

Indices biochimiques et milieux marins. Journées du GABIM, Brest, 18-20 Nov. 1981
Publi. CNEXO (Actes Colloq.) n. 14, 1982, p.123 à 130

DONNEES SUR L'ACTIVITE DES CARBOXYLASES DE QUELQUES
DIATOMÉES MARINES EN CULTURE

par

C. DESCOLAS-GROS

Laboratoire ARAGO 66650 BANYULS-SUR-MER

R E S U M E

— Dans le but d'étudier la possibilité d'utiliser l'activité des carboxylases comme indice de l'état physiologique des communautés phytoplanctoniques en mer nous avons dosé l'activité de la ribulose diphosphate carboxylase, de la phosphoénolpyruvate carboxylase, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase sur trois diatomées. Les trois espèces présentent une activité ribulose diphosphate carboxylase dominante et on a trouvé une activité phosphoénolpyruvate carboxykinase chez *Phaeodactylum tricorutum* et *Nitzschia turgiduloïdes*. Cette espèce qui provient d'eaux antarctiques cultivée à 5°C montre un optimum d'activité lorsque les tests sont effectués à 50°C. —

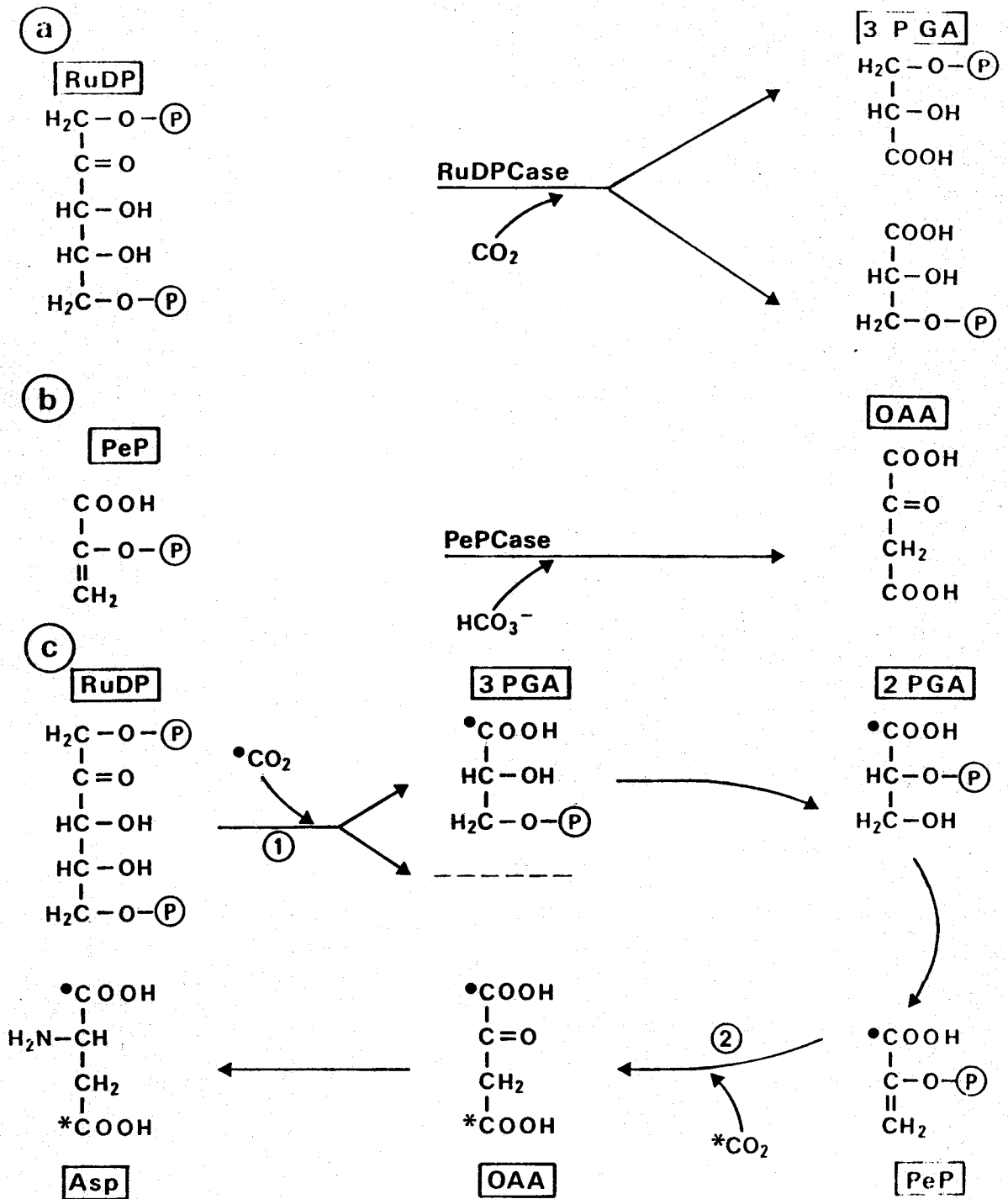
A B S T R A C T

— In order to study the possibility of using the activities of carboxylating enzymes as a test of the physiological state of the phytoplankton communities in the sea, we measure ribulose diphosphate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase on three diatoms. The three species show a greater activity of the ribulose diphosphate carboxylase, and an activity of the phosphoenolpyruvate carboxykinase is demonstrated on *Phaeodactylum tricorutum* and *Nitzschia turgiduloïdes*. This species, which comes from antarctic waters, is cultured at 5°C. It has an optimum of activity when the tests are run at 50°C. —

M O T S - C L E S : Carboxylases, Phytoplankton, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Nitzschia turgiduloïdes*.

K E Y W O R D S : Carboxylases, Phytoplankton, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Nitzschia turgiduloïdes*.

Figure 1: Hypothèses sur la fixation du carbone par les carboxylases des organismes phytoplanctoniques.



- a La ribulose 1-5 diphosphate carboxylase (RuDPCase) catalyse l'incorporation d'un atome de carbone sur un maillon à 5 carbones le ribulose 1-5 diphosphate (RuDP) qui donne 2 molécules de 3 phosphoglycérate (3 PGA).
- b La phosphoénolpyruvate carboxylase (PePCase) catalyse la betacarboxylation du phosphoénolpyruvate (PeP) pour donner un composé à 4 atomes de carbone l'oxaloacétate (OAA). Le substrat de la phosphoénolpyruvate carboxylase serait l'ion HCO_3^- (cf. MORRIS, 1980).
- c Réactions intervenant pour les carboxylations à la lumière (d'après KREMER, 1980). Une première fixation du CO_2 se ferait grâce à l'activité de la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase (1) puis une seconde aurait lieu par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (2). A la lumière le phosphoénolpyruvate proviendrait du 3 phosphoglycérate (3 PGA).

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes marins, la production primaire pélagique est mesurée à partir de l'incorporation du bicarbonate ^{14}C par des échantillons mis à incuber pendant une certaine durée (STEEMANN-NIELSEN, 1952). Cette méthode, très souvent utilisée, a permis l'évaluation rapide des potentialités biologiques des masses d'eau. Elle pose, cependant, des problèmes méthodologiques et interprétatifs qui sont liés à une méconnaissance des mécanismes biochimiques responsables de la fixation du carbone au niveau cellulaire. L'étude de ces mécanismes ainsi que la recherche d'indices caractéristiques de l'état physiologiques des communautés nous apparaît indispensable pour faire progresser notre connaissance des écosystèmes marins.

1. HISTORIQUE

Grâce au progrès des connaissances relatives à la photosynthèse, plusieurs équipes ont essayé de déterminer les voies de fixation du carbone du phytoplancton. De ces travaux découlent deux hypothèses.

1.1. Celle de l'équipe de MORRIS

Dans une synthèse regroupant les travaux obtenus par son équipe MORRIS (1980) considère que les cellules phytoplanctoniques possèdent deux mécanismes :

- l'un (Fig. 1-a) fait intervenir la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase ; le premier produit formé est un composé à 3 atomes de carbone, le phosphoglycérate, d'où le nom de photosynthèse de type C_3 donné aux végétaux fixant le carbone uniquement par cette voie découverte par CALVIN (1951).

- l'autre (Fig. 1-b), appelé ici métabolisme C_4 , fait intervenir une phosphoénolpyruvate carboxylase ; le premier produit formé est l'oxaloacétate à quatre carbones rapidement converti en aspartate et / ou malate.

MORRIS pense qu'il existe un spectre de types métaboliques ; à l'une des extrémités il place des algues vertes comme *Dunaliella tertiolecta* et certaines cyanobactéries comme *Synechococcus* qui ont une photosynthèse de type C_3 dominant ; à l'autre, des diatomées comme *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricorutum* chez lesquelles le métabolisme C_4 l'emporte. Par ailleurs, il considère que l'état physiologique des organismes peut perturber ces tendances : de bonnes conditions seraient favorables à l'activité de la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase.

1.2. Celle de KREMER et al. et de HOLDSWORTH et al.

Ces auteurs pensent qu'il n'existe aucune preuve expérimentale suffisante pour parler de métabolisme C_4 dominant. La fixation du CO_2 se ferait principalement grâce à l'activité de la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase à laquelle s'ajouterait une fixation par β carboxylation (Fig. 1-c) due à :

1) une phosphoénolpyruvate carboxylase chez *Dunaliella tertiolecta*, *Porphyridium cruentum*, *Anabaena cylindrica* et chez *Chaetoceros calcitrans*.

2) une phosphoénolpyruvate carboxykinase chez *Phaeodactylum tricorutum* et d'autres diatomées : HOLDSWORTH et COLBECK (1976), HOLDSWORTH et BRUCK (1977), KREMER et BERKS (1978), KREMER (1980), APPLEBY et al. (1980).

3) une pyruvate carboxylase chez deux dinoflagellés : *Amphidinium carterae* et *Gymnodinium sp* : APPLEBY *et al.* (1980).

Plusieurs méthodes sont disponibles pour caractériser le type métabolique utilisé par des organismes végétaux 1) l'isolement des produits formés à court terme dans la photosynthèse, 2) le dosage de l'activité des différentes carboxylases, 3) la sensibilité de la photosynthèse à l'oxygène puisque la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase peut, en effet, se comporter comme une oxygénase, 4) la mesure du rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase fixant préférentiellement le $^{12}\text{CO}_2$.

Dans ce travail, nous avons dosé l'activité de trois carboxylases sur plusieurs espèces de diatomées en culture ; cette technique nous semble, dans un premier temps, la plus apte à être adaptée au travail à la mer pour effectuer des bilans d'activités sur des communautés plurispécifiques.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Espèces choisies et conditions de culture

Les trois espèces sélectionnées sont les suivantes :

- *Skeletonema costatum*, isolée à Banyuls-sur-Mer, où elle joue un rôle important dans le cycle annuel se trouvant à la base de floraisons printanières. Toutes les mises au point méthodologiques ont été effectuées sur cette espèce en fin de phase exponentielle.

- *Nitzschia turgiduloïdes*, espèce d'eau froide, isolée dans des eaux antarctiques, ainsi que trois autres espèces, par l'équipe du Laboratoire Arago.

- *Phaeodactylum tricornerutum*, étudiée par les différents auteurs et que nous avons considéré comme organisme de référence.

Ces cultures ont été faites en lumière continue, sur milieu F/2 à 18°C et 1800 lux pour *Skeletonema* et *Phaeodactylum* ; sur milieu F à 5°C et 2000 lux pour *Nitzschia*.

50 à 100 ml de culture sont filtrés sur filtre whatman GF/C avant extraction.

2.2. Extraction

Procédé 1 : Le filtre est broyé dans un Potter de verre immergé dans de la glace pilée en présence de 5 ml d'un mélange de Tricine 50 mM (pH : 8), dithiothreitol 5 mM, E.D.T.A. (sel disodique) 1 mM, Triton X-100 à 10%.

Procédé 2 : Le filtre est mis dans le même milieu et laissé 20 minutes à 20°C.

2.3. Dosages enzymatiques adaptés au phytoplancton d'après LAVERGNE *et al.* 1979.

Ils sont effectués dans 1'heure suivant l'extraction.

- Ribulose 1-5 diphosphate carboxylase

L'essai de 500 μ l contient en solution dans du tampon Tricine (Sigma) 50 mM (pH 8), dithiothreitol (Sigma) 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $NaH^{14}CO_3$ (Amersham) 20 mM, et 100 μ l d'extrait. Après une préincubation de 10 minutes RuDP (Sigma) 2 mM est ajoutée. Au bout de 20 minutes la réaction est arrêtée par addition de 300 μ l HCl 3N.

- Phosphoénolpyruvate carboxylase

L'essai de 500 μ l contient en solution dans du tampon Tricine 50 mM (pH : 7,5) dithiothréitol 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $NaH^{14}CO_3$ 20 mM et 100 μ l d'extrait. Après une préincubation de 10 minutes PeP (Sigma) 5 mM est ajouté, au bout de 20 minutes la réaction est arrêtée par addition de 300 μ l d'une solution saturée de 2-4 Dinitro-phenyldrazine dans HCl 6N.

- Phosphoénolpyruvate carboxykinase

Le protocole est identique à celui de la phosphoénolpyruvate carboxylase en ajoutant à la solution $MnCl_2$ 5 mM et ADP (Sigma) 5 mM.

Les blancs sont obtenus sans RuDP ou PeP ; chaque dosage est effectué en triplicat. Après l'arrêt des réactions 50 μ l du mélange est mis dans une fiole à scintillation et évaporé sous hotte. Le résidu est repris dans 1 ml d'eau et 10 ml d'Instagel (Packard) sont ajoutés. Le comptage de la radioactivité est fait par scintillation liquide.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

L'extraction correcte des enzymes est la phase capitale pour la suite des dosages, une variabilité artificielle des résultats pouvant être due à une extraction incomplète. Les deux procédés décrits ci-dessus donnent des résultats comparables et reproductibles ; l'action conjuguée du broyage et du détergent (Triton X-100) nous semble plus adaptée à des dosages effectués sur des communautés composées d'organismes de constitution différente. La présence d'EDTA 1 mM et de dithiothréitol 5 mM dans le tampon d'extraction augmente l'activité de la RuDP carboxylase.

Pour les 3 espèces étudiées, nous avons mis en évidence une activité très nette de la RuDP carboxylase et aucune activité PeP carboxylase. L'activité PeP carboxykinase est variable selon les espèces. La plus forte a été trouvée chez *Phaeodactylum tricornerutum* en fin de phase exponentielle ; le rapport RuDP carboxylase / PeP carboxykinase est alors de 4 pour des dosages effectués à 25°C ; une activité très faible a été mesurée chez *Nitzschia turgiduloïdes* ; elle n'a pas été mise en évidence sur *Skeletonema costatum*. Le passage de l'extrait de *Skeletonema costatum* sur colonne séphadex G 25 n'a pas fait apparaître d'activité PeP carboxylase ni PeP carboxykinase.

Notre but étant de déceler la présence ou l'absence des différentes enzymes et d'avoir, par le dosage des activités, une idée de l'importance relative de ces enzymes dans les cellules il est indispensable d'optimiser les différents dosages et d'observer les variations de ces optimum d'une espèce à l'autre. Nous avons donc étudié les variations de l'activité RuDP carboxylase en fonction de la température de l'essai chez *Skeletonema costatum* et *Nitzschia turgiduloïdes* (Fig. 2) cet optimum est plus élevé pour l'espèce antarctique (50°C) cultivée à 5°C. Il faudrait supposer que la structure de la RuDP carboxylase de cette espèce est plus résistante aux extrêmes de température.

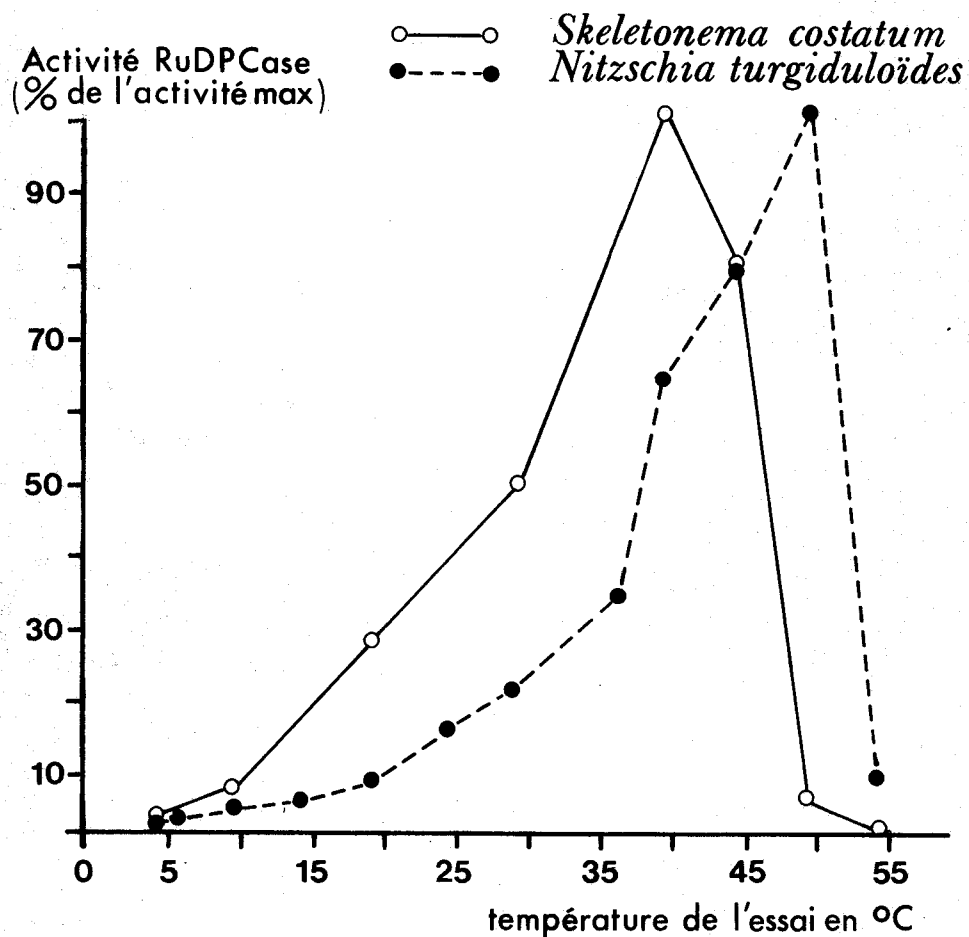


Figure 2 : Influence de la température de l'essai sur l'activité de la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase (RuDPCase) chez deux diatomées en culture

- *Skeletonema costatum* espèce méditerranéenne (température de culture 18°C)

- *Nitzschia turgiduloïdes* espèce antarctique (température de culture 5°C).

La différence d'optimum pour une même carboxylase appartenant à des espèces différentes, peut rendre difficile la standardisation des conditions expérimentales optimum sur des communautés phytoplanctoniques. Cependant on peut espérer une meilleure homogénéité des résultats sur des espèces vivant à une même latitude.

Nos résultats confirment ceux de HOLDSWORTH et COLBECK (1976) et de KREMER et BERKS (1978) mais pas ceux de MUKERJI et MORRIS (1976). Ces divergences montrent que l'utilisation d'une seule technique est insuffisante pour tirer des conclusions sur le métabolisme du carbone utilisé par une espèce. Une autre partie de notre travail effectué avec FONTUGNE consiste à mesurer le rapport $^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$ (FONTUGNE et DUPLESSY, 1981) des échantillons sur lesquels nous effectuons les dosages. La valeur du rapport confirme l'existence d'une fixation par une enzyme appartenant au "métabolisme C_4 " chez *Phaeodactylum tricornerutum*. Nous pensons également essayer de caractériser les produits formés à court terme dans la photosynthèse.

Le dosage des activités enzymatiques au cours d'une campagne en mer (campagne R.C.A., septembre 1981) est sans problème majeur. Ces mesures en mer sur des communautés plurispécifiques seront poursuivies parallèlement à l'étude sur des espèces en culture des facteurs pouvant faire varier l'activité des carboxylases.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à G. de BILLY pour son aide efficace lors de la mise au point des dosages et L. ORIOL pour les bons soins qu'elle a apporté aux cultures.

BIBLIOGRAPHIE

- APPLEBY G. ; J. COLBECK ; E.S. HOLDSWORTH -1980- β carboxylation enzymes in marine phytoplankton and isolation and purification of pyruvate carboxylase from *Amphidinium carterae*. J. Phycol. 16, p. 290-295.
- CALVIN M. ; J.A. BASSHAM ; A.A. BENSON ; V.H. LYNCH ; C. OUELLET ; L. SCHOU ; W. STEPKA ; N.E. TOLBERT -1951- Symp. Soc. Exp. Biol. 5, p., 284.
- FONTUGNE M.R. ; J.C. DUPLESSY -1981- Organic carbon fractionation by marine plankton in the temperature range - 1 to 31°C. Oceanologica Acta, 4 (1) p., 85-90.
- HOLDSWORTH E.S. ; J. COLBECK -1976- The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tricornerutum*. Mar. Biol., 38, p., 189-199.
- HOLDSWORTH E.S. ; K. BRUCK -1977- Enzymes concerned with β carboxylation in marine phytoplankton. Purification and properties of Phosphoenolpyruvate carboxykinase. Arch. Biochem. Biophys., 182, p., 87-94.
- KREMER B.P. ; BERKS R. -1978- Photosynthesis and carbon metabolism in marine and freshwater diatoms. Z. Pflz Physiol., 87, p., 149-165.

KREMER B.P. -1980- Dark reactions of photosynthesis NATO-ASI. Advanced in Physiological ecology of phytoplankton. Lipari, Sicily, 14-26 October 1980 (in press).

LAVERGNE D. ; E. BISMUTH ; M.L. CHAMPIGNY -1979- Physiological studies on two cultivars of *Pennisetum* : *P. americanum* 23 DB, a cultivated species and *P. mollissimum*, a wild species. I. Photosynthetic carbon metabolism. Z. Pflanzenphysiol. Bd 91 p., 291-303.

MORRIS I. -1980- Paths of carbone assimilation in marine phytoplankton. Primary Productivity in the sea. Ed. P. Falkowski Plenum press, p., 139-159.

MUKERJI D. ; I. MORRIS -1976- Photosynthetic carboxylating enzymes in *Phaeodactylum tricorutum* : Assay methods and properties. Mar. Biol., p., 199-206.

STEEMANN-NIELSEN E. -1952- The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. J. Cons., 18, p., 117-140.