

# **Sécrétion périodique de peroxydases par des suspensions cellulaires d'épinard sous divers régimes lumineux = Periodic secretion of peroxidases by spinach cell suspensions under different light treatments**

Autor(en): **Sticher, L. / Penel, Cl. / Greppin, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **40 (1987)**

Heft 3: **Archives des Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740325>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

SÉCRÉTION PÉRIODIQUE DE PEROXYDASES  
PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'ÉPINARD,  
SOUS DIVERS RÉGIMES LUMINEUX

Periodic secretion of peroxidases  
by spinach cell suspensions under different light treatments

PAR

**L. STICHER, Cl. PENEL, H. GREPPIN \***

---

RÉSUMÉ

La nature endogène d'un rythme hémicircadien de la sécrétion extracellulaire de peroxydases a été mise en évidence, de même que son entraînement par la durée du jour et de la nuit. L'extrusion de protons et l'extractabilité des peroxydases présentent une structure temporelle du même type, avec un phasage différent.

ABSTRACT

The endogenous nature of a hemicircadian rhythm of peroxidase secretion has been pointed out, as its synchronization by the light/dark cycle. Proton extrusion and peroxidase extractability presented the same type of time-structure but with different phase setting.

INTRODUCTION

La peroxydase peut être relâchée dans l'espace extracellulaire d'organes, de culture de tissus et de cellules (Van Huystee et Turcon, 1973; Penel *et al.*, 1980, 1984; Sticher *et al.*, 1981, 1982, 1983; Kevers *et al.*, 1982, 1985; Gaspar *et al.*, 1982, 1984, 1985; Castillo *et al.*, 1984; Sallier de la Tour *et al.*, 1984; Greppin *et al.*, 1986).

---

\* Laboratoire de Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève 4.

La sécrétion (processus actif) et l'activation de l'enzyme peuvent être contrôlées par le calcium. Sallier de la Tour *et al.* (1984) ont montré que la sécrétion pouvait fluctuer selon le moment de la journée et l'origine des cellules. Nous présentons ici des arguments expérimentaux montrant l'existence d'un rythme bimodal, d'origine endogène, entraînable par le nyctémère.

### *Matériel et méthodes*

Des suspensions cellulaires sont obtenues en transférant, par erlenmeyer (30 ml de milieu M S), 200 mg (poids frais) de cal d'hypocotyle d'épinard (*Spinacia oleracea*, cv Nobel). Le milieu M S (Murashige et Skoog, 1962) contient de l'acide 3-indolylbutyrique et de la benzyladénine à  $10^{-6}$  M. Les erlenmeyers sont disposés sur un agitateur à plateau (150 rpm) dans les chambres de cultures.

Trois conditions climatiques sont testées:

1. Jours courts, JC (lumière blanche, 8 h; 2200 lux; t°C,  $24 \pm 0,5$ ; H %,  $74 \pm 5$ ; obscurité, 16 h; t°C,  $19 \pm 0,5$ ; H %,  $84 \pm 5$ ).
2. Jours longs, JL (lumière blanche, 16 h, 3000 lux; t°C,  $22 \pm 0,5$ ; H %,  $58 \pm 5$ ; obscurité, 8 h; t°C,  $18 \pm 0,5$ ; H %,  $82 \pm 5$ ).
3. Lumière continue, LC (lumière blanche, 3000 lux; t°C,  $22 \pm 0,5$ ; H %,  $58 \pm 5$ ).

Les cellules cultivées dans les conditions 1, 2, 3, sont issues de cals placés sous le même régime, ces derniers provenant de plantes ayant subi le même traitement lumineux. L'éclairage provient de tubes Sylvania «daylight» de 40 W (Sticher, 1985).

### *Extraction des protéines et des peroxydases solubles*

Les suspensions cellulaires sont broyées dans un mortier, refroidi dans la glace, en présence de 4 ml/g de poids frais du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0. Après broyage et rinçage, l'extrait brut est centrifugé à 10 000 g, pendant dix minutes à 0° c. Le surnageant est repris et des aliquotes servent pour le dosage des protéines et de l'activité peroxydasique.

### *Dosage des protéines*

Nous avons utilisé le bleu de Coomassie (Bradford, 1976), à raison de 1 ml de colorant pour 50 ou 100 µl de l'échantillon. Après quinze minutes, la densité optique du mélange est mesurée à 595 nm dans un spectrophotomètre. Une courbe étalon (albumine de bœuf), permet de déterminer la quantité de protéines.

### *Dosage de l'activité peroxydasique*

50 ou 100  $\mu$ l de l'extrait cellulaire ou du milieu d'incubation des suspensions cellulaires sont ajoutés au mélange suivant: 2 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 6,1 contenant 0,5% de gâïacol; 0,5 ml d'une solution de  $H_2O_2$   $10^{-2}$  M. La densité optique du mélange est lue au spectrophotomètre (470 nm), après soixante secondes pour l'extrait cellulaire, dix minutes pour le milieu des suspensions cellulaires. L'activité enzymatique ( $\Delta DO$ , 470 nm) est rapportée au poids frais ou aux protéines cellulaires, et au temps de mesure (Sticher, 1985).

### *Mesure de la sécrétion des peroxydases*

Les suspensions cellulaires en culture sont transférées, délicatement, dans un milieu M S, sans calcium, vingt-quatre heures avant le test. Lors de celui-ci, elles sont très délicatement placées dans un milieu d'incubation, MTK (Mops, 50 mM amené à pH 7.5 avec du Tris, KCl, 20 mM). On laisse incuber, pendant une heure, les 200 mg de cellules dans 2 ml de MTK; ensuite pour stimuler et amplifier la sécrétion, 2 mM de calcium sont ajoutés. La sécrétion de peroxydases est suivie pendant soixante minutes (mesure de l'activité).

### *Résultats*

La capacité de sécrétion dans le milieu externe (suspensions cellulaires), a été mesurée à différents moments de la journée, tant en jours courts qu'en jours longs (fig. 1). Ainsi, nous observons en JC, un rythme bimodal, hémicircadien, avec un pic de sécrétion très important le matin et un deuxième l'après-midi (nuit). Les minimums de sécrétion, lors du passage jour/nuit et à minuit sont extrêmement bas; l'amplitude des fluctuations est élevée et les passages brusques.

En jours longs, on observe une stimulation générale du niveau de la capacité de sécrétion. Il y a aussi un pic le matin et dans l'après-midi (lumière), mais ceux-ci sont décalés par rapport à JC. Il y a donc modulation de la phase par la photopériode, particulièrement pour le deuxième pic (deux à quatre heures de déphasage: effet «light off»?). Cet effet d'entraînement par un donneur de temps externe (nyctémère: «light on, light off») est observé dans les rythmes circadiens endogènes permettant la mesure du temps, par leur asservissement au «Zeitgeber» externe (Millet et Manachère, 1983).

En lumière continue et conditions constantes (Sticher, 1985), le rythme bimodal persiste pendant plus d'une semaine et présente le déphasage par rapport au temps externe, caractéristique des endorythmes circadiens sans donneur de temps (dérive dans le temps externe) pour les ajuster. Si cette capacité de sécrétion est clairement mise en évidence par l'action du calcium, ajouté au milieu, il faut relever qu'il est possible d'observer le même type de rythmes, sans ce traitement. Dans ces conditions

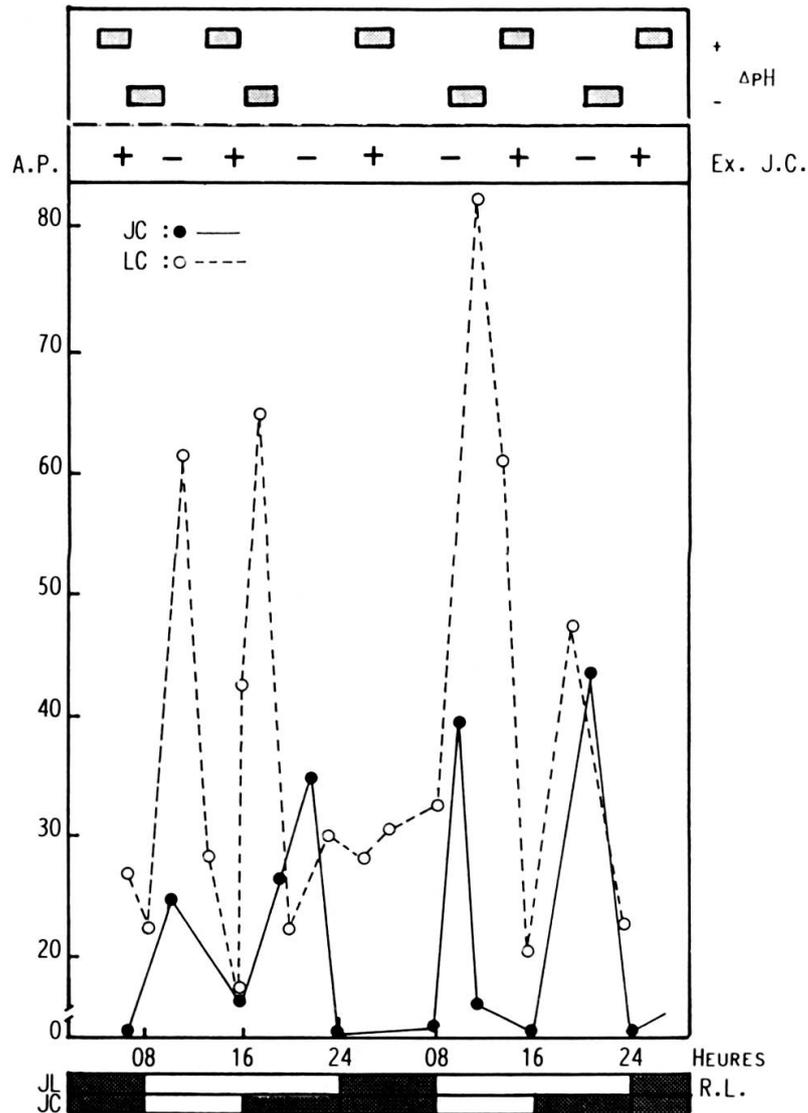


FIG. 1.

Evolution de l'activité peroxydasique AP ( $\Delta$ DO 470 nm/60 min. g pds frais) sécrétée dans le milieu, en jours courts, JC (●) et en jours longs, JL (○). RL: régime lumineux. Heures locales. Ex. JC: minimums (-) et maximums (+) dans l'extractabilité, en jours courts, des peroxydases cellulaires solubles (en vingt-quatre heures, l'amplitude de variation est de 500% de l'extractabilité la plus basse ( $\Delta$ DO, 470 nm/mg protéines). pH: variation du pH du milieu externe: position des maximums (-) et des minimums (+) d'acidification. L'amplitude de variation sur vingt-quatre heures est de 0,9 pH. La mesure se fait dans de l'eau distillée (2ml) où la suspension (200 mg) est placée (5 min.); après ce temps 2 mM de calcium sont ajoutés. Le pH et l'activité peroxydasique ( $\Delta$ DO, 470 nm/g poids frais) sont mesurés pendant soixante-cinq min.

toutefois, l'amplitude est extrêmement faible, eu égard aux moyens de détection utilisés. Les isoperoxydases que l'on retrouve dans le milieu sont essentiellement basiques et peu nombreuses (Sallier de la Tour *et al.*, 1984).

Cette variation de la sécrétion est précédée et accompagnée par une variation bimodale du pH du milieu externe (fig. 1). Lors des maximums (JC) de sécrétion,

il y a acidification du milieu. Toutefois, ce phénomène n'est pas, selon le traitement (Sticher, 1985), en complète corrélation avec la sécrétion. Il semble donc exister un rythme bimodal endogène de sécrétion des protons par les cellules. Il s'agit aussi d'un processus actif (Sticher, 1985).

Enfin, l'extractabilité des peroxydases solubles (fig. 1), cellulaires, varie de manière rythmique bimodale. Le rythme est déphasé de  $180^\circ$  par rapport à la sécrétion (antagonique). Il est donc maximal quand celle-ci est minimale. Il y aurait donc un rythme hémicircadien endogène dans la disponibilité en peroxydases totales cellulaires (sequestration, ou synthèse-dégradation des peroxydases solubles).

### *Discussion*

Au vu des résultats obtenus, on peut affirmer qu'il existe un rythme endogène bimodal et entraînable, de type hémicircadien, réglant la sécrétion des peroxydases (surtout basiques) dans le milieu extracellulaire. L'origine et le fondement de cette propriété ne sont pas connus, elle implique probablement le calcium et le réseau membranaire. Habituellement les périodes d'une douzaine d'heures correspondent au rythme de marée. Toutefois, en raison de la dérive dans le temps, en conditions constantes et lumière continue, et aussi de l'entraînement différent des deux pics par la photopériode, on peut postuler l'existence de deux rythmes circadiens déphasés. Les rythmes enzymatiques ultradiens de 12 h ont été bien étudiés (Wagner, 1976; Koukari *et al.*, 1985). Pour le même enzyme et selon l'espèce considérée ou le traitement, trois situations peuvent exister: rythme circadien, rythme ultradien, combinaison des deux. De même que les rythmes circadiens, ils semblent avoir un fondement génétique de leur périodicité.

L'utilisation de l'ionophore du calcium A23187, donné dans le milieu, au moment du minimum de sécrétion, ne stimule pas cette dernière. Le rythme observé ne semble pas dû à des variations cycliques de la concentration cytoplasmique en calcium. C'est lorsque l'extractabilité des peroxydases cellulaires est la plus forte, que la sécrétion est la plus faible. Il s'agit donc d'un processus très spécifique mettant en jeu un petit nombre d'isozymes. Nous pensons à un rôle important des membranes dans ce processus (Golgi, plasmalemma).

Les variations du pH ne sont pas le produit de cellules lésées; l'activité peroxydase est très faible dans le milieu, d'autre part, elle résulte d'un processus actif (Sticher, 1985). Dans le cas de lésions, il y aurait diffusion passive d'une grande quantité de peroxydases vu la concentration de celles-ci dans la cellule.

## BIBLIOGRAPHIE

- BRADFORD, M. M., 1976. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- CASTILLO, F., C. PENEL, H. GREPPIN, 1984. *Plant Physiol.*, 74, 845-851.
- GASPAR, T., C. PENEL, T. THORPE, H. GREPPIN, 1982. *Peroxidases 1970-1980*, Centre de Botanique, Genève, 324 p.
- GASPAR, T., C. KEVERS, M. COUMANS, C. PENEL, H. GREPPIN, 1984. *Experientia*, 40, 696-697.
- GASPAR, T., C. PENEL, F. J. CASTILLO, H. GREPPIN, 1985. *Physiol. Plant.* 64, 418-423.
- GREPPIN, H., C. PENEL, T. GASPAR, 1986. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Centre de Botanique, Genève, 470 p.
- KEVERS, C., L. STICHER, C. PENEL, H. GREPPIN, T. GASPAR, 1982. *Plant Growth Regulation*, 1, 61-66.
- KEVERS, C., T. GASPAR, C. PENEL, H. GREPPIN, 1985. *Plant Cell Reports*, 4, 120-122.
- KOUKKARI, W. L., S. H. DUKE, M. V. BONZON, 1985. In: *Les mécanismes de l'irritabilité et du fonctionnement des rythmes chez les végétaux*, colloque de Freiburg-i. Br., éd. H. Greppin et E. Wagner, Centre de Botanique, Genève, pp. 106-126.
- MILLET, B., G. MANACHÈRE, 1983. *Introduction à l'étude des rythmes biologiques*. Ed. Vuibert, Paris, 88 p.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG, 1962. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- PENEL, C., L. STICHER, H. GREPPIN, 1980. *Plant Physiol. suppl.* 65, 129.
- PENEL, C., L. STICHER, C. KEVERS, T. GASPAR, H. GREPPIN, 1984. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 179, 173-180.
- SALLIER DE LA TOUR, R., L. STICHER, C. PENEL, H. GREPPIN, 1984. *Saussurea* (Genève), 15, 17-23.
- STICHER, L., C. PENEL, H. GREPPIN, 1981. *J. Cell. Sci.* 48, 345-353.
- STICHER, L., C. PENEL, H. GREPPIN, 1982. In: *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, ed. A. Fujiwara, Tokyo, pp. 223-224.
- STICHER, L., C. PENEL, H. GREPPIN, 1983. In: *Membranes and Compartmentation in Regulation of Plant Functions*, ed. Europ. Phytochem. Soc., Toulouse, Univ. P. Sabatier, p. 125.
- STICHER, L. 1985. *Etude des peroxydases et de leur sécrétion dans des cultures de cellules et de cals d'épinard*. Thèse n° 2185, Université de Genève, 289 p.
- VAN HUUSTEE, R. B., G. TURCON, 1973. *Can. J. Bot.*, 51, 1169-11.
- WAGNER, E., 1976. In: *The Molecular Basis of Circadian Rhythms*, éd. J. W. Hastings, H. G. Schweiger; Abakon Verlag., Berlin, pp. 215-238.