

D-GLUCOSYLATION DES PHYTOSTÉROLIS ET ACYLATION DES STÉRYL-D-GLUCOSIDES EN PRÉSENCE D'ENZYMES DE PLANTES^{*†}

C PEAUD-LENOËL[‡] ET M AXELOS[‡]

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

(Reçu le 12 décembre 1971 accepté le 25 janvier 1972)

ABSTRACT

Starting from wheat root homogenates, particles catalyzing the transfer of D-glucosyl residues from UDPGlc to phytosterols and the acylation of steryl D-glucosides were purified by sucrose gradient centrifugation. The enzymes responsible for these reactions seem to be localized on a specific species of membranous organelle.

After acetone extraction of the endogenous lipid material from the particles, the insoluble fraction retained its enzymic activities. The UDPGlc sterol glucosyltransferase could then be solubilized with Triton X-100. By mixing the Triton X-100 supernatant with the substrates UDPGlc and sterol, the transglucosylation system was reconstituted. After addition of the acetone powder to the sterylglucoside and phosphatidyl ethanolamine, which has been identified as an acyl donor, the formation of steryl acyl-D-glucoside was observed.

SOMMAIRE

À partir d'homogenats de racines de blé, les particules qui catalysent le transfert de résidus D-glucosyles de l'UDPGlc aux phytostérols et l'acylation des stéryl-D-glucosides ont été purifiées par centrifugation sur gradient de concentration de saccharose. Les enzymes responsables de ces réactions semblent localisées sur une catégorie spécifique d'organites membranaires.

Après extraction du matériel lipidique endogène des particules par l'acétone, la fraction insoluble conserve ses activités enzymatiques. La glucosyltransferase peut ensuite être solubilisée par le Triton X-100. En mélangeant cette fraction soluble avec les substrats UDPGlc et stérol, le système de transglucosylation a été reconstitué. Par addition de stéryl-D-glucoside à la phosphatidyl-éthanolamine, identifiée comme donneur d'acyle, on observe en présence de la poudre acétonique, la synthèse de stéryl-acyl-D-glucoside.

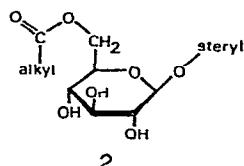
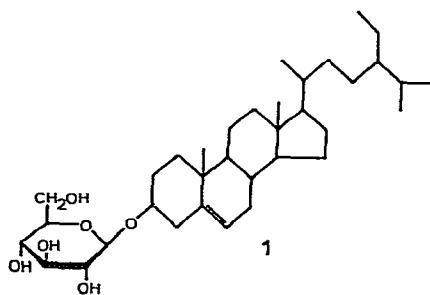
*Dédicace au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire.

†Certains des résultats exposés dans ce mémoire ont fait l'objet de publications préliminaires^{1,2}.

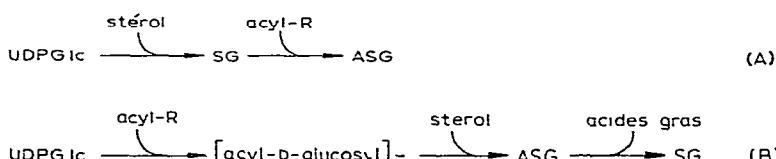
‡Adresse actuelle Laboratoire de Biochimie Fonctionnelle des Plantes Département de Biologie, C U Marseille-Luminy, 13-Marseille (France).

INTRODUCTION

Les glycosides de stérols entrent dans la composition chimique de nombreuses plantes, peut-être de toutes, et sont représentés par une grande variété de substances³⁻⁵. On constate souvent une analogie remarquable entre la structure de l'oligosaccharide constituant la copule glucidique⁴⁻⁶ et celle des unités répétitives des polysaccharides des parois cellulaires.



En général, une liaison glycosidique attache l'ose ou l'oligosaccharide au C-3 du stérol, mais on connaît d'autres points d'attache sur des stérols polyhydroxylés^{5,7}. Il nous a paru intéressant de préciser le mécanisme biochimique de la glycosylation des stérols dans le cas le plus simple, celui des mono- β -D-glucosides de phytostérols (stéryl-D-glucosides) (1). Dans les plantes, les stérylglucosides sont accompagnés⁸ par leurs dérivés 6'-O-acyl- β -D-glucosyles (2). La glucosylation biologique des stérols a déjà fait l'objet de plusieurs études. Il a été montré⁹ d'abord qu'une partie de la radioactivité de l'uridine 5'-(α -D-glucopyranosyl-U- 14 C pyrophosphate) (UDP[U- 14 C]Glc) infiltrée dans des feuilles de laitue était retrouvée dans SG* et ASG. Le transfert de résidus D-glucosyle de l'UDPGlc sur des phytostérols endogènes et l'acylation de SG par un donneur d'acyle inconnu ont été observés ensuite avec des homogenats d'organes végétaux, bruts ou fractionnés par centrifugation¹⁰⁻¹³. Ceci a conduit Eichenberger et Grob à proposer deux mécanismes de réaction possibles¹⁴:



*Abréviations SG, stéryl-D-glucoside libre, ASG, stéryl-acyl-D-glucoside

Nous décrirons dans cette communication l'identification des réactions de la chaîne (*A*) et la biosynthèse de SG et ASG par des enzymes partiellement purifiées à partir du blé en germination.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Isolation de fractions particulières synthétisant des glucolipides — Lorsqu'un homogénat de racines de blé est mis en incubation en présence d'UDP[U-¹⁴C]Glc, une partie de la radioactivité est retrouvée^{1,5} dans la fraction insoluble dans l'hydroxyde de sodium 0,5M à 100°. La majeure partie de l'activité d'incorporation se trouve dans une fraction particulière de l'homogénat. Cette fraction de densité voisine de 1,13 a été isolée par centrifugation sur un gradient linéaire de saccharose (Fig. 1). Les particules ainsi séparées ont été identifiées à des microsomes^{1,16}. Elles ne contiennent ni mitochondries, ni structures plastidiales.

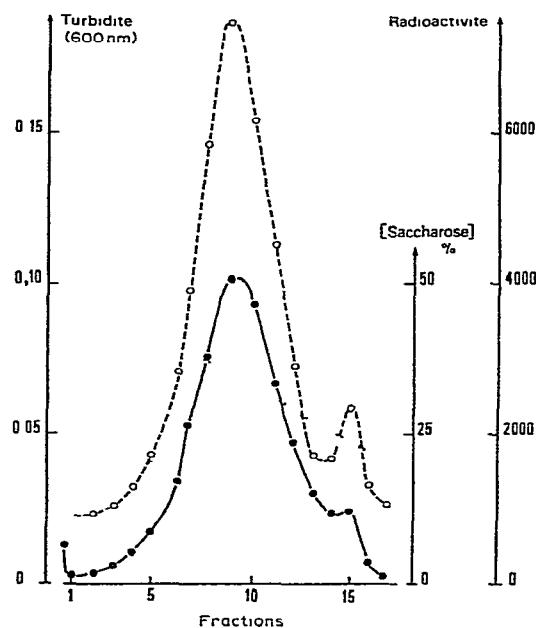


Fig. 1 Incorporation des résidus D-glucosyle de l'UDPGlc dans la fraction insoluble dans l'hydroxyde de sodium des microsomes de blé. Sédimentation des microsomes sur gradient linéaire de saccharose. Incubation des microsomes, 10 min à 25°, en présence d'UDP[U-¹⁴C]Glc 10 μM (194 Ci/mole) et de MgCl₂ 20 mM. La radioactivité insoluble dans l'hydroxyde de sodium 0,5M a été mesurée suivant la Réf. 15. Turbidité à 600 nm ○—○, radioactivité incorporée en impulsions/min —●—●, concentration de saccharose en % (p/v).

Dans les expériences de routine, les microsomes ont été isolés par centrifugation entre deux couches de saccharose de densité 1,095 au sommet et 1,169 au fond du tube. Les microsomes se retrouvent à l'interface.

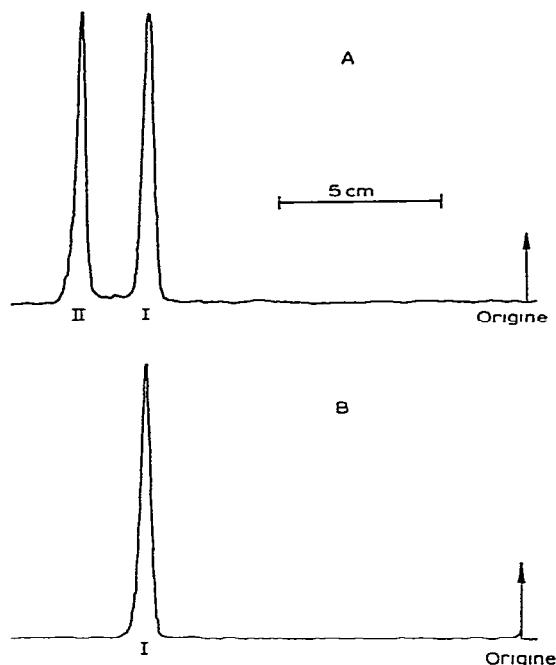


Fig 2 Enregistrement de la radioactivité sur un chromatogramme en couche mince de silice Chromatographie dans le solvant A, durée 1 h 45 min (A) Glucolipides radioactifs obtenus après incubation d'UDP[U-¹⁴C]Glc avec les microsomes (B) Même expérience, après saponification du mélange radioactif de I et II Radioactivité en unités arbitraires

Isolement et identification des glucolipides — Après incubation des microsomes en présence d'UDP[U-¹⁴C]Glc, les substances radioactives insolubles dans l'eau bouillante peuvent être fractionnées en deux groupes l'un est constitué par des β -D-glucannes¹⁵, l'autre par des composés solubles dans le mélange chloroforme-méthanol Cette fraction lipidique a été extraite par la méthode de Lennarz et Talamo¹⁷ Le matériel lipidique, concentré sous vide, a été ensuite fractionné par chromatographie sur couche mince de silice (Fig 2) Deux pics distincts de radioactivité (I) et (II), ont été élus et rechromatographiés séparément sur couche mince en deux dimensions en présence de SG et d'ASG préparés par la méthode de Lepage⁸ Les radiogrammes montrent qu'une des taches radioactives (I) cochromatographie avec SG et l'autre (II), avec ASG Par saponification dans le méthanol alcalin, II donne une seule tache radioactive identique à I et à SG (Fig 2 et Tableau I)

Par hydrolyse acide de I, une seule tache radioactive est observée par chromatographie sur papier, de R_F identique à celle du D-glucose témoin (Solvant F) Enfin la cocrystallisation de I avec du stéryl-D-glucoside authentique montre que I est effectivement un stéryl-D-glucoside et II le dérivé acylé décrit par Lepage Des résultats parallèles ont été obtenus par d'autres auteurs^{9 10,12 14} En raison de la faible quantité des substances radioactives obtenues en présence des microsomes, il n'a pas été possible d'identifier les divers phytostérols endogènes qui sont liés au D-glucose

Il n'y a pas de raison de penser qu'ils soient différents des stérols identifiés par extraction des plantes entières ou des homogénats^{13,18-20}. Comme il sera montré plus loin, la reconstitution du système de biosynthèse *in vitro* en présence de stérols exogènes permet de confirmer les structures proposées pour les stéryl-glucosides synthétisés par les microsomes.

TABLEAU I

IDENTIFICATION DE STÉRYL-D-GLUCOSIDES ET STÉRYL-ACYL-D-GLUCOSIDES SYNTHÉTISÉS ENZYMATIQUEMENT

<i>Cochromatographie en couche mince de silice</i>	<i>R_F</i>	
	<i>I^a + SG</i>	<i>II^a + ASG</i>
Solvant A	0,70	0,86
Solvant B	0,62	0,70
Solvant C	0,09	0,31
<i>Cocrystallisation de (I) avec les stéryl-D-glucosides du soja^b</i>	<i>Rendement^c de cristallisation (%)</i>	<i>Radioactivité spécifique^c</i>
Mélange avant cristallisation		4440
1 ^{re} Cristallisation	85	4810
2 ^{eme} Cristallisation	84	4430
3 ^{eme} Cristallisation	81	4780

^aSubstances marquées enzymatiquement sur le D-glucosyle-U-¹⁴C ^bCristallisation dans le mélange ether-chloroforme-méthanol (62 1, v/v) ^cDésintégrations/min/mg

Fractionnement des microsomes et séparation des accepteurs stéroïques endogènes — Lorsque les microsomes sont traités par le Triton X-100, leur capacité de biosynthèse de D-glucananes est perdue mais ils conservent la propriété de synthétiser des stéryl-D-glucosides (Tableaux II et III). Dans ces conditions, l'activité est retrouvée dans le surnageant après centrifugation pendant 2 h à 130 000 g.

TABLEAU II

SOLUBILISATION PAR LE TRITON X-100 DE L'ACTIVITÉ DE TRANSFERT DU RESIDU D-GLUCOSYLE DE L'UDPGlc AUX STÉROL

<i>Enzyme</i>	<i>Residus D-glucosyle transferés^a (nmoles/mg)^b</i>	
	<i>Aux β-D-glucananes</i>	<i>Aux stérols endogènes</i>
Microsomes	0,92	3,68
Lysat total par le Triton X-100	0	2,94
Surnageant 130 000 g du lysat	0	3,55
Culot 130 000 g du lysat	0	0,16

^aDans les conditions d'incubation décrites à la Fig. 1 ^bmg de protéine des microsomes employés pour chaque préparation

Par traitement acétonique des microsomes, après dialyse, on obtient une poudre acétono-insoluble et un extrait lipidique soluble. La poudre acétonique, remise en suspension aqueuse, ne forme plus SG ou ASG en présence d'UDPGlc seul. L'addition de stérols au système restaure l'activité transglucosylase (Tableau III), mais le dérivé acylé n'est pas formé dans un tel système.

TABLEAU III

TRANSFERT DU RESIDU D-GLUCOSYLE DE L'UDPGlc AUX STEROLS^a

Enzyme ^b	<i>Accepteurs lipidiques exogènes</i>	<i>Residus D-glucosyle transférés (nmoles par mg de protéine)</i>	
		<i>Dans SG</i>	<i>Dans ASG</i>
A Microsomes	0	2,18	1,26
	Microsomes bouillis	0	0
	Lysat par le Triton X-100	1,46	0,32
B Poudre acétonique des microsomes	0	0	0
	EL ^c	4,21	0,21
	Cholesterol	1,33	0
C Fraction de poudre acétonique soluble dans le Triton X-100	0	0	0
	β -Sitostérol	3,76	0
	Stigmastérol	2,86	0
	Cholesterol	2,36	0

^aPour les conditions d'incubation et de mesure, voir Partie Expérimentale. ^bQuantité de protéine Exp A 58 µg, Exp B 43 µg, Exp C 20 µg. ^cEL extrait lipidique de microsomes 0,9 mg.

L'activité de transglucosylation peut être solubilisée à partir de la poudre acétonique par le Triton X-100 (Tableau III). Le surnageant 130 000 g de cette préparation contient 90% de l'activité qui cependant est labile et ne peut être conservée plus de quelques heures, même à -25°. Le Tableau III montre que plusieurs stérols, y compris le cholestérol, sont des accepteurs du résidu D-glucosyle de l'UDPGlc en présence de la préparation enzymatique. La spécificité des accepteurs stéroïques n'a pas encore été étudiée complètement.

Ces expériences suggèrent que la biosynthèse de SG et ASG a lieu suivant le schéma réactionnel (A) plutôt que suivant le schéma (B). Ce fait est confirmé par l'étude de la cinétique d'incorporation d'UDP[U-¹⁴C]Glc dans SG et ASG avec les préparations microsomales¹ et par les expériences décrites dans le paragraphe suivant.

Acylation de SG en présence de poudre acétonique de microsomes — Lorsque SG est mis en incubation en présence de poudre acétonique, aucune réaction ne se produit en l'absence d'un donneur d'acyle exogène. L'activité d'acylation est restaurée en présence de l'extrait lipidique de microsomes ou de lécithine brute de soja (Tableau IV).

TABLEAU IV

ACYLATION ENZYMATIQUE DES STERYL-D-GLUCOSIDES

<i>Enzyme</i>	<i>Proteine</i> (μg)	<i>Substrats et cofacteurs^a</i>	<i>Radioactivité incorporée</i> <i>dans ASG^b</i>
A ^c	Microsomes	58	SG (21 000) ^b
	Poudre acetonique des microsomes	70	SG (16 800) ^b
	id	70	SG (18 520) ^b + EL (880 μg)
B ^d	id	70	SG (17 860) ^b + PE (400 μg)
	id	67	SG (17 200) ^b + PE (135 μg)
	id	67	SG (17 100) ^b + PE (135 μg) + Mg ²⁺
		67	SG (16 900) ^b + PE (135 μg) + ATP

^aEL extrait lipidique de microsomes, PE phosphatidyl-éthanolamine de soja, Mg²⁺ 2 mM, ATP 1 mM^bDesintegrations/min, SG steryl-D-[U-¹⁴C]glucoside préparé enzymatiquement par transglucosylation ^cVolume total de 50 μl , pour les conditions d'incubation et de mesure, voir la Partie Expérimentale ^dMêmes conditions que dans^c, sauf un vol total de 25 μl

La fraction active de la lécitine de soja a été purifiée par chromatographie sur colonne d'acide silicique avec le mélange de solvants chloroforme-méthanol-eau (Tableau V). Les fractions les plus actives ont été concentrées sous vide puis rechromatographiées sur acide silicique par le mélange de solvants acétate d'éthyle-chloroforme-méthanol. Une seule région active a été observée. Cette fraction concentrée sous vide a été analysée et identifiée à la phosphatidyl-éthanolamine, comme il est décrit dans la Partie Expérimentale. D'autres échantillons de PE, provenant du blé,

TABLEAU V

ACTIVITÉ D'ACYLATION DE SG DES FRACTIONS LIPIDIQUES DE LA LECITHINE BRUTE DE SOJA^a

<i>Solvant d'elution^b</i>	<i>Tubes no</i>	<i>Composition de la fraction</i>	<i>Radioactivité incorporée</i> <i>dans ASG^c</i>
Acetone-heptane (1 3, v/v)	5 a 8	Aucun lipide	87
	14 a 25	Lécithine brute totale (500 μg)	3340
Chloroforme-méthanol-eau (14 3 0 7 v/v)	149 a 151	Lipides neutres, pigments stérols	780
	152 a 154	ASG	Non mesure
	157 a 160	SG + inconnu	680
Chloroforme-méthanol-eau (15 30,9 4,1, v/v)	197 a 204	SG + PE + DGDG ^d	1310
Méthanol-eau (22 3, v/v)	221 a 227	PE + DGDG ^d	2700
	233 a 237	Phospholipides non analysés	860
		id	685
		id	490

^aConditions d'incubation décrites dans le Tableau IV B, volume total de 40 μl , SG-(glucosyl-¹⁴C) 6000 désintégrations/min, SG (soja) 4 μg , la fraction lipidique est essayée un aliquot correspondant à 7,5 mg de lécitine brute déposée au sommet de la colonne ^bFractionnement sur colonne d'acide silicique ^cDesintégrations/min ^dPE, phosphatidyl-éthanolamine, DGDG, digalactosyldiglycéride

de l'épinard ou de *E. coli*, restaurent l'activité de transacylation. Le dipalmitoyl- α -glycérophosphate d'éthanolamine de synthèse est peu actif (Tableau VI). Il est bon de rappeler que les PE naturelles contiennent toutes une proportion importante d'acides gras insaturés qui semblent nécessaires à l'activité. De plus, la composition en acides

TABLEAU VI

ACTIVITÉ DE TRANSACYLATION DE DIVERSES PHOSPHATIDYL-ÉTHANOLAMINES

<i>Substrat</i>	<i>Activité de transacylation^a</i> (%)
PE (soja)	100
PE (blé)	80
PE (<i>E. coli</i>)	39
Dipalmitoyl-GPE ^b	9

^aMesurée dans les conditions décrites dans le Tableau IV A et exprimée en % de l'activité obtenue avec la PE de soja. ^bGPE, glycero-1-phosphate d'éthanolamine.

gras de ASG est très voisine de celle de PE (Tableau VII). On pouvait alors supposer, soit que PE était un activateur de l'acylation en C-6 du groupe D-glucosyle de SG, soit que PE était réellement le donneur d'acyle de la réaction de transacylation. Pour le savoir, nous avons préparé de la phosphatidyl-éthanolamine marquée par ¹⁴C dans

TABLEAU VII

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA PHOSPHATIDYL-ÉTHANOLAMINE ET DU STERYL-ACYL-D-GLUCOSIDE^c

<i>Acides gras</i>	<i>PE (ble)</i>	<i>PE (soja)</i>	<i>ASG (soja)^b</i>	<i>ASG (soja)^c</i>
C 16-0	21,7	32,8	33,7	33,9
C 16-1	0	0	0,9	0
C 18-0	0	2,1	7,0	6,2
C 18-1	0	5,5	8,8	9,1
C 18-2	45,2	52,5	47,4	43,2
C 18-3	33,0	5,2	2,2	7,6

^aValeurs exprimées en % d'acides totaux. ^bD'après Lepage⁸. ^cD'après Singh et Privett²¹.

les acides gras, par incubation d'*E. coli* avec de l'acétate-2-¹⁴C. Par incubation de SG et de PE-(acyl-¹⁴C) en présence de la poudre acétonique, on constate que la radioactivité est incorporée dans ASG (Fig. 3). PE est effectivement le donneur d'acyle de cette réaction.

Les résultats du Tableau IV n'expriment pas les activités absolues des préparations enzymatiques. En effet la radioactivité spécifique du substrat stéryl-D-[¹⁴C]-glucoside préparé enzymatiquement n'est pas connue parce que les microsomes qui ont permis de le préparer contiennent déjà des stéryl-D-glucosides libres et acylés. Dans quelques expériences il a été possible cependant d'estimer l'activité de transfert d'acyle par dilution isotopique du substrat radio-actif avec du SG exogène. En présence de SG 0,5 mM, l'activité de transacylation des microsomes lysés par le Triton,

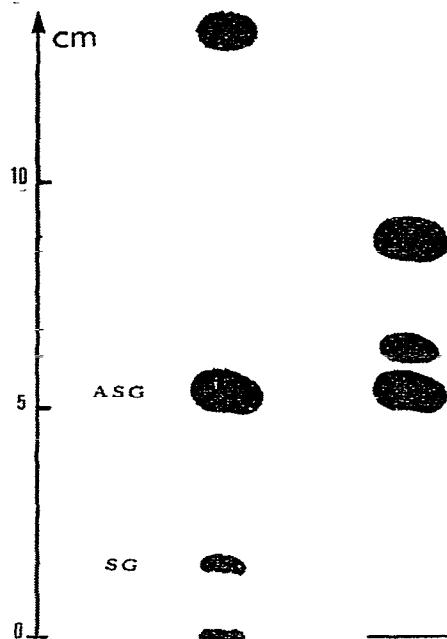


Fig 3 Identification d ASG obtenu par incubation de SG et de PE-(acyl- ^{14}C), en présence de poudre acetonique. Chromatographie sur couche mince de silice du mélange de lécithine brute de soja et des produits de la réaction enzymatique (solvant C). La tache radioactive ASG a été partiellement purifiée par une première chromatographie dans le solvant D. À gauche révélation au réactif de Liebermann. À droite autoradiographie.

mesurée par la méthode décrite dans la Partie Expérimentale est 12,5 nmoles par mg de protéine en 5 min. La même mesure d'activité effectuée avec la poudre acetonique délipidée et additionnée de PE d'*E. coli* est 3,8 nmoles par mg de protéine en 5 min.

Reconstitution du système complet — Le Tableau VIII montre la reconstitution du système complet de transglucosylation et d'acylation en présence d'UDPGlc, de cholestérol et de PE, mis en incubation avec une poudre acetonique de microsomes.

TABLEAU VIII

RECONSTITUTION DU SYSTÈME ENZYMATIQUE DE SYNTHÈSE DE CHOLESTÉRYL-D-GLUCOSIDE LIBRE ET ACYCLE

Mélange mis en incubation	Radioactivité incorporée ^a	
	Dans SG	Dans ASG
Système complet ^b	11300	5850
PE omise	21450	160
Cholestérol omis	0	0
PE et cholestérol omis	0	0

^aDésintégrations/min ^bVoir Partie Expérimentale

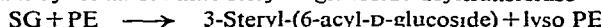
Il faut en conclure qu'il existe bien deux enzymes dans ces fractions particulières, l'une capable de transférer le résidu D-glucosyle de l'UDPGlc aux stérols, la deuxième capable d'acyler les stéryl-D-glucosides suivant les deux schémas réactionnels

UDPGlc sterol glucosyltransferase



(C)

Phosphatidyl-ethanolamine stéryl-D-glucoside acyltransférase



(D)

Les constantes de Michaelis des substrats sont indiquées dans le Tableau IX. Aucun cofacteur dialysable n'a été trouvé pour la première réaction. La deuxième réaction est fortement inhibée par Mg^{2+} et activée légèrement par l'ATP (Tableau IV).

TABLEAU IX

CONSTANTES D'AFFINITE APPARENTES DES SUBSTRATS DE LA GLUCOSYL-TRANSFERASE ET DE L'ACYL-TRANSFERASE

Enzyme	Substrat	Constantes d'affinité (mM)
Glucosyl-transferase ^a	UDPGlc	0,028
	β -Sitostérol	0,30
Acyl-transferase ^a	SG (soja)	0,16
	PE (soja)	$\sim 5^b$

^aPour les conditions de mesure voir la Partie Expérimentale ^bValeur approximative

Nous avons mentionné précédemment que les microsomes semblent être de beaucoup la fraction cellulaire la plus active dans la biosynthèse des D-glucosides de phytosterols. En particulier les mitochondries ne contiennent que très peu ou pas cette activité¹⁶. Les mêmes fractions microsomales catalysent aussi la biosynthèse des β -D-glucannanes mais aucune évidence ne permet de relier, de façon précise, la synthèse des polysaccharides et celle des D-glucosides de stérols. D'après les résultats antérieurs de Kauss¹¹, les nôtres¹⁵ et ceux de la présente étude, on constate qu'il est possible de séparer les activités de biosynthèse des β -D-glucannanes et des D-glucosides de stérols par les fractions microsomales. Le Tableau X résume ces résultats.

Il est néanmoins remarquable de constater que les stéryl-D-glucosides sont des constituants ubiquitaires des plantes et qu'ils semblent jouer un rôle important dans la structure lipidique des membranes cellulaires. Ils ne devraient donc pas être considérés comme des produits secondaires du métabolisme. Dans le cas où la copule glucidique est un oligosaccharide, il serait intéressant de préciser les réactions de biosynthèse qui donnent naissance à la structure spécifique de la chaîne. L'intérêt pharmacodynamique et les effets physiologiques d'un certain nombre d'entre eux apportent un intérêt supplémentaire à l'étude de leur biosynthèse²².

À notre connaissance, le transfert enzymatique d'un acide gras d'un phospholipide conduisant à l'esterification d'un ose n'avait jamais été décrit. Mentionnons que

TABLEAU X

SYNTHESE DE D-GLUCANNES ET DE STÉRYL-D-GLUCOSIDES PAR LES MICROSOMES DE BLE

Conditions expérimentales			Synthèse observée ^a			
Substrat	Detergent	Cofacteur	D-Glucannes		Stéryl-D-glucosides	
			β -(1→3)	β -(1→4)	Libres	Acytes
UDPGlc ^b	0	Mg ²⁺	+	+	++	+
UDPGlc ^b	0	0	+	0	+	++
UDPGlc ^b	Triton X-100	Mg ²⁺	0	0	++	+
UDPGlc ^b	Triton X-100	0	0	0	+	++
UDPGlc ^b	Digitonine	Mg ²⁺	+	+	0	0
UDPGlc ^b	Digitonine	0	+	0	0	0
SG	0	Mg ²⁺	0	0		+
SG	0	0	0	0		++

^aPour les conditions expérimentales et valeurs numériques, voir Ref 15 et Tableaux III et IV^bConcentration 10 µM

dans les microsomes intacts, la majeure partie des stéryl-D-glucosides se trouve sous forme acylique. L'activité d'acylation mesurée *in vitro* et la proportion de phosphatidyl-éthanolamine des lipides des microsomes permettent de penser que la réaction d'acylation décrite s'opère *in vivo*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques chromatographiques — Les lipides ont été chromatographiés sur couche mince de silice sur films plastiques (Schleicher et Schull F 1500) dans les systèmes de solvants suivants (A) chloroforme-méthanol-eau (65 25 4, v/v), (B) 2,6-diméthyl-4-heptanone-acide acétique-eau (20 15 2, v/v), (C) acétone-heptane (1 1), (D) chloroforme-méthanol (43 7, v/v) (E) chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol (2 5 3, v/v). Les stéroïdes ont été révélés par pulvérisation du réactif modifié de Liebermann⁹ ou d'acide perchlorique à 20 %, puis chauffage à 110°, pendant 3 à 4 min. Les réactifs utilisés pour les phospholipides aminés étaient la ninhydrine (2 g/l) dans l'alcool butylique saturé d'eau et le réactif de Dittmier²³.

Le D-glucose obtenu par hydrolyse de SG dans l'acide chlorhydrique en solution aqueuse saturée à 0° (30 min à 20°) a été chromatographié sur papier Whatman n° 1 dans le solvant F alcool butylique-acide acétique-eau (4 1 2, v/v) et révélé par la benzidine trichloracétique.

La radioactivité sur les chromatogrammes a été détectée au moyen d'un compteur enregistreur Tracerlab 4 π Scanner et dans certaines expériences par autoradiographie.

Tampon I — Il contient du chlorhydrate de 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) 0,1M et du 2-hydroxy-1-ethanethiol (2-mercaptopropanoïde) 5 mM, pH 7,5.

Substrats — Les stéryl-D-glucosides libres et acyles ont été obtenus à partir de 22 g de lécithine brute de soja (Touzart et Matignon, France), par chromatographie sur colonne d'acide silicique selon la méthode de Lepage⁸ SG a été purifié par cristallisations successives dans l'ether (quantité obtenue 80 mg) ASG a été rechromatographié sur une colonne (3 × 17 cm) d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) Un gradient linéaire de chloroforme-méthanol de composition 100 0 à 22 3 (v/v) et de volume total 700 ml a été utilisé pour l'elution ASG a été elue par le mélange 19 1 (v/v) (quantité obtenue 180 mg sous forme d'huile)

La PE du soja a été obtenue à partir de 1,8 g de lécithine brute commerciale, la PE d'*E. coli* a partir d'un extrait lipidique de bactéries (43 mg de lipides pour 7,5 g de cellules centrifugées), préparé suivant la méthode de Kanfer et Kennedy²⁴ et la PE de blé extraite des racines par la même méthode (300 mg de lipides pour 75 g de matériel frais) Dans les trois cas les techniques de purification de PE étaient semblables Un premier fractionnement des lipides a été effectué sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) avec les systèmes de solvants acetone-heptane (1 3, v/v, 2 5 vol de colonne), chloroforme (1 vol), chloroforme-méthanol-eau (93 6,75 0,25 à 30 61,8 8,2, v/v, 5,3 vol) et méthanol-eau (22 3, v/v, 1 vol) Les fractions contenant PE (Tableau V) ont été rechromatographiées sur colonne d'acide silicique préalablement équilibrée avec le solvant d'elution chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol (2 5 3, v/v) Le SG a été retrouvé dans le volume mort, suivi immédiatement par le digalactosyldiglyceride, la PE a été élue après passage de 3 vol de solvant Ce fractionnement a été réalisé sur une colonne de 3 × 23 cm dans le cas du soja (182 mg de lipides déposés, 98 mg de PE obtenue), sur une colonne de 1,2 × 19 cm dans le cas d'*E. coli* (28 mg de lipides déposés, 26 mg de PE obtenue). enfin, dans le cas du blé, sur une colonne de 1 × 15 cm (27 mg de lipides déposés, 23 mg de PE obtenue)

L'UDPGlc, l'ATP, le cholestérol et le dipalmitoyl-glycéro-1-phosphate d'éthanolamine étaient des produits commerciaux de Calbiochem (La Jolla, California) Un échantillon de PE d'épinard nous a été aimablement fourni par le Dr R Douce (Université de Paris VI, France), le Dr R Goutarel (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) nous a fait don de β -sitostérol et de stigmastérol et le Dr A Picaud (CNRS, Gif-sur-Yvette, France), de digalactosyldiglyceride L'UDP[U-¹⁴C]Glc (194 Ci/mole) a été préparé enzymatiquement par incubation de α -D-glucopyranosyle-U-¹⁴C phosphate et d'UTP, en présence d'UDPGlc-pyrophosphorylase de blé²⁵ Il a été purifié par chromatographie bidimensionnelle sur papier²⁶

Les stéryl-[U-¹⁴C]glucosides ont été synthétisés enzymatiquement avec un rendement de 25 % par incubation pendant 1 h à 30° du mélange suivant UDP[U-¹⁴C]Glc 20 nmoles (3,9 μ Ci), extrait lipidique de microsomes 2,5 mg, Triton X-100 13 mg, poudre acetonique de microsomes (1,1 mg de protéine) dans le Tampon I, volume total 280 μ l Le mélange d'incubation inactive à 100° a été saponifié par l'hydroxyde de sodium 0,5M, pendant 5 min à 100°, pour désacyler l'ASG formé Après extraction des lipides par la méthode de Lennarz et Talamo¹⁷, SG radioactif a été purifié par trois chromatographies successives sur couche mince de silice dans les solvants D, A et E

La PE-(acyl- ^{14}C) a été obtenue suivant la méthode de Kanfer et Kennedy²⁴ avec les modifications suivantes glycérol 0,2% dans le milieu de culture, incubation de 1 ml de suspension cellulaire d'*E. coli* K 12 HFr H (0,3 mg de matière sèche) avec 1 μmole d'acétate-2- ^{14}C (50 Ci/mole) pendant 3 h à 37°. Après précipitation des cellules par l'acide trichloracétique à 10% et centrifugation, le culot bactérien a été lavé par l'eau et séché par l'éthanol et le benzene, avec évaporation sous vide. Au matériel sec on a ajouté 0,1 ml de méthanol à 55°, puis 0,2 ml de chloroforme, et la suspension obtenue a été déposée sur une plaque de silice. Deux chromatographies successives réalisées en atmosphère d'azote dans les systèmes de solvants A et E ont permis d'isoler la PE (quantité obtenue 2 μCi). Sa radioactivité spécifique était voisine de 30 Ci/mole.

Identification du donneur d'acyle isolé du soja — Cette identification est basée sur les expériences suivantes.

L'hydrolyse alcaline de la substance, selon Dawson²⁷, a fourni un ester phosphorique hydrosoluble qui a été identifié par cochromatographie sur plaque de cellulose (Eastman n° 6064, solvant de Paladini²⁶, pH 3,8) avec le GPE provenant de dipalmitoyl-GPE de synthèse, traité d'une manière parallèle. La tache (R_F 0,43) a été détectée par la ninhydrine et le réactif phosphomolybdique²⁸.

La fraction heptane-soluble des produits de saponification de la substance par l'hydroxyde de potassium 0,5M en solution dans le méthanol a fourni des acides gras qui ont été méthyles par le diazométhane en solution étherée et analysés par chromatographie en phase gazeuse (colonne de 2 m, entraînement à l'azote, phase stationnaire, polyéthylène glycol adipate à 10% sur « Chromosorb » température, 188°, détecteur ionisation de flamme). Les diverses durées de rétention ont été comparées à celles d'esters méthyliques authentiques. Le pourcentage des divers acides a été mesuré par intégration du contour des pics enregistrés.

La substance a cochromatographié avec le dipalmitoyl-GPE dans les solvants A et E (R_F 0,45 et 0,12, respectivement) et a réagi positivement à la ninhydrine et au réactif spécifique des phospholipides²³.

L'éthanolamine a été identifiée comme seule substance azotée contenue dans les produits d'hydrolyse acide²⁹ par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions « Chromobeads » à l'aide d'un auto-analyseur Technicon et comparaison du temps de rétention avec ceux d'échantillons authentiques.

Le dosage d'azote et de phosphore, après minéralisation, et le dosage de la fonction ester acyle³⁰ ont donné les résultats suivants. Calc pour la phosphatidyl-éthanolamine N P acyl ester 1 1 2, trouve N P acyl ester 0,98 0,99 1,82.

Préparation des microsomes de racines de blé — Des grains de blé (*Triticum sativum L.*, cv Moisson-Vilmorin) lavés et hydratés pendant 24 h dans l'eau courante, ont été mis en germination en atmosphère saturante à 22–24° sur des plaques perforées. Après 36 h environ, les racines des plantules ont été coupées au rasoir et utilisées, soit à l'état frais, soit après conservation à –25°.

La préparation des microsomes a été adaptée de celle décrite par Ray *et al*³¹. Le détail en a été exposé antérieurement¹. Toutes les préparations ont été conduites

en Tampon I La fraction de l'homogenat des racines qui sémente entre 2500 g et 130 000 g (20 min) dans le Tampon I-saccharose (18%, p v) a été placée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose dans le même tampon (Fig 1) Après centrifugation pendant 2 h à 25 000 t p m dans le rotor SW 27 d'une centrifugeuse Spinco (Beckman Inst), la turbidité des diverses fractions à 600 nm a été mesurée photométriquement et les activités enzymatiques ont été dosées La méthode précédente a été simplifiée pour les préparations enzymatiques qui suivent par sédimentation des microsomes à l'interface de deux couches de Tampon I-saccharose (25% et 45%, p v), pendant 2 h à 25 000 t p m dans le rotor SW 27 Les microsomes ainsi obtenus ont été conservés pendant plusieurs jours à -25° sans perte de leurs activités de synthèse de stéryl-D-glucosides En partant d'une masse fraîche de racines de 75 g, on a obtenu une fraction active de volume 2 ml environ contenant 1,5 mg de protéine par ml La quantité de protéine des préparations a été mesurée par la technique de Itzhaki et Gill^{3,2}

Préparation de la poudre acétone des microsomes — Les microsomes ont été dialysés pendant 6 h à 0° contre du Tampon I puis agités avec 6 vol d'acétone à -15° Le culot résultant d'une centrifugation pendant 2 min à 12 000 g a été lavé à l'acétone et secoué sous vide pendant 12 h à 0° Il peut être conservé à l'état sec à -25° pendant quelques jours Le surnageant acétone a été concentré et secoué sous vide à la température de <40° L'extrait lipidique contenait 2,3 mg de lipides par mg de protéine des microsomes

Solubilisation des préparations enzymatiques par le Triton X-100 — Après séparation par centrifugation, les microsomes, en suspension dans le Tampon I-saccharose, ont été additionnés d'une solution de Triton X-100 (octylphenoxypoly-éthoxyéthanol, Rohm et Haas Co, Philadelphia, Pennsylvania) dans le même tampon, jusqu'à une concentration de 0,28% dans le mélange La perte de turbidité à 600 nm était d'environ 60% La suspension a été ensuite centrifugée pendant 1 h à 36 000 t p m dans le rotor Spinco n° 40 L'activité de biosynthèse des glucolipides a été mesurée dans le surnageant et dans le culot de centrifugation remis en suspension dans le même volume de Tampon I-saccharose

L'activité UDPGlc sterol glucosyltransferase a été solubilisée à partir des poudres acétoneuses préparées comme décrit dans les paragraphes précédents Dans une préparation type, 2,6 mg de poudre acétoneuse ont été mis en suspension dans 0,65 ml de Tampon I contenant du Triton X-100 (0,5%) La suspension a été centrifugée pendant 20 min à 36 000 t p m dans le rotor SW 65 Le surnageant et le culot remis en suspension dans le même volume de tampon ont été employés pour mesurer les activités enzymatiques L'addition de Triton X-100 à la poudre acétoneuse conduit à la solubilisation de 40 à 50% des protéines totales

Essais enzymatiques — *Transfert de résidus D-glucosyle de l'UDPGlc aux stérols* Le système complet de volume total 50 µl, était constitué d'UDP[U-¹⁴C]Glc (2,5 nmoles, 0,1 µCi), de stérol (50 nmoles) et d'enzyme, tamponnés par le Tampon I Les substrats lipidiques ont été ajoutés en solution dans 5 µl de Triton X-100 à 25% Lorsque la poudre acétoneuse de microsomes était la source d'enzyme, elle a

été mise en suspension dans le tampon d'incubation, au moment de l'emploi. Après incubation pendant 5 min à 30°, on a arrêté la réaction par chauffage à 100°, pendant 3 min.

La constante d'affinité apparente du β -sitostérol a été mesurée dans les mêmes conditions en modifiant de 11 à 540 μM la concentration du substrat, en présence de poudre acétonique (42 μg de protéine par essai).

Pour la mesure de la constante de Michaelis de l'UDPGlc, on a utilisé comme source d'enzyme des microsomes lysés par le Triton (120 μg de protéine par essai), en présence de substrat 5 μM à 1 mM, sans addition de stérol exogène.

Acylation des stéryl-D-glucosides Les conditions standard d'incubation étaient les suivantes : les stéryl-D-[U- ^{14}C]glucosides et les donneurs d'acyle dissous dans 5 μl de Triton X-100 à 25 %, ont été ajoutés à la suspension de poudre acétonique dans le Tampon I (volume total de 50 μl). Dans le cas de l'essai avec les microsomes, SG, dans 5 μl de méthanol, a été ajouté à la préparation de particules en suspension dans le Tampon I-saccharose sans donneur d'acyle exogène. Après incubation à 30° pendant 30 min, on a inactivé les mélanges pendant 3 min à 100°.

La mesure de la constante de Michaelis de SG a été faite dans les conditions standard, en présence de substrat 0,01 à 1 mM et de 400 μg de PE pour chaque essai. La durée d'incubation a été réduite à 5 min.

Pour le cas particulier du transfert d'acyl- ^{14}C de la PE d'*E. coli* aux stéryl-D-glucosides de soja non radioactifs (Fig. 4), l'incubation a été réalisée comme suit : 5 μl d'une solution dans le Triton X-100 à 25 % contenant SG (14 mg), PE (200 μg , 1 μCi) et ATP (25 nmoles) ont été ajoutés à la suspension de poudre acétonique dans le Tampon I (volume total 25 μl). Après 1 h à 30°, une nouvelle addition de la même quantité d'enzyme dans 15 μl de Tampon I a été faite et l'incubation poursuivie pendant 1 h encore (quantité totale de protéine : 140 μg).

Reconstitution du système de transglucosylation et de transacylation Le mélange mis en incubation pendant 30 min à 30° contenait UDP[^{14}C]Glc 2,5 nmoles (0,1 μCi), PE (soja) 340 nmoles, cholestérol 25 nmoles, ATP 25 nmoles, poudre acétonique de microsomes (41 μg de protéine) dans un volume total de 25 μl de Triton X-100 2,5 % dans le Tampon I.

Le système précédent a été employé pour la mesure de la constante d'affinité apparente de PE pour la transacylase, en faisant varier la concentration de substrat de 0 à 40 mM. Cette méthode ne fournit qu'une valeur approchée de la constante d'affinité et a été utilisée faute de disposer d'une quantité suffisante de substrats lipidiques radioactifs.

Mesures des activités de biosynthèse de SG et ASG — Les produits lipidiques des réactions enzymatiques ont été isolés par chromatographie du mélange réactionnel inactivé, déposé directement sur couche mince de silice, suivant une bande de largeur 2 cm. Pour les essais effectués en présence de microsomes, les lipides ont été préalablement extraits par du chloroforme-méthanol (2:1, v/v) selon la méthode de Lennarz et Talamo¹⁷. Le solvant D a été employé pour le développement des chromatogrammes suivant une première dimension. Dans quelques expériences (voir le texte) les

aires radioactives ont été éluées par le chloroforme-méthanol et rechromatographiées dans le solvant C

La radioactivité incorporée dans SG et ASG a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Packard Tri-Carb (Packard Instrument Co , Inc , Downers Grove, Illinois), par deux méthodes La première consistait à détacher l'aire radioactive de la plaque de silice et à placer directement la substance en poudre dans le mélange scintillant Les rendements obtenus par cette technique étaient constants mais non directement calculables Dans la seconde méthode, les produits ont été elués de la silice par le chloroforme-méthanol (2 1, v/v), concentrés sous vide, repris par le chloroforme et comptés Dans les deux cas, les comptages étaient effectués avec 13 ml de liquide scintillant comprenant du 2,5-diphényloxazole (0,4%) et du 1,4-bis-(4-méthyl-5-phényloxazol-2-yl)-benzène (0,025%), en solution dans du toluène

RÉFÉRENCES

- 1 C PEAUD-LENOËL ET M AXELOS, *C R Acad Sci Paris, Ser D*, 273 (1971) 1057
- 2 M AXELOS ET C PEAUD-LENOËL, *C R Acad Sci Paris, Ser D*, 273 (1971) 1434
- 3 J E COURTOIS ET F PERCHERON, dans W PIGMAN ET D HORTON (Éds), *The Carbohydrates*, 2^e Éd , Vol II A, Academic Press, New York, 1970, p 213
- 4 P G MARSHALL, dans S COFFEY (Ed), *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 2^e Éd , Vol II D, Elsevier, Amsterdam, 1970, p 360
- 5 J ELKS, dans S COFFEY (Ed), *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 2^e Éd , Vol II E, Elsevier, Amsterdam, 1970, p 1
- 6 V J CHIRVA, P K KINTJA ET G V LAZUR'EVSKII, *Khim Prir Soedin, Uzb SSR*, 6 (1969) 494
- 7 D C COLLINS, D G WILLIAMSON ET D S LAYNE, *J Biol Chem*, 245 (1970) 873
- 8 M LEPAGE, *J Lipid Res*, 5 (1964) 587.
- 9 W EICHENBERGER ET D W NEWMAN, *Biochem Biophys Res Commun*, 32 (1968) 366
- 10 C T HOU, Y. UMEMURA, M NAKAMURA ET S FUNAHASHI, *J Biochem (Tokyo)*, 63 (1968) 351
- 11 H KAUSZ, *Z Naturforsch*, B, 23 (1968) 1522
- 12 A ONGUN ET J B MUDD, *Plant Physiol*, 45 (1970) 255
- 13 R A LAINE ET A D ELBEIN, *Biochemistry*, 10 (1971) 2547
- 14 W EICHENBERGER ET E C GROB, *Chimia*, 23 (1969) 368
- 15 C PEAUD-LENOËL ET M AXELOS, *Fed Eur Biochem Soc Lett*, 8 (1970) 224
- 16 A NOUGAREDE, C PEAUD-LENOËL ET M AXELOS, résultats non publiés
- 17 W J LENNARZ ET B TALAMO, *J Biol Chem*, 241 (1966) 2707.
- 18 W EICHENBERGER ET W MENKE, *Z Naturforsch*, B, 21 (1966) 859
- 19 P DUPÉRON ET R DUPERON, *C R Acad Sci Paris, Ser D*, 270 (1970) 1108
- 20 P B BUSH, C GRUNWALD ET D L DAVIS, *Plant Physiol*, 47 (1971) 745
- 21 H SINGH ET O S PRIVETT, *Lipids*, 5 (1970) 692
- 22 G FRANZ ET H MEIER, *Planta Medica*, 17 (1969) 396
- 23 J C DITTMER ET R L LESTER, *J Lipid Res*, 5 (1964) 126
- 24 J KANFER ET E P KENNEDY, *J. Biol Chem*, 238 (1963) 2919
- 25 M AXELOS ET C PÉAUD-LENOËL, *Bull Soc Chim Biol*, 51 (1969) 261
- 26 A PALADINI ET L F LELOIR, *Biochem J*, 51 (1952) 426
- 27 R M C DAWSON, *Biochim Biophys Acta*, 14 (1954) 374
- 28 C S HANES ET F A ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107
- 29 J C DITTMER ET M A. WELLS, *Methods Enzymol*, 14 (1969) 502
- 30 Réf 29, p 490
- 31 P M RAY, T L SHININGER ET M M. RAY, *Proc Nat. Acad Sci U S*, 64 (1969) 605
- 32 R F ITZHAKI ET D M GILL, *Anal Biochem*, 9 (1964) 401