

4.2.5 - Membranes des bâtonnets rétinien

4.2.6 - Membranes des cellules végétales

Etude de l'interaction du cytochrome c et de la ferredoxine avec la double membrane limitante du chloroplaste

(M. NEUBURGER, J. JOYARD et R. DOUCE)

Il est bien établi à présent, à la suite des travaux de HELDT [2], HEBER [1] et WALKER [3], que la double membrane limitante ou enveloppe des chloroplastes catalyse très activement le transfert du phosphate ainsi que des petites molécules en  $C_3$  phosphorylées entre le stroma d'une part et le cytoplasme d'autre part. Au voisinage de pH 7-7,5, toutes les molécules transférées sont chargées négativement. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui président à ce transport, il était intéressant, dans une première étape, de connaître la charge globale de ce double système membranaire.

A cette fin, nous avons suivi l'adsorption de deux molécules protéiques sur l'enveloppe des chloroplastes. La première molécule utilisée est la ferredoxine extraite des feuilles d'Epinard et marquée au  $^{59}Fe$ . Son point isoélectrique est voisin de 3,8. Elle est donc chargée négativement vers pH 7,0. La seconde molécule est le cytochrome c, extrait de la levure (*Saccharomyces cerevisiae* D 261) et également marquée au  $^{59}Fe$ . Son point isoélectrique est supérieur à 9 : elle est donc chargée positivement vers pH 7. Par ailleurs, ces deux molécules présentent des masses moléculaires identiques ( $\approx 12\ 000$  daltons).

Nous avons alors montré que l'enveloppe isolée dans un état de très haute pureté (J. JOYARD et R. DOUCE, *Physiologie Végétale*, sous presse) ainsi que les chloroplastes intacts, adsorbent violemment la molécule de cytochrome c chargée positivement (figure 85). En revanche, la molécule de ferredoxine, dans les mêmes conditions de pH, n'était absolument pas adsorbée (figure 86).

Ce résultat, qui démontre que l'enveloppe des chloroplastes est chargée négativement vers pH 7, pose le problème de l'approche des molécules chargées négativement lors de leur transfert à travers la double membrane limitante (M. NEUBURGER, J. JOYARD et R. DOUCE, en préparation). Au cours de ce travail, nous avons également montré que l'enveloppe de chloroplastes intacts, qui présentent une intégrité physiologique remarquable, est imperméable aux molécules de saccharose et de cytochrome c. En revanche,

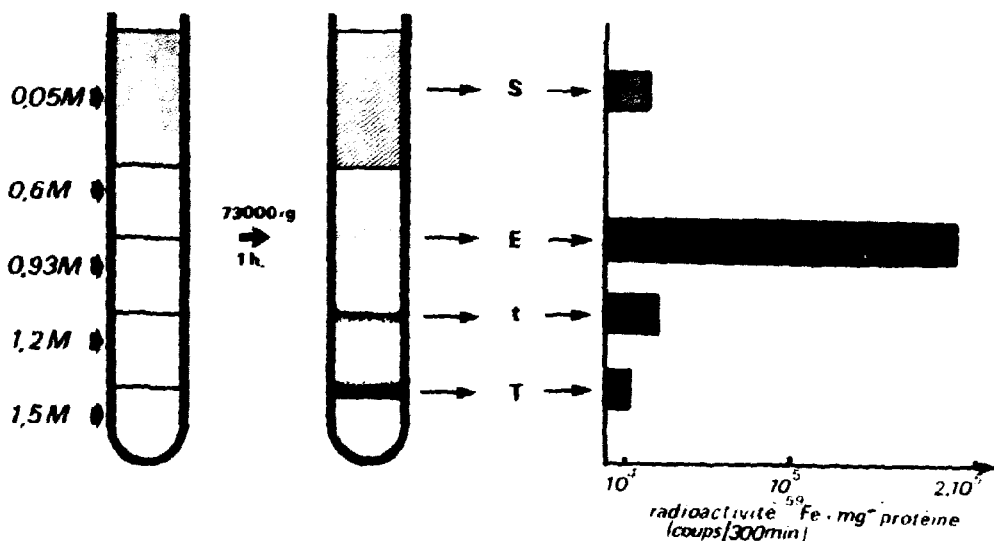


Fig. 85 - Les chloroplastes intacts isolés rapidement selon la méthode de JENSEN et BASSHAM (1966) sont mis en incubation pendant 5 mn dans le milieu réactionnel suivant : Sorbitol 0,33 M,  $MgCl_2$   $10^{-3}$  M, EDTA  $2 \cdot 10^{-3}$  M, tampon tricine-NaOH 30 mM, pH 7,2, cytochrome c- $(^{59}Fe)$  extrait de la levure :  $1 \mu M$  ( $1,7 \cdot 10^6$  désintégrations/300 mn/nmole de cytochrome), volume réactionnel 4 ml.

Les chloroplastes sont ensuite purifiés sur gradient de densité de saccharose, puis projetés dans un milieu de basse osmolarité (tampon tricine-NaOH, 10 mM, pH 7,2,  $MgCl_2$  4 mM). Les divers systèmes membranaires, enveloppes et thylakoïdes, sont séparés par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose (J. JOYARD, R. DOUCE, *Physiol. Vég.* ; sous presse). La radioactivité de chacune des fractions est exprimée par mg de protéines le long du profil du gradient.

- S = stroma
- E = enveloppe
- t = thylakoïdes riches en globules osmophiles
- T = thylakoïdes.

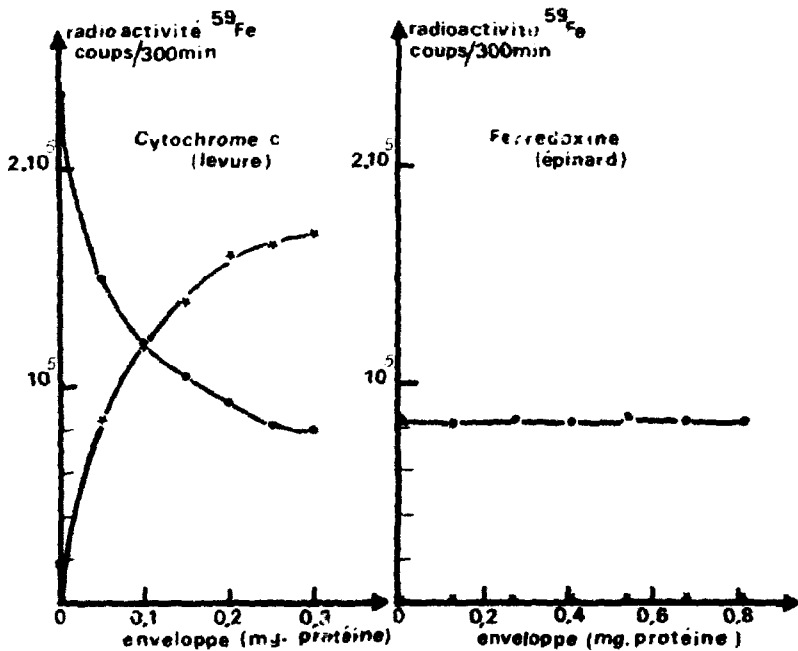


Fig. 86 - Interaction de l'enveloppe isolée du chloroplaste avec le cytochrome c et la ferredoxine. Des quantités variables d'enveloppes sont mises à incuber dans le milieu suivant : MOPS 0,05 M pH 7,6, sorbitol 0,33 M, MgCl<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup> M, MnCl<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup> M, EDTA 2.10<sup>-3</sup> M, <sup>59</sup>Fe-cytochrome c 34 nM ou <sup>59</sup>Fe-ferredoxine 35 nM. Volume réactionnel 0,5 ml.

Après 5 mn d'incubation, on ajoute 12,5 ml du milieu précédent. La suspension d'enveloppes est centrifugée à 10 000 rpm 1 h (rotor SW 40 BECKMAN). La radioactivité des différents surnageants et culots d'enveloppe est mesurée par spectrométrie gamma.

- Radioactivité <sup>59</sup>Fe des surnageants ;
- \* Radioactivité <sup>59</sup>Fe des culots d'enveloppes.

elle se laisse traverser par les molécules de ferredoxine. Un tel résultat montre que l'enveloppe des chloroplastes serait impliquée dans le contrôle du passage des molécules protéiques, notamment celles qui sont constitutives des thylakoïdes et qui sont synthétisées dans le cytoplasme comme la ferredoxine (M. NEUBURGER, R. DOUCE, en préparation).

- [1] U. HEBER  
(1974) Ann. Rev. Plant. Physiol., 25, 393-421
- [2] H.W. HELDT et L. RAPPLEY  
(1970) Febs Letter, 10, 143-148
- [3] D.A. WALKER  
(1974) in M.P.T. Intern. Rev. of Sci. Biochem. serie one, vol. II  
Plant Biochem., Ed. Northcote D.N., Univ. Park Press, 1-49.