

STRUCTURE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES: LOCALISATION DES GALACTOSYLDIGLYCERIDES DANS LES CHLOROPLASTES AU MOYEN DES ANTICORPS SPECIFIQUES

II. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A L'AIDE D'UN MARQUAGE A LA PEROXYDASE

AGNES BILLECOCQ

Institut Pasteur, Service de Biochimie des Antigènes, Paris (France)

(Reçu le 21 novembre, 1973)

(Manuscrit revisé reçu le 18 février, 1974)

SUMMARY

Structures of biological membranes: Localisation of galactosyldiglycerides in chloroplasts by means of specific antibodies

II. Treatment with peroxidase: electron microscope study

The results obtained in this study confirm that the outer membrane of the chloroplast envelope contains galactosyldiglycerides and that these molecules are uniformly distributed over the membrane surface. The results show that the galactosyldiglyceride molecules that are accessible to antibodies at the level of the thylakoids are distributed over the membrane surface in discrete patches.

INTRODUCTION

Dans un travail précédent [1], nous avons montré par des tests d'agglutination, de fixation du complément et d'immunofluorescence que des anticorps spécifiques anti-galactosyldiglycérides réagissent avec les membranes des chloroplastes. Ces faits nous avaient permis de conclure qu'une partie au moins des galactosyldiglycérides contenus dans ces plastes est localisée à la surface des membranes (enveloppe et thylakoïdes) et que leur pôle galactose est orienté vers l'extérieur de ces formations. Un doute subsistait cependant au sujet de l'enveloppe. Elle est très fragile et, au cours des réactions d'agglutination et de fixation du complément, elle pouvait être altérée ou détruite. Par ailleurs, on ne distingue cette enveloppe que d'une manière très imparfaite en microscopie optique et les figures observées en immunofluorescence sont difficiles à interpréter avec précision; en particulier, la signification des formes "ballon" donne lieu à des controverses. Pour les uns la paroi du "ballon" colorée en immunofluorescence représenterait l'enveloppe [2]; pour d'autres cette paroi résulterait du gonflement de la membrane des thylakoïdes [3]. Il était donc nécessaire de compléter

nos premières expérimentations par l'examen de nos réactions immunologiques en microscopie électronique afin de vérifier l'intégrité des enveloppes et de préciser la localisation des réactions obtenues.

MATERIAUX ET METHODES

Les anticorps anti-galactosyldiglycérides et anti-glucuronosyldiglycéride sont purifiés par la méthode Coulon-Morelec [4] à partir d'immunsérum de lapin préparés comme il a été décrit précédemment [1].

Les anticorps anti- γ -globulines de lapin provenant d'un immunsérum de mouton sont purifiés puis ils sont marqués avec de la peroxydase à l'aide de la méthode en deux temps d'Avrameas et Ternynck [5].

Les chloroplastes sont isolés à +4° suivant la technique décrite précédemment [1] en tampon phosphate 0.1 M (pH 7.8 saccharose), 0.4 M, sérumalbumine bovine 1 mg/ml, cystéine 3 mM et purifiés sur gradient de saccharose 1.7 M-1 M-0.7 M. Les chloroplastes possédant l'enveloppe (chloroplastes de classe I dans la classification utilisée par Ridley et Leech [6]) sont recueillis à l'interface 1.7 M-1 M après centrifugation et ceux qui n'ont plus cette enveloppe (chloroplastes de classe II) sont prélevés à l'interface 1 M-0.7 M. Les chloroplastes sont utilisés immédiatement après leur séparation sans aucune fixation, soit après action d'une solution de glutaraldéhyde à 0.25% dans le tampon d'extraction pendant 15 min, opération suivie de plusieurs lavages. La chlorophylle est dosée par la méthode d'Arnon [7] et la suspension de chloroplastes est utilisée à une concentration de 0.1 mg chlorophylle/ml.

La réaction immunoenzymatique (permettant de réaliser une coloration visible en microscopie électronique) est réalisée suivant une technique indirecte. Dans un premier temps on ajoute à la suspension de chloroplastes un égal volume d'une solution d'anticorps anti-galactosyldiglycérides dont le titre en agglutination avec l'antigène homologue est 1/32-1/64. On laisse en contact 30 min, on élimine le liquide surnageant par centrifugation et on lave les chloroplastes une fois avec le tampon. Dans un deuxième temps, on met la suspension de chloroplastes en contact avec les anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase (concentration variant de 16 à 50 μ g protéine/ml pendant 1 h). On élimine le liquide surnageant et on lave deux fois. La présence des anticorps est révélée en plaçant les chloroplastes quelques minutes dans une solution de diaminobenzidine, substrat pour la peroxydase, en présence d'eau oxygénée suivant la technique décrite par Avrameas [8].

Afin de préserver au maximum l'intégrité des organites, les stades successifs de la réaction immunoenzymatique sont effectués à +4° et tous les réactifs sont dilués dans le tampon utilisé pour l'extraction des chloroplastes. La réaction enzymatique est réalisée dans le même milieu mais en absence de cystéine.

Pour contrôler la spécificité de la réaction, on fait agir des anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (titre 1/32-1/64 avec l'antigène homologue) ne réagissant pas avec les chloroplastes en agglutination, en fixation du complément, en immunofluorescence.

Les chloroplastes sont fixés dans une solution d'acide osmique à 0.4% dans le tampon d'extraction, déshydratés progressivement par de l'alcool puis par de l'oxyde de propylène avant d'être inclus dans de l'épon araldite.

Les coupes sont examinées directement sans aucune contre-coloration avec un microscope électronique Siemens opérant sous une tension de 80 kV.

RESULTATS

Les images obtenues après action des anticorps anti-galactosyldiglycérides sur les chloroplastes de classe I non fixés montrent la présence d'un dépôt important et homogène, opaque aux électrons, sur l'enveloppe qui (Fig. 1) seule est colorée. Il n'y a pas de dépôt au niveau des membranes des thylakoïdes: il n'y a donc pas eu de pénétration des anticorps à l'intérieur des chloroplastes. Les chloroplastes sont bien conservés, dans leur majorité: ils possèdent leur enveloppe et le stroma est généralement présent. Nous constatons par contre que les chloroplastes traités par des anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (Fig. 2) ou non traités par un anticorps ne possèdent plus d'enveloppe ni de stroma, pour la plupart. Le dépôt de l'immunocomplexe sur l'enveloppe augmente donc sa résistance. Les chloroplastes peuvent alors subir sans dommage les centrifugations et remises en suspension au cours de la réaction immunoenzymatique, opérations qui altèrent profondément les préparations témoins. Nous n'observons aucune activité peroxydasique dans les chloroplastes lorsqu'ils sont mis en contact avec la diaminobenzidine.

Une fixation légère des chloroplastes par le glutaraldéhyde permet une meilleure conservation de leur morphologie. Nous obtenons après action des anticorps anti-

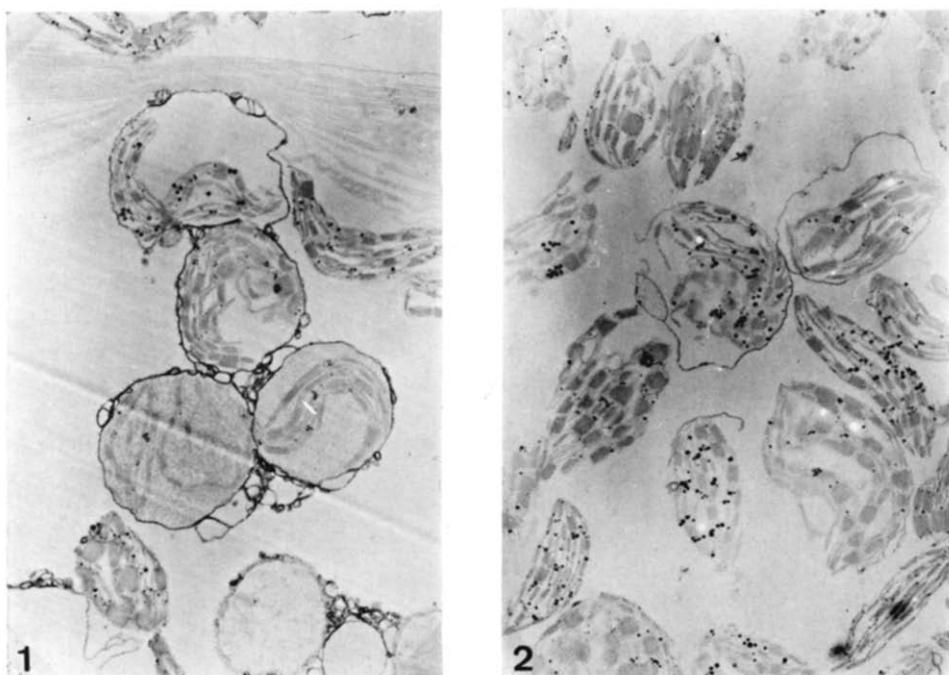


Fig. 1. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe I non fixés. Anticorps anti-galactosyldiglycérides. Grandissement $\times 5000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/8. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $30 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

Fig. 2. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe I non fixés. Anticorps anti glucuronosyldiglycéride (témoin négatif). Grandissement $\times 5000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/8. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $30 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

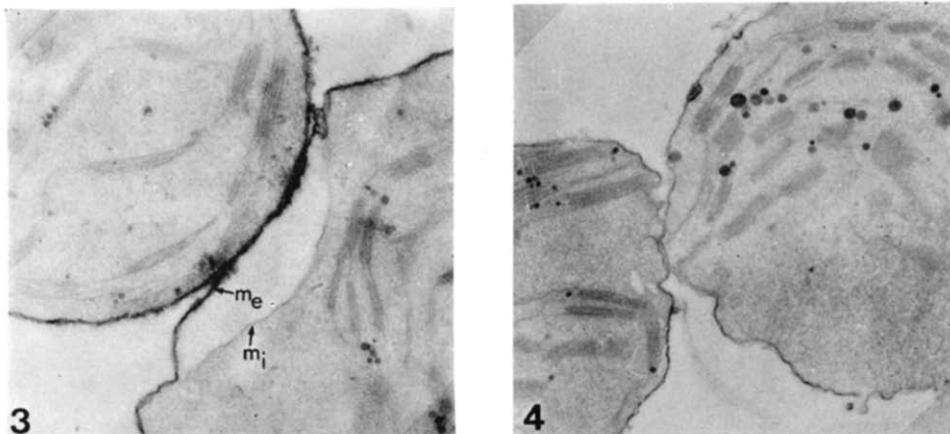


Fig. 3. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe I fixés par le glutaraldéhyde. Anticorps anti-galactosyldiglycérides. Grandissement $\times 13\,333$. m_e et m_i , membrane externe et interne de l'enveloppe. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/8. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $30\ \mu\text{g}$ de protéine/ml.

Fig. 4. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe I fixés par le glutaraldéhyde. Anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (témoin négatif). Grandissement $\times 13\,333$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/8. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $30\ \mu\text{g}$ de protéine/ml.

galactosyldiglycérides sur ces chloroplastes fixés des résultats identiques à ceux trouvés précédemment avec les chloroplastes non fixés. Dans ce cas nous avons pu distinguer les membranes externes et internes de l'enveloppe, celles-ci étant par endroit séparées (Fig. 3); on constate alors que seule la membrane externe est colorée. Ce résultat peut s'expliquer de deux façons: soit une absence de réactivité de la membrane interne, soit une imperméabilité de la membrane la plus externe. Le glutaraldéhyde peut jouer un rôle dans cette imperméabilité mais nous ne disposons pas d'image de décollement des membranes interprétable après coloration sans fixation par le glutaraldéhyde.

Avec les chloroplastes fixés par le glutaraldéhyde, il peut se produire une légère absorption aspécifique des anticorps anti- γ -globulines marqués à la peroxydase ou des anticorps anti-glucuronosyldiglycéride mais toujours à des concentrations de ces réactifs nettement supérieures à celles utilisées dans la réaction spécifique (Fig. 4). L'emploi de réactifs dilués ou l'adjonction d'albumine au milieu réactionnel (serum-albumine bovine $10\ \text{mg}/\text{ml}$) atténuent ces phénomènes non spécifiques.

Grâce à l'observation en microscopie électronique de réactions immuno-enzymatiques, nous avons pu mettre en évidence la présence au niveau de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes, de galactosyldiglycérides dont le pôle galactose est orienté vers l'extérieur. Ceci est en accord avec les récents travaux de Douce et al. [9] qui ont également démontré, par des méthodes biochimiques, la présence de galactosyldiglycérides dans l'enveloppe.

Après action des anticorps anti-galactosyldiglycérides sur les chloroplastes de classe II non fixés, on observe un dépôt important de colorant à la surface des thylakoïdes intergranaires ou granaires (Figs 5 et 6). Cette coloration n'est pas homogène mais présente un aspect granulaire et elle n'apparaît que sur les membranes péri-

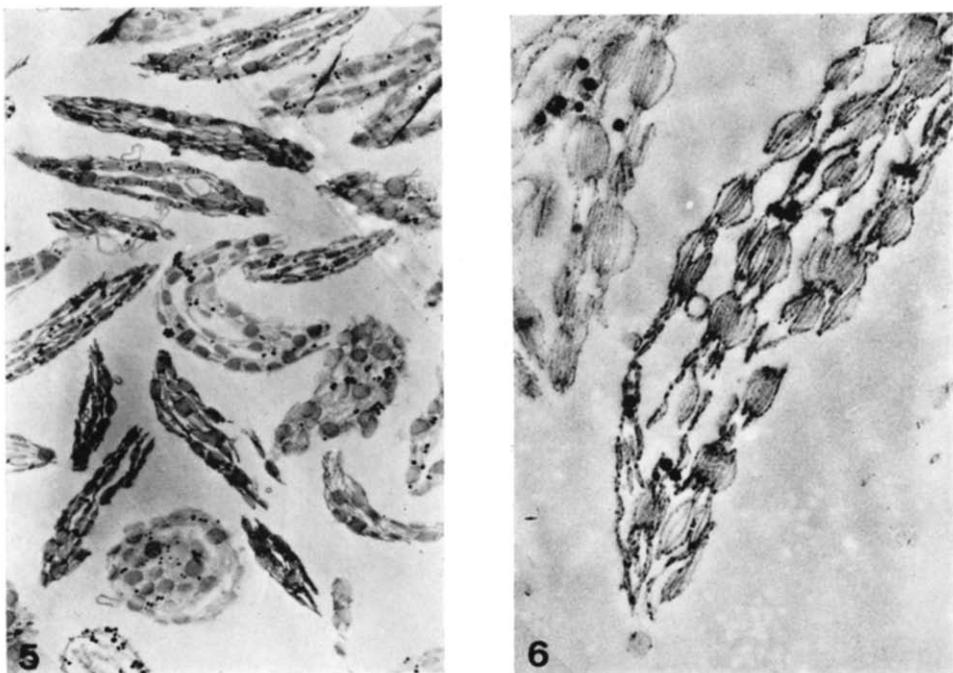


Fig. 5. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe II non fixés. Anticorps anti-galactosyl-diglycérides. Grandissement $\times 5000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/16. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $20 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

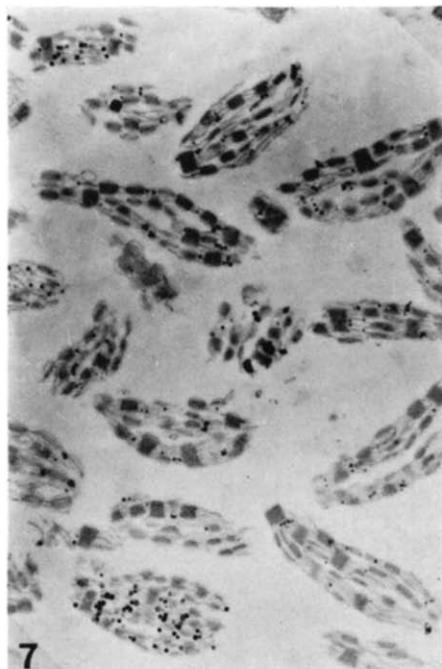
Fig. 6. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe II non fixés. Anticorps anti-galactosyl-diglycérides. Grandissement $\times 15\,000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/16. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $20 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

phériques des grana. L'absence de coloration au niveau interne des grana peut être interprétée de plusieurs façons: une disposition particulière des galactosyldiglycérides au niveau des partitions ou un accrolement très étroit des membranes en ces points ne permettant pas aux anticorps d'atteindre les sites réactifs. Cette deuxième alternative paraît être la bonne; en effet lorsque les membranes d'un granum se décollent l'une de l'autre, il apparaît une coloration granulaire des faces alors exposées au milieu extérieur.

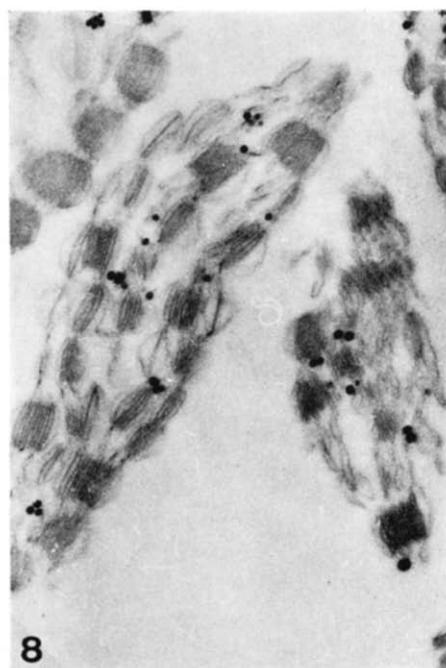
Nous n'observons aucune coloration des chloroplastes après action des anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (Figs 7 and 8). Ce résultat démontre la spécificité de la réaction observée.

DISCUSSION

Quoi qu'il en soit, ces résultats nous paraissent pouvoir être interprétés à la lumière des modèles de structure des membranes proposés actuellement: pour Singer et Nicolson [10] les protéines constitutives des membranes seraient plus ou moins enfouies dans une couche lipidique bimoléculaire fluide, dans la théorie micellaire de Weier et Benson [11] les protéines et les lipides seraient associés par leurs liaisons



7



8

Fig. 7. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe II non fixés. Anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (témoin négatif). Grandissement $\times 5000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/16. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $20 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

Fig. 8. Action des anticorps sur des chloroplastes de classe II non fixés. Anticorps anti-glucuronosyldiglycéride (témoin négatif). Grandissement $\times 15\,000$. Anticorps anti-lipide employés dilués à 1/16. Anticorps anti- γ -globulines de lapin marqués à la peroxydase à $20 \mu\text{g}$ de protéine/ml.

apolaires. Dans ces deux schémas, les pôles hydrophiles des lipides se trouveraient en contact avec le milieu extérieur. Les résultats obtenus ne semblent pas à notre avis en faveur de la structure proposée par Calvin puis modifiée par Leslie [12] dans laquelle les lipides sont situés à l'intérieur et les protéines à l'extérieur de la membrane.

Enfin si nous ne pouvons écarter à priori la possibilité d'un réarrangement des molécules lipidiques et protéiques dans les membranes au cours des expériences, nous constatons que ces membranes ont conservé une structure maintenant leur imperméabilité aux molécules d'anticorps.

RESUME

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste porte des molécules de galactosyldiglycérides et que ces molécules sont réparties d'une manière uniforme à la surface de cette membrane. Ils montrent que les molécules de galactosyldiglycérides accessibles aux anticorps au niveau des thylakoïdes sont distribuées d'une manière ponctiforme à la surface de ces membranes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. Manigault d'avoir bien voulu nous ouvrir son Service de Microscopie Electronique (à l'Institut Pasteur) et nous remercions également ses collaborateurs de l'aide et des conseils qu'ils nous ont prodigués.

REFERENCES

- 1 Billecocq, A., Douce, R. et Faure, M. (1972) *C.R. Acad. Sci.* 275, 1135-1137
- 2 Mackender, R. O. et Leech, R. M. (1970) *Nature* 228, 1347-1349
- 3 Hoshina, S. et Nishida, K. (1970) *Experientia* 26, 1275-1276
- 4 Coulon-Morelec, M. J. (1972) *Ann. Inst. Pasteur* 123, 619-640
- 5 Avrameas, S. et Ternynck, T. (1971) *Immunochemistry* 8, 1175-1179
- 6 Ridley, S. M. et Leech, R. M. (1968) *Planta* 83, 20-34
- 7 Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15
- 8 Avrameas, S. (1969) *Immunochemistry* 6, 43-52
- 9 Douce, R., Holtz, R. B. et Benson, A. A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7215-7222
- 10 Singer, S. J. et Nicolson, G. L. (1972) *Science* 175, 720-731
- 11 Weier, T. E. et Benson, A. A. (1966) in *Biochemistry of Chloroplasts* (Goodwin, T. W., ed.), Vol. I, pp. 91-113, Academic Press, Londres
- 12 Leslie, R. B. (1968) in *Biological Membrane* (Chapman, D., ed.), pp. 289-346, Academic Press, New York et Londres