

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 24 (1993)

Artikel: Estimation, par Résonance Magnétique Nucléaire du Phosphore 31, du métabolisme énergétique chez *Chlorella rubescens* Chod., en culture synchrone
Autor: Calderon, Carlos / Crespi, Pierre / Simon, Patrice
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099162>

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>

Estimation, par Résonance Magnétique Nucléaire du Phosphore 31, du métabolisme énergétique chez *Chlorella rubescens* Chod., en culture synchrone

CARLOS CALDERON, PIERRE CRESPI
PATRICE SIMON & HUBERT GREPPIN

ABSTRACT

CALDERON, C., P. CRESPI, P. SIMON & H. GREPPIN (1993). Estimation, by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance, of energy metabolism in synchronized cells of *Chlorella rubescens* Chod. *Saussurea* 24: 23-36. In French, English and French abstracts.

Energetic fluctuations of synchronized cells of *Chlorella rubescens* in autotrophic cultures have been investigated *in vivo* by ^{31}P nuclear magnetic resonance. For this purpose, a special device has been used to maintain algae in optimal physiological conditions. By this method, photosynthetic production of ATP (adenosine triphosphate) has been visualized. Two peaks of ATP have been detected during the photophase, before the cell division, and an additional one appeared during the nyctoperiod. All these data were consistent with those obtained by biochemical way in a previous study (CALDERON & al., 1993). An *in vivo* fluctuation of inorganic phosphate, reflecting its use by the processes of photophosphorylation and oxidative phosphorylation has also been shown during the cell cycle of the microalga. Finally, concomittant fluctuations of polyphosphates were observed suggesting, besides a role in stock reserve, an active role in the regulation of phosphorylated compounds and in the cell energetic state.

RÉSUMÉ

CALDERON, C., P. CRESPI, P. SIMON & H. GREPPIN (1993). Estimation, par Résonance Magnétique Nucléaire du Phosphore 31, du métabolisme énergétique chez *Chlorella rubescens* Chod., en culture synchrone. *Saussurea* 24: 23-36. En français, résumés anglais et français.

La Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (^{31}P RMN), technique non destructive et non invasive, a permis de corroborer *in vivo* les fluctuations énergétiques mesurées biochimiquement (CALDERON & al., 1993) chez *Chlorella rubescens* Chod., en culture synchrone autotrophe. Deux pics d'ATP (Adénosine triphosphate) ont été détectés durant la photophase, avant la division cellulaire, et un troisième durant la nyctopériode, lors de la division cellulaire, confirmant les mesures biochimiques. La production photosynthétique d'ATP a pu être visualisée, par la technique de ^{31}P RMN, moyennant l'utilisation d'un dispositif spécial permettant le maintien des algues dans des conditions physiologiques optimales. L'évolution *in vivo* du phosphate inorganique, reflétant son utilisation dans les processus de photophosphorylation et de phosphorylation oxydative a été également mise en évidence au cours du cycle cellulaire. Finalement, la ^{31}P RMN nous a également permis d'observer des variations relatives des polyphosphates, laissant présumer, outre un rôle de réserve, un rôle actif dans la régulation de l'état énergétique cellulaire.

Introduction

L'étude du métabolisme énergétique de la microalgue *Chlorella rubescens* Chod. a montré que le système adénylique et l'état énergétique de la cellule sont soumis à un contrôle puissant au cours du cycle cellulaire (CALDERON, 1990). Une fluctuation de la charge énergétique, composée de trois pics majeurs, a ainsi pu être mise en évidence par des mesures biochimiques dans différentes conditions de culture (CALDERON & al., 1993). C'est en autotrophie que la résolution des pics est apparue la meilleure et nous avons donc estimé pertinent de vérifier par la méthode de ^{31}P RMN quelques-uns des paramètres physiologiques et énergétiques de notre système d'étude, en condition de culture autotrophique. De plus, de nouveaux éléments d'analyse seront ajoutés grâce à l'examen des polyphosphates et des phosphates inorganiques.

Le développement et l'application en biologie des techniques de RMN, en phase liquide, ont permis d'obtenir des spectres du phosphore 31 qui donnent des informations sur le pH intracellulaire (MOON & RICHARDS, 1973; ROBERTS & al., 1981a, b), la compartimentation intracellulaire (BELTON & RATCLIFFE, 1985), le phénomène du transport membranaire, les concentrations de métabolites et leurs interconversions et flux (GADIAN & al., 1979; UGURBIL & al., 1979; O'NEILL & RICHARDS, 1980), et plus récemment sur les polyphosphates et les nucléotides adényliques, pendant le cycle cellulaire des algues (SIANOUDIS & al., 1985; DAWSON & MC DONALD, 1987).

Quelques remarques doivent être faites concernant la technique de ^{31}P RMN. S'il est vrai que l'intensité d'un pic du spectre est linéairement proportionnelle à la quantité du groupement chimique responsable de celui-ci, elle n'en demeure pas moins une technique peu sensible. En effet, une quantification des niveaux de phosphates n'est possible que si leurs concentrations dépassent 0,1 mM. Deux étapes importantes doivent être effectuées pour permettre de lier l'intégrale d'un pic à une certaine concentration; premièrement, la sensibilité de l'appareillage doit être évaluée par l'utilisation d'un composé de concentration connue. Cette référence peut servir de standard interne pendant les mesures sur le matériel biologique; deuxièmement, la proportionnalité liant l'aire du pic à la concentration n'est pas la même suivant les différents pics. L'utilisation de produits purs pour chaque pic comme référence est donc nécessaire. Le peu de sensibilité de la technique peut être compensé par une augmentation de la densité des cellules, lors des mesures. Il devient alors nécessaire d'utiliser des dispositifs spéciaux afin de créer des conditions physiologiques définies et homogènes. Dans notre cas, un apport constant en gaz carbonique et aussi en énergie lumineuse a permis d'obtenir des spectres RMN du ^{31}P d'une bonne résolution. L'utilisation d'un standard interne a d'autre part rendu possible la comparaison des mesures réalisées sur différents échantillons. Ces conditions étant réunies, nous avons donc pu évaluer la capacité de photophosphorylation de *Chlorella rubescens* au cours de son cycle cellulaire et, à partir de cette capacité, nous avons tenté de quantifier l'ATP et le phosphate inorganique présent.

Matériel et méthodes

Microalgue et milieu de culture

La souche utilisée a été *Chlorella rubescens* Chod. (B-24) de notre algorithme. L'algue a été cultivée axéniquement dans un milieu Detmer modifié et en condition de culture synchrone autotrophe (CALDERON, 1990; CALDERON & al., 1993).

Préparation des cultures et échantillonnage

Des échantillons de 30 ml de culture ont été prélevés au cours du cycle cellulaire et, après une centrifugation à 12000 g pendant 10 min. et à 4°C (Beckman, rotor JA-20), la concentration algale est ramenée à 5×10^7 cellules/ml. Ce culot est lavé trois fois avec une solution de MOPS 50 mM et d'EDTA 2 mM, à pH 6,5 (SIANOUDIS & al., 1987), ceci visant à empêcher de possibles interférences paramagnétiques. On laisse ensuite les algues dans un volume minimum du même milieu, tout en conservant la concentration finale désirée.

Dispositif spécial: fibre optique et micro-barboteur

Afin de maintenir les cellules dans un état physiologique stable pendant les mesures, nous avons mis au point d'après MITSUMORI & ITO (1984a), un dispositif spécial permettant d'aérer et d'illuminer les algues à l'intérieur même du spectromètre. Une lampe halogène (40W) a été utilisée comme source lumineuse et la lumière a été conduite à travers une fibre optique (diamètre 200 μ m, fibre optique multimode à saut d'indice silice silicone PCS 200). Cette fibre est introduite dans le tube pour les essais de RMN où la photo-irradiation atteint 10 Klux. En utilisant un tuyau en plastique (1mm de diamètre), on fait barboter l'échantillon avec de l'air contenant 5% de CO₂ et avec un débit de 100 ml/min. Ceci permet d'homogénéiser la solution et d'apporter le gaz carbonique pour les besoins métaboliques.

Appareil et calibrage

Nous avons utilisé un spectromètre RMN Bruker WP200, à une fréquence de résonance pour le ³¹P de 81,01 MHz. Le temps d'accumulation (A.Q) a été de 0,5 sec., la relaxation (R.D) de 2 sec. et le temps entre deux scans de 2,5 sec. Mille scans ont été accumulés pour chaque spectre. Le calibrage de nos mesures a été réalisé avec l'acide méthylène diphosphonique comme référence (0 ppm) (SIANOUDIS & al., 1985). Pour la stabilisation du champ magnétique directeur nous avons ajouté de l'eau deutériée à l'intérieur d'un tube capillaire qui contenait aussi la référence et qui plongeait dans la solution d'algues.

Concentrations intégrées et étalonnage

La technique conventionnelle ³¹P RMN, en phase liquide, que nous avons utilisée donne une intensité du signal qui est intégrée sur la totalité de l'échantillon à l'intérieur de la bobine détectrice. Ainsi, les intensités des pics du spectre peuvent être considérées comme des concentrations intégrées permettant une analyse semi-quantitative de notre système (KIME & al., 1982). Considérant que l'abondance isotopique (a_i) du ³¹P est de 100%, nous proposons l'équation suivante pour la quantification des différents phosphates à partir du spectre ³¹P RMN chez *Chlorella*:

$${}^{31}\text{P}_T = 1/s \sum_{a=1}^{a=n} \int {}^{31}\text{P}_a$$

- $^{31}\text{P}_T$: représente la totalité (100%) du signal intégré des fréquences de résonance.
- $^{31}\text{P}_a$: correspond aux différentes fréquences de résonance intégrées du spectre RMN soit aux aires totales des raies d'absorption respectives. Ces différentes fréquences vont dans notre cas de 1 à 6 ; Fructose-6-phosphate (1), phosphate inorganique (2), ATP α (3), ATP γ (4), ATP β (5) et polyphosphates (6).
- s: représente l'aire du standard interne, soit l'acide méthylène diphosphonique.

Ainsi, la "concentration intégrée" totale de ^{31}P est égale à la somme des concentrations intégrées, aires des raies d'absorption, de chaque fréquence spécifique. Néanmoins, pour être plus précis dans nos calculs, il faut à chaque fois rapporter les valeurs des fréquences intégrées à une valeur standard (LAUER & al., 1989). L'utilisation d'un standard interne (s) nous permet de corriger les fluctuations dues aux variations du champ magnétique directeur. Ainsi, nous avons pu réaliser des courbes d'étalonnage, rapportées chaque fois au standard interne, pour le phosphate inorganique (Pi) et pour l'ATP. Les mesures sont effectuées à pH neutre. Dans le cas de l'ATP, et en considérant sa triple raie de fréquence de résonance nous avons défini que:

$$\text{ATP} = 1/s \sum \text{ATP } \alpha, \gamma, \beta$$

L'intégrale totale de la résonance magnétique des noyaux ^{31}P de la molécule d'ATP sera donc égale à la somme des résonances de l'ATP α , γ , β divisée par la valeur intégrée du signal du standard interne.

Seule une analyse qualitative sera effectuée par RMN du ^{31}P et ceci pour deux raisons principales. La technique de RMN du ^{31}P mesure seulement les polyphosphates (poly-P) non cycliques d'une part et, d'autre part il est très difficile de trouver un bon standard purifié adapté à notre étude sur les algues.

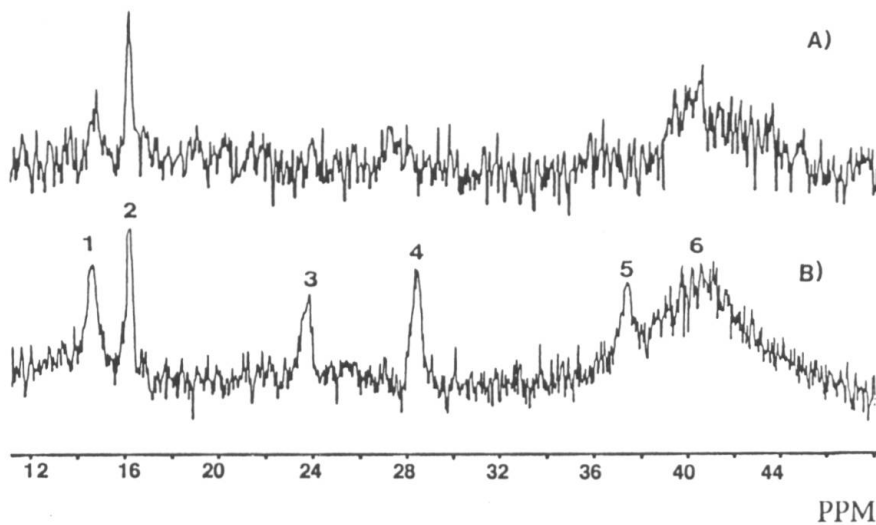


Fig. 1. — Photophosphorylation *in vivo* chez *Chlorella rubescens* Chod. Les spectres montrent l'évolution de l'ATP à l'obscurité (A) et à la lumière en présence de CO_2 après 15 minutes (B). Les pics observés sont: le fructose 6-phosphate (1), le phosphate inorganique (2), l'ATP α (3), l'ATP β (4), l'ATP γ (5) et les polyphosphates (6). Le temps d'accumulation a été, pour A et B, de 1000 scans.

Résultats

*Spectre RMN ^{31}P chez *Chlorella rubescens* Chod.*

La qualité du spectre dépend de plusieurs facteurs: les conditions de culture dont le pH, les macro-et micronutriments en solution et la dynamique physico-chimique, les conditions d'échantillonnage, la performance et les caractéristiques de l'appareillage et des dispositifs spéciaux mis en œuvre pour chaque expérience (ROBERTS & al., 1981a, b; LAUER & al., 1989; ROLIN & al., 1989). Ainsi, la quantité des "scans", la durée des temps d'enregistrement, les interférences paramagnétiques de certains ions, la puissance du champ directeur, sont des facteurs très importants pouvant modifier la résolution des pics de résonance du ^{31}P . En tenant compte de ces différents facteurs, nous avons obtenu des spectres RMN (fig. 1) comportant non seulement le fructose -6-phosphate (14,80 ppm), le phosphate inorganique (16,20 ppm) et les polyphosphates (40,20 ppm) mais aussi les raies spectrales de l'ATP α , γ , β (23,70 ppm; 28,30 ppm et 37,65 ppm respectivement). De plus la capacité de photophosphorylation de *Chlorella rubescens* a été mise en évidence *in vivo* (fig. 1). Nous avons en effet constaté que la lumière et l'apport de CO_2 amorcent la photosynthèse et de ce fait, après 15 minutes, nous observons une production nette d'ATP.

Evolution de l'ATP et du P_i au cours du cycle cellulaire

Les mesures ont été réalisées seulement aux heures clés établies précédemment par voie biochimique. L'utilisation de courbes étalon (fig. 2) nous a permis d'estimer les concentrations d'ATP et de P_i .

Comme nous pouvons le voir dans la figure 3, nous avons retrouvé *in vivo* les trois événements énergétiques précédemment décrits par l'analyse biochimique. En effet, deux pics d'ATP sont visibles durant la photophase. Le premier a son maximum à l'heure 5 (concentration intégrée = 4,35) et le second à l'heure 52 (concentration intégrée = 5,26). On retrouve le troisième événement à l'heure 85 durant la nyctopériode (concentration intégrée = 4,48) (fig. 3A). Compte tenu de la concentration algale par ml de culture, ces résultats quantifiés en utilisant l'étalonnage préalablement réalisé sont entre 15% et 25% inférieurs à ceux obtenus lors du dosage de l'ATP par voie biochimique (cf. CALDERON & al., 1993).

Nous avons aussi constaté une consommation interne accrue de P_i à l'heure 5 suivie d'une récupération de l'intensité du signal à l'heure 25 (fig. 3B). Entre l'heure 25 et 52, on assiste à une diminution de l'intensité du signal (concentration intégrée) et ensuite une autre récupération a lieu jusqu'à l'heure 70. Enfin, les valeurs de P_i décroissent jusqu'à la fin du cycle à l'heure 94 (fig. 4B). Après quantification, de la même manière que pour l'ATP, ces résultats sont inférieurs de 30% à 40% aux dosages chimiques de P_i (cf. CALDERON, 1990).

Il semble intéressant de relever que ces deux pools, ATP et P_i , suivent une évolution inverse tout au moins pendant la photophase (fig. 3).

Les polyphosphates

L'évolution relative des polyphosphates par rapport aux autres paramètres détectables lors du cycle cellulaire est présentée dans la figure 4. On constate que l'intensité relative du signal des polyphosphates (ainsi que du P_i) est plus faible à l'heure 5 qu'au début du cycle, qu'elle augmente à l'heure 52 et qu'elle est maximale à l'heure 85 avant de

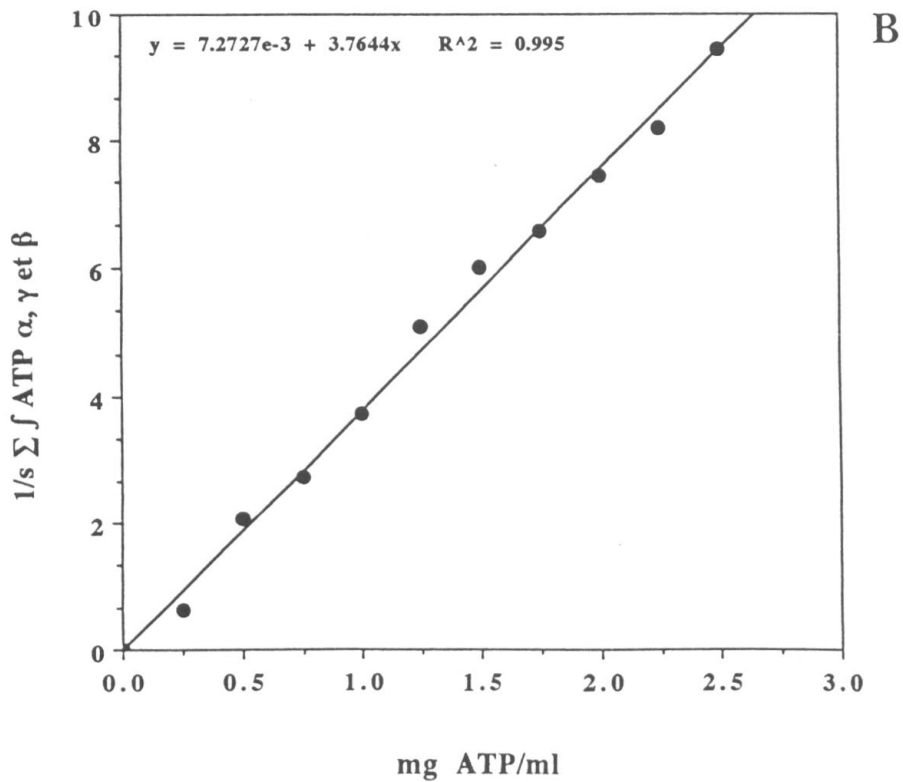
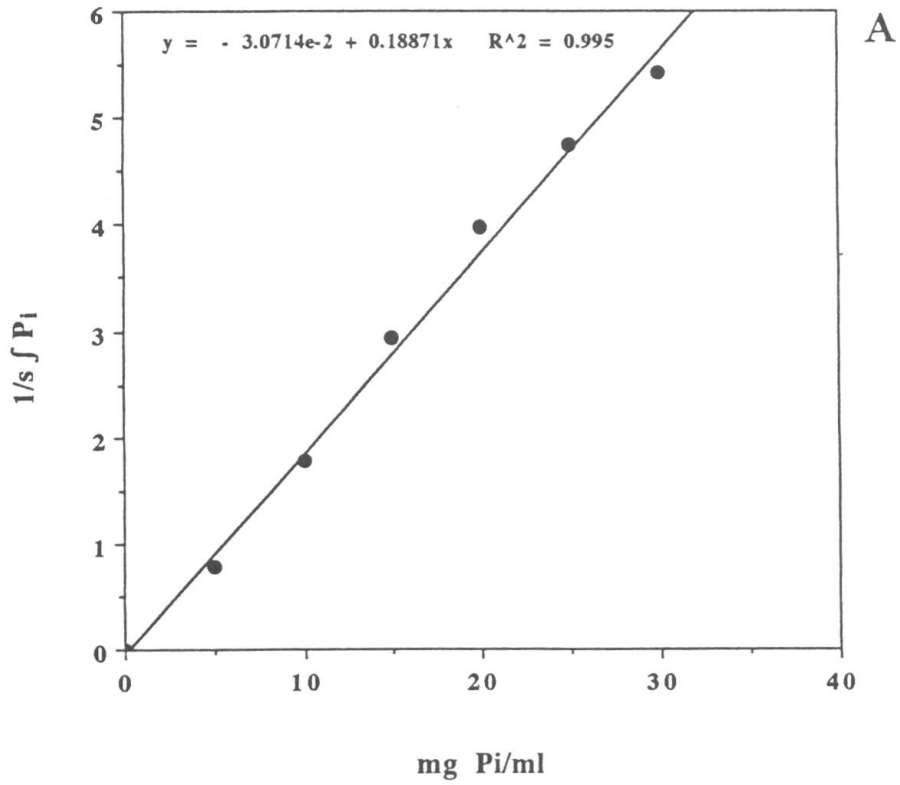


Fig. 2. — Droites d'étalonnage du phosphate inorganique (2A; mg P_i /ml) et de l'ATP (2B; mg ATP/ml) en fonction des intensités intégrées de leurs signaux ^{31}P RMN respectifs. Le standard interne (s) utilisé est l'acide méthylène diphosphonique.

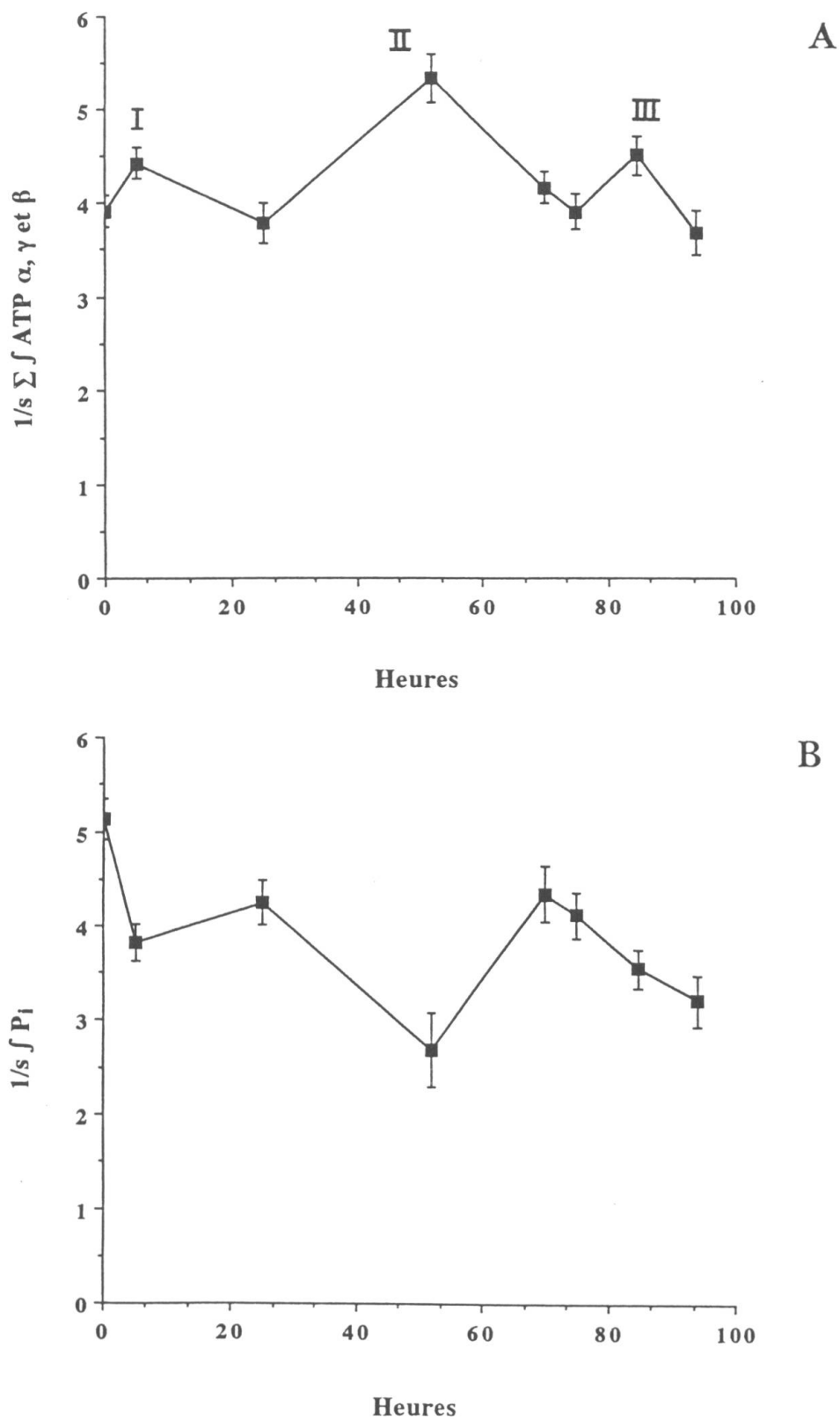


Fig. 3. — Estimation semi-quantitative (concentration intégrée) par ^{31}P RMN de l'évolution de l'ATP (4A) et du phosphate inorganique, Pi , (4B) au cours du cycle cellulaire de *Chlorella rubescens* Chod., en culture synchrone. Trois pics sont indiqués (I, II & III).

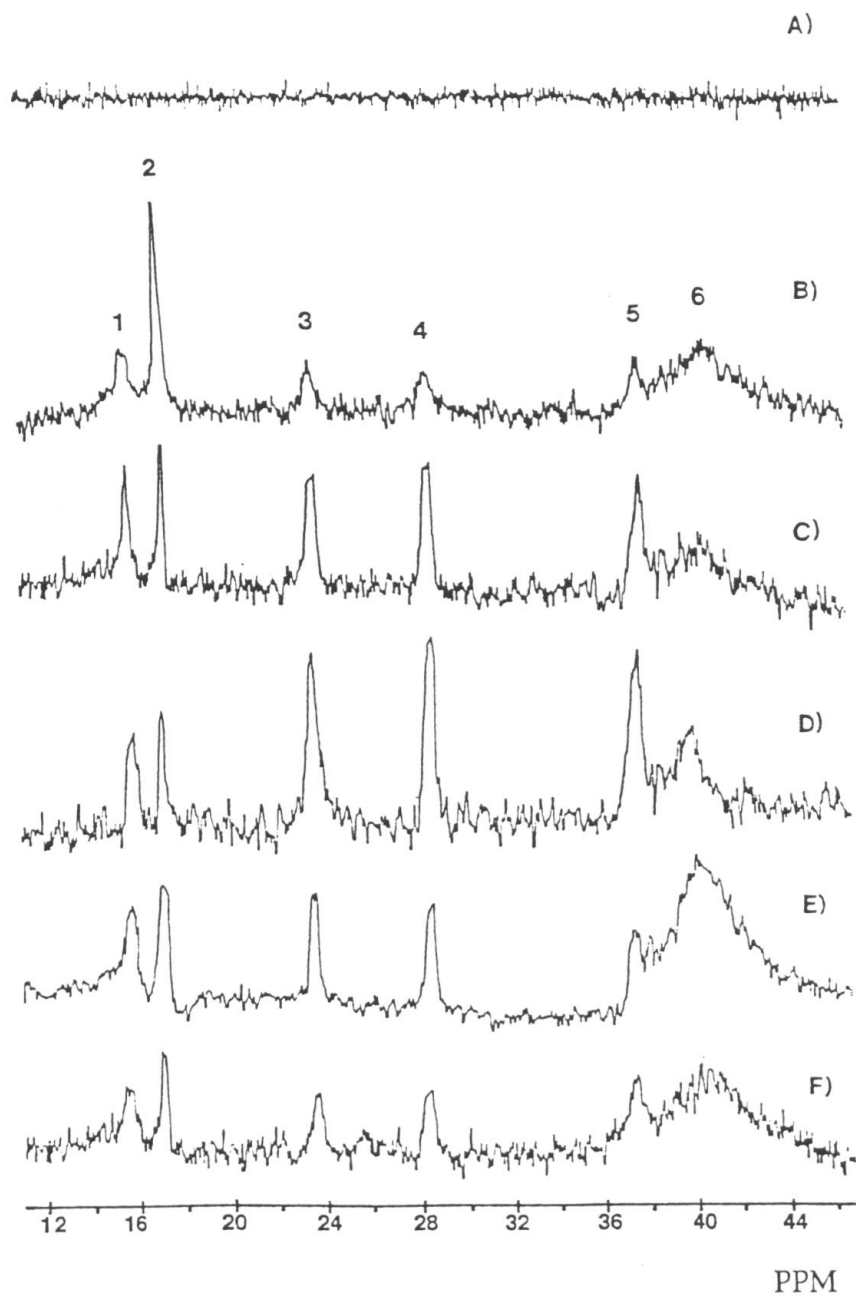


Fig. 4. — Variations de l'intensité du signal ^{31}P RMN du fructose-6 phosphate (1), du phosphate inorganique (2), de l'ATP α (3), de l'ATP γ (4) et β (5), et des polyphosphates (6) au cours du cycle de vie de *Chlorella rubescens* Chod. aux heures 0 (B), 5 (C), 52 (D), 85 (E) et 94 (F) de la culture synchrone. La figure (A) correspond au spectre du milieu de resuspension des algues après lavage avec de l'EDTA. Le temps d'accumulation a toujours été de 1000 scans.

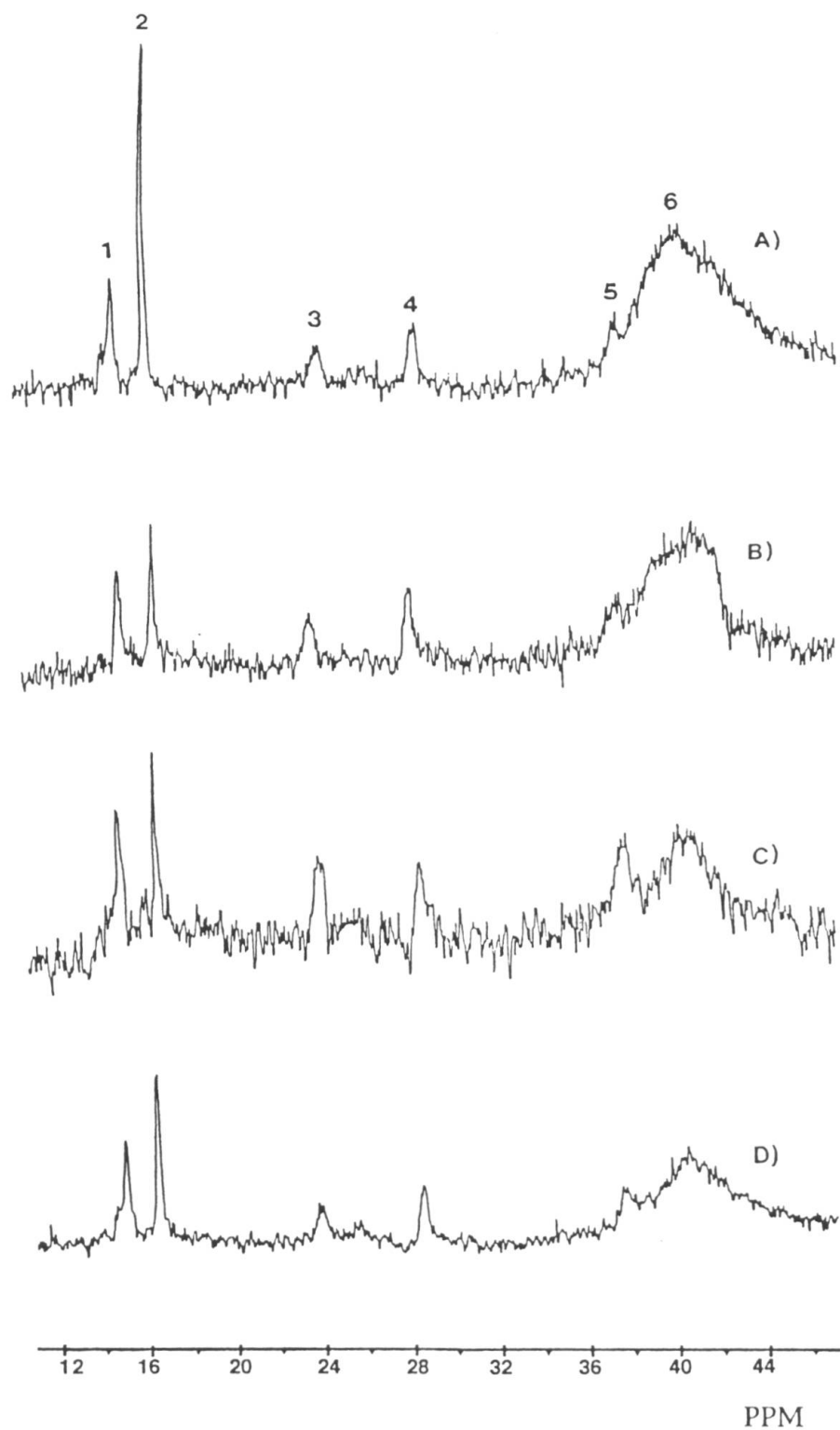


Fig. 5. — Evolution du signal ^{31}P RMN des polyphosphates (6), du P_i (2) et de l'ATP α (3), γ (4) et β (5) dans une culture placée à l'obscurité pendant 4 jours (A, B, C et D successivement). On a utilisé des échantillons synchrones de *Chlorella rubescens* Chod., âgés de 48 heures et préalablement enrichis en phosphate ($1,2 \times 10^{-3}$ M de KH_2PO_4).

retrouver sa valeur de l'heure 0 à la fin de la nyctopériode. Pour illustrer la consommation des polyphosphates (stockage-mobilisation), nous avons placé à l'obscurité et pendant 4 jours des échantillons âgés de 48 heures et issus d'une culture synchrone enrichie en phosphate. Les algues sont en effet cultivées dans une solution contenant $1,2 \times 10^{-3}$ M de KH_2PO_4 . Chaque jour, à la même heure, nous prélevons un échantillon pour les mesures. Nous avons observé une diminution journalière du signal RMN des polyphosphates jusqu'à un niveau très faible au quatrième jour (fig. 5). Le signal d'ATP est continuellement régulé et remarquablement ramené à des valeurs détectables sur notre appareil. Le P_i intracellulaire est aussi utilisé pour les processus de phosphorylation nécessaires au métabolisme. Son signal diminue très fortement à partir du deuxième jour puis reste à un niveau moyen (fig. 5).

Discussion

Une bonne résolution des raies spectrales de l'ATP par la RMN du ^{31}P nécessite que les échantillons soient dans un état physiologique adéquat, c'est-à-dire, dans notre situation, que les algues soient en photosynthèse active. Grâce à une méthodologie et un appareillage adéquats (LEE & RATCLIFFE, 1983; MITSUMORI & ITO, 1984b), il est possible de créer les conditions optimales de lumière et d'apport en CO_2 qui provoquent la stimulation de l'appareil photosynthétique mesurable par la ^{31}P RMN (KALLAS & DAHLQUIST, 1981; FOYER & al., 1982). La production d'ATP à la lumière est due principalement à la photophosphorylation plutôt qu'à la phosphorylation oxydative (MITSUMORI & ITO, 1984b). Nous avons ainsi pu corroborer *in vivo* les fluctuations de l'ATP et du phosphate inorganique, préalablement mesurées par voie biochimique. Il est important de souligner que les mêmes événements énergétiques ont été observés par ces deux techniques. Ces résultats démontrent que la RMN du ^{31}P est une technique fiable et performante pour les analyses physiologiques *in vivo*. Cependant, les résultats en valeur absolue des quantités mesurées par RMN du ^{31}P sont inférieurs à ceux mesurés biochimiquement. Ceci peut s'expliquer par les limitations de la méthode de RMN du ^{31}P , telles la puissance du champ magnétique directeur, l'action des forces ioniques, les interférences paramagnétiques d'un côté et le fait de la compartimentation cellulaire et le pH d'un autre côté. Pour toutes ces raisons, nous insistons sur le fait qu'il est plus juste de rapporter nos résultats à une concentration intégrée plutôt que de chercher à les quantifier de manière absolue.

Nous avons assisté, ces dernières années, à une abondante production scientifique au sujet de l'étude par ^{31}P RMN de la compartimentation cellulaire et de la mobilisation de métabolites intracellulaires. L'orthophosphate inorganique (P_i), notamment, a fait l'objet de multiples recherches. En effet, sa raie spectrale d'absorption est caractérisée par d'importants déplacements chimiques. La dépendance de ceux-ci vis-à-vis particulièrement du pH a permis la détermination du pH de compartiments intra-cellulaires (MOON & RICHARDS, 1973; GADIAN & al., 1979; ILES, 1981). Ceci est d'autant plus important que les concentrations de H^+ jouent un rôle décisif dans la régulation métabolique (BUSA & NUCCITELLI, 1984). Nous n'avons cependant trouvé qu'un pic de P_i qui varie en intensité au cours du cycle de vie. Cette raie unique a aussi été observée par KALLAS & DAHLQUIST (1981), NICOLLAY & al. (1983) et par FOYER & al. (1982). Des travaux plus récents font état d'au moins deux raies spectrales correspondant à deux compartiments cellulaires qui ont un pH différent (SIANOUDIS & al., 1985; SIANOUDIS & al., 1986a). Ces travaux ont montré que, si l'on considère la forme sigmoïdale de la courbe de titration de P_i et si l'on tient compte qu'une différence dans le déplace-

ment chimique d'au moins 0,2 ppm est nécessaire pour que deux signaux P_i soient résolus, une différence minimale de 0,3 à 0,6 unité de pH est nécessaire pour distinguer deux compartiments cellulaires. Les différences de pH entre les compartiments cellulaires de *Chlorella rubescens* seraient apparemment trop petites pour être détectées. Il se peut aussi que les quantités de P_i présentes dans les mitochondries ou dans les chloroplastes soient au-dessous du seuil de sensibilité de notre technique. SIANOUDIS & al. (1987) ont pu déterminer, chez *Chlorella fusca*, en utilisant le 2-déoxyglucose-6-phosphate comme un indicateur de pH cytoplasmique, que ce compartiment avait un pH de 7,0 à 7,2 à l'obscurité et de 7,7 à la lumière. Comme dans notre cas, ces mêmes auteurs n'ont observé qu'un seul pic de P_i intracellulaire et ce pic correspondait au cytoplasme et non aux chloroplastes. Nous pouvons donc supposer que notre pic unique correspond au P_i cytoplasmique.

Le P_i transporté à travers la membrane cellulaire des algues, entre dans un "pool" dynamique du phosphate intracellulaire d'où il est incorporé dans des métabolites phosphorylés, à l'intérieur des organelles subcellulaires, ou transporté et stocké dans des vésicules sous forme de polyphosphates (SMITH, 1966; CEMBELLA & al. 1984). Plusieurs processus métaboliques dont la photophosphorylation et la phosphorylation oxydative permettent la synthèse d'ATP à partir d'ADP et P_i , et régulent les autres nucléotides adényliques. Ainsi, les décroissances de P_i intracellulaire (fig. 3B) peuvent relever d'un processus de "ré-énergisation" de la cellule à travers la synthèse de trinuécléotides (SIANOUDIS & al. 1984). Cette "ré-énergisation" serait active notamment lors des trois événements énergétiques repérés chez *Chlorella rubescens*, en culture synchrone.

Les polyphosphates ont été identifiés comme une forme de mise en réserve, dans les cellules, de groupes phosphates riches en énergie (MEYERHOF & al., 1953), à partir de l'accumulation intracellulaire des orthophosphates absorbés (WINTERMANS, 1955). Ils se présentent sous la forme de granules métachromatiques à l'intérieur de plusieurs compartiments cellulaires et espaces intramembranaires (PEVERLY & al., 1978). La technique de la ^{31}P RMN a énormément contribué à développer l'étude des polyphosphates. Ainsi, l'influence des changements de l'environnement sur le pool des (poly-P) et leur fonction dans le métabolisme des micro-organismes ont été examinées avec ce nouvel outil (ELGAVISH & al., 1980; NICOLAY & al., 1983; FLORENTZ & al., 1984; SIANOUDIS & al., 1986b). La quantité de (poly-P) dans les cellules dépend de l'état métabolique particulier où elles se trouvent pendant le cycle de vie (cf. fig. 4) ou bien des conditions nutritionnelles spécifiques (cf. fig. 5) (MIYACHI & al., 1964; SIANOUDIS & al., 1984). *Chlorella rubescens* a donc la capacité de synthétiser et d'accumuler les (poly-P) à la lumière et en même temps, elle peut mobiliser ces phosphométabolites. L'élévation de la charge énergétique entraîne une demande de P_i et cette demande peut être comblée par le biais de P_i ou des (poly-P) (fig. 4C & D) ou non (fig. 4E). Ainsi, la cellule n'utiliserait pas seulement les (poly-P) qu'en cas de carence totale de P_i dans le milieu (AITCHINSON & BUTT, 1973), mais serait en mesure d'utiliser cette source d'énergie à tout moment. La découverte d'enzymes spécifiques permettant la synthèse d'ATP à travers l'action combinée des poly-P:AMP phosphotransférase et adénylate-kinase (GROENESTIJN & al. 1987) a permis d'attribuer un nouveau rôle, autre que de réservoir de phosphates, aux (poly-P). Plusieurs enzymes telles la polyphosphate kinase (KORNBERG, 1957), la polyphosphate: AMP phosphotransférase (DIRHEIMER & EBER, 1965), la polyphosphate NAD-kinase dépendante (MURATA & al. 1980) sont capables de phosphoryler des adénylates, des nucléotides pyridiniques et quelques composants organiques (KULAEV & VAGABOV, 1983). Chez *Chlorella*, une polyphosphate glucokinase a été mise en évidence (KULAEV, 1975) et plus récemment de nouveaux aspects dans le mécanisme et la cinétique de la réaction de la polyphosphate-kinase (ROBINSON & WOOD, 1986) et de la polyphosphate glucokinase (PEPIN & WOOD, 1986) ont été soulevés. Selon KULAEV & VAGABOV (1983), la fonction générale des polyphosphates à haut poids

moléculaire, dans les micro-organismes, consisterait en la régulation intracellulaire des concentrations d'importants métabolites tels l'ATP, l'ADP et d'autres nucléosides polyphosphates, pyro- et particulièrement orthophosphates.

Dans ce contexte, nous pouvons supposer que nos observations sur l'évolution du pool des polyphosphates chez *Chlorella rubescens* au cours du cycle cellulaire reflètent le rôle actif que ces macromolécules sont amenées à jouer dans le système énergétique cellulaire. Une étude des diverses enzymes mentionnées plus haut est cependant encore nécessaire pour mieux évaluer et apprécier ce rôle.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le prof. J. Tronchet et le D^r F. Barbalat-Rey, de l'unité de chimie pharmaceutique de l'Université de Genève, pour leur collaboration à ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AITCHISON, P. A. & V. S. BUTT (1973). The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. *J. Exp. Bot.* 24: 497-510.
- BELTON, P. S. & R. G. RATCLIFFE (1985). NMR and compartmentation in biological tissues. *Progr. NMR Spectroscopy* 17: 241-279.
- BUSA, W. B. & R. NUCCITELLI (1984). Metabolic regulation via intracellular pH. *Amer. J. Physiol.* 246: R 409-438.
- CALDERON, C. E. (1990). *Etude, en cultures synchrones autotrophes, mixotrophes et hétérotrophes, de l'évolution énergétique (P) de Chlorella rubescens, Chod.* Thèse n° 2455. Département de Botanique et Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université de Genève. Imprimerie de la section de Physique, Genève.
- CALDERON, C. E., P. SIMON & H. GREPPIN (1993). Fluctuation of the adenylate energy charge in synchronous *Chlorella rubescens* Chod. grown in auto-, mixo- and heterotrophic conditions. *Arch. Sci. Genève* 46: 259-272.
- CEMBELLA, A. D., N. J. ANTIA & P. J. HARRISON (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective. *Part 2 CRC Critical Reviews in Microbiology* 11: 13-81.
- DAWSON, P. S. S. & J. C. MACDONALD (1987). Changes in phosphorus magnetic resonance spectra during the cell cycle of phosphorus limited phased culture of *Candida utilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 43: 57-60.
- DIRHEIMER, G. & J. P. EBER (1965). Caractérisation d'une polyphosphate-AMP-phosphotransférase dans *Corynebacterium xerosis*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 260: 3787-3790.
- ELGAVISH, A., G. A. ELGAVISH, M. HALMANN, T. BERMAN & SHOMER (1980). Intracellular phosphorus pools in intact algal cells. ³¹P-NMR and transmission electron microscopy studies. *FEBS Lett.* 117: 137-142.
- FLORENTZ, M., P. GRANGER & P. HARTEMANN (1984). Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy to study phosphorus metabolism of microorganisms from wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 519-525.
- FOYER, C., D. WALKER, C. SPENCER & B. MANN (1982). Observations on the phosphate status and intracellular pH of intact cells, protoplasts and chloroplasts from photosynthetic tissue using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochem. J.* 202: 429-434.
- GADIAN, D. G., G. K. RADDA, R. E. RICHARDS & P. J. SEELEY (1979). ³¹P NMR in living tissue: the road from a promising to an important tool in biology. In: SHULMAN, R. G. (Ed.), *Biological Applications of Magnetic Resonance*. Acad. Press, New York.
- GROENESTIJN VAN, J. W., M. H. DEINEMA & A. J. B. ZEHNDER (1987). ATP production from polyphosphate in acinetobacter strain 210 A. *Arch. Microbiol.* 148: 14-19.
- ILES, R. (1981). Measurement of intracellular pH. *Bioscience Rep.* 1: 687-699.
- KALLAS, T. & F. W. DAHLQUIST (1981). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analysis of internal pH during photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biochemistry* 20: 5900-5907.
- KIME, M. J., R. G. RATCLIFFE, R. J. P. WILLIAMS & B. C. LONGHMAN (1982). The applications of ³¹P nuclear magnetic resonance to higher plant tissue I. Detection of spectra. *J. Exp. Bot.* 33: 656-669.

- KORNBERG, S. R. (1957). Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 26: 294-300.
- KULAEV, I. S. (1975). Biochemistry of inorganic polyphosphates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 73: 131.
- KULAEV, I. S. & V. M. VAGABOV (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 24: 81-171.
- LAUER, M. J., D. G. BLEVINS & H. SIERZPUTOWSKA-GRACZ (1989). ³¹P Nuclear magnetic resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine max* L.) as affected by phosphate nutrition. *Plant Physiol.* 89: 1331-1336.
- LEE, R. B. & R. G. RATCLIFFE (1983). Development of an aeration system for use in plant tissue NMR experiments. *J. Exp. Bot.* 34: 1213-1221.
- MEYERHOF, O., R. SHAFAS & A. KAPLAN (1953). Heat of hydrolysis of trimetaphosphate. *Biochem. Biophys. Acta* 12: 121-127.
- MITSUMORI, F. & O. ITO (1984a). A simple photoirradiation method for biological samples in NMR probes and its application to photosynthesizing green algae. *J. Magnetic Resonance* 60: 106-108.
- MITSUMORI, F. & O. ITO (1984b). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of photosynthesizing *Chlorella*. *FEBS Lett.* 174: 248-252.
- MIYACHI, S., R. KANAI, S. MIHARA, S. MIYACHI & S. AOKI (1964). Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 93: 625-634.
- MOON, R. B. & J. H. RICHARDS (1973). Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 248: 7276-7278.
- MURATA, K., T. UCHIDA, K. TANI, J. KATO & I. CHIBATA (1980). Metaphosphate: a new phosphoryl donor for NAD phosphorylation. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 44: 61-68.
- NICOLAY, K., W. A. SCHEFFERS, P. M. BRUINENBERG & R. KAPTEIN (1983). In vivo ³¹P NMR. Studies on the role of the vacuole in phosphate metabolism in yeasts. *Arch. Microbiol.* 134: 270-275.
- O'NEILL, K. & C. P. RICHARDS (1980). Biological ³¹P NMR spectroscopy. *A. Rep. NMR Spec.* (Ed. G. A. Webb), 10A: 133-236.
- PEPIN, C. A & H. G. WOOD (1986). Polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. Kinetics and demonstration that the mechanism involves both processive and nonprocessive type reactions. *J. Biol. Chem.* 261: 4476-4480.
- PEVERLY, J. H., J. ADAMEC & M. V. PARTHASARATHY (1978). Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. *Pl. Physiol.* 62: 120-126.
- ROBERTS, J. K. M., P. M. RAY, N. WADE-JARDETZKI & O. JARDETZKI (1981a). Extent of intracellular pH changes during H⁺ extrusion by maize root tip cells. *Planta* 152: 74-78.
- ROBERTS, J. K. M., N. WADE-JARDETZKI & O. JARDETZKI (1981b). Intracellular pH measurements by ³¹P nuclear magnetic resonance. Influence of factors other than pH on ³¹P chemical shifts. *Biochemistry* 20: 5389-5394.
- ROBINSON, N. A. & H. G. WOOD (1986). Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that the synthesis and utilization of polyphosphate is a processive mechanism. *J. Biol. Chem.* 261: 4481-4485.
- ROLIN, D. B, R. T. BOSWELL, C. SLOGER, S. I. TU & P. E. PFEFFER (1989). In vivo ³¹P NMR spectroscopic studies of soybean *Bradyrhizobium* symbiosis I. Optimization of parameters. *Pl. Physiol.* 89: 1238-1246.
- SIANOUDIS, J., A. MAYER & D. LEIBFRITZ (1984). Investigation of intracellular phosphate pools of the green alga *Chlorella fusca* using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Org. Magn. Res.* 22: 364-368.
- SIANOUDIS, J., A. C. KÜSEL, T. NAUJOKAT, W. OFFERMANN, A. MAYER, L. H. GRIMME & D. LEIBFRITZ (1985). Respirational activity of *Chlorella fusca* monitored by in vivo ³¹P NMR. *Eur. Biophys. J.* 13: 89-97.
- SIANOUDIS, J., A. C. KÜSEL, D. LEIBFRITZ, L. H. GRIMME & A. MAYER (1986a). The cytoplasmic pH of the green alga *Chlorella fusca* measured by ³¹P NMR-spectroscopy. In: MARET, G., J. KIEPENHEVER, N. BOCCARA (eds.), *Biophysical effects of steady magnetic fields*. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- SIANOUDIS, J., A. C. KÜSEL, A. MAYER, L. H. GRIMME & D. LEIBFRITZ (1986b). Distribution of polyphosphates in cell-compartments of *Chlorella fusca* as measured by ³¹P NMR-spectroscopy. *Arch. Microbiol.* 144: 48-54.

- SIANOUDIS, J., A. C. KÜSEL, A. MAYER, L. H. GRIMME & D. LEIBFRITZ (1987). The cytoplasmic pH in photosynthesizing cells of the green alga *Chlorella fusca*, measured by ^{31}P NMR-spectroscopy. *Arch. Microbiol.* 147: 25-29.
- SMITH, F. A. (1966). Active phosphate uptake by *Nitella translucens*. *Biochem. Biophys. Acta* 126: 94.
- UGURBIL, K., R. G. SHULMAN & T. R. BROWN (1979). High resolution ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of *Escherichia coli* cells in vivo. In: SHULMAN, R. G. (ed.), *Biological applications of magnetic resonance*. Academic Press, New York.
- WINTERMANS, J. F. G. M. (1955). Polyphosphate formation in *Chlorella* in relation to photosynthesis. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 55: 69-126.