50376
1977
194

N° D'ORDRE : 392

50376
1977
194

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

P A R

Christel HASE

UNIVERSITE DES Sc. et Techn. BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE LILLE

# APPROCHE GENECOLOGIQUE PAR VOIE BIOCHIMIQUE DU COMPLEXE U L E X DANS LE NORD ET L'OUEST FRANCAIS

Soutenue le 29 JUIN 1977 devant la commission d'examen

| | |
|---|---|
| R. LINDER, | Président |
| D. COUSTAUT, | Rapporteur |
| J. MONTREUIL,<br>G. BIZERTE, | Examinateurs |
| H.F. LINSKENS, | Membre Invité |

# APPROCHE GENECOLOGIQUE PAR VOIE BIOCHIMIQUE

# DU COMPLEXE ULEX

# DANS LE NORD ET L'OUEST FRANCAIS

par Christel HASE

Travail effectué aux :

Laboratoire de Physiologie et Biologie végétales
Faculté de Pharmacie

en collaboration avec le Centre de Technologie Biomédicale, INSERM
59000 LILLE

Laboratoire de Cytogénétique et d'Ecologie
Université des Sciences et Techniques de Lille
59650 VILLENEUVE D'ASCQ.

# TABLE DES MATIERES

I. - INTRODUCTION..... 8

A - Importance actuelle des isozymes dans la biochimie génétique ..... 8

1. Les isozymes dans la cellule, dans les tissus, dans un organisme..... 10

a) isozymes et compartimentation..... 10

b) isozymes dans les tissus d'un même organisme..... 11

c) isozymes dans un même organisme..... 12

2. Variants isozymatiques définis dans des organismes différents..... 13

B - But du travail..... 22

II. - MATERIEL UTILISE..... 23

A - Taxinomie du genre Ulex..... 24

B - Caractères phytogéographiques et phytosociologiques des taxons 24

C - Caractères des formes analysées..... 28

D - Prélèvement du matériel végétal..... 30

III. - ANALYSE DES PROTEINES TOTALES SOLUBLES..... 31

A - Intérêt de l'analyse des protéines solubles (électrophorèses en disques sur gel de polyacrylamide)..... 32

B - Résultats..... 32

1. des électrophorèses en disques sur gel de polyacrylamide..... 32

2. des Rf calculés..... 32

3. de la recherche d'un autre mode de représentation..... 36

4. du coefficient de similitude..... 36

C - Discussion..... 39

D - Résumé..... 41

IV. - ANALYSE DES LEUCINE-AMINOPEPTIDASES..... 42

A - Introduction..... 43

B - Résultats..... 46

1. de l'électrophorèse..... 46
2. de l'estimation du poids moléculaire..... 47
3. de la détermination du point isoélectrique..... 49

C - Discussion..... 54

D - Résumé..... 55

V. - ANALYSE DES ESTERASES..... 56

A - Introduction..... 57

B - Résultats..... 60

1. de l'activité spécifique estérasique..... 60
2. de l'activité estérasique dans l'extrait brut..... 62
3. des isoestérases et des électrophorèses sur gel de polyacrylamide..... 62

a) influence du substrat 1-Naphthylacétate..... 62

b) utilisation d'autres substrats synthétiques..... 63

4. Estimation du poids moléculaire..... 64

5. Analyse des isoestérases par focalisation isoélectrique préparative..... 65

a) résultats qualitatifs ..... 65

b) aspect quantitatif de l'analyse des isoestérases..... 68

c) analyse des cinétiques isozymatiques..... 70

- influence du pH..... 70
- influence de la température..... 72

C - Discussion..... 73

D - Résumé..... 75

VI. - ANALYSE DES PEROXYDASES..... 76

A - Introduction..... 77

B - Résultats..... 79

1. de l'activité totale peroxydasique des tissus chlorophylliens des Ajoncs..... 79
a) influence du pH sur l'activité totale..... 82
b) influence de la température..... 82
2. séparation des isoperoxydases..... 82
a) analyse par électrophorèse sur disques..... 82
b) séparation préparative des isozymes peroxydasiques par focalisation isoélectrique préparative..... 84
c) comparaison des isoperoxydases des Ajoncs..... 86
d) analyse quantitative des isoperoxydases séparées..... 90
e) cinétique des isoperoxydases isolées..... 92
3. activité AIA-oxydasique des isoperoxydases..... 93
a) comparaison des taux de purification des peroxydases et AIA-oxydases..... 93
b) influence du pH sur l'activité AIA-oxydasique dans l'extrait brut..... 95
c) influence de la température sur l'activité AIA-oxydasique dans l'extrait brut..... 96
d) analyse des isozymes isolées..... 96
e) cinétique des isozymes..... 98
4. l'inhibiteur de peroxydase..... 99
a) mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur..... 100
b) la nature de l'inhibiteur..... 101
c) action de l'inhibiteur..... 103
d) conclusions..... 105
5. inhibition de l'activité AIA-oxydasique..... 107

C - Discussion..... 108

D - Résumé..... 110

VII. - DISCUSSION FINALE..... 112

VIII. - RESUME FINAL..... 115

IX. - ABREVIATIONS UTILISEES..... 116

X. - BIBLIOGRAPHIE..... 117

*ULEX EUROPAEUS* L., Ambleteuse, 31-3-75.

*ULEX GALLII* Planch., Cap Fréhel, 4-9-76 dans un peuplement d'*U. europaeus*.

*ULEX GALLII* Planch., Cap Fréhel, 4-9-76.

*ULEX MINOR* Rothm., près Dinard, 5-9-76.

# I. INTRODUCTION

## A. - *IMPORTANCE ACTUELLE DES ISOZYMES DANS LA BIOCHIMIE GENETIQUE.*

L'hétérogénéité enzymatique est une notion ancienne mais, attribuée à des artéfacts ou modifications secondaires issues des processus de purification, elle resta longtemps inexploitée.

En 1959, MARKERT et MØLLER (97) désignèrent sous le terme d'"isozymes" (ou "isoenzymes") ces formes multiples moléculaires d'enzymes. Ces dernières années la liste des enzymes qui présentent des formes multiples s'allonge sans cesse. Cet essor est étroitement lié à la multiplicité et au perfectionnement des techniques électrophorétiques et à leur association de plus en plus fréquente aux techniques histochimiques (zymogrammes) (15, 145). Parallèlement à l'extension de nos connaissances, la nécessité de les classer s'est imposée selon leur origine, leur déterminisme génétique et leur structure, d'après SCANDALIOS (134) ; on distingue des isozymes non plus au sens le plus large mais des isozymes "allélique,non alléliques, homo-ou hétéropolymères".

Desnombreuses analyses biochimiques ou de biochimie génétique, se dégage un fait marquant : leur omniprésence dans les organismes. Leur présence apparaît actuellement comme un trait banal du métabolisme. Le tableau I illustre diverses participationsimportantes de quelques isozymes végétales dans l'orientation du métabolisme : formation de la lignine (cinnamoyl - CoA ligase ; phénylalanine - ammonium lyase, etc...) ; dans la photosynthèse (ribulose-diphosphate carboxylase ; phosphoénol pyruvate carboxylase); dans le catabolisme hormonal (indole acétate oxydase). Ainsi, leur omniprésence est directement liée à la multiplicité des voies métaboliques, qu'elles vont contrôler.

Cependant, cette liste n'est pas exhaustive et l'on peut s'attendre à un élargissement plus net de nos connaissances dans les prochaines années. En effet, l'identification des isozymes est presque exclusivement basée sur des différences de composition en acides aminés exprimées par des modifications de leurs migrations dans un champ électrique. Or, si une modification relevée par le changement d'un acide aminé dans une séquence polypeptidique est à l'origine de cette identification, elle n'est pas pour autant toujours responsable des différences de mobilité électrophorétique observées ( 74, 96, 134) ; seules de nouvelles techniques plus sensibles en permettront la révélation.

Tableau I. - Enzymes végétales.

| ENZYME | NOMENCLATURE ENZYME COMMISSION | ORIGINE | REFERENCES |
|---|---|---|---|
| Acétylglucosaminidase | 3.2.1.29 | *Dictyostelia* | 90 |
| ADP-Glucose-α-1,4-Glucanne-α-4-glucosyltransférase | 2.4.1.b | *Cyanidium* | 46 |
| Alanine aminotransférase | 2.6.1.2 | *Zea* | 1 |
| Alcool déshydrogénase | 1.1.1.1 | *Phascolus, Zea, Typha, Pirus* | 73,133,134, |
| Aldolase | 4.1.2.7 | *Spinacia, Raphanus, Daucus* | 156 |
| Aminopeptidase | 3.4.1.2 | *Pisum, Phascolus* | 10,137,170 |
| Amylase | 3.2.1.1 | *Zea, Triticum, Secale* | 20,73,164 |
| ARN-polymérase | 2.7.7.6 | *Triticum, Mycètes* | 56,102 |
| Ascorbate oxydase | 1.10.3.3 | *Pinus* | 161 |
| Aspartate aminotransférase | 2.6.1.1 | *Spinacia, Zea, Cucurbita* | 1,66,152 |
| Catalase | 1.11.1.6 | *Zea* | 134 |
| Cellulase | 3.2.1.4 | *Citrus* | 54 |
| Cinnamoyl-CoA-ligase | | *Petunia* | 124 |
| Cinnamylalcool déshydrogénase | | *Glycine* | 174 |
| p-Coumaryl-CoA-ligase | | *Glycine, Petunia* | 79,123 |
| Cutinase | | *Fusarium* | 122 |
| Déhydroquinase | | *Neurospora* | 52 |
| Déhydroquinate déshydratase | 4.2.1.10 | *Neurospora* | 52 |
| Désoxyribonucléase | 3.1.4.5 | *Pseudomonas* | 108 |
| Estérase | 3.1.1.1 | *Phascolus, Hordeum, Picea* | 2,9 |
| Formate déshydrogénase | 1.2.1.2 | *Baptisia* | 141 |
| Fumarase | 4.2.1.2 | *Lycopersicum* | 63 |
| β-Galactosidase | 3.2.1.23 | *Baptisia* | 141 |
| α-1,4-glucanne-phosphate-glucosyltransférase | | *Cyanidium* | 46 |
| α-1,4-glucanne-α-1,4-glucanne-6-glucosyltransférase | 2.4.1.18 | *Cyanidium* | 46 |
| α-1,4-glucanne-synthétase | | *Oryza* | 120 |
| Glucose-6-phosphate déshydrogénase | 1.1.1.49 | *Candida, Dianthus* | 104,159 |
| β-Glucosidase | 3.2.1.21 | *Dictyostelia* | 90 |
| Glutamate déshydrogénase | 1.4.1.2 | *Ricinus, Mycètes* | 84,85 |
| Glutamate oxaloacétate transaminase | 2.6.1.1 | *Zea, Triticum* | 60,139 |
| Glycéroldéshydrogénase | 1.1.1.6 | *Baptisia* | 141 |
| Indole-3-acétate oxydase | | *Pisum* | 29 |
| Indole-3-acétaldéhyde réductase | | *Cucumis* | 17 |
| Indophénol oxydase | | *Baptisia* | 141 |
| Invertase | 3.2.1.26 | *Haemanthus* | 86 |
| Isocitrate déshydrogénase | 1.1.1.42 | *Pirus malus, Mycètes* | 85,133 |
| Lactate déshydrogénase | 1.1.1.27 | *Dianthus, Neurospora, Solanum, Mycètes* | 16,85,104,13 |
| Lipase | 3.1.1.3 | *Phaseolus* | 132 |
| Lipoxygénase | 1.13.1.13 | *Pisum* | 23 |
| Malate déshydrogénase | 1.1.1.37 | *Neurospora, Spinacia, Zea, Nicotiana, Equisetum* | 8,30,114,157 |
| Malate enzyme | 1.1.1.38 | *Lycopersicum, Solanum* | 16,63 |
| Nucléotidase | 3.1.3.5 | *Funaria* | 128 |
| Peroxydase | 1.11.1.7 | *Cucurbita, Datura, Zea* | 14,32,88 |
| Phénylalanine ammonia lyase | 4.3.1.5 | *Aesculus* | 21 |
| Phénol oxydase | 1.10.3.1 | *Quercus* | 6,12 |
| Phosphatase acide | 3.1.3.2 | *Arabidopsis* | 69 |
| Phosphatase alcaline | 3.1.3.1 | *Dictyostelia* | 90 |
| Phosphénolpyruvate carboxylase | 4.1.1.32 | *Chlamydomonas, Phaseolus, Cakile, Gossypium* | 7,22,110,163 |
| Phosphofructokinase | 2.7.1.11 | *Lycopersicum* | 63 |
| Phosphoglucomutase | 2.7.5.1 | *Lycopersicum* | 63 |
| 6-Phosphogluconate déshydrogénase | 1.1.1.43 | *Lycopersicum, Dianthus, Candida* | 63,104,159 |
| Phosphoexose isomérase | 5.3.1.9 | *Lycopersicum* | 63 |
| Phosphorylase | 2.4.1.1 | *Solanum* | 51 |
| Ribonucléase | 2.7.7.16 | *Pinus* | 98 |
| Ribulosediphosphate carboxylase | 4.1.139 | *Avena* | 155 |
| Succinate déshydrogénase | 1.3.99.1 | *Zea* | 109 |
| Sulfate perméase | | *Neurospora* | 99 |
| Superoxyde dismutase | 1.15.1.1 | *Spinacia, Spirulina* | 92 |
| Thréonine déaminase | 4.2.1.16 | *Dictyostelia* | 90 |
| Transaldolase | 2.2.1.2 | *Candida* | 159 |
| Transkétolase | 2.2.1.1 | *Candida* | 159 |
| Triosephosphate isomérase | 5.3.1.1 | *Pisum* | 3 |
| UDP-glucose-4-épimérase | 5.1.3.2 | *Phaseolus* | 67 |
| Uréase | 3.5.1.5 | *Phaseolus* | 40 |

- Fonctions des isozymes :

Omniprésentes, leurs activités sont étroitement liées à leur localisation. Cependant l'étude de leur comportement conduit à dissocier :

I - les isozymes dont la présence appartient normalement à une cellule ou à un même organisme ;

II - les isozymes qui peuvent être considérées comme des variants électrophorétiques dont la présence ou l'absence dans des organismes différents sera un critère pour distinguer ces organismes.

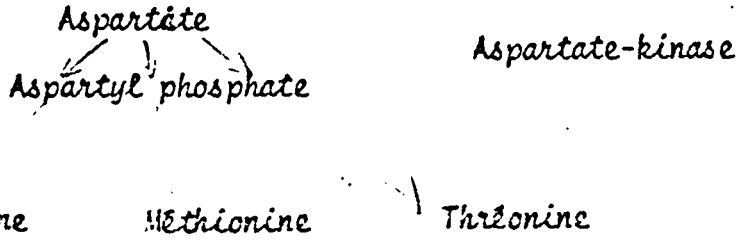
## I. - LES ISOZYMES DANS LES CELLULES, DANS LES TISSUS, DANS UN ORGANISME.

Le comportement des isozymes est nuancé, leurs diverses fonctions sont étroitement liées à leur localisation cellulaire et à leurs rapports avec la compartimentation intracellulaire ; elles participent à la régulation différentielle des voies métaboliques ; elles interviennent enfin, dans la différenciation et le développement non seulement des différents territoires de la cellule ou du tissu mais également de l'organisme tout entier.

### I.a - Isozymes et compartimentation :

Un excellent exemple de leur polymorphisme en fonction de leur localisation intracellulaire est donné par LONGO et SCANDALIOS (89), Les malates-déshydrogénases possèdent des isozymes cytoplasmiques différentes de celles de la fraction mitochondriale.

- Isozymes et régulation : La présence d'isozymes différentes dans une même organite semble curieuse mais se justifie : exemple présenté par WILKINSON (17, 173). Chez *Escherichia coli*, l'aspartate-kinase contrôle la formation de trois acides aminés : lysine, méthionine et thréonine. Trois isozymes participant à cette biosynthèse sont identifiées. Or, au cours du processus, l'une d'entre elles est inhibée sélectivement par l'un des produits finaux (feedback inhibition), ce qui , en d'autres termes, signifie qu'une seule isozyme était à l'origine de chacune des trois voies conduisant aux trois acides aminés ; ces trois voies métaboliques sont déjà bien séparées bien qu'une même réaction se déroule selon le schéma.



Cet exemple est intéressant parce qu'il illustre l'intérêt que présente l'analyse de la cinétique isozymatique dans l'étude de la régulation métabolique.

I.*b* - Isozymes et tissus d'un même organisme :

Au cours de la différenciation, la participation d'enzymes est nécessaire pour assurer les besoins eux mêmes spécifiques de chaque tissu. Comme chaque isozyme est le produit direct de l'action d'un gène, on peut suivre par l'analyse de leurs changements, l'expression génique différentielle liée au développement et à la différenciation (134, 133). Cependant l'analyse du développement permet de nuancer la qualité de la variation isozymatique selon qu'elles agissent spécifiquement dans une étape bien définie ou encore qu'elles sont caractéristiques d'un certain tissu. Ces variations de la composition isozymatique observées au cours du développement sont quantitativement rapportées et il apparaît nettement que la présence ou l'importance de l'action isozymatique sont liées au bon fonctionnement, lui-même variable, d'un organisme au cours de son existence.

Chez les végétaux, l'étude de l'activité isozymatique en relation avec la différentiation, se limitent largement à la description des changements observés ce qui, actuellement, ne fait guère progresser nos connaissances de l'influence génétique dans le contrôle du développement et de la différenciation.

Par contre, l'efficacité de l'action isozymatique peut être bien comprise en considérant l'exemple de l'analyse du polymorphisme de la lactate-déshydrogénase qui, selon les tissus où se localisent ses isozymes présentera des différences considérables de leur cinétique selon les tissus (173).

Généralement, des sous-unités en nombre variable, apparaissent chez les isozymes polymériques. Ainsi deux formes homotétramériques de la lactico-déshydrogénase sont identifiées : l'une est présente dans le tissu musculaire squelettique (LDH-M), l'autre appartient au muscle cardiaque (LDH-H). Si ces deux formes étaient présentes dans le même tissu, la formation d'hétéropolymères serait possible, dans cette éventualité 5 isozymes sont connues et correspondent aux formes suivantes :

- une première forme homotétramère dite $M_4$, constituée de quatre sous-unités de type M ;
- trois formes hétérotétramères l'une $M_3H$ comprend 3 sous-unités M et une sous-unité H l'autre $M_2H_2$ et enfin $M_1H_3$ ;
- enfin une cinquième ($H_4$) forme homopolymère constituée de quatre sous-unités H.

Ces isozymes diffèrent par leurs cinétiques : l'homotétramère LDH - H localisé dans le muscle cardiaque est fortement inhibé par les fortes concentrations en pyruvate. Par contre, ces concentrations sont optimales pour l'activité de la LDH-M des muscles du squelette. On peut donc supposer (173) que dans les tissus des muscles du squelette la LDH-M favorise la voie qui conduit à la formation du lactate nécessaire à la physiologie du muscle : la glycolyse anaérobie aboutit normalement à une formation rapide d'énergie sous forme de NADH.

La LDH-H est plus adaptée au métabolisme du muscle cardiaque, elle agit en effet selon la voie favorisant la formation du pyruvate qui sera oxydé par le cycle de Krebs.

Le rôle des isozymes est donc prépondérant dans le métabolisme en facilitant une adaptation spécifique de chaque tissu à une fonction donnée. Il faudrait qu'un plus grand nombre de travaux soit consacré à l'analyse des cinétiques des formes multiples d'enzymes car une meilleure connaissance de leurs structures et des facteurs qui influencent leurs activités permettraient la recherche d'une conclusion plus directe en corrélation avec leurs différentes fonctions.

I.C - Isozymes dans un même organisme :

Nous venons d'envisager l'influence de la présence et de l'activité isozymatiques sur les voies métaboliques d'une cellule ou de tissus histologiquement homologues mais de fonctions éloignées. Il est également possible que des isozymes différentes catalysent la même réaction dans une même cellule si les conditions offertes changent ; ainsi un changement rapide entraînant une variation de concentration du substrat (en particulier substrats exogènes à l'organisme) exigera la présence d'une isozyme mieux adaptée à cette nouvelle situation. Dans cette éventualité, un organisme qui possèderait deux isozymes : l'une travaillant d'une manière optimale pour de faibles concentrations en substrat et l'autre dont l'activité serait favorisée par des concentrations importantes, sera plus favorisé qu'un autre organisme qui n'aurait à sa disposition qu'une seule enzyme opérant moyennement dans tous les cas (24).

Ainsi, des isozymes facilitent l'adaptation rapide d'un organisme à la variabilité d'un environnement (71), dont les facteurs de variation sont nombreux tels le pH, la température etc... La température est un paramètre dont l'influence est importante sur le comportement des plantes et des animaux poïkilothermes. Ainsi on a constaté qu'un grand nombre de poissons eurythermes se contentent d'une seule enzyme qui fonctionne sans changement dans une large zone de température (150 ).

Il serait intéressant de contrôler si on observe un changement régulier entre deux valeurs relativement constantes, car dans ce cas il serait certainement plus avantageux pour l'organisme de posséder deux isozymes.

Pour des changements intervenant dans une gamme de valeurs plus importantes, il sera plus avantageux de posséder une enzyme avec des capacités assez larges ; ainsi l'organisme ne sera pas surchargé par un nombre élevé d'isozymes ayant chacune une gamme très restreinte de fonctionnement (150).

On peut donc admettre au terme de ce premier point concernant la présence d'isozymes dans le métabolisme normal d'une cellule ou d'un organisme qu'elles interviennent à des niveaux multiples dans la régulation métabolique et dans l'adaptation optimale du tissu ou de l'organisme aux besoins métaboliques en fonction de l'environnement et de sa variation.

## 2. - VARIANTS ISOZYMATIQUES DEFINIS DANS DES ORGANISMES DIFFERENTS.

### - Isozyme et transmission héréditaire :

L'étude des isozymes revêt une particulière importance en génétique car chaque isozyme étant le produit direct d'un ou de plusieurs gènes, sa connaissance sera la meilleure approche du gène. Ainsi, ces composés étant génétiquement définis et contrôlés par un nombre très faible de gènes, leur utilisation dans les problèmes délicats qu'offre la taxinomie présentera, par conséquent, un énorme avantage par rapport aux critères morphologiques qui dépendent généralement d'un nombre toujours plus élevé de gènes.

Enfin, l'action génique est elle-même connue puisque l'action isozymatique peut être parfaitement définie ; c'est là un avantage que d'autres composés ne présentent pas, tels les flavonoïdes, les anthocyanes utilisées si fréquemment dans les manipulations génétiques, leurs fonctions étant toujours plus ou moins bien comprises.

Il est vraisemblable que les isozymes appartenant à une même cellule, ou à un même organisme (71) doivent être controlées par des gènes distincts puisque chaque isozyme présente une fonction bien déterminée : de telles isozymes peuvent être considérées comme des isozymes non-alléliques. Par contre, la comparaison d'organismes différents conduit à la conception de la présence d'isozymes "alléliques" formées par exemple par une mutation sur un locus. JOHNSON a souligné (71, 72)

l'importance capitale de ces "variants" isozymatiques alléliques dans des domaines génétiques extrêmement variés : origine d'espèces, évolution, génétique des populations, sélection etc... L'application de la variation isozymatique est tout aussi fructueuse en taxinomie dans l'appréciation des affinités entre espèces par l'élaboration "d'arbres généalogiques". Dans cette voie, SCOGIN (142) propose un schéma du genre *Lupinus* en se basant sur l'analyse des isoleucine-aminopeptidases. Certes, cette tentative qui ne repose que sur l'étude d'une seule enzyme ne peut dépasser le cadre d'une simple hypothèse puisque l'analyse d'autres enzymes conduirait probablement à une image totalement modifiée.

Les relations biochimiques entre les espèces sont également recherchées par l'étude de la variation protéique (83,147). Mais ces tentatives nécessaires pour mieux connaître les affinités demeurent aléatoires, car on se base ici sur des molécules nombreuses dont la structure, la fonction, le déterminisme génétique sont inconnus et devront être précisés. Ainsi que bien que les analyses enzymatiques conduisent à des conclusions plus ou moins nettement définies, le fait que leur fonction est déterminée avec précision, nous permet de mieux connaître et évaluer l'importance de leur intervention dans le métabolisme cellulaire ainsi que les relations "génétique-métabolisme".

Les isozymes offrent donc de nombreux avantages dans l'étude de l'évolution et de l'origine des espèces. L'étude de ces sujets était autrefois basée sur des phénomènes morphologiques. Avant l'application des techniques électrophorétiq à ces problèmes, l'évolution est étudiée par exemple en cherchant une liaison entre la fréquence d'un gène caractérisant un trait morphologique, par exemple la couleur des écailles de *Cepaea* (24), et des facteurs d'environnement. Une liaison directe entre l'environnement et la présence d'un gène indique fortement un effet de sélection.

Sur ce point de vue des controverses importantes existent au niveau de l'importance qui doit être accordée à ces observations au point de vue sélection. Dans ces controverses les études des isozymes ont été particulièrement fructueuses pour élucider le problème important qui est l'évolution des espèces. Les controverses se sont développés à partir de deux points de vue différents :

a - les changements dans la séquence d'acides aminés de certaines protéines au cours de l'évolution ;

b - l'observation d'une hétérozygotie importante dans un seul individu.

L'appréciation quantitative et qualitative des changements qui interviennent dans la séquence des acides aminés des protéines chez des espèces plus ou

moins proches, ou de la variation isozymatique observée dans des populations naturelles est à la base de théories qui s'affrontent : celle des "neutralistes" et celle des "sélectionnistes".

Ces deux théories admettent l'éventualité d'une mutation au hasard mais pour les neutralistes, elle est guidée et maintenue par une dérive génétique également soumise au hasard. Pour les "tenants de la sélection" par contre l'apparition de la mutation (due au hasard) n'est maintenue par la suite qu'en fonction des avantages sélectifs qu'elle apporte à l'organisme au cours de l'évolution.

- Valeurs de ces hypothèses par rapport à l'analyse des séquences en acides aminés :

L'analyse séquentielle en acides aminés des protéines ayant des fonctions identiques (similaires), hémoglobine ou cytochrome par exemple, fait apparaître des différences d'autant plus importantes que les espèces étudiées sont plus éloignées. KIMURA (77) (neutraliste) suppose l'existence d'un taux constant de substitution des acides aminés, maintenu au cours de l'évolution par une dérive génétique au hasard et conduisant à des composés différents dans leur structure primaire mais équivalents dans leurs fonctions.

Les tenants de la sélection par contre pensent que ces mutations sont maintenues dans une espèces donnée en raison de l'avantage qu'elles représentent à un moment donné du développement.

Un exemple interessant illustre ceci, c'est celui de l'hémoglobine de l'Homme (58). Pour les neutralistes, ils envisagent la possibilité de remplacer l'hémoglobine de l'Homme par une hémoglobine provenant (appartenant) à un animal choisi au hasard, puisque les différences séquentielles étant dues au hasard, elles n'apportent aucune modification de leur fonction.

Il est évident qu'une telle expérience est impossible mais deux hémoglobines se rencontrent chez l'Homme : une hémoglobine "foetale" et une hémoglobine "adulte" qui diffèrent par la substitution de la chaine β adulte par la chaine γ.

Les deux hémoglobines diffèrent pour leur affinité pour l'oxygène. Ceci peut être expliqué en considérant l'existence d'une différence de liaison du 2,3-diphosphoglycérate sur la chaîne polypeptidique, influencée par la présence de l'histidine (position 143) dans la chaine β de l'hémoglobine adulte, ou par la sérine qui s'y substitue dans la chaine Y de l'hémoglobine foetale.

Les courbes de dissociation de l'oxygène seront donc différentes pour les deux hémoglobines, celle de l'hémoglobine fœtale étant décalée vers la partie gauche du tracé correspondant à l'hémoglobine adulte.

Les modifications structurales observées sont étroitement liées aux besoins physiologiques imposés par chacun des différents stades du développement.

Cette substitution d'acide aminé précis est considérée comme un argument en faveur d'avantage sélectif pour les sélectionnistes bien que les neutralistes peuvent toujours alléguer qu'il ne s'agit là que d'un fait d'autant plus exceptionnel que généralement les études sont surtout orientées vers le polymorphisme isozymatique.

- Variation isozymatiques :

Depuis quelques années l'hypothèse d'une unité génétique au sein d'une espèce ou d'une population naturelle est de plus en plus abandonnée en raison de l'importance de la variation intraspécifique et du polymorphisme fréquemment observés dans les populations au niveau en particulier du polymorphisme protéique et enzymatique qui reflète nécessairement la diversité de la composition génétique.

Le polymorphisme protéique et enzymatique doit être pris en considération dans l'évolution de l'espèce ; c'est le noeud du mécanisme de la sélection (24).

En effet, la compréhension de la variabilité génétique entre les populations peut s'admettre dans la perspective d'une meilleure adaptation, ce qui représente un pas dans l'évolution de l'espèce.

Mais avant d'envisager l'étude expérimentale de l'influence de la composition isozymatique dans le domaine de la génétique des populations, il est nécessaire de préciser l'importance que revêt la présence des variants électrophorétiques (71) selon les deux hypothèses qui s'affrontent actuellement, celles des neutralistes ou des sélectionnistes.

KIMURA et CROW (78) considèrent sur des bases strictement théoriques et non expérimentales, qu'une grande variation génétique dans une population représente "une charge génétique" considérable conduisant à la disparition de l'espèce. Aussi, pensent-ils que le taux total de la variation dans une même population ne doit pas être important.

Mais ces conclusions sont nettement battues en brèche par le fort degré de polymorphisme enzymatique mis en évidence par les techniques électrophorétiques qui est apparu bien superieur aux prévisions théoriques.

Ce que montre l'exemple de Drosophila pseudoobscura où 30% des loci des gènes structuraux sont polymorphes dans chaque population et le taux de héterozygotie est de 12% (87) chez un individu.

De même chez l'Homme, sur 71 loci examinés, 28% sont polymorphes dans une population et le taux d'hétérozygotie est de 6,7% par individu (58). Enfin chez les plantes, les estimations considèrent que chez Avena sp. 31 à 54% des loci sont polymorphes dans une population (2).

Ainsi KIMURA et CROW (78) ont essayé de maintenir leur théorie en formulant l'hypothèse de la neutralité sélective : la charge génétique dans une population n'est pas accrue par la présence du polymorphisme enzymatique si les variants électrophorétiques ne présentent pas de différences considérables dans leurs propriétés; l'influence de la sélection au niveau de ces variants n'est pas modifiée. Dans la plupart des exemples connus, le polymorphisme dans les populations naturelles reflète dès lors un changement du hasard et sera sans conséquence métabolique. Cette théorie est discutable, car les différents degrés du polymorphisme sont liés à la fonction physiologique de l'enzyme étudié. En fait on a observé que certaines classes d'enzymes ainsi établies en relation avec leur fonction sont beaucoup plus variables que d'autres. Actuellement, aucune explication génétique ne peut rendre cette observation compatible avec la ~~théorie~~ neutralité sélective (71). GILLESPIE et KOJIMA (53) ont récemment proposé l'existence d'une relation entre le polymorphisme enzymatique et la variabilité des substrats offerts à ces enzymes. Ainsi, la variation sera plus faible pour les enzymes intéressées à la production énergétique que pour celles qui dégradent les substrats exogènes. Cette hypothèse est étayée par de nombreux résultats expérimentaux, en particulier les enzymes caractérisées par une ~~large~~ faible spécificité de substrats sont nettement plus variables que celles qui utilisent des substrats hautement spécifiques. JOHNSON (71) a très largement étendu cette hypothèse. Il répartit à cet effet les enzymes en trois classes selon que les enzymes sont caractérisées :

- par une grande variabilité de substrats (I) et qui montrent un degré élevé de polymorphisme ;
- par leur fonction de régulation dans le métabolisme (II) et dont la variation sera relativement plus élevée que celle du troisième groupe ;
- par l'absence de fonctions dans la régulation (III).

Il est évident que des changements interviennent sur des loci, correspondant à des enzymes intervenant dans la régulation vont induire des modifications beaucoup plus importantes au niveau du métabolisme que si ces loci correspondaient à des enzymes non régulateurs et qui atteignent en général très vite l'équilibre de la réaction. Aussi ces enzymes, cette vitesse de réaction étant supérieure à ce qui est nécessaire au flux exigerait pour influence la régulation métabolique une réduction considérable de leurs activités.

En général, les enzymes qui participent à la régulation catalysent des réactions soit d'une manière irréversible, soit en n'atteignant que difficilement l'état d'équilibre. Ce sont des enzymes qui se situant au départ d'une voie métabolique ou à un carrefour de ces voies.

Le tableau (selon JOHNSON (71) ) réunit les taux moyens d'hétérozygotiesrelevés pour ces trois classes d'enzymes testées dans différents organismes.

*Valeurs des taux moyens d'hétérozygotie:*

| Classes d'enzymes | Organismes | | |
|---|---|---|---|
| | Drosophila | Petits vertébrés | Homme |
| I | 0,24 | 0,22 | 0,18 |
| II | 0,19 | 0,14 | 0,13 |
| III | 0,06 | 0,06 | 0,005 |

On observe que dans chaque cas, l'hétérozygotie est variable, elle sera la plus forte pour les enzymes à substrats non spécifiques variables (classe I), assez forte pour les enzymes de la classe II qui interviennent dans la régulation et enfin elle apparait avec les taux les plus faibles pour les enzymes qui n'interviennent pas dans la régulation (classe III).

Avec une probabilité assez élevé, ces différences sont réelles ce qui montre clairement que le rôle physiologique du polymorphisme relevé du niveau des loci correspondant à ces enzymes du métabolisme est étroitement lié à la régulation du métabolisme.

La portée de ces résultats contre la théorie de la neutralité sélective est considérable. Il est très difficile de maintenir que l'hypothèse basée sur l'action des allèles polymorphes qui serait sélectivement équivalente pourrait expliquer les relations relevées entre polymorphisme et fonction enzymatique.

L'influence de l'hétérogénéité de l'environnement est souvent évoquée pour expliquer l'important degré du polymorphisme enzymatique relevé. On a donc émis l'hypothèse que le polymorphisme reflète réellement la capacité de compenser un changement antérieur. Ainsi, soumis à un environnement variable, l'organisme au cours de son évolution serait susceptible de développer une "stratégie optimale" grâce à la présence de plusieurs formes alternatives assurant une même réaction.

La présence de ces formes multiples serait nettement plus avantageuse pour un organisme que celle d'une forme enzymatique unique malgré une plus large capacité enzymatique. La connaissance des cinétiques et des propriétés physico-chimiques de chacune de ces formes multiples d'enzymes doit permettre de mieux comprendre *leur* existence. Il est également nécessaire de mieux connaître les facteurs extérieurs de l'environnement qui interviennent sur la fréquence des différents allèles présents dans une population. Enfin, il faut démontrer l'intervention directe de la sélection sur la fréquence allélique pour cela ayant identifié le facteur de sélection il est nécessaire de prouver que ce facteur agit directement sur le locus analysé.

Dans la tentative d'une recherche des effets d'une sélection l'utilisation du polymorphisme enzymatique est particulièrement favorable puisqu'elle conduit à l'identification simultanée des loci à travers la fonction enzymatique qu'ils codent.

Si nous connaissons la nature des différences qui caractérisent les différentes isozymes, la fonction de l'enzyme analysée et l'écologie de l'organisme il devient possible de postuler un ou plusieurs facteurs sélectifs et de rechercher une relation entre ces facteurs et la fréquence des gènes.

Un bon exemple de cette recherche de la fonction isozymatique dans l'évolution est apporté par les travaux de CLARKE et al. (24) dans l'étude des alcooldéshydrogénases (ADH) chez *Drosophila*.

Les populations naturelles de *Drosophila* sont caractérisées par la présence de deux allèles dénommés $Adh^F$ et $Adh^S$ qui diffèrent au niveau de la présence de leurs enzymes F et S. L'analyse biochimique montre que ces enzymes diffèrent :

- par leurs activités (F est deux fois plus actif que S) par rapport à un substrat tel l'éthanol (par mouche, par g d'extrait ou par g de protéines) ;

- par une thermostabilité : F est nettement plus thermolabile que l'enzyme S ;

- par leur réaction aux variations de pH : F est ici aussi plus sensible à cette variation que S. ;

- par leurs affinités à des substrats différents tels éthanol, n-propanol, isopropanol, octanol etc...

Dans tous les cas F réagit plus rapidement que S mais d'une manière plus ou moins forte selon les substrats. L'hétérozygote FS présente en général une réaction intermédiaire.

Parallèlement à l'établissement de ces importantes caractéristiques sur lesquelles la variation isozymatique est établie, il est nécessaire de préciser la nature de l'agent sélectif. Cela implique une bonne connaissance de la fonction de l'ADH qui chez *Drosophila* doit être particulière "détoxyfiante" puisque nes mouches vivent sur des fruits en décomposition où les concentrations en alcools atteignent 10 % et même davantage. Or de telles concentrations peuvent être toxiques pour des tissus vivants. L'hypothèse de cette action est appuyée par le fait que l'nn connaît des mutants dépourvus de cette enzyme et qui, dans ce cas ne peuvent pas vivre dans ce milieu.

Connaissant la fonction de l'enzyme et les différences caractéristiques qui permettent de distinguer chaque isozyme on peut émettre un certain nombre de prédictions concernant le comportement d'une population soumise à l'expérimentation : ainsi des concentrations élevées en alcool doivent favoriser l'expression de l'allèle F et cela est fonction de la variation de la spécificité des enzymes par rapport à chaque substrat. D'autre part, l'expression de chaque allèle S est favorisée par le choc thermique, tandis que celle de l'allèle F sera favorisée par l'exposition à de basses températures.

Toutes ces prévisions ont été cnnfirmées expérimentalement, différents travaux mettent en évidence l'existence d'une action sélective sur les variants du locus Adh. Dans des conditions bien déterminées, il est possible d'obtenir une variation des fréquences alléliques en fonction des propriétés physico-chimiques des isozymes et de l'influence des facteurs d'environnement sur des populations artificielles ou naturelles.

Dans des conditions où une sélection fortement orientée vers l'expression d'un allèle il semble que le polymorphisme ne peut être maintenu qu'en fonction d'une certaine hétérogénéité de l'environnement. Ceci peut être illustré par l'exemple des allèles correspondants à l'estérase d'un poisson (*Catastomus clarki*). Les fréquences alléliques des isoestérases sont étudiées tout le long de la rivière du Colorado (U.S.A.) ; ces fréquences montrent un rapport direct avec la température de l'eau. L'allèle ES-$I^a$ diminue vers le nord cependant que l'allèle Es-$I^b$ dont l'optimum de température est plus bas sera favorisé dans le nord (80).

L'importance de la sélection sur des loci génétiques peut être démontrée par le grand nombre et l'importance du polymorphisme des variants isozymatiques alléliques que l'on peut considérer comme les premiers critères en faveur de la sélection. Mais très souvent, il est difficile de bien caractériser l'effet de la sélection dans chaque exemple rencontré de polymorphisme car fréquemment la faiblesse de la sélection est telle qu'elle ne se manifeste pas en une seule génération.

Cependant, les faits qui militent en faveur de cette théorie sont d'ores et déjà trop importants pour accepter l'objection des tenants de la théorie neutraliste qui les considère comme une exception à la règle générale.

Il est donc vraisemblable que dans les prochaines années cette controverses entre "neutralistes" et "sélectionnistes" s'achèvera en faveur des seconds.

*B. - BUT DU TRAVAIL.*

Les techniques biochimiques sont fréquemment sollicitées pour aider à mieux comprendre les problèmes posés par la taxinomie. Ainsi, il est important de déterminer la relation qui doit exister entre la variation de port et la distribution géographique chez de nombreuses espèces appartenant à différentes familles telles les Légumineuses, les Ericacées, les Plantaginacées où des formes génétiquement bien définies présentent parfois une altération du port qui devient bas et même prostré en fonction d'une distribution écologique déterminées (26).

Le genre Ulex a particulièrement retenu notre attention parce qu'on y rencontre des formes basses chez différentes espèces ce qui nous permettra de rechercher si le mécanisme qui contrôle l'apparition et le maintient de ce "nanisme" est identique quelque soit l'espèce basse considérée.

Dans l'hypothèse que la variation du port est liée à des changements du métabolisme cellulaire, nous avons recherché la présence d'activités enzymatiques et étudié la composition isozymatique de différentes enzymes. Enfin, la comparaison des résultats obtenus chez les plantes dressées et les plantes basses de qui nous permettra de mieux connaître les différences qui existent entre ces différentes formes.

Au cours de l'analyse des isozymes nous nous sommes efforcée d'enrichir les données purement descriptives exclusivement basées sur la présence (ou l'absence) de bandes électrophorétiques par les données plus précises apportées par technique de focalisation isoélectrique préparative (F I P). C'est une méthode de fractionnement des protéines qui permet leur isolement dans des fractions pures en fonction de leur point isoélectrique.

En effet, les protéines sont des molécules amphotères ; placées dans un gradient du pH sous l'influence d'un champ électrique convenablement choisi, en caractère est annulé à un pH déterminé pour lequel les charges positives équilibrent les charges négatives. Au pH, les protéines isolées ne migrent plus car pH et pKi correspondent étroitement. Ainsi cette technique permet non seulement une analyse plus précise des isozymes séparées mais également leur définition par un critère plus précis que le Rf, le pKi.

Le matériel végétal analysé provient de populations naturelles ce qui nous a conduit à retenir l'influence de facteurs écologiques sur la composition isozymatique étudiée.

# C H A P I T R E  I I

## M A T E R I E L  U T I L I S E .

II. - MATERIEL UTILISE.

Le genre Ulex est remarquable par des écotypes dressés qui deviennent bas et même prostrés sur le littoral. Ce nanisme a souvent été attribué à une adaptation phénotypique (anénomorphose sur les côtes balayées par le vent). Mais, après transplantation en jardin, leur port ne change pas ; les descendants issus de graines sont dans l'ensemble du même type. Le phénotype ainsi transmis ne peut être un simple accomodat, mais un génotype adapté au milieu (49).

D'autres espèces présentent également, dans les mêmes variations écologiques, cette altération du port : Sarothamnus (48) ; Erica ciliaris (27) ; Plantago recurvata (27).

Dans le genre Ulex cette amplitude de phénotype se rencontre chez deux espèces différentes : Ulex europaeus L. et Ulex gallii Planch. ; ceci permet de comparer dans le même genre des écotypes différents.

A - TAXINOMIE DU GENRE ULEX.

Avant de définir la diagnose des espèces et des types analysés, il convient de rappeler les principaux traits de la taxinomie du genre Ulex qui se révèle assez imprécise.

Le genre fut longtemps monospécifique : Ulex europaeus L. (131), puis devint trispécifique : Ulex europaeus L., U. gallii Planch. et Ulex minor Rothm. (= Ulex nanus Forst.) (129).

Actuellement taxon spécifique, Ulex gallii Planch. a longtemps été considéré comme une sous-espèce d'Ulex europaeus L. (12) et parfois comme hybride Ulex europaeus L. x Ulex minor Rothm. (44).

Les caractères morphologiques des trois espèces sont conscrits dans le tableau II ; ils montrent qu'il est assez difficile de les séparer nettement. C'est une raison supplémentaire d'utiliser des données biochimiques pour les différencier.

B - CARACTERES PHYTOGEOGRAPHIQUES ET PHYTOSOCIOLOGIQUES DES TAXONS.

Ulex europaeus L., Ulex gallii Planch. et Ulex minor Rothm. sont des espèces atlantiques (27), mais chacune a une distribution phytogéographique, ainsi qu'une appartenance sociologique propres.

1. Ulex europaeus L.

Ulex europaeus L. est une espèce subatlantique (figure 1) qui préfère en général un climat peu contrasté, caractérisé par une température moyenne annuelle oscillant entre 8°C et 16°C, une pluviosité répartie uniformément sur toute l'année (50), une insolation moyenne faible et un vent assez fort (50). Elle craint les fortes gelées $\leq$ 10°C.

C'est l'espèce qui a la plus large répartition. Le type érigé participe aux fourrés préforestiers (Prunetalia) atlantiques et subatlantiques. De ce fait,

il fait partie de l'alliance Ulicion minoris, mais la déborde largement. Entre autres le type érigé se trouve dans l'association Calluno-Ericetum tetralicis des landes humides.

Le type prostré, appelé aussi Ulex europaeus maritimus, apparaît seulement dans les landes littorales qui sont climaciques :

- la lande thermophile sèche, halotolérante, des falaises sud-armoricaines : association Ulici (europaei) maritimi-Ericetum vagantis ;
- la lande sèche halotolérante des pointes extrême-atlantiques : association Dactylo-Sarothamnetum maritimi ;
- la lande à Ajonc de Le Gall qui est en retrait de la précédente : association Ulici (gallii) humilis-Ericetum cinereae où il se trouve avec Ulex gallii prostré (= humilis) ;
- finalement la lande mésophile des falaises, à l'ouest de Saint Malo-Vannes, avec Ulex gallii prostré : association Ulici (gallii) humilis-Ericetum ciliaris.

2. Ulex gallii Planch.

Ulex gallii Planch. se montre plus océanique qu'Ulex europaeus L.. CORILLION (27) le caractérise comme eu-atlantique et remarque que son aire de distribution (figure 2) recouvre le district phytogéographique à plus forte atlanticité du massif armoricain.

Cette espèce fait avant tout partie des associations à Ulex gallii qui se rangent dans l'alliance Ulicion minoris.

L'écotype dressé d'Ulex gallii se trouve

- dans les landes sub-sèches,non climaciques, à Ajonc de Le Gall des régions les plus occidentales : association Ulici gallii-Ericetum cinereae ;
- dans les landes mésophiles de l'intérieur de la Basse-Bretagne et du S.W. de la grande Bretagne : association Ulici (gallii)-Ericetum ciliaris ;
- dans les landes humides : association Ulici gallii-Ericetum tetralicis.

Le type prostré caractérise la lande à Ajonc de Le Gall, citée précédemment avec Ulex europaeus maritimus prostré : association Ulici (gallii) humilis-Ericetum cinereae.

3. Ulex minor Rothm.

Ulex minor est caractérisé comme ibéro-atlantique plus thermophile qu'Ulex europaeus et Ulex gallii. Quelques stations isolées situent la limite septentrionale de son aire de distribution dans le nord de la Bretagne (26). Dans le massif armoricain, les aires d'Ulex gallii Planch. et d'Ulex minor Rothm. s'excluent mutuellement.

Cette espèce caractérise l'alliance Ulicion minoris. Elle se trouve

- dans les landes sèches :

. les landes subméscphiles pas trop pauvres de Gascogne : Potentillo montanae - Ericetum cinereae ;

. la lande tempérée atlantique, sud-armoricaine et ligérienne : Helianthemo umbellatae - Ericetum cinereae ;

. la lande submésophile non thermophile du Nord-Ouest, Bretagne, Normandie, Angleterre : Ulici minoris-Ericetum cinereae .

- dans les landes mésophiles :
  - . groupe des associations Scopario-Ericeta ciliaris
  - . association Ulici minoris-Scoparietum
  - . association Ulici minoris-Ericetum ciliaris
- dans les landes humides :
  - . association Scopario-Ericetum tetralicis
  - . association Ulici minoris-Ericetum tetralicis

L'ensemble des données phytogéographiques et phytosociologiques traduit pour le genre ULEX en France, un gradient d'atlanticité qui va d'Ulex europaeus subatlantique (extension la plus continentale), par Ulex minor jusqu'à Ulex gallii, eu-atlantique la plus extrême dans son type humilis du littoral.

| | *Ulex europaeus L.* | *Ulex gallii Planch.* | *Ulex minor Roth.* |
|---|---|---|---|
| Taille | - 2 m et plus | - 2 m | - 1 m et plus |
| Tige | - robuste<br>abondamment velue | - robuste<br>abondamment velue | - assez souple, nombreux rameaux émis du même point<br>assez velue |
| Pédicelle | - 5-8 mm | - 3-5 mm | - 3,5 mm |
| Floraison | - surtout au printemps, février-juin | - été : juillet à octobre | - été : juillet à octobre |
| Taille fleur | - 14-17 mm | - 9-14,5 mm | - 9-12 mm |
| Sépales | - 12-16,5 mm | - 8-12 mm | - 8-10 mm |
| Etendard | - bien plus long que les autres pétales | - bien plus long que les autres pétales | - un peu plus long que les autres pétales |
| Ailes | - un peu plus longues que les sépales | - nettement plus longues que les sépales | - un peu plus courtes que les sépales |
| - Carène | - nettement plus courte que les ailes et les sépales | - plus longue que les sépales | - de la même longueur que les sépales |
| - Gousse | - dépasse les sépales, noire, couverte de cils blancs | - de la même longueur que les sépales, verte, tachetée sombre, couverte de poils souvent dorés | - de la même longueur que les sépales, verte, couverte de poils roux |

Tableau II . - Diagnose des espèces-type d'*Ulex* étudiées.

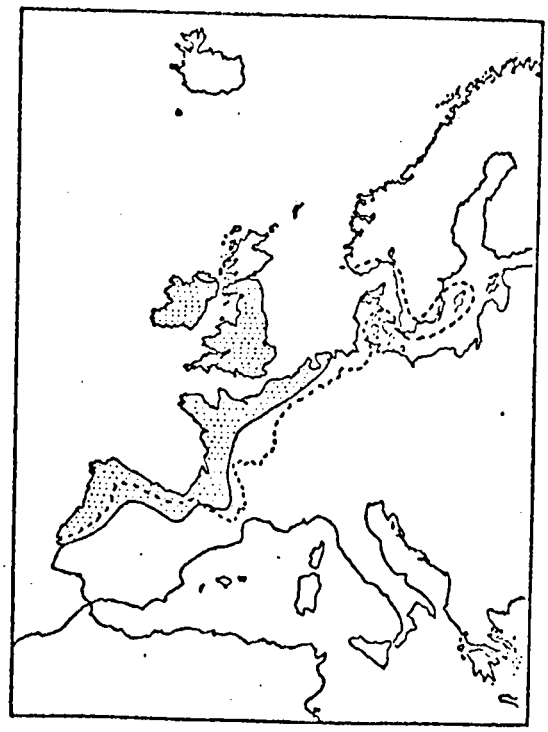


Figure 1. - Aire de distribution d'*Ulex europaeus* L. (——) et limite présumée du gradient eu-atlantique (---).

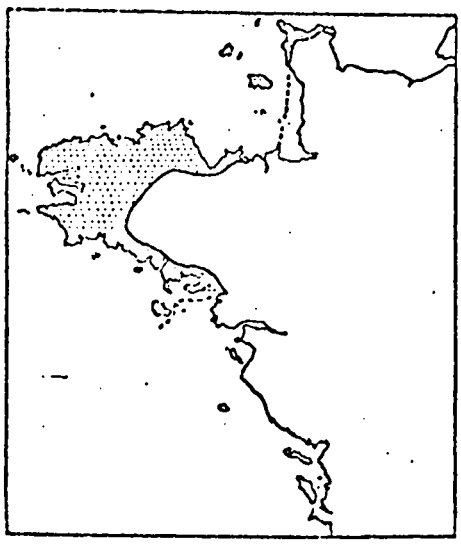


Figure 2. - Aire de distribution d'*Ulex gallii* Planch.

Sept formes du complexe Ulex sont analysées. Elles comprennent :

a) des formes dressées d'*Ulex europaeus L.* du Pas-de-Calais (où seules ces formes sont connues) et de Bretagne (désignées $E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$).

Les formes du Pas-de-Calais sont intéressantes à analyser car elles seront les témoins par leur variation de l'influence écologique d'une situation plus nordique.

b) une forme basse d'*Ulex europaeus L.* de Bretagne ($E_C$).

c) une forme dressée d'*Ulex gallii Pl.* ($G_D$) de Bretagne.

d) une forme basse d'*Ulex gallii Pl.* de Bretagne ($G_C$)

e) une forme dressée (connue en France uniquement sous cette forme), *Ulex minor Roth.*, de Bretagne (M).

Dans le tableau III sont consignées les principales caractéristiques de chaque forme, la figure 1 indique les lieux de récolte des différentes formes.

. $E_{D1}$ est cueillie dans le Pas-de-Calais, dans la vallée de la Hem près de Clerques à environ 100 m d'altitude. Cette station distante d'environ 25 km de la mer est la plus continentale de nos échantillons.

$E_{D2}$, deuxième forme du Pas-de-Calais, provient du pré communal d'Ambleteuse. Elle se développe sur une dune sableuse à 30 m d'altitude à 1 km de la mer.

$E_{D3}$ est la troisième forme dressée d'Ulex europaeus L. cueillie près de Pleubian (Bretagne) à 30 m d'altitude à environ 1 km de la mer. Ce site est celui qui sera le plus orienté à l'ouest pour U. europaeus L.

Les formes basses à *Ulex europaeus* et *U. gallii* sont toutes deux originaires du Cap d'Erquy à 50 m d'altitude, *U. gallii* occupe le versant ouest du Cap d'Erquy et ses nombreux coussins, très prostrés tapissent la falaise.

*U. europaeus L.*, situé plus à l'est est une forme basse mais plus élevée que celle des Ajoncs de Le Gall et a des exigences plus marquées pour se développer sur un sol plus riche.

Les formes dressées à U. gallii Pl. forment à 300 m d'altitude l'essentiel de la couverture végétale du plateau de Menez-Hom (Morbihan) totalement dégarni en espèces arborescentes. Ainsi, il apparaît d'après nos distributions géographiques

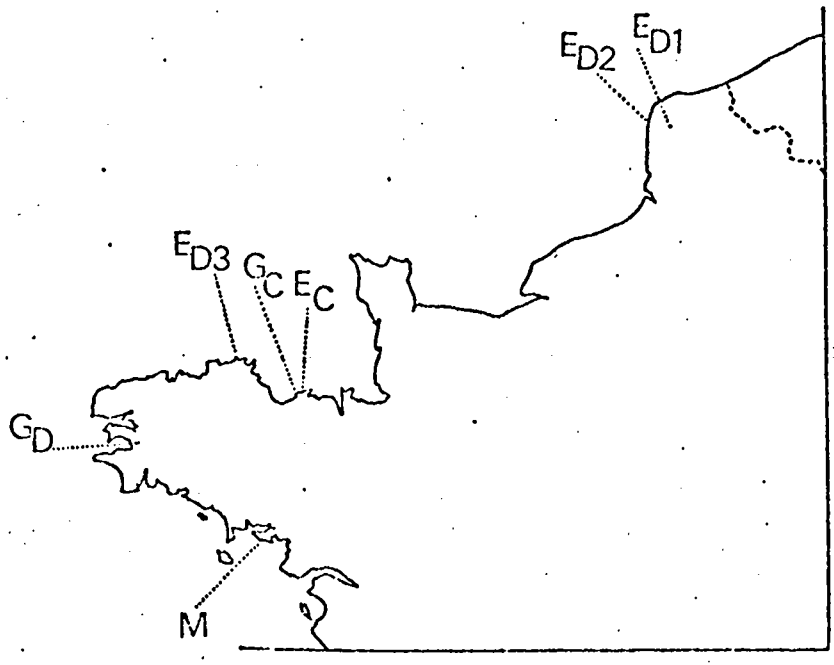



Figure 3. - Stations de prélèvement des formes d'*Ulex* étudiées.

| Espèce | Lieu de récolte | Port | Taille | Désignation | Longitude | Latitude |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *U. europaeus* L. | Hem(Pas-de-Calais) | Dressé | 1,5-2,0 | $E_{D1}$ | 0,35° | 55,45° |
| *U. europaeus* L. | Ambleteuse(Pas-de-Calais) | Dressé | 1,0-1,5 | $E_{D2}$ | 0,80° | 55,45° |
| *U. europaeus* L. | Pleubian(Côtes du Nord) | Dressé | 1,5-2,0 | $E_{D3}$ | 6,05° | 54,30° |
| *U. europaeus* L. | Cap d'Erquy(Côtes du Nord) | Couché | 0,5-1,0 | $E_C$ | 5,35° | 54,05° |
| *U. gallii* Pl. | Menez-Hom(Finistère) | Dressé | 0,5-1,5 | $G_D$ | 7,30° | 53,60° |
| *U. gallii* Pl. | Cap d'Erquy(Côtes du Nord) | Couché | 0,1-0,3 | $G_C$ | 5,35° | 54,05° |
| *U. minor* Roth.* | Since(Morbihan) | Dressé | 0,3-1,0 | M | 5,60° | 53,00° |

* Ulex minor Rothm. n'existe en France que dans la forme dressée.

Tableau III. - Provenance des types analysés. Le caryotype d'*Ulex europaeus* est tétraploïde 2n = 64 ou hexaploïde 2n = 96 , celui d'*Ulex gallii* est pentaploïde 2n = 80 ou hexaploïde 2n = 96 ; celui d'*Ulex minor* est diploïde 2n = 32 ou tétraploïde 2n = 64 (réf. 19, 158).

de nos récoltes qu'*U. gallii* pourrait vivre dans des endroits beaucoup plus exposés que ceux qui abritent *U. europaeus*.

Enfin, *U. minor Roth.* a été cueilli dans le golfe du Morbihan, dans une région marécageuse presque au niveau de la mer.

## D. PRELEVEMENT DU MATERIEL VEGETAL.

Les rameaux et phyllodes d'Ulex sont récoltés dans une population homogène au printemps.

L'échantillon est globalement prélevé sur plus d'une vingtaine d'individus pris au hasard dans la population.

Le matériel végétal est ensuite congelé et gardé à -18°C jusqu'à son utilisation.

# C H A P I T R E  I I I

## A N A L Y S E  D E S  P R O T E I N E S  T O T A L E S  S O L U B L E S

A. - INTERET DE L'ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SOLUBLES (ELECTROPHORESE EN DISQUES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE).

L'analyse biochimique des différentes formes d'ajoncs peut être envisagée dans une première étape par l'étude des protéines solubles.

Depuis une dizaine d'années une méthode sensible et reproductible, l'électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide, est souvent proposée pour mieux définir des unités taxinomiques, ce qui permettra de les différencier et de préciser leurs affinités. Bien souvent, en effet les critères physionomiques, morphologiques et cytologiques s'avèrent impuissants à élucider des problèmes taxinomiques ; l'application et la généralisation des techniques électrophorétiques apporte un critère chimiotaxinomique très enrichissant chez les Angiospermes (11,13,33,45,105,107,113,160,162), les Gymnospermes ( 106, 161 ), les Algues (175) et les Mycètes (10,172).

Le choix de l'analyse protéique se justifie également parce qu'ainsi le niveau étudié sera celui du gène dont elles sont le produit direct tandis que l'analyse d'un caractère par l'étude des flavonoïdes ou celle des anthocyanes sera d'interprétation difficile car ces composés sont contrôlés par un grand nombre de gènes ( 13 ).

Enfin l'analyse des protéines s'est également révélée prometteuse dans l'analyse des polyploïdes : DESBOROUGH et PELOQUIN ( 33 ) ont recherché à préciser le degré d'affinités entre différentes espèces de Solanum par la comparaison des profils protéiques de chaque espèce obtenus par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide.

Cette technique a donc été appliquée à notre matériel afin de mieux définir les différentes d'Ajoncs par l'établissement et la comparaison de leurs profils protéiques ( 61 ).

B. RESULTATS.

L'extraction des protéines solubles a été réalisée selon McCOWN et al. ( 103 ) à l'aide d'un tampon Tris -HCl, 0,1 M, pH 7,5 en présence de dithiothreitol (0,5 mM) et de polyvinylpyrrolidone (1 g/g de tissu congelé).

L'extrait brut obtenu est déposé directement sur les gels de polyacrylamide de telle sorte que la quantité déposée corresponde au même poids de tissu et non à la même quantité protéique ( 40 ) ce qui permet la comparaison en richesse protéique de chacun des extraits des différentes formes. Après électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide à 7 % dans un système basique (App. Techn. p. ) et coloration des protéines par une solution à 0,5 % d'amido-Schwarz 10 B, dans l'acide acétique à 7%.

1 - Résultats des électrophorèses en disques sur gel de polyacrylamide :

Les résultats des électrophorèses en gel de polyacrylamide sur disques des protéines totales solubles sont consignées dans la figure 4. Leur comparaison montre que, par cette technique, un grand nombre de bandes protéiques est séparé : 11, dans les extraits des formes dressées d'Ulex europaeus (PLEUDIAN) et d'Ulex gallii (MENEZ-HOM) ; 21, dans les extraits des formes dressées d'Ulex europaeus de la vallée de la Hem.

2 - Des Rf calculés :

Les valeurs des Rf établies permettent l'identification dans ces électrophorégrammes d'un certain nombre de fractions et leur classement en plusieurs groupes selon leur identité et la fréquence de leur représentation dans les différentes formes.

Nous pouvons sur ces bases distinguer plusieurs des fractions, celles qui sont communes à différents extraits ; celles où la variabilité des valeurs calculées des Rf reflète la grande diversité des formes protéiques dans ces extraits.

a) Fractions communes à différents extraits : Deux fractions protéiques ont une large distribution dans les électrophorégrammes :

- la première de Rf compris entre 0,10 et 0,15 correspond à une protéine remarquable par son omniprésence, sa forte concentration protéique, sa faible mobilité électrophorétique que traduisent les valeurs de son Rf établi dans un système basique. Cette protéine, par ces différents caractères, peut être assimilée à la fraction I protéique décrite par de nombreux auteurs (103,130).

Pour MARGULIES elle correspondrait à la ribulose di-phosphate carboxylase ( 95 ) qui est l'enzyme intervenant dans la fixation du $CO_2$ au cours de la photosynthèse.

Remarquons que malgré son omniprésence, cette fraction présente une certaine variabilité des Rf calculés en fonction des formes analysées :

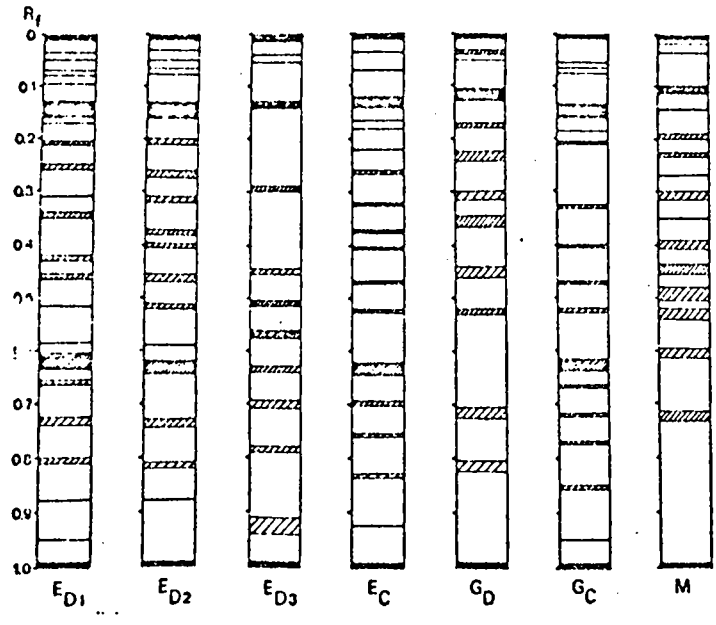



Figure 4. - Electrophorégrammes des protéines solubles dans les différentes formes d'*Ulex* analysées.

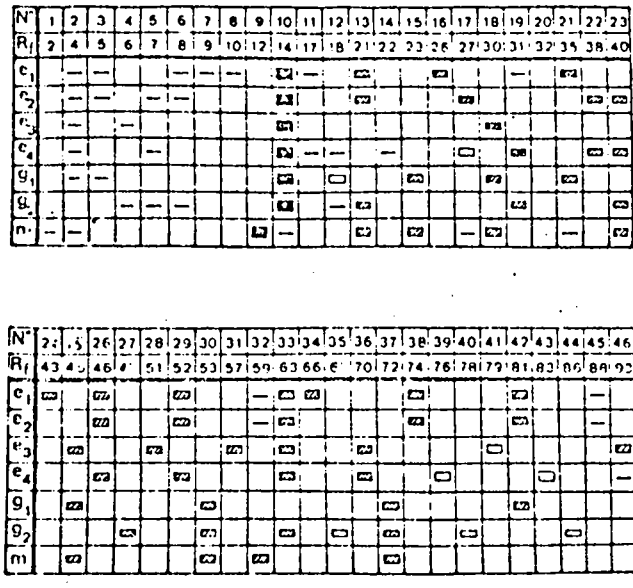



Figure 5

Distribution semi-schématique des résultats obtenus par électrophorèse (disques), l'évaluation des $R_f$ et de la concentration protéique dans chacune des différentes formes testées.

$c_1$ — U. europ. dressé (Hem)
$c_2$ — U. europ. dressé (Ambleteuse)
$c_3$ — U. europ. dressé (Pleubian)
$c_4$ — U. europ. couché (Cap d'Erquy)
$g_1$ — U. gallii dressé (Menez-Hom)
$g_2$ — U. gallii couché (Cap d'Erquy)
m — U. minor dressé (Since)
N° — Numéro de chaque bande
$R_f$ — $R_f$ x 100

| Valeurs des Rf | Formes | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,14 | $E_{D1}$ | $E_{D2}$ | $E_{D3}$ | $E_C$ | $G_C$ |
| 0,13 | $G_D$ | | | | |
| 0,12 | M | | | | |

- la deuxième fraction protéique est une fraction majeure de Rf 0,63 identifiée chez tous les Ulex europaeus L. quelque soit le port, et dans les formes basses d'Ulex gallii Pl.

Ainsi nous pouvons noter l'identité de comportement des formes normales et basses d'Ulex europaeus L. et des formes basses d'Ulex gallii. Par contre, les formes normales d'Ulex gallii Pl. et d'Ulex minor Roth. vont s'éloigner par les variations de mobilité électrophorétique (fraction I protéique) ou par la disparition de la fraction protéique de Rf = 0,63.

b) Fractions à valeurs variables reflétant une grande diversité protéique dans les différentes formes : La comparaison des électrophorégrammes des différents extraits met en évidence une multitude de bandes protéiques de Rf variables qui traduisent une grande diversité protéique.

Cependant, il est possible d'identifier dans les extraits des formes du Pas-de-Calais des bandes protéiques communes (Rf : 0,46, 0,52, 0,63, 0,74, 0,81) mais elles diffèrent entre elles cependant dans une zone de Rf compris entre 0,35 et 0,45 où en particulier deux fractions protéiques de Rf 0,38 et 0,40 sont absentes chez les Ajoncs de la vallée de la Hem mais appartiennent par contre aux formes plus littorales (Ambleteuse, les formes basses d'Ulex europaeus L. du Cap d'Erguy).

Ces observations montrent qu'il est difficile de saisir des différences entre les formes : individuellement, chaque forme possède un profil protéique spécifique sans que cela n'entraîne pour chaque espèce d'Ulex un profil protéique déterminé comme cela a été constaté par d'autres chercheurs (33,83) pour d'autres espèces.

Aussi pour mieux saisir les différences apparues dans la composition des fractions nous avons recherché un autre mode de représentation de ces bandes par rapport aux Rf calculé.

3 - De la recherche d'un autre mode de représentation :

Afin de mieux saisir les différences qui séparent les formes au niveau des protéines solubles, nous avons considéré comme homologues les bandes qui se chevauchent entièrement ou à 50 % au moins.

Dans la figure 5, chaque bande est schématisée selon son Rf dans les différentes formes où elle est présente. D'autre part, nous avons essayé également d'apporter un caractère quantitatif en représentant la variabilité des fractions selon leur importance.

Par ce mode de représentation, nous retrouvons nons seulement les ressemblances constatées ci-dessus au niveau des bandes de Rf de 0,14 et 0,63 (bandes 10 et 33) mais surtout les différences. En effet, l'examen de ce tableau permet, en fonction de la mobilité électrophorétique des protéines, d'établir des ressemblances faibles entre les formes dressées de Pleubian (Ulex europaeus L. et les autres formes car les fractions protéiques 28, 31 et 43 (Rf respectifs : 0,51 ; 0,57 et 0,83) appartiennent à cette forme littorale seule.

Par contre, de fortes ressemblances existent entre les formes normales d'Ulex gallii, Ulex minor Roth. et Ulex europaeus L. de Pleubian (bandes 18 et 25, de Rf respectifs 0,30 et 0,45) ou entre les formes normales et basses d'Ulex gallii Pl. et d'Ulex minor Roth. (bandes 30 et 37, de Rf respectifs 0,53 et 0,72).

4 - Du coefficient de similitude :

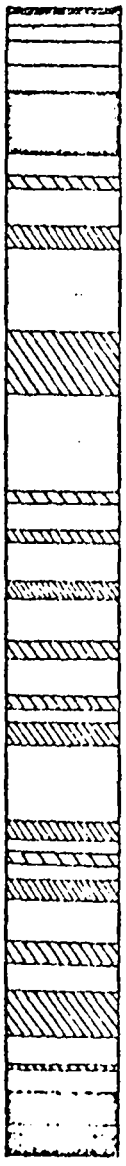
Le coefficient de similitude est basé sur la comparaison des bandes communes chez deux formes par rapport au nombre total de bandes relevées dans les différents électrophorégrammes (app. Tech. p. ). Ainsi compris, sans en retenir l'aspect quantitatif, ce coefficient n'apporte qu'un caractère strictement qualitatif. Il indique que :

- les formes dressées littorales d'Ulex europaeus L. de la Bretagne (Pleubian) s'éloignent de toutes les autres formes à Ulex europaeus L. (28à38% de similitude

- les formes basses d'Ulex gallii sont plus proches des formes basses d'Ulex europaeus L. (59 %) que des formes dressées d'Ulex gallii Pl. (22 %).

Les Ajoncs du Pas-de-Calais sont en moyenne aussi proches d'Ulex gallii dressé que d'Ulex gallii couché (59 % appr. de similitude).

Enfin pour Ulex minor la forme la plus proche est Ulex gallii dressé (54 %), la plus éloignée est Ulex gallii couché (25 %).



| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $E_{D1}$ | 100% | | | | | | |
| $E_{D2}$ | 79% | 100% | | | | | |
| $E_{D3}$ | 38% | 29% | 100% | | | | |
| $E_C$ | 58% | 65% | 36% | 100% | | | |
| $G_D$ | 50% | 50% | 36% | 43% | 100% | | |
| $G_C$ | 47% | 53% | 30% | 59% | 22% | 100% | |
| M | 39% | 44% | 31% | 31% | 54% | 26% | 100% |
| | $E_{D1}$ | $E_{D2}$ | $E_{D3}$ | $E_C$ | $G_D$ | $G_C$ | M |

Figure 6.

Electrophorèse des protéines solubles : application du calcul de similitude à l'établissement des affinités entre les différentes formes considérées.

Figure 7. - Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 % des protéines solubles des graines d'*Ulex europaeus* dressé, $E_{D2}$ Ambleteuse (coloration à l'amido-schwarz).

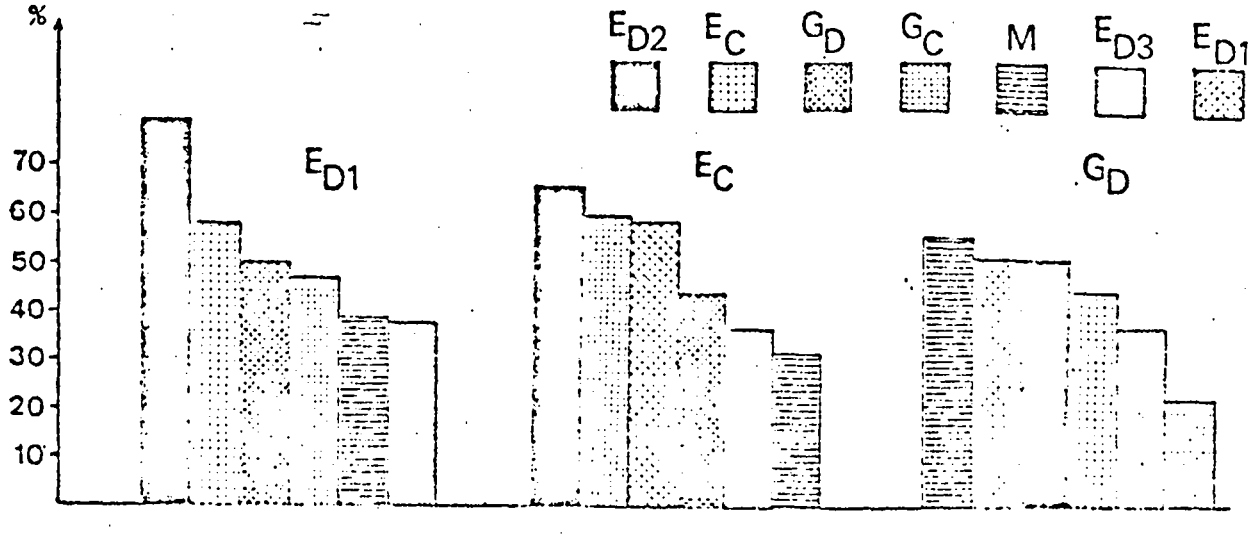



Tableau IV. - Diagramme des affinités relatives des formes $E_{D1}$, $E_C$ et $G_D$ aux autres formes analysées.

Un diagramme peut être établi en se basant sur les différentes valeurs de ce coefficient, dans la comparaison d'une forme aux six autres, par exemple Ulex europaeus L. de la vallée de la Hem, Ulex europaeus L. du Cap d'Erguy (forme basse) puis Ulex gallii Pl. (forme normale) (Tab. IV).

Dans le premier cas, Ulex europaeus de la vallée de la Hem est dans l'ordre plus proche des formes normales d'Ambleteuse, puis des formes basses du Cap d'Erguy. Par contre, les formes dressées d'Ulex europaeus L. de Pleubian et d'Ulex minor Roth. s'en éloignent. Par cette méthode la position d'U. gallii Pl. est confirmée, quelque soit sa forme, cet ajonc montre toujours une similitude moyenne aux types érigés d'Ulex europaeus L.

La comparaison d'Ulex europaeus du Cap d'Erquy avec d'autres formes montre que ce type prostré est assez proche de ceux du Pas-de-Calais et d'Ulex gallii prostré ($G_C$), mais qu'il s'éloigne nettement des types érigés d'Ulex europaeus de la Bretagne ($E_{D3}$) ainsi que d'Ulex gallii dressé ($G_D$) et d'Ulex minor (M).

Enfin, le tableau montre également une forte ressemblance entre $G_D$ et M. La forme la plus éloignée de $G_D$ est $G_C$.

B2 - Concentration protéique des tissus chlorophylliens :

La concentration protéique des tissus chlorophylliens est déterminée selon la méthode de Lowry (app. technique p. T ) et exprimée par gramme de tissus (fig. 8).

On constate que les formes dressées d'Ulex europaeus L. et d'Ulex minor Roth. présentent des concentrations protéiques nettement supérieures à celles des formes basses (Ulex europaeus L.) et des formes normales ou basses d'Ulex gallii Pl.

C. - DISCUSSION.

L'analyse électrophorétique des protéines des tissus chlorophylliens conduit à des résultats complexes et divers rendant toute tentative d'interprétation délicate et difficile. Ceci est d'autant plus net qu'à l'intérieur d'une même espèce les diverses formes s'écartent davantage que les mêmes formes entre espèces différentes.

Des espèces différentes peuvent présenter plus de similitude entre elles qu'avec des formes appartenant à la même espèce.

Cette grande convergence du port que présentent les formes basses d'Ulex europaeus L. et d'Ulex gallii Pl. laissait supposer l'existence d'affinités profondes ou bien que leurs profils protéiques soient très proches, on ne peut négliger l'hypothèse de l'influence de la proximité d'habitats écologiques sur la composition protéique. Ainsi, chaque forme analysée sous la double influence du génome et des changements de l'environnement pourrait établir un complément protéique spécifique.

Aussi, afin de mieux cerner les limites de l'influence de l'environnement sur le polymorphisme de la composition protéique, avons-nous analysé et comparé les protéines des semences d'Ajoncs. Les graines présentent d'après de nombreux auteurs ( 13, 45, 83, 107, 160 ), une composition protéique plus stable que celle des tissus chlorophylliens parce que moins influençable par les modifications du milieu extérieur.

Un exemple des résultats de l'analyse électrophorétique des graines est consigné dans la figure 8. Leur complexité est plus élevée, de nombreuses bandes protéiques sont séparées. Cependant, l'application du calcul de similitude fait apparaître une identité des écarts quelque soit le matériel analysé (tissus chlorophylliens, graines) ce qui confirme nos déductions concernant les relations possibles entre les différentes formes analysées.

Cependant, la grande complexité des résultats de l'analyse électrophorétique des tissus chlorophylliens et des graines conduit à douter de l'utilité ou de la validité de cette prospection. Il est vrai qu'en ne la considérant uniquement dans l'optique d'une simple technique d'approche elle s'est révélée précieuse par les différences profondes que souligne la comparaison des compositions protéiques des différents Ajoncs analysés. Ceci ne peut être compris que par la recherche de plusieurs procédés de comparaison : découpage des gels au hasard ( 33 ), recherche d'homologies protéiques permettant la classification des protéines selon leur degré de présence.

- découpage des gels ou différentes zones établies au hasard et comparaison des zones : ce procédé utilisé afin de mieux sérier les traits saillants des ressemblances, ne satisfait guère. En effet, le découpage étant effectué au hasard, on ne possède aucune certitude que les protéines d'un même territoire possèdent suffisamment de caractères communs justifiant leur position dans cette zone et par conséquent notre comparaison.

- essai de classification des bandes selon leur degré de présence (ou d'absence). Un tel classement est également critiquable parce qu'il repose sur la notion d'homologie protéique, qui ne peut être établie par la seule mobilité électrophorétique car elle suppose une connaissance précise non seulement de la charge et de la taille de ces molécules, mais aussi de leurs fonctions. Or cette hypothèse d'homologie des bandes protéiques n'est pas prouvée même dans le cas où les formes comparées sont taxinomiquement proches.

La plus grande prudence s'impose donc, dans l'interprétation des différences protéiques observées. Cependant, si cette technique n'apporte pas un critère satisfaisant permettant de mieux apprécier l'exactitude des "coupures" établies sur des critères morphologiques entre les différentes formes, elle présente par contre un double avantage : celui de nous permettre

tout d'abord une meilleure approche des affinités en définissant un profil protéique particulier à chacune des formes analysées, à défaut d'un profil protéique de l'espèce.

En second lieu, cette technique nous sera très précieuse non seulement parce qu'elle justifie la nécessité des analyses biochimies dans la taxinomie ou l'écologie mais surtout par les nouvelles voies qu'elle ouvre. En particulier, il est devenu évident que les relations "protéines-expression génique" ne seront comprises que par l'identification et la définition d'activités enzymatiques.

C'est donc vers la recherche de la présence et du rôle des formes multiples d'enzymes que nous allons orienter notre travail. Le fait ici que la fonction précise des enzymes est connue facilitera largement notre compréhension de la valeur du polymorphisme enzymatique dans le métabolisme des différentes formes analysées.

Certes, une grande difficulté réside dans le choix des enzymes à analyser (72) sachant que la régulation métabolique et le métabolisme seront fortement influencés et perturbés par tous changements intervenant au niveau des enzymes qui les contrôlent qu'ils ne le seraient par des enzymes non régulateurs.

D. - RESUME.

De très nombreuses bandes protéiques sont séparées et identifiées par électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide. Chaque forme analysée est caractérisée par un profil protéique spécifique qui permet d'établir des ressemblances plus ou moins fortes. Cependant, la complexité des résultats obtenus et les limites de cette technique interdisent toute conclusion nette.

# C H A P I T R E  I V

## A N A L Y S E  D E S  L E U C I N E - A M I N O P E P T I D A S E S

# A. INTRODUCTION

L'analyse enzymatique projetée débutera par l'étude des leucine-aminopeptidases ; ces enzymes génétiquement bien définies sont intéressantes par leur participation dans la génétique et le métabolisme des êtres vivants.

C'est pourquoi, la littérature foisonne d'exemples où leur étude a permis d'aborder avec succès la recherche de l'origine des espèces (93,137,142,165) qui est à la base de l'établissement rationnel des relations taxinomiques, ou encore la démonstration par l'analyse biochimique du caractère mendélien de l'hérédité (138,165). Ainsi, SCANDALIOS a isolé et défini 4 isoleucine-aminopeptidases dans l'endosperme liquide du maïs. Selon les lignées, des variants électrophorétiques sont caractérisés pour deux de ces isozymes A et B. L'analyse de la transmission héréditaire de l'un d'eux (visualisé par la bande A, par exemple) montre que A peut présenter selon les lignées testées deux variants : l'un à migration rapide (R), l'autre à migration lente (L). Une forme hétérozygote pour ces deux variants (R) et (L) est obtenue par croisement de ces deux lignées pures. Le croisement en retour avec l'un des parents permet en $F_1$ une distribution des variants (L) et (RL) selon un partage 1 : 1 ; en $F_2$ la distribution 1 : 2 : 1 est pratiquement obtenue. Ainsi ces deux variants (L) et (R) représentent des isozymes alléliques sans dominance.

Une autre déduction sur la structure de l'enzyme est possible à partir de cette expérience : comme l'hétérozygote (comportant les bandes R et L) ne montre pas de bandes intermédiaires, il est probable que l'enzyme est une monomère, car on n'observe pas l'apparition d'hétéropolymère.

D'autre part, les études de biochimie génétique effectuées chez Phaseolus (170) mettent en évidence deux isozymes contrôlées par des allèles sans dominance. Deux isozymes sont également identifiées chez Pisum (138) et chez Picea abies (93) : une isoleucine-aminopeptidase est contrôlée par un locus monomorphe, l'autre par un locus polymorphe sans dominance allélique.

Les isoleucine-aminopeptidases sont également intéressantes par les fonctions métaboliques qu'elles assurent.

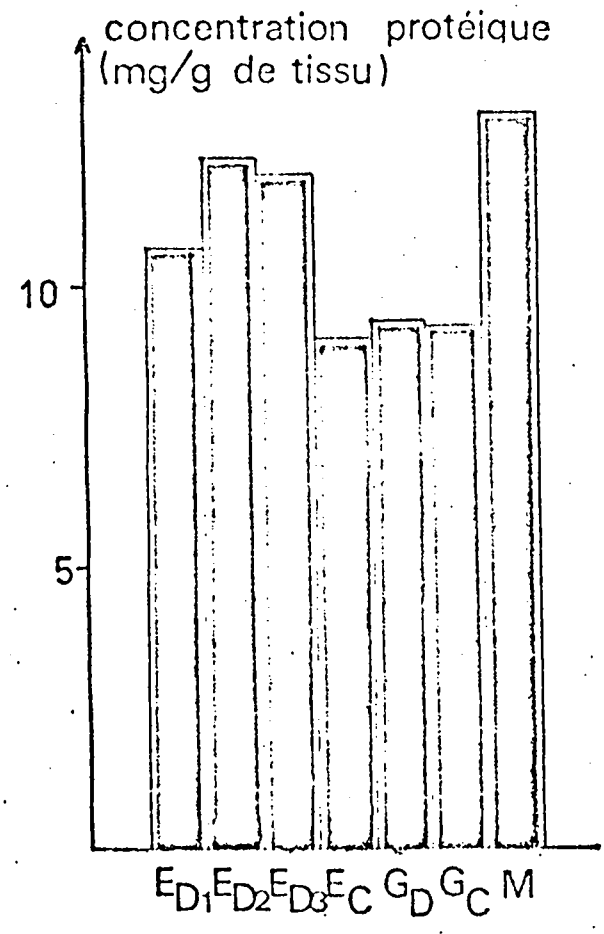



Figure 8. - Concentration moyenne des protéines foliaires par g de tissu des formes d'*Ulex* analysées.

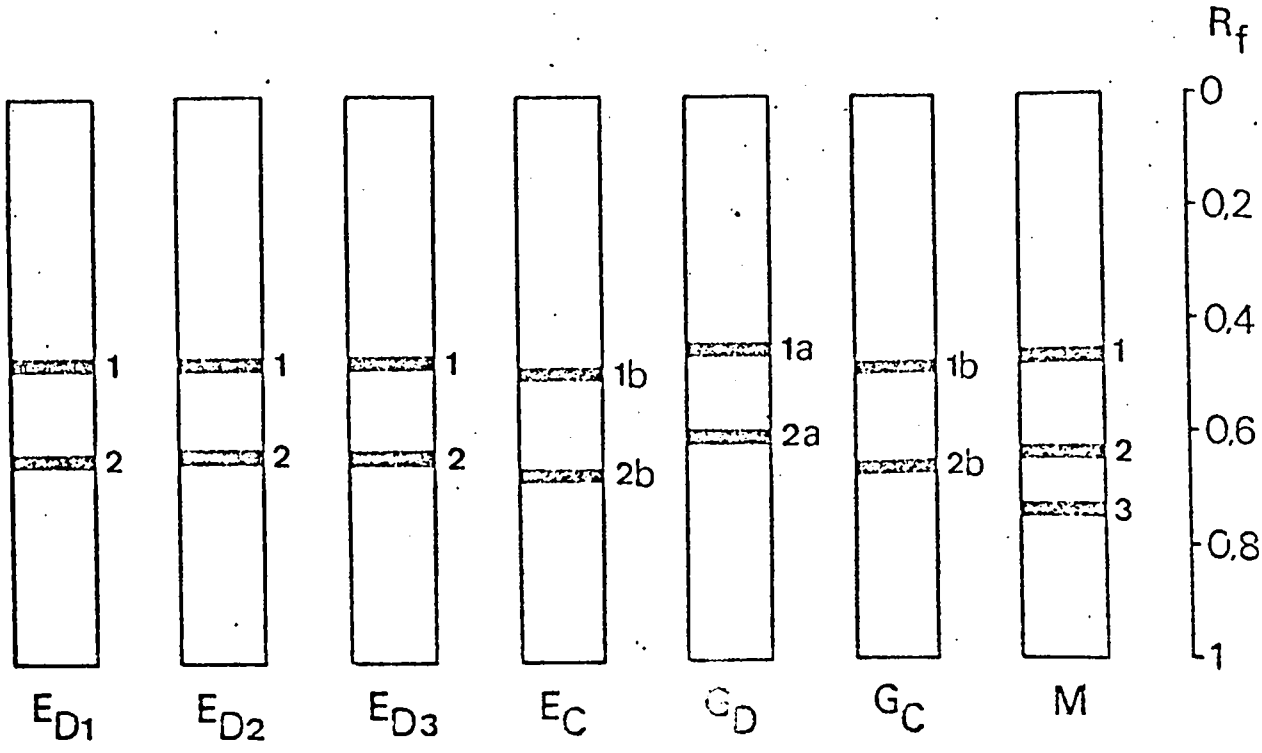
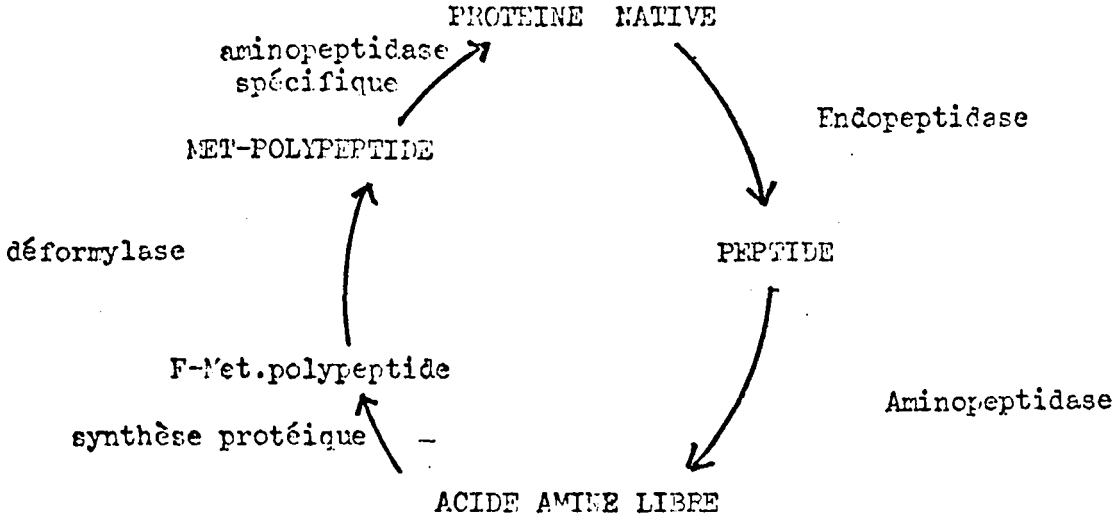



Figure 9. - Electrophorégrammes des isoleucine-aminopeptidases de l'extrait brut (gel de polyacrylamide à 7 %).

Les aminopeptidases sont en effet des exopeptidases qui interviennent dans la dégration protéique au niveau de l'acide aminé N-terminal. Cette fonction est non seulement intéressante pendant la germination (elle assure la mobilisation des protéines de réserve), mais également au cours du métabolisme normal où dans la dégradation et la synthèse permanente des protéines (turnover) les aminopeptidases alimentent le pool des acides aminés libres.

Récemment, l'intervention des aminopeptidases dans la synthèse protéique a été montrée : BARTH ( 5 ) a constaté que les aminopeptidases des ribosomes d'Escherichia coli sont caractérisées par une spécificité marquée pour des peptides comportant la méthionine comme acide aminé N-terminal. La localisation intracellulaire de cette enzyme laisse supposer une intervention possible dans la synthèse protéique. Il semble en effet, qu'en association avec une déformylase spécifique, l'aminopeptidase dissocie le complexe "formyl-méthionine" marqueur interne du début des chaînes polypeptiques. Ainsi l'aminopeptidase joue un rôle important en contrôlant et en régulant la transformation d'une chaîne polypeptidique en protéine fonctionnelle à un moment donné de cette "fonctionalisation".

Selon BARTH ( 5 ) l'intervention des aminopeptidases à deux niveaux différents dans le "turn over" protéique peut être schématisé comme suit :




Enzymes à large spécificité de substrats, les aminopeptidases ont une action spécifique variable selon la nature et la position d'un grand nombre d'acides aminés ( 151 ). ELLEMAN ( 36 ) a ainsi isolé une aminopeptidase

du petit pois active sur des chaînes polypeptidiques comportant comme acide aminé N-terminal : la phényl-alanine, la leucine, la méthionine, l'isoleucine et l'alanine.

Leur spécificité analysée avec des dipeptides dépend également de la nature de l'acide aminé en position C-terminale, c'est ce que montre la variabilité des rendements d'hydrolyse de divers dipeptides utilisés comme substrat : - 100 % (Phe-Ala) ; 75 % (Phe-Glu) ; nul (Phe-Pro).

Dans ce travail nous avons utilisé un substrat artificiel chromogène (leucine-p-nitranilide ou leucine - $\beta$ -naphtylamide-HCl) qui comporte la leucine comme acide aminé N-terminal. Nous appellerons donc leucine-aminopeptidase ou LAP l'enzyme dont nous analysons l'activité. Il est bien évident que cette appellation n'est qu'une commodité de travail qui n'exclut pas pour cette enzyme, la possibilité également de posséder une activité spécifique pour d'autres acides aminés.

B. - RESULTATS.

1 - de l'électrophorèse :

Par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide à 7 % de concentration en polyacrylamide, dans un système basique (App. tech. T ) 2 à 3 bandes isozymatiques à activité leucine-aminopeptidasique sont séparées selon les extraits (figure 9) : 2 dans les populations d'Ulex europaeus L. et d'Ulex gallii Pl., 3 chez Ulex minor Roth. Le calcul des Rf est précieux.

1 - il souligne l'identité de comportement enzymatique :

- des formes dressées à Ulex europaeus L. : chez $E_{D1}$ $E_{D2}$, $E_{D3}$, les bandes 1 et 2 ont pour Rf respectifs 0,47 et 0,64 ;

- des formes basses où les valeurs du Rf des bandes 1 et 2 s'élèvent (0,49 et 0,67).

2 - il souligne enfin l'originalité du comportement des formes normales d'Ulex gallii Pl. et d'Ulex minor Roth.

Chez le premier, les valeurs du Rf des deux bandes 1 et 2 des isoleucine aminopeptidases sont plus faibles (0,45 et 0,60 respectivement).

Quant à Ulex minor 3 isoleucine aminopeptidases sont séparées : les deux premières ont des migrations électrophorétiques identiques à celles des formes dressées des Ulex europaeus L., la troisième, de migration électrophorétique plus rapide est également originale par son analyse quantitative : elle représente en effet 45 % de l'activité enzymatique totale dosée par densitométrie des gels.

Ainsi par le calcul des Rf des variants électrophorétiques des isoleucine-aminopeptidases sont caractérisés. Ces variants peuvent, sur la base de la valeur de leur migration électrophorétique, être qualifiés de variants rapides (R) ou lents (L) comme cela l'a déjà été proposé ( 134 ). Le fait que les variations (R) ou (L) de ces variants s'effectuent dans le même sens pour deux isozymes d'une forme laissent supposer que ces isozymes sont contrôlées par des gènes liés.

Ces différences de migration observées doivent être précisées. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisée pour les séparer est une méthode de fractionnement basée sur la charge électrique des molécules. Elle se comporte également comme un "tamis" moléculaire, la séparation protéique est fonction de leur taille. Aussi les différences de migration électrophorétique doivent donc relever de la variabilité des tailles moléculaires et/ou de celle des charges extérieures (point isoélectrique).

Dans le but de mieux définir les isoleucine-aminopeptidases séparées, la détermination de ces deux constantes physicochimiques (pKi et poids moléculaire) est envisagée.

2 - Estimation du poids moléculaire :

Le poids moléculaire des protéines globulaires peut être estimé par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations (5, 7 et 10 %) et en présence de protéines de référence dont les poids moléculaires sont connus (App. Tech. T ).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau V. L'examen de ces résultats montre que les poids moléculaires des isozymes appartenant aux formes dressées du complexe Ulex europaeus L. sont plus ou moins identiques. C'est donc la valeur moyenne du poids moléculaire des isozymes de ces formes représentées par l'appellation de $E_D$.

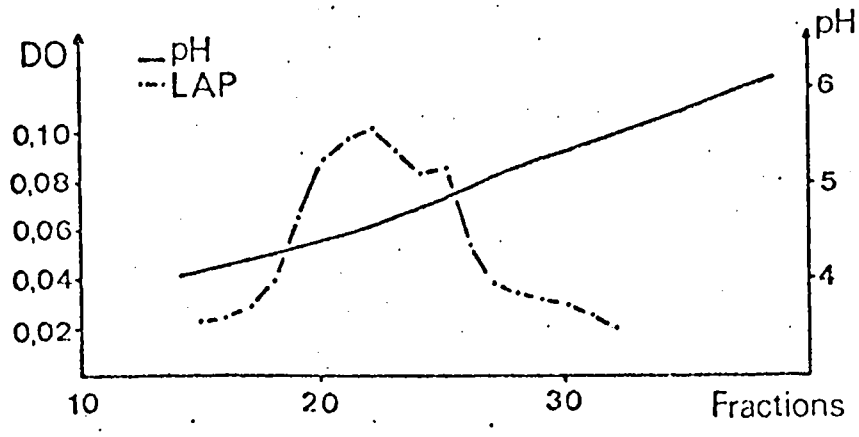



Figure 10. - Schéma d'élution des isoleucine-aminopeptidases d'*Ulex minor* (Ampholine pH 3,5-10 ; 48 h ; +4°C ; 500 V ; fractions de 2,5 ml).

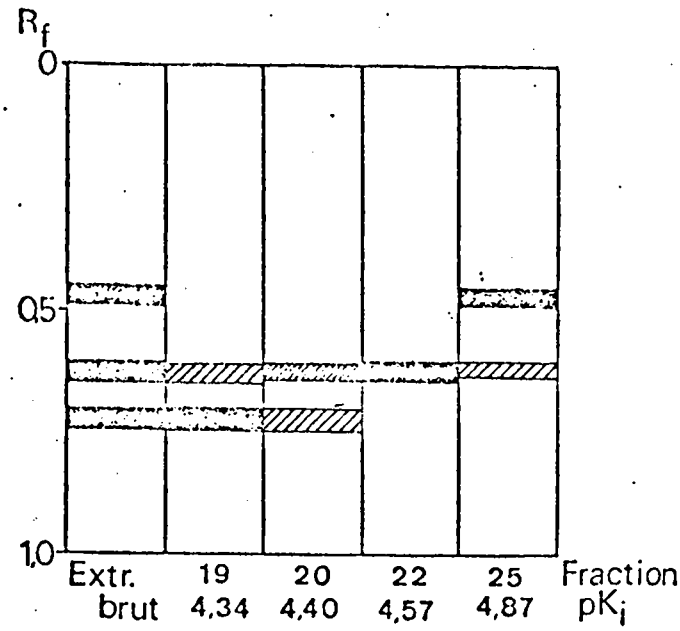



Figure 11. - Electrophorégrammes de contrôle des fractions éluées par focalisation isoélectrique préparative et comparaison avec l'extrait brut (leucine-aminopeptidases d'*Ulex minor* Roth.)

TABLEAU V. : Estimation du poids moléculaire des Iso-LAP

| Bandes isozymatiques | Formes analysées | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $E_D$ | $E_C$ | $G_D$ | $C_C$ | M |
| 1 | 101 000 | 54 000 | 102 000 | 54 000 | 112 000 |
| 2 | 68 000 | 33 000 | 77 000 | 30 000 | 73 000 |
| 3 | - | - | - | - | 81 000 |

Dans ce tableau, les valeurs des poids moléculaires des formes normales ($E_D$, $G_D$ et M) sont assez proches ; celles des formes basses, équivalentes entre elles sont 50 % environ plus faibles que celles des formes dressées. La taille de ces molécules intervient probablement dans la variabilité de leurs migrations.

3 - Détermination du point isoélectrique :

La focalisation isoélectrique est une technique fine de fractionnement protéique qui permet simultanément la séparation des protéines et leur définition par la détermination de leur point isoélectrique (App. techn. p. )

Nous avons appliqué cette méthode pour séparer les isoleucine-aminopeptidases. La détermination des conditions expérimentales optimales est effectuée chez Ulex minor Roth.(62) Nous avons retenu dans une première étape, la séparation des isozymes dans une gamme assez large de pH (pH 3 à 10). Le schéma d'élution d'une colonne d'Ampholine dans les conditions précisées dans l'appendice technique (T ) est représentée dans la figure 10 : l'activité leucine-aminopeptidasique est localisée dans un seul pic très asymétrique. Son hétérogénéité enzymatique est révélée lors d'un électrophorèse de contrôle des fractions à forte activité enzymatique (fig. 11). Il apparaît ainsi que les trois isozymes, précédemment caractérisées dans l'extrait brut; se retrouvent dans ce pic, mais leur séparation étant imparfaite, la détermination des pki demeure imprécise. Ainsi, l'utilisation de cette méthode ne satisfait guère au premier abord, mais si on ne la considère que comme une étape préliminaire elle présente l'avantage de localiser les pki des trois isozymes dans une gamme de pH plus étroite (pH 4 à 5).

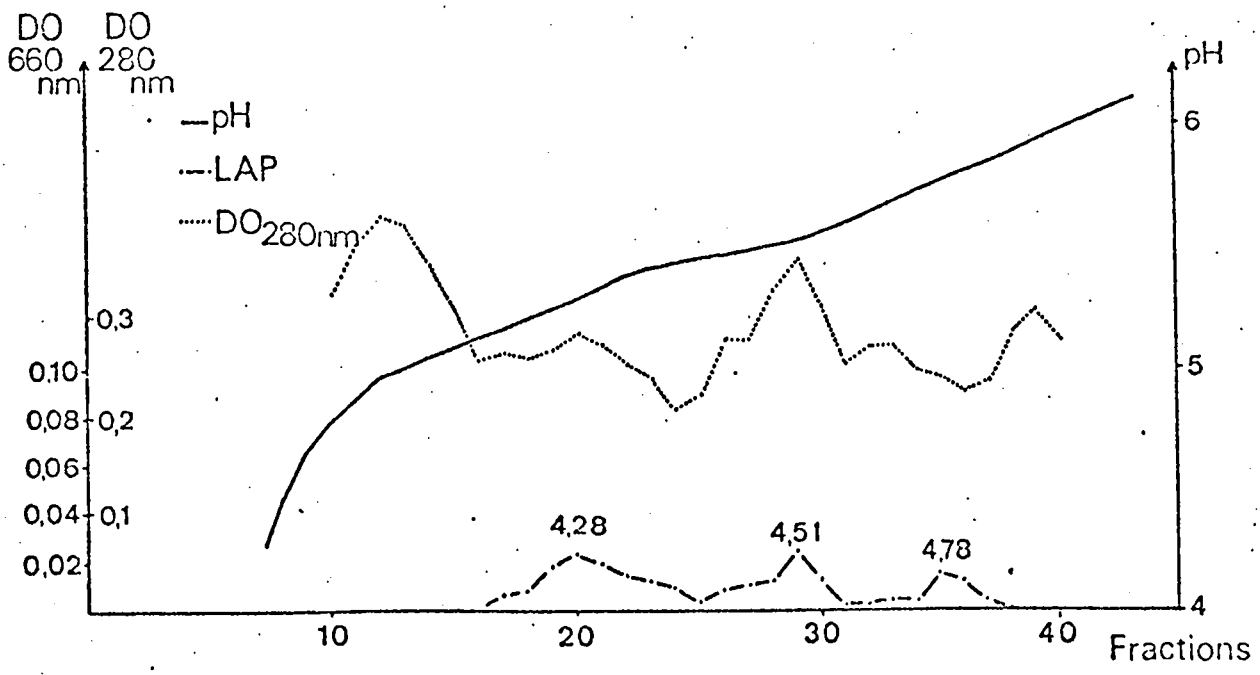



Figure 12. - Schéma d'élution des isoleucine-aminopeptidases dans *Ulex minor* (ampholine pH 4-6 ; 72 h ; +4°C ; 800 V ; fractions de 2,5 ml).

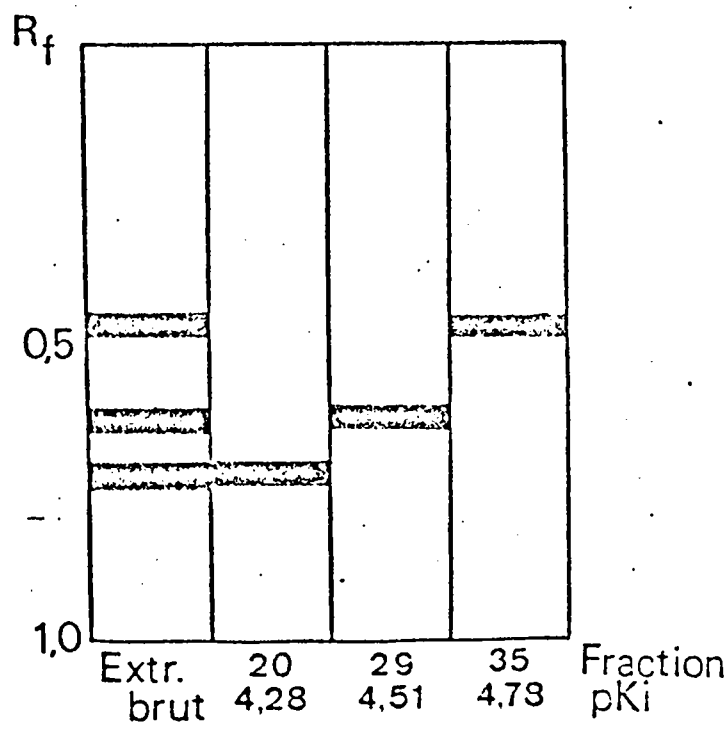



Figure 13. - Electrophorégrammes de contrôle des fractions éluées par focalisation isoélectrique préparative et comparaison avec l'extrait brut (leucine-aminopeptidases dans *Ulex minor*).

Nous avons donc repris la séparation des isozymes par focalisation isoélectrique des extraits d'Ulex minor Roth. en utilisant une gamme de pH plus restreinte (pH 4 à 6). Dans ces conditions, le schéma d'élution représenté dans la figure 12 montre que trois pics sont nettement séparés.

Une électrophorèse de contrôle des fractions à activité enzymatique importante (fig. 13) confirme la parfaite séparation des isozymes et leur définition par leurs pki respectifs qui sont, selon les bandes :

- 1 - de pki 4,78
- 2 - de pki 4,51
- 3 - de pki 4,28.

Cette technique a également été appliquée à la séparation des isoleucine-aminopeptidases d'une autre forme d'Ajonc, $E_{D3}$, où deux bandes enzymatiques sont caractérisées dans les zymogrammes des extraits bruts. La focalisation isoélectrique permet une séparation de ces deux isoleucine-aminopeptidases qui sont strictement localisées dans deux pics (fig. 14). Ici aussi des électrophorèses de contrôle en gel de polyacrylamide permet l'assimilation de ces deux pics à l'activité isoleucine-aminopeptidasique précédemment reconnue dans les extraits bruts (fig. 15). Ainsi deux isozymes sont présents dans cet extraits ; elles sont définies par le pki (bande 1 pki = 4,81 ; bande 2, pki : 4,43).

Cette élégante méthode est également remarquable par sa finesse ; elle permet en effet de caractériser de très faibles activités enzymatiques. Cette qualité est intéressante car l'activité enzymatique testée dans les tissus analysés est relativement faible (app. 0,006 µmole/mg protéines). Toute purification même partielle entraîne une augmentation de cette valeur (0,02 µmole/mg protéines dans les extraits brûts) ce qui correspondra lors de la focalisation isoélectrique à une activité totale enzymatique de 0,2 umole/mg protéines par colonne (le dépôt = 10 mg protéines). Cette activité bien que faible pour être nettement décelée par d'autres techniques peut être analysée par focalisation isoélectrique.

Appliquée successivement à l'ensemble des extraits bruts des différents Ajoncs, cette méthode va nous permettre la séparation, l'identification, la définition et la comparaison de leurs isoleucine-aminopeptidases.

Les moyennes de pki obtenues à l'issue de plusieurs (3 au minimum) focalisations sont reportées dans le tableau VI.

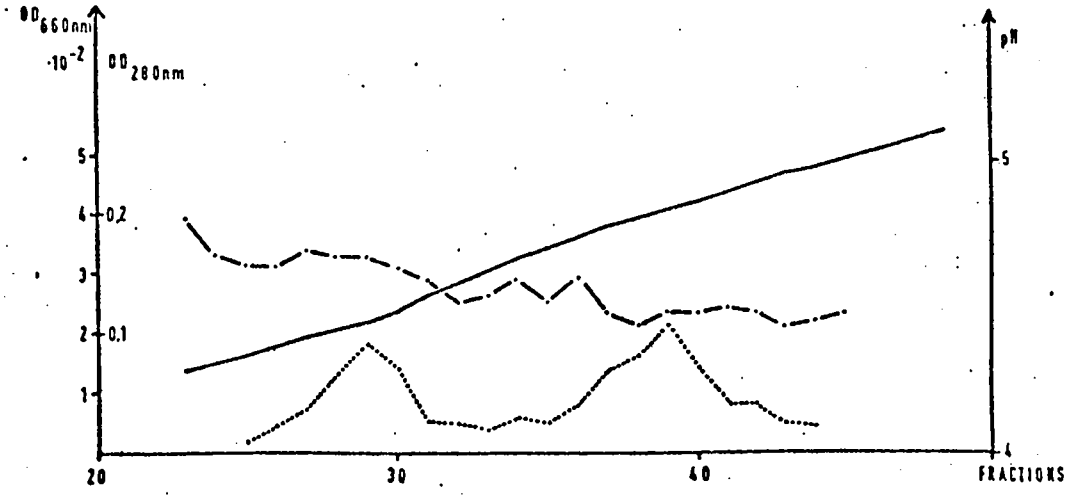



Figure 14. - Schéma d'élution des isoleucine-aminopeptidases dans *Ulex europaeus*, $E_{D2}$ (ampholine pH 4-6 ; 72 h ; +4°C ; 800 V ; fractions de 2,5 ml).

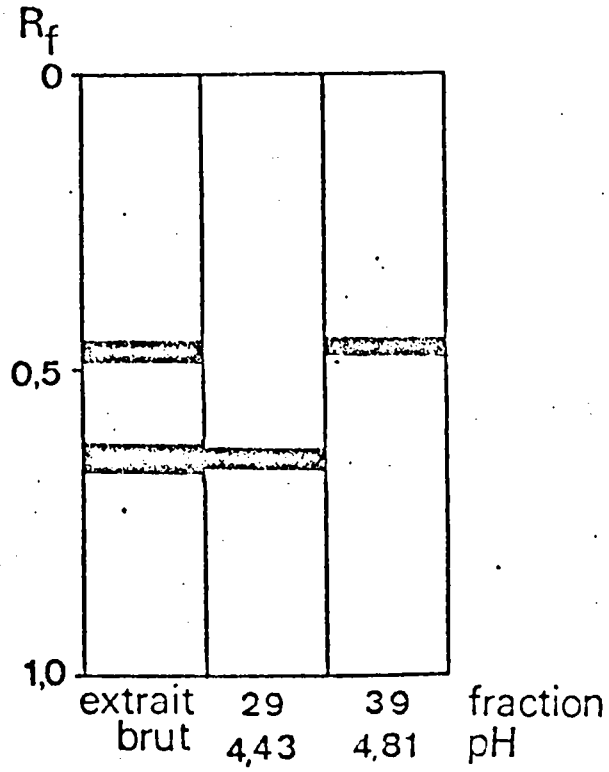



Figure 15. - Electrophorégrammes de contrôle des fractions obtenues par FIP (leucine-aminopeptidases dans *Ulex europaeus* dressé $E_{D3}$).

TABLEAU VI. : Valeurs moyennes des pki des isoleucine-aminopeptidases.

| Isozymes | Formes analysées | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $E_{D1}$ | $E_{D2}$ | $E_{D3}$ | $E_C$ | $G_D$ | $G_C$ | M |
| 1 | 4,76 | 4,83 | 4,81 | 4,87 | 4,96 | 4,82 | 4,78 |
| 2 | 4,44 | 4,49 | 4,43 | 4,46 | 4,66 | 4,47 | 4,50 |
| 3 | - | - | - | - | - | - | 4,29 |

Cette détermination des pki est importante, car les différences de migration électrophorétique des bandes 1a et 2a par exemple[6], que n'expliquaient pas les valeurs de leurs poids moléculaires respectifs, sont comprises par la basicité élevée de leurs pki.

L'ensemble des résultats obtenus par les différentes techniques électrophorétiques est consigné dans le tableau VII.

| | Bande 1 | | | Bande 2 | | | Bande 3 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PM | $pK_i$ | $R_f$ | PM | $pK_i$ | $R_f$ | PM | $pK_i$ | $R_f$ |
| $E_{D1}$ | 106 000 | 4,76 | 0,47 | 71 000 | 4,44 | 0,64 | | | |
| $E_{D2}$ | 96 000 | 4,83 | 0,47 | 66 000 | 4,49 | 0,63 | | | |
| $E_{D3}$ | 101 000 | 4,81 | 0,47 | 67 000 | 4,43 | 0,64 | | | |
| $E_C$ | 54 000 | 4,87 | 0,49 | 33 000 | 4,46 | 0,67 | | | |
| $G_D$ | 102 000 | 4,97 | 0,45 | 77 000 | 4,66 | 0,60 | | | |
| $G_C$ | 54 000 | 4,82 | 0,48 | 30 000 | 4,47 | 0,66 | | | |
| M | 112 000 | 4,78 | 0,47 | 77 000 | 4,50 | 0,64 | 81 000 | 4,29 | 0,74 |

TABLEAU VII: Résultats groupés de toutes les formes analysées

C. DISCUSSION.

Le "couplage" de plusieurs techniques électrophorétiques conduit à une bonne séparation et à une excellente définition des isozymes par l'estimation de leurs poids moléculaire et de leur pki.

Ces résultats permettent de mieux comprendre les différences de migration observées en approfondissant les causes. C'est ainsi, qu'il pouvait paraître surprenant que des formes basses manifestent un comportement identique bien qu'elles appartiennent à des espèces différentes. Précédemment, l'analyse protéique avait montré que des ressemblances assez importantes se dégageaient entre ces formes basses. Ici, l'identité de comportement de leurs isoenzymes permet de les séparer totalement des formes normales.

D'autre part, la comparaison des poids moléculaires des isozymes des formes normales laisse supposer qu'une relation de type "dimère-monomère" existe entre elles. Or, il a été impossible par des tentatives d'hybridation des isozymes sur gel de caractériser chez les formes normales des monomères. D'autre part, aucun fait réel ne nous autorise à penser qu'une telle association des monomères en dimères n'apparaîtrait exclusivement chez les formes normales.

Les résultats de l'analyse des isoleucine-aminopeptidases est également importante par les arguments qu'elle apporte dans l'appréciation des relations qui doivent exister entre formes normales et basses d'Ulex gallii Pl. d'une part et, d'autre part, entre les formes des deux complexes : Ulex europaeus L. et Ulex gallii Pl.

Les isoenzymes des formes normales et basses d'Ulex gallii Pl. diffèrent par les valeurs de leurs pki et par celles de leurs poids moléculaires. C'est là un argument biochimique important dans notre étude qui se proposait de mieux saisir les liens possibles entre ces deux espèces. Ces mêmes caractères physico-chimiques qui définissent les isoleucine-aminopeptidases s'opposent à toute hypothèse faisant d'Ulex europaeus L., le type de base complémentaire entre les isozymes de ces formes.

C'est ainsi que les isozymes des deux formes basses s'en éloignent nettement par la faiblesse de leurs poids moléculaire. Celles des formes normales d'Ulex gallii, de poids moléculaire identique s'en distinguent à leur tout par les valeurs de leurs pki.

Enfin, Ulex minor Roth. apparaît ici, comme une espèce totalement marginale par la présence d'une troisième isozyme.

D. - RESUME DES LAP.

Les isoleucine-aminopeptidases des Ajoncs ont été isolées et analysées par différentes techniques électrophorétiques (électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations en polyacrylamide, focalisation isoélectrique préparative, zymogrammes).

Des variants électrophorétiques sont caractérisés. L'analyse de leur comportement suggèrent que ces isozymes sont contrôlées par des gènes liés.

Pour mieux comprendre le comportement de ces variants des leucine-aminopeptidases leurs constantes physico-chimiques, poids moléculaire et point isoélectrique, sont établies. La détermination de ces constantes s'est révélée intéressante non seulement parce que l'analyse de leurs variations expliquent les différences électrophorétiques observées mais également parce qu'elle permet la séparation des Ajoncs en quatre groupes :

- l'un, réunissant les formes normales d'Ulex europaeus L.
- le second, comprenant les formes basses (Ulex europaeus L. et Ulex gallii Pl.)
- le troisième, correspond aux formes normales d'Ulex gallii Pl.
- et le quatrième sera uniquement représenté par les formes normales d'Ulex minor Roth.

Ainsi, au niveau moléculaire, les formes basses se distinguent nettement des formes dressées. L'originalité d'Ulex minor Rothm. forme dressée est confirmée, la composition et le comportement des leucine-aminopeptidases justifient sa position dans un groupe marginal.

# C H A P I T R E  V

# A N A L Y S E  D E S  E S T E R A S E S

A. - INTRODUCTION.

Les estérases (ici restreintes aux carboxylestérases, E.C. 3.1.1.) sont un groupe complexe et hétérogène qui hydrolysent in vitro de nombreux esters (81).

Leurs fonctions métaboliques ne sont pas déterminées avec certitude cependant quelques travaux soulignent l'intérêt de leur étude puisqu'il semble qu'elles interviennent dans la physiologie de la croissance, dans les relations du potentiel cytogénétique et écolophysiologique des plantes avec des fluctuations des facteurs du milieu.

C'est ainsi que leur participation à la formation des parois et à la conduction des substances sont suggérées par la localisation d'une activité estérasique sur ces sites notamment au niveau des plasmodesmes (121). Des liens étroits ont également été reconnus par WILKINSON (175) entre la variation numérique ou de l'activité des isoestérases et les variations de l'activité mitotique observée selon les différents stades de développement des plantules d'oignon.

Ces propriétés rendent leur étude particulièrement intéressante dans l'analyse du déterminisme du "nanisme" qui pourrait éventuellement dépendre d'une lignification précoce des parois cellulaires, ce qui, évidemment limiterait la croissance.

Mais leur étude sera d'autant plus intéressante qu'un effet direct de la sélection sur leur polymorphisme a été mis en évidence.

Le premier pas qui démontre l'intervention de la sélection en un locus donné a été apporté par l'observation d'un changement de la fréquence allélique au niveau d'une isozyme chez des organismes soumis à un gradient géographique.

Plusieurs exemples pourraient être cités dans le domaine animal, montrant chez les estérases, l'augmentation de l'allèle majeur C dans les populations de Drosophila ananassae du Pacifique en direction sud vers l'équateur (71).

Rappelons également l'exemple cité dans notre introduction, celui de Catastomus clarkii (80) où les fréquences des allèles subissaient une variation, correspondant à la diminution de l'allèle Es-I$^a$ vers le nord, cependant que dans cette même situation, l'allèle Es-I$^b$ était favorisée.

Chez les végétaux, nous rapportons quelques travaux : NAKAGAHRA et al. ( 112 ) relèvent un changement de la composition isoestérasique dans des populations de Riz soumises à un gradient géographique dans l'Asie du sud-est.

Cette variation isozymatique en fonction d'un gradient géographique peut correspondre à une sorte d'avantage présentée par une isozyme donnée dans des conditions climatiques définies. Mais cela ne peut être considéré comme étant la preuve d'une sélection. Il est en effet possible que deux populations isolées primitivement et dont les compositions isoestérasiques sont différentes présentent un début de chevauchement de leurs aires ce qui créera l'image d'un gradient géographique influençant les fréquences alléliques.

Une démonstration plus marquante, de l'effet direct de la sélection sur les isoestérases de l'Orge est apportée (ALLARD et coll.) ( (2 ) : ils mesurent les fréquences de gènes et de génotypes sur 4 loci estérasiques pendant 25 générations dans une population expérimentale. Ils visaient ainsi à obtenir des preuves expérimentales concernant l'équilibre des forces responsables :

- des fortes différences observées dans les fréquences alléliques entre des plants d'orge originaires de différentes régions écogéographiques du monde ;
- de l'importante variation allélique décelée dans des populations locales d'Orge.

Les analyses des changements très significatifs des fréquences alléliques observées dans ces populations montrent leur dépendance d'une "action sélective dirigée" qui favorise certains allèles plus particulièrement.

Par contre, ils ne dépendant aucunement de divers processus tels mutations, migrations ou dérivé génétique. Ces auteurs conclurent en soulignant le rôle prédominant joué par la sélection naturelle dans la détermination des pfofils isoenzymatiques et la variation allélique observée pour l'Orge.

Il est regrettable que ces isozymes n'aient jamais été isolées et que leurs cinétiques ne soient pas déterminées pour étayer les différences observées entre chaque isozyme et préciser jusqu'à quel point la présence d'une isozyme plutôt qu'une autre représente un avantage à certaines conditions écologiques. La connaissance d'une modification au niveau des cinétiques servirait l'hypothèse de l'action d'un facteur sélectif et de sa nature.

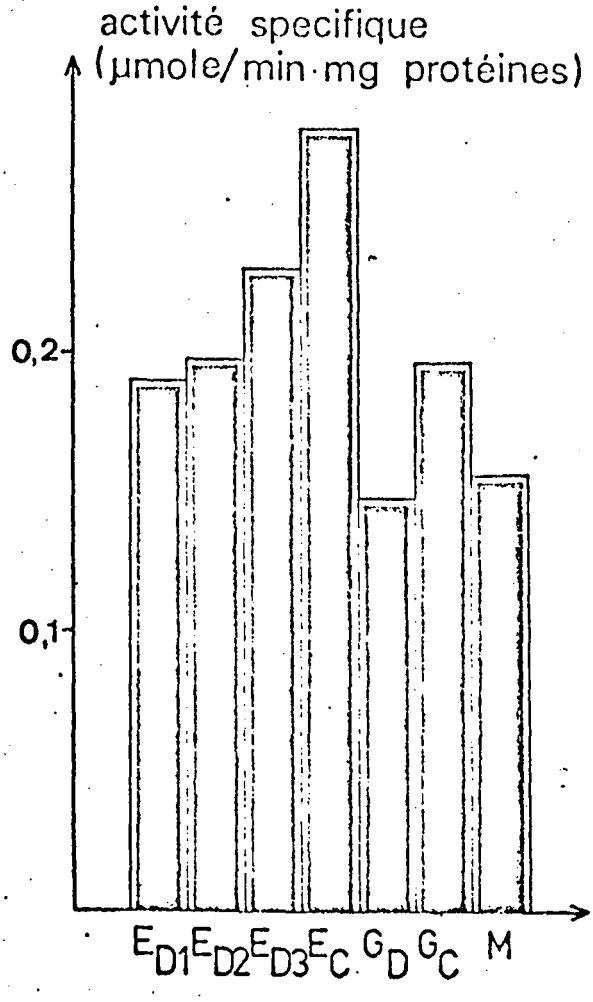



Figure 16. - Activité spécifique moyenne d'estérase dans l'extrait brut d'*Ulex*.

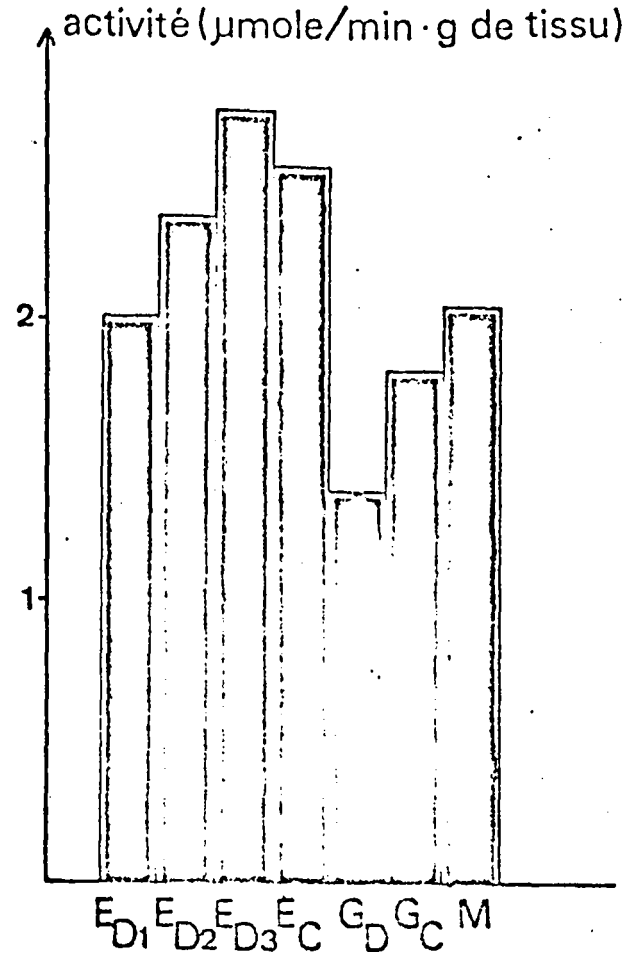



Figure 17. - Activité d'estérase par g de tissu végétal.

Il est également possible que le polymorphisme des estérases en lui-même ne présente aucun avantage sélectif, celui-ci serait sous la dépendance d'une liaison directe des loci estérasiques avec des loci qui contrôlent une expression "différentielle" en réponse à différents facteurs utilisés expérimentalement (température, photopériode, intensité lumineuse, etc...) ( 2 ).

Les isoestérases sont contrôlées génétiquement (135,140) SCHWARTZ a démontré chez le Maïs la présence de 7 allèles en un locus estérasique ( 140 ). Le croisement de plantes différentes pour deux allèles conduit à la formation d'un hétérozygote qui révèle outre les deux bandes parentales, une troisième bande hybride intermédiaire ce qui laisse supposer que les estérases du Maïs possèdent, en ce locus, une structure dimère ( 140 ).

Ainsi, l'étude de la composition isoestérasique sera intéressante à différents points de vue par leur intervention dans les processus de la formation des parois, par leur définition génétique et également par le fait qu'elle permet la démonstration d'un effet sélectif direct sur les loci estérasiques.

B. - RESULTATS.

Avant de procéder à la séparation et à la recherche de l'éventuelle présence de formes multiples chez les estérases, il nous a paru intéressant de tester l'activité totale estérasique dans les différentes formes d'Ajoncs ainsi que l'influence de quelques paramètres (variation de pH, température) sur cette activité.

1 - Activité spécifique estérasique :

Sa mise en évidence est décrite dans l'appendice technique (T ). Elle est très variable selon les formes analysées (figure 16) qui vont posséder individuellement un certain niveau d'activité spécifique estérasique.

La figure 16 permet la comparaison des activités totales estérasiques (exprimées en umole/mg/mn) dans les extraits des différentes formes analysées. L'activité estérasique dosée est plus forte dans chacune des formes basses (0,28 et 0,23umole/mg/mn) que chez les formes normales qui leur correspondent (0,2 ; 0,23 et 0,15 umole/mg/mn).

Mais la valeur de ces observations est difficile à estimer, c'est ce que confirme notre tentative de mesure de l'activité estérasique par gramme de tissu, comparée donc parallèlement à la variation de la concentration protéique.

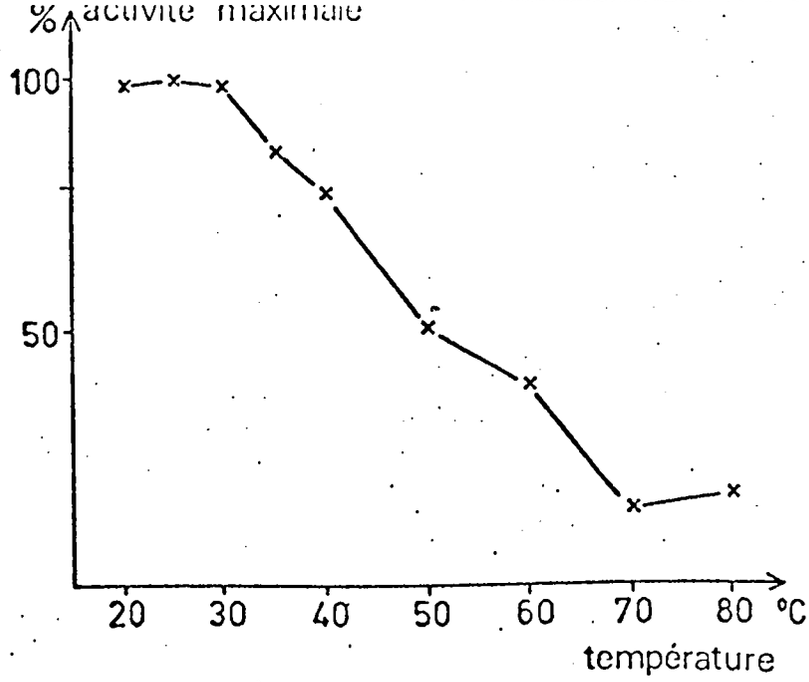



Figure 18. - Influence de la température sur l'activité estérasique de l'extrait brut (prétraitement pendant 5 mn).

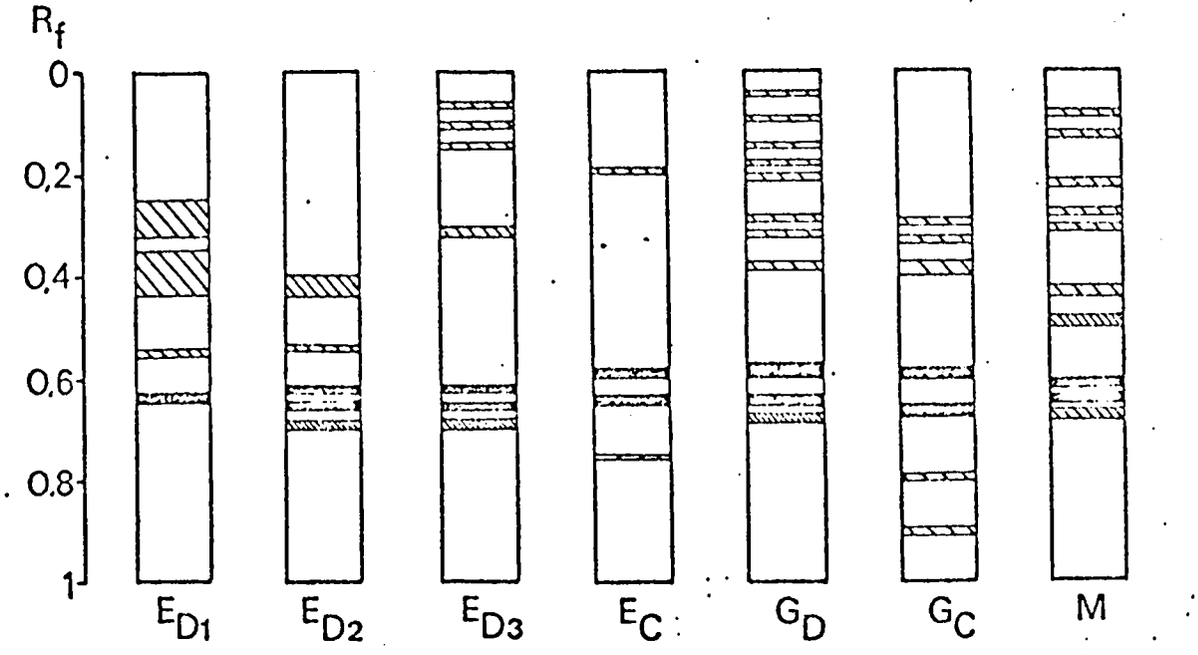



Figure 19. - Electrophorégrammes des isoestérases de l'extrait brut (gel de polyacrylamide à 7 % ; substrat : 1-Naphthylacétate).

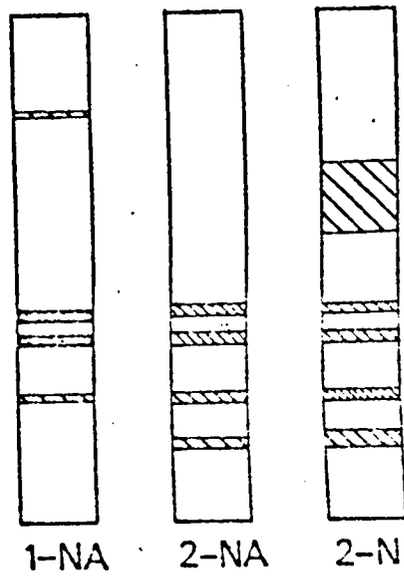



Figure 20. - Electrophorégrammes des estéroses d'*Ilex europaeus* couché $E_3$. Coloration avec les substrats 1-Naphthylacétate (1-NA), 2-Naphthylacétate (2-NA) et 2-Naphthylpropionate (2-NP).

Le calcul de leurs Rf et le nombre de bandes séparées permettent la classification des isoestérases en deux groupes :

- celles de Rf compris entre 0 et 0,5 : C'est une région à nombre de bandes élevées mais très variables et où l'activité enzymatique est la plus faible. C'est pourquoi dans la figure 19 seules sont représentées les bandes dont la fréquence de présence est la plus constante.

- celles de Rf compris entre 0,5 et 1,0 : Dans cette zone, l'activité enzymatique la plus élevée apparaît sous forme de bandes importantes quantitativement et dont la fréquence de distribution est la plus stable.

3b - Utilisation d'autres substrats synthétiques :

Deux autres substrats synthétiques : le 2-naphtyl-acétate et le 2-naphtyl-propionate sont utilisés. Le comportement des estérases pour ces 3 substrats peut être compris en considérant l'exemple des formes basses d'Ulex europaeus L. (figure 20).

La bande de Rf 0,2 ne réagit qu'avec le 1-Naphtyl-acétate ; avec le 2-Naphtyl-propionate une nouvelle bande large apparaît (Rf. 0,30 - 0,44).

Les bandes importantes révélées en présence du 1-naphtyl-acétate (Rf. 0,60 et 0,64) présentent des activités qui vont décroissantsavec le 2-naphtyl-acétate et surtout avec le 2-naphtyl-propionate.

Par contre, les bandes caractérisées par une migration rapide (Rf. 0,76 et 0,85) montrent une activité plus élevée avec le 2-naphtyl propionate.

Ainsi, chaque isoestérase manifeste une affinité spécifique particulière à chacun des substrats utilisés. Leur spécificité est très marquée puisqu'elle tient compte entre le 1-NA et le 2-NA de la position de l'acétate sur le naphtol.

Ce caractère de spécificité très étroite retrouvé lors de l'utilisation des deux autres substrats synthétiques ne surprend plus puisque le 2-naphytl-acétate et le 2-naphtyl-propionate diffèrent par la longueur des chaînes des acides.

Ceci explique l'absence de différences nettes observées dans les mécanismes d'action enzymatique des estérases et des lipases. Ces dernières en effet sont des estérases qui interviennent sur les liaisons unissant un acide gras à longue chaîne à un groupement alcool.

L'application de la focalisation isoélectrique a été envisagé pour mieux comprendre le comportement de ces isozymes. Nous n'avons retenu, pour cette technique, que les isoestérases caractérisées par une activité spécifique élevée, de Rf supérieurs à 0,5 rejetant ainsi les autres isoestérases dont la présence est soumise exclusivement à différents facteurs tels âge du tissu, le stade de développement, etc...

Rappelons que c'est la focalisation isoélectrique des estérases qui nous a servi d'exemple pour l'application de cette méthode à l'analyse des isozymes végétales (App. Techn. T ) et les conditions de séparation sont ainsi décrites dans l'appendice technique T ).

Dans les fractions pures une meilleure définition des isoestérases est recherchée par l'établissement de leurs constantes physico-chimiques respectives.

4 - Estimation du poids moléculaire :

L'estimation des poids moléculaires est réalisée par électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide (à concentrations variables de polyacrylamide) en présence de protéines de références de poids moléculaires connus.

Dans le cas des isozymes de Rf compris entre 0,6 et 0,7, 3 bandes importantes de Rf respectifs 0,65, 0,67 et 0,70 sont observées sur ces électrophorégrammes. Elles sont remarquables par l'identité des variations de leur migration en fonction des concentrations différentes en polyacrylamide. Ceci signifie qu'elles possèdent un poids moléculaires identique qui est de :

- 50 000 pour les isoestérases $I_1$ à $I_3$

Deux autres isozymes $I_4$ et $I_5$, qualitativement importantes, de Rf respectivement de 0,62 et 0,50 ont des poids moléculaires de 59 000 ($I_4$) et 65 000 ($I_5$).

Ces valeurs sont ici inférieures à celles qui sont proposées par exemple pour l'Orge (121 ) : 29 500, ou de 165 000 pour une estérase du porc qui est constituée de 3 sous-unités de 58 000 ( 32 ).

Lors de l'analyse électrophorétique des isoestérases $I_1$ à $I_3$, [redacted] Les caractères de leurs migrations (elles sont peu différentes) et l'identité de leurs poids moléculaires laissent supposer que nous nous trouvons en présence d'isozymes génétiquement bien définies qui sont des formes d'isoestérases alléliques en un même locus.

Il est certain qu'ici, les observations ne peuvent conduire qu'à des hypothèses qui, cependant trouveraient une justification dans les grandes similitudes de ces bandes qui sont proches :

- par l'affinité qu'elles présentent aux substrats ;
- par l'identité de leur charge qui explique les faibles différences de migration observées ;
- par l'identité de leurs poids moléculaires.

Ces arguments biochimiques correspondent à de véritables critères qui militent en faveur de la présence de formes alléliques.

5 - Analyse des Isoestérases (quantitativement importantes) par focalisation isoélectrique préparative.

Une expérience préliminaire a été envisagée en utilisant une gamme de pH de 3 à 10. Elle révèle que les isoestérases (de Rf appr. 0,6) ont un pki compris entre 4 et 5. Aussi, comme dans le cas précédemment envisagé des leucine-aminopeptidases une gamme d'ampholine de pH 4 à 6 sura retenue dans l'analyse des estérases (28).

Les profils d'élution de chacune des formes analysées ne montrent pour les différents extraits que des variations infimes à l'issue des focalisations successives, attestant ainsi la bonne reproductibilité de la technique (App. Tech. T ) et aussi l'excellente stabilité de ces isozymes dans les tissus provenant de plantes différentes d'une même population.

De même que pour les leucine-aminopeptidases des contrôles électrophorétiques (en disc-électrophorèse) sont effectués pour identifier les pics obtenus.

a) résultats qualitatifs :

5 isozymes sont finalement identifiées dans les formes analysées et leurs caractéristiques respectives sont consignées dans le tableau VIII. et la fig. 21.

TABLEAU VIII.

| Isoestérases | pki | Rf | PM |
|---|---|---|---|
| $I_1$ | 4.49 | 0,703-0,718 | 50 000 |
| $I_2$ | 4.63 | 0,667-0,680 | 50 000 |
| $I_3$ | 4.78 | 0,644-0,650 | 50 000 |
| $I_4$ | 5.07 | 0,612-0,622 | 59 000 |
| $I_5$ | 5.30 | 0,488-0,503 | 65 000 |

Les bandes $I_1$, $I_2$, et $I_3$ présentent des poids moléculaires identiques or les écarts de pki ou de Rf sont aussi élevés entre $I_1$ et $I_2$ d'une part et entre $I_2$ et $I_3$ d'autre part.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une structure dimère pour les estérases ainsi que SCHWARTZ le supposait ( 140 ) correspondant à 2 homodimères $I_1$ et $I_3$, et 1 hétérodimère $I_2$

Mais une telle hypothèse ne peut être soutenue en l'absence d'études approfondies génétiques et de celle de la conformation protéique.

La comparaison des différentes formes d'Ulex appelle quelques remarques : 1- ainsi les formes normales d'Ulex europaeus L. ($E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$) montrent une composition isozymatique identique pour les isoestérases $I_1$, $I_2$ et $I_3$.

2 - D'autre part, les formes basses et dressées à Ulex gallii Pl. et d'Ulex europaeus L. couché $E_C$ L. sont également proches par le comportement de leurs isoestérases et se distinguent des formes normales d'Ulex europaeus par la présence d'une quatrième isoestérase $I_4$.

3 - Enfin, Ulex minor est toujours aussi marginal par les estérases $I_1$, $I_2$, $I_3$ auxquelles vient s'ajouter une autre bande unique $I_5$.

La comparaison des distributions des isoestérases dans le complexe Ulex conduit à des observations très proches de celles qu'a apporté l'étude des leucine aminopeptidases.

Pour les LAP et les EST les formes normales d'Ulex europaeus L. présentent une image très homogène d'espèce. Ulex minor possède pour ces deux groupes d'iszymes une bande supplémentaire unique, de même la composition

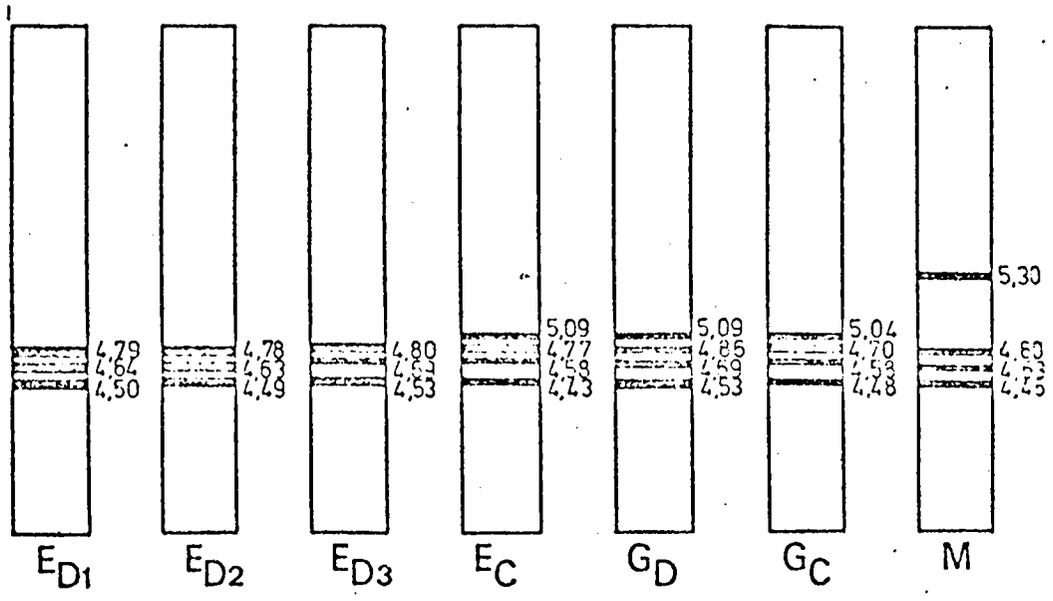



Figure 21. - Identification des isoestérases après FIP par leur pki et leur Rf dans un gel de polyacrylamide à 7 %.

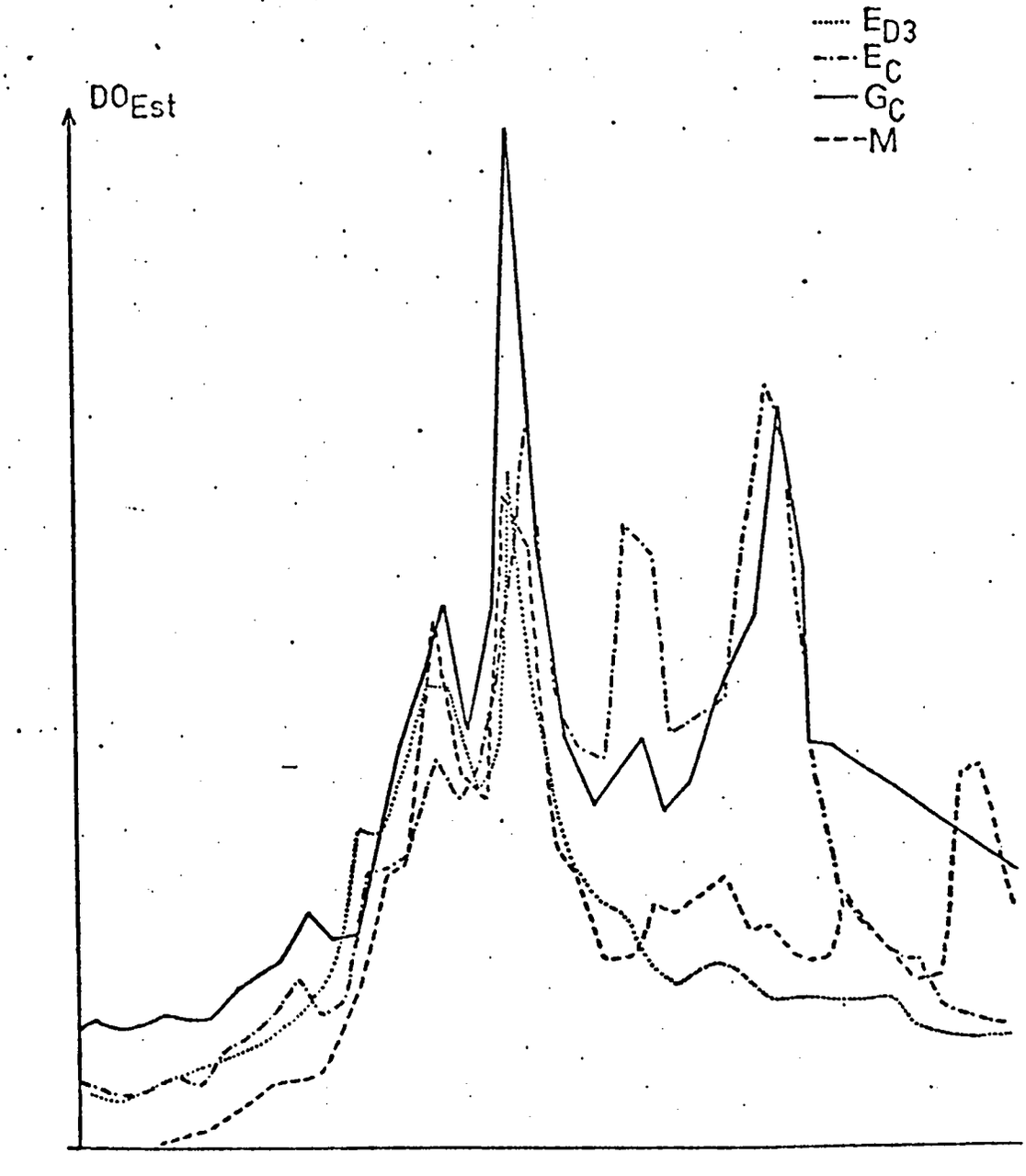



Figure 22. - Superposition des schémas d'élution de quatre formes d'Uéx ($E_{D3}$, $E_C$, C, et M), (ampholine pH 4-6 ; +4° ; 200 V ; 72 h ; fractions de 2,5 ml).

en isoLAP ou en isoestérases est identique pour les formes basses d'Ulex gallii Pl. et d'Ulex europaeus L.

Les estérases diffèrent cependant des leucine-aminopeptidases car les formes normales d'Ulex gallii et les deux formes basses ont la même composition isozymatique.

Sur les bases des données apportées par l'étude des isoestérases, une distribution des différentes formes du complexe Ulex peut être établie selon 3 groupes :

- un premier groupe à Ulex europaeus L. dressé dans lequel $E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$ sont définis par la présence et les caractères de $I_1$, $I_2$ et $I_3$.
- un deuxième groupe comprenant les Ulex gallii quelque soit leur forme et les formes basses d'Ulex europaeus L., c'est à dire $E_C$, $G_C$ et $G_D$, formes définies par les isozymes $I_1$, $I_2$, $I_3$ et $I_4$.
- enfin, un troisième groupe réunira les formes à Ulex minor caractérisées par les isozymes $I_1$, $I_2$, $I_3$ et $I_5$.

b) Aspect quantitatif de l'analyse des isoestérases :

Dans le cadre de l'étude isoestérasique, les données de l'analyse qualitatives peuvent être complétées par celles de l'analyse quantitative en raison de la forte activité enzymatique recélée par les tissus et par la constance des profils d'élution. La quantité relative de chaque isozyme par rapport à la somme des activités enzymatiques reconnues dans la zone de pH où les 5 isozymes analysées sont inclues.

La figure 22 illustre la superposition des profils d'élution de 4 échantillons : $E_{D3}$ représente l'ensemble du groupe $E_D$, les profils d'$E_{D1}$ et $E_{D2}$ étant sensiblement identiques ; $G_C$ représente l'espèce Ulex gallii Planch.

Les formes appartenant au groupe 2 précédemment défini sont rapidement identifiées par la présente de $I_4$. Le pic qui pourrait correspondre à une activité isoestérasique intermédiaire entre $I_3$ et $I_4$ ne peut être interprété comme tel car par analyse électrophorétique des fractions (disc électrophorèse) aucune bande nouvelle n'est observable à ce niveau. Il est donc possible que la formation artificielle de ce pic résulte de la superposition de deux pics voisins (app. tech. T ).

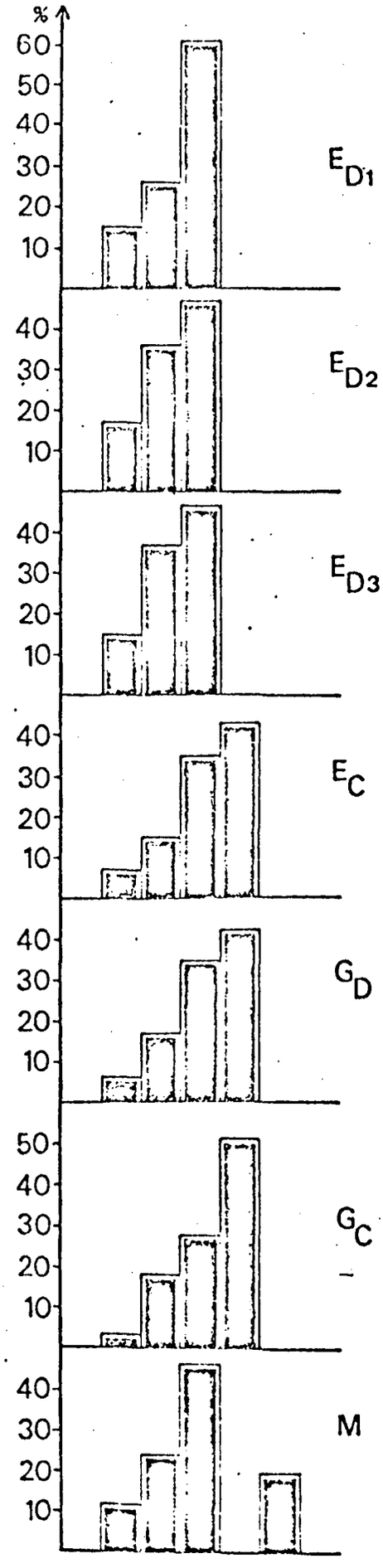



Figure 23. - Pourcentage de chaque isoestérase ($I_1$ à $I_5$) dans les différentes formes.

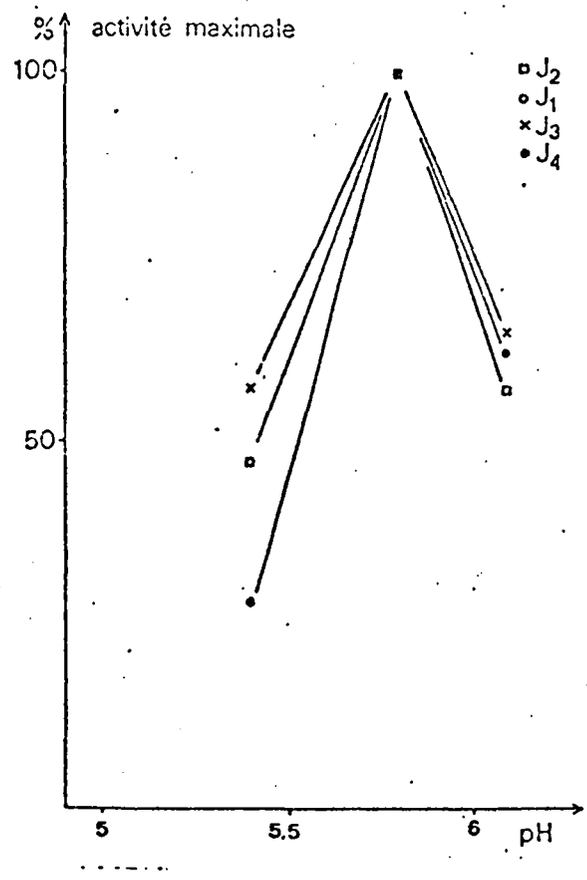



Figure 24. - Influence du pH sur l'activité estérasique des isozymes $I_1$ à $I_4$.

A partir de ces profils d'élution, l'éstimation des pourcentages respectifs d'activité isoestérasique sont établis par rapport à l'activité totale de ces pics réunis (fig. 23).

La comparaison des 3 formes normales d'Ulex europaeus L. montre que chez $E_{D1}$ l'isozyme $I_3$ est très prépondérante (61 % de l'activité), ce qui explique la présence unique d'une bande très importante à ce niveau dans l'analyse par "disc-électrophorèse" de l'extrait brut (fig. 8).

Les formes réunies dans le deuxième groupe ($E_C$, $G_C$ et $G_D$) sont caractérisées par la présence de $I_4$, quantitativement importante.

Ulex minor Rothm. peut être défini par la présence de $I_5$, bien que cette isozyme ne soit pas majeure : elle ne représente que 19 % de l'activité totale, alors que $I_3$ est ici l'isozyme majeure comme dans le premier groupe ($E_D$).

L'analyse quantitative confirme donc par ses données celles de l'analyse qualitative. Elle permet également l'estimation des valeurs quantitatives respectives de chaque isozyme dans son contexte enzymatique.

c) Analyse des cinétiques isozymatiques :

Cette analyse s'imposait en raison des profondes différences qualitatives et quantitatives qui caractérisent la composition isoestérasique et de notre ignorance quasi totale de leurs fonctions dans ce complexe. C'est par le biais de l'étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique que cette étude sera conduite.

-influence du pH :

La sensibilité montrée par les isozymes aux variations de pH est très variable. Des essais préliminaires établissent que chaque isozyme présentera comme l'extrait brut une activité maximum à pH 5,8. Cependant, contrairement à l'extrait brut, ce maximum est plus accusé puisque l'activité diminue considérablement en fonction de faibles variations de pH. Ceci nous a conduit à analyser les valeurs de cette activité corrélativement à des valeurs très proches de pH : pH 5,4 ; 5,8 et 6,2 (figure 23).

On constate que les isoestérases sont très sensibles à toute variation du pH vers des valeurs très acides. $I_1$ à $I_3$ possèdent encore 50 % appr. de leur activité à pH 5,4 ; $I_4$, plus sensible ne présente plus que 30 % de son activité maximale pour ces valeurs de pH (5,4). Pour toutes les isozymes, leur activité est encore approximativement de 60 % à pH 6,2.

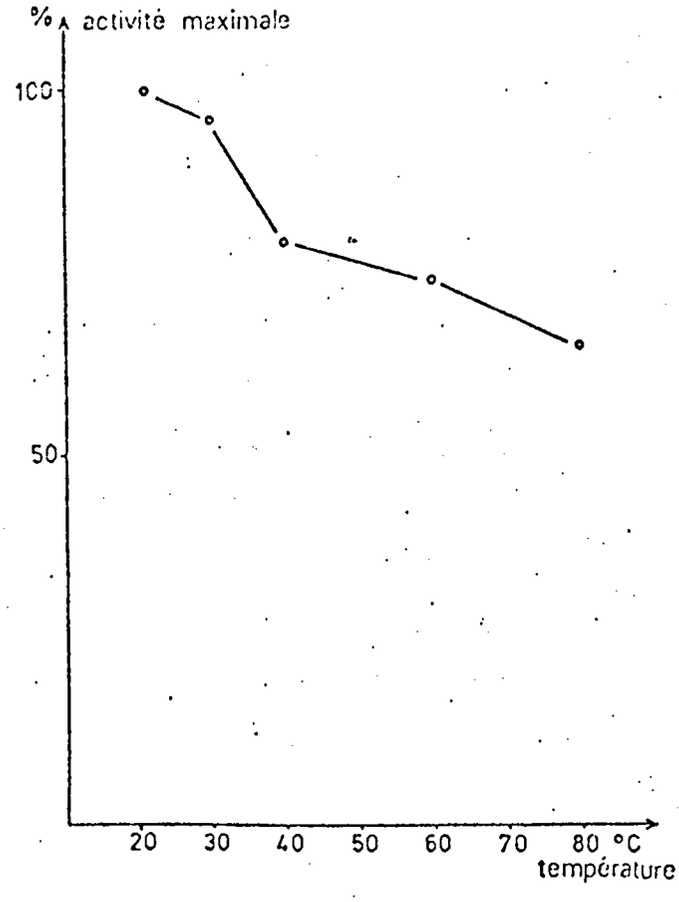



Figure 25. - Influence de la température (prétraitement de 5 mn) sur l'activité estérasique de l'isozyme $I_3$.

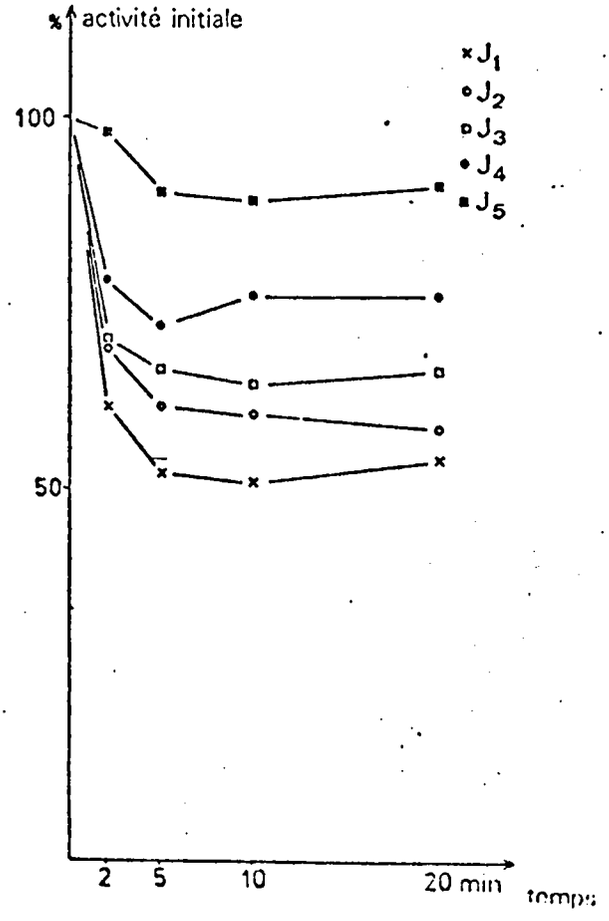



Figure 26. - Influence de la durée d'un traitement à 80°C (de 0 à 20 mn) sur l'activité estérasique des isozymes $I_1$ à $I_5$.

Les faibles différences observées entre les isoestérases $I_1$ à $I_3$ suggèrent que le centre actif n'est pas touché par les changements qui sont à la base des valeurs différentes des pki.

b-influence de la température :

L'influence de la température est étudiée sur des extraits bruts et sur chacun des éluats de la focalisation isoélectrique contenant les différentes isozymes séparées.

Dans ce but, les fractions pures contenant l'isoestérase $I_3$ sont soumises à des températures variables pendant 5 minutes.

Si nous comparons (~~figure 24~~) les activités résiduelles après traitement thermique (80°C, 5 mn) de l'isoestérase $I_3$ (fig. 24) et de l'extrait brut (fig. 18), la thermostabilité de l'isozyme $I_3$ est plus élevée ~~xxxxxxxx~~ (65 % de son activité initiale) que celle de l'extrait brut (18 % de son activité initiale).

En raison de cette thermostabilité, l'expérience a été modifiée non plus par la mesure de l'activité résiduelle après 5 mn à des températures variables mais en étudiant l'influence d'un traitement prolongé à 80°C sur l'activité estérasique (fig. 25). Les résultats obtenus nous permettent par leur netteté de relier les valeurs des pki à la thermostabilité : l'enzyme sera d'autant plus thermostable que la valeur du pki est plus basique.

Une relation est recherchée entre la localisation géographique des différentes formes et le degré de thermostabilité des estérases.

Les isozymes les plus thermolabiles appartiennent essentiellement aux formes du Pas-de-Calais ($E_{D1}$ et $E_{D2}$) ; les isoestérases thermostables sont davantage présentes dans les formes de Bretagne ($E_C$, $G_D$ et $G_C$), enfin c'est chez Ulex minor Roth. qui représente la forme la plus au sud de la Bretagne que se rencontre l'isozyme le plus thermostable.

C. - DISCUSSION.

L'analyse électrophorétique des isoestérases est extrêmement importante par le nombre et l'originalité des critères physico-chimiques qu'elle apporte.

Ainsi, en se basant sur les isozymes définies par un pki compris entre pH 4,0 et 5,5 et sur le fait que ce critère correspond à des isozymes quantitativement et qualitativement importante, les 7 formes d'Ulex étudiées peuvent être distribuées en 3 groupes très proches des 4 groupes proposés à l'issue de l'analyse des isoleucine-aminopeptidases.

Ces 3 groupes comprennent :

1 - dans le premier, les formes normales à Ulex europaeus L. où $E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$ sont définis par l'identité de leurs profils isozymatiques ;

2 - dans le deuxième groupe seront réunies non seulement les formes basses ($G_C$ et $E_C$) mais également les formes dressées d'Ulex gallii Pl. ;

3 - enfin, un troisième groupe réduit aux formes normales d'Ulex minor Roth. très originales par l'apparition d'une bande très spécifique à cet Ajonc ce qui lui confère un profil isozymatique différent des forumules normales d'Ulex europaeus L. où de celles des Ulex gallii Pl.

Sachant combien certains paramètres sont importants en écologie, l'influence du pH et de la température sur les cinétiques respectives des isozymes est envisagée. La variation de leur thermostabilité est un critère qui permet de distinguer les isoestérases.

Dans l'analyse il faut vérifier alors si le profil isoestérasique établi pour les formes d'Ulex europaeus L. érigé du Pas-de-Calais et de la Bretagne est le même dans toute l'aire de répartition de l'espèce. Ceci revient à se demander si les isozymes ~~exxxxx~~ potentielles du génotype sont totalement exprimées ; une réponse doit pouvoir être donnée dans la connaissance des profils estérasiques d'Ajoncs situés dans un gradient d'atlanticité plus marquée (Pays-Bas, Espagne).

Il est possible que ces génotypes soient caractérisés par la présence d'une iscestérase dont le caractère thermostable élevé sera plus avantageux pour ces Ajoncs en fonction du climat que ne le serait son expression chez les Ajoncs situés plus au Nord.

Ainsi, il apparaît très souhaitable de s'adresser non plus à des populations naturelles mais à des populations expérimentales afin de vérifier si la composition isozymatique varie en fonction de la transplantation des Ajoncs d'une aire à caractère atlantique dans une aire à caractère ibéro-atlantique.

De telles expériences permettent de comprendre la distribution géographique des différentes formes d'Ulex :

-ainsi si le génotype d'Ulex europaeus L. ne peut exprimer une isozyme plus thermostable, son extension vers le sud sera limitée ;

-par contre, le caractère ibéro-atlantique d'Ulex minor Rothm. pourrait s'expliquer par le pouvoir du génotype d'exprimer une isozyme plus thermostable.

L'analyse des isoestérases conduit à placer dans un même groupe, les formes basses d'Ulex europaeus L. et les formes normales et basses d'Ulex gallii Pl. (les affinités ne résident donc plus uniquement dans le port).

On peut supposer qu'entre les formes basses d'Ulex europaeus L. et d'Ulex gallii Pl; de grandes affinités écologiques sont à la base d'échange génétique responsable de la très grande convergence du port et l'identité de la composition isozymatique. Ulex gallii Pl. est d'ailleurs la mieux adaptée des formes basses à son écologie spécifique sur les falaises que ne le sont les formes basses d'Ulex europaeus L. Aussi pourrait-on objecter que pour mieux juger le grand degré d'effinité qui unit ces espèces et pour limiter l'influence du courant de gènes qui circule entre les formes, il serait souhaitable de pouvoir prélever les échantillons des formes basses à Ulex europaeus L. au coeur des populations d'Ulex europaeus L., dans un site nettement plus éloigné de celui qui permet le développement des deux formes.

Cette objection est d'importance limitée, puisque les possibilités d'hybridation permanente entre les formes d'Ulex demeurent faibles en raison de l'éloignement des périodes de floraison !.

Le troisième critère intéressant concerne l'estimation des poids moléculaires. Les isoestérases $I_1$ à $I_3$ ont sensiblement le même poids moléculaire, mais l'isoestérase $I_2$ présente des "trait intermédiaires" caractéristiques : Rf, pki et thermostabilité.

Il est plausible, pour comprendre ceci de postuler la structure suivante : les isozymes $I_1$ à $I_3$ seraient des dimères composés des sous-unités A et B. Ayant des poids moléculaires identiques, $I_1$ et $I_3$ peuvent être considérées comme des homodimères pour lesquelles :

$I_1$ serait composée de 2 sous-unités A

$I_3$ serait corposée de 2 sous-unités B

Quand à $I_2$, elle peut être considérée comme unehétérodimère formé de l'association d'une sous-unité A et d'une sous-unité B ; cette structure expliquerait donc les caractères intermédiaires observées au niveau des charges extérieures et de la thermostabilité.

Il est donc certain qu'il ne s'agit là que d'une hypothèse de travail. Sa vérification exigera la reconstitution de ces monomères afin d'en analyser les structures.

D. - RESUME.

Le polymorphisme des estérases est établi : 5 isoestérases $I_1$, $I_2$, $I_3$, $I_4$ et $I_5$, sont caractérisées et définies par leurspki compris entre 4,0 et 5,5.

En se basant sur la variation de leur composition isoestérasique, nous pouvons répartir les Ajoncs en 3 groupes :

- le premier réunit tous les Ulex europaeus L. dont les formes sont normales $E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$ ;
- le deuxième dans lequel les formes basses d'Ulex europaeus L. voisinent avec les Ulex gallii Pl. quelque soit leur port ;
- enfin un troisième réduit aux formes à Ulex minor Roth.

L'analyse des cinétiques des isoestérases isolées permet de mettre en évidence la variation élevée du caractère thermostable de ces enzymes. Leur thermostabilité est d'autant plus élevée que les valeurs du pki seront plus basiques.

# CHAPITRE VI

# ANALYSE DES PEROXYDASES

A. - INTRODUCTION.

Les péroxydases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de nombreux composés en agissant en peroxydases en présence d'$H_2O_2$ ou comme de simples oxydases. Leur structure semble être celle d'une seule chaîne polypeptidique d'un poids moléculaire de 40 000 (168, 169).

De très nombreuses recherches enrichissent nos connaissances de leurs fonctions in vitro mais dont l'importance réelle in vivo n'est pas démontrée (154).

La multiplicité de leurs fonctions semble en relation avec un polymorphisme enzymatique élevé (135), leur structure et la diversité de leur localisation dans les parois ou les membranes. Ainsi histochimiquement, il a été montré qu'elles sont associées à la paroi de nombreux organites (154) et qu'elles sont légèrement liées aux membranes du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, du vacuome et des ribosomes (154).

La diversité de ces fonctions attribuées ou reconnues aux peroxydases est rapportée dans le tableau IX.

Mais leur participation à la physiologie de la croissance et à sa régulation retient notre attention.

Déjà EVANS en 1963, a comparé l'activité peroxydasique chez les tomates normales et naines. Il a noté une forte augmentation de cette activité chez les plantes naines. Depuis leur participation plus ou moins directe au contrôle de la croissance est souligné par de nombreux travaux.

Ainsi les peroxydases associées à la paroi (154) limitent le processus de croissance en intervenant sur l'extensibilité de la paroi : soit en favorisant la polymérisation oxydative de la lignine ce qui entraîne un durcissement précoce des tissus, soit en contrôlant la quantité d'hydroxyproline de la paroi (91).

Elles peuvent aussi agir directement sur la croissance en la bloquant par une action peroxydasique qui, en l'absence d'$H_2O_2$, assure l'oxydation de l'acide β-indolyl-acétique (29, 55, 84, 94, 117, 126, 146, 147).

Leur action plus ou moins nuancée sur la croissance semble en relation avec une variation de la composition isozymatique ( 38, 39, 118 ).

Ainsi les multiples aspects de l'activité peroxydasique nous conduit à envisager la participation de ces peroxydases dans le déterminisme et le maintien de l'altération du port des Ajoncs. Cependant, il faut noter que le polymorphisme des peroxydases est à l'origine de quelques travaux génétiques qui leur sont consacrés. Chez les Végétaux, un contrôle génétique des isoperoxydases est connu : 2 isoperoxydases chez Hordeum ( 41 ), 1 isoperoxydase chez Nicotiana, Cucurbita ( 32, 64 ), sont contrôlées par des allèles codominants. La transmission héréditaire de ces isozymes est mendélienne, aucune bande qui montrerait la formation d'un hétérozygote lors des processus d'hybridation sur gel, n'est mise en évidence. Ceci est en accord avec les résultats de l'analyse biochimique conduisant à admettre pour ces peroxydases une structure monomérique.

| FONCTION | REFERENCES |
|---|---|
| Oxydation de l'acide β-indolylacétique | 29, 55, 91, 94, 117, 126, 146, 147 |
| Formation de la lignine | 94 |
| Formation de l'éthylène | 94 |
| Réduction de nitrate | 94 |
| Destruction de la chlorophylle | 111 |
| Oxydation des polyphénols | 94, 147 |
| Résistance contre des maladies | 146 |
| Respiration | 146 |
| Influence sur l'extensibilité de la paroi | 91 |
| Formation de dityrosine | 88 |

TABLEAU IX: Fonctions des peroxydases

B. - RESULTATS.

1 - Activité totale peroxydasique des tissus chlorophylliens des Ajoncs:

L'activité totale peroxydasique est déterminée selon PUTTER (T21) en présence du gaiacol et de l'eau oxygénée comme substrats. Le gaiacol est un substrat spécifique des peroxydases ; l'apparition de sa forme oxydée est mesurée à 436 nm.

L'activité totale peroxydasique déterminée dans les extraits des différentes formes d'Ajoncs, est exprimée par mg de protéines et par g de tissu (figure 27 et 28).

L'examen de ces résultats montre que les valeurs de l'activité peroxydasique sont :

- assez basses et sensiblement identiques chez les types normaux d'Ajoncs ($E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$) ;
- élevées chez Ulex minor Roth. et Ulex gallii Planch. érigé (M et $G_D$) ;
- intermédiaires pour les types prostrés d'Ulex europaeus L. ($E_C$) et d'Ulex gallii ($G_C$).

Le fait que les rapports d'activité observés sont identiques quelque soit le mode de comparaison retenu (mg de protéines ou g de tissu) indique qu'il s'agit de différences d'activité réelles.

Une activité spécifique plus faible n'apparaît pas chez les formes basses ( 38, 39 ) mais la comparaison d'espèces différentes montre que l'activité la plus faible est caractérisée dans les formes normales les plus hautes (Ulex europaeus L.) et inversement, elle est la plus élevée pour l'espèce Ulex minor Roth., qui représente une forme normale à taille la plus faible. Ulex gallii Pl. possède une taille dressée intermédiaire entre ces deux exemples ci-dessus, les valeurs d'activité peroxydasique évaluées sont également intermédiaires. Ainsi variations de ~~port~~ taille et variations d'activité peroxydasique sont inversement liées.

Ce premier stade de comparaison doit être approfondi de façon à établir si les peroxydases participent réellement à la régulation de la croissance par un certain degré de leur polymorphisme permettant l'inégale activité de leurs isoperoxydases.

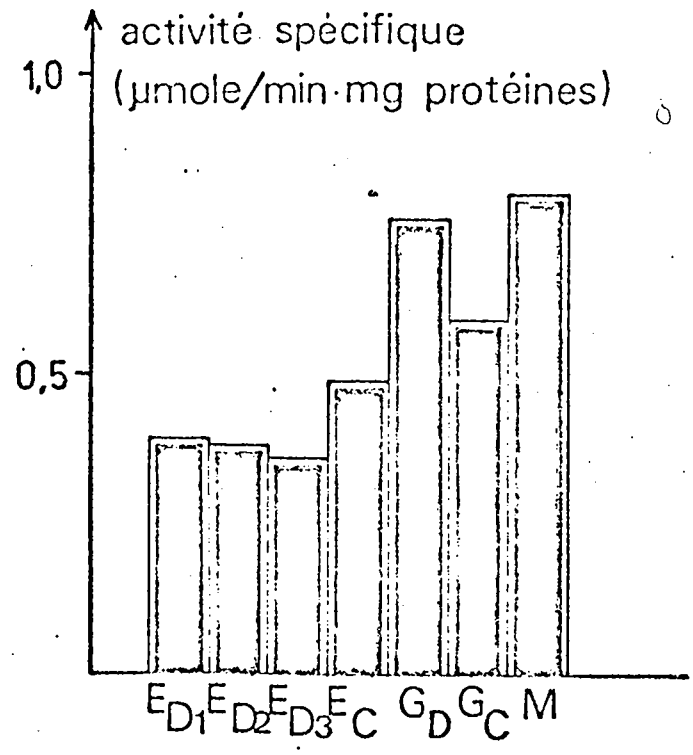



Figure 27. - Comparaison de l'activité spécifique peroxydasique dans l'extrait brut des formes d'*Ilex* analysées.

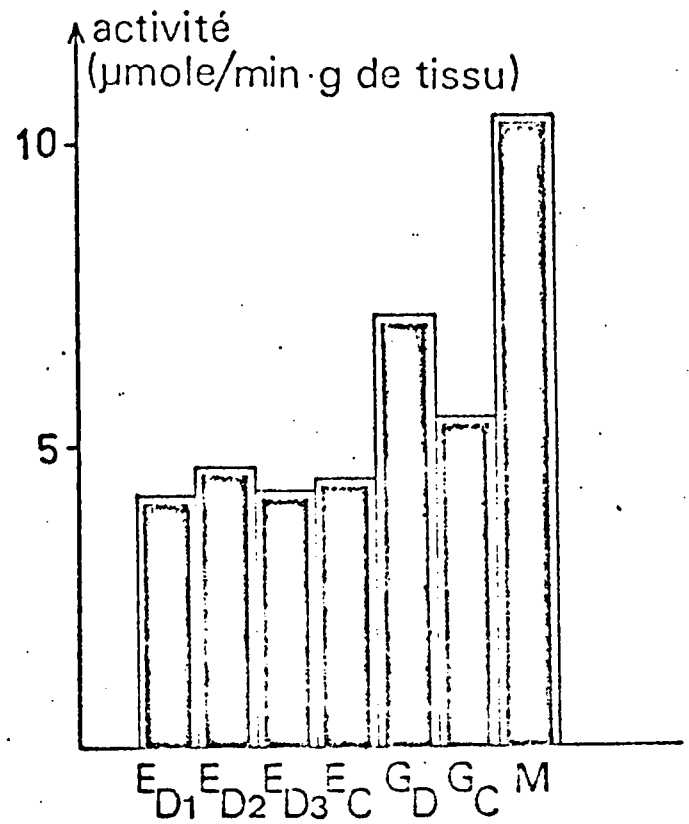



Figure 28. - Comparaison de l'activité peroxydasique par g de tissu de l'extrait brut des différentes formes d'*Ilex*.

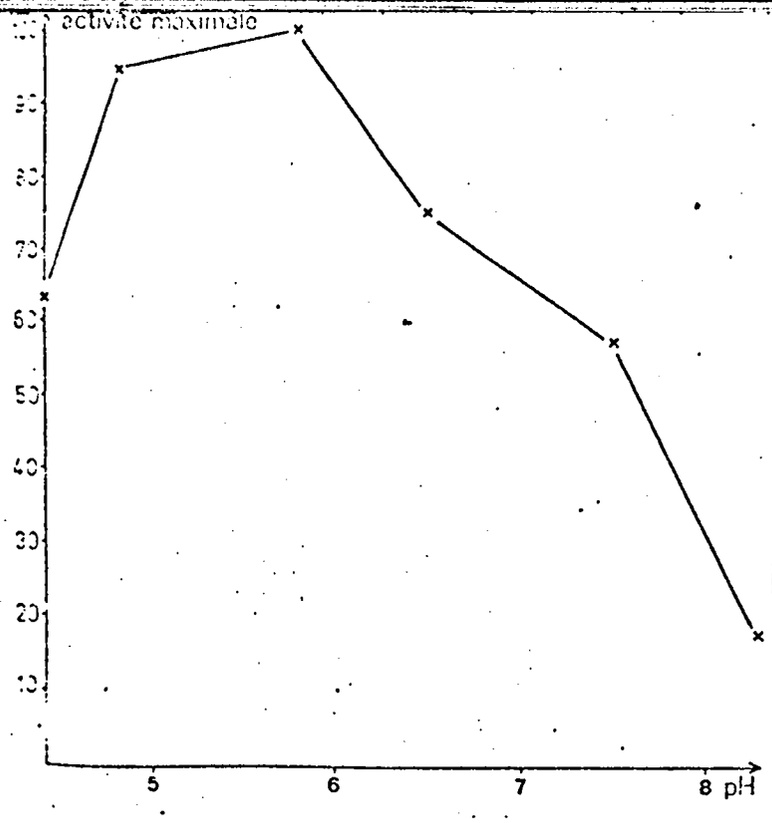
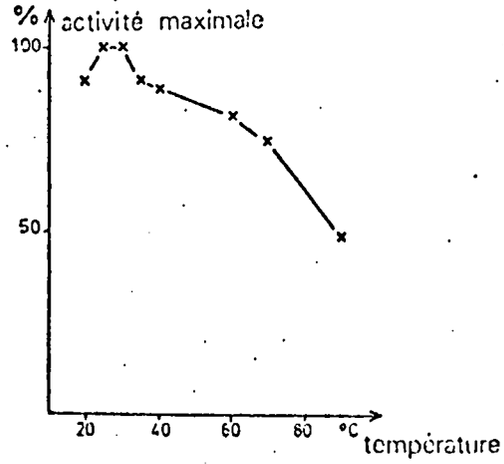



Figure 29. - Influence du pH sur l'activité peroxydasique de l'extrait brut.

Figure 30. - Influence de la température (prétraitement de 5 mn) sur l'activité peroxydasique de l'extrait brut.



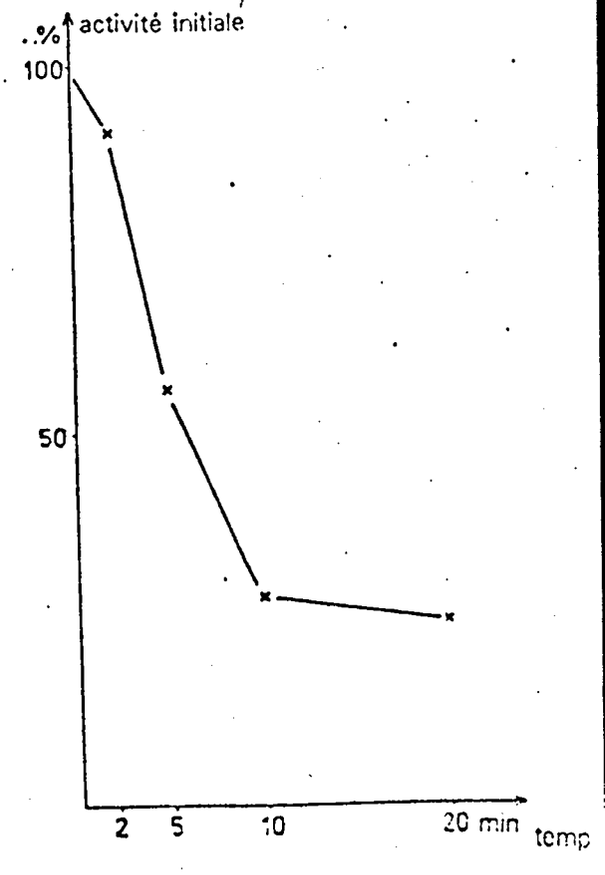




Figure 31. - Influence de la durée d'un traitement à 70°C (de 0 à 20 mn) sur l'activité peroxydasique de l'extrait brut.

a) Influence du pH sur l'activité totale :

L'influence du pH sur l'activité totale enzymatique est mesurée dans l'extrait brut.

L'activité maximum est localisée dans un plateau de pH compris entre pH 4,8 et pH 5,8. De part et d'autre de ce plateau (figure 29) elle baisse rapidement. Ainsi les valeurs de cette activité totale sont plus acides que celles qui ont été établies par JUDEL ( 75 ) où les extraits de Tournesol possèdent une activité totale peroxydasique dont le pH maximum est compris entre pH 6,8 et 7,3.

b) Influence de la température :

Après un traitement de 5 min pour chacune des températures retenues, l'activité résiduelle est déterminée (figure 30). Les peroxydases semblent assez thermostables car après 5 minutes à 80°C l'activité résiduelle représente encore 50 % de l'activité initiale.

Les peroxydases sont des enzymes où la thermostabilité a souvent été constatée ( 31, 75 ), aussi de nombreux auteurs mesurent-ils cette activité dans des extraits à température ambiante ( 32 ). Personnellement nous avons maintenu de grands soins dans la préparation des extraits enzymatiques et dans la détermination des activités car nous pens ons q'un certain degré de thermostabilité doit varier en fonction des isozymes analysées qui, étant plus ou moins thermolabiles risquent d'être inactivées.

En raison des pertes de l'activité qui sont très faibles, l'influence d'un traitement prolongé à 80°C (fig. 31) est étudié ; une diminution rapide et nette de l'activité est observée. Cependant, après 20 minutes à 80°C, 25 % de l'activité initiale sont encore relevés.

2 - Séparation des peroxydases :

Bien que les variations de l'activité spécifique observées dans les différentes formes soient très faibles, la recherche de formes multiples de peroxydases a été envisagée afin de différencier les formes normales et les formes basses.

a) Analyse par électrophorèse sur disques :

Dans ce but, les extraits bruts des Ajoncs sont soumis à une électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide à 7 % dans un système basique (app. tech. T ). Ce sont les résultats de ces zymogrammes que nous présentons ci-après :

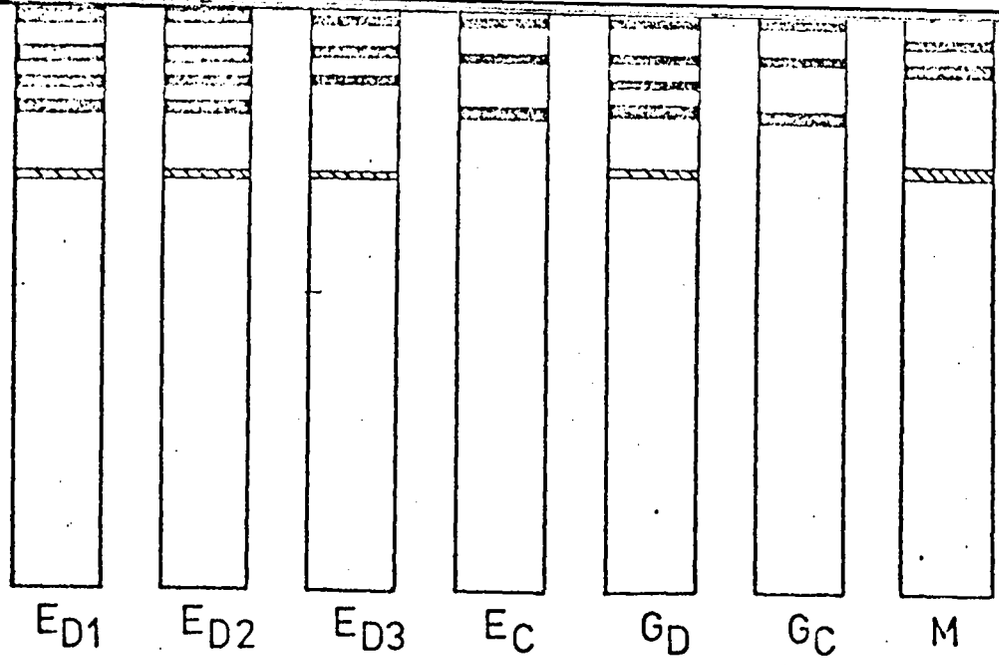



Figure 32. - Zymogrammes des isopéroxydases de l'extrait brut des différentes formes d'*Ulex*.

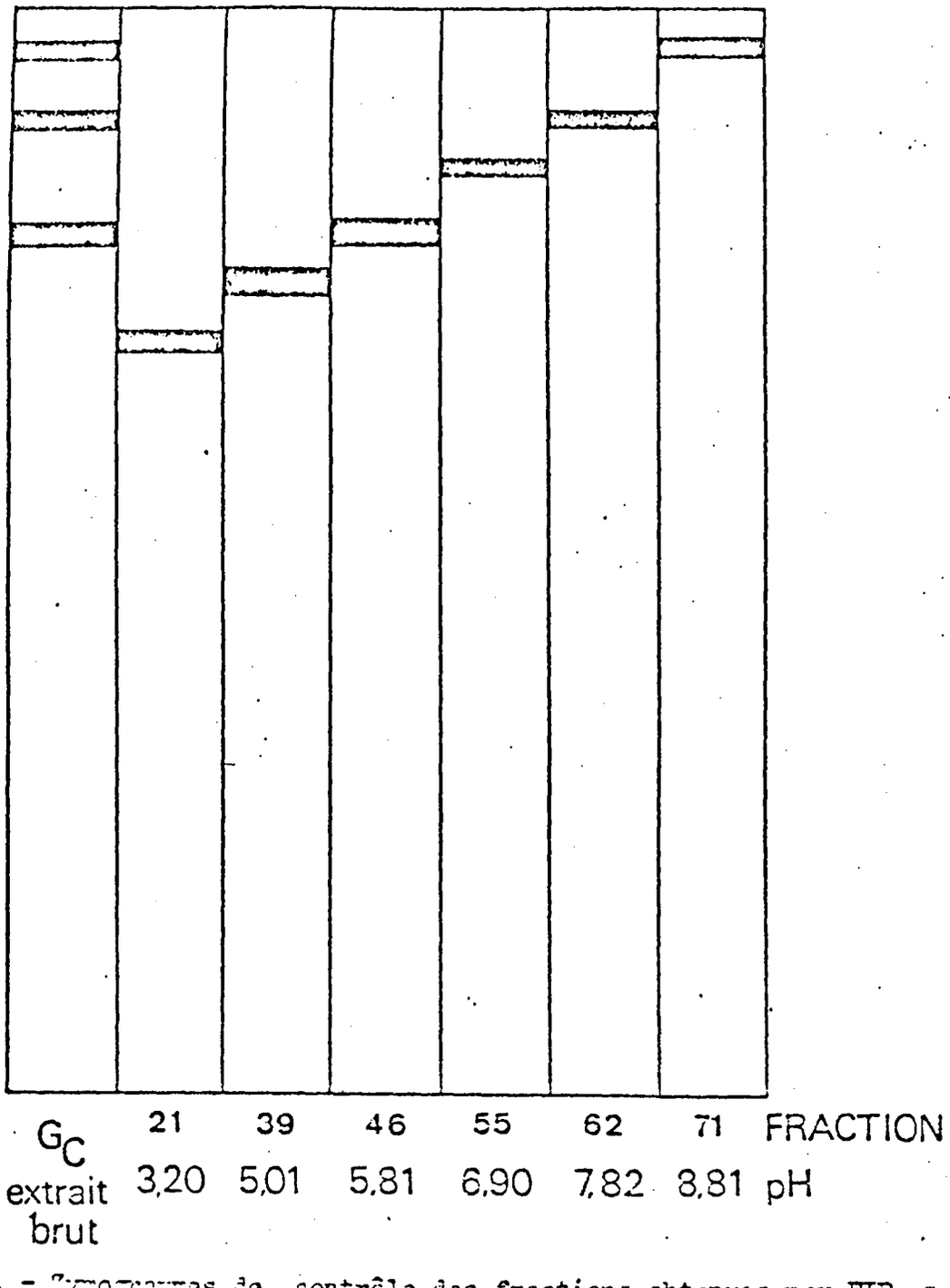



Figure 34. - Zymogrammes de contrôle des fractions obtenues par FIP et comparaison avec l'extrait brut.

Un nombre variable d'isozymes, 3 à 5 selon les formes, est caractérisé (figure 32) : 5 isozymes confèrent une nette identité aux diagrammes des formes dressées des Ulex europaeus (de la vallée de la Hem et d'Ambleteuse) et des Ulex gallii Pl.

4 isozymes pour les zymogrammes des Ulex europaeus L. de Pleubian, 3 isozymes apportent enfin une grande similitude aux zymogrammes des formes basses.

Enfin, notons que 3 isozymes seulement sont identifiées dans les diagrammes d'Ulex minor Roth. mais la première bande isozymatique est légèrement décalée par rapport à celle de toutes les autres formes.

Il est d'ailleurs remarquable de constater que seules les formes normales d'Ajoncs possèdent cette première bande isozymatique à migration rapide (Rf = 0,3).

b) Séparation préparative des isozymes peroxydasiques par focalisation isoélectrique préparative :

Afin de mieux caractériser les isoperoxydases, nous les avons séparées par focalisation isoélectrique préparative. Une excellente séparation est réalisée par cette méthode ainsi que le montre le schéma d'élution (figure 33) obtenu par focalisation isoélectrique des extraits des formes basses d'Ulex gallii Pl.

Dans la gamme de pH retenu, pH 3 à 10, 8 isoperoxydases sont nettement séparées. Chacune d'elles sera définie par son point isoélectrique. Elles seront également définies par leurs Rf respectifs établis après électrophorèse de contrôle sur disques en gel de polyacrylamide. Notons que dans le cas de deux isozymes les plus basiques, de pki respectifs 9,12 et 9,73 qui ne migrent pas dans un gel basique, leurs Rf ont été établis par électrophorèse dans un système acide (app. Techn. p T ). Leur présence dans l'extrait brut est vérifiée, ce que nous n'avions pas recherché jusque là.

La finesse et la sensibilité de cette méthode est ainsi bien prouvée par cet exemple puisqu'elle sépare un plus grand nombre d'isozymes que ne le permettait l'électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide. En particulier cette technique a surmonté la difficulté qui résidait dans la faiblesse quantitative de quelques isozymes dans les extraits enzymatiques (quelques pour cents de l'activité totale). Nous avons voulu également montrer qu'il ne s'agissait pas d'artéfacts issus des processus de purification en recherchant la présence de ces iszymes directement dans l'extrait brut.

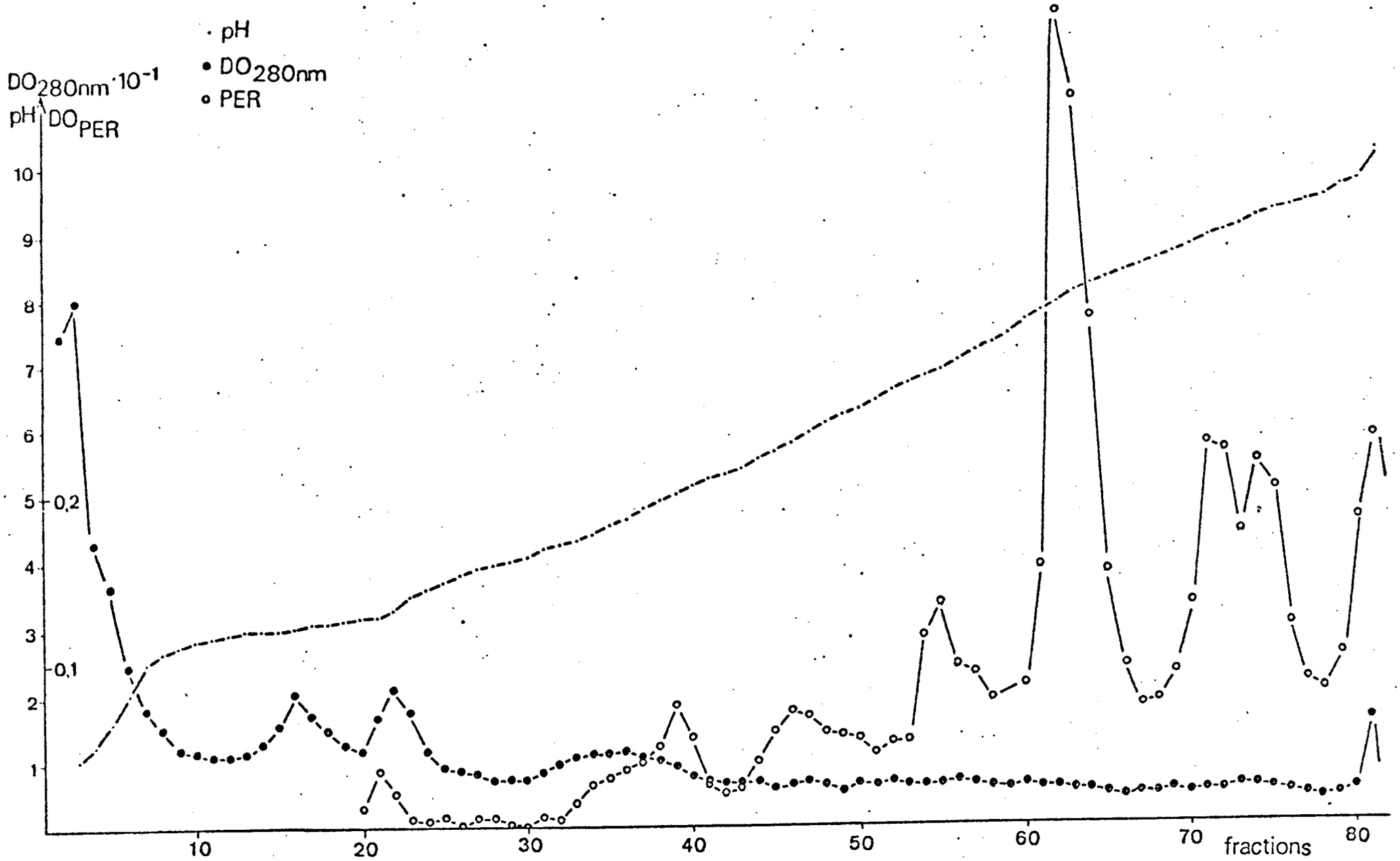



Figure 33. - Schéma d'élution des isoperoxydases d'*Ulex gallii* couché ($G_C$), (ampholine pH 3,5-10 ; +4°C ; 500 V ; 48 h ; fractions de 2,5 ml).

. Aussi, pour pallier à la difficulté de la faible teneur enzymatique, avons-nous apporté dans les gels une "surcharge enzymatique" : dans ce cas, les bandes qui, primitivement étaient distinctes, ne sont plus discernées puisqu'elles se confondent en une large bande mais, par contre, les bandes quantitativement faibles apparaissent. La présence effective de ces isozymes est donc montrée ce qui réfute toute possibilité d'une formation artificielle dans la colonne au cours de la focalisation isoélectrique.

C) Comparaison des isoperoxydases des Ajoncs :

L'image des peroxydases apportée par focalisation isoélectrique préparative est complexe puisque 10 isoperoxydases sont séparées et définies par leurs pki et par leurs Rf respectifs.

Remarquons qu'en raison de leurs migrations assez faibles, il nous a été impossible de déterminer leurs poids moléculaires par électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide (à différentes concentrations en polyacrylamide).

D'ailleurs, les isozymes dont le pki est assez basique, ne pénètrent pas dans les gels et ici aussi aucune estimation n'est permise.

Les valeurs moyennes des pki et des Rf des isoperoxydases séparées sont regroupées dans la figure 35 (tableau X ). Les isoperoxydases sont numérotées de 1 à 10 ($P_1$, $P_2$, $P_3$, etc...).

C'est la forme normale de la vallée de la Hem ($E_{D1}$) qui renferme le nombre le plus élevé d'isozymes (10). Cette forme est remarquable également par la présence exclusive d'une isozyme de pki 4,22. D'autre part, cet Ajonc et celui d'Ambleteuse sont les seules formes à posséder une isozyme définie par son pki, 3,79, ~~appro.~~ respectivement 3,72

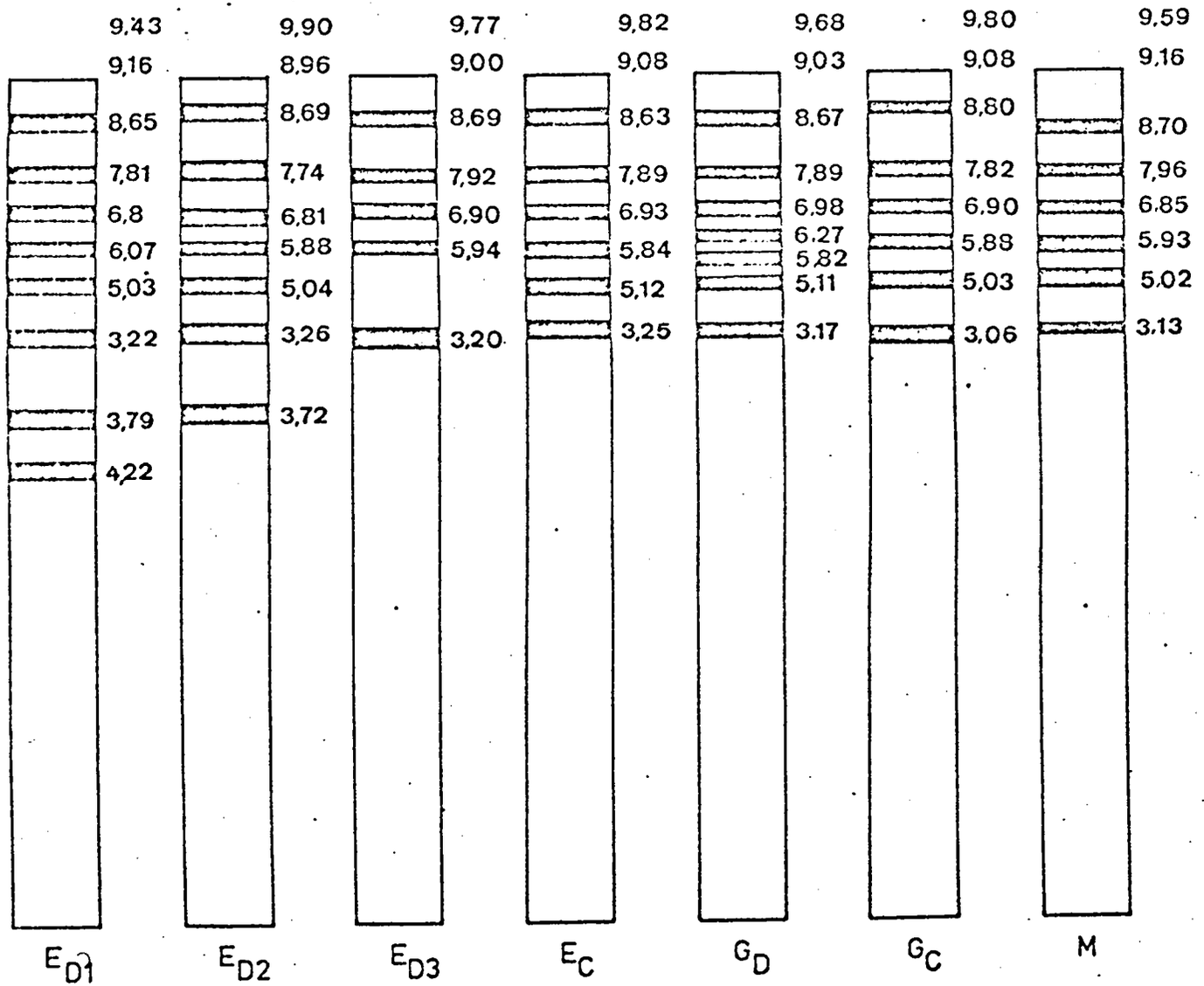



Figure 35. - Caractéristiques physico-chimiques par le pki et le Rf des isoperoxydases des formes d'*Ulex*.

TABLEAU X. - Valeurs moyennes des pki et des Rf des isoperoxydases.

| Isozymes | pki | Rf |
|---|---|---|
| $P_1$ | 3,17 | 0,31 |
| $P_2$ | 3,75 | 0,40 |
| $P_3$ | 4,22 | 0,47 |
| $P_4$ | 5,07 | 0,25 |
| $P_5$ | 5,93 | 0,20 |
| $P_6$ | 6,91 | 0,16 |
| $P_7$ | 7,87 | 0,12 |
| $P_8$ | 8,69 | 0,06 |
| $P_9$ | 9,05 | 0,42* |
| $P_{10}$ | 9,72 | 0,61* |

*Rf dans un gel acide

Les autres isozymes sont omniprésentes dans les différentes formes à l'exception des Ajoncs de Pleubian ($E_{D3}$) caractérisées par l'absence d'une isoperoxydase de pki approximatif de 5,0 ($P_4$).

On note également qu'à l'isoperoxydase $P_5$ (pki 5,9 ; Rf = 0,2) se substitue dans les formes normales Ulex gallii Pl. deux bandes isoperoxydasiques distinctes, nommées $P_{5a}$ et $P_{5b}$ définies respectivement pour $P_{5a}$ par un Rf de 0,19 et un pki de 6,26 et dans le cas de $P_{5b}$ par un Rf de 0,215 et un pki de 5,65.

Enfin, Ulex minor Roth. est remarquable par le décalage de la première bande isozymatique $P_8$ tel que nous l'avions déjà observé en électrophorèse dans un système basique.

La différence de migration de cette isoperoxydase nommée ici $P_{8a}$ doit être imputée à une différence de poids moléculaire vraisemblablement plus faible, puisque son pki est identique à celui des peroxydases homologues dans les autres formes.

De même, il est tout aussi vraisemblable que les isoperoxydases $P_2$ et $P_3$ doivent à des poids moléculaires plus faibles que celui de $P_1$ puisque malgré un pki plus basique, leurs migrations sont plus rapides dans un gel de polyacrylamide dans un système basique.

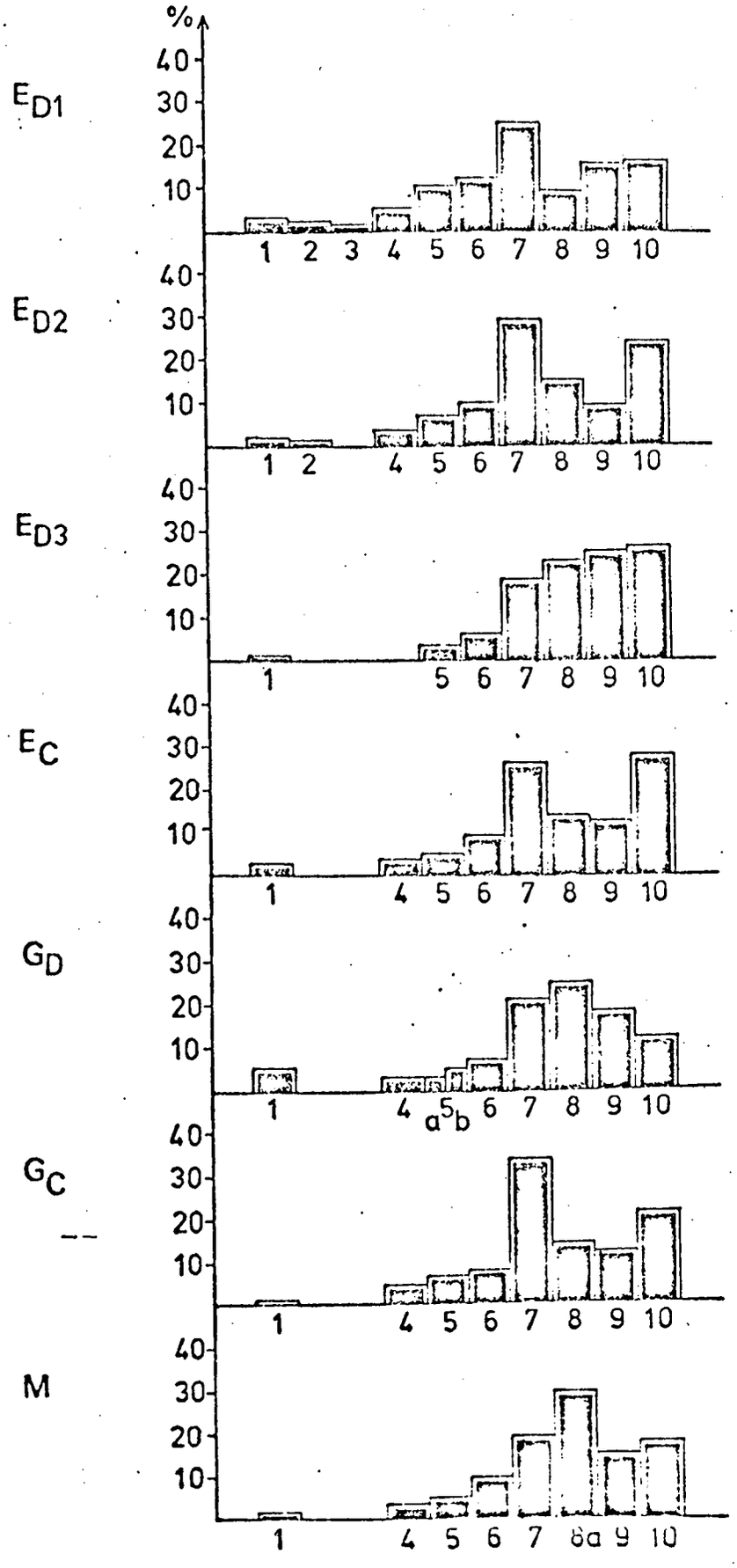



Figure 36. - Pourcentage de chaque isoperoxydase ($P_1$ à $P_{10}$) dans les formes d'*Ulex*.

Ainsi, en conclusion, le nombre d'isoperoxydases séparées par focalisation isoélectrique préparative est nettement supérieur à celui qui est apporté par électrophorèse sur disques en gel de polyacrylamide. La composition isozymatique ne présente pas non plus de différences profondes : $P_1$, $P_5$ à $P_{10}$ sont omniprésentes à l'exeption de $P_5$ chez les formes normales d'Ulex gallii Pl. et de $P_8$ chez Ulex minor Roth.

d) Analyse quantitative des isoperoxydases séparées :

Il nous a paru intéressant d'approfondir l'analyse de ces isoperoxydases par la détermination quantitative de chacune des isoperoxydases par rapport à l'activité totale testée de la colonne (Fig. 36).

Chaque forme peut, d'après l'examen de cette figure, être définie par un profil isozymatique qui permet la comparaison des formes analysées entre elles et de mieux apprécier les affinités possibles qu'elles présentent. Nous constatons ainsi les grandes similitudes que présentent les formes basses entre elles, confirmant ainsi les résultats précédents obtenus lors de l'analyse d'autres isozymes (isoleucine-aminopeptidases et isoestérases).

Une seule isozyme, $P_{10}$, peut différencier les formes basses car elle est une des isozymes majeures chez Ulex europaeus L. prostré, mais quantitativement plus faibles chez Ulex gallii Planch. également prostré.

L'isoperoxydase $P_7$ présentera de 25 à 35 % de l'activité totale et sera prépondérante chez $E_{D1}$, $E_{D2}$, $E_C$ et $G_C$ ; par contre, pour les formes dressées à Ulex gallii et à Ulex minor, ce sera $P_8$ qui représentera l'isozyme la plus importante.

Enfin, $E_{D3}$ est particulier par un profil isoperoxydasique très original par l'importance marquée des isozymes basiques.

Si l'on compare ces résultats avec ceux précédemment obtenus (protéines et enzymes) les profils protéiques et ceux des isoperoxydases montrant une nette similitude notamment pour les profils de $E_{D1}$, $E_{D2}$, $E_C$ et $G_C$ d'une part et d'autre part pour ceux de $G_D$ et de M. De même pour les traits très particuliers que présentent $E_{D3}$. On peut dire que ces profils ici, semblent davantage être déterminés par l'état physiologique de la plante et par l'influence des facteurs écologiques.

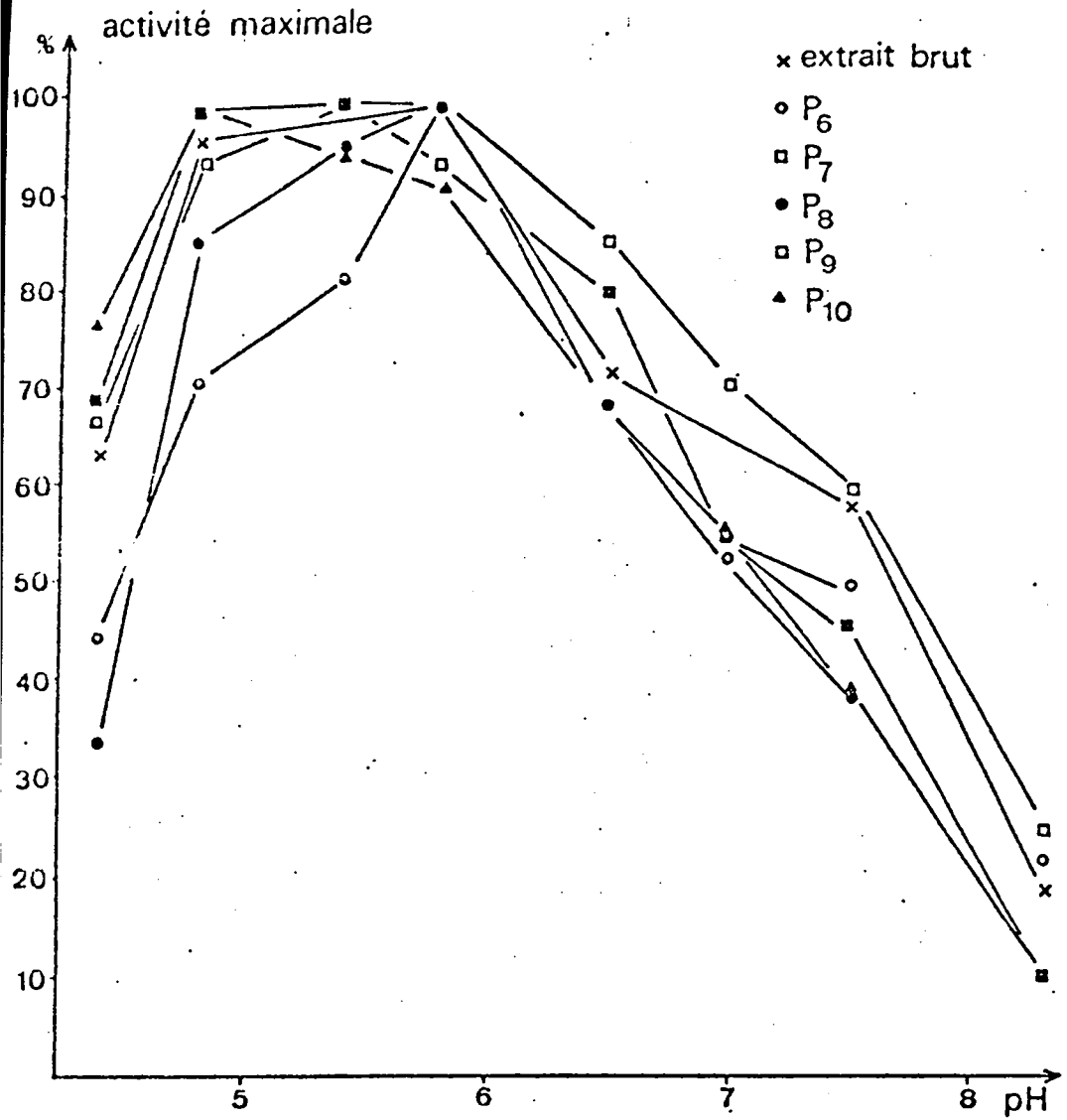



Figure 37. - Influence du pH sur l'activité péroxydasique de l'extrait brut et des isopéroxydases $P_6$ à $P_{10}$.

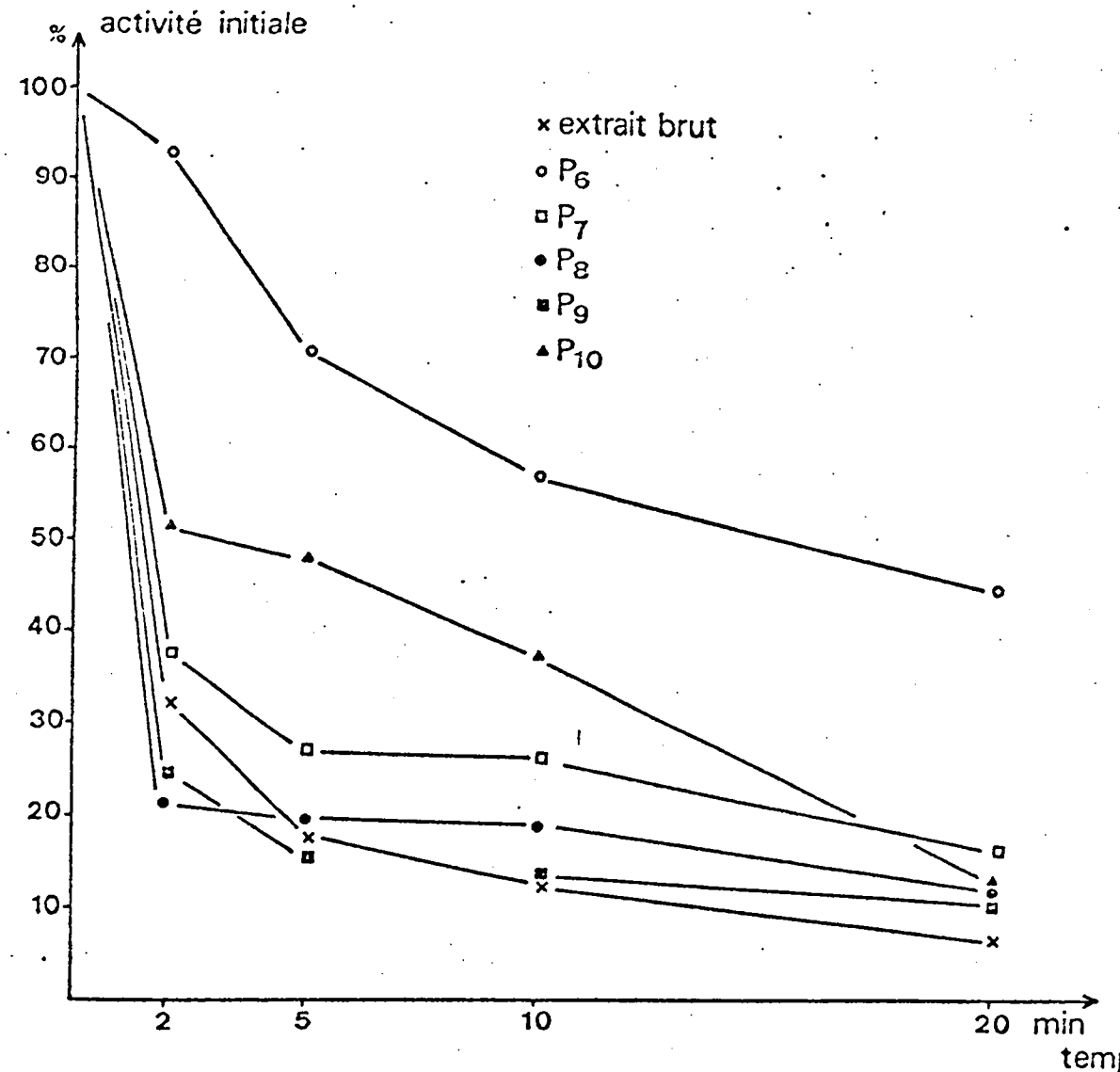



Figure 38. - Influence de la durée d'un traitement à 80°C (de 0 à 20 mn) sur l'activité péroxydasique de l'extrait brut et des isopéroxydases $P_6$ à $P_{10}$.

Au contraire, les profils issus de l'analyse des isoleucine-aminopeptidases et des isoestérases ~~xxxxxxxxxxxx~~ reflètent davantage l'activité du génotype.

e) Cinétique des isoperoxydases isolées :

La focalisation isoélectrique conduit à des fractions pures, permettant l'analyse de l'activité enzymatique. Mais nous n'avons retenu ici que l'étude des isoperoxydases $P_6$ à $P_{10}$ en raison de leur importance quantitative, Ce que les isozymes $P_1$, $P_2$, $P_3$, $P_4$ et $P_5$ ne permettaient pas, l'activité isozymatique était en effet trop faible, nous faisant atteindre ici les limites de la technique de détermination enzymatique.

- influence du pH sur l'activité enzymatique : cette influence a été étudiée sur les fractions pures des isoperoxydases $P_6$ à $P_{10}$. Les résultats sont représentés dans la figure 37 et comparés au comportement de l'extrait brut (qui correspond à la figure 29).

On n'observe pas de différences majeures entre ces isoperoxydases, le pH maximum est localisé pour les 5 isozymes entre pH 4,8 et 5,8 plateau qui a été déjà constaté pour l'extrait brut.

Pour les isoperoxydases acides ($P_6$ à $P_8$) le pH maximum est situé à pH 5,8 tandis qu'il apparaît décalées vers des valeurs plus acides pour les isoperoxydases plus basiques ($pH_{max}$ 4,8).

Cependant, ces différences demeurent moins importantes que celles notées pour les pI. Ainsi leur centre actif ne doit pas être influencé par les charges extérieures des protéines. Il en résulte que le polymorphisme que nous relevons chez les peroxydases est indépendant d'une variation de l'activité isoperoxydasique par rapport à l'influence du pH.

- influence de la température sur l'activité enzymatique des isoperoxydases : comme nous l'avons précédemment recherchée dans l'extrait brut, l'influence de la température sur l'activité enzymatique des isoperoxydases est étudiée en soumettant les isozymes isolées à un traitement à 80°C pendant des temps variables de 2 à 20 minutes (figure 38). Des différences considérables entre ces isoperoxydases analysées sont observées. Certaines sont assez thermolabiles (elles ne possèdent plus que 20 % de leur activité initiale après 2 mn à 80°C ($P_8$ et $P_9$). Mais cette activité résiduelle peut se maintenir

après 20 mn à 80°C. Par contre, d'autres isozymes perdent relativement peu d'activité après des traitements plus brefs (2 à 5 mn à 80°C), mais cette activité diminue et correspond finalement à 15 % de l'activité initiale après un traitement plus long ($P_{10}$). L'isopéroxydase la plus thermostable est $P_6$ : après deux minutes à 80°C, 93 % de l'activité initiale persistent et même après 20 minutes 45 % de l'activité initiale peuvent encore être mesurés.

Les isoperoxydases sont donc plus ou moins thermostables selon les isozymes considérées, mais les différences relevées ici apparaissent plus complexes que celles constatées précédemment chez les isoestérases. Chez ces dernières, thermostabilité et pki étaient en liaison directe et les isozymes les plus thermostables apparaissaient dans les formes plus au sud de la Bretagne.

Ici il faut considérer que les peroxydases sont des enzymes à fonctions multiples dont la cinétique est influencée par les changements de substrats.

C'est pourquoi nous avons examiné les réactions des peroxydases en présence d'un autre substrat qui présente dans notre étude un certain intérêt : hormone de croissance ou acide-3-indolylacétique (AIA).

3 - Activité AIA - oxydasique des isoperoxidases :

Les AIA-oxydases sont des enzymes qui dégradent l'acide 3-indolylacétique et qui interviennent dans la régulation de la croissance. Cette activité est souvent associée à une activité peroxydasique. Quelques auteurs ont réussi à séparer ces deux activités (143) mais généralement ces tentatives ont échoué ( 29, 39, 55, 65, 147, 153 ). L'éventualité d'une enzyme à deux centres actifs est évoquée par l'oxydation de l'AIA est réalisée en l'absence d'$H_2O_2$, substrat très spécifique pour l'activité peroxydasique. ENDO ( 37 ) montre par exemple, que l'apoenzyme de la peroxydase (sans hème) a perdu l'activité peroxydasique mais possède encore une activité AIA-oxydasique.

Dans le cadre de notre étude, nous avons retenu la détermination de l'activité AIA-oxydasique des isoperoxydases isolées par rapport à leur activité peroxydasique.

a - comparaison des taux de purification des peroxydases et d'AIA-oxydase : l'activité relevée AIA-oxydasique est relativement faible dans les tissus chlorophylliens examinés. Ceci peut s'expliquer par la nature du matériel végétal qui n'est pas en période de forte croissance et qui est déjà lignifié.

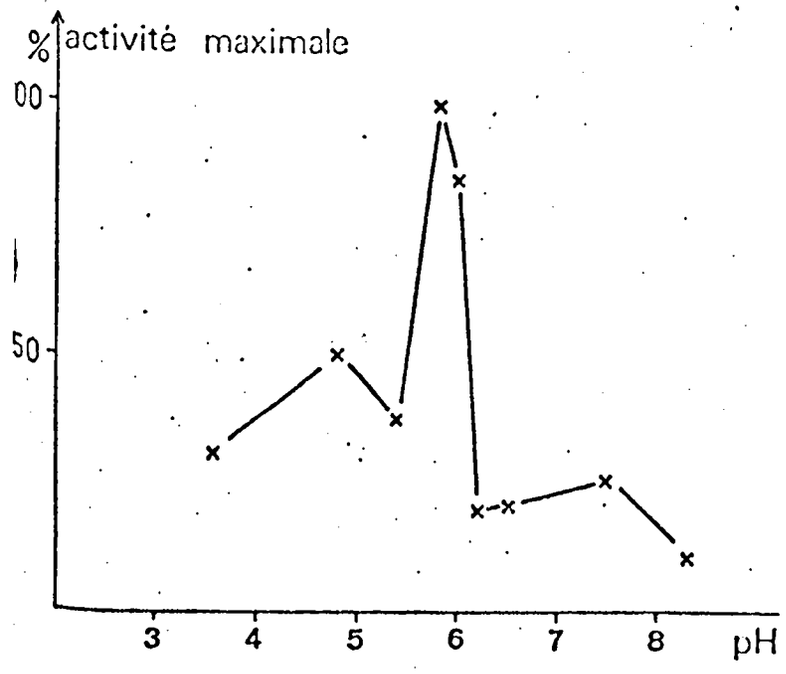



Figure 39. - Influence du pH sur l'activité AIA-oxydasique de l'extrait brut d'*Ulex*.

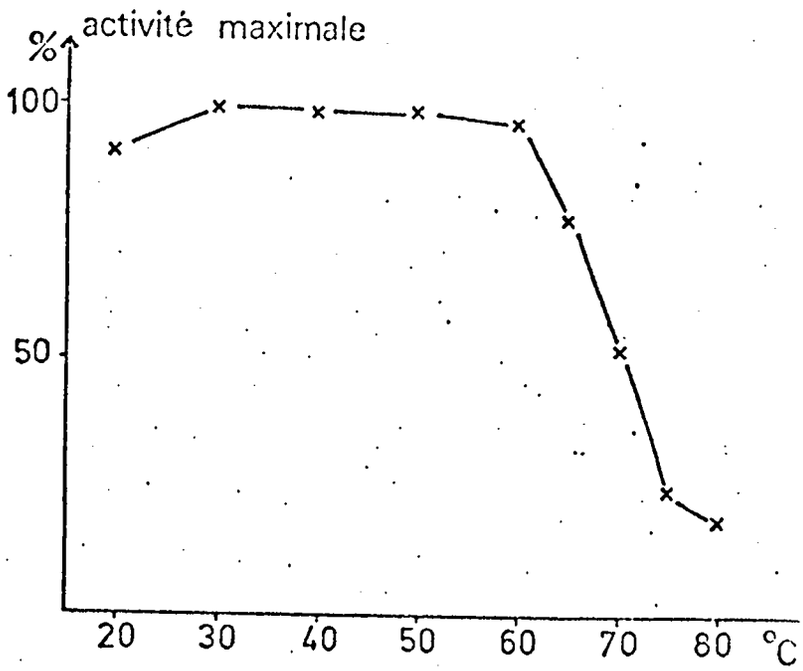



Figure 40. - Influence de la température (prétraitement de 5 mn sur l'activité AIA-oxydasique de l'extrait brut d'*Ulex*).

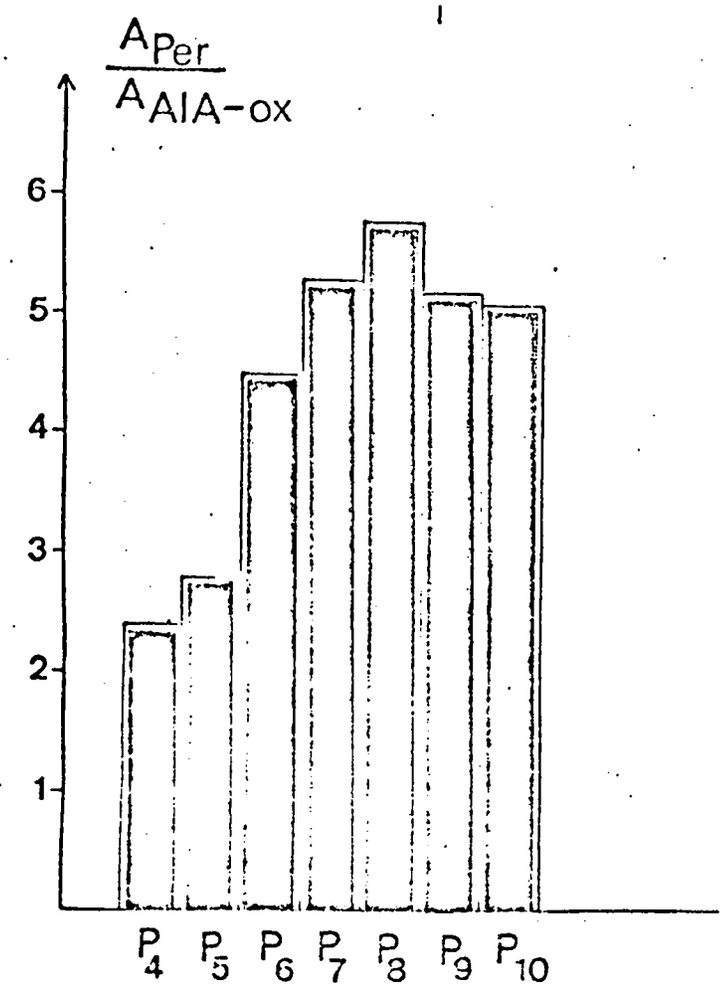



Figure 41. - Comparaison du rapport activité péroxydasique/activité AIA-oxydasique, des isopéroxydases $P_4$ à $P_{10}$.

Cette faible activité est certainement à la base de notre impuissance à localiser ces AIA-oxydases sur les gels de polyacrylamide. Nous n'avons pu la déterminer que par un essai photométrique, ce qui ne précise pas si sur un gel cette activité AIA-oxydasique coïncide avec l'activité peroxydasique.

C'est pourquoi, la détermination des taux de purification des deux enzymes était précieuse à établir. Ces résultats permettent effectivement de supposer que ces deux activités sont associées : le tableau XI montre que les AIA-oxydases sont purifiées dans les mêmes proportions que les peroxydases. Le rapport activité peroxydasique/activité AIA-peroxydasique reste inchangé au cours de la purification de l'activité peroxydasique.

| | Activité totale (µmole/min) | | |
|---|---|---|---|
| | PER | AIA-ox. | $A_{Per} / A_{AIA-Ox.}$ |
| extrait brut | 11,7 | 1,17 | 10 |
| extrait purifié | 47,0 | 5,40 | 8,7 |

| | Activité spécifique (µmole/mg · min) | |
|---|---|---|
| | PER | AIA-ox. |
| extrait brut | 1,35 | 0,37 |
| extrait purifié | 20,30 | 14,90 |
| Taux de purification | 15 | 17 |

Tableau XI. - Taux de purification des activités peroxydasique et AIA-oxydasique.

Ainsi dans l'extrait purifié les deux activités enzymatiques se trouvent au même stade de purification par rapport à l'extrait brut. De plus, l'extrait purifié manifeste les mêmes proportions d'activité.

*b* - <u>influence du pH sur l'activité AIA-oxydasique dans l'extrait brut</u> : cette influence a été recherchée. L'enzyme possède un pH maximum très important à pH 5,8 (fig. 39) et son activité montre une grande sensibilité aux variations de pH vers des valeurs basiques. Ainsi dès un pH 6,2, c'est à dire

à 0,4 unité de pH du pH max., on ne retrouve plus que 20 % de l'activité maximum. L'existence d'un deuxième maximum, nettement plus faible, à pH 4,8 indique déjà la présence d'isozymes.

Cette courbe a été comparée à celle de l'activité peroxydasique (figure 29), aucune ressemblance n'apparaît.

c - <u>influence de la température sur l'activité AIA-oxydasique dans l'extrait brut</u> : l'extrait brut est soumis 5 mn à différentes températures. L'activité enzymatique est assez stable jusqu'à une température de 60°C (figure 40) puis pour des températures supérieures à 60°C, l'activité enzymatique est rapidement détruite.

Ces courbes sont comparées aux courbes établies avec les peroxydases (figure 30). Le comportement des deux activités enzymatiques est totalement différent. Ainsi, par exemple, l'activité peroxydasique manifeste encore 50 % de l'activité maximum après 5 mn à 80°C, l'activité AIA-oxydasique, dans les mêmes conditions ne présente plus que 20 % de l'activité maximum.

Ces résultats ne permettent pas d'établir des conclusions parce que nous avons dans chaque cas, analysé un mélange d'isozymes dont chacune doit posséder un comportement différent et spécifique.

d - <u>analyse des isozymes isolées</u> : elle a été entreprise dans le but de mettre en évidence l'activité AIA-oxydasique. Pour cela, nous avons déterminé l'activité AIA-oxydasique des isoperoxydases.

De toute évidence, ces isoperoxydases possèdent une activité AIA-oxydasique puisque la même molécule protéique catalyse deux réactions enzymatiques différentes et ici, cette molécule protéique (isoperoxydases) est, après focalisation isoélectrique préparative, nettement purifiée (comparée à l'extrait brut, nous avons pu estimer le taux de purification à 500 fois !). Cependant la contamination des fractions par les Ampholines, ne permet pas la détermination de la concentration protéique dans les éluats obtenus après focalisation isoélectrique, ni par conséquent la comparaison des activités spécifiques de chaque isozyme. Aussi, envisagerons-nous uniquement les rapports d'activités.

Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 41. Seules les isozymes $P_1$ à $P_3$ qui présentent une activité très faible ne sont pas examinées.

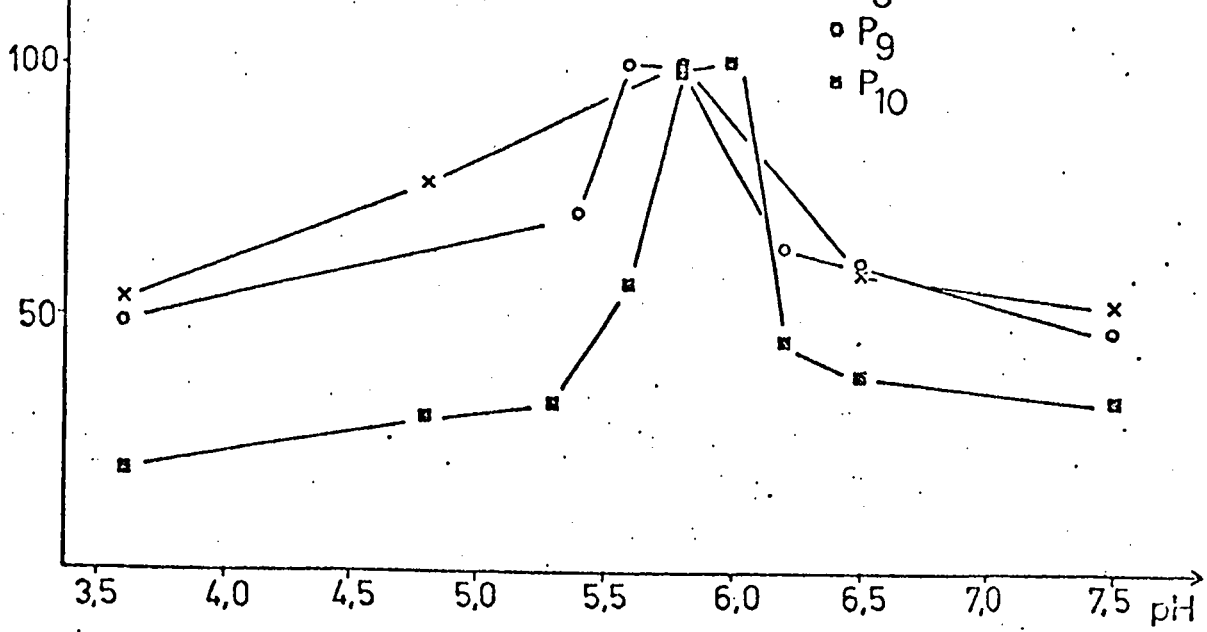



Figure 42. - Influence du pH sur l'activité AIA-oxydasique des isoperoxydases $P_8$ à $P_{10}$.

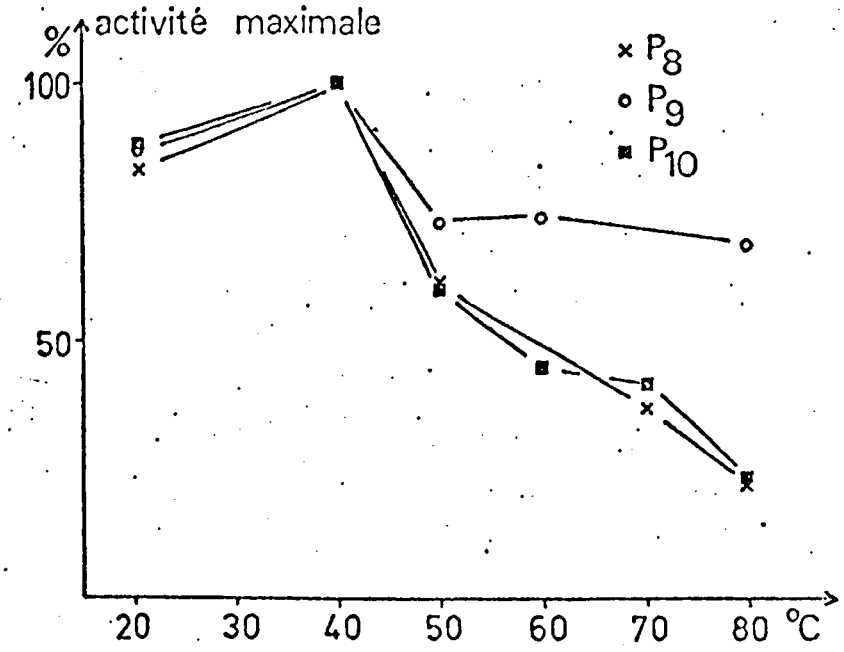



Figure 43. - Influence de la température (prétraitement de 5 mn) sur l'activité AIA-oxydasique des isoperoxydases $P_8$ à $P_{10}$.

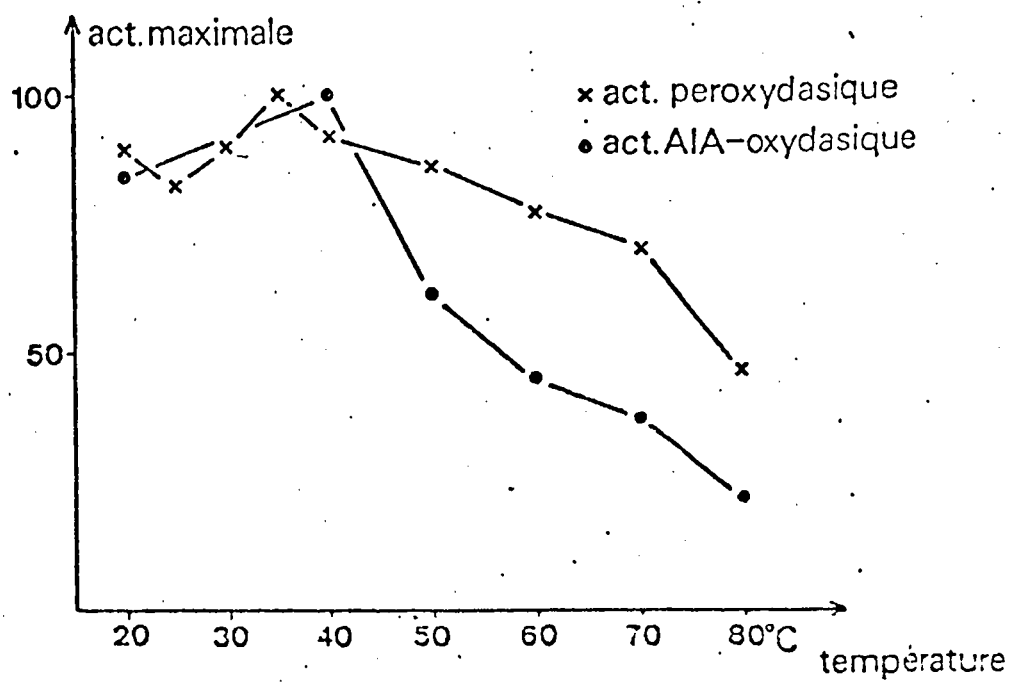



Figure 44. - Comparaison de l'influence de la température (prétraitement de 5 mn) sur l'activité péroxydasique et l'activité AIA-oxydasique de l'isoperoxydase $P_9$.

Les isozymes définies par un pki très basique ($P_8$, $P_9$ et $P_{10}$) ne diffèrent guère. Elles présentent 5 à 6 fois plus d'activité peroxydasique que d'activité AIA-oxydasique.

Mais au fur et à mesure que les valeurs des pki deviennent acides, l'activité peroxydasique diminue : ainsi pour l'isozyme $P_4$ (pki 5,07) cette activité peroxydasique n'est plus que 2,4 fois plus forte que l'activité AIA-oxydasique.

Le comportement ~~spécifique~~ de chacune des isozymes est ~~variable~~ spécifique, elles interviennent différemment dans la dégradation de l'acide B-indolylacétique. Les ~~est~~ plus efficaces étant les isozymes "acides".

L'importance de chaque isozyme dans le métabolisme cellulaire exige une meilleure connaissance de leur localisation intracellulaire. On peut se demander si cette localisation est spécifique pour chaque isozyme et si ainsi les isoperoxydases plus efficace dans l'oxydation de l'AIA ($P_4$ ou $P_5$) sont importantes dans le métabolisme malgré leur quantité faible.

e) Cinétique des isozymes :

L'influence du pH et de la température sur l'activité AIA-oxydasique des peroxydases $P_8$, $P_9$ et $P_{10}$ est analysée afin de mieux comprendre la réaction d'oxydation de l'acide β-indolyacétique et de la comparer à celle des isoperoxydases.

- influence de la température : les trois isoperoxydases montrent une activité maximum après 5 minutes à 40°C. (fig. 43) Cette activité diminue considérablement dès 50°C et pour $P_8$ et $P_{10}$ il ne reste plus que 20 % de l'activité maximum, après 5 minutes à 80°C. L'isozyme $P_9$ est plus stable et garde dans les mêmes conditions encore 70 % de son activité maximum.

Ce comportement indique que les activités peroxydasique et AIA-oxydasique d'une même isozyme diffèrent considérablement.

Nous avons comparé (figure 42) les deux activités de isoperoxydase $P_8$ soumise à l'influence d'un traitement thermique. L'activité peroxydasique apparaît nettement plus thermostable que l'activité AIA-oxydasique.

- <u>influence du pH</u> : Les isoperoxydases $P_8$, $P_9$ et $P_{10}$ montrent un pH maximum situé à pH 5,8. Ce maximum est plus ou moins prononcé selon les isoperoxydases. L'isoperoxydase $P_{10}$ présente un pH maximum très étroit situé entre pH 5,8 et 6,0. Comme dans l'extrait brut, l'activité à pH 6,2 n'est plus que 50 % de l'activité maximale.

Les isoperoxydases $P_8$ et $P_9$ sont moins sensibles aux changements de pH.

Ainsi, pour ces trois isoperoxydases, le pH maximum est d'autant plus prononcé que le pki de l'isozyme est plus basique.

L'étude de l'influence du pH sur les deux activités ~~isozymatiques~~ enzymatiques montre ici aussi la faiblesse de leurs ressemblances (figure 37).

En conclusion, l'examen de l'ensemble de ces résultats nous conduit à émettre l'hypothèse de l'existence de deux centres actifs chez ces isoperoxydases (37) : l'un à affinité importante pour $H_2O_2$ comme substrat ; l'autre catalyse l'oxydation de certains composés, tel l'AIA, en absence d'$H_2O_2$.

BU LILLE

4) <u>L'inhibiteur de peroxydases</u> :

C'est par pur hasard, et apparemment sans aucun lien avec nos préoccupations que la présence d'un inhibiteur de l'activité peroxydasique a été soupçonnée dans les extraits bruts des tissus chlorophylliens.

L'intervention d'inhibiteurs de l'activité peroxydasique n'est pas une idée nouvelle ( , 34, 100, 117) bien que leur nature biochimique ne soit pas nettement définie : la présence d'un inhibiteur est signalée dans la gousse des Anthyllis (34) sa nature chimique ici aussi n'a pas été élucidée.

PARISH ($X_3$ 117 100 ) constate la présence de composés fluorescents dans les feuilles de blé qui influencent l'oxydation de l'AIA par les peroxydases du Raifort. Un inhibiteur, à caractère protéique, est reconnu au cours de la maturation des mangues par MATTOO et MODI ( 100 ), son influence sur les peroxydases présentes dans un même tissu est analysée.

Nous avons également remarqué, dans les tissus chlorophylliens, la manifestation d'une activité inhibitrice. Aussi avons-nous envisagé de déterminer la nature d'un inhibiteur localisé dans les mêmes tissus que les peroxydases et les modalités de son action sur ces peroxydases.

a-Mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur : C'est au cours des contrôles de la persistance d'une activité peroxydasique à l'issue des différentes étapes de purification, qu'une anomalie a été observée. En effet, cette activité est contrôlée pour différentes valeurs du pH (pH 4,8 et pH 7,0) dans l'extrait brut, dans le premier précipité ($P_1$) par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation, dans le surnageant $S_1$ (le précipité était repris par un tampon Tris HCl, 0,1 M, pH 7,5).

Les résultats de ces contrôles sont rapportés dans le tableau XII. L'activité peroxydasique mesurée est exprimée en µmole/minute.

| | Activité peroxydasique (exprimée en µmole/ml.min.) | |
|---|---|---|
| | pH 4,8 | pH 7,0 |
| Extrait brut | 54,70 | 30,60* |
| Précipité $P_1$ | 2,81 | 1,03 |
| Surnageant $S_1$ | 50,30 | 44,40 |
| $P_1$ + $S_1$ | 53,11 | 45,43 |
| $P_1$ + $S_1$(%) | 97 % | 148 % |

Tableau XII. - Comparaison de l'activité peroxydasique pendant la purification à des pH différents.

* Le pH maximum se situe entre pH 4,8 et pH 5,8 ; de ce fait l'activité mesurée sera évidemment plus forte à pH 4,8 qu'à pH 7,0 pour le même extrait brut.

Nous constatons que l'activité mesurée dans l'ensemble "précipité - surnageant" est nettement plus élevée (148 %) que dans l'extrait brut à pH 7,0.

L'hypothèse de la présence dans l'extrait d'un composé inhibiteur précipitable par le sulfate d'ammonium et inactif à pH 4,8 est dès lors envisagée.

Cette hypothèse peut être vérifiée en reprénant l'expérience en sens inverse c'est à dire en ajoutant de faibles fractions du précipité au surnageant. L'activité est mesurée à pH 7,0 (si aucune précision n'est donnée, tous les dosages seront effectués selon cette valeur du pH). Les résultats de ces mesures sont consignés dans le tableau XIII ; l'activité peroxydasique est exprimée en µmole/ml./mn.

| | Activité peroxydasique (µmole/ml. mn) |
|---|---|
| P | 0,206 |
| S | 0,320 |
| P + S | 0,365 = 65 % de l'activité théorique. |

Tableau XIII : Mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur.

Cette expérience confirme la présence d'un pouvoir inhibiteur. La nature et les modalités de son action doivent être élucidées.

β-Nature de l'inhibiteur : Puisque ce composé précipité par le sulfate d'ammonium et est très sensible aux changements de pH, on peut supposer que sa nature est protéique.

Dans cette hypothèse, il est possible qu'il s'agisse d'une substance réellement inhibitrice ou d'une enzyme qui utiliserait le(s) même(s) substrat(s) que les peroxydases d'où le ralentissement de la réaction peroxydasique. Dans le cas des peroxydases les deux substrats sont possibles : le gaiacol et l'eau oxygénée.

PÜTTER (T21)

- le gaiacol : selon (44) le gaiacol a une spécificité très marquée pour les peroxydases ; il n'est donc pas oxydé par d'autres enzymes, phénoloxydases, par exemple. Mais une telle oxydation ne peut pas être responsable de la diminution du changement de densité optique par minute. En effet, la mesure de l'activité peroxydasique est basée sur le développement d'une coloration due à la formation d'un produit d'oxydation du gaiacol. Ainsi, des mesures de contrôle sont effectuées en l'absence d'$H_2O_2$, aucun changement de densité optique n'est observé.

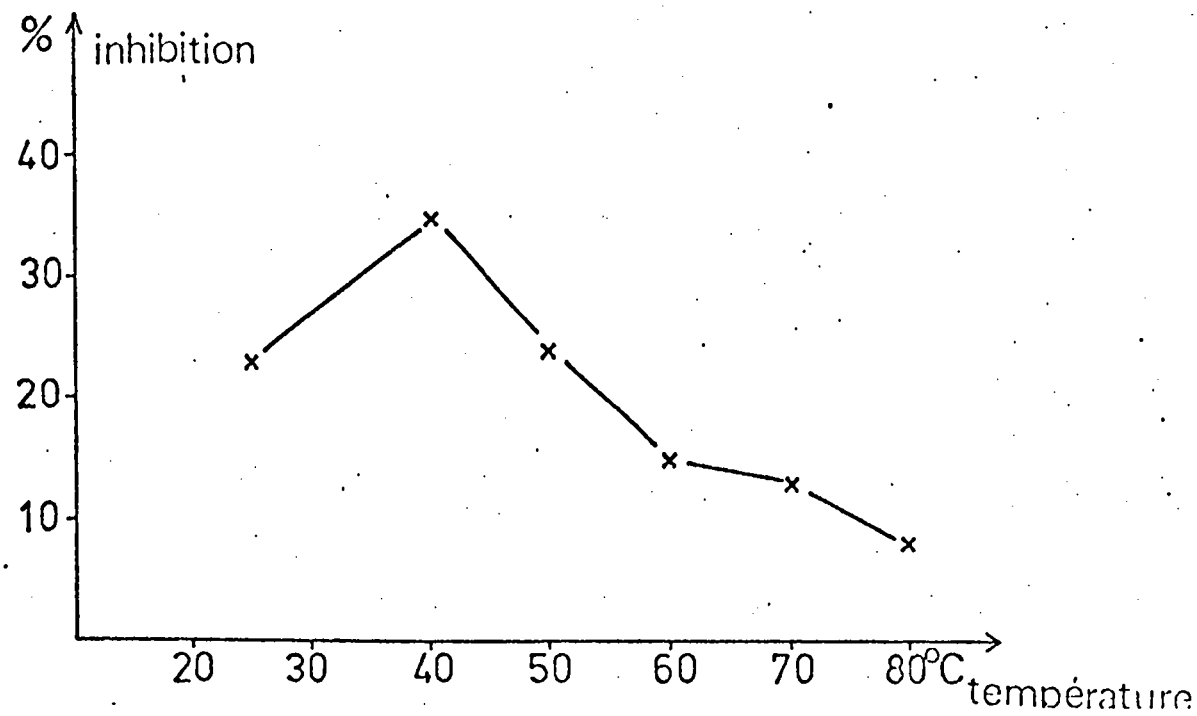



Figure 45. - Influence de la température (prétraitement de 5 mn) sur la capacité inhibitrice du $P_1$ sur l'activité peroxydasique de l'extrait brut d'Ulex.

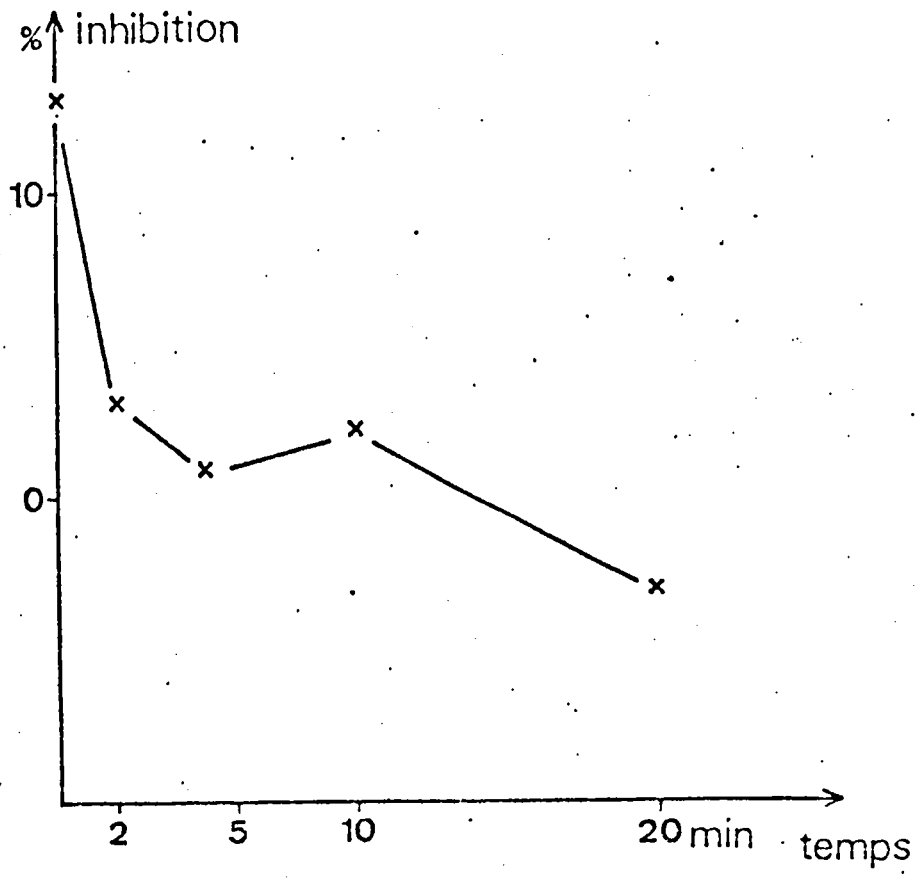



Figure 46. - Influence de la durée d'un traitement à 80°C (de 0 à 20 mn) sur la capacité inhibitrice de P1 inhibant l'activité peroxydasique de l'extrait brut d'Ulex.

- $H_2O_2$ : l'hypothèse que l'inhibiteur serait une catalase utilisant l'eau oxygénée du milieu est retenue. Un essai basé sur la disparition de $H_2O_2$ ce qui peut être suivie à 240nm (T21 4), ne met en évidence aucune activité catalasique dans l'extrait brut, ni dans le précipité.

De même dans les conditions de l'essai peroxydasique, nous n'observons aucune destruction de $H_2O_2$ en absence du gaiacol.

Ainsi, par ces déterminations, l'hypothèse du caractère protéique de l'inhibiteur peut être retenue. Afin de l'étayer davantage, nous avons étudié l'influence de la température sur ce pouvoir inhibiteur.

L'inhibiteur manifeste une activité maximum à 40°C (figure 45) et cette activité diminue rapidement pour des valeurs plus élevées. Mais, la possibilité d'une inhibition persiste après 5 minutes à 80°C. Nous avons mesuré le pouvoir inhibiteur résiduel après des traitements prolongés à 80°C, ainsi après 20 minutes à 80°C, tout inhibition a disparue (Figure 46).

Le dernier critère envisagé dans le but de prouver la nature protéique de l'inhibiteur est l'influence du pH sur cette activité (figure 47). L'activité maximum est comprise entre pH 6,5 et pH 7,0. Pour des valeurs du pH proches de 4,8, une ~~légère~~ légère action inhibitrice est encore présente ; mais au-dessus de pH 7,5, l'inhibiteur est inactif.

C-Action de l'inhibiteur : L'action de l'inhibiteur est recherchée dans l'extrait brut, dans une préparation partiellement purifiée de peroxydases, dans les éluats obtenus par focalisation isoélectrique.

- inhibition de l'extrait brut : une faible inhibition peut être relevée dans l'extrait brut. Elle persiste si, lors de l'essai enzymatique, le précipité est ajouté à l'extrait brut (figure 48).
Nous constatons que la réaction enzymatique de l'extrait brut est ralentie en présence de l'inhibiteur sans que la vitesse initiale soit influencée.

- inhibition d'une préparation partiellement purifiée de peroxydases (P3) : Des quantités variables de l'inhibiteur (préparation P4) sont

* *Dans ces expériences il ne faut pas oublier que nous ne possédons pas de mesures directe pour évaluer la concentration de l'inhibiteur. Il s'agit de préparation effectuées à partir de divers extraits bruts où le volume du précipité correspond chaque fois au même poids de tissu végétal. De plus dans chaque cas il est nécessaire de déterminer l'activité peroxydasique exacte dans le précipité.*

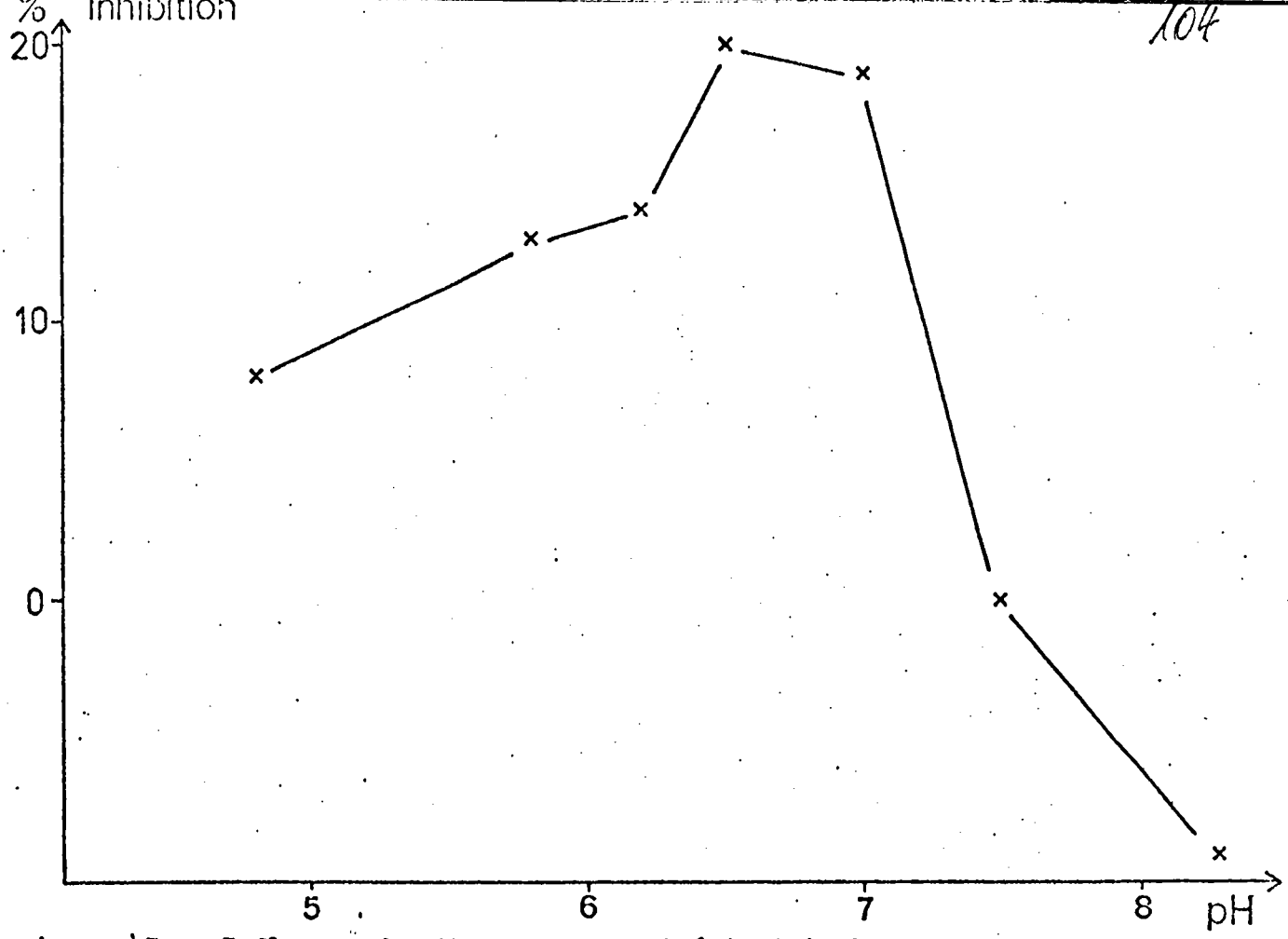



Figure 47. - Influence du pH sur la capacité inhibitrice de P1.

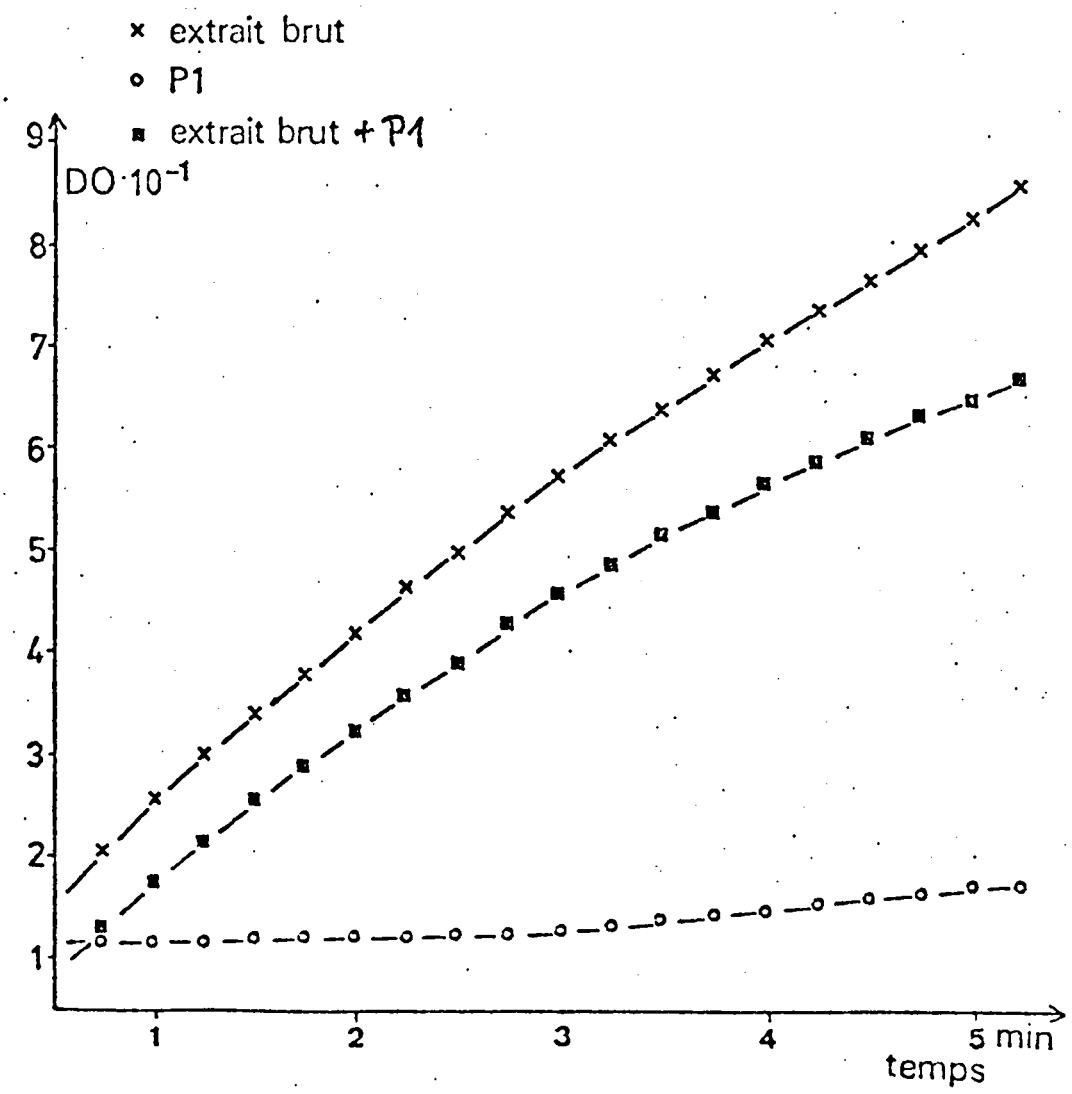



Figure 48. - Activité peroxydasique de l'extrait brut (+—), de P1 seul (o—) et de P1 + extrait brut (▪ —). Changement de densité optique pendant 5 mn.

ajoutés à la préparation partiellement purifiée de peroxydases (P3). Nous constatons que le rapport entre la concentration en inhibiteur n'est pas linéaire à l'inhibition mais conduit vers un état de saturation (figure 49).

Inhibition des isoperoxydases isolées par focalisation isoélectrique: cette inhibition peut être testée par addition de quantités égales d'inhibiteur aux éluats obtenus par focalisation isoélectrique. Ainsi les pourcentages d'inhibition établis pour chacune des isozymes sont consignés dans le tableau XIV ci-après :

| Isozyme | Inhibition |
|---|---|
| $P_6$ | 63 % |
| $P_7$ | 52 % |
| $P_8$ | 52 % |
| $P_9$ | 56 % |
| $P_{10}$ | 49 % |

Tableau XIV. - Inhibition des isoperoxydases (exprimée en pourcentage).

L'action de l'inhibiteur sur les isozymes ne montre pas de différences fondamentales entre chacune d'elles. L'addition de quantités croissantes d'inhibiteur aux isozymes ne modifie pas, comme cela a aussi été constaté dans l'extrait brut, la vitesse initiale de la réaction mais ralentit beaucoup plus rapidement la réaction. L'exemple de $P_{10}$ (figure 50) est ici rapporté. La réaction semait identique si nous avions considéré l'exemple d'autres isoperoxydases telles $P_6$, $P_7$, $P_8$ ou $P_9$.

CONCLUSIONS.

Un inhibiteur des peroxydases est reconnu dans les tissus chlorophylliens des Ajoncs, ses propriétés nous conduisent à proposer une structure protéique. En effet :

a) il est précipité par le sulfate d'ammonium ;

b) il est sensible aux variations de pH ;

c) il est inactivé par un traitement à des températures élevées.

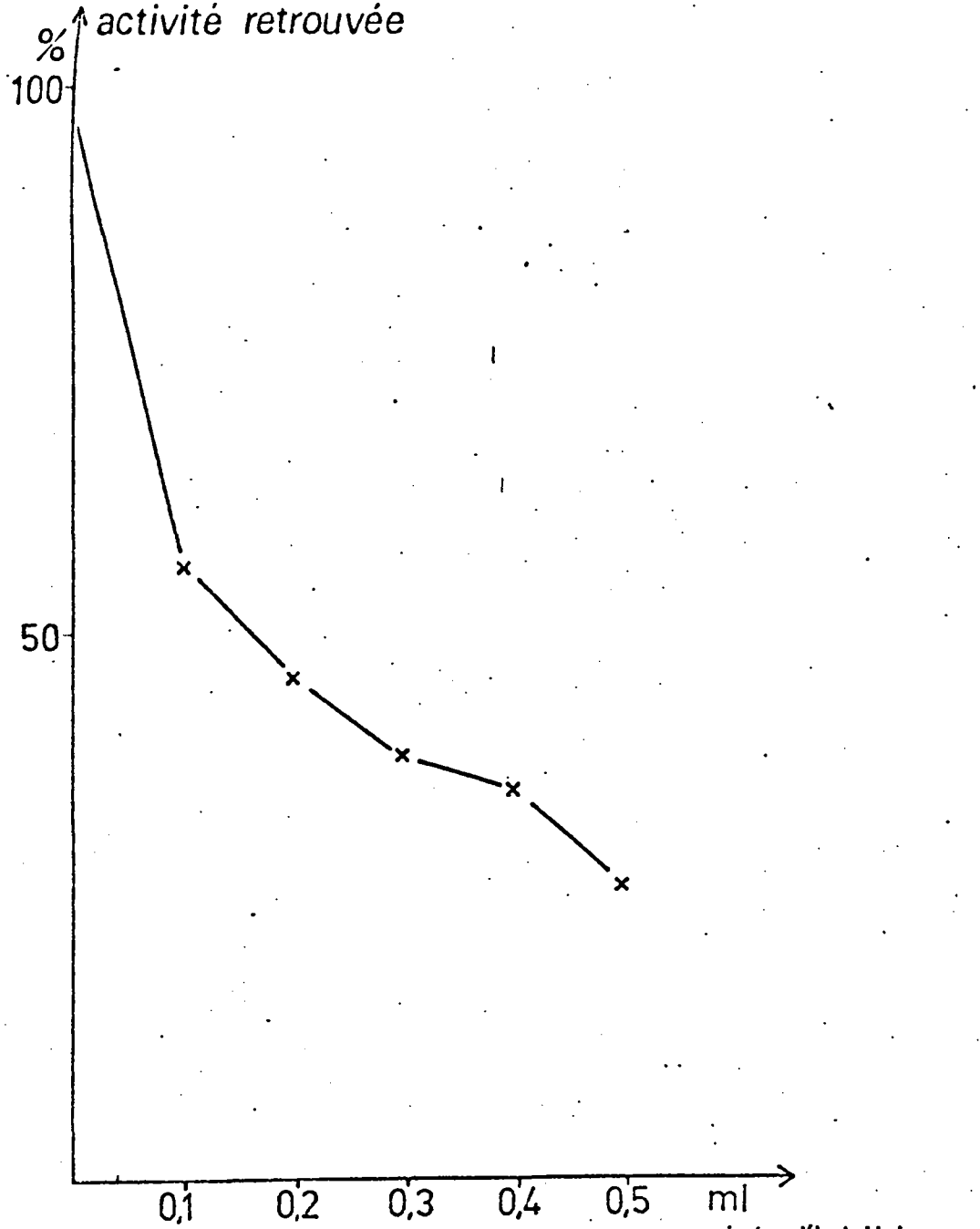



Figure 49.

Influence de la quantité d'inhibiteur sur l'activité peroxydasique.

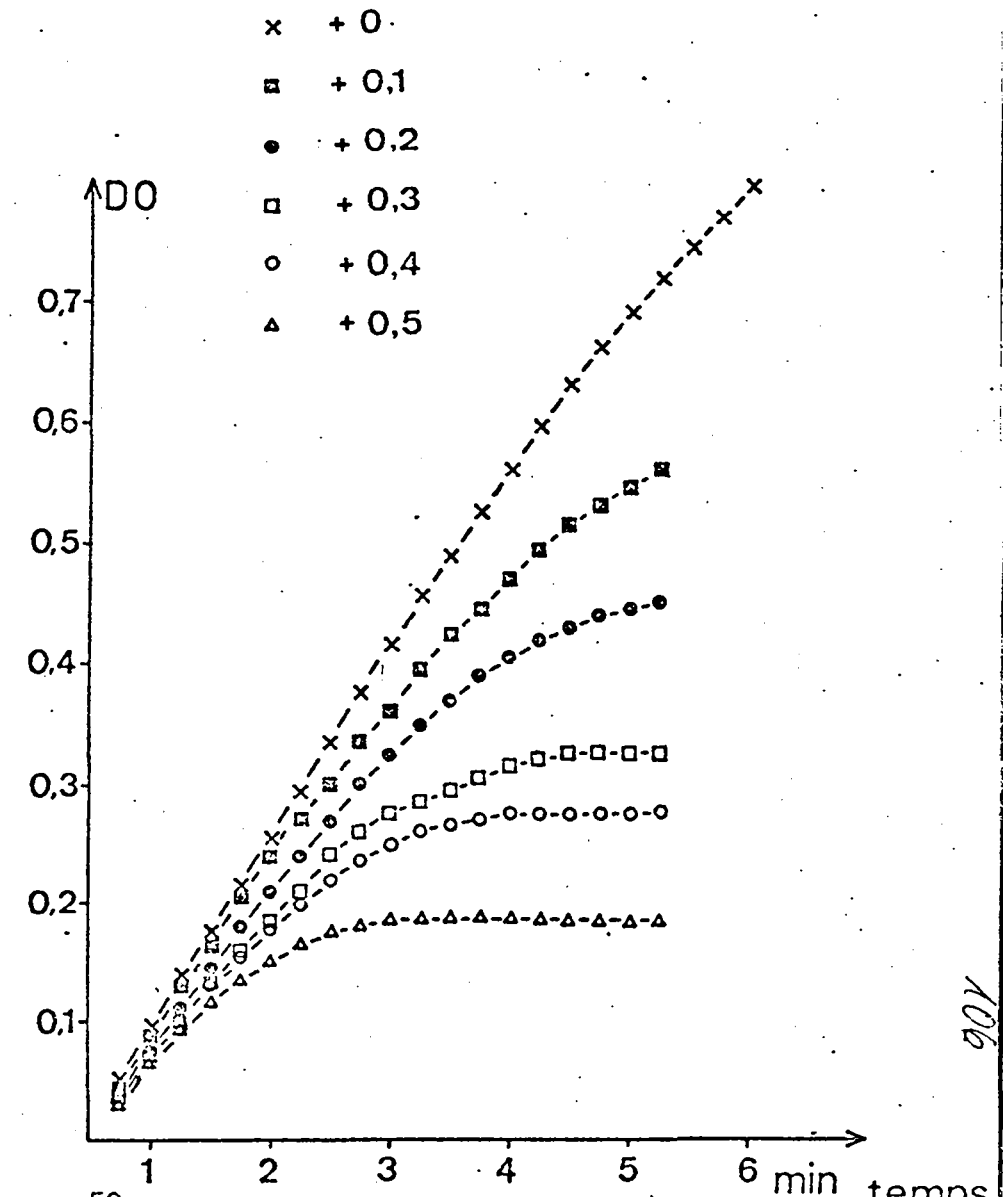



Figure 50.

Influence de la quantité d'inhibiteur (de 0 à 0,5 ml) sur l'activité peroxydasique de l'isoperoxydase $P_{10}$.

Il semble que par les caractères de son activité, ce composé intervienne comme un inhibiteur non-compétitif, il ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour ses différents substrats, mais ralentit considérablement la réaction enzymatique.

Il est possible que cet inhibiteur contrôle les peroxydases en s'y associant. Ceci rend plus complexe l'analyse de ces enzymes à fonctions multiples, puisque l'activité enzymatique in vivo n'exprime pas le niveau d'activité in vitro.

Mais ici, à ce stade de notre travail où nous ignorons sa nature exacte, dès nous est impossible de définir sa fonction. Nous pouvons cependant souligner l'identité de son action sur toutes les isozymes majeures des Ajoncs. Il est certain que la détermination exacte de sa nature sera d'autant plus intéressante à établir qu'il intervient dans le contrôle de l'activité des péroxydases qui interviennent elles-même en contrôlant divers processus : croissance, lignification, etc...

Ainsi, des études plus précises apporteront certainement des indices nouveaux sur les mécanismes de contrôle du métabolisme cellulaire. A ce propos, il estintéressant de rappeler qu'inhibiteur et peroxydases présentent les mêmes localisations. Ceci laisse supposer une intervention certaine de la compartimentation cellulaire entre ces deux molécules.

5 - Inhibition de l'activité AIA-oxydasique :

Dans l'hypothèse que les peroxydases possèderaient deux centres actifs, l'un à activité peroxydasique, l'autre à activité AIA-oxydasique, il s'est avéré intéressant d'envisager la possibilité d'une inhibition de l'activité AIA-oxydasique par cet inhibiteur.

Au stade de purification P3, une inhibition de 70 % de l'activité AIA-oxydasique est observée, or, dans les mêmes conditions l'activité peroxydasique sera plus faiblement inhibée (30 %) indiquant ainsi que l'action inhibitrice est plus élevée au niveau de l'activité AIA-oxydasique. Il s'est avéré nécessaire de comparer également l'inhibition de l'activité peroxydasique qui se situe chez les isoperoxydases entre 50 et 60 %. Ainsi ces valeurs demeurent encore inférieures à celles que nous avons estimées lors de la détermination de l'inhibition de l'activité AIA-oxydasique (tableau XV).

| Isozyme | Inhibition |
|---|---|
| $P_7$ | 70 % |
| $P_8$ | 73 % |
| $P_9$ | 74 % |
| $P_{10}$ | 74 % |

Tableau XV. - Inhibition de l'activité AIA-oxydasique des isoperoxydases.

Cet inhibiteur affecte donc plus fortement l'activité AIA-oxydasique que l'activité peroxydasique.

C. - DISCUSSION.

Par l'ensemble de nos résultats, l'hétérogénéité des peroxydases est confirmée : 10 isoperoxydases sont isolées dans un même tissu. Il est surprenant de constater en fonction d'un polymorphisme aussi étendu, l'absence de différences majeures entre les différentes formes analysées. Aussi, sur ce point, nos observations ne concordent pas avec celles de SMITH et al. (148) qui n'ont pu caractériser aucune bande commune isoperoxydasique en fonction d'une importante variation interspécifique chez 61 espèces de Nicotiana.

Sans aucun doute, il faut prendre en considération le fait que les espèces analysées sont proches par leur origine et par les aires qu'elles occupent. Ainsi :

- les deux formes du Pas-de-Calais ($E_{D1}$ et $E_{D2}$) sont très proches l'une de l'autre par la distribution qualitative et quantitative des isoperoxydases ;
- les deux formes basses d'Ulex europaeus L. et d'Ulex gallii Planch. sont également proches de ce groupe.

La comparaison des isoperoxydases conduit à des profils isoperoxydasiques qui présentent de grande similitude avec les profils issus de l'analyse des protéines solubles qu'illustre par exemple le comportement de $E_{33}$ qui s'éloigne ainsi de toutes les autres formes, le comportement également des formes normales d'Ulex gallii Pl. et d'Ulex minor Roth. qui semblent assez proches les unes des autres ; enfin le comportement des formes normales et basses de l'Ajonc de LE GALL qui paraissent assez éloignées l'une de l'autre.

La distribution isoperoxydasique semble donc, comme la distribution des proteines l'avait déjà montré, refléter un état physiologique momentané soumis au contrôle des facteurs de l'environnement.

Le fait que les peroxydases sont un groupe d'enzymes à fonctions multiples rend difficile et délicate l'interprétation des résultats recueillis dans le cadre de notre étude de l'altération du port. Cependant, l'existence d'importantes différences dans les cinétiques des isozymes, notamment en ce qui concerne leur thermostabilité, nous permet de supposer que chaque isozyme intervient d'une manière très spécifique, en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques. Aussi, nos conclusions concernant la signification de ces isozymes seront-elles prudentes aussi longtemps que la fonction exacte de chaque isozyme et que sa localisation intracellulaires ne seront pas précisées.

Nous pensions caractériser des peroxydases spécifiquement liées à la destruction de l'acide βindolylacétique mais nos résultats montrent que chaque isozyme possède une activité AIA-oxydasique, en particulier les isozymes "acides" qui sont apparues plus efficaces dans le déroulement de cette action. Un essai préliminaire met en évidence l'efficacité de l'action oxydante des isoperoxydases $P_7$ et $P_9$ sur l'eugenol ( 88 ), composé naturel qui est un intermédiaire dans la biosynthèse de la lignine. Il est donc évident, qu'il serait d'autant plus intéressant de poursuivre notre travail dans cette direction, en analysant parallèlement à la dégradation de l'acide βindolylacétique, le mode de formation active de la lignine, puisque l'activité spécifique peroxydasique constatée dans les tissus lignifiés est supérieure à celle des tissus en voie de croissance. Mais, la biosynthèse de la lignine est un processus physiologique complexe dépendant de l'activité et du contrôle d'un grand nombre de composés et d'enzymes qui rend aléatoire son analyse à partir d'une seule réaction.

La découverte d'un inhibiteur de l'activité peroxydasique rend leur étude encore plus complexe. En particulier, l'activité de chacune des isoperoxydases constatée dans les tissus, ne reflètera plus un véritable état physiologique mais un état physiologique résultant de son contrôle par un autre composé.

Nous proposons pour cet inhibiteur une structure protéique. Ceci s'appuie sur ses principales caractéristiques :

- de précipitation par le sulfate d'ammonium ;
- de sensibilité aux changements de pH ;
- de sensibilité aux températures élevées qui inactivent ce composé.

Dans l'état actuel de notre expérimentation, il est difficile de mieux caractériser ce composé. Nous ne possédons, en effet, aucune possibilité d'évaluer la valeur de sa concentration. La connaissance de cette valeur pourrait être établie en fonction de l'inhibition d'une activité peroxydasique donnée. Mais la valeur obtenue n'exprime pas sa concentration exacte étant donné qu'il n'y a pas de rapport linéaire entre sa concentration et l'effet inhibiteur produit (figure 49).

Mais il est intéressant de constater que l'inhibiteur agit sur les deux activités enzymatiques présentées par la molécule peroxydasique, plus fortement sur l'activité AIA-oxydasique que sur l'activité peroxydasique.

Dans ce dernier cas, l'inhibiteur intervient comme un inhibiteur non-compétitif puisqu'il ne modifie pas l'affinité du centre actif pour les substrats mais ralentit considérablement la réaction. Ceci indique que sa liaison avec l'enzyme ne s'effectue pas au niveau du centre actif peroxydasique.

Sa forte action sur l'activité AIA-oxydasique suggère qu'il interfère probablement avec le deuxième centre actif dont l'existence a été avancée. Plusieurs travaux récents démontrent l'existence d'une protéine capable de se fixer à l'acide βindolylacétique ( 68, 116, 167 ). Si l'inhibiteur décelé chez les Ajoncs correspond à cette "protéine de liaison" nous aurions là un composé dont la présence serait fondamentale par son rôle dans la régulation de la croissance.

D. - RESUME.

Un nombre élevé d'isoperoxydases sont caractérisées dans les tissus chlorophylliens des Ajoncs : 10 isoperoxydases sont séparées et définies. Leurs pki s'étalent dans une très large gamme de pH (pH 3,17 à pH 9,72).

Le comportement de ces isozymes est variable selon :

- leurs thermostabilités et leurs affinités relatives à divers substrats par rapport à l'activité peroxydasique et AIA-oxydasique ;
- leurs sensibilités aux variations de pH pour l'activité AIA-oxydasique.

Chaque isozyme possèdera donc des caractéristiques bien spécifiques ce qui laisse supposer une fonction également très spécifique. La distribution qualitative et quantitative des isoperoxydases conduit à répartir les différentes analysées dans trois groupes qui comprendront :

1 - un premier groupe réunissant les formes normales d'Ulex europaeus L. du nord ($E_{D1}$, $E_{D2}$) et les formes basses (ULex europaeus L. $E_C$ et d'Ulex gallii Planch. $G_C$).

2 - un deuxième groupe comprendra les formes normales d'Ulex europaeus L. ($E_{D3}$) de Pleubian.

3 - un troisième groupe où voisinent les formes normales d'Ulex gallii Planch. et d'Ulex minor Rothm.

Ainsi la similitude des profils isoperoxydasiques et protéiques nous conduisent à une conception de l'établissement des divisions très proche de celle résultant de l'analyse protéique (éloignement de $E_{D3}$ ; différences considérables qui séparent Ulex gallii Planch. engé et prostré ; enfin affinités proches entre les formes ~~basses et normales~~ engées d'Ulex gallii Planch. $G_D$ et Ulex minor Rothm.).

Un inhibiteur pour lequel une structure protéique est proposée, est omniprésent dans tous les extraits analysés. Il agit de manière non compétitive sur l'activité peroxydasique mais intervient plus intensément sur l'activité AIA-oxydasique, ce qui laisse supposer que cet inhibiteur doit influencer directement la croissance en la contrôlant.

VII . . - DISCUSSION FINALE.

Le but de ce travail était d'analyser la variation du port et de mieux établir les affinités des différentes formes dans le complexe Ulex en fonction des critères biochimiques. Les protéines et les enzymes constituent l'un des premiers maillons de l'expression génétique ; elles sont donc un révélateur idéal pour procéder à une approche génécologique approfondie.

Les trois espèces étudiées : Ulex europaeus L., Ulex gallii Planch. et Ulex minor Rothm. ont une aire phytogéographique distincte : Ulex europaeus L. est une subatlantique dont la distribution s'étend à l'intérieur du pays, mais les formes prostrées, plus atlantiques, sont limitées au littoral. Ulex gallii Planch. est une eu-atlantique ; son type prostré ne borde que le littoral. Ulex minor Rothm. est ibéro-atlantique, il a sa limite septentrionale dans notre domaine d'étude. Ulex gallii Planch. et Ulex minor Rothm. ont des exigences écologiques très voisines, mais leurs aires s'excluent.

Comme marqueurs biochimiques nous avons successivement étudié : des protéines totales solubles, des enzymes dont LAP, EST et PER. Le polymorphisme isozymatique a été établi et les isoleucine-aminopeptidases, isoestérases et isoperoxydases sont définies par leurs critères physico-chimiques : pki, Rf et poids moléculaires.

Les résultats obtenus nous conduisent à réunir nos analyses suivant deux aspects :

a) analyse des protéines totales solubles et des peroxydases ;

b) analyse des leucine-aminopeptidases et des isoestéraces.

a) Analyse des protéines totales solubles et des peroxydases :

L'étude des protéines et des peroxydases permet une bonne approche du métabolisme momentané de la plante. Les différences observées entre les formes analysées relèvent des divers facteurs écologiques (température, sol, pluviosité, etc...). Ainsi, nous pouvons comprendre les ressemblances biochimiques entre espèces différentes comme Ulex gallii Planch. érigé et Ulex minor Rothm. ; leurs exigences écologiques sont analogues.

Il existe des différences de composition protéique et peroxydasique entre les formes érigées d'Ulex europaeus L. En effet, le nombre de bandes est réduit pour les protéines et les peroxydases chez $E_{D3}$ de Bretagne ; par contre, il est plus élevé chez $E_{D1}$ et $E_{D2}$ du Pas-de-Calais. On peut émettre l'hypothèse que la différence de nombre de bandes reflète une sélection d'adaptation écologique entre le climat assez uniforme de Bretagne et celui du Pas-de-Calais qui subit plus de variations.

Par contre, il faut relever également que les types érigés du Pas-de-Calais et les deux types prostrés du Cap d'Erquy ont des profils protéique et peroxydasique similaires, ce qui s'expliquerait également par les perturbations climatiques plus amples sur le littoral.

En conclusion, les profils protéique et peroxydasique qui résultent de l'analyse biochimique du complexe Ulex mettent en évidence une adaptation aux facteurs d'un même milieu par une convergence des formes qui génétiquement sont différentes. Ainsi, par l'analyse de molécules très proches du métabolisme physiologique les affinités phénotypiques sont perçues.

b) Analyse des leucine-aminopeptidases et des isoestérases :

Les résultats des isoleucine-aminopeptidases et des isoestérases apportent une image très différente car les divergences observées reposent certainement sur le génotype. Le classement qui en résulte concorde assez étroitement avec les propositions de la systématique de ROTHMALER (129), à l'exception des formes prostrées dont la position est particulière.

En fonction des critères biochimiques, les 7 formes analysées du complexe Ulex peuvent être réparties en 3 groupes :

- 1 - le groupe à Ulex europaeus L. dressé ;
- 2 - le groupe des formes prostrées (ULex europaeus L. et Ulex gallii Pl.) et d'Ulex gallii érigé ;
- 3 - le groupe Ulex minor Rothm.

- premier groupe : les ressemblances des profils isozymatiques (isoleucine-aminopeptidases et isoestérases) confirment l'appartenance à une même espèce des trois formes dressées d'Ulex europaeus L. ($E_{D1}$, $E_{D2}$ et $E_{D3}$) malgré la discordance que reflète l'analyse des protéines et des peroxydases.

- deuxième groupe : l'analyse des isoestérases apportent une image homogène par la présence d'une isozyme supplémentaire des trois formes $E_C$, $G_D$ et $G_C$. Par contre, l'image donnée par les isoleucine-aminopeptidases est plus complexe ; on peut distinguer dans le deuxième groupe deux subdivisions :

a) les formes prostrées d'Ulex europaeus L. et d'Ulex gallii Pl. dont les profils isozymatiques sont identiques ;

b) les formes dressées d'Ulex gallii Pl. dans le profil isozymatique est particulier.

L'identité des profils isozymatiques dans les formes basses est assez surprenante en raison de leur appartenance à des espèces différentes selon

ROTHMALER (129) et qu'effectivement nous avons constaté des différences morphologiques et physiologiques (éloignement des périodes de floraison par exemple). Il apparaît que des affinités plus importantes se manifestent entre les formes prostrées d'espèces différentes qu'entre les diverses formes d'une même espèce. On peut donc distinguer biochimiquement les formes érigées des formes prostrées.

Le milieu peut réaliser une convergence d'adaptation héréditaire chez deux espèces différentes : une forte atlanticité se manifeste chez les deux types prostrés, ils sont uniquement localisés sur les falaises du littoral breton.

- troisième groupe : ici se situent les formes érigées d'Ulex minor Rothm. qui, d'après notre étude, apparaît comme une espèce marginale parmi les formes analysées.

Les profils des isoestérases et isoleucine-aminopeptidases montrent la présence exclusive d'une bande spécifique. Ainsi, cette espèce est biochimiquement isolée.

Si l'on considère les formes dressées, l'analyse biochimique confirme la classification systématique de ROTHMALER : il s'agit bien là de 3 espèces distinctes.Par ailleurs, elle élucide le cas d'ULex gallii Pl. que FOURNIER considère comme hybride entre Ulex europaeus L. et Ulex minor Rothm. or, les estérases et les leucine-aminopeptidases non rencontrées ailleurs, la caractérisent comme taxon autonome, ce qui infirme l'hypothèse de FOURNIER.

L'analyse de la thermostabilité des isoestérases fait ressortir une relation directe entre la présence de certaines isozymes et la distribution phytogéographique. Ulex minor Rothm., de tempérament ibéro-atlantique, possède une isoestérase plus thermostable qu'Ulex europaeus L. dont l'aire de distribution est plus nordique. Ulex gallii Planch. élabore une isoestérase dont la thermostabilité est intermédiaire entre celle d'Ulex europaeus L. et celle d'ULex minor Rothm. On peut ainsi comprendre pourquoi Ulex gallii Planch. peuple des stations aux conditions climatiques plus extrêmes qu'Ulex europaeus, par exemple sur le plateau de Menez-Hom où ne poussent pas d'arbres et où la végétation est exposée à une forte insolation; il en est de même sur les falaises du littoral qui sont fortement ensoleillées. Ceci justifie aussi la situation biochimique d'Ulex europaeus L. prostré qui possède la même isozyme que les 2 types précédents, isozyme qui est absente chez Ulex europaeus L. érigé.

# C H A P I T R E  VIII : R E S U M E  F I N A L

L'analyse génécologique par voie biochimique du complexe Ulex (sept écotypes des 3 espèces : Ulex europaeus, Ulex gallii, Ulex minor) dans le nord et l'ouest de la France, a été réalisée sur les protéines totales solubles, les isozymes des estérases, les isozymes des leucine-aminopeptidases et les isozymes des peroxydases.

Deux ordres de résultats sont mis en évidence :

1 - l'analyse des protéines totales solubles et des isoperoxydases montre que chacun des sept types d'Ulex analysés a une composition spécifique qui semble refléter son comportement physiologique et écologique ;

2 - l'examen des isoleucine-aminopeptidases et des isoestérases permet de classer les sept types analysés en 3 groupes :

- Ulex europaeus L. (type érigé de 3 stations différentes) ;
- Ulex gallii Planch. (type érigé et type prostré) et Ulex europaeus L. (type prostré) ;
- Ulex minor Rothm. (type érigé).

Cette subdivision se rapproche de la classification systématique du genre Ulex, effectuée par ROTHMALER, à l'exception d'Ulex europaeus L. type prostré, que l'analyse isozymatique rapproche de l'espèce Ulex gallii Planch.

Cet apport biochimique confirme dans l'ensemble la récente subdivision systématique ainsi que le comportement génécologique des types érigés et prostrés des 3 espèces qui traduit un gradient d'atlanticité dans l'ordre Ulex europaeus subatlantique - Ulex minor - Ulex gallii eu-atlantique.

IX ABREVIATIONS.

| | |
|---|---|
| Act | Activité |
| ADH | Alcool déshydrogénase |
| ADN | Acide désoxyribonucleique |
| ADP | Adenosine diphosphate |
| AIA | Acide β-indolylacétique |
| AIA-ox. | Oxydase de l'acide β-indolylacétique |
| Ala | Alanine |
| ARN | Acide ribonucléique |
| DO | Densité optique |
| $E_{D1}$ | Ulex europaeus L. dressé (Hem) |
| $E_{D2}$ | Ulex europaeus L. dressé (Ambleteuse) |
| $E_{D3}$ | Ulex europaeus L. dressé (Pleubian) |
| $E_C$ | Ulex europaeus L. couché (Cap d'Erquy) |
| FTP | Focalisation isoélectrique préparative |
| $G_D$ | Ulex gallii Pl. dressé (Venez-Hom) |
| $G_C$ | Ulex gallii Pl. couché (Cap d'Erquy) |
| Glu | Glutamine |
| LAP | Leucine-Aminopeptidase |
| LDH | Lactate déshydrogénase |
| M | Ulex minor Roth. (SINCE) |
| 1-NA | 1-Naphthylacétate |
| 2-NA | 2-Naphthylacétate |
| 2-NP | 2-Naphthylpropionate |
| P | Précipité |
| Per | Peroxydase |
| pH max. | pH maximale |
| Phe | Phénylalanine |
| pki | Point isoélectrique |
| Pro | Proline |
| S | Surnageant |
| U. | Ulex |
| UDP | Uridine di phosphate |

X. BIBLIOGRAPHIE


1. ALEKHINA,N.D.;SHIRSHOVA,E.D.:Isozyme composition of aspartate- and alanine-aminotransferases from roots of maize cultivated at lowered temperature.
   Doklady Akademii Nauk SSSR,228,248-251,1976
2. ALLARD,R.W.;KAHLER,A.J.;WEIR,B.S.:The effect of selection on esterase allozymes in a barley population.
   Genetics,72,489-503,1972
3. ANDERSON,L.E.:Cloroplast and cytoplasmic enzymes.III.Pea leaf triose phosphate isomerases.
   Biochimica Biophysica Acta,235,237-244,1971
4. BAESS,D.;POMMERENING,K.;RUCKPAUL,K.:Aktivitätsvergleich von freier und trägerfixierter Meerrettichperoxidase.
   Acta Biol.med.germ.,34,965-969,1975
5. BARTH,A.:Über die Stellung der Aminopeptidasen im Proteinstoffwechsel und ihre mögliche Bedeutung bei der "Funktionalisierung" der Proteine.
   Biologische Rundschau,13,22-35,1975
6. BARTHE,J.-P.,GADAL,P.:Mise en évidence par focalisation isoélectrique de trois isoenzymes de la polyphénoloxydase chez Quercus pedunculata.
   FEBS Letters,21,233-236,1972
7. BEER,S.;SHOMER-ILAN,A.;WAISEL,Y.:Salt stimulated phosphoenolpyruvate carboxylase in Cakile maritima.
   Physiologia Plantarum,34,293-295,1975
8. BENVENISTE,K.B.;MUNKRES,K.D.:Multiple molecular forms of Neurospora Mitochondrial malate dehydrogenase.
   dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes I,561-574,1975,Academic Press,New York
9. BERGMANN,F.:Genetische Untersuchungen bei Picea abies mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung.II.Genetische Kontrolle von Esterase- und Leucine-aminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen.
   Theoret.Appl.Genetics,43,222-225,1973
10. BERRY,J.A.;FRANKE,R.G.:Taxonomic significance of intraspecific isozyme patterns of the slime mold Fuligo septica produced by disc electrophoresis.
    American J.Botany,60,976-986,1973
11. BHATIA,C.R.;BUIATTI,M.;SMITH,H.H.:Electrophoretic variation in proteins and enzymes of the tumor forming hybrid Nicotiana glauca x N.Langsdorffii and its parent species.
    American J.Botany,54,1237-1241,1967
12. BONNIER,G.:Flore complète illustrée en couleurs de France,Suisse et Belgique,II,117-120,1934
13. BOULTER,D.;THURMAN,D.A.;TURNER,B.L.:The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics.
    Taxon,15,135-143,1966
14. BREWBAKER,J.L.;HASEGAWA,Y.:Polymorphisms of the major peroxidases of maize.
    dans MARKERT,C.L.(ed.):Isozymes,III,659-674,1975,Academic Press,New York

15. BREWER,G.J.:Introduction to isozyme techniques.
Academic Press,New York,1970

16. BRINKMANN,F.G.;VANDERMEER,L.J.:Dehydrogenases in potato tuber (Solanum tuberosum) - Identy,coenzyme specificity and isoenzyme composition of Malic Enzyme,Malate dehydrogenase and Lactate dehydrogenase.
Zeitschrift für Pflanzenphysiologie,75,322-331,1975

17. BROWN,C.S.;KLINE,E.L.;UMBARGER,H.E.:Single reactions with multiple enzymes as one of three patterns in microorganisms.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes II,249-273,1975,Academic Press,New York

18. BUZUN,G.A.;DZHEMUKHADZE,K.M.;MILESHKO,L.F.:Molecular weights of teaplant sprout polyphenoloxidase isoenzymes determined by the method of electrophoresis in polyacrylamide gel.
Doklady Akademii Nauk SSSR,218,708-711,1974

19. CASTRO,D.de:Algumas contagens de cromosomas no genero Ulex L. (sensu lato).
Agron.Lusitana,3,104-114,1941

20. CHAO,S.-E.,SCANDALIOS,J.G.:Differential expression of parental alleles in maize.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,III,675-690;1975,Academic Press,New York.

21. CHARRIERE-LADREIX,Y.:Sur la présence de deux isoenzymes de la phenylalanine-ammonia-lyase chez Aesculus hippocastanum.
Phytochemistry,14,1727-1732,1975

22. CHEN,J.H.;JONES,R.F.:Multiple forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from Chlamydomonas reinhardtii.
Biochimica Biophysica Acta,214,318-325,1970

23. CHEPURENKO,N.V.;BORISOVA,J.G.;BUDNITSKAIA,E.V.:Characteristics of isoenzymes of pea seed lipoxygenase.
Doklady Akademii Nauk SSSR,229,1008-1010,1976

24. CLARKE,B.:The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci.
Genetics,79,101-113,1975

25. COPES,D.L.:Isoenzyme study of dwarf and normal Douglas-fir trees.
Botanical Gazette,136,347-352,1975

26. CORILLION,R.:Nouvelles précisions sur la répartition d'Ulex gallii Planch. en Bretagne.
Bull.Soc.Scient.Bret.,34,233-236,1959

27. CORILLION,R.:Notice détaillée des feuilles armoricaines.
Editions de Centre National de la Recherche Scientifique,Paris,1971

28. COUSTAUT,D.;MOSCHETTO,Y.;HASE,C.:Application de la focalisation isoélectrique préparative (FIP) à la définition et à l'analyse d'isozymes végétales (isoestérases et isoperoxydases).
XII$^{e}$ Congrès International de la Societé de Pharmacie de la Méditerranée Latine,Messine,4-7 juin 1976

29. DARBYSHIRE,B.:The glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots.
Physiologia Plantarum,29,293-297,1973

30. DE JONG,D.W.:Effect of temperature and daylength on peroxidase and malate-(NAD)-dehydrogenase isozyme composition in tobacco leaf extracts.
American J.Botany,60,846-852,1973

31. DELINCEE,H.;RADOLA,B.J.;DRAWERT,F.:The effect of heat on isoelectric and size properties of horseradish peroxidase.
Experientia,27,1265-1267,1971

32. DENNA,D.W.;ALEXANDER,M.B.:The isoperoxidases of Cucurbita pepo.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes II,851-864,1975,Academic Press,New York.

33. DESBOROUGH,S.;PELOQUIN,S.:Disc electrophoresis of tuber proteins from Solanum species and interspecific hybrids.
Phytochemistry,5,727-733,1966

34. DUMITRESCU,M.;GUERN,M.:Polyploidie et qualité de quelques enzymes de l'Hippocrepis comosa L.
C.R.Acad.Sci.,D,273,59-62,1971

35. DUMITRESCU,M.;GORENFLOT,R.;COUDERC,H.:La présence d'un inhibiteur de la peroxydase dans la gousse sèche de l'Anthyllis vulneraria L. ssp.dillennii.
Revue Roumaine de Biochimie,12,15-20,1975

36. ELLEMAN,T.C.:Aminopeptidases of pea.
BiochemicalJ.,141,113-118,1974

37. ENDO,T.:Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes.
Plant and Cell Physiology,9,333-341,1968

38. EVANS,J.L.:Peroxidase from the extreme dwarf tomato plant:identification, isolation and partial purification.
Plant Physiology,43,1037-1041,1968

39. EVANS,J.J.;ALLDRIDGE,N.A.:The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (Lycopersicon esculentum Mill.).
Phytochemistry,4,499-503,1965

40. FAW,W.F.;JUNG,G.A.:Electrophoretic protein patterns in relation to low temperature tolerance and growth regulation in alfalfa.
Cryobiology,9,548-555,1972

41. FELDER,M.R.:Genetic control of four cathodal peroxidase isozymes in barley.
J.Heredity,67,39-42,1976

42. FISHBEIN,W.N.;NAGARAJAN,K.;SCURZI,W.:Structural classes of jackbean urease variants and their relation to a structural classification of isozymes.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes I,403-417,1975,Academic Press,New York

43. FORD,E.B.:Génétique écologique.Gauthiers-Villars,Paris,1972

44. FOURNIER,P.:Les quatre flores de la France.Paul Lechevalier,Paris,1961

45. FOX,D.J.;THURMAN,D.A.;BOULTER,D.:Studies on the proteins of seeds of Leguminosae.I.Albumins.
Phytochemistry,3,417-419,1964

46. FREDRICK,J.F.:Evolution of isozymes forming storage polyglucans in algae.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes IV,307-321,1975,Academic Press,New York

47. GASQUEZ,J.;COMPOINT,J.-P.:Premières données taxonomiques sur Echinochloa crus galli (L.) P.B. et espèces voisines par électrophorèse en tube sur gel de polyacrylamide.
C.R.Acad.Sci.,D,277,837-840,1973

48. GEHU,J.M.:Sarothamnus scoparius ssp. maritimus dans le Nord Ouest Français.
Bull.Soc.Bot.Nord France,16,211-222,1963

49. GEHU,J.M.:Communication personnelle

50. GEHU-FRANCK,J.:Contribution à l'étude auto- et synécologique de l'ajonc d'Europe.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie,Lille,1974

51. GERBRANDY,S.J.;SHANKAR,V.;SHIVARAM,K.N.;STEGEMANN,H.:Conversion of potato phosphorylase isozymes.
Phytochemistry,14,2331-2334,1975

52. GILES,N.H.;CASE,M.E.:Two pairs of isozymes in the aromatic biosynthesis and catabolic pathways in Neurospora crassa.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes II,865-876,1975,Academic Press,New York

53. GILLESPIE,J.H.;KOJIMA,K.:The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two Drosophila ananassae populations.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA,61,582-585,1968

54. GOREN,R.;HUBERMAN,M.:Effects of ethylene and 2,4-D on the activity of cellulase isoenzymes in abscission zones of the developing orange fruit.
Physiologia Plantarum,37,123-130,1976

55. GOVE,J.P.;HOYLE,M.C.:The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish.
Plant Physiology,56,684-687,1975

56. GRIFFIN,D.H.;TIMBERLAKE,W.;CHENEY,J.;HORGEN,P.A.:The RNA polymerases of fungi. Glutarimides and the regulation of RNA polymerase I.
dans MARKERT,C.L. (ed.) :Isozymes I,69-87,1975,Academic Press,New York

57. GUPTA,V.K.;PAWAR,V.S.:Leucineaminopeptidase (LAP) activity in tall and dwarf cultivars of rice (Oryza) at successive stages of development.
Annals of Botany,38,205-208,1974

58. HARRIS,H.:Genes and isozymes.
Proceedings of the Royal Society,B,174,1-31,1969

59. HARRIS,H.:Molecular evolution:the neutralist - selectionist controversy.
Federation Proceedings,35,2079-2082,1976

60. HART,G.E.:Glutamate Oxaloacetate Transaminase isozymes of Triticum: evidence for multiple systems of triplicate strucutral genes in hexaploid wheat.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes III,637-657,1975,Academic Press,New York

61. HASE,C.;COUSTAUT,D.:Protéines foliaires solubles des formes dressées et basses des ajoncs du littoral ouest français.
Bulletin de la Societé de Pharmacie de Lille,33,29-40,1977

62. HASE,C.;COUSTAUT,D.;MOSCHETTO,Y.:Focalisation isoélectrique préparative (FIP) et séparation des isoleucine aminopeptidases chez Ulex minor Roth.
Bulletin de la Societé de Pharmacie de Lille,33,41-49,1977

63. HOBSON,G.E.:Electrophoretic investigations of enzymes from developing Lycopersicon esculentum fruit.
Phytochemistry,13,1383-1390,1974

64. HOESS,R.H.;SMITH,H.H.;STOWELL,C.P.:A genetic analysis of peroxidase isozymes in two species of Nicotiana.
Biochemical Genetics,11,319-323,1974

65. HOYLE,M.C.:Indoleacetic acid oxidase:a dual catalytic enzyme?
Plant Physiology,50,15-18,1972

66. HUANG,A.H.C.;LIU,D.F.;YOULE,R.J.:Organelle-specific isozymes of aspartate-α-ketoglutarate transaminase in spinach leaves.
Plant Physiology,58,110-113,1976

67. HÜTTERMANN,A.;GEBAUER,M.;WESSEL,J.;HOFFMANN,W.:Activity,isoenzyme pattern and synthesis of UDP-glucose-4-epimerase during differentiation of Physarum polycephalum.
Biochimica Biophysica Acta,384,493-500,1975

68. IHL,M.:Indole-acetic acid binding proteins in soybean cotyledon.
Planta,131,223-228,1976

69. JACOBS,M.;SCHWIND,F.:Biochemical genetics of Arabidopsis acid phosphatases: polymorphism,tissue expression,and genetics of $AP_1$,$AP_2$ and $AP_3$ loci.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes IV,349-369,1975,Academic Press,New York

70. JEANJEAN,M.F.;KOBREHEL,K.;FEILLET,P.:Purification et caractérisation de deux peroxydases de blé dur.
Biochimie,57,145-153,1975

71. JOHNSON,G.B.:Enzyme polymorphism and biosystematics:the hypothesis of selective neutrality.
Ann.Review Ecol.System.,4,93-116,1973

72. JOHNSON,G.B.:Enzyme polymorphism and metabolism.
Science,184,28-37,1974

73. JOUDRIER,P.:Specificité génétique de la β-amylase chez Triticum aestivum: existence de cinq types variétaux de zymogrammes.
C.R.Acad.Sci.;D,278,1777-1780,1974

74. JOVET,P.;JOVET-AST,S.:Ajoncs du pays basque:leur distinction specifique.
Bull.Cent.Etud.Recher.Sci.,Biarritz,6,213-226,1966

75. JUDEL,G.K.:Einfluss von pH und Temperatur auf die Aktivität von Phenoloxidase und Peroxidase aus Sonnenblumen.
Biochem.Physiol.Pflanzen,167,243-251,1975

76. KADAM,S.S.;SINGH,J.;MEHTA,S.L.:Changes in isoenzymes in embryo and endosperm of normal and opaque-2 Zea mays during imbibition.
Phytochemistry,12,1221-1225,1973

77. KIMURA,M.:Evolutionary rate at the molecular level.
Nature,217,624-642,1968

78. KIMURA,M.;CROW,J.F.:The number of alleles that can be maintained in a finite population.
Genetics,49,725-738,1964

79. KNOBLOCH,K.-H.;HAHLBROCK,K.:Isoenzymes of p-coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of Glycine max.
Eur.J.Biochem.52,311-320,1975

80. KOEHN,R.K.;RASMUSSEN,D.J.:Polymorphic and monomorphis serum esterase heterogeneity in catastomid fish populations.
Biochem.Genetics,1,131-144.1967

81. 15.KONFERENZ der Gesellschaft für Biologische Chemie:Esterasen.
Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie,354,1-12,1973

82. KUNERT,M.;HEYMANN,E.:The equivalent weight of pig liver carboxylesterase (E.C.3.1.1.1.) and the esterase content of microsomes.
FEBS Letters,49,292-296,1975

83. LADIZINSKY,G.;ADLER,A.:The origin of chickpea as indicated by seed protein electrophoresis.
Israel.J.Botany,24,183-189,1975

84. LEE,D.W.:Glutamate dehydrogenase isoenzymes in Ricinus communis seedlings.
Phytochemistry,12,2631-2634,1973

85. LE JOHN,H.B.:Homology and analogy of dehydrogenases in fungal phylogeny.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,IV,323-348,1975,Academic Press,New York

86. LENDZIAN,K.;SCHAFER,E.:Invertases of pollen of Haemanthus albiflos.
Phytochemistry,12,1227-1228,1973

87. LEWONTIN,R.C.;HUBBY,J.L.:A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations.II.Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura.
Genetics,54,595-609,1966

88. LIU,E.H.;LAMPORT,D.T.A.:The pH induced modification of the electrophoretic mobilities of horseradish peroxidase isozymes.
Archives of Biochemistry and Biophysics,158,822-826,1973

89. LONGO,G.P.;SCANDALIOS,J.G.:Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA,62,104-111,1969

90. LOOMIS,W.F.:Stage specific isozymes of Dictyostelium discoideum.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,III,177-189,1975,Academic Press,New York

91. LOY,J.B.:A comparison of stem peroxidases in bush and vine forms of squash (Cucurbita maxima Duch.and C.pepo).
Journal of Experimental Botany,23,450-457,1972

92. LUMSDEN,J.;HALL,D.O.:Soluble and membrane-bound superoxide dismutases in a blue-green alga (Spirulina ) and spinach.
Biochem.Biophys.Research Commun.,58,35-41,1974

93. LUNDKVIST,K.:Inheritance of leucine aminopeptidase isozymes in Picea abies.
Hereditas,76,91-96,1974

94. MACHACHKOVA,J.;GANCEVA,K.;ZMRHAL,Z.:The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat.
Phytochemistry,14,1251-1254,1975

95. MARGULIES,M.M.:Concerning the sites of synthesis of proteins of chloroplast ribosomes and of fraction I protein (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase).
Biochem.Biophys?Research Commun.,44,539-545,1971

96. MARKERT,C.L.:Biology of isozymes.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,I,1-9,1975,Academic Press,New York

97. MARKERT,C.L.;MØLLER,F.:Multiple forms of enzymes:tissue,ontogenetic and species specific pattern.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA,45,753-763,1959

98. MARTINEZ-HONDUVILLA,M.J.;MARTINEZ-HONDUVILLA,C.J.:Pine seed ribonucleases. I.Preparation and properties.
Rev.Esp.Fisiol.,31,283-288,1975

99. MARZLUF,G.A.:Genetic and developmental regulation of distinct sulfate permease species in Neurospora crassa.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,III,239-252,1975,Academic Press,New York

100. MATTOO,A.K.;MODI,V.V.:Palmitic acid activation of peroxidase and its possible significance in mango ripening.
Biochimica Biophysica Acta,397,318-330,1975

101. MAYR,E.:Population,espèces et évolution.
Hermann,Paris,1974

102. MAZUS,B.;BRODNIEWICZPROBA,T.:RNA-polymerase-1 and polymerase-2 in germinating wheat embryo.
Acta Biochim.Polon.,23,261-268,1976

103. McCOWN,B.H.;BECK,G.E.;HALL,T.C.:Plant leaf and stem proteins.I.Extraction and electrophoretic separation of the basic,water-soluble fraction.
Plant Physiology,43,578-582,1968

104. McCOWN,B.H.;HALL,T.C.;BECK,G.E.:Plant leaf and stem proteins.II.Isoenzymes and environmental change.
Plant Physiology,44,210-216,1969

105. McLEESTER,R.C.;HALL,T.C.;SUN,S.M.;BLISS,F.A.:Comparison of globulin proteins from Phaseolus vulgaris with those from Vicia faba.
Phytochemistry,12,85-93,1973

106. McMULLAN,E.E.;EBELL,L.F.:Disc electrophoresis of soluble proteins of conifer foliage.
Phytochemistry,9,2281-2285,1970

107. MIEGE,M.-N.;MIEGE,J.:Les protéines des graines de quatre espèces de Dioscorea d'Afrique occidentale.
C.R.Acad.Sci.,D,272,2536-2539,1971

108. MILLER,R.V.;CLARK,A.J.:Purification and properties of two deoxyribonucleases of Pseudomonas aeruginosa.
J.Bacteriology,127,794-802,1976

109. MONASTYREVA,L.E.;OZOLINA,N.V.;LEVITES,E.V.:The investigation of genetic polymorphism of succinate dehydrogenase in maize.
Genetika,12,10-14,1976

110. MUKERIJ,S.K.;TING,J.P.:PEPcarboxylase isoenzymes:separation and properties of three forms from cotton leaf tissue.
Arch.Biochem.Biophys.,143,297-311,1971

111. NAGLE,N.E.;HAARD,N.F.:Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit.
J.Food Science,40,576-579,1975

112. NAKAGAHRA,M.;AKIHAMA,T.;HAYASHI,K.:Genetic variation and geographic cline of esterase isozymes in native rice varieties.
Jap.J.Genetics,50,373-382,1975

113. NATARELLA,N.J.;SINK,K.C.:Electrophoretic analysis of proteins and peroxidases of selected Petunia species and cultivars.
Botanical Gazette,136,20-26,1975

114. NING SUN YANG:Biochemical properties and development expression of genetically determined malate dehydrogenase isozymes in maize.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,III,191-212,1975,Academic Press,New York

115. NOLTMANN,E.A.:The different origons of multiple molecular forms of phosphoglucose isomerase.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,I,451-470,1975,Academic Press,New York

116. OLIVE,J.-L.;BONNAFOUS,J.-C.;MANI,J.-C.;MOUSSERON-CANET,M.:Membranes plasmiques végétales.Etude par fluorescence.
Biochimie,55,993-996,1973

117. PARISH,W.:The effects of light on peroxidase synthesis and indoleacetic acid oxidase inhibitors in coleoptiles and first leaves of wheat.
Zeitschrift für Pflanzenphysiologie,60,90-97,1969

118. PAWAR,V.S.;GUPTA,V.K.:Peroxidase isoenzymes in development of tall and dwarf cultivars of rice.
Annals of Botany,39,777-783,1975

119. PECH,J.-C.;BARDET,C.;FALLOT,J.:Evolution des protéines solubles et de certaines enzymes dans la pulpe de la poire Passe-Crassane au cours de la conservation.
Physiologie Végétale,8,461-474,1970

120. PISIGAN,R.A.;DEL ROSARIO,E.J.:Isoenzymes of soluble starch synthetase from Oryza sativa grains.
Phytochemistry,15,71-73,1976

121. PRENTICE,N.;BURGER,W.C.;MOELLER,M.:An esterase from barley endosperm.
Phytochemistry,10,1497-1499,1971

122. PURDY,R.E.;KOLATTUKUDY,P.E.:Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification,amino acid composition and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from Fusarium solani f.pisi.
Biochemistry,14,2824-2831,1975

123. RANJEVA,R.;BOUDET,A.M.;FAGGION,R.:Phenolic metabolism in Petunia tissues. IV.Properties of p-coumarate:coenzyme A ligase isoenzymes.
Biochimie,58,1255-1262,1976

124. RANJEVA,R.;FAGGION,R.;BOUDET,A.M.:Métabolismes des composés phénoliques des tissus de Petunia.II.Etude du système enzymatique d'activation des acides cinnamiques.Mise en évidence de deux formes de la cinnamoyl-CoA-ligase.
Physiologie Végétale,13,725-734,1975

125. REDDY,M.M.;THRELKELD,S.F.H.:Genetic studies of isozymes in Neurospora. I.A study of eight species.
Can.J.Genet.Cytol.,13,298-305,1971

126. RICARD,J.;JOB,D.:Reaction mechanisms of indole-3-acetate degradation by peroxidases.A stopped-flow and low-temperature spectroscopic study.
Eur.J.Biochem.,44,359-374,1974

127. RIGHETTI,P.;CARAVAGGIO,T.:Isoelectric points and molecular weights of proteins
J.Chromatography,127,1-28,1976

128. ROTHE,G.:Unterschiede im Enzymmuster von Protonema,Moospflänzchen,Sporogon und Kallus der Laubmooskreuzung Funaria hygrometrica x Physcomitrium pisiforme. Beitr.Biol.Pflanzen,48,433-444,1972

129. ROTHMALER,W.:Revision der Genisteen.I.Monographie der Gattung um Ulex. Botanisches Jahrbuch,72,69-116,1941

130. ROUGE,P.:Interêt de l'électrophorèse des protéines foliaires en systématique végétale. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie,Toulouse,1972

131. ROUY,G.;FOUCAUD,J.:Flore de France,IV,240-246,1896

132. RUDOLPH,K.;STAHMANN,M.A.:Multiple hydrolases in bean leaves (Phaseolus vulgaris L.) and the effect of halo blight disease caused by Pseudomonas phaseolicola. Plant Physiology,41,389-394,1966

133. RYCHTER,A.;LEWAK;S.:Polyacrylamide-gel electrophoresis of apple-seed enzymes. Acta Biochim.Polon.,16,333-338,1969

134. SCANDALIOS,J.G.:Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants:a review. Biochem.Genetics,3,37-79,1969

135. SCANDALIOS,J.G.:Isozymes in development and differentiation. Annual Review of Plant Physiology,25,225-258,1974

136. SCANDALIOS,J.G.:Genes,isozymes and evolution. dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,IV,1-9,1975,Academic Press,New York

137. SCANDALIOS,J.G.;CAMPEAU,M.A.:Mutant aminopeptidases in Pisum.II.Nuclear gene control of a mitochondrial enzyme. Mutation Research,14,397-403,1972

138. SCANDALIOS,J.G.;ESPIRITU,L.G.:Mutant aminopeptidases of Pisum sativum. I.Developmental genetics and chemical characteristics. Molec.Gen.Genetics,105,101-112,1969

139. SCANDALIOS,J.G.;SORENSEN,J.C.;OTT,L.A.:Genetic control and intracellular localization of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. Biochem.Genetics,13,759-769,1975

140. SCHWARTZ,D.:$E_1$ esterase isozymes of maize,on the nature of the gene-controlled variation. Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,58,568-575,1967

141. SCOGIN,R.:Enzyme polymorphism in natural populations of the genus Baptisia (Leguminosae). Phytochemistry,8,1733-1737,1969

142. SCOGIN,R.:Leucine aminopeptidase polymorphism in the genus Lupinus (Leguminosae). Botanical Gazette,134,73-76,1973

143. SEQUEIRA,L.;MINEO,L.:Partial purification and kinetics of indolacetic acid oxidase from tobacco roots. Plant Physiology,41,1200-1208,1966

144. SHANNON,L.M.:Plant isoenzymes.
Ann.Rev.Plant Physiology,19,187-210,1968

145. SHAW,C.R.:How many genes evolve?
Biochem.Genetics,4,275-283,1970

146. SHEEN,S.J.:Peroxidases in the genus Nicotiana.
Theoret.Appl.Genetics,40,18-25,1970

147. SHINSHI,H.;NOGUCHI,M.:Relationship between peroxidase,IAAoxidase and polyphenoloxidase.
Phytochemistry,14,1255-1258,1975

148. SMITH,H.H.;HAMILL,D.E.;WEAVER,E.A.;THOMPSON,K.H.:Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among Nicotiana species and amphiploids.
J.Heredity,61,203-212,1970

149. SMITH,O.M.;SMITH,G.A.:An electrophoretic comparison of six species of Yucca and Hesperaloe.
Botanical Gazette,131,201-205,1970

150. SOMERO,G.N.:The role of isozymes in adaptation to varying temperatures.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,II,221-234,1975,Academic Press,New York

151. SOPANEN,T.;MIKOLA,J.:Purification and partial characterization of barley leucine aminopeptidase.
Plant Physiology,55,809-814,1975

152. SPLITTSTOESSER,W.A.;STEWART,S.A.:Distribution and isoenzymes of aspartate aminotransferase in cotyledons of germinating pumpkin.
Physiologia Plantarum,23,1119-1126,1970

153. SRIVASTAVA,O.P.;VAN HUYSTEE,R.B.:Evidence for close association of peroxidase, polyphenoloxidase and IAAoxidase isozymes of peanut suspension culture medium.
Canad.J.Botany,51,2207-2215,1973

154. STAFFORD,H.A.;BRAVINDER-BREE,S.:Peroxidase isozymes of first internodes of sorghum.
Plant Physiology,49,950-956,1972

155. STEER,W.:Evolution in the genus Avena:inheritance of different forms of ribulose diphosphate carboxylase.
Can.J.Genet.Cytol.,17,337-344,1975

156. TAKEO,K.:Aldolase isoenzymes of higher plants.
Phytochemistry,8,2127-2131,1969

157. TING,J.P.;FUHR,I.;CURRY,R.;ZSCHOCHE,W.C.:Malate dehydrogenase isozymes in plants:preparation,properties and biological significance.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,II,369-384,1975,Academic Press,New York

158 . TCHECHOV,B.P.:Examen caryologique des tribus Sophoreae Spreng.,Podalarieae Bent. et Genistae Bronn. des Leguminosae.
Isv.Tomsk.Ruski.Dom.,3,121-131,1931

159 . TSOLAS,O.:Isozymes of the pentose phosphate pathway.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,I,767-780,1975,Academic Press,New York

160 . UNGAR,I.A.;BOUCAUD,J.:Comparison of seed proteins in the genus Suaeda (Chenopodiaceae) by means of disc electrophoresis.
American J.Botany,61,325-330,1974

161 . VAN LEAR,D.H.;SMITH,W.H.:Soluble proteins and enzyme patterns in shoots of slash pine under different nutritional regimes.
Phytochemistry,9,1929-1932,1970

162 . VAUGHAN,J.G.;DENFORD,K.E.:An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of Brassica and Sinapis species,with special reference to their taxonomic value.
J.Experimental Botany,19,724-732,1968

163 . VIDAL,J.;CAVALIE,G.:Mise en évidence des formes isofonctionnelles de la PEPcarboxylase chez Phaseolus vulgaris.
Physiologie Végétale,12,175-188,1974

164 . WAGENAAR,S.;LUTGENBORG,F.F.: α-Isoamylases of rye seeds.
Phytochemistry,12,1243-1247,1973

165 . WALL,J.R.:Leucine aminopeptidase polymorphism in Phaseolus and differential elimination of the donor parent genotype in interspecific backcrosses.
Biochem.Genetics,2,108-118,1968

166 . WALL;J.R.;WALL,S.W.:Isozyme polymorphisms in the study of evolution in the Phaseolus vulgaris-P.coccineus complex of Mexico.
dans MARKERT,C.L. (ed.):Isozymes,IV,287-305,1975,Academic Press,New York

167 . WARDROP,A.J.;POLYA,G.M.:Properties of a soluble auxin-binding protein from dwarf bean seedlings.
Plant Science Letters,8,155-164,1977

168 . WELINDER,K.G.;SMILLIE,L.B.;SCHONBAUM,G.R.:Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase.I.Tryptic peptides.
Canad.J.Biochem.,50,44-62,1972

169 . WELINDER,K.G.;SMILLIE,L.B.:Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase.II.Thermolytic peptides.
Canad.J.Biochem.,50,63-90,1972

170 . WEST,N.B.;GARBER,E.D.:Genetic studies of variant enzymes.I.An electrophoretic survey of esterase and leucine aminopeptidase in the genus Phaseolus.
Canad.J.Genet.Cytol.,9,640-645,1967

171 . WEST,N.B.;GARBER,E.D.:Genetic studies of variant enzymes.II.The inheritance of esterases and leucine aminopeptidases in Phaseolus vulgaris x P.coccineus.
Canad.J.Genet.Cytol.,9,646-655,1967

172 . WHITNEY,P.J.;VAUGHAN,J.G.;HEALE,J.B.:A discelectrophoretic study of the proteins of Verticillium albo-atrum,V.dahliae and Fusarium oxysporum with reference to their taxonomy.
J.Exp.Botany,19,415-426,1968

173. WILKINSON,J.H.:Isoenzymes.
Chapman and Hall,London,1970

174. WYRAMBIK,D.;GRISEBACH,H.:Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl alcohol dehydrogenase from soybean cell suspension cultures.
Europ.J.Biochem.,59,9-15,1975

175. YOUNG,E.G.:A comparison of the soluble proteins in various species of algae by disc electrophoresis in polyacrylamide gels.
Phytochemistry,9,2167-2174,1970

# APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

PAGES

I ) EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES SOLUBLES ET PREPARATION DE FRACTIONS PARTIELLEMENT PURIFIEES DE DIFFERENTES ENZYMES 5

A) EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES SOLUBLES 5

B) PREPARATION D'EXTRAITS PARTIELLEMENT PURIFIES DES ENZYMES ETUDIEES 5

1) Précipitation au sulfate d'ammonium à 35% de saturation - obtention de $P_1$ 6

2) Précipitation au sulfate d'ammonium à 60% de saturation - obtention de $P_2$ 6

3) Précipitation au sulfate d'ammonium à 90% de saturation - obtention de $P_3$ 6

C) EXEMPLE DE PURIFICATION . 6

II ) ELECTROPHORESE EN DISQUES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE 7

A) PREPARATION DES SOLUTIONS 7

1) Système basique 7

a) Gel à 7% de polyacrylamide 7

b) Gel à 5% de polyacrylamide 8

c) Gel à 10% de polyacrylamide 9

2) Système acide 9

B) PREPARATION DES GELS 10

1) Système basique 10

a) Gel de séparation (7% de polyacrylamide) 10

b) Gel de séparation (5% ou 10% de polyacrylamide) 10

c) Gel de concentration 10

2) Système acide 11

a) Gel de séparation 11

b) Gel de concentration 11

C) DEPOT DE L'ECHANTILLON 11

D) ELECTROPHORESES 11

1) Système basique 11

2) Système acide 12

E) COLORATION DES GELS 12

1) Proteines 12

2) Leucine aminopeptidase 12

3) Estérase 12

4) Peroxydase 13

F) CALCUL DU $R_f$ 13

III ) CALCUL DE SIMILITUDE 14

IV ) ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE 14

V APPLICATION de la densitométrie 16

VI ) DETERMINATION DE LA CONCENTRATION PROTEIQUE 17

A) PREPARATION DES SOLUTIONS 17

B) ESSAI 17

C) COURBE ETALON 17

D) SPECIFICITE DE LA METHODE 18

VII ) DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES 18

A) LEUCINEAMINOPEPTIDASE (LAP) 19

1)Essai continu 19

a) Preparation des solutions 19

b) Essai enzymatique 19

c) Calcul de l'activité enzymatique 20

2) Essai discontinu 20

a) Préparation des solutions 20

b) Essai enzymatique 20

B) ESTERASE (Est) 21

1) Essai continu 21

a) Recherche du $pH_{max}$ de la réaction 21

b) Longueur d'onde maximale d'absorption du complexe coloré 21

c) Linéarité de la réaction par rapport à la quantité d'extrait 22

d) Determination du coefficient molaire de la densité optique 22

e) Linéarité de la réaction par rapport au temps 22

f) Concentration optimale de substrat 22

g) Décomposition autonome du substrat 22

h) Préparation de la solution colorante 23

i) Essai enzymatique 23

k) Calcul de l'activité enzymatique 23

2) Essai discontinu 23

a) Préparation des solutions 23

b) Essai enzymatique 23

C) PEROXYDASE 24

1) Essai continu 24

a) Préparation des solutions 24

b) Essai enzymatique 24

c) Calcul de l'activité enzymatique 25

2) Essai discontinu 25

a) Préparation des solutions 25

b) Essai enzymatique 25

D) OXYDASE DE L'ACIDE β-INDOLYLACETIQUE (AIA-oxydase) 26

1) Préparation des solutions 26

2) Essai enzymatique 26

3) Calcul de l'activité enzymatique 26

VII( ) FOCALISATION ISOELECTRIQUE PREPARATIVE (FIP) 27

A) APPAREIL ; 27

1) Preparation des solutions 27

a) Solution dense d'électrode DE 27

b) Solution légère d'électrode LE 27

c) Solution dense D 28

d) Solution légère L 28

e) Solution de lavage 28

2) Remplissage de la colonne 28

3) Séparation électrophorétique 28

4) Elution de la colonne 29

5) Analyse des fractions 29

a) Mesure du pH 29

b) Mesure de la densité optique 29

c) Mesure de l'activité enzymatique 30

d) Analyse par éléctrophorèse en disque 30

e) Analyses des Isozymes isolées 30

6) Les Ampholines dans les fractions obtenues 30

7) La quantité protéique déposée dans la colonne 31

8) Exemple d'application de la FIP à l'étude d'isozymes végétales 31

a) Analyse de l'activité estérasique dans la colonne 32

b) Analyse des fractions par électrophorèse en disque 32

c) Influence d'un traitement à 80°C sur les 4 isoestérases 33

ABREVIATIONS UTILISEES DANS L'APPENDICE TECHNIQUE . 34

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE . 35

## I. - EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES SOLUBLES ET PREPARATION DE FRACTIONS PARTIELLEMENT PURIFIEES DE DIFFERENTES ENZYMES.

### A - Extraction des protéines totales solubles :

L'extraction (fig. T1) des protéines solubles totales est modifiée selon McCOWN et al. (18) et ROUGE (26). Le matériel végétal congelé est broyé en présence d'un tampon TRIS-HCL 0,1 M pH 7,5, de dithiothréitol (DTT) 0,5 mM et de polyvinylpolypyrrolidone (PVP) insoluble (1 g/g de tissu végétal). Le dithiothréitol (4) est nécessaire pour la protection des groupements -SH, le PVP insoluble (15) complexe les polyphénols très abondants quantitativement dans les tissus étudiés. En absence de ces deux protecteurs l'extrait protéique brunit rapidement par oxydation des phénols libérés lors du broyage, puis ces polyphénols contractent des liaisons avec les protéines, ce qui fausse considérablement l'analyse protéique.

Après broyage l'extrait protéique est séparé des débris tissulaires et du PVP insoluble par filtration sur verre fritté (porosité G 1) et par centrifugation à 20 000 g pendant 30 mn dans une centrifugeuse réfrigérée CHRIST Universal Junior II KS. Toutes ces opérations sont effectuées à +4°C, dans un matériel préalablement refroidi. Le surnageant obtenu est vert clair transparent dans le cas de l'extraction des protéines du tissu chlorophyllien. Il est utilisé directement (extrait brut) en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Dans le cas des isozymes, qui seront analysées par focalisation isoélectrique préparative, une purification partielle des enzymes est nécessaire.

### B - Préparation d'extraits partiellement purifiés des enzymes étudiées :

La purification d'une enzyme montrant des formes isozymatiques est difficile si on ne connait pas la nature exacte de chaque isozyme. Les propriétés physico-chimiques de ces isozymes étant très différentes, on ne peut pas employer des méthodes de fractionnement qui séparent les protéines suivant leur charge ou leur taille moléculaire afin d'obtenir un extrait des isozymes totales. Ainsi nous avons dû nous contenter de fractionnement successif au sulfate d'ammonium. L'activité des isoleucine-aminopeptidases et des isoestérases se concentre dans la même étape de fractionnement. Après chaque fractionnement on contrôlera par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide la présence des isozymes précédemment observées dans l'extrait brut.

1 - Précipitation au sulfate d'ammonium à 35 % de saturation - obtention de P 1 : Du sulfate d'ammonium solide est ajouté dans l'extrait protéique brut jusqu'à 35 % de saturation (pour 50 ml d'extrait brut 10 g de sulfate d'ammonium). L'extrait est abandonné pendant 30 mn sous agitation douce ; le précipité formé est récupéré par centrifugation (15 000 g pendant 10 mn) et repris dans du tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,5. Ce précipité n'a qu'une faible activité pour les enzymes analysées et sert surtout à éliminer les protéines non-actives et des composés non-protéiques.

2 - Précipitation au sulfate d'ammonium à 60 % de saturation - obtention de P 2: Le surnageant de la première précipitation est repris et additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 60 % de saturation (10 g $(NH_4)_2SO_4$ supplémentaire par 50 ml) et la précipitation est réalisée dans les mêmes conditions que pour le précipité P1. Le précipité P2 est riche en activité leucine-aminopeptidasique et estérasique.

3 - Précipitation au sulfate d'ammonium à 90 % de saturation - obtention de P 3: En ajoutant encore 10 g $(NH_4)_2SO_4$ solide par 50 ml d'extrait (90 % de saturation de sulfate d'ammonium) on obtient après précipitation et centrifugation le précipité P 3 qui contient la plus grande partie de l'activité peroxydasique.

Avant analyse par focalisation isoélectrique préparative (FIP) chaque précipité repris dans le tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,5 est dialysé pendant une nuit contre de l'eau bidistillée pour éliminer la plupart des ions qui gènent la FIP.

C - Exemple de purification :

Nous donnons un exemple de purification obtenue pour les trois enzymes étudiés à partir d'un seul extrait brut en comparant l'activité totale dans l'extrait brut et dans chaque étape de purification.

| | ACTIVITE TOTALE ENZYMATIQUE (µmole/min) | | |
|---|---|---|---|
| | Peroxidase (pH 7,0) | Estérase | Leucineaminopeptidase |
| Extrait brut | 19,400 | 14,800 | 0,280 |
| $P_1$ | 0,447 | 1,015 | 0,012 |
| $P_2$ | 1,170 | 7,620 | 0,140 |
| $S_2$ | 23,100 | 4,430 | 0,078 |
| $P_3$ | 11,900 | - | - |
| $S_3$ | 9,95 | - | - |

Tableau I. - Comparaison des activités enzymatiques pendant le fractionnement.

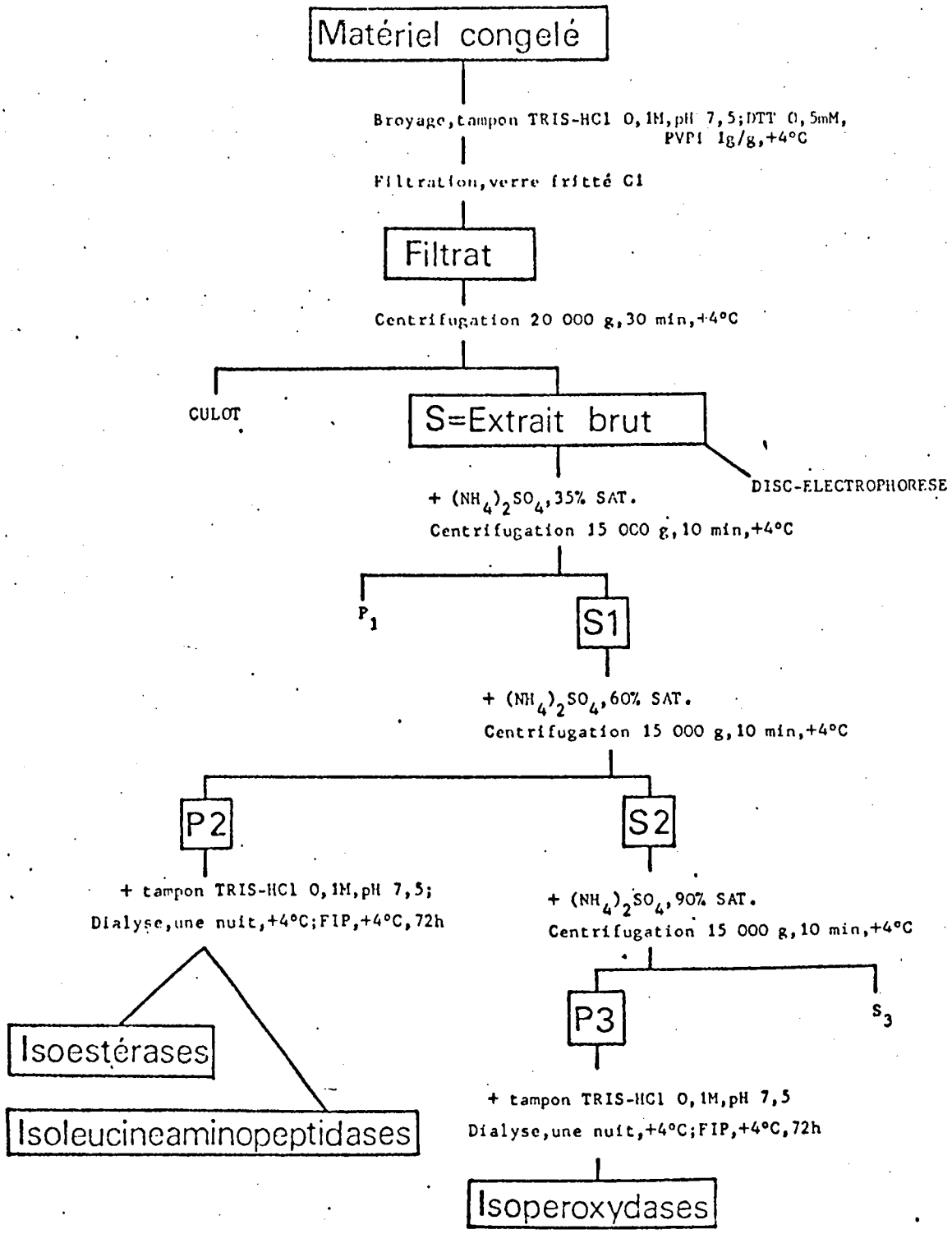



Figure T 1. - Schéma d'extraction des protéines et enzymes étudiées.

Le taux de purification de chaque préparation peut être déterminé à partir de l'activité spécifique calculée par rapport à la concentration protéique.

| | ACTIVITE SPÉCIFIQUE (µmole / mg.min) | | |
|---|---|---|---|
| | Peroxidase | Estérase | Leucineaminopeptidase |
| Extrait brut | 0,610 | 0,258 | 0,00440 |
| $P_1$ | 0,056 | 0,152 | 0,00146 |
| $P_2$ | 0,091 | 0,592 | 0,01085 |
| $P_3$ | 10,400 | - | - |
| Taux de purification | 17,0 | 2,3 | 2,5 |

Tableau II. - Activité spécifique des différentes enzymes dans les étapes de purification.

## II. - ELECTROPHORESE EN DISQUES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

La séparation analytique des protéines et enzymes est réalisées par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide selon la technique d'ORNSTEIN et DAVIS d'après MAURER (17). Nous avons utilisé des systèmes basiques ou acides suivant les protéines à séparer.

### A - Préparation des solutions :

1- Système basique

a) Gel à 7 % de polyacrylamide :

- Solution 1 :

| | | |
|---|---|---|
| HCl 1 N | 48,0 | ml |
| TRIS* | 36,6 | g |
| TEMED | 0,23 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

* *Pour les abréviations utilisées, voir la liste page T*

- Solution 2 :

| | | |
|---|---|---|
| Acrylamide | 28,0 | g |
| BIS | 0,735 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 3 :

| | | |
|---|---|---|
| Persulfate d'ammonium | 0,14 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 4 :

| | | |
|---|---|---|
| HCl 1 N | 48,0 | ml |
| TRIS | 5,98 | g |
| TEMED | 0,46 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 5 :

| | | |
|---|---|---|
| Acrylamide | 10,0 | g |
| BIS | 2,5 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 6 :

| | | |
|---|---|---|
| Riboflavine | 4,0 | mg |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 7 :

| | | |
|---|---|---|
| Saccharose | 40,0 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Tampon d'électrodes I pH 8,3 :

| | | |
|---|---|---|
| TRIS | 6,0 | g |
| Glycine | 28,8 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 1000 | ml |
| à diluer à 1/10 avant l'emploi | | |

b) Gel à 5 % de polyacrylamide :

La solution 2a remplace la solution 2.

- Solution 2a :

| | | |
|---|---|---|
| Acrylamide | 20,0 | g |
| BIS | 0,5 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

c) Gel à 10 % de polyacrylamide :

La solution 2b remplace la solution 2.

- Solution 2b :

| | | |
|---|---|---|
| Acrylamide | 40,0 | g |
| BIS | 1,0 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

2) Système acide :

Solutions pour un gel à 7 % de polyacrylamide :

- Solution 8 :

| | | |
|---|---|---|
| KOH 1N | 48,0 | ml |
| Acide acétique conc. | 17,2 | ml |
| TEMED | 4,0 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 9 :

| | | |
|---|---|---|
| Persulfate d'ammonium | 0,28 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 10 :

| | | |
|---|---|---|
| KOH 1N | 48,0 | g |
| Acide acétique conc. | 2,87 | ml |
| TEMED | 0,46 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Tampon d'électrodes II pH 4,5 :

| | | |
|---|---|---|
| Alanine | 31,2 | g |
| Acide acétique conc. | 8,0 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 1000 | ml |
| à diluer à 1/10 avant l'emploi. | | |

Les solutions 2, 5 et 6 du système basique sont également employées pour les gels acides.

Toutes les solutions sont stockées à l'abri de la lumière, à +4 °C, les solutions 3, 7 et 9 sont renouvelées chaque semaine.

B - Préparation des gels :

Les gels sont préparés dans des tubes en verre (longueur 75 mm, diamètre inférieur 5 mm).

1) Système basique :

a) Gel de séparation (7 % de polyacrylamide) :

Le mélange est préparé immédiatement avant la préparation des gels et dégazé à l'aide d'une trompe à vide pour éviter la formation de bulles d'air dans le gel. La quantité préparée dépend du nombre de gel.

- Mélange :

| | |
|---|---|
| Solution 1 | 1 volume |
| Solution 2 | 2 volumes |
| Eau bidistillée | 1 volume |
| Solution 3 | 4 volumes |

Les tubes, placés dans un support, sont remplis avec le mélange à l'aide d'une seringue sur une hauteur de 5,5 mm. Une goutte d'eau bidistillée est déposée à la surface du mélange afin d'obtenir une surface plane après polymérisation. Celle-ci a lieu à température ambiante pendant 30 mn puis l'eau est éliminée à l'aide d'un papier filtre.

b) Gel de séparation (5 % ou 10 % de polyacrylamide) :

Pour la préparation des gels à 5 % ou 10 % de polyacrylamide, la solution 2 du mélange est remplacée respectivement par la solution 2a ou 2b.

c) Gel de concentration :

Le mélange est préparé à l'abri de la lumière dans les proportions suivantes :

| | |
|---|---|
| Solution 4 | 1 volume |
| Solution 5 | 2 volumes |
| Solution 6 | 1 volume |
| Solution 7 | 4 volumes. |

Sur le gel de séparation on dépose le mélange jusqu'à une hauteur de app. 8 mm. Puis après dépôt d'une goutte d'eau bidistillée à la surface du mélange et la photopolymérisation a lieu pendant 30 mn, à température ambiante, devant une lampe fluorescente. L'eau est enlevée immédiatement avant le dépôt de l'échantillon.

2) Système acide :

Le mode de préparation des gels ne change pas, seule la préparation des mélanges respectifs sera modifiée :

a) Gel de séparation : Mélange :

| | |
|---|---|
| Solution 8 | 1 volume |
| Solution 2 | 2 volumes |
| Eau bidistillée | 1 volume |
| Solution 9 | 4 volumes. |

b) Gel de concentration : Mélange :

| | |
|---|---|
| Solution 10 | 1 volume |
| Solution 5 | 2 volumes |
| Solution 6 | 1 volume |
| Eau bidistillée | 4 volumes |

C - Dépôt de l'échantillon :

Suivant la nature et la concentration des protéines à analyser 0,01 ml à 0,15 ml d'échantillon sont déposé sur chaque gel. L'extrait brut est amené à une concentration de saccharose de 20 % avec du saccharose solide avant le dépôt afin d'éviter tout mélange avec le tampon d'électrophorèse. Les fractions obtenues par focalisation isoélectrique préparative sont analysées telles qu'elles car elles proviennent d'une colonne en gradient de saccharose et contiennent dans tous les cas une concentration suffisante de saccharose.

Dans le cas où les fractions obtenues par FIP constituent l'échantillon à déposer, le volume de l'échantillon sera important en raison de leur très faible concentration protéique. Un gel de concentration à larges pores sera indispensable pour l'obtention de bandes fines.

Au-dessus de l'échantillon chaque tube est rempli complètement par le tampon d'électrophorèse.

D - Electrophorèse :

L'électrophorèse a lieu dans une cuve BUCHLER réfrigérée à +4°C reliée à une alimentation BUCHLER 3-1014A qui permet de contrôler la tension et le courant pendant la séparation.

1) Système basique :

- Conditions électrophorétiques :

| | |
|---|---|
| Courant | 2,5 mA/gel |
| Polarité | Haut - / Fond + |

Marqueur du front : bleu de bromophenol (dans le tampon de la cuve supérieure)

2) Système acide :

- Conditions électrophorétiques :

| | |
|---|---|
| Courant | 4 mA/gel |
| Polarité | Haut + / Fond - |

Marqueur du front : Bleu de méthylène (dans le tampon d'électrophorèse de la cuve supérieure).

Le courant est coupé quand le marqueur du front a migré jusqu'à 5 mm de la base des gels. Les gels sont retirés des tubes de verre à l'aide d'une seringue remplie d'eau bidistillée dont on introduit l'aiguille en effectuant une rotation de cette aiguille entre le tube et le gel.

E - Coloration des gels :

1) Protéines :

La coloration des protéines est réalisée par ~~xxxxxxxxx~~ immersion des gels pendant 1 h, dans une solution d'Amidoschwarz 10B à 0,5 % dans l'acide acétique à 7 %. La décoloration est effectuée électrophorétiquement dans l'acide acétique à 7 % pendant 15 mn dans un CANALCO Quick Gel Destainer. Les gels peuvent être conservés pendant quelques semaines dans l'acide acétique à 7 %.

2) Leucine-aminopeptidases :

Les leucine-aminopeptidases sont colorées par incubation des gels dans la solution colorante (27) jusqu'à apparition de bandes bleues (30-60 mn).

- Solution colorante :

| | | |
|---|---|---|
| Tampon acétate 0,2 M, pH 4,4 | 100 | ml |
| L-Leucyl- β-naphthylamide HCl | 20 | mg |
| Fast Black K | 25 | mg |
| (Sel de diazonium de 4-Amino-2,5-Dimethoxy-4'-Nitroazobenzène) | | |

La couleur se développe par couplage du naphthol, libéré par l'action des leucine-aminopeptidases, avec le sel de diazonium.

Après coloration, les gels sont conservés dans l'acide acétique à 7 %.

3) Estérases :

Les estérases sont mises en évidence par incubation des gels dans la solution colorante (modifié après 26) jusqu'à apparition de bandes rouges (15-30 mn).

- Solution colorante :

| | |
|---|---|
| Eau bidistillée | 94 ml |
| Tampon Phosphate-citrate 0,2 M, pH 5,8 | 4 ml |
| 1-Naphthylacétate (1 % dans l'acétone) | 2 ml |
| Fast Blue B | 50 mg |
| (Sel de diazonium d'o-dianisidine) | |

La réaction est basée sur le même principe que celle des LAP. D'autres substrats sont également utilisés : l'1-Naphthylacétate est remplacé par 2-Naphthylacétate, 2-Naphthylpropionate et autres sels de naphthol.

Les gels sont également conservés dans l'acide acétique à 7 %.

4 - Peroxydases :

Les gels sont immergés dans la solution colorante modifiée après PUTTER (21) en présence du gaiacol comme substrat.

- Solution colorante :

| | |
|---|---|
| Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0 | 100 ml |
| Solution acétique de gaiacol | |
| . gaiacol | 0,2 ml |
| . acide acétique à 10 % | 25 ml |
| $H_2O_2$ à 3 % | 20 ml |

Ce mélange est préparé juste avant emploi. Assez rapidement (10-20 mn) des bandes brunes sur fond incolore apparaissent. La longueur de migration de chaque bande doit être mesurée rapidement parce que la coloration est fugace et disparaît après une heure de coloration.

E - Calcul du Rf :

Le calcul du Rf n'est pas établi selon la formule simple d'un rapport de migration de chaque bande à la migration du front, mais nous avons retenu une formule plus complexe qui nous permet la détermination du Rf dans tous les cas, même si éventuellement le front de migration restait invisible après coloration enzymatique (ce qui rendait l'établissement d'un rapport simple impossible (25)).

$$Rf = \frac{L_1 \times X}{L_2 \times F}$$

où :

$L_1$ - Longueur totale du gel non-coloré

$L_2$ - Longueur totale du gel coloré

X - Longueur de migration de la bande protéique dans le gel coloré

F - Longueur de migration du front dans le gel non-coloré.

III. - CALCUL DE SIMILITUDE.

Le coefficient de similitude entre les différentes formes d'Ulex analysées est calculé selon la formule de SORENSEN (28). Dans notre travail, ce coefficient n'a été appliqué qu'aux bandes protéiques :

$$S\ (\%) = \frac{2 \times C}{N}\ 100$$

où C - Nombre de bandes communes aux deux formes comparées

N - Nombre total de bandes des deux formes comparées.

IV. - ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE.

Le poids moléculaire de certaines protéines peut être estimé par électrophorèse en gel de polyacrylamide à des concentrations différentes de polyacrylamide (17, 25). Dans ce cas les conditions électrophorétiques étant strictement identiques, la charge des molécules n'intervient pas, seul le tamis formé par le gel de polyacrylamide sera responsable des différences de migration observées pour une même protéine dans ces gels. Cette méthode ne s'applique qu'aux protéines globulaires à condition qu'elles puissent pénétrer dans un gel assez concentré (PM inférieur à 200 000) et que leur charge leur permette une migration dans le système d'électrophorèse employé.

Nous avons retenu quelques protéines de références pour caractériser nos systèmes d'électrophorèse employés :

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1) | Albumine bovine | PM | 67 000 |
| 2) | Alcool déshydrogénase (ADH) | PM | 150 000 |
| 3) | Ribonucléase | PM | 13 683 |

La ribonucléase ne convient pas à nos systèmes, mais l'albumine et l'ADH donnent plusieurs bandes : les bandes des produits dimères, ce qui nous permet de comparer plusieurs composés avec des PM différents.

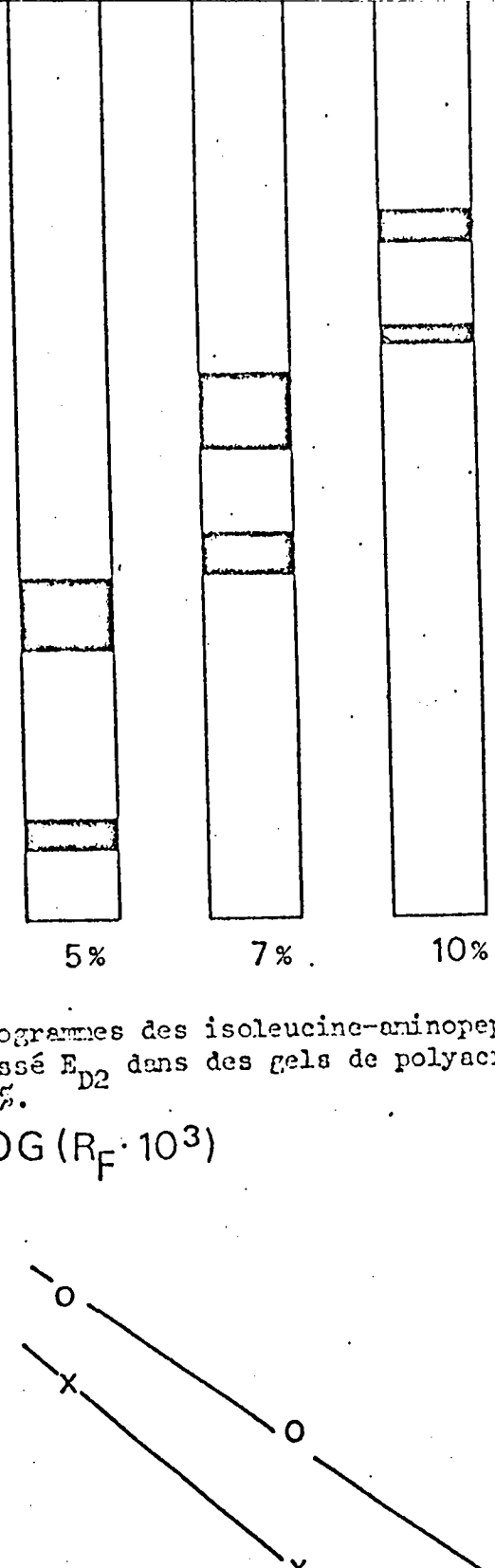



Figure T 2. - Zymogrammes des isoleucine-aminopeptidases d'*Ulex europacus* dressé $E_{D2}$ dans des gels de polyacrylamide de 5 %, 7 % et 10 %.

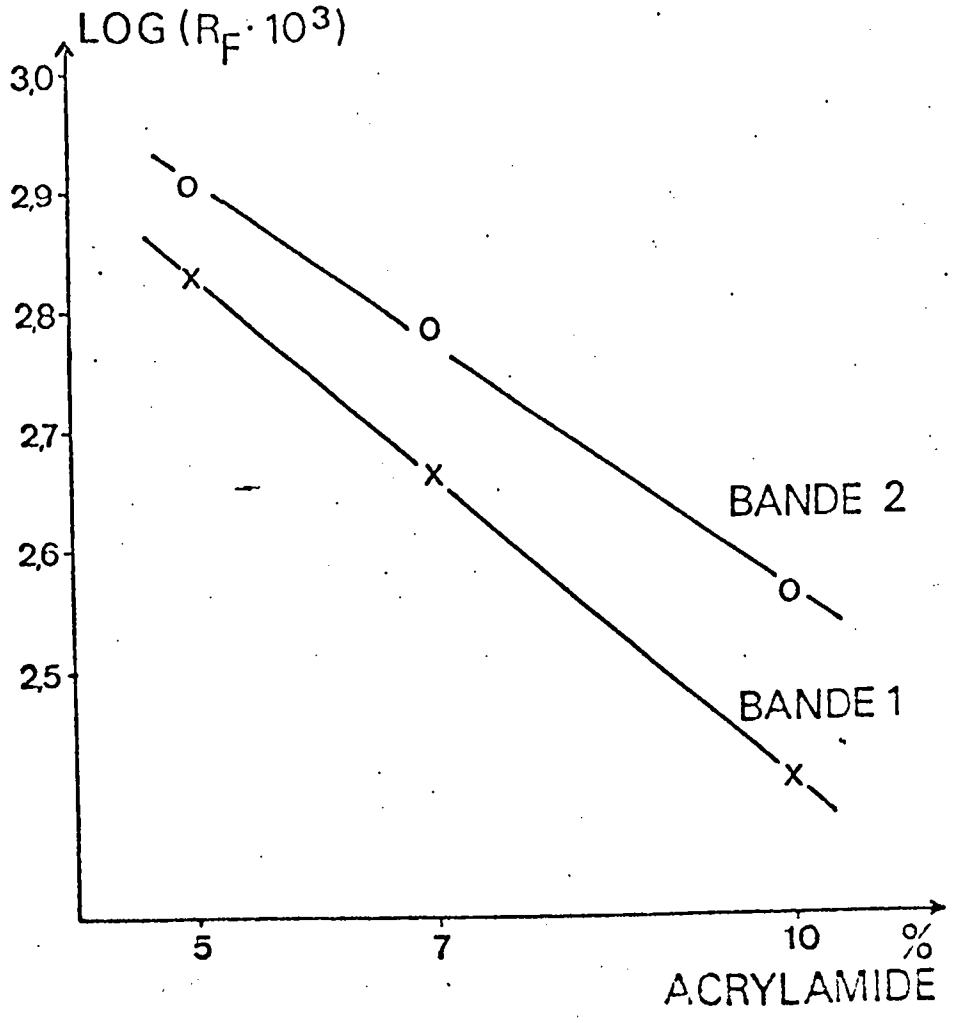



Figure T 3. - Contrôle de la linéarité des courbes en fonction du log Rf des 2 isoleucine-aminopeptidases en fonction de la concentration d'acrylamide

Nous avons utilisé une formule simplifiée pour estimer le rapport entre le PM et le Rf, dans cette formule :

$$\log m_1/m_2 = k_1.PM + k_2$$

$m_1$ - mobilité dans un gel de concentration x

$m_2$ - mobilité dans un gel de concentration y

Les constantes $k_1$ et $k_2$ sont fonction de la porosité du gel. Pour des protéines de PM et de Rf connus, on peut par la détermination des constantes $k_1$ et $k_2$ de systèmes électrophorétiques bien définis, évaluer le PM des molécules inconnues.

Exemple :

| PROTEINE | gel à 7 % | | gel à 10 % | | $\log m_1/m_2$ | PM |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R_f$ | $\log R_f \times 10^3$ | $R_f$ | $\log R_f \times 10^3$ | | |
| Albumine monomère | 0,667 | 2,830 | 0,437 | 2,640 | 0,190 | 67 000 |
| Albumine dimère | 0,434 | 2,637 | 0,214 | 2,330 | 0,307 | 134 000 |
| Isozyme LAP (U.gallii) | 0,446 | 2,649 | 0,244 | 2,388 | 0,261 | ? |

Pour cet exemple on obtient pour :

$$k_1 = \frac{67\,000}{0,117}$$

$$k_2 = -42\,000,$$

ce qui donne comme PM pour l'isozyme de LAP :

$$PM = 0,261 \frac{67\,000}{0,117} - 42\,000 = 107\,000$$

Chaque PM donné comme résultat correspond à la moyenne de détermination obtenue en comparant des protéines différentes de références à une même protéine recherchée.

En comparant le logarithme du Rf d'une protéine par rapport à la concentration en acrylamide on devrait obtenir une droite. La figure T 2 correspond aux zymogrammes des leucine-aminopeptidases dans des gels à concentrations variables d'acrylamide (5 %, 7 %, 10 %), la figure T 3 indique le logarithme du Rf par rapport à la concentration d'acrylamide, effectivement les courbes obtenues sont des droites dans le cas des deux bandes observées.

Certes, la méthode n'est pas très précise mais elle l'est suffisamment pour donner un ordre d'idée de la taille d'une molécule examinée, surtout en tenant compte du temps nécessaire pour établir un PM, il s'agit ici d'une méthode très rapide. Dans notre cas où nous examinons la mobilité de protéines dans des gels de densité différente, elle nous donne une estimation du PM par un calcul simple sans exiger la recherche d'autres techniques.

V - Densitométrie :

Les bandes électrophorétiques (protéique et enzymatique) sont évaluées quantitativement par densitométrie des gels par un spectrophotomètre ZEISS PMQ 2 couplé à un enregistreur Servogor et un dispositif de support et transport pour les gels de polyacrylamide. Les longueurs d'ondes utilisées diffèrent suivant la coloration des gels :

| | |
|---|---|
| - protéines (coloration à l'Amidoschwarz) | 650 nm |
| - LAP | 660 nm |
| - estérase | 530 nm |
| - peroxydase | 436 nm. |

La densitométrie permet à l'aide d'un intégrateur, la détermination quantitative de chaque pic.

Pour les gels riches en bandes cette détermination quantitative est impossible, les pics n'étant pas complètement séparés. Cette technique est surtout intéressante dans son application aux LAP, enzymes qui ne forment qu'un faible nombre d'isozymes.

V. - DETERMINATION DE LA CONCENTRATION PROTEIQUE.

La concentration protéique est déterminée d'après la méthode modifiée de LOWRY (23).

A - Préparation des solutions :

- Solution 1 :

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2CO_3$ | 2 | g |
| NaOH 1 N q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 2 :

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4$ $5H_2O$ | 0,5 | g |
| Tartrate de sodium | 1 | g |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- Solution 3 :

Mélanger 1 ml de la solution 2 avec 50 ml de la solution 1.

- Solution 4 :

Réactif de Folin (commercial) dilué avec de l'eau bidistillée jusqu'à la concentration 1 N.

B - Essai :

L'essai est effectué dans des tubes à essai dans lesquels on pipette successivement :

- 0,1 ml de la solution protéique (qui contient entre 10 et 100 µg de protéines)
- 1,0 ml de la solution 3. On laisse réagir pendant 10 mn à température ambiante puis on ajoute :
- 0,1 ml de la solution 4 en agitant vigoureusement et on laisse reposer 30 mn à température ambiante.
- 0,5 ml d'eau bidistillée sont ajoutés pour obtenir un volume suffisamment grand pour permettre la mesure de la DO dans des cuves optiques de 1 cm de parcours optique.

La densité optique (DO) est mesurée à 750 nm. La valeur de la concentration protéique correspondante est calculée à l'aide d'une courbe étalon établi avec la serum-albumine bovine.

C - Courbe étalon :

L'essai de LOWRY ne donne pas un rapport linéaire entre la densité optique et la concentration protéique. Ainsi il ne suffit pas de partir d'une

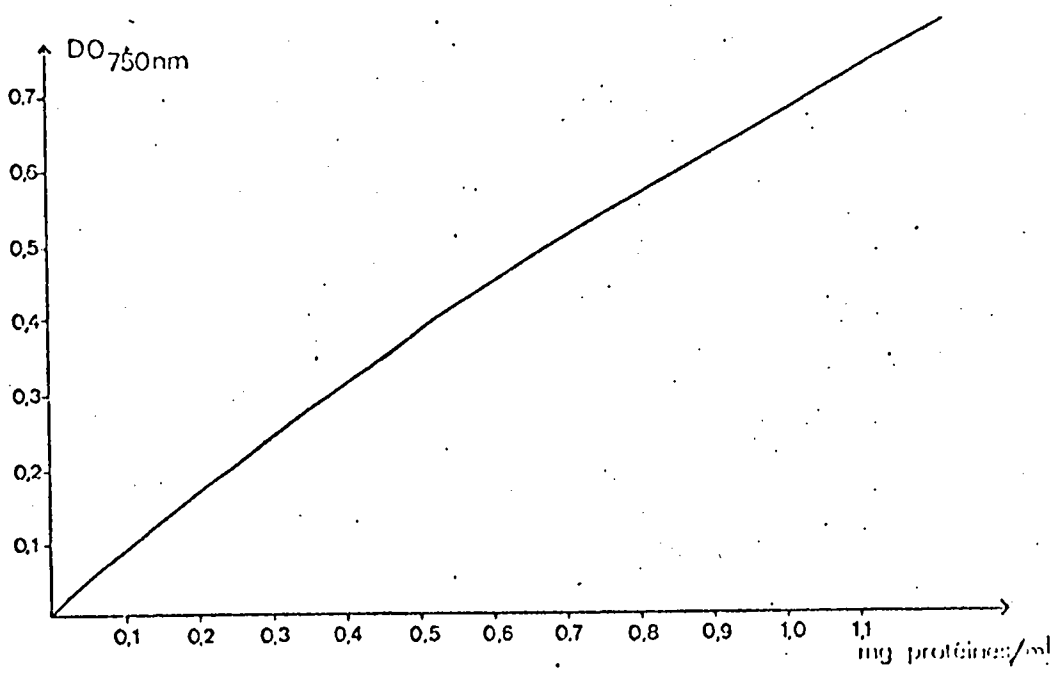



Figure T 4. - Courbe étalon de la concentration protéique par rapport à la DO suivant la méthode de LOWRY avec sérum albumine bovine comme standard.

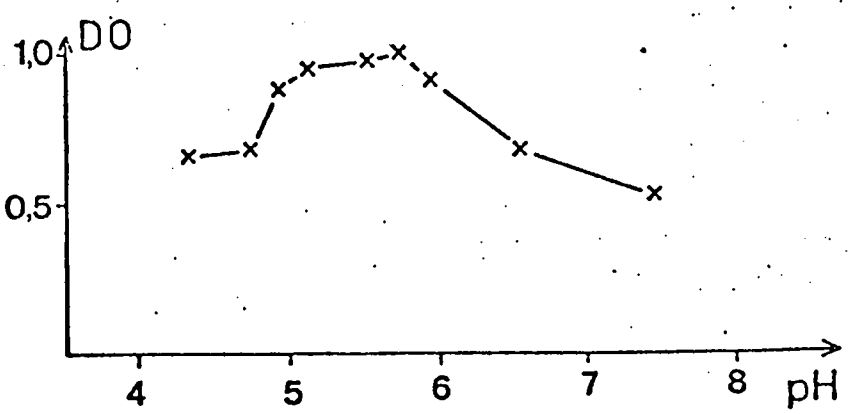



Figure T 5. - Influence du pH sur l'activité estérasique de l'extrait brut.

valeur calculée sur un échantillon de concentration protéique connue, de calculer un facteur de transformation"DO/concentration protéique", mais il faut établir une courbe étalon avec de la sérum albumine-bovine comme référence (figure T 4).

D - Spécificité de la méthode :

La méthode utilisée présente trois désavantages importants qu'il faut prendre en considération lors de son utilisation (12, 25) qui sont :

1 - l'absence d'un rapport linéaire entre la concentration protéique et la densité optique. Ce désavantage peut être pallié par l'emploi d'une courbe d'étalon ;

2 - les résultats varient en fonction des protéines utilisées. Ce désavantage ne peut pas être compensé mais il est indispensable de nommer la protéine qui a servi à l'établissement de la courbe étalon ;

3 - sa faible spécificité. La réaction étant basée sur la réaction des acides aminés aromatiques, des substances aromatiques (phénols, tryptophane) interviennent. Dans l'analyse des précipités (précipitations au sulfate d'ammonium) nous avons constaté l'inconvénient des concentrations élevées au sulfate d'ammonium. La détermination de la concentration protéique dans les fractions obtenues par FIP est rendue impossible car les Ampholines interfèrent également avec la réaction.

Mais cette méthode a été utilisée en raison de sa grande sensibilité, app. 100 fois plus sensible que la méthode de BIURET et 10 fois plus sensible que la mesure de la densité optique à 280 nm ; elle est intéressante dans notre travail, [illegible] en raison de la faible concentration protéique des extraits.

VI. - DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

Pour la détermination des activités enzymatiques, nous avons utilisé des méthodes photométriques, en suivant le changement de densité optique pendant un certain temps (spectrophotomètre MAROC II, JOBIN et YVON) à l'aide du coefficient molaire de densité optique du produit de la réaction ; ce changement de DO nous permet de calculer les moles de substrats transformés par minute. L'activité est donc exprimée en µmole/mn, pour une valeur plus générale on se réfère à une quantité déterminé d'extrait (µmole/ml.mn). Après détermination de la concentration protéique de l'extrait, l'activité spécifique peut être exprimée en µmole/mg protéines.mn.

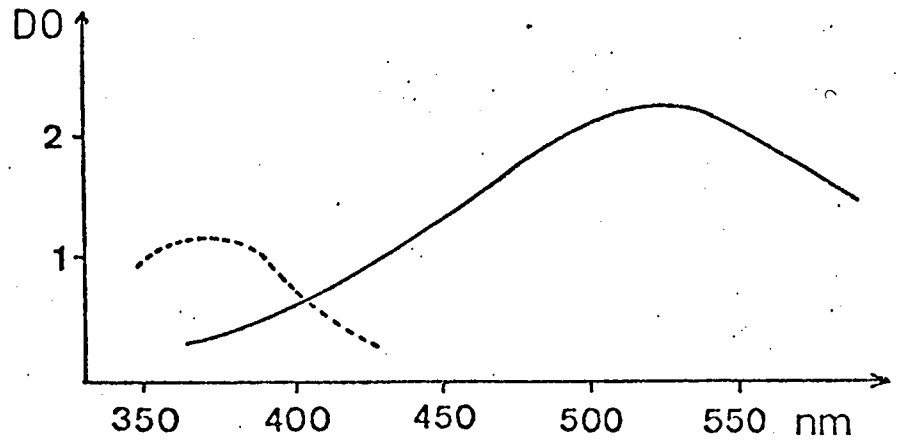



Figure T 6. - Spectre du complexe coloré avant (---) et après (___) l'action des estérases.

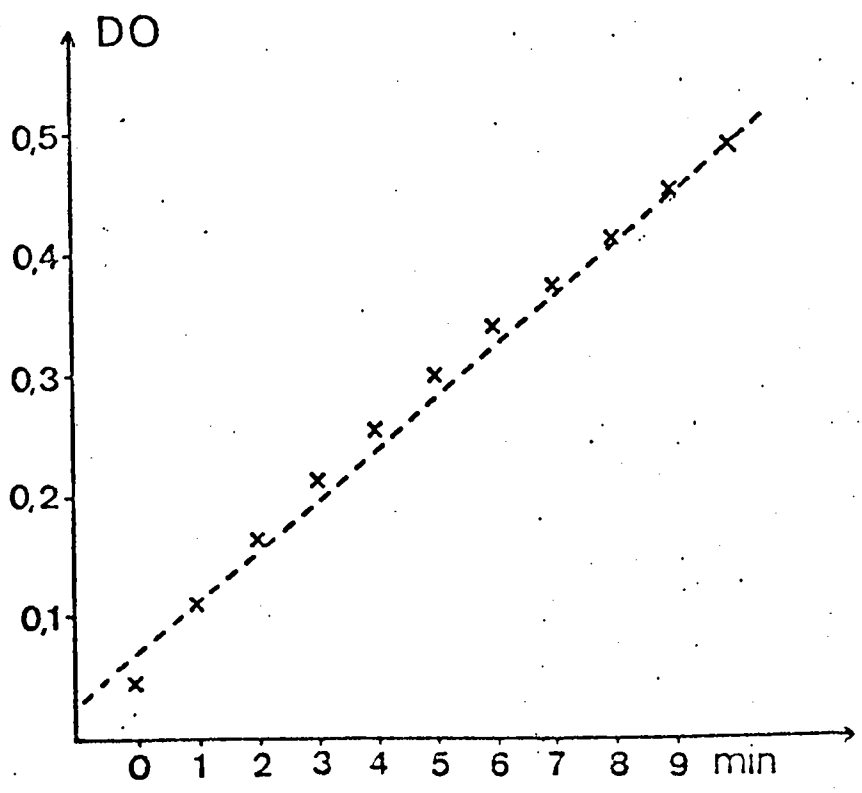



Figure T 7. - Linéarité de la formation du complexe coloré sous l'action des estérases par rapport au temps de réaction.

Pour chaque enzyme nous avons d'abord recherché le $pH_{max}$ de la réaction, qui est donc le pH indiqué dans les essais enzymatiques ci-dessous.

Pour analyser l'influence du pH sur l'activité enzymatique dans l'extrait brut ou de celle des isozymes isolées, le tampon indiqué est remplacé par d'autres tampons de même molarité à des pH différents : de pH 4 à 5 nous utilisons des tampons acétate, de pH 5 à 7 des tampons phosphate, de pH 7 à 8 des tampons TRIS-HCl et au-dessus de pH 8 des tampons TRIS-glycine.

Pour étudier l'influence de la température une partie aliquote de chaque extrait est traitée pendant un temps déterminé à la température indiquée et son activité enzymatique sera ensuite déterminée.

A) LEUCINEAMINOPEPTIDASE (LAP) :

1)Essai continu :

L'essai colorimétrique modifié selon Appel (1) est basé sur l'hydrolyse de L-Leucine-p-nitranilide. On determine l'apparition du p-Nitrophenol libre à 405 nm.

a)Préparation des solutions:

-Solution 1:

Tampon TRIS-HCl 50 mM, pH 7,2

-Solution 2:

| | | |
|---|---|---|
| L-Leucine-p-nitranilide | 30,2 | mg |
| solution 1 q.s.p. | 100 | ml |

Les solutions sont conservées à +4°C.

b)Essai enzymatique

On pipette dans des cuves en verre:

| | |
|---|---|
| Solution 2 | 2,00 ml |
| Echantillon | 1,00 ml |

Au moment où l'échantillon est ajouté, le chronomètre est déclenché et on mesure la densité optique toutes les 15 sec pendant 6 min à 405 nm, à température ambiante. L'échantillon est dilué avec de l'eau bidistillée suivant son activité. Pour l'analyse de l'extrait brut, 0,2 ml sont en général suffisant pour donner un changement de DO important (0,1 à 0,3 unité de DO pendant 6 min).

c) Calcul de l'activité enzymatique :

d (parcours optique) = 1 cm

$\varepsilon$ (coefficient de DO à 405 nm) = 9,62 $cm^2/\mu mole$

$V_t$ (volume total) = 3,00 ml

$V_E$ (volume de l'échantillon) = suivant la dilution

$\Delta DO/min$ (changement de DO par min) = établi par mesure

A (activité enzymatique)

$$A = \frac{V_t}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \Delta DO/min \quad (\mu mole/min, ml)$$

La décomposition autonome du substrat dans les conditions de l'essai est déterminée ~~dans un essai~~ avec de l'eau comme échantillon. Cet essai donne une activité de $0,173 \cdot 10^{-3}$ µmole/ml, min, cette valeur dont il est soustraite de chaque activité.

2) Essai discontinu :

Pour permettre une determination rapide d'un nombre élevé d'échantillon (fractions obtenues par focalisation isoélectrique préparative par exemple) nous avons expérimenté un essai discontinu basé sur la même réaction que celle déjà utilisée dans la coloration des LAP sur gel de polyacrylamide.

a) Préparation des solutions

Nous utilisons la solution colorante employée pour la coloration des gels (voir page T ) dont nous rappellons ici la composition:

| | | |
|---|---|---|
| Tampon acétate 0,2 M, pH 4,4 | 100 | ml |
| L-Leucyl-β-naphthylamide HCl | 20 | mg |
| Fast Black K | 25 | mg |

Cette solution est préparée immédiatement avant l'emploi.

b) Essai enzymatique :

Un tube à essai est rempli de:

| | |
|---|---|
| échantillon | 0,5 ml |
| solution colorante | 1,0 ml. |

A température ambiante, la réaction a lieu et peut être contrôlée visuellement par le développement d'une couleur bleue. Après un temps suffisamment long pour le développement de la couleur (app. 2 h) la réaction est arrêtée en ajoutant

0,5 ml d'acide acétique concentré par tube. La densité optique est mesurée à 660 nm (longueur d'onde maximale du complexe coloré) contre un essai effectué avec de l'eau bidistillée comme échantillon.

Cette méthode ne nous donne pas une valeur de l'activité précise mais elle nous permet de localiser rapidement l'activité enzymatique dans les fractions obtenues par FIP (les valeurs obtenues sont comparables pour les fractions d'une même colonne). Dans le cas où les échantillons possèdent une activité, cette activité enzymatique sera exactement mesurée par l'essai continu, ce qui permet de comparer l'activité initiale dans la colonne et l'activité résiduelle que présentent les différentes fractions.

L'activité déterminée selon ces deux méthodes montre une proportion fixe et les isozymes isolées réagissent avec les deux substrats, ainsi la même enzyme réagit avec les deux substrats employés.

B - Estérase (Est) :

L'essai enzymatique colorimétrique des estérases est établi selon une réaction basée sur l'utilisation d'un substrat telle que nous l'avons employée pour la coloration des gels ; ceci évite la difficulté de l'emploi de deux substrats différents pour une même enzyme.

1) Essai continu :

Pour tester l'utilité de cette réaction lors d'un essai enzymatique continu (le couplage du produit de la réaction à un autre composé peut fausser les rapports d'activité) nous avons effectué plusieurs essais préliminaires. Selon PILZ (20) on peut extraire le colorant insoluble par des solvants, mais pour les activités relativement faibles comme celles présentées par les tissus chlorophylliens, cette méthode n'est pas assez sensible. Mais nous avons pu obtenir une solution dans laquelle le colorant est dans une suspension tellement fine qu'elle permet la mesure directe du changement de densité optique.

Expériences nécessaires pour déterminer les conditions de l'essai :
a) Recherche du pH max. de la réaction : la figure T 5 montre la courbe obtenue pour des pH différents. Ainsi les activités ont été mesurées à pH 5,8. Cette valeur s'éloigne un peu des pH utilisés par d'autres auteurs (7, 19, 27), app. pH 7,0.

b) Longueur d'onde maximale d'absorption du complexe coloré : le complexe formé est de couleur rouge, mais comme la

solution colorante avant la réaction est également de couleur légèrement rose, nous avons déterminé les maxima d'absorption des deux colorations pour voir s'ils ne se superposent pas. La solution colorante, avant la réaction, montre un maximum d'absorption à 370 nm (fig.T6), après la réaction, le maximum se trouve à 530 nm, longueur d'onde ou la solution colorante avant la réaction ne montre pas d'absorption, ainsi nos mesures d'activités peuvent être determiné à 530 nm.

c) Linéarité de la réaction par rapport à la quantité d'extrait :

Les changements de densité optique obtenus avec une série de dilution d'un échantillon montrent une proportionalité directe avec la quantité d'enzymes, cette proportionalité existe évidemment seulement pour des activités pas trop importantes, c'est-à-dire des activités qui montre un changement linéaire de la densité optique par rapport au temps.

d) Determination du coefficient molaire de la densité optique :

Pour pouvoir exprimer l'activité, mesurée en µmoles de substrat transformé, il faut connaitre le coefficient molaire de densité optique. Celui-ci peut être determiné avec des concentrations connues de naphthols, pour un pH 5,8 et à 530 nm, nous avons obtenu une valeur de 5,2 $cm^2$/umole.

e) Linéarité de la réaction par rapport au temps :

L'activité estérasique est linéaire par rapport au temps entre la première et la sixième minute de réaction (fig.T7). Ce délai est alors utilisé pour la détermination d'activité.

f) Concentration optimale de substrat :

Pour tester si la concentration du substrat dans la solution colorante est optimale, nous avons fait des essais avec des concentrations plus importantes de substrat, l'activité mesurée n'étant pas plus importantes cela indique que la concentration du substrat dans la solution colorante est optimale.

g) Décomposition autonome du substrat :

Pour un essai effectué avec de l'eau comme échantillon on obtient une activité de $6,33.10^{-3}$ µmole/mn.ml. La faiblesse de cette activité est telle par rapport aux activités déterminées dans les extraits protéiques, qu'elle est négligeable.

Après ces essais préliminaires l'activité a été déterminée comme nous l'expliquons ci-dessous :

h.) Préparation de la solution colorante :

La coloration a lieu à partir des mêmes solutions que celle des gels (voir page T 12), nous rappelons ~~ici~~ ci-après la composition de la solution colorante.

Solution colorante:

| | | |
|---|---|---|
| Eau bidistillée | 94 | ml |
| Tampon phosphate-citrate 0,2 M, pH 5,8 | 4 | ml |
| α-Naphthylacétate (1% ds l'acétone w/v) | 2 | ml |
| Fast Blue B | 50 | mg |

i.) Essai enzymatique

Des cuves optiques sont remplies avec:

| | | |
|---|---|---|
| Solution colorante | 2 | ml |
| Echantillon | 0,1 | ml |

Le chronomètre est déclenché au moment ou l'extrait est ajouté et la densité optique est mesurée toutes les 15 sec, pendant 6 min, à 530 nm, à température ambiante.

k.) Calcul de l'activité enzymatique :

| | |
|---|---|
| d (parcours optique) | = 1 cm |
| $\varepsilon$ (coefficient de DO) | = 5,2 $cm^2/\mu mole$ |
| $V_t$ (Volume total) | = 2,1 ml |
| $V_E$ (Volume d'échantillon) | = 0,1 ml |
| $\Delta$DO/min (changement de DO par min) | = à déterminer |

$$A = \frac{V_t}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \Delta DO/min = 4,04\ \Delta DO/min \quad (\mu mole/ml \cdot min)$$

2) Essai discontinu :

Pour les mêmes raisons que pour les LAP nous avons recherché un essai discontinu.

a) Préparation des solutions :

La solution colorante est la même que celle de l'essai continu (voir ci-dessus), elle est ensuite diluée avec de l'aau bidistillée dans les proportions 1:1.

b) Essai enzymatique :

Des tubes à essai sont remplis de:

| | |
|---|---|
| solution colorante diluée | 1 ml |
| échantillon | 0,5ml |

Après un temps assez court (app. 10 mn) une couleur rouge se développe dans les tubes dont l'échantillon possède une activité enzymatique. La réaction est arrêtée en ajoutant 0,5 ml d'acide acétique concentré par tube et la densité optique est mesurée contre un essai contenant de l'eau bidistillée. Comme pour les LAP, cet essai est seulement utilisé comme moyen rapide de détection de l'activité enzymatique, pour une détermination plus précise l'ssai continu est utilisé.

C) PEROXYDASE :

L'activité peroxydasique est déterminée selon PUTTER (21) en présence de gaiacol et d'$H_2O_2$ comme substrats. Les concentrations de substrats ont été doublées parce qu'elles ne correspondaient pas à une concentration optimale. On mesure l'apparition de la forme oxydée de gaiacol à 436 nm. Selon PUTTER, le gaiacol est un substrat spécifique des peroxydases et il n'est pas oxydé par des phénoloxydases.

1) Essai continu :

a) Préparation des solutions :

- solution 1
  tampon acétate 0,1 M, pH 4,8

- solution 2 :
  gaiacol 40,2 mM:

| | | |
|---|---|---|
| Gaiacol | 0,45 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

- solution 3 :
  $H_2O_2$ 24,6 mM:

| | | |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ à 30 % | 0,28 | ml |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

Les solutions sont conservées à +4°C et les solution 2 et 3 sont renouvelées chaque semaine.

b) Essai enzymatique :

Dans une cuve optique on mélange:

| | | |
|---|---|---|
| solution 1 | 3,00 | ml |
| solution 2 | 0,05 | ml |
| solution 3 | 0,03 | ml |
| échantillon | 0,10 | ml |

Après addition de l'échantillon, le chronomètre est déclenché et la densité optique est mesurée toutes les 15 s, pendant 6 mn,

à 436 nm, à température ambiante. La variation de densité optique est linéaire jusqu'à une valeur de 0,2 /min. Pour une activité plus importante il faut diluer l'échantillon.

c) Calcul de l'activité enzymatique :

d (parcours optique) = 1 cm

$\varepsilon$ (coefficient de DO à 436 nm) = 6,39 $cm^2/\mu mole$

$V_t$ (volume total) = 3,18 ml

$V_E$ (volume d'échantillon) = 0,1 ml

$$A = \frac{V_t}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \Delta DO/min = 4,98 \ \Delta DO/min \ (\mu mole/ml \cdot min)$$

Avec ~~de~~ l'eau on obtient une valeur de 0,001 µmole /ml·min, valeur qui peut être négligée par rapport aux activités obtenues.

2) Essai discontinu :

A partir de l'essai continu nous avons préparé un essai discontinu.

a) Préparation des solutions :

Les solutions employées sont les mêmes que celles de l'essai continu (voir page T ). A partir de ces solution on prépare le réactif.

Réactif:

| | |
|---|---|
| Solution 1 | 90,0 ml |
| Solution 2 | 1,5 ml |
| Solution 3 | 1,0 ml |

b) Essai enzymatique :

On mélange dans des tubes à essai:

| | |
|---|---|
| Réactif | 1,0 ml |
| Echantillon | 0,5 ml |

Après un temps de réaction suivi par le developpement d'une couleur jaune dans les tubes (app. 10 min), la réaction est stoppée en ajoutant à chaque tube 0,5 ml d'acide acétique concentré.

La densité optique à 436 nm est déterminée pour chaque essai contre un témoin (eau bidistillée). Les limites de cette méthode reposent sur les mêmes remarques précédemment faites lors de l'analyse des LAP et EST.

L'inhibiteur de peroxydase est étudié par un essai effectué à pH 7,0. Le tampon acétate 0,1 M, pH 4,8 est alors remplacé par un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0.

D) OXYDASE DE L'ACIDE β-INDOLYLACETIQUE (AIA-OXYDASE) :

L'activité d'AIA-oxydase est mesurée par un essai modifié selon Machačkova (16). L'activité enzymatique nécessite la présence d'un effecteur (2,4-Dichlorophenol).

1) Préparation des solutions :

- solution 1 :
  tampon phosphate-citrate 0,05 M, pH 5,8 ; $Mn^{2+}$ 0,1 mM

- solution 2 :

| | | |
|---|---|---|
| Acide β-indolylacétique (2 mM) | 7 | mg |
| Alcool absolu q.s.p. | 20 | ml |

- solution 3 :

| | | |
|---|---|---|
| 2,4-Dichlorophénol (1 mM) | 16,3 | mg |
| Eau bidistillée q.s.p. | 100 | ml |

2) Essai enzymatique :

Dans une cuve optique en quartz on mélange:

| | | |
|---|---|---|
| Solution 1 | 2,00 | ml |
| Solution 2 | 0,20 | ml |
| Solution 3 | 0,10 | ml |
| Echantillon | 0,20 | ml |

Le chronomètre est déclenché dès l'addition de ~~en ajoutant~~ l'échantillon et la densité optique est mesurée tous les 15 sec, pendant 6 min, à 247 nm à température ambiante.

3) Calcul de l'activité enzymatique :

Lors de l'essai des AIA-oxydases on ne connait pas le coefficient molaire de densité optique du produit de la réaction (β-méthylèneoxindole), ainsi l'activité mesurée est exprimée en DO / cm, min.

| | |
|---|---|
| d (parcours optique) | = 1 cm |
| $V_t$ (volume total) | = 2,5 ml |
| $V_E$ (volume d'échantillon) | = 0,2 ml |

$$A = \frac{V_t}{d \cdot V_E} \cdot \Delta DO/min = 12 \cdot \Delta DO/min \text{ cm}$$

## VII) FOCALISATION ISOELECTRIQUE PREPARATIVE

La focalisation isoelectrique est une technique qui sépare les protéines suivant leurs charges dans un gradient de pH formé à l'aide des Ampholines sous l'influence d'une haute tension. A la fin de la séparation chaque protéine se situe à l'endroit du gradient où sa charge est nulle, c'est-à-dire à son point isoélectrique $pK_i$ (2,5-13,24). Ainsi, par cette technique, on ne sépare pas seulement des protéines mais on détermine en même temps une constante physico-chimique de chaque protéine. Les Ampholines (commercialisé par LKB) sont un mélange d'acides aminocarboxylés aliphatiques (29,10) avec des points isoélectriques continus dans une gamme de pH définie.

### A) APPAREIL

La focalisation isoélectrique a lieu dans une colonne UNIPHOR LKB 7900 (fig. 78)(14). La colonne est stabilisée contre la convection par un gradient de saccharose. L'appareil comprend : une colonne en verre réfrigerée à +4°C, munie aux deux extrémités de chambres d'électrodes, qui sont en contact avec l'intérieur de la colonne pendant la séparation mais qui peuvent en être séparé ~~d'elle~~ par deux obturateurs mobiles.

#### 1) Préparation des solutions :

Le remplissage de la colonne a lieu à partir d'une solution dense et d'une solution légère de saccharose et d'Ampholines et de deux solutions d'électrodes (dense et légère).

La cathode est situé en haut de la colonne dans le cas d'une gamme d'Ampholine qui commence en dessous de 6, dans l'autre cas la cathode doit être placée en bas ce qui empêche des précipitations en haut de la colonne (14).

a) solution dense d'électrode (DE) ;

| | |
|---|---|
| acide phosphorique conc. | 0,7 ml |
| $H_2O$ bidistillée | 49 ml |
| saccharose | 42 g |

b) solution légère d'électrode (LE) :

| | |
|---|---|
| NaOH | 0,56 g |
| $H_2O$ bidistillée | 70 ml |

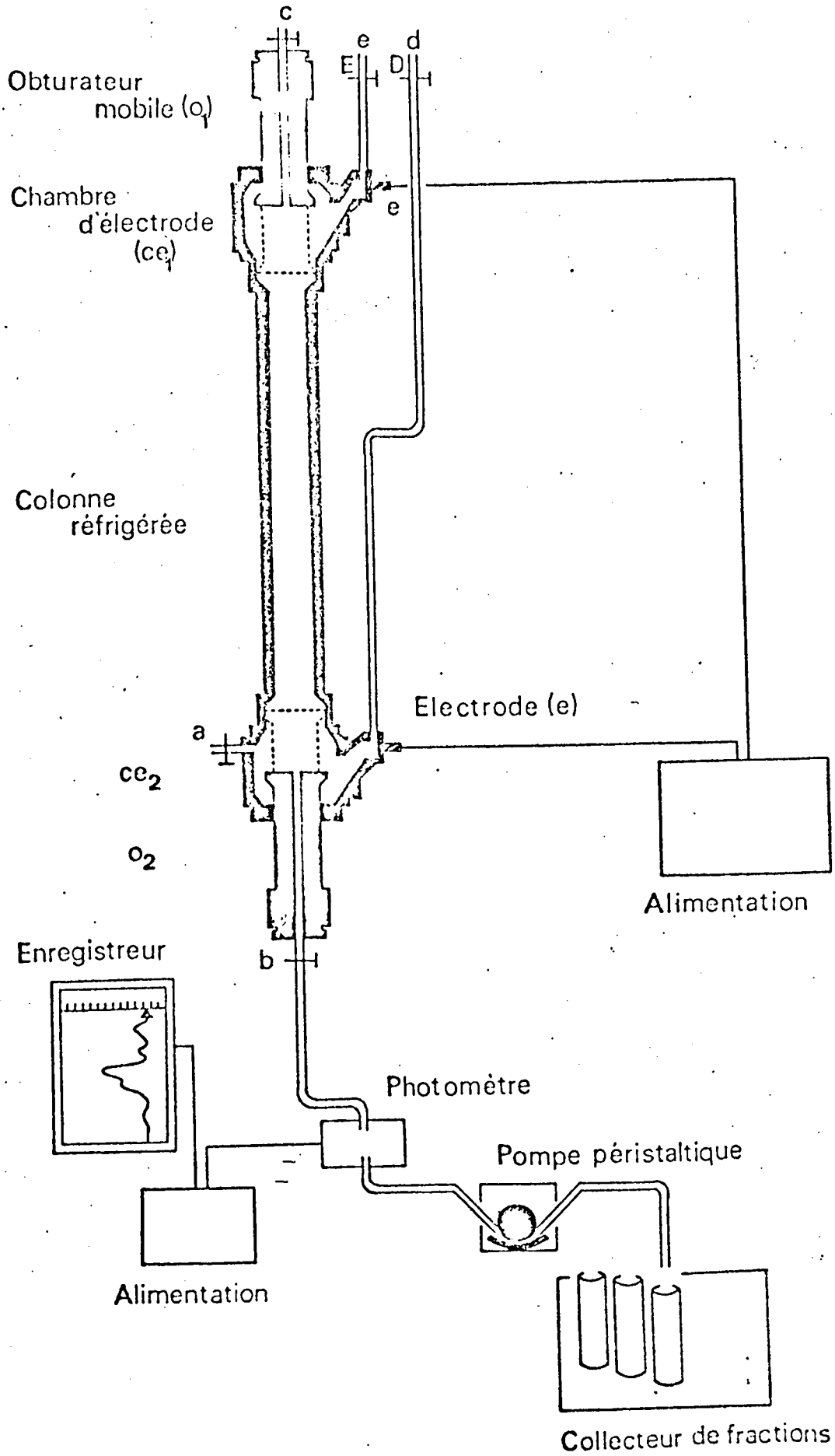



**Figure T 8.** - Schéma de l'appareil LKB 7900 pour la focalisation isoélectrique préparative.

c) solution dense (D) :

$H_2O$ bidistillée à 1% d'Ampholine de la gamme de pH choisi (pH 3-10 ou pH 4-6) 75 ml

saccharose 50 g

d) solution légère (L) :

$H_2O$ bidistillée à 1% d'Ampholine de la gamme de pH choisi 100 ml

e) solution de lavage :

$H_2O$ bidistillée 38 ml

saccharose 20 g

2) Remplissage de la colonne :

Au début du remplissage l'obturatueur mobile ~~du haut~~ de la partie supérieure $o_1$ est enlevé, l'obturateur ~~du bas~~ de la partie inférieure $o_2$ se trouve en position basse. Par l'ouverture de la chambre d'électrode ~~du bas~~ $ce_2$ est remplie avec la solution (DE). Ensuite l'obturateur $o_2$ est poussé en position haute, isolant ainsi cette chambre d'électrode ~~est isolée de la~~ colonne. Le surplus de la solution (DE) situé dans la colonne est vidé par l'ouverture b, dont le tuyau est ainsi complètement rempli de liquide. La colonne est rincée deux fois avec la solution de lavage (vidée par l'ouverture a). Ensuite des deux recipients du mélangeur de gradient LKB 8122 placés au-dessus de la colonne, sont remplies respectivement avec la solution dense et légère. A la solution légère on ajoute, à ce moment, l'extrait protéique dialysé, dilué avec de l'eau bidistillée à 10 ml. Puis le gradient de saccharose se forme dans la colonne. Après remplissage l'obturateur mobile $o_1$ est introduit complètement. Le reste de la solution DE est versée dans le tuyau d'équilibre D par l'ouverture d. Le tuyau de l'ouverture b trempe dans la solution de lavage et l'obturateur $o_2$ est abbaissé lentement. A ce moment, la chambre d'électrodes du bas se trouve en contact avec l'intérieur de la colonne. Le tuyau d'équilibre D est rempli d'eau bidistillée jusqu'à 20 cm du haut et fermé. L'obturateur $o_1$ est levé et par l'ouverture e la chambre d'électrode du haut $ce_1$ est remplie par la solution LE jusqu'à 20 cm du haut du tuyau d'équilibre E. A ce moment le tuyau D est ouvert et un équilibre se forme entre le gradient et la pression de l'air.

3) Separation électrophorétique

Par l'alimentation LKB 3371 D une haute tension est appliquée aux chambres d'électrodes. La valeur de cette tension ainsi que la durée de la focalisation dépendent de la gamme d'Ampholine utilisée (tableau III).

| Gamme de pH | Tension | Temps de séparation |
|---|---|---|
| 3 - 10 | 500 V | 48 h |
| 5 - 8 | 800 V | 72 h |
| 7 - 10 | 800 V | 72 h |
| 4 - 6 | 800 V | 72 h - 96 h |

Tableau III: Tension appliquée et temps de séparation pour les différentes gammes de pH utilisées

La tension doit être augmentée lentement jusqu'à la valeur nécessaire afin de ne jamais excéder 3 W (et empêcher ainsi des échauffements locaux dans la colonne)(10,11).

En règle générale, la séparation est accomplie quand le courant ne diminue plus, ~~quand il n'y a plus~~ de molécules chargées ~~qui~~ ne migrent plus dans la colonne, c'est-à-dire quand chaque molécule se situe à l'endroit de son point isoélectrique dans le gradient de pH formé.

4) Elution de la colonne :

A la fin de la séparation, la tension est coupée, les deux tuyaux d'équilibre sont fermés et les deux obturateurs mobiles sont rabattus (en ouvrant respective l'ouverture a et c). Ensuite le tuyau de l'ouverture b est relié à une pompe péristaltique LKB 12 000, l'ouverture c est ouverte et l'élution a lieu avec un débit de 1 ml/min. L'éluat est analysé pour son absorption à 280 nm (qui est enregistrée par un enrégistreur 6520-4 de LKB) par un photomètre à flux continu LKB UVICORD II 8300. Les fractions de 2,5 ml sont ~~recoltées~~ recueillies dans un collecteur de fraction LKB ULTRORAC 7000 à +4°C.

5) Analyse des fractions :

a) Mesure du pH :

Le pH de chaque fraction est déterminé à la température de la séparation (+4°C) (3) avec un pH -mètre METROHM E300B. Il est important de respecter la température parce que le pH ~~change~~ varie avec la température.

b) Mesure de la densité optique :

La densité optique à 260 nm et 280 nm est determinée pour chaque fraction (Spectrophotomètre MAROC II, Jobin et Yvon, lampe à hydrogène, cuves en quartz). Les valeurs obtenues ~~n'indiquent pas~~ ne correspondent pas directement à la concentration protéique car les Ampholines montrent également une absorption à ces longueurs d'ondes.

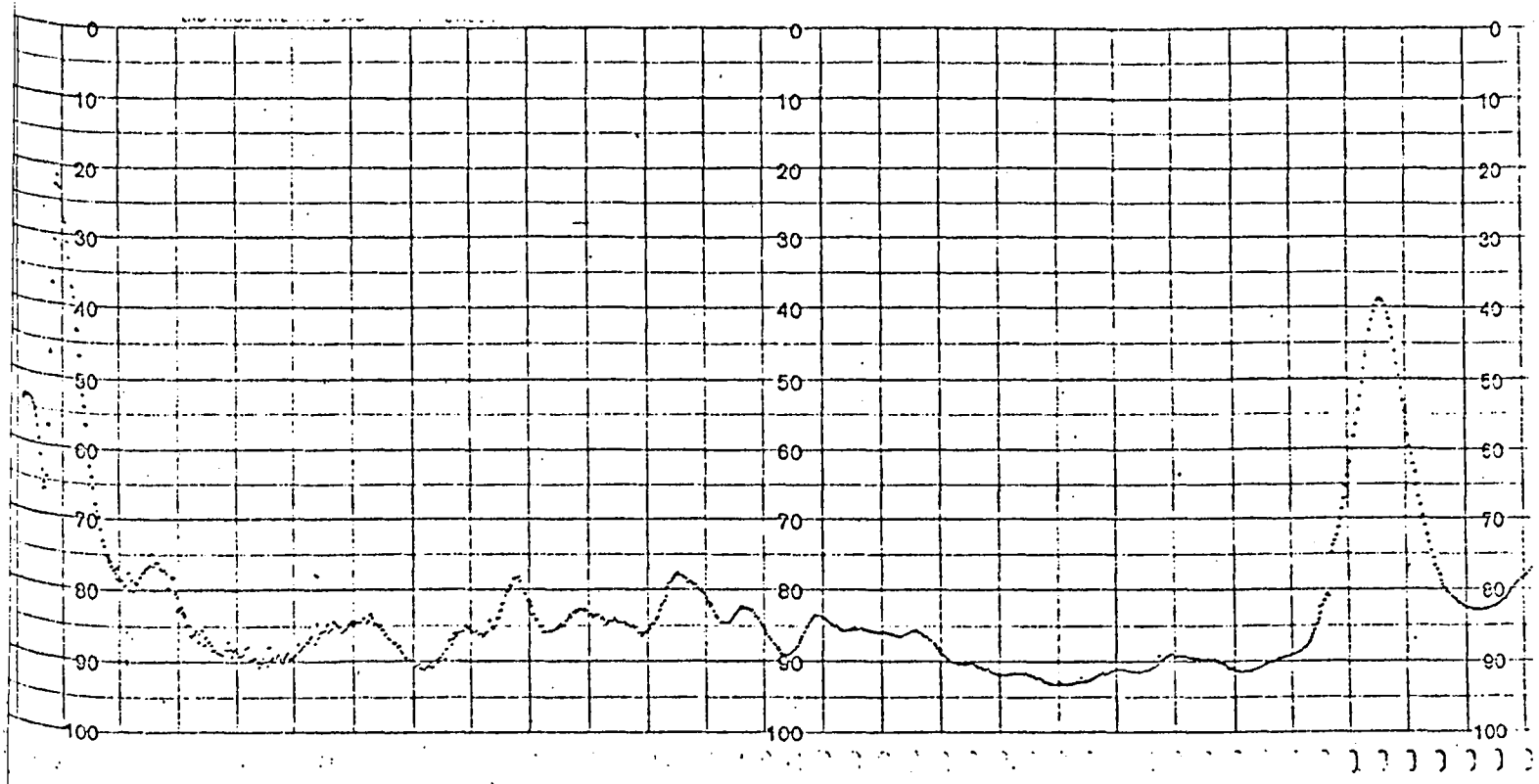


Figure T 9. - Schéma d'élution d'une colonne de FIP (expérience n° 137) obtenu par un photomètre UVICORD à 280 nm (vitesse de déroulement du papier 60 mm/h, vitesse de la pompe péristaltique 60 ml/h.

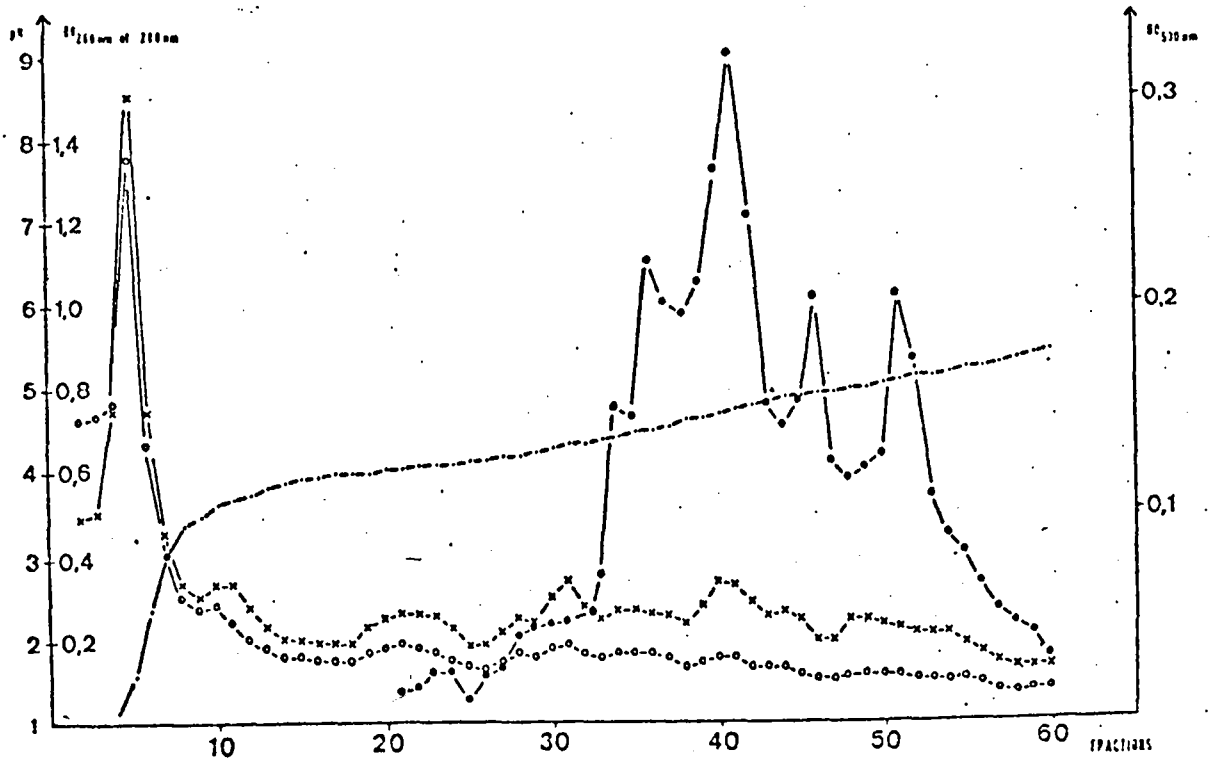



Figure T. 10. - Schéma d'élution de l'expérience 137 :

-x- $DO_{260\ nm}$

O $DO_{280\ nm}$

● $DO_{530\ nm}$ (activité estérasique)

---pH

Cette densité optique peut être déterminé par une focalisation " à blanc" (sans dépôt protéique), elle n'est pas identique à chaque endroit de la colonne, mais dépend du pH de la fraction.

c) Mesure de l'activité enzymatique :
Par l'essai discontinu, l'activité enzymatique de l'enzyme analysée est determiné dans chaque fraction (voir partie des méthodes de détection des activités enzymatiques). Les fractions à activité importante sont analysées par l'essai continu et l'activité exacte est déterminée.

d) Analyse par électrophorèse en disque :
Les fractions à activité importante sont analysées par électrophorèse en disques sur gel de polyacrylamide pour relier les pics obtenus par focalisation aux bandes enzymatiques observées sur gel dans l'analyse de l'extrait brut.

e) Analyses des isozymes isolées :
Les isozymes sont analysées par leurs comportements relatifs aux changements de température et de pH par les essais enzymatiques expliqués ci-dessus.

6) Les Ampholines dans les fractions obtenues :

Les Ampholines sont présentes dans chaque fraction obtenue par FIP. Dans le cas d'une analyse des protéines elles doivent être éliminées. Par leur caractère proche de celui des protéines, elles gènent la détermination de la concentration protéique (par mesure de la DO et aussi par la méthode de LOWRY) dans les fractions. Pour les séparer on peut proposer deux méthodes qui se sont révélées d'application facile :
- dialyse
- chromatographie d'exclusion (Sephadex G 50).
La dialyse exige une durée assez longue en raison du PM des Ampholines (1000-1500) (9,10), par contre la chromatographie sur Sephadex permet une séparation rapide mais elle s'accompagne d'une dilution de l'échantillon.

Dans nos fractions, suivant la quantité protéique déposée dans une colonne, la concentration protéique est très faible (quelques µg/ml). Ainsi l'analyse des fractions a plutôt été basée sur l'activité enzymatique que sur la concentration protéique. Pour l'analyse enzymatique la mesure des Ampholines ne dérangent pas, car elles ne forment pas de liaisons avec les protéines (9) (les bandes protéiques sur le gel se trouvent au même niveau avant et après FIP, c'est-à-dire que le PM n'a pas changé pendant la séparation) et ne montrent pas

d'activité enzymatique (les fractions sans enzymes ne montrent pas d'activité enzymatique).

7) La quantité protéique déposée dans une colonne :

La quantité protéique déposée sur une colonne dépend de la gamme de pH employée et de la nature protéique. Pour une préparation assez homogène, il faut déposer une quantité très faible ( app. 1 mg); pour une préparation plus hétérogène le depôt peut être plus important (jusque 10 mg). Car un dépôt trop important d'une seule protéine, entraine sa précipitation à son point isoélectrique en raison de l'insolubilité relative des protéines à leur pki. Les précipités sont plus lourds que le gradient de saccharose, ils vont alors descendre plus bas dans la colonne, à un endroit où ne se trouvant plus à leur pki, les protéines sont alors plus solubles et entrent en solution pour migrer vers le pH qui correspond à leur pki où elles précipitent de nouveau et ainsi de suite (6,22). Ainsi, pour les protéines qui sont "précipitées" la détermination de leur pki est impossible car elles se trouvent toujours à plusieurs endroits dans la colonne dont un seul correspond à leurs pki.

8) Exemple d'application de la FIP à l'étude d'isozymes végétales :

| | |
|---|---|
| Expérience No.: | 137 |
| Forme d'Ulex analysée: Ulex europaeus couché | $E_C$ |
| Quantité de matériel végétal | 5 g |
| Quantité d'extrait brut | 56 ml |
| Enzyme analysée: Estérase | Est |
| Etape de purification utilisée | $P_2$ |
| Quantité de $P_2$ avant dialyse | 5 ml |
| Activité specifique dans $P_2$ | 0,64 µmole/mg min |
| Activité totale déposée dans la colonne | 4,3 µmole/min |
| Quantité protéique déposée dans la colonne | 6,73 mg |
| Taux de purification enzymatique dans $P_2$ | 2,7 fois |
| Gamme d'Ampholine utilisée | pH 4-6 |
| Tension | 800 V |
| Temps de séparation | 96 h |
| Température de séparation | +4°C |
| Volume de chaque fraction | 2,5 ml |
| Vitesse d'enrégistrement | 60 mm/h |

est determiné dans chaque fraction: pH, $DO_{260\ nm}$, $DO_{280nm}$, $Act._{Est}$

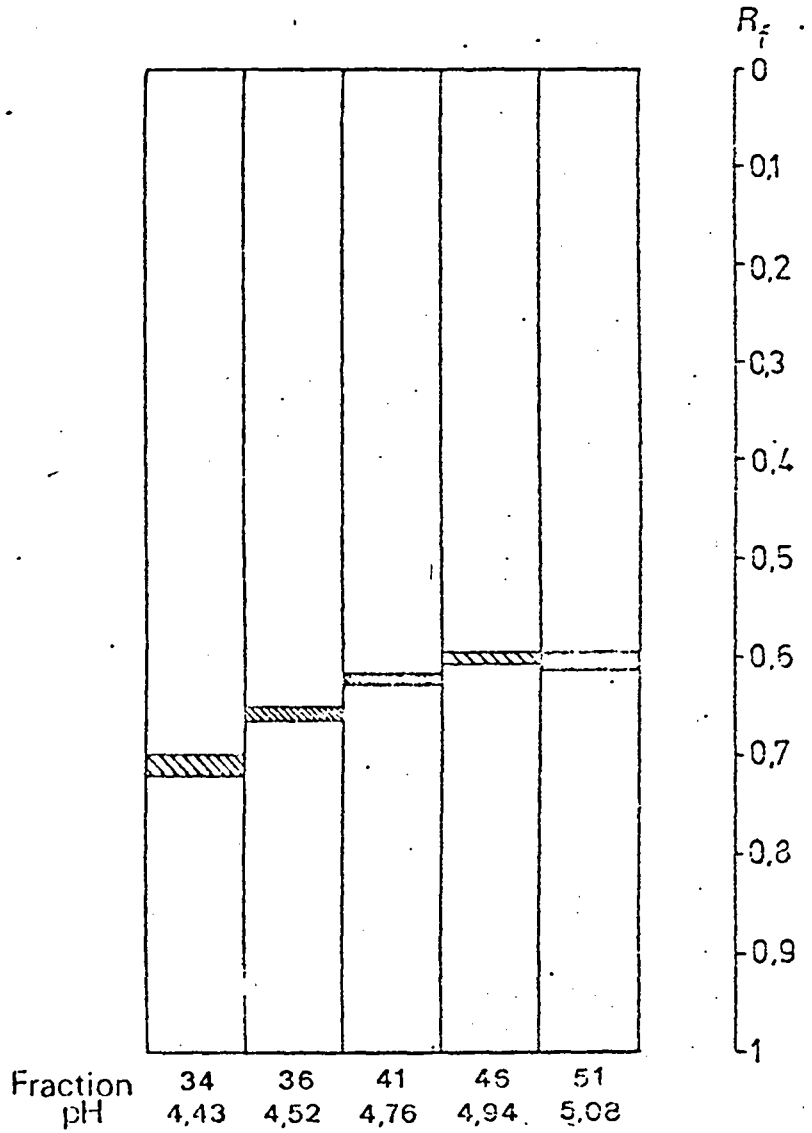



Figure T. 11.

Electrophorégrammes de contrôle des fractions obtenues par FIP, coloration pour les estérases.

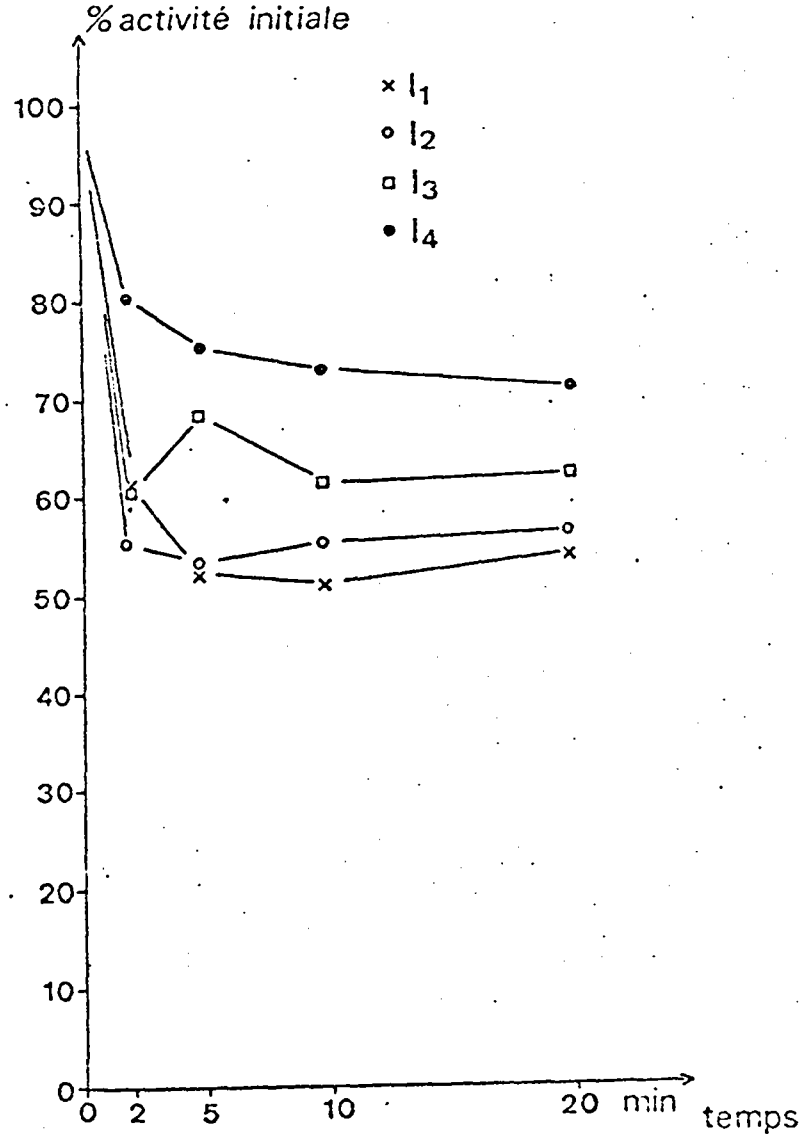



Figure T. 12.

Influence de la durée d'un traitement à 80°C (de 0 à 20 mn) su l'activité estérasique des isoestérases $I_1$ à $I_4$.

a) Analyse de l'activité estérasique dans la colonne

Le schéma d'élution obtenu par le photomètre à flux continu est indiqué par la figure T9. Le diagramme d'élution établi suivant les différentes valeurs determinées dans chaque colonne est représenté dans la figure T10.

Au total on trouve 5 pics d'activité estérasique dans les fractions 20 à 60. Les fractions supérieures ne sont pas analysées car nous savons par des essais préliminaires qu'à pH 6 on ne trouve plus d'isozymes estérasiques par contre un deuxième groupe d'isozymes existe dont les pki ont des valeurs supérieures à pH 7, qui n'ont pas été séparés dans la gamme de pH employée.

Dans les fractions analysées nous retrouvons au total une activité de 1,9 µmole/min, ce qui correspond à 44% de l'activité ~~mise dans~~ de la colonne (le deuxième groupe d'isozymes n'est pas inclut). Effectivement en analysant toutes les fractions de la colonne, on retrouve presque 100 % de l'activité, ce qui indique que l'activité estérasique n'est pas tellement sensible aux conditions extrèmes de la colonne, car il faut rappeler que dans la colonne les différentes protéines sont isolées dans un milieu non-tamponné.

b) Analyse des fractions par électrophorèse en disque :

L'analyse des fractions (fig T11) à activité estérasique nous indique la présence de 4 isozymes différents (pics de fraction 34, 36, 40 et 51) de $pK_i$ respectifs: 4,43; 4,52; 4,76 et 5,08. Malgré les pics très rapprochés les électrophorèses indiquent pour chaque fraction une seule bande enzymatique. Pour la fraction 46 nous ne trouvons pas de bandes enzymatique supplémentaires sur le gel, nous supposons alors que ce pic est formé secondairement par superposition des deux pics latéraux.

Ainsi 4 isozymes sont isolées:

$I_1$ $pK_i$ 4,43 $R_f$(gel à 7%): 0,704
$I_2$ $pK_i$ 4,52 $R_f$( " ): 0,657
$I_3$ $pK_i$ 4,76 $R_f$( " ): 0,626
$I_4$ $pK_i$ 5,08 $R_f$( " ): 0,603

c) Influence d'un traitement à 80°C sur les 4 isoestérases :

- Conditions du traitement : 0,5 ml de chaque pic (2 fractions réunies) sont traités pendant des temps variables (2, 5, 10 et 20 mn) à 80°C. Leur activité est déterminée par l'essai continu puis comparée à l'activité d'un échantillon non-traité (figure T 12). Les résultats indiquent que la stabilité thermique croît avec le pki.

9 - REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE.

La focalisation isoélectrique est une technique très sensible et hautement reproductible. La figure T 3 nous montre un schéma d'élution d'une colonne de FIP, il s'agit d'une répétition (expérience 141) de l'exemple donné ci-dessus (expérience 137). On constate que ces schémas sont plus ou moins identiques ce qui illustre l'utilité de cette méthode dans un but préparatif.

Dans le tableau IV nous comparons les pki obtenus dans ces deux expériences pour les différentes isoestérases identifiées par électrophorèse en disque sur polyacrylamide.

| Isozyme | pki | |
|---|---|---|
| | Exp. 137 | Exp. 141 |
| $I_1$ | 4,43 | 4,44 |
| $I_2$ | 4,52 | 4,58 |
| $I_3$ | 4,76 | 4,76 |
| $I_4$ | 5,08 | 5,09 |

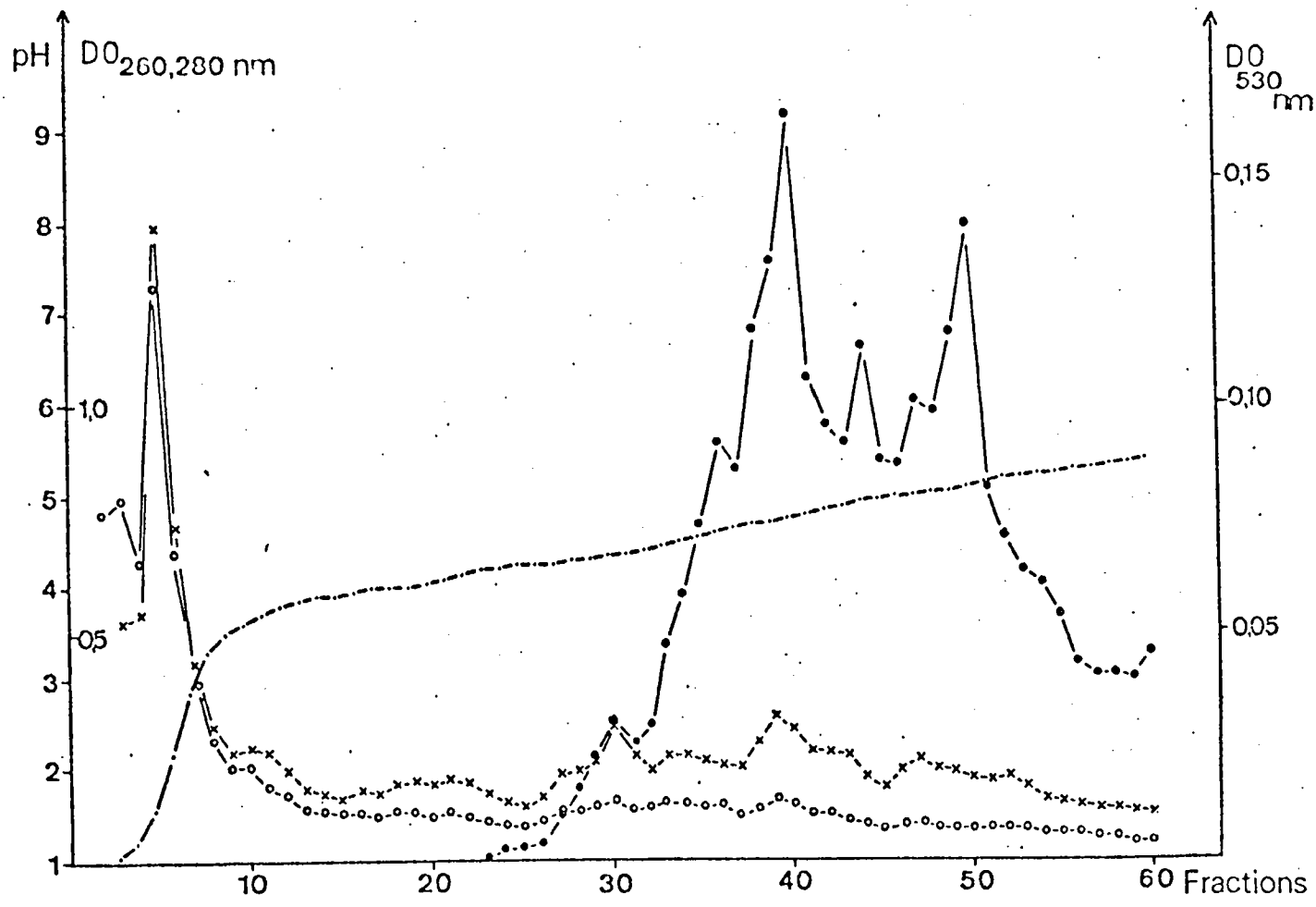



Figure T. 13. - Schéma d'élution de l'expérience 141 :

-x- $DO_{260}$ nm

O $DO_{280}$ nm

⊗ $DO_{530}$ nm (activité estérasique)

---pH

ABREVIATIONS UTILISEES DANS L'APPENDICE TECHNIQUE

ADH = Alcool deshydrogénase
AIA = Acide β-indolylacétique
BIS = N,N'-méthylène-bis-acrylamide
ce = chambre d'électrode
DO = densité optique
DTT = Dithiothréitol
Est = Estérase
FIP = Focalisation isoélectrique préparative
LAP = Leucine aminopeptidase
o = obturateur mobile
P = Précipité
Per = Peroxydase
$pK_i$ = point isoélectrique
PM = poids moléculaire
PVP = Polyvinylpolypyrrolidone
S = Surnageant
TRIS = Trihydroxyméthylaminométhane
TEMED = N,N,N',N'-tetraméthyléthylènediamine

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE


1. APPEL,W.:Leucine aminopeptidase
   Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer,H.U.,ed.),Verlag Chemie Weinheim,1974,Vol.2,p.958-963

2. ARBUTHNOTT,J.P.;BEELEY,J.A.:Isoelectric Focusing
   Butterworths Publishers,London,1975

3. BOURS,J.:The use of protein markers in thin-layer isoelectric focusing.
   Science Tools,20,29-34,1973

4. CLELAND,W.W.:Dithiothreitol,a new protective reagent for SH- groups.
   Biochemistry,3,480-482,1964

5. COUSTAUT,D.;MOSCHETTO,Y.;HASE,C.:Application de la focalisation isoélectrique préparative (FIP) à la définition et à l'analyse d'isozymes végétales (isoestérases et isoperoxydases).
   XII$^{e}$ Congrès International de la Societé de Pharmacie de la Mediterranée Latine,Messine,4-7 juin 1976

6. DAVIES,H.:Some recent trends in preparative isoelectric focusing.
   Science Tools,23,4-6,1976

7. FIELDES,M.A.;TYSON,H.:Activity and relative mobility of peroxidase and esterase isozymes of flax (Linum usitatissimum) genotrophs.
   I.Developing main stems.
   Can.J.Genetics and Cytology,15,731-744,1973

8. FOTTRELL,P.F.:Esterase isoenzymes from legume root nodules.
   Phytochem.7,23-29,1968

9. GASPARIC,V.;ROSENGREN,A.:C-14 labelled carrier ampholytes designed for preparative peptide separation.
   Science Tools,21,1-2,1974

10. HAGLUND,H.:Isoelectric focusing in pH gradients.
    Methods of Biochemical Analysis,Vol.19,LKB Produkter

11. HAGLUND,H.:Isoelectric focusing in natural pH gradients - a technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins.
    Science Tools,14,17-23,1967

12. HARTREE,E.F.:Determination of protein:a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.
    Analytical Biochemistry,48,422-427,1972

13. HASE,C.;COUSTAUT,D.;MOSCHETTO,Y.:Focalisation isoléectrique préparative (FIP) et séparation des isoleucine aminopeptidases chez Ulex minor Roth.
    Bulletin de la Societé de Pharmacie de Lille,33,41-49,1977

14. LKB 7900 UNIPHOR Instruction Manual
LKB Produkter AB Sweden

15. LOOMIS,W.D.;BATTAILE,J.:Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.
Phytochemistry,5,432-438,1966

16. MACHACKOVA,J.;GANCEVA,K.;ZMRHAL,Z.:The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat.
Phytochemistry,14,1251-1254,1975

17. MAURER,H.R.:Disc-Electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.
Walter de Guyter,Berlin,New York,1971

18. McCOWN,B.H.;BECK,G.E.;HALL,T.C.:Plant leaf and stem proteins.I.Extraction and electrophoretic separation of the basic,water-soluble fraction.
Plant Physiology,43,578-582,1968

19. PARISOT,D.:Etude comparée de la mise en place des étapes du developpement et des programmes d'activités potentielles des estérases chez Penicillium baarnense.
Physiologie végétale,12,375-395,1974

20. PILZ,W.:Arylesterases
Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer,H.U.,ed.),Verlag Chemie Weinheim,1974,Vol.2,p.806-813

21. PUTTER,J.:Peroxidases
Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer,H.U.,ed.),Verlag Chemie Weinheim,1974,Vol.2,p.685-690

22. RADOLA,B.J.:Präparative isoelektrische Fokussierung-eine neue Methode für die Isolierung und Reinigung von Proteinen.
Chemiker Zeitschrift,98,549-554,1974

23. RAPOPORT,S.M.;RADERECHT,H.J.:Physiologisch-chemisches Praktikum.
VEB Verlag Volk und Gesundheit,Berlin,6.Auflage,1972

24. RIGHETTI,P.G.:Progress in isoelectric focusing and isotachophoresis.
North-Holland Publishing Company Amsterdam - Oxford, 1976.

25. RODBARD,D.;CHRAMBACH,A.:Estimation of molecular radius,free mobility and valence using polyacrylamide gel electrophoresis
Analytical Biochemistry,40,95-134,1971

26. ROUGE,P.:Interêt de l'électrophorèse des protéines foliaires en systématique végétale.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie,Toulouse,1972

27. THOMAS,D.L.;KOKEMOR,J.K.:Electrophoresis study of heating in situ on proteins and enzymes in germinated Arachis hypogaea cotyledons: comparison with dormant seed.
Phytochemistry,13,69-76,1974

28. UNGAR,I.A.;BOUCAUD,J.:Comparison of seed proteins in the genus Suaeda (Chenopodiaceae) by means of disc-electrophoresis.
American Journal of Botany,61,325-330,1974

29. Vesterberg,O.;Svensson,H.:Isoelectric fractionation,analysis,and characterization of ampholytes in natural pH gradients.IV.Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins.
Acta Chemica Scandinavica,20,820-834,1966

30. WEST,N.B.;GARBER E.D.:Genetic studies of variant enzymes I. An electrophoretic survey of esterase and leucine aminopeptidase in the genus Phaseolus.
Canadian Journal of Genetics and Cytology,9,640-645,1967

UNIVERSITE DES Sc. et Techn. BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE LILLE