayoshi, G., Koumoto, J., Nishizuka, Y. (1986) Rapid purification of protein kinase C by high performance liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 636-643.
- Ko, K., Bornemisza, O., Kourtz, L., Ko, Z.W., Plaxton, W.C., Cashmore, A.R. (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a cognate 70-kDa Heat Shock Protein of the chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.* 267: 2986-2993.
- Kraft, A.S., Anderson, W.B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* 301: 621-623.
- Langer, T., Neupert, W. (1991) Heat shock proteins hsp60 and hsp 70: Their role in folding, assembly and membrane translation of proteins. *Dans Current topics in microbiology and immunology*, vol.167. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, pp 3-30.
- Leustek, T., Amir-Shapira, D., Toledo, H., Brot, N., Weissbach, H. (1992) Autophosphorylation of 70 kDa heat shock proteins. *Cell. mol. Biol.* 38: 1-10.
- Leustek, T., Dalie, B., Amir-Shapira, D., Brot, N., Weissbach, H. (1989) A member of the hsp70 family is localized in mitochondria and resembles *Escherichia coli* DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7805-7808.
- Lubben, T.H., Donaldson, G.K., Viitanen, P.V., Gatenby, A. (1989) Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone. *Plant Cell*, 1: 1223-1230.
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, K., Vierling, E. (1990) Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 374-378.
- Marshall, J.S., Keegstra, K. (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the major hsp70 of the pea chloroplastic stroma. *Plant Physiol.* 100: 1048-1054.
- Martel, R., Cloney, L.P., Pelcher, L.E., Hemmingsen, S.M. (1990) Unique composition of plastid chaperonin-60: alpha and beta polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene* 94: 181-187.

- McMullin, T.W., Hallberg, R.L. (1988) A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *E.coli* groEL gene. *Mol Cell Biol.* 8: 371-360.
- Mitchell, F.E., Marais, R.M., Parker, P.J. (1989) The phosphorylation of protein-kinase C as a potential measure of activation. *Biochem. J.* 261: 131-136.
- Mizzen, L.A., Chang, C., Garrels, J.I., Welch, W.J. (1989) Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp75, a member of the hsp70 family and hsp58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J. Biol. Chem.* 264: 20664-20675.
- Morimoto, R.I., Tissières, A., Georgopoulos, C. (1990) *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 450.
- Munro, S., Pelham, H.R.B. (1986) An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78-kd glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46: 291-300.
- Musgrove, J.E., Johnson, R.A., Ellis, R.J. (1987) Dissociation of the ribulose bisphosphate-carboxylase large-subunit binding protein into dissimilar subunits. *Eur. J. Biochem.* 163: 529-534.
- Palleros, D.R., Welch, W.J., Fink, A.L. (1991) Interaction of the hsp70 with unfolded proteins: Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5719-5723.
- Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E., Parker, P.J. (1990) Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* 194: 89-94.
- Pfanner, N., Weinzierl, A. (1992) Mechanisms of mitochondrial protein import. *Int. J. Biochem.* 24: 65-69.
- Ranjewa, R., Boudet, A.M. (1987) Phosphorylation of proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:73-93.
- Rieul, C., Cortay, J., Bleicher, F., Cozzone, A.J. (1987) Effect of bacteriophage M13 infection on phosphorylation of DnaK protein and other *Escherichia coli* proteins. *Eur. J. Biochem.* 168: 621-627.
- Rothman, J.E., Schmid, S.L. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46: 5-9.
- Ruffieux, L. (1991) Contribution à l'étude de la phosphorylation des lipides des membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. Travail de licence au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, Suisse.
- Simon, S.M., Peskin, C.S., Oster, G.F. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3770-3774.
- Trewavas, A., Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. *TIG.* 7: 356-361
- Tsuprun, V.L., Boekema, E.J., Samsonidze, T.G., Pushkin, A.V. (1991) Electron microscopy of the complexes of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) and Rubisco subunit-binding protein from pea leaves. *FEBS Lett.* 289: 205-209.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
- Waegemann, K., Paulsen, H., Soll, J. (1990) Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence. *FEBS Lett.* 261: 89-92.
- Welch, W.J. (1990) The mammalian stress response: Cell physiology and biochemistry of stress proteins. *Dans* Stress proteins in biology and medicine, Morimoto, R.I., Tissières, A. and Georgopoulos, C. (eds), Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 223-278.

Welch, W.J., Feramisco, J.D. (1985) Rapid purification of mammalian 70.000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1229-1237.

Yalovsky, S., Paulsen, H., Michaeli, D., Chitnis, P.R., Nechushtai, R. (1992) Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5616-5619.

1210

CHAPITRE 9

Projets futurs

9.1. Quelques réflexions préliminaires

Mis à part les travaux publiés par Jürgen Soll et ses collaborateurs sur les phosphoprotéines de l'enveloppe du chloroplaste de *Pois* (voir la bibliographie des chapitres précédents), aucune étude détaillant la cartographie des protéines phosphorylées dans l'enveloppe du chloroplaste d'*Epinard* n'avait été réalisée. Ce manquement est maintenant comblé par le présent travail.

Les effets du Mg^{2+} , Ca^{2+} , pH, ATP et H7, aussi bien que les expériences de "pulse-chase" avec de l'ATP non radioactif, montrent sans équivoque qu'un mécanisme de phosphorylation est identique pour deux protéines de 26 et 14 kDa localisées dans la membrane interne de l'enveloppe. Par contre, ce processus est tout à fait différent de celui impliquant une phosphoglucomutase (67 kDa) située dans l'espace intermembranaire de l'enveloppe. La caractérisation, bien que partielle, des protéines membranaires de 26 et 14 kDa, phosphorylées probablement par une même protéine-kinase dépendante du calcium, nous permet maintenant de décrypter les messages que véhicule le processus de phosphorylation des protéines dans l'enveloppe du chloroplaste. En effet, ces protéines, qui sont apparemment des pools phosphorylés de LHCII et de petites sous-unités de la RubisCO sous leur forme mature (ayant déjà perdu leur peptide de transit), sont probablement en cours d'import dans le chloroplaste. Leur phosphorylation intense dans l'enveloppe change leur charge intrinsèque et contrôle assurément leur prise en charge par les chaperonines et HSP70 chloroplastiques et, par conséquent, leur insertion dans l'organite.

La protéine de l'enveloppe qui présente le plus d'intérêt dans l'optique d'une recherche future (voir "Projets futures") est sans doute la protéine de 51 kDa. En effet, cette protéine, qui est phosphorylée à la fois dans des chloroplastes intacts et des préparations d'enveloppes, semble impliquée dans l'import des protéines nucléocytoplasmiques dans le chloroplaste.

La phosphorylation de la sous-unité β des chaperonines par une protéine-kinase C animale et l'autophosphorylation des HSP70 chloroplastiques témoignent de l'importance des régulations posttranslationnelles à la surface de cette catégorie de protéines. Leur fonction n'est pas, semble-t-il, limitée uniquement à favoriser l'arrangement tridimensionnel et l'oligomérisation correcte de polypeptides nouvellement importés dans le chloroplaste, mais sert aussi à stimuler la phosphorylation de certaines protéines d'enveloppes, notamment celles de 26 et 14 kDa. Comme ces deux protéines semblent être des pools phosphorylés de LHCII et de petites sous-unités de la RubisCO en cours de translocation à travers l'enveloppe, ce n'est probablement pas le fruit du hasard si les chaperonines et les HSP70 chloroplastiques, qui prennent en charge les protéines nouvellement importées, catalysent aussi leur phosphorylation.

J'ai l'intime conviction que ce travail de thèse, qui m'a maintenu en haleine pendant toute sa durée, contribuera dans l'avenir à élucider le rôle exact joué par les phosphoprotéines dans l'enveloppe du chloroplaste.

9.2. Projets futurs

A mon avis, cette étude sur la phosphorylation des protéines de l'enveloppe prendra toute sa signification si les résultats que nous avons obtenus sont utilisés pour la prolonger. Les projets réalisables dans un futur proche sont répertoriés ci-dessous:

- Etudier la phosphorylation des protéines d'enveloppes après l'hydrolyse contrôlée de phospholipides par l'action de phospholipases sélectives (PLC/PLD/PLA₂).
- Parvenir à immunoprécipiter la protéine de 26 kDa de l'enveloppe à l'aide d'anticorps α -LHCII; ce qui, pour des raisons inconnues, s'avère actuellement très difficile.
- Induire la phosphorylation *in organello* de protéines d'enveloppes en fournissant notamment aux chloroplastes intacts du (³²P)Pi et de la lumière.
- Isoler la protéine-kinase(s) qui phosphoryle les protéines de 26 et 14 kDa de l'enveloppe.

- Mettre en évidence le ou les sites de phosphorylation sur chacune des protéines de 26 kDa (LHCII?) et 14 kDa (SS), en phosphorylant notamment des peptides de synthèse, relatifs à des séquences peptidiques propres aux deux protéines, qui embrassent au moins une sérine centrale.
- Déterminer par immunofluorescence et immunocytochimie la localisation exacte de la phosphoprotéine de 51 kDa dans les membranes d'enveloppes.
- Pêcher le gène codant pour la phosphoprotéine de 51 kDa de l'enveloppe, en épurant une banque de cADN de l'Epinard à l'aide d'anticorps α -51 kDa et/ou d'une sonde nucléotidique synthétisée à partir d'une séquence peptidique interne à la protéine de 51 kDa.
- Etudier l'import du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO dans le chloroplaste d'Epinard, avec un regard particulier sur leur phosphorylation au cours du processus de translocation et après leur prise en charge par les chaperonines ou HSP70 chloroplastiques.
- Pêcher le gène codant pour la phosphoprotéine de 18 kDa du stroma, en épurant une banque de cADN de l'Epinard à l'aide d'anticorps α -18 kDa purifiés et/ou d'une sonde nucléotidique synthétisée à partir d'une séquence peptidique interne à la protéine de 18 kDa.

Plusieurs de ces projets de recherche sont déjà en cours de réalisation au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel.

*Pour le savant, croire la science
achevée est toujours une illusion aussi
complète que le serait pour l'historien de
croire l'histoire terminée.*

de Broglie, Physique et microphysique

Abréviations

a.a.:	acide aminé
ADN:	acide désoxyribonucléique
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adénosine triphosphate
($\gamma^{32}\text{P}$)ATP:	adénosine triphosphate avec du ^{32}P en position γ
BSA:	albumine sérique de boeuf
cpn60 α :	sous-unité α de la chaperonine chloroplastique
cpn60 β :	sous-unité β de la chaperonine chloroplastique
cADN:	acide désoxyribonucléique complémentaire
cAMP:	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
DMSO:	diméthylsulfoxyde
EDTA:	éthylènediamine tétraacétate
EGTA:	éthylène glycol-bis(β -aminométhyléther)tétraacétate
FPLC:	"fast protein liquid chromatography"
GroEL:	produit du gène <i>groEL</i> chez <i>E. coli</i> (chaperonine 60)
GroES:	produit du gène <i>groES</i> chez <i>E. coli</i> (chaperonine 10)
GTP:	guanosine triphosphate
HIII-S:	fraction III-S de l'histone
H7:	1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-méthylpipérazine
HSP60:	"Heat Shock Protein" de 60 kDa
HSP70:	"Heat Shock Protein" de 70 kDa
IEF:	focalisation isoélectrique
IgG:	immunoglobuline G
kDa:	kilodalton
LHCII:	"light harvesting complex II"
LHCIIA:	sous-unité A du "light harvesting complex II"
LHCIIIB:	sous-unité B du "light harvesting complex II"
LHCP:	"light harvesting complex protein"
LS:	grande sous-unité de la RubisCO ("Large Subunit")
Me:	membrane externe de l'enveloppe
MES:	acide morpholinoéthane-sulfonique
Mi:	membrane interne de l'enveloppe
Mx:	membrane externe de l'enveloppe
MOPS:	acide morpholinopropane-sulfonique

Mr:	poids moléculaire apparent
PAGE:	"polyacrylamide gel electrophoresis"
pI:	point isoélectrique
PBS:	tampon phosphate salin
PKC:	protéine-kinase C
PNC:	papier de nitrocellulose
RubisCO:	ribulose bisphosphate carboxylase-oxygénase
SDS:	dodécylsulfate de sodium
SS:	petite sous-unité de la RubisCO ("Small Subunit")
TBS:	tampon TRIS salin
TCA:	acide trichloroacétique
TEMED:	tétraméthyl-éthylènediamine
TKM:	tampon TRIS contenant du potassium et du magnésium
TNET:	tampon TRIS salin contenant du TX-100 et de l'EDTA
Tricine:	N-tris-(hydroxyméthyl)-méthylglycine
TRIS:	N-tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TX-100:	Triton X-100
TX-114:	Triton X-114
UV:	rayon ultra-violet