

BBA 46370

RELATION ENTRE STRUCTURE, COMPOSITION ET FRACTIONNEMENT  
PAR LE TRITON X-100 DE LA LAMELLE CHLOROPLASTIQUE DE LA  
SOUCHE SAUVAGE ET DE DEUX MUTANTS NON PHOTOSYNTHETIQUES  
DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTI*

ALAIN PICAUD

*Laboratoire de Photosynthèse, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette (France)*

(Reçu le 3 mai, 1972)

---

SUMMARY

*Relationship of structure, composition and Triton X-100 fractionation of chloroplast lamellae in wild type and two non-photosynthetic mutant strains of Chlamydomonas reinhardtii*

In order to provide information on the link between the two photosystems studies on the mode of action of Triton X-100 has been carried out on mutants, strains *ac 21*, *Fl 15* and wild type of *Chlamydomonas reinhardtii*. Experiments show that the release of Photosystem I particles from mutant chloroplast fragments needs less Triton X-100 than wild type does and that, compared to wild type, the chloroplast fragments of mutants appear to be deficient in carotenoids (*ac 21*) or in lipids (*Fl 15*). It is possible, therefore, to correlate the easier splitting of the mutant membrane by detergent with a decrease in the amount of these compounds (carotenoids and lipids) in mutant strains.

The following interpretation is proposed: (a) some of the carotenoids could be part of the hydrophobic sites on Photosystem I subchloroplast particles; (b) some polar lipids could be linked to these sites; (c) Triton X-100 could, in a competitive way, replace the membrane lipids linked to the hydrophobic sites of subchloroplast particles. It seems probable that anomalies in the mutant behaviour in regard to the Triton X-100 action are related to membrane structural defects in these mutants.

---

INTRODUCTION

L'étude de la structure et du fonctionnement de l'appareil photosynthétique a été menée selon diverses voies; deux sont concernées dans ce travail:

(1) L'obtention, à partir des lamelles chloroplastiques, de particules enrichies en activités spécifiques de type Système II ou de type Système I. Par l'action des détergents, au moins deux types différents de complexes chromoprotéiques ont pu ainsi être isolés (voir revues<sup>1,2</sup>).

(2) L'étude de mutants non photosynthétiques d'algues unicellulaires<sup>3</sup>. Parmi celles-ci, *Chlamydomonas reinhardtii*, dont de nombreux mutants ont été caractérisés,

constitue un excellent matériel. L'examen comparé de plusieurs mutants, bloqués à divers niveaux de la chaîne des transporteurs d'électrons, permet de préciser l'agencement de cette chaîne ainsi que les phénotypes respectifs de ces mutants<sup>4</sup>.

Le rapprochement de ces deux méthodes d'étude doit, éventuellement, faire apparaître des relations entre la modification du lien structural entre particules de type Photosystème I et de type Photosystème II d'une part, et les anomalies qui caractérisent les phénotypes des mutants, d'autre part.

Dans ce but, nous avons étudié les conditions d'action du Triton X-100 sur des fragments de chloroplastes provenant de la souche sauvage et de deux mutants non photosynthétiques de *C. reinhardtii* *ac* 21 et *Fl* 15.

Ces deux mutants ont été choisis parce que tous deux présentent des anomalies de natures différentes dans la chaîne des transporteurs d'électrons. En effet, chez le mutant *ac* 21, les transporteurs photosynthétiques d'électrons apparaissent bloqués entre le cytochrome *b* 559 et le cytochrome *c* 553 (réf. 5); le mutant *Fl* 15 ne possède pas de cytochrome *c* 553 sous sa forme liée à la membrane<sup>6</sup>.

Le lien entre particules Photosystème I et Photosystème II est probablement localisé dans cette zone de la chaîne des transporteurs d'électrons: la rupture du lien entre les deux photosystèmes, provoquée par l'action des détergents, donne une répartition différente des cytochromes *b* 559 et *c* 553 selon le type de particule; les particules de type Photosystème II sont enrichies en cytochrome *b* 559 et les particules de type Photosystème I enrichies en cytochrome *c* 553 (réfs 7 et 8).

Outre les anomalies portant sur la chaîne des transporteurs d'électrons, les phénotypes des mutants ont les caractéristiques suivantes:

Le mutant *ac* 21, étudié par Levine et collaborateurs, est normalement chlorophyllien; sa morphologie observée en microscopie électronique est semblable à celle de la souche sauvage<sup>9,10</sup>. Il est appauvri en caroténoïdes<sup>11</sup> et en plastoquinones<sup>12</sup>. Il ne photoréduit pas le NADP<sup>+</sup> à partir de l'eau, mais possède des Photosystèmes II et I fonctionnels<sup>13</sup>.

Le mutant *Fl* 15 est normalement chlorophyllien. Il ne présente pas de jet d'oxygène à l'illumination, ni de dégagement d'oxygène en conditions de photosynthèse stationnaires<sup>14</sup>; toutefois les Photosystèmes II et I sont fonctionnels isolément<sup>15</sup>. Hormis le cytochrome *c* 553 lié à la membrane qui est absent, le contenu en divers transporteurs (cytochrome *b* 559, plastocyanine, ferrédoxine) et en pigments (chlorophylles, caroténoïdes, plastoquinones) est normal chez ce mutant<sup>6</sup>.

Dans ce travail nous avons observé: (1) que, les fragments chloroplastiques des mutants présentent une sensibilité plus grande à l'action du Triton X-100 que ceux de la souche sauvage; (2) que les fragments chloroplastiques de la souche *ac* 21 sont appauvris en caroténoïdes et que ceux de la souche *Fl* 15 sont déficients en lipides membranaires.

Les résultats de ces observations sont rapprochés et discutés; un mécanisme expliquant le mode d'action du Triton X-100 est proposé.

#### MATERIEL ET METHODES

##### *Organisme et conditions de culture*

La souche sauvage et le mutant *ac* 21 de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été

fourni par le Prof. R. P. Levine (Harvard). Le mutant *Fl 15* a été sélectionné au Laboratoire par J. Garnier.

Les algues sont cultivées à 25 °C et à la lumière (4500 lux), dans des conditions axéniques, sur milieu contenant de l'acétate (milieu Tris, acétate, phosphate<sup>16</sup> ou milieu minimum additionné de 0.2 % d'acétate de sodium<sup>17</sup>).

Dans ces conditions, on obtient les courbes de croissance représentées sur la Fig. 1. La courbe de croissance du mutant *ac 21* (hétérotrophe) est monophasique;

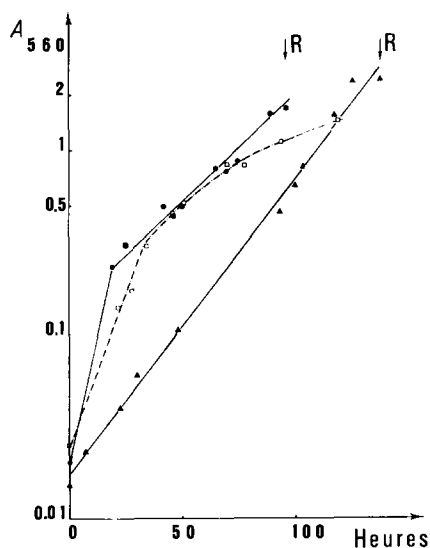


Fig. 1. Courbes de croissance des souches *ac 21* et sauvage de *C. reinhardtii*. ●, souche sauvage cultivée sur milieu minimum additionné d'acétate de sodium (0.2%); □, souche sauvage cultivée sur milieu minimum en présence d'air enrichi en CO<sub>2</sub> (4%); ▲, mutant *ac 21* cultivé sur milieu minimum additionné d'acétate de sodium (0.2%). Les flèches ↓ indiquent le moment où les récoltes sont effectuées. En ordonnée: turbidité de la suspension mesurée à 560 nm. Conditions de culture:  $t = 25 \pm 0.5$  °C, éclairage par tubes fluorescents Philips type lumière du jour 4500 lux. Les cultures sont continuellement aérées et agitées.

celle du sauvage, cultivé sur milieu sans acétate de sodium (en phototrophie) présente une phase de croissance exponentielle suivie d'une phase linéaire où la lumière devient le facteur limitant la photosynthèse. Enfin, la courbe de croissance de la souche sauvage, cultivée en présence d'acétate, a un caractère biphasique dû à la mixotrophie imposée par les conditions de culture.

Les algues sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance.

#### Préparation des fragments chloroplastiques

Après récolte, les algues sont lavées dans le tampon Tris-maléate 0.05 M, KCl 0.01 M, MgCl<sub>2</sub>  $5 \cdot 10^{-3}$  M, pH 7.0. Elles sont cassées par action des ultrasons (Branson sonifier, 20 kHz) dans des conditions standards (80 W, 60 s pour une concentration en matériel de 0.8 mg de chlorophylle *a plus b* par ml de suspension). Le cassage, ainsi que les préparations ultérieures sont effectués à 4 °C. Le sonicat est centrifugé à  $400 \times g$  pendant 5 min, pour éliminer dans le culot les algues non brisées, puis le surnageant est centrifugé à  $2000 \times g$  pendant 30 min. C'est sur le culot  $C_{2000 \times g}$ ,

dont le contenu pigmentaire est indiqué dans le Tableau I (pour la souche sauvage), que seront effectués les dosages des lipides et des caroténoïdes ainsi que l'incubation en présence du Triton X-100.

TABLEAU I

COMPOSITION PIGMENTAIRE DES ALGUES ENTIÈRES ET DES FRAGMENTS CHLOROPLASTIQUES  $C_{2000 \times g}$ , OBTENUS À PARTIR DE LA SOUCHE SAUVAGE DE *Chlamydomonas reinhardtii*

Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de quatre séries de mesures.  $C_{2000 \times g}$ : fragments chloroplastiques obtenus, après cassage des algues, par centrifugation à  $2000 \times g$ ; contient de 50 à 70% des chlorophylle *a* + *b* du matériel chloroplastique de départ.

	Chlorophylle <i>a/b</i>	Chlorophylle <i>a</i> + <i>b</i> ( $\mu$ moles/mg de substance sèche)	Carotènes + xanthophylles ( $\mu$ moles/mg de substance sèche)
Algues entières	$2.58 \pm 0.05$	$46 \pm 2$	$4.8 \pm 0.6$
$C_{2000 \times g}$	$2.57 \pm 0.05$	$85 \pm 4$	$13.8 \pm 1.4$

#### Dosages des caroténoïdes, des lipides et des chlorophylles

Les caroténoïdes sont extraits selon la technique décrite par Krinsky et Levine<sup>11</sup>: les fragments chloroplastiques ( $C_{2000 \times g}$ ) sont directement traités par la potasse à 6 % dans le méthanol; après saponification des lipides, la fraction insaponifiable est extraite par l'éther éthylique.

Les carotènes et xanthophylles sont séparés par chromatographie sur colonne de silice, dans les systèmes d'éluants éther de pétrole-éther éthylique (90:10, v/v), éther éthylique-méthanol (90:10, v/v) et méthanol pur. Les caroténoïdes contenus dans les éluats sont dosés par spectrophotométrie, en utilisant les coefficients d'absorption donnés par Davies<sup>18</sup>.

Les lipides totaux sont extraits des fragments chloroplastiques ( $C_{2000 \times g}$ ) par le chloroforme-méthanol (2:1, v/v) selon la méthode de Folch, citée par Allen et Good<sup>19</sup>.

Les extraits sont chromatographiés sur plaque de gel de silice dans le système de solvants hexane-éther éthylique-acide acétique (70:30:1, v/v/v) pour développer les lipides neutres et dans le système de solvants chloroforme-méthanol-acide acétique (65:25:8, v/v/v) pour les lipides polaires<sup>20</sup>.

Les chlorophylles *a* et *b* sont extraites par l'acétone à 80 % et dosées spectrophotométriquement selon Mackinney<sup>21</sup> et Arnon<sup>22</sup>.

#### Dosage des centres photochimiques $P_{700}$

Les centres  $P_{700}$  sont dosés spectrophotométriquement à 700 nm par différence: forme réduite par l'hydrosulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) moins forme oxydée par le ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), à l'aide du dispositif de mesure des échantillons diffusants du Cary 14.

#### Conditions d'action du Triton X-100

Une étude préliminaire utilisant la technique décrite par Huzisige *et al.*<sup>23</sup> a permis d'isoler par l'action de la digitonine et du Triton X-100, combinée à des centrifugations différentielles, deux types extrêmes de particules. Par cette technique on obtient à  $12000 \times g$ , 30 min, un culot enrichi en chlorophylle *b* (chlorophylle

$a/b = 2.2$ ) capable de photoréduire le 2,6-dichlorophénol indophénol à partir de l'eau (14  $\mu$ moles 2,6-dichlorophénol indophénol réduites par mg de chlorophylle  $a + b$  et par h) et à  $140000 \times g$ , 2 h, un culot enrichi en chlorophylle  $a$  (chlorophylle  $a/b = 4.2$ ), plus particulièrement en holochrome  $a$  690 nm, ne présentant plus qu'une très faible activité de photoréduction du 2,6-dichlorophénol indophénol (1.5  $\mu$ moles 2,6-dichlorophénol indophénol réduites par mg de chlorophylle  $a + b$  et par h). Ces résultats, comparables à ceux obtenus sur les végétaux supérieurs, montrent qu'une séparation physique des deux systèmes photochimiques peut être obtenue sur *C. reinhardtii* à l'aide des détergents.

Dans le présent travail, nous nous sommes limités à faire l'étude comparée de l'action du Triton X-100 seul sur les fragments chloroplastiques de la souche sauvage et des mutants *ac 21* et *Fl 15*: sur les fragments chloroplastiques ( $C_{2000 \times g}$ ) on fait agir le Triton X-100, à 4 °C pendant 30 min à des concentrations variables, comprises entre 0 et 15 molécules de Triton X-100 (masse mol. = 506) pour une molécule de chlorophylle  $a + b$ . Après incubation, la suspension est centrifugée à  $12000 \times g$  pendant 30 min. On suit alors dans le surnageant la répartition des chlorophylles  $a$  et  $b$ .

## RESULTATS

### Action du Triton X-100 sur les fragments chloroplastiques de la souche sauvage

Sur la Fig. 2, on constate que la courbe représentative des variations du rapport chlorophylle  $a/b$  dans  $S_{2000 \times g}$  croît jusqu'à un maximum puis décroît et tend asymptotiquement vers la valeur du rapport chlorophylle  $a/b$  mesuré sur les fragments chloroplastiques initiaux  $C_{2000 \times g}$  (voir Tableau I). On y constate aussi un parallélisme entre les variations du rapport chlorophylle  $a/b$  et les variations de la

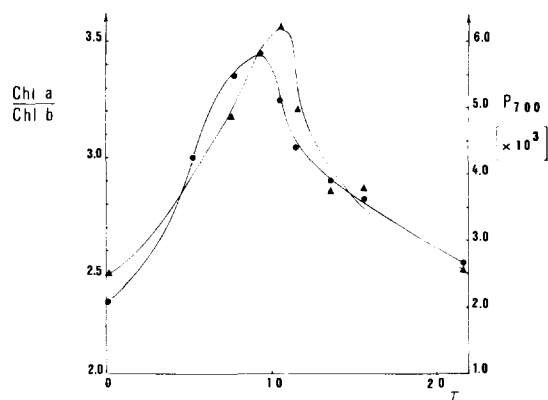


Fig. 2. Variation du rapport chlorophylle  $a/b$  et du contenu en centre photochimique  $P_{700}$ , dans le surnageant  $S_{12000 \times g}$ , en fonction de la concentration en Triton X-100 appliquée aux fragments chloroplastiques de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. En ordonnée: ●—●, chlorophylle  $a/b$ ; ▲—▲, concentration en centres photochimiques  $P_{700}$ . Le  $P_{700}$  est mesuré par la différence d'absorption à 700 nm entre un lot réduit par le  $Na_2S_2O_4$  moins un lot oxydé par le  $K_3Fe(CN)_6$ . Cette différence d'absorption est rapportée à la densité optique au maximum rouge de la chlorophylle dans l'échantillon; les valeurs normalisées portées en ordonné sont celles des rapports absorbance  $P_{700}$  (red.—ox.)/absorbance max. rouge  $\times 10^3$ . En abscisse: concentration relative en Triton X-100 (moles de Triton X-100 par mole de chlorophylle  $a + b$ ).

teneur en centres photochimiques  $P_{700}$ . L'augmentation du rapport chlorophylle  $a/b$  est due à un enrichissement des surnageants  $12000 \times g$  en particules subchloroplastiques enrichies en chlorophylle  $a$  et en centre  $P_{700}$ . Pour des concentrations plus grandes en Triton X-100, il y a libération dans  $S_{12000 \times g}$  de particules subchloroplastiques enrichies en chlorophylle  $b$ ; ceci se traduit par une diminution du rapport chlorophylle  $a/b$  qui tend vers la valeur de ce rapport mesuré sur les fragments chloroplastiques initiaux ( $C_{2000 \times g}$ ).

Cet effet de séparation préférentielle de particules de type Photosystème I par le Triton X-100 a été décrit par Briantais<sup>8</sup> pour les végétaux supérieurs (maïs).

*Action comparée du Triton X-100 sur les fragments chloroplastiques du sauvage et des mutants*

On constate, sur la Fig. 3, que les courbes représentant la variation du rapport

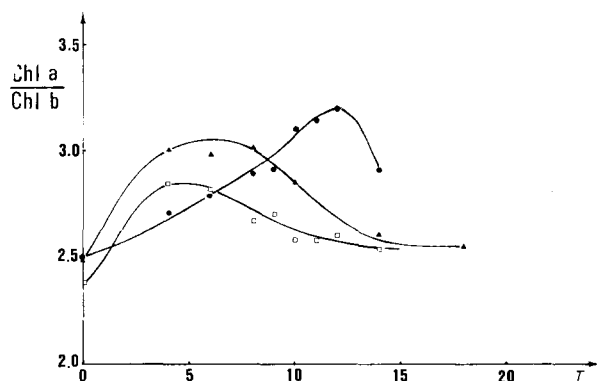


Fig. 3. Variation du rapport chlorophylle  $a/b$  dans le surnageant  $S_{12000 \times g}$ , en fonction de la concentration relative en Triton X-100 pour la souche sauvage et les mutants *ac 21* et *Fl 15* de *C. reinhardtii*. En ordonnée: rapport chlorophylle  $a/b$  dans  $S_{12000 \times g}$  (●, sauvage; ▲, *ac 21*; □, *Fl 15*). En abscisse: concentration en Triton X-100 (moles de Triton X-100 par mole de chlorophylle  $a + b$ ).

chlorophylle  $a/b$  ont la même allure générale, pour les mutants *ac 21* et *Fl 15* et pour le sauvage. Par contre, les concentrations en Triton X-100, nécessaires pour obtenir par centrifugation à  $12000 \times g$  un surnageant présentant l'enrichissement maximum en chlorophylle  $a$ , sont plus faibles pour les mutants *ac 21* et *Fl 15* que pour le sauvage.

L'abaissement de la concentration en Triton X-100, nécessaire pour obtenir le maximum du rapport chlorophylle  $a/b$  peut correspondre à un affaiblissement du lien entre les particules subchloroplastiques enrichies en chlorophylle  $a$ , libérées dans  $S_{12000 \times g}$  par l'action du détergent, et le reste de la membrane. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à relier cette différence de comportement vis à vis du Triton X-100 à une modification de la composition des fragments chloroplastiques. L'examen des données bibliographiques, rappelées dans l'introduction<sup>5,6,12</sup>, concernant la composition en divers pigments des souches *ac 21* et *Fl 15*, nous a conduit à analyser la composition en lipides et en caroténoïdes des fragments chloroplastiques  $C_{2000 \times g}$ . Les résultats de ces analyses sont résumés dans le Tableau II. Les fragments chloroplastiques du mutant *ac 21*, comparés à ceux du sauvage, ont un contenu en

TABLEAU II

ETUDE COMPARÉE, POUR LE SAUVAGE ET LES MUTANTS *ac 21* ET *Fl 15*, DE LA COMPOSITION EN PIGMENTS ET EN LIPIDES DES FRAGMENTS CHLOROPLASTIQUES  $C_{2000 \times g}$  ET DE LA CONCENTRATION EN TRITON X-100 NÉCESSAIRE POUR OBTENIR UN RAPPORT CHLOROPHYLLE *a/b* MAXIMUM DANS LE SURNAGEANT  $S_{12000 \times g}$

		<i>Souche sauvage</i>	<i>ac 21</i>	<i>Fl 15</i>
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	dans $C_{2000 \times g}$	2.54	2.51	2.35
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	maximum dans $S_{12000 \times g}$	3.45	3.45	2.95
$T_m$	(moles de Triton X-100 par mole Chl <i>a</i> + <i>b</i> )	$9.5 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.5$
$\frac{C + X}{\text{Chl } a + \text{Chl } b}$	( $\mu$ moles/nmole)	122	88	138
$C + X$	( $\mu$ moles/g de substance sèche)	12.5	7.8	13
$C/X$	(mole/mole)	0.16	0.15	0.15
Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i>	( $\mu$ moles/g de substance sèche)	96.4	83.4	88.6
$\frac{\text{Chl } a + \text{Chl } b}{L}$	(mg pour 100 mg)	19	21	36
$\frac{C + X}{L}$	(mg pour 100 mg)	1.30	0.77	2.75
$L$	(mg/mg de substance sèche)	0.48	0.54	0.25

Abréviations: Chl *a*, chlorophylle *a*; Chl *b*, chlorophylle *b*; C, carotènes; X, xanthophylles; L, lipides totaux;  $T_m$ , concentration en Triton X-100 nécessaire pour obtenir un rapport chlorophylle *a/b* maximum dans le surnageant  $S_{12000 \times g}$  (cf. Fig. 3 et Matériel et Méthodes).

lipides normal, mais ont une teneur en caroténoïdes plus faible. Cette déficience est en accord avec les résultats des dosages de Krinsky et Levine<sup>11</sup> sur les algues entières. Par contre, les fragments chloroplastiques du mutant *Fl 15* contiennent la même quantité de caroténoïdes mais moitié moins de lipides que les fragments provenant de la souche sauvage, que les teneurs soient exprimées par rapport aux chlorophylles *a* et *b* ou par rapport à la masse de substance sèche. En plus de la diminution quantitative en lipides totaux, on observe, sur les chromatogrammes de la Fig. 4, des différences qualitatives dans la répartition de ces lipides: il y a plus de lipides neutres — probablement des diglycérides connus comme intermédiaires métaboliques dans la biosynthèse des lipides polaires<sup>24</sup> — et corrélativement moins de lipides polaires (galactolipides, sulfolipides et phospholipides).

Par ailleurs, les coupes cytologiques de la Fig. 5 dues à Giraud, Hauswirth et Garnier (non publié) montrent la présence de nombreux globules lipidiques dans le cytoplasme du mutant *Fl 15*. Des comptages effectués sur ces coupes indiquent une fréquence de ces inclusions cinq fois plus élevée chez ce mutant que chez le sauvage (voir Tableau III). Cette accumulation dans le cytoplasme peut expliquer le déficit en lipides polaires qui est observé dans la membrane chloroplastique de *Fl 15*.

Le rapprochement entre les observations montrant l'affaiblissement du lien physique rompu par le Triton X-100 et les modifications phénotypiques des mutants étudiés, suggère qu'interviennent dans la liaison entre particules subchloroplastiques

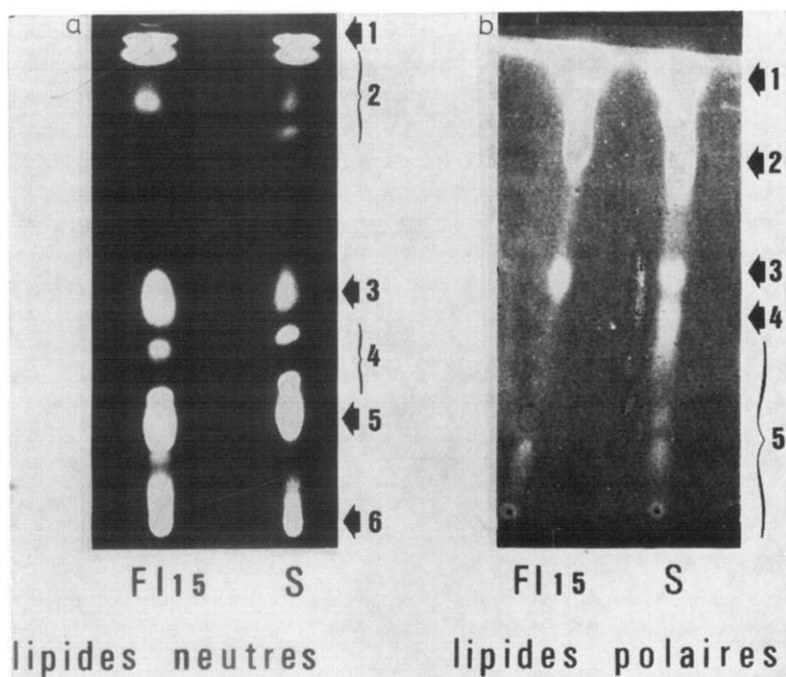


Fig. 4. Chromatogrammes, sur plaque de gel de silice, des lipides des fragments  $C_{2000 \times g}$  provenant de la souche sauvage et du mutant *Fl 15*. (A) Chromatographie des lipides neutres (hexane-éther éthylique-acide acétique, 70:30:1, v/v/v). Les lipides sont révélés aux vapeurs d'iode. D'après les chromatogrammes de Nichols<sup>20</sup>, les taches peuvent être identifiées comme étant: 1, carotènes; 2, stérols et triglycérides; 3, diglycérides; 4, stérols; 5, xanthophylles et phéophytines; 6, chlorophylles et lipides polaires. (B) Chromatographie des lipides polaires (chloroforme-méthanol-acide acétique, 65:25:8, v/v/v). Les lipides sont révélés à l'acide sulfurique; les galactolipides et sulfolipides par l'orcinol. 1, pigments et lipides neutres; 2, monogalactosyldiglycérides; 3, digalactosyldiglycérides; 4, sulfolipides; 5, phospholipides.

Photosystème I et membrane: (1) les caroténoïdes ou une fraction d'entre eux; (2) les lipides polaires constituant de la membrane: galactolipides et phospholipides.

#### DISCUSSION

##### *Rôle structural des caroténoïdes et des lipides, mode d'action du Triton X-100*

Les résultats concernant *ac 21*, qui montrent un "affaiblissement" de la liaison entre particules et membrane, corrélativement à une teneur plus faible en caroténoïdes, sont à rapprocher des observations de Vernon *et al.*<sup>25</sup>; ces auteurs ont constaté qu'une extraction préalable des caroténoïdes par l'hexane facilite l'extraction ultérieure par le Triton X-100 des centres photochimiques  $P_{700}$ . A la suite de ces travaux, les mêmes auteurs en cultivant *Anabaena variabilis* en présence de diphénylamine, inhibiteur connu de la caroténogénèse, ont pu préparer, sans extraction préalable des caroténoïdes par l'hexane, des particules (" $HP_{700}$ ") enrichies en centres photochimiques  $P_{700}$  (réfs 26 et 27). Le rôle structural du  $\beta$ -carotène dans le lien rompu par le Triton X-100 a été discuté récemment<sup>26</sup>. Le  $\beta$ -carotène est étroitement associé au Photosystème I: il est établi que les particules subchloroplastiques Photosystème I



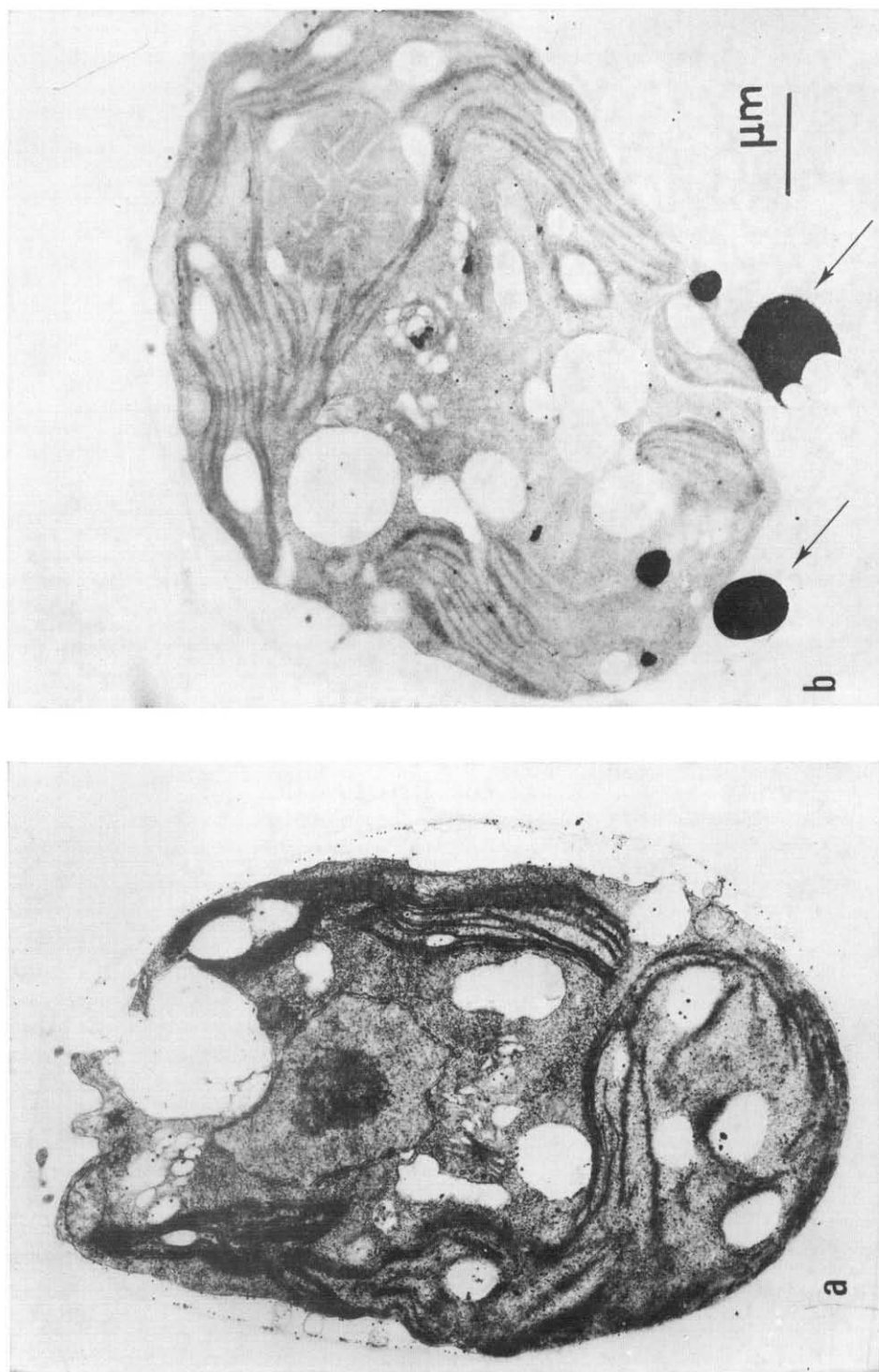


Fig. 5. Clichés en microscopie électronique de *C. reinhardtii*. (a) Souche sauvage. (b) Mutant Fl 15. Techniques: fixation par le glutaraldéhyde et post-fixation osmique; contrastant: citrate de plomb. On observe sur la coupe du Fl 15 (flèches) la présence d'inclusions cytoplasmiques, qui, par ailleurs, ne sont pas colorées après fixation au permanganate de potassium. La nature lipidique de ces inclusions semble probable ( $\times 17500$ ). (D'après Giraud, Hauswirth et Garnier, résultats non publiés.)

TABLEAU III

CONTENU EN GLOBULES LIPIDIQUES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DU MUTANT *Fl 15*

Les globules lipidiques donnent la même coloration à l'osmium que les stigmas. Ceux-ci sont pris comme référence pour une évaluation quantitative des globules lipidiques contenus dans le cytoplasme de la souche sauvage et du mutant *Fl 15*. Les comptages sont effectués à partir des coupes cytologiques de la Fig. 5.

	Nombre de cellules examinées	Nombre de stigmas	Nombre de globules lipidiques
Sauvage	135	23	11
<i>Fl 15</i>	108	26	58

sont enrichies en  $\beta$ -carotène et appauvries en xanthophylles<sup>7,28</sup> et que l'efficacité du transfert d'énergie du  $\beta$ -carotène aux chlorophylles du Photosystème I est élevée<sup>29</sup>.

Un type de complexe pigments-protéines, proche des particules Photosystème I a été isolé par Thornber<sup>30</sup>. L'analyse biochimique de ces complexes, montrant la richesse des protéines en résidus d'acides aminés apolaires, suggère que les complexes chlorophylles-protéines pourraient *in vivo* être liés au reste de la membrane par des liaisons de type hydrophobes; les caroténoïdes présents dans ces complexes pourraient intervenir dans la liaison<sup>30</sup>.

Les résultats portant sur le mutant *Fl 15* montrent un "affaiblissement" de la liaison entre les particules subchloroplastiques Photosystème I et la membrane en même temps qu'une diminution de la teneur en lipides. Ces observations sont à rapprocher de celles faites par Vernon *et al.*<sup>27</sup>. Les résultats des dosages des lipides et du Triton X-100, fixé sur les diverses particules obtenues par ces auteurs (TSF<sub>I</sub>, TSF<sub>II</sub>, HP<sub>700</sub>), et leur comparaison avec la composition de la membrane, permettent d'envisager un mécanisme de substitution des lipides par le Triton X-100.

Un tel mécanisme peut être envisagé à partir des études de Ji et Benson<sup>31</sup> sur des systèmes modèles. Ces auteurs ont montré que les monogalactosyldiglycérides, liés aux protéines dans une membrane artificielle, peuvent être substitués par des agents compétiteurs tels que phytol, sulfate de phytol, acide palmitique *etc.* ... et que la nature de la partie polaire de ces agents intervenait peu dans leur efficacité. On peut concevoir que des agents chimiques de structure analogue aux galactosyldiglycérides (*ex* Triton X-100) puissent ainsi rompre le lien entre membrane et particules subchloroplastiques.

Les résultats, présentés et discutés dans ce travail, conduisent à proposer le schéma d'action suivant pour le Triton X-100:

(1) Le Triton X-100 agirait comme un agent compétiteur des lipides; il se substituerait aux lipides en interaction avec les particules subchloroplastiques de type système I; expérimentalement on constate qu'à la diminution de la teneur en lipides correspond une concentration plus faible en Triton X-100 nécessaire pour provoquer la séparation des particules (mutant *Fl 15*).

(2) Les caroténoïdes, ou une fraction d'entre eux, constitueraient un des types de sites hydrophobes des particules subchloroplastiques Photosystème I. Cette hypothèse rend compte des résultats expérimentaux montrant qu'à une teneur plus faible en caroténoïdes correspond une concentration plus faible en détergent nécessaire

pour provoquer la rupture du lien physique entre les particules subchloroplastiques Photosystème I et Photosystème II (mutant *ac 21*).

#### *Interprétation du cas des mutants *ac 21* et *Fl 15**

Levine et Gorman<sup>5</sup> ont interprété la mutation qui affecte la souche *ac 21* comme une mutation portant sur un transporteur d'électrons inconnu M situé entre les cytochromes *b 559* et *c 553* (dans l'hypothèse adoptée d'une formulation en série de la séquence des cytochromes). Cette interprétation rend compte des données suivantes: (1) chaque photosystème est fonctionnel mais le mutant *ac 21* est incapable de transférer les électrons du Système II au Système I. (2) L'oxydo-réduction des cytochromes *b 559* et *c 553* n'est pas soumise à l'antagonisme photochimique entre les Systèmes I et II.

Si l'on tient compte des résultats exposés dans ce travail, il est possible que la membrane chloroplastique du mutant *ac 21* soit affectée d'un défaut de structure mis en évidence par l'action du Triton X-100; ce défaut de structure, dans lequel serait impliquée la déficience en caroténoïdes (ou en une partie d'entre eux), empêcherait que s'établisse le lien physiologique entre Photosystème II et Photosystème I.

Dans le cas du mutant *Fl 15*, un défaut de structure semble aussi probable: cette souche synthétise le cytochrome *c 553* sous sa forme soluble mais ne possède pas de cytochrome *c 553* lié à la membrane<sup>6</sup>. L'absence de cytochrome *c 553* lié dans la membrane de *Fl 15* pourrait être liée à la diminution de la teneur en lipides polaires, constituants de la membrane, observée dans le présent travail.

Il semble donc que le mutant *Fl 15* soit atteint d'une anomalie relative au métabolisme lipidique, qui se traduit par une diminution de la quantité de lipides polaires, principaux constituants de la lamelle chloroplastique, et par l'accumulation dans le cytoplasme de lipides, qui pourraient être des intermédiaires dans la biosynthèse des lipides polaires.

En conclusion, cette étude a montré qu'interviennent dans le lien entre particules subchloroplastiques Photosystème I et Photosystème II, obtenues par l'action du Triton X-100, (1) les caroténoïdes (ou une fraction d'entre eux), (2) les lipides polaires ou une fraction d'entre eux.

Une interprétation de ces résultats est proposée: le Triton X-100 romprait la liaison entre certains sites hydrophobes des particules subchloroplastiques (caroténoïdes) et des lipides de la membrane. Le Triton X-100 agirait comme agent compétiteur vis à vis des lipides.

Les anomalies, mises en évidence par l'action du Triton X-100, rendent probable l'hypothèse d'un défaut de structure de la membrane. Toutefois, la nature exacte des relations entre les diverses anomalies qui affectent l'appareil photosynthétique de chaque mutant reste inconnue pour le moment.

#### RESUME

L'étude du mode d'action du Triton X-100 dans l'extraction de particules subchloroplastiques enrichies en Système I ou en Système II a été effectuée avec la souche sauvage et deux mutants non photosynthétiques (*ac 21* et *Fl 15*) de *Chlamydomonas reinhardtii*: on constate d'une part, que la libération de particules de type Photosystème I nécessite moins de détergent chez les mutants que chez le sauvage;

d'autre part, que les fragments chloroplastiques des mutants comparés à ceux du sauvage contiennent moins de lipides et de pigments.

Il est ainsi possible d'établir, pour les mutants, une relation entre une plus grande facilité de séparation, par le détergent, de particules subchloroplastiques et une diminution du contenu de la membrane en deux classes de constituants—les caroténoïdes d'une part (mutant *ac 21*)—les lipides, autres que les pigments, d'autre part (mutant *Fl 15*).

L'interprétation proposée pour ces résultats est la suivante: (1) les caroténoïdes, ou une fraction d'entre-eux, constitueraient un des types de sites hydrophobes des particules subchloroplastiques; (2) les lipides polaires, ou une fraction d'entre eux, seraient liés par interaction avec les sites précédents. (3) le Triton X-100 entrerait en compétition avec les lipides polaires, et romprait les liaisons entre les lipides de la membrane et les particules subchloroplastiques.

Il est probable que les anomalies constatées dans le mode d'action du Triton X-100, sur les fragments de chloroplaste des souches *ac 21* et *Fl 15*, témoignent d'un défaut de structure de la membrane chloroplastique chez ces mutants.

#### REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Messieurs J. M. Briantais et J. Garnier pour les conseils qu'ils lui ont donnés au cours de ce travail, ainsi que Monsieur G. Giraud qui lui a aimablement fourni les clichés de microscopie électronique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. K. Boardman, dans F. Nord, *Advances in Enzymology*, Vol. 30, Interscience, New York, 1968, p. 1.
- 2 R. Park et P. V. Sane, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22 (1971) 395.
- 3 J. Garnier, *Physiol. Vég.*, 3 (1965) 121.
- 4 R. P. Levine, *Science*, 162 (1968) 768.
- 5 R. P. Levine et D. S. Gorman, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1293.
- 6 J. Garnier et J. Maroc, *Biochim. Biophys. Acta*, 205 (1970) 205.
- 7 N. K. Boardman et J.-M. Anderson, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 187.
- 8 J. M. Briantais, *Physiol. Vég.*, 7 (1969) 135.
- 9 U. Goodenough et R. P. Levine, *Plant Physiol.*, 44 (1969) 990.
- 10 U. Goodenough et R. P. Levine, *Plant Physiol.*, 44 (1969) 1001.
- 11 N. I. Krinsky et R. P. Levine, *Plant Physiol.*, 39 (1964) 680.
- 12 R. M. Smillie et R. P. Levine, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 4058.
- 13 R. P. Levine et D. Wolkman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1961) 264.
- 14 J. Garnier, in *Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity Proc. I.B.P. Meet., Trebon, 1969*, Pudoc, Wageningen, 1970, p. 543.
- 15 J. Garnier et J. Maroc, *Proc. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Stresa, 1971*, sous presse.
- 16 D. S. Gorman et R. V. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1665.
- 17 R. P. Levine et W. T. Ebersold, *Z. Vererbungslere*, 89 (1958) 691.
- 18 B. Davies, in T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, New York, 1965, p. 489.
- 19 C. F. Allen et P. Good, dans A. San Pietro, *Methods in Enzymology*, Vol. 23A, Academic Press, New York, 1971, p. 523.
- 20 B. W. Nichols, *Biochim. Biophys. Acta*, 70 (1963) 417.
- 21 G. Mackinney, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 315.
- 22 D. I. Arnon, *Plant Physiol.*, 24 (1949) 1.
- 23 H. Huzisige, H. Usiyama, T. Kikuti et T. Azi, *Plant Cell Physiol.*, 10 (1969) 441.
- 24 P. Mazliak, *Le Métabolisme des Lipides dans les Plantes Supérieures*, Masson, Paris, 1968, p. 138.
- 25 L. P. Vernon, H. Y. Yamamoto et T. Ogawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 63 (1969) 911.
- 26 T. Ogawa, L. P. Vernon et H. Y. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 197 (1970) 302.

- 27 L. P. Vernon, E. R. Shaw, T. Ogawa et D. Raveed, *Photochem. Photobiol.*, 14 (1971) 343
- 28 B. Ke, C. Seliskar et R. Breeze, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1081.
- 29 J. C. Goedheer, *Biochim. Biophys. Acta*, 172 (1969) 252.
- 30 J. P. Thornber, *Biochim. Biophys. Acta*, 172 (1969) 230.
- 31 T. H. Ji et A. A. Benson, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 686.

*Biochim. Biophys. Acta*, 275 (1972) 414-426