

SUR L'INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE DU sn-GLYCEROL-3-PHOSPHATE-¹⁴C DANS LE MONOGALACTOSYLDIGLYCERIDE DES PLASTES ISOLES

R.DOUCÉ et T.GUILLOT-SALOMON

Laboratoire de Biologie Végétale IV, Faculté des Sciences, 12 rue Cuvier, Paris 5, France

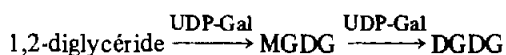
Received 25 September 1970

Isolated plastids (chloroplasts and etioplasts) that are morphologically intact and free of any contamination from other cell structures can incorporate label from sn-glycerol-3-phosphate-¹⁴C into monogalactosyldiglyceride.

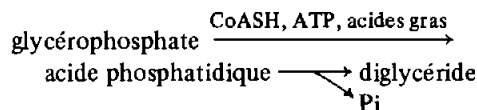
1. Introduction

Si l'importance des galactolipides riches en acides gras polyinsaturés dans les membranes des chloroplastes est établie depuis longtemps [1], leurs voies de biosynthèse, par contre, restent à préciser.

Récemment Neufeld et Hall [2], Ongun et Mudd [3], Mudd, Van Vliet et Van Deenen [4] et Chang et Kulkarni [5] ont montré que les chloroplastes isolés de feuilles d'Épinard catalysent le transfert du galactose de l'uridine diphosphate galactose (UDP-Gal) dans plusieurs galactolipides et notamment le monogalactosyldiglycérade (MGDG): 1,2-di-O-acyl-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-sn-glycérol, et le digalactosyldiglycérade (DGDG): 1,2-di-O-acyl-3-O-(6-O-α-D-galactopyranosyl-β-D-galactopyranosyl)-sn-glycérol, les molécules de galactose se fixant probablement sur des diglycérades très insaturés [4]:



D'autre part, il a été démontré que des chloroplastes isolés [6], exempts de toute contamination par d'autres structures cellulaires et morphologiquement intacts, peuvent catalyser l'incorporation de la radioactivité du sn-glycérol-3-phosphate-¹⁴C (GP¹⁴C) dans l'acide phosphatidique et les diglycérades selon un mécanisme mis en évidence pour la première fois dans les tissus animaux par Komberg et Pricer [7]:



Il était donc intéressant de savoir si les diglycérades ainsi synthétisés pouvaient ultérieurement s'incorporer dans les galactolipides constitutifs des membranes plastidiales.

2. Matériel et méthodes

Les chloroplastes des feuilles d'Épinard (*Spinacia oleracea*) les chloroplastes et les étioplastes de feuilles de Maïs (*Zea mays*, hybride Wisconsin 355), sont isolés selon une technique résumée dans une publication antérieure [8]. Des parties aliquotes des diverses suspensions d'organites obtenues sont fixées pour le contrôle en microscopie électronique [8] (fig. 1), ou encore employées pour le dosage des protéines [9].

La mesure de l'incorporation de la radioactivité du sn-glycérol-3-phosphate-¹⁴C dans les lipides des plastes est suivie, au cours du temps, dans le milieu réactionnel suivant: saccharose 0,3 M; MgCl₂ 5 mM; tampon Tris 10 mM pH 7,5; CoASH 0,2 mM; ATP 2 mM; UDP-Gal 1 mM; GP¹⁴C 0,1 mM, 3 × 10⁵ cpm. L'addition d'acides gras n'est pas indispensable. Pour un volume final de 2,4 ml le milieu renferme de 5 à 15 mg de protéines plastidiales.

Les lipides sont extraits, séparés et identifiés selon une technique décrite antérieurement [9].

Le GP¹⁴C est synthétisé selon la méthode de Chang et Kennedy [10].

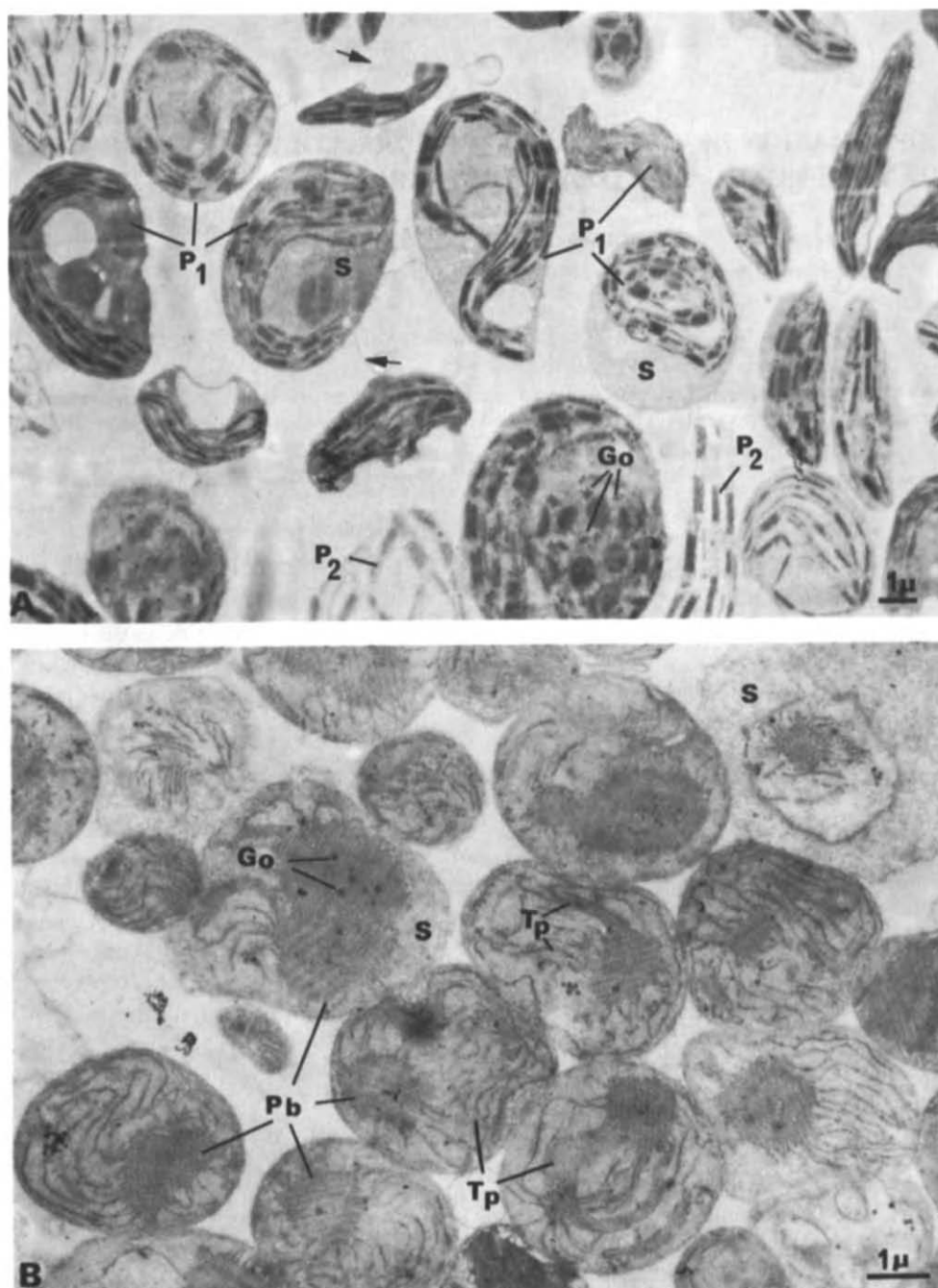


Fig. 1. Contrôle en microscopie électronique des suspensions de plastes. Fixation: glutaraldéhyde- OsO_4 ; inclusion, araldite; contraste, MnO_4Ba . (A) Culot de chloroplastes isolés de feuilles d'Epinard ($\times 5000$). La plupart des chloroplastes ont conservé leur intégrité morphologique (P_1). Les flèches indiquent quelques gonflements de leur double membrane limitante. Certains plastes (P_2), privés de leur membrane externe, ont perdu leur stroma (S). (Go, globules osmiophiles). (B) Culot d'étioplastes isolés de feuilles de plantules de Maïs cultivées à l'obscurité ($\times 8000$). Les étioplastes ont conservé leur intégrité morphologique. Go, globules osmiophiles; Pb, corps prolamellaire; Tp, tubules primaires; S, stroma.

3. Résultats et discussions

Le tableau 1 montre que les plastes mis en incubation dans un milieu qui conserve leur intégrité morphologique incorporent activement dans leurs lipides la radioactivité du GP¹⁴C qu'on leur fournit. Cette incorporation, indépendante des conditions d'éclairement, exige la présence d'ATP et de CoASH dans le milieu d'incubation.

La chromatographie des lipides radioactifs sur papier imprégné de gel de silice [11] montre, après autoradiographie des chromatogrammes (fig. 2), que la majorité de la radioactivité incorporée (60 à 70%) se localise dans deux phospholipides qui, après désacylation [9], donnent du glycérophosphate. Ces deux lipides ont été identifiés comme étant respectivement l'acide phosphatidique (AP) et son dérivé lyso (lysoAP). Ce résultat confirme, en les étendant, les travaux de Sastry et Kates [12]. Nous devons toutefois signaler que l'acide phosphatidique ainsi marqué présente, dans ces conditions, un R_f très inférieur à celui d'un témoin d'acide phosphatidique obtenu par dégradation de la lécithine du jaune d'oeuf sous l'action de la phospholipase D (EC 3.1.4.4). Un tel comportement est sans nul doute imputable à la très grande insaturation de l'acide phosphatidique activement synthétisé. En effet, les acides gras utilisés pour l'acylation du glycérophosphate sont d'origine endogène donc polyinsaturés [13].

Tableau 1
Incorporation de la radioactivité du GP¹⁴C dans les lipides totaux des chloroplastes et des étioplastes isolés.

Milieu	GP incorporé (nmoles/5 mg protéines)		
	Chloroplastes		Étioplastes
	Epinaud	Maïs	Maïs
complet			
lumière	33	12	24
obscurité	30	13	20
sans CoASH	3	1	2
sans ATP	6	3	4

La composition du milieu réactionnel est décrite dans le texte.
La durée de l'incubation est de 60 min.

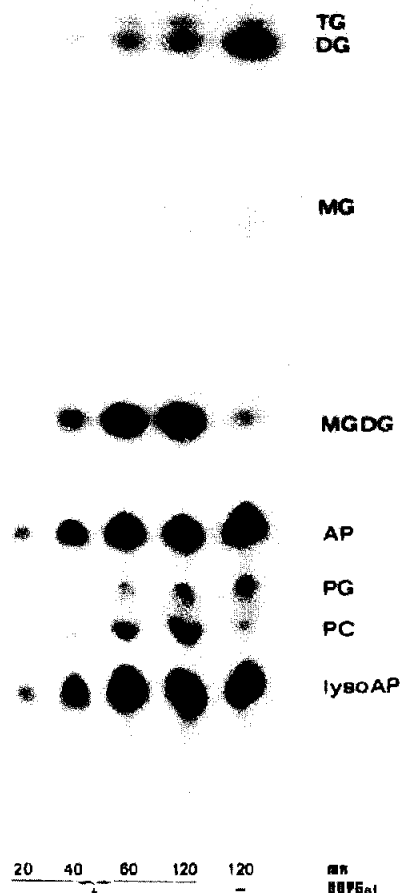


Fig. 2. Séparation, par chromatographie sur papier imprégné de gel de silice, des lipides d'étioplastes de feuilles de Maïs ayant incorporé la radioactivité du GP¹⁴C pendant des temps variés (20, 40, 60, 120 min). TG, triglycéride; DG, diglycéride; MG, monoglycéride; MGDG, monogalactosyldiglycéride; AP, acide phosphatidique; PG, phosphatidylglycérol; PC, phosphatidylcholine; lysoAP, acide lysophosphatidique. Solvant, diisobutylcétone-acide acétique-eau (40:25:5, v/v). Révélation ¹⁴C autoradiographie. La composition du milieu réactionnel est décrite dans le texte. Il renferme (+) ou non (-) de l'UDP-Gal.

D'autre part la fig. 2, ainsi que le tableau 2, montrent qu'en l'absence d'UDP-Gal dans le milieu d'incubation les galactolipides ne sont pratiquement pas synthétisés alors que les diglycérides ont tendance à s'accumuler. Par contre, si le milieu renferme de l'UDP-Gal les résultats obtenus sont profondément différents.

Tableau 2
Incorporation de la radioactivité du GP¹⁴C dans les galactolipides et les diglycérides des chloroplastes et des étioplastes isolés.

	GP incorporé (nmoles/5 mg protéines)					
	Chloroplastes				Étioplastes	
	Epinard		Maïs		Maïs	
	sans UDP-Gal	avec UDP-Gal	sans UDP-Gal	avec UDP-Gal	sans UDP-Gal	avec UDP-Gal
MGDG	0,2	5	0,1	2	0,2	5,5
DGDG	0	0	0	0	0	0
Diglycérides	4,5	1,0	1,4	0,2	3,4	0,5

La composition du milieu réactionnel est décrite dans le texte. La durée de l'incubation est de 60 min.

En effet, MGDG est activement synthétisé et, dans ces conditions, les diglycérides ne s'accumulent plus. En résumé, les résultats obtenus indiquent que les plastes isolés (chloroplastes et étioplastes) possèdent toutes les enzymes qui catalysent l'incorporation de la radioactivité du GP¹⁴C dans MGDG. Nous avons montré, en particulier, que les diglycérides synthétisés par la voie de Kornberg et Pricer pouvaient servir de substrat pour une galactosylation éventuelle.

Cependant, dans ces conditions, toutes les tentatives que nous avons effectuées pour mettre en évidence la galactosylation du MGDG en DGDG se sont soldées par un échec. Nous inclinons alors à penser que les enzymes qui catalysent, d'une part, la galactosylation des diglycérides, et, d'autre part, celle du MGDG, sont, au sein du chloroplaste, spatialement éloignées l'une de l'autre.

Remerciements

Nous remercions vivement J. Dupont pour son excellente collaboration technique.

Références

- [1] A.A. Benson, Ann. Rev. Plant. Physiol. 15 (1964) 1.
- [2] E.F. Neufeld et C.W. Hall, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14 (1964) 503.
- [3] A. Ongun et J.B. Mudd, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1558.
- [4] J.B. Mudd, H.H.D.M. Van Vliet et L.L.M. Van Deenen, J. Lipid Res. 10 (1969) 623.
- [5] S.B. Chang et N.D. Kulkarni, Phytochemistry 9 (1970) 927.
- [6] R. Douce, Thèse Doctorat, Paris (1970).
- [7] A. Kornberg et W. Pricer, J. Biol. Chem. 204 (1953) 329.
- [8] J. Bahl, T. Guillot-Salomon et R. Douce, Physiol. Vegetale 8 (1970) 55.
- [9] R. Douce, T. Guillot-Salomon, C. Lance et M. Signol, Bull. Soc. Franc. Physiol. Vegetale 14 (1968) 351.
- [10] Y.Y. Chang et E.P. Kennedy, J. Lipid Res. 8 (1967) 447.
- [11] G.V. Marinetti, J. Erbland et J. Kochen, Federation Proc. 16 (1957) 837.
- [12] P.S. Sastry et M. Kates, Can. J. Biochem. 44 (1966) 459.
- [13] C.F. Allen, P. Good, H.F. Davis, P. Chisum et S.D. Fowler, Am. Oil Chemists Soc. 43 (1966) 223.