

## LOCALISATION DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DANS LES TISSUS VEGETAUX

### 1) Sur l'absence d'activité phospholipasique D dans les mitochondries et les plastes isolés

H. CLERMONT et R. DOUCE

*Laboratoire de Biologie Végétale IV, 12, rue Cuvier, Paris, France*

Received 10 July 1970

Mitochondria and plastids isolated from various plant tissues by methods which exclude contamination by other cell organelles lack phospholipase D activity.

### 1. Introduction

Bien que signalée dans de très nombreux tissus végétaux [1-11], la localisation intracellulaire de la phospholipase D (phosphatidylcholine phosphatidohydrolase, EC 3.1.4.4.) reste encore à préciser. Pour certains auteurs, cette enzyme serait, en effet, présente au niveau d'organites cellulaires tels que les plastes [2] et les mitochondries [10,12], alors que, pour d'autres [4,5], elle serait localisée dans la fraction soluble de la cellule.

Or, il est certain que l'étude des voies de biosynthèse des principaux phospholipides des végétaux supérieurs ne peut être conduite que sur des fractions dépourvues de toute activité phospholipasique D. En effet, la présence de cette enzyme dans les suspensions d'organites isolés entraîne, au cours du temps, au sein même des membranes, une libération d'acide phosphatidique [13] que l'on sait être le précurseur des principaux phospholipides complexes [14].

Aussi avons nous repris l'étude du problème de la localisation de cette enzyme, en nous attachant plus particulièrement au cas des plastes et des mitochondries.

### 2. Matériel et méthodes

Les mitochondries utilisées proviennent soit de choux-fleurs du commerce (*Brassica oleracea* L., C.V. *Botrytis*), soit de plantules de *Phaseolus aureus* L. cultivées à l'obscurité pendant 4 jours.

Les chloroplastes sont extraits soit de feuilles d'Epinard (*Spinacia oleracea* L.) provenant du commerce, soit de feuilles de plantules de Maïs (*Zea mays* L., hybride Wisconsin 355) cultivées sur milieu de Knop et soumises à un éclairement de 3000 lux pendant 14 hr par jour. Nous avons également étudié le cas d'étioplastes isolés de feuilles de plantules de Maïs maintenues à l'obscurité totale pendant 14 jours.

L'obtention de mitochondries physiologiquement actives a été réalisée par centrifugation différentielle selon une technique résumée par Bonner [15]. La séparation des mitochondries pures est effectuée par centrifugation sur un gradient continu de concentration de saccharose (0.4 à 1.6M) à 15000 rpm pendant 1 hr (Spinco rotor SW 25) [16].

Les chloroplastes et les étioplastes sont isolés et purifiés selon une technique décrite dans une note précédente [17]. Des parties aliquotes des diverses suspensions d'organites obtenues sont fixées pour le contrôle en microscopie électronique [18], utilisées pour le dosage des protéines [18], ou encore, employées pour vérifier leur intégrité physiologique [18,19].

L'activité phospholipasique D est mesurée en suivant l'apparition de l'acide phosphatidique à partir de la phosphatidylcholine du jaune d'oeuf dans le milieu réactionnel suivant: tampon acétate 0.1 M pH 5.6,  $\text{CaCl}_2$  60 mM, phosphatidylcholine émulsionnée 4 mM. Pour un volume final de 4 ml on ajoute 1 ml d'éther. A la fin de l'incubation, les phospholipides sont extraits selon la méthode de Folch et al. [20]. L'acide phosphatidique apparu est séparé rapidement de la phosphatidylcholine par chromatographie sur papier imprégné d'acétate de Baryum à l'aide de méthanol, puis dosé selon la méthode de Duce [21]. L'activité enzymatique est exprimée en nmoles d'acide phosphatidique libéré par mg de protéines et par heure.

### 3. Résultats

Le tableau 1 montre que, quelle que soit la nature du tissu végétal considéré, les suspensions de mitochondries obtenues par centrifugation différentielle (A) et physiologiquement actives [18] présentent toujours une intense activité phospholipasique D. Cependant, il est difficile de rattacher l'activité phospholipasique mesurée dans ces préparations à la présence d'une phospholipase mitochondriale car les résultats varient considérablement d'une extraction à l'autre. De plus, on constate que ces préparations renferment toujours une proportion non négligeable de vésicules diverses [17].

Tableau 1

Activité phospholipasique D des fractions mitochondrielles isolées de divers tissus végétaux.

Origine	A	Acide phosphatidique apparu (nmoles/mg protéines/h)		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Chou-fleur	A	2.680	1.120	4.720
	B	130	50	240
<i>Phaseolus aureus</i>	A	750	2.100	1.500
	B	35	120	85

A: mitochondries obtenues par centrifugation différentielle [15];

B: mitochondries purifiées par centrifugation sur gradient continu de concentration de saccharose [16].

En revanche, les mitochondries purifiées sur gradient de saccharose (B), qui conservent néanmoins un couplage étroit entre les réactions d'oxydation et de phosphorylation [16], ne possèdent pratiquement plus d'activité phospholipasique D. Les images électroniques montrent que les mitochondries purifiées sont assez homogènes. En particulier, la plupart des vésicules ont disparu.

Le tableau 2 montre également que les suspensions de chloroplastes obtenues par centrifugation différentielle à forte vitesse (20 min à 8000 g) (A') présentent une activité phospholipasique D importante. Ce résultat confirme les observations antérieures de Kates [2]. Cependant, les chloroplastes ainsi obtenus sont contaminés par d'autres fractions cellulaires. Dans ces conditions, il est difficile, là encore, d'affirmer que l'activité observée dans ces préparations est liée à la présence d'une phospholipase D plastidiale.

En revanche, les chloroplastes purifiés par passage sur un gradient discontinu de saccharose (B') sont dépourvus de toute activité phospholipasique D. Les images électroniques montrent que les chloroplastes purifiés ne présentent aucune contamination par d'autres structures membranaires [17].

Le comportement des étioplastes est analogue à celui des chloroplastes. Une fois purifiés par passage sur gradient discontinu de saccharose, ces organites ne présentent plus aucune activité phospholipasique D.

Tableau 2

Activité phospholipasique D de fractions chloroplastiques isolées de divers tissus végétaux.

Origine	A'	Acide phosphatidique apparu (nmoles/mg protéines/h)		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Maïs	A'	790	950	580
	B'	0	0	0
Epinard	A'	720	890	1250
	B'	0	0	0

A': chloroplastes obtenus par centrifugation différentielle [2];

B': chloroplastes purifiés par centrifugation sur gradient continu de concentration de saccharose [17].

#### 4. Discussion

L'absence d'activité phospholipasique D dans les mitochondries et les plastes isolés de divers tissus n'est probablement pas imputable à une perte massive de l'enzyme au cours du processus d'extraction et de purification des divers organites étudiés. En effet, l'examen des culots de plastes et de mitochondries au microscope électronique permet d'affirmer que presque tous les organites isolés ont conservé leur membrane limitante [17].

Nos observations posent sous un jour nouveau le problème de la localisation de la phospholipase D dans la cellule végétale. Des travaux préliminaires nous ont permis de constater qu'un faible pourcentage (2 à 5%) de l'activité phospholipasique D totale peut être retrouvée dans certaines structures membranaires. En revanche, la majorité de l'activité est présente dans la fraction soluble de la cellule. Il nous faut cependant encore préciser si elle est localisée dans le cytoplasme ou bien dans le système vacuolaire.

#### Remerciements

Nous remercions Jacques de Virville pour sa collaboration technique. Nous remercions également M. Faure (Institut Pasteur, Paris) qui nous a obligamment fourni la phosphatidylcholine.

#### Références

- [1] D.J. Hanahan and I.L. Chaikoff, *J. Biol. Chem.* 172 (1948) 191.
- [2] M. Kates, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32 (1954) 571.
- [3] R.H. Smith, *Biochem. J.* 56 (1954) 240.
- [4] H.L. Tookey and A.K. Balls, *J. Biol. Chem.* 218 (1956) 213.
- [5] F.M. Davidson and C. Long, *Biochem. J.* 69 (1958) 458.
- [6] E. Einset and W.L. Clark, *J. Biol. Chem.* 231 (1958) 703.
- [7] R. Douce, M. Faure and J. Marechal, *Compte Red. Acad. Sci. Paris* 262 (1966) 1549.
- [8] M. Faure and J. Troestler, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49 (1967) 279.
- [9] S.F. Yang, S. Freer and A.A. Benson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 477.
- [10] M. Heller, E. Aladjem and B. Shapiro, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 1395.
- [11] R.H. Quarles and R.M.C. Dawson, *Biochem. J.* 112 (1969) 787.
- [12] R. Douce, *Compte Red. Acad. Sci. Paris* 262 (1966) 475.
- [13] R. Douce and C. Lance, *Abstracts 5th FEBS Meeting (Prague, 1968)* 57.
- [14] R.M.C. Dawson, in: *Essays in Biochemistry*, Vol. 2, eds. P.N. Campbell and G.D. Greville (Academic Press, London, New York, 1966) p. 69.
- [15] W.D. Bonner, in: *Methods in Enzymology*, Vol. 10, eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Academic Press, New York, 1967) p. 126.
- [16] J.E. Baker, L.G. Elvin, J.B. Biale and S.I. Honda, *Plant Physiol.* 43 (1968) 2001.
- [17] J. Bahl, T. Guillot-Salomon and R. Douce, *Physiol. Vég.* 8 (1970) 55.
- [18] R. Douce, T. Guillot-Salomon, C. Lance and M. Signol, *Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét.* 14 (1968) 351.
- [19] R.G. Jensen and J.A. Bassham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1095.
- [20] J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497.
- [21] G. Ducet and I. Mencl, *Ann. Agronomiques 2 bis* (1957) 17.