

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 23 (1992)

Artikel: Fluctuation périodique de l'activité peroxydasique chez *Pseudonomas fluorescens* Mig.
Autor: Tokarska, Malgorzata / Greppin, Hubert
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099144>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Fluctuation périodique de l'activité peroxydasique chez *Pseudomonas fluorescens* Mig.

MALGORZATA TOKARSKA
&
HUBERT GREPPIN

RÉSUMÉ

TOKARSKA, M. & H. GREPPIN (1992). Fluctuation périodique de l'activité peroxydasique chez *Pseudomonas fluorescens* Mig. *Saussurea* 23: 83-87. En français, résumés français et anglais.

L'activité peroxydasique a été mesurée dans le surnageant de culture de *Pseudomonas fluorescens* Mig. (protocaryote). Durant la période où la concentration en protéines du milieu ne varie plus, on peut observer des fluctuations de moyennes fréquences de l'activité peroxydasique. Les autolysats bactériens sont proposés comme des systèmes propres à étudier le fondement des horloges physiologiques circadiennes existant chez les eucaryotes.

ABSTRACT

TOKARSKA, M. & H. GREPPIN (1992). Periodic fluctuation of the peroxidasic activity in *Pseudomonas fluorescens* Mig. *Saussurea* 23: 83-87. In French, French and English abstracts.

Peroxidasic activity has been measured on supernatant of *Pseudomonas fluorescens* Mig. culture (protocaryote). During the time where the proteins concentration presents no variation, we can observe medium-frequency fluctuations of the peroxidasic activity. The bacterial autolysats are proposed as an appropriate system for studying the foundation of circadian physiological clocks in eucaryotic beings.

Introduction

L'orientation dans le temps des activités cellulaires des eucaryotes a pour origine l'existence d'horloges physiologiques endogènes (BÜNNING, 1973; MILLET & MANACHÈRE, 1983; RENSING & JAEGER, 1985). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le fondement physico-chimique et biochimique de ces horloges; l'accent étant mis sur la compartimentation et les membranes, les acides nucléiques et les protéines (HASTINGS & SCHWEIGER, 1976; EDMUNDS, 1988; GOLDBETER, 1990).

Suite aux travaux des Queiroz et à l'existence d'échanges lents dans les protéines (QUEIROZ-CLARET & QUEIROZ, 1981; LENK & al., 1982; QUEIROZ, 1985), nous

proposons d'accorder un rôle central à ces dernières dans le fondement même des horloges cellulaires (WOODWARD & al., 1982; RUPLEY & al., 1983; QUEIROZ & al., 1988; KIMMICH & al., 1990).

Si l'existence d'horloges circadiennes chez les eucaryotes est maintenant largement admise, bien que la nature de leur fondement soit encore du domaine des hypothèses, la discussion est largement ouverte en ce qui concerne les protocaryotes, malgré quelques découvertes récentes (KIPPERT, 1991).

Nous présentons ici les résultats de mesures de l'activité peroxydasique sur des autolysats bactériens placés en conditions constantes de température et de contenu en protéines totales.

Matériel et méthodes

Pseudomonas fluorescens Mig. souche B52 du Département de botanique et biologie végétale, est cultivé à 25°C dans un milieu liquide favorisant l'achromie (GREPPIN & GOUDA, 1972). La composition chimique est la suivante: lactate d'ammonium, 15 g (K&K Lab. Inc.); MgSO₄.7 H₂O, 0.3 g (Fluka); K₂HPO₄, 0.3 g (Merck); citrate de fer, 0.00263 g (Fluka); eau distillée ad 1000 ml. Le pH du milieu est ajusté à 7.4 avec du NaOH à 10%.

Le milieu est réparti à raison de 50 ml dans des Erlenmeyers de 150 ml, puis stérilisé à l'autoclave pendant 20 min. à 120°C.

Lors de la mise en culture concentrée des bactéries, le milieu est identique au précédent, à l'exception du lactate d'ammonium dont la concentration est ramenée à 2‰.

Un inoculum de 0.5 ml, issu d'une culture standard âgée de 72 heures a été ajouté aux 50 ml du milieu nutritif, agités mécaniquement de manière continue.

Croissance de la population bactérienne

Celle-ci est estimée par turbidimétrie, mesurée à 650 nm, dans un spectrophotomètre Pye Unicam SP 1700, sur une aliquote de la suspension bactérienne.

Protéines

Elles sont dosées au moyen du test Bio-Rad (1979, Bio-Rad Laboratories, Munich) et comparées à une solution étalon de protéine (albumine bovine). 1.5 ml de culture est centrifugé à 15.000 g (4°C) pendant 10 min; le surnageant est dosé au spectrophotomètre à 595 nm après réaction; le culot aussi après traitement préalable aux ultrasons.

Activité enzymatique

L'activité enzymatique est mesurée dans le surnageant du milieu de culture, selon un test spectrophotométrique à 414 nm (Ultrospec II, LKB, Biochrom). Le milieu de réaction, dans un volume final de 0.8 ml, contenait: 0.2 ml d'ABTS de Sigma à 54 mM (acide 2.2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique); 0.4 ml d'H₂O₂ à 25 mM, et 0.2 ml de surnageant de culture bactérienne. La vitesse initiale de la réaction enzymatique sert de mesure de l'activité peroxydasique qui est exprimée en ΔDO/min.

Culture concentrée

Cinq cultures achromes âgées de 72 heures sont centrifugées 20 min à 15.000 g (4°C); les culots sont récupérés et suspendus dans 50 ml de milieu (lactate d'ammonium à 2‰)

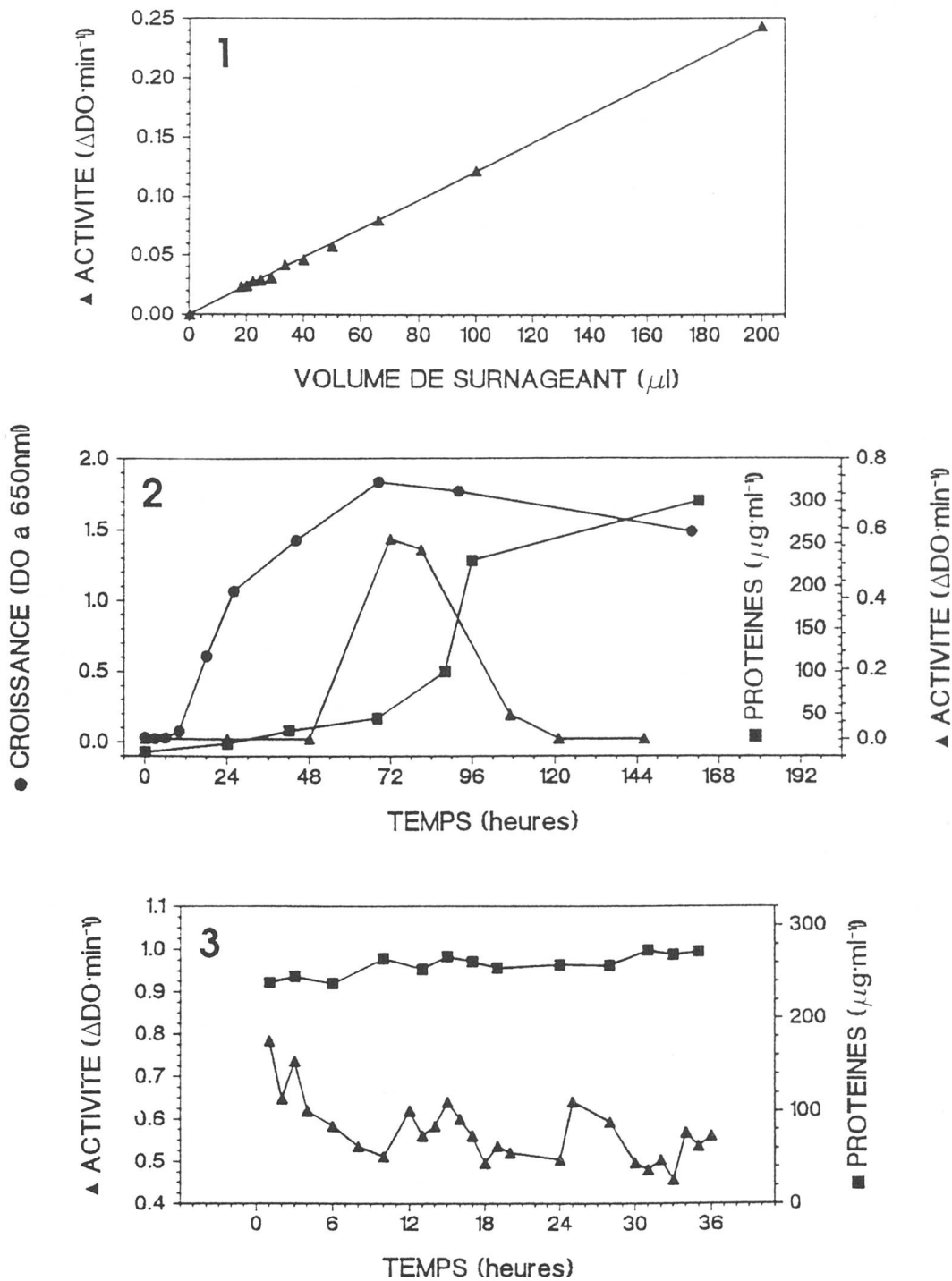


Fig. 1. — Linéarité de l'activité peroxydasique en fonction du volume de surnageant ajouté dans le milieu de réaction. Dans le surnageant utilisé le contenu en protéines est de 150 μg ml⁻¹.
Du KCN, ajouté au milieu de la réaction, à concentration finale 10 mM, inhibe la réaction à 93%.

Fig. 2. — Evolution de la multiplication bactérienne (turbidimétrie), du contenu en protéines et de l'activité peroxydasique dans le surnageant du milieu de culture (*Pseudomonas fluorescens* cultivé à 25°C, agitation mécanique).

Fig. 3. — Fluctuation de l'activité peroxydasique dans le surnageant de culture concentrée, au moment où la concentration en protéines du surnageant est constante.

placés dans un Erlenmeyer de 150 ml. Cette culture est placée dans les mêmes conditions que précédemment.

Résultats

La figure 1 montre la linéarité de la réaction peroxydasique mesurée, en fonction du volume de surnageant utilisé. Les conditions de mesure sont donc bonnes.

L'évolution turbidimétrique correspond à la croissance bactérienne, essentiellement due à la multiplication; la quantité maximale de protéines du culot correspond à 580 µg/ml de milieu de culture. Dès 72 heures, il y a autolyse progressive de la culture (fig. 2). Le surnageant s'enrichit en protéines libres au cours du temps; dès 48 heures de culture, les protéines sécrétées dans le milieu, puis celles provenant de l'autolyse augmentent. L'activité peroxydasique libérée par les bactéries est maximale après 72 heures de culture, moment où l'autolyse va s'accélérer.

Les bactéries issues de cultures âgées de 72 heures sont concentrées cinq fois et resuspendues dans un milieu neuf à 2‰ de lactate d'ammonium. L'évolution de la concentration en protéines du surnageant est suivie jusqu'au moment où celle-ci ne varie plus (275 µg/ml ± 11 µg/ml; déviation standard: 4%). A ce moment l'activité peroxydasique est mesurée (fig. 3). Nous observons pendant 40 heures, dans le surnageant, des fluctuations périodiques de l'activité peroxydasique. La période est d'environ 12.8 heures et l'amplitude de 0.12 ΔDO/min (21% de l'activité moyenne).

Conclusion

La peroxydase, dans des autolysats bactériens, semble présenter, dans des conditions constantes de température, des fluctuations périodiques lentes de son activité. Cette observation recouvre ce qui a déjà été observé dans d'autres extraits enzymatiques de *Kalanchoë* (QUEIROZ-CLARET & QUEIROZ, 1981) ou des solutions de peroxydases de raifort (TOKARSKA & al., 1992).

Certaines protéines de protocaryotes réagissent en solution, in vitro, de la même manière que celles des eucaryotes. Celles-là pourraient donc être utilisées pour comprendre le fondement de la mesure du temps par les organismes vivants (autolysats d'espèces bactériennes différentes, mutants de la même espèce, protéines artificielles, etc.). Les échanges de protons lents entre certains acides aminés hydrophiles et hydrophobes pourraient être responsables du mouvement lent de la protéine, en particulier au niveau des sites actifs, et provoqueraient des fluctuations rythmiques de l'activité enzymatique. Par le biais de l'eau liée et des échanges de protons, une coopérativité s'installerait parmi la population enzymatique dans l'espace cellulaire ou liée aux membranes. Si l'hypothèse se vérifie, cela ouvre la possibilité, par voie génétique, de créer des protéines ayant un rythme de fluctuation déterminé et ainsi changer l'orientation dans le temps du travail cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- BÜNNING, E. (1973). *The Physiological Clock*. Springer, Verlag, New York.
 EDMUNDS, L. N. (1988). *Cellular and molecular bases of biological clocks*. Springer Verlag, New York.
 GOLDBETER, A. (1990). *Rhythmes et Chaos*. Masson, Paris.
 GREPPIN, H. & S. GOUDA (1972). L'alternative respiratoire chez *Pseudomonas fluorescens* en fonction de l'offre du milieu. *Saussurea* 3: 167-176.
 HASTINGS, W. J. & H. G. SCHWEIGER (1976). *The molecular basis of circadian rhythms*. Abakon Verlag, Berlin.

- KIMMICH, R., T. GNEITING, K. KOTITSCHKE & G. SCHUR (1990). Fluctuations, exchange processes, and water diffusion in aqueous protein systems. *Biophys. J.* 58: 1183-1197.
- KIPPERT, F. (1991). Essential clock proteins/circadian rhythms in prokaryotes — What is the evidence? *Bot. Acta* 104: 2-4.
- LENK, R., C. QUEIROZ-CLARET, O. QUEIROZ & H. GREPPIN (1982). Studies by NMR in vitro spontaneous oscillations of activity in enzymatic extracts. *Chem. Phys. Lett.* 92: 187-190.
- MILLET, B. & G. MANACHÈRE (1983). *Introduction à l'étude des rythmes biologiques*. Vuibert, Paris.
- QUEIROZ, O. (1985). Spontaneous long-period oscillations in the catalytic capacity of enzymes in solution. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 16: 1-9.
- QUEIROZ-CLARET, C. & O. QUEIROZ (1981). Rythmes circadiens spontanés d'activité enzymatique (PEP carboxylase et malate deshydrogénase de *Kalanchoë*) dans des extraits maintenus en conditions constantes. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* 292: 1237-1240.
- QUEIROZ-CLARET, C., R. LENK, O. QUEIROZ & H. GREPPIN (1988). NMR studies of in vitro slow oscillations in enzymes properties and dissipative structures. *Pl. Phys. Biochem.* 26: 333-338.
- RENSING, L. & M. I. JAEGER (1985). *Temporal Order*. Springer Verlag, Berlin.
- RUPIFY, J. A., E. GRATTON & G. CARERI (1983). Water and globular proteins. *TIBS* 8: 18-22.
- TOKARSKA, M., H. GREPPIN, M. BONZON & C. PENEL (1993). In vitro slow fluctuations in peroxidasic enzymes activity. *Chronobiol. Int.* (in press).
- WOODWARD, C., I. SIMON & E. TÜCHSEN (1982). Hydrogen exchange and the dynamic structure of proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 48: 135-160.

Adresse de auteurs: M. T.: Laboratoire de physique, Ecole polytechnique de Lublin, 38a, rue Nadbystrzycka, PL 20-618 Lublin.

H. G.: Laboratoire de biochimie et physiologie végétales, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève 4.

