

CARACTERISTIQUES DE LA RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE
(Rubisco) DU TOURNESOL

B. RANTY*, E. MARTINEZ-BUSTAMANTE**, M. PIQUEMAL*, G. CAVALIE*

*Centre de Physiologie Végétale, UA CNRS n° 241, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cédex, France

**Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, Colombie

SUMMARY

In order to explain the high photosynthetic capacity exhibited by sunflower plant, some properties of the enzyme responsible for the CO_2 and O_2 fixation were investigated with special attention to substrate specificity factor (SSF) and the activation state. Compared to that of the Rubisco of different C_3 plants the substrate specificity factor was higher for the sunflower enzyme ; this protein did not exhibit a high affinity for CO_2 , but the ratio of the two activities (V_c/V_o) was about two times as high as in barley or soybean. Measurements of total and initial activities led to per cent activation values of about 100 % for the sunflower Rubisco, and very much lower for the enzyme of other cultivated species (ranging from 35 to 75 % for Horse Bean, Pea, Wheat and Soybean). Furthermore, the activation state of the sunflower Rubisco remained high during all the diurnal period. So the carboxylase of this plant is supposed to exhibit, in vivo, the whole day long, the maximum of its capacity.

INTRODUCTION

Il est maintenant bien connu que le Tournesol, végétal de type photosynthétique C_3 , manifeste une photosynthèse nette élevée, de l'ordre de 40 mg de CO_2 par dm^2 de surface foliaire et par heure (Fock et al., 1979). Comparativement à d'autres espèces de type C_3 , ces performances ont été attribuées à une faible résistance stomatique (Potter et Breen, 1980), à une moindre résistance du mésophylle à la diffusion du CO_2 (Holmgreen et al., 1965) ou encore à une meilleure énergisation de l'enveloppe du chloroplaste (Poincelot et Day, 1976). De plus, Delaney et Walker (1978) ont montré une plus grande efficacité du transport des électrons dans les thylacoïdes des chloroplastes de Tournesol ainsi qu'une vitesse plus élevée de carboxylation du ribulose bisphosphate (RuBP). Il semble ainsi que l'enzyme assurant la fixation photosynthétique du CO_2 , la Ribulose 1-5 bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) soit directement impliquée dans l'expression des performances photosynthétiques du Tournesol (Ranty et Cavalié, 1982). Les résultats présentés dans ce travail montrent que non seulement certaines propriétés cinétiques de l'enzyme, dont le rapport de spécificité des substrats, mais aussi sa capacité d'expression in vivo, mesurée par le degré d'activation, peuvent être invoquées pour expliquer le taux d'assimilation particulièrement élevé de cette plante.

MATERIEL ET METHODES

Les différentes analyses ont été effectuées à partir des feuilles de Tournesols cv Mirasol ou Topflor, cultivés en salle conditionnée (éclairage : $300 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; température jour-nuit : $26^\circ\text{C}-20^\circ\text{C}$; héméroperiode : 14 h ; degré hygrométrique de l'air : 60 à 80 % de la saturation), sur sable imbibé de la solution nutritive de Hoagland-Arnon

ou au champ (dispositif expérimental de la Station Agronomique de Toulouse-Auzeville).

Détermination du facteur de spécificité des substrats. La mesure simultanée des activités RuBP carboxylase et oxygénase est réalisée selon une méthode radiochimique décrite par Jordan et Ogren (1981a). Le rapport des activités s'exprime par la relation : $v_c/v_o = SSF \times [CO_2]/[O_2]$, où v_c et v_o sont les vitesses de carboxylation et d'oxygénation du RuBP, $[CO_2]$ et $[O_2]$ les concentrations en substrats (Laing et al., 1974). Le facteur de spécificité des substrats, obtenu selon cette équation, est défini par l'expression : $SSF = Vc.Ko/Vo.Kc$ où Vc et Vo sont les vitesses maximales des réactions, Kc et Ko les constantes d'affinité pour le CO_2 et l' O_2 .

Détermination de l'état d'activation. L'activité RuBP carboxylase est mesurée par méthode radiochimique (Lorimer et al., 1977), après activation de la protéine ou immédiatement après extraction (Perchorowicz et al., 1982). La première détermination conduit à l'activité totale, la seconde à l'activité initiale. Le degré d'activation est donné par le rapport de l'activité initiale sur l'activité totale x 100.

RESULTATS

1 - Caractéristiques cinétiques et rapport de spécificité des substrats

La mesure simultanée des activités carboxylase et oxygénase a été effectuée pour différentes concentrations en oxygène et en anhydride carbonique. L'évolution du rapport des activités (v_c/v_o) obtenu pour la Rubisco purifiée à partir des feuilles de Tournesol, est représentée par la figure 1. La valeur du facteur de spécificité des substrats correspond, par définition, à la pente de la droite de régression ainsi obtenue (coefficient de corrélation, $r = 0,97$).

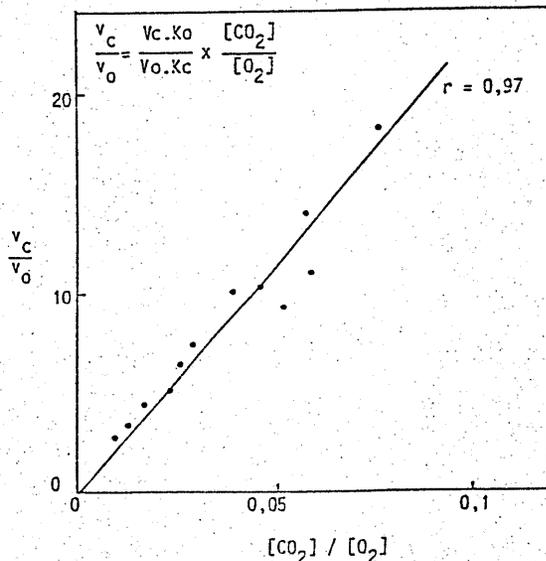


Figure 1 : Evolution du rapport des activités RuBP carboxylase et oxygénase (v_c/v_o) de l'enzyme de Tournesol, déterminé à différentes concentrations en CO_2 et O_2 .

Le facteur de spécificité des substrats et les caractéristiques de l'enzyme de diverses espèces C_3 sont regroupées dans le tableau 1. La Rubisco du Tournesol se distingue nettement de celles des 3 autres végétaux, par la valeur du facteur de spécificité des substrats (+ 25 %) et celle du rapport des activités maximales (2 fois plus élevée).

Tableau 1 - Valeurs des facteurs de spécificité des substrats et des constantes cinétiques de la Rubisco purifiée à partir de quelques plantes C_3 . Kc et Ko sont déduits des mesures de l'activité carboxylase : Kc est déterminé par la représentation de Lineweaver-Burk, Ko est assimilé à la constante d'inhibition de l'activité carboxylase par l'oxygène. Vc/Vo est calculé d'après la relation : $Vc/Vo = SSF \times Kc/Ko$.

Espèce végétale	$\frac{Vc \cdot Ko}{Vo \cdot Kc}$	Kc (μM)	Ko (μM)	$\frac{Vc}{Vo}$
Tournesol	233 \pm 14	9,7	437	5,2
Soja	188 \pm 10	5,1	409	2,3
Orge	186 \pm 10	4,8	475	1,9
Melon	185 \pm 14	8,5	534	2,9

2 - Degré d'activation de la Rubisco du Tournesol

Les activités carboxylase, totale et initiale, ont été mesurées dans les feuilles du haut du couvert de différentes plantes cultivées. Ces déterminations ont été effectuées à plusieurs stades de développement et, pour chaque espèce, dans des échantillons récoltés dans trois parcelles représentant un niveau d'intensification culturale différent. Le tableau 2 regroupe les valeurs moyennes du degré d'activation calculé à l'issue des dosages.

Tableau 2 - Valeurs du degré d'activation de la Rubisco extraite des feuilles d'espèces cultivées, récoltées après 3 à 4 h d'éclaircissement.

Espèce végétale	Degré d'activation (%)
Blé (cv Talent)	50,7 \pm 16,2
Pois (cv Frisson)	59,6 \pm 12,4
Féverole (cv Talo)	32,4 \pm 6,4
Soja (cv Kingsoy)	68,2 \pm 12,5
Tournesol (cv Topflor)	100,0 \pm 12,3

Alors que la Rubisco des feuilles de Tournesol semble apte à manifester in vivo la totalité de ses capacités, celle des autres végétaux ne se trouve, au moment de l'expérimentation, que partiellement activée. L'examen, chez le Tournesol, de l'évolution du degré d'activation au cours de la journée (figure 2) confirme le résultat précédent et révèle des valeurs sensiblement constantes et voisines de 100 %, des premières heures à la fin de la journée. La Rubisco du Tournesol est donc susceptible d'exprimer, tout au long de la journée, la totalité de ses capacités.

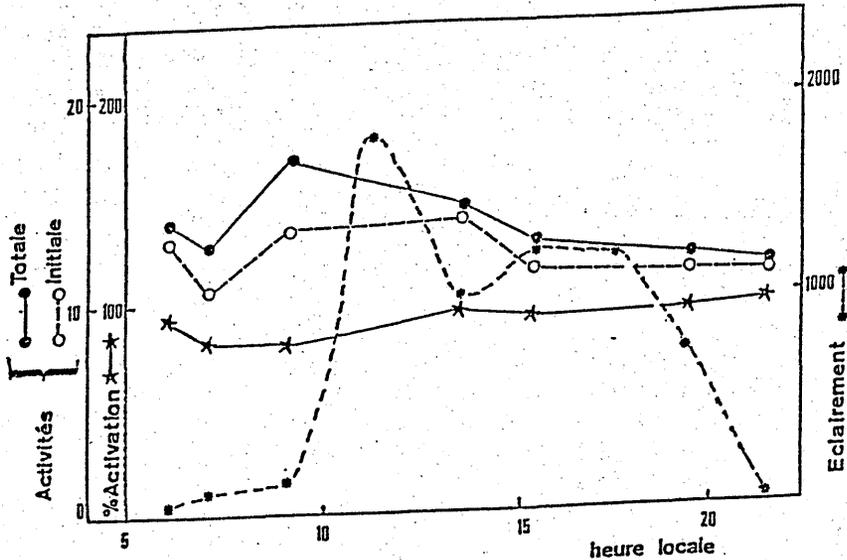


Figure 2 - Variations des activités Rubisco au cours de la journée et évolution de son degré d'activation chez le Tournesol.

DISCUSSION

Les valeurs des constantes d'affinité pour le CO_2 et l' O_2 s'accordent avec celles données, par exemple, par Makino et al. (1985), qui signalent pour le Tournesol un $K_m(\text{CO}_2)$ de $9,4 \mu\text{M}$, ou par Bird et al. (1982), pour lesquels le $K_m(\text{O}_2)$ de la Rubisco de cette même plante est de $429 \mu\text{M}$. Par ailleurs, les travaux de Jordan et Ogren (1981b) ont conduit à des rapports V_c/V_o de l'ordre de 1,5 à 2,5 pour les diverses plantes de type C_3 analysées ; mais le Tournesol ne semble pas avoir fait l'objet de telles déterminations. D'après ces mêmes auteurs, le rapport de spécificité des substrats est pour l'ensemble des végétaux de type photosynthétique C_3 de l'ordre de 80 ; les valeurs supérieures rapportées dans ce travail sont dues à des modifications des conditions expérimentales (pH, température et force ionique du milieu réactionnel) entraînant en particulier la nécessité d'adopter, pour le calcul, une nouvelle valeur de la constante de dissociation du bicarbonate. Les mesures ayant été effectuées strictement dans les mêmes conditions, il apparaît une autre supériorité du rapport de spécificité des substrats dans le cas du Tournesol. D'ailleurs, Parry et al. (1987) ont récemment indiqué une variabilité spécifique de ce même rapport, l'enzyme du Blé se montrant plus performante que celles du Maïs, du Pois ou de l'Épinard. Ainsi, le Tournesol semble-t-il figurer parmi les espèces C_3 les plus efficaces dans leur capacité à fixer du CO_2 sur le Ribulose bisphosphate.

L'activité initiale de la Rubisco (mesurée *in vitro*, sans activation préalable par le CO_2 et le Mg^{++}) semble mieux refléter l'activité *in vivo* ; aussi le degré d'activation ou état d'activation apparaît-il comme une nouvelle caractéristique, plus physiologique, de l'enzyme. Les données bibliographiques ne mentionnent pas le cas du Tournesol mais des valeurs de 70 % pour la Soja (Mc Dermitt et al., 1983), 60 % pour l'Épinard et 30 à 60 % pour le Blé (Perchorowicz et al., 1982), 60 à

80 % pour le Haricot (Seeman et Sharkey, 1986) ont été rapportées, démontrant ainsi une variabilité spécifique certaine de ce paramètre. Lors de l'étude des fluctuations journalières des activités de la Rubisco des feuilles de Soja, récoltées à divers stades de développement, Servaites et al. (1984) ont observé une augmentation progressive du degré d'activation de 6 à 10 h du matin, puis une diminution, à partir de 16 h. Une évolution de l'état d'activation en fonction de l'éclairement a été également remarquée par Perchorowicz et Jensen (1983). Chez le Tournesol, les résultats illustrés par la figure 2, et confirmés par plusieurs séries d'analyses en 1986 et 1987, montrent que le niveau des activités est indépendant de l'éclairement et que l'activité initiale est pratiquement aussi élevée que l'activité totale pendant toute la journée. Ces caractéristiques nécessitent de plus amples investigations intégrant les connaissances récemment acquises et concernant l'inhibiteur nocturne de la Rubisco, le carboxy-arabinitol-1-phosphate (Seeman et al., 1985) et la Rubisco activase (Salvucci et al., 1987).

CONCLUSION

Il semble que les capacités photosynthétiques élevées du Tournesol puissent être attribuées, au moins en partie, à des particularités de la Rubisco ; chez cette plante en effet l'enzyme se distingue par son aptitude à fixer le CO_2 au détriment de l'oxygène, et par un état d'activation, proche de l'optimum, pendant toute l'héméropériode. Le Tournesol constitue ainsi un matériel de choix pour l'étude des modalités de l'expression de l'activité de la Rubisco.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le CETIOM pour l'aide financière et l'intérêt porté à ce travail, ainsi que les Drs R. Blanchet et A. Bouniols, de l'INRA Toulouse-Auzeville, pour leur concours bienveillant.

BIBLIOGRAPHIE

- Bird I.F., Cornelius M.J. et Keys A.J., 1982. Affinity of RuBP carboxylases for carbon dioxide and inhibition of the enzymes by oxygen. *Journal of Experimental Botany* 33, 1004-1013.
- Delaney M.E. et Walker D.A., 1976. A reconstituted chloroplast system from *Helianthus annuus*. *Plant Science Letters* 7, 285-294.
- Delaney M.E. et Walker D.A., 1978. Comparison of the kinetic properties of ribulose biphosphate carboxylase in the chloroplast extracts of spinach, sunflower and four other reductive pentose phosphate pathway species. *Biochemical Journal* 171, 477-482.
- Fock H., Klug K. et Canvin D.T., 1979. Effect of carbon dioxide and temperature on photosynthesis CO_2 uptake and photorespiratory CO_2 evolution in sunflower leaves. *Planta* 145, 219-223.
- Holmgreen P., Jarvis P.G. et Jarvis M.S., 1965. Resistances to carbon dioxide and water vapour transfer in leaves of different plant species. *Physiologia Plantarum* 18, 557-573.
- Jordan D.B. et Ogren W.L., 1981a. A sensitive assay procedure for simultaneous determination of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activities. *Plant Physiology* 67, 237-245.
- Jordan D.B. et Ogren W.L., 1981b. Species variation in the specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* 291, 513-515.

- Laing W.A., Ogren W.L. et Hageman R.H., 1974. Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiology* 54, 678-685.
- Lorimer G.H., Badger M.R. et Andrews T.J., 1977. D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase : improved methods for the activation and assay of catalytic activities. *Analytical Biochemistry* 78, 66-75.
- Makino A., Mae T. et Ohira K., 1985. Enzymic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase purified from rice leaves. *Plant Physiology* 79, 57-61.
- Mc Dermitt D.K., Zeiher C.A. et Porter C.A., 1983. Physiological activity of RuBP carboxylase in soybeans. Dans : *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 1, Published by the Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program, University of Missouri, Colombia.
- Parry M.A.J., Schmidt C.N.G., Cornelius M.J., Millard B.N., Burton S., Gutteridge S., Dyer T.A. et Keys A.J., 1987. Variations in properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from various species related to differences in amino acid sequences. *Journal of Experimental Botany* 38, 1260-1271.
- Perchorowicz J.T. et Jensen R.G., 1983. Photosynthesis and activation of ribulose bisphosphate carboxylase in wheat seedlings. *Plant Physiology* 71, 955-960.
- Perchorowicz J.T., Raynes D.A. et Jensen R.G., 1982. Measurement and preservation of the *in vivo* activation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in leaf extracts. *Plant Physiology* 69, 1165-1168.
- Poincelot R.P. et Day P.R., 1976. Isolation and bicarbonate transport of chloroplast envelope membranes from species of differing net photosynthetic efficiency. *Plant Physiology* 57, 334-338.
- Potter J.R. et Breen P.J., 1980. Maintenance of high photosynthetic rates during the accumulation of high leaf starch levels in sunflower and soybean. *Plant Physiology* 66, 528-531.
- Ranty B. et Cavalié G., 1982. Purification and properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from sunflower leaves. *Planta* 155, 388-391.
- Salvucci M.E., Werneke J.M., Ogren W.L. et Portis A.R., 1987. Purification and species distribution of ribulose activase. *Plant Physiology* 84, 930-936.
- Seeman J.R., Berry J.A., Freas S.M. et Krump M.A., 1985. Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light modulated inhibitor of catalysis. *Proceedings of National Academic Sciences USA* 82, 8024-8028.
- Seeman J.R. et Sharley T.D., 1986. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 82, 555-560.
- Servaites J.C., Torisky R.S. et Shih Fong Chao, 1984. Diurnal changes in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity and activation state in leaves of field-grown soybeans. *Plant Science Letters* 35, 115-121.