

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DE L'ENVELOPPE DES CHLOROPLASTES D'EPINARD

B. PINEAU

Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse C.N.R.S. 91190 Gif-sur-Yvette

R. DOUCE

Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Laboratoire de Physiologie Végétale, Domaine universitaire, B.P.53, 38041 Grenoble

Received 17 July 1974

The polypeptide heterogeneity of the chloroplast envelope has been compared with those of other fractions of Spinach chloroplasts: thylakoids and stroma by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The envelope electrophoretic pattern shows many polypeptides whose mobility differ from those of the thylakoids. The possible identity of the small subunit of RuDPcarboxylase with a polypeptide of the chloroplast external membrane is discussed.

1. Introduction

La double membrane limitante ou enveloppe des chloroplastes présente des caractéristiques morphologiques, chimiques et des propriétés fonctionnelles qui la distinguent des membranes des thylakoïdes [1-5]. Elle est dépourvue de chlorophylle [1-4], possède une composition en caroténoïdes [1] et en lipides particulière [1,4] et présente une activité ATPasique qui est différente de celle du facteur de couplage associé aux thylakoïdes [1,5]. Ses propriétés ne sont cependant pas encore connues avec certitude. Pour préciser le nombre de fonctions enzymatiques spécifiquement associées à l'enveloppe, l'étude de son hétérogénéité en protéines a été effectuée comparativement à celle des autres fractions chloroplastiques.

2. Matériel et méthodes

Les chloroplastes sont extraits de feuilles d'épinards (*Spinacia oleracea L.*) selon la méthode de Walker [6]. La suspension de chloroplastes ainsi obtenues renferme une forte proportion de chloroplastes ayant conservé

leur enveloppe (type A et B de Hall) [7]. Elle est cependant contaminée par des chloroplastes cassés (type C) [7] des mitochondries et divers systèmes membranaires de nature inconnue. L'obtention de chloroplastes morphologiquement intacts, hautement purifiés est alors effectuée selon la méthode de Leech [8].

La préparation des diverses fractions chloroplastidales, notamment celle de l'enveloppe est réalisée selon une technique décrite précédemment [1].

Les protéines des divers systèmes membranaires (fractions 2 et 4 décrites dans 1) ainsi que celle du stroma sont solubilisées pendant une heure à température ambiante dans le sodium dodecylsulfate à 4% (Matheson, Coleman and Bell : M.C.B.) ou (British Drug Houses : B.D.H.). La dissolution est achevée par un traitement de 10 min à 60°C après addition d'un égal volume du milieu suivant: Tris-HCl 62 mM, pH = 6,8; β -mercaptoéthanol 0,2 M; Glycerol 20% (v/v).

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse suivant la méthode de Laemmli [9] dans des gels de SDS-polyacrylamide (Acrylamide: 10% et bis méthylène-acrylamide: 0,36%) (Eastman Kodak Co.). Le tampon d'électrophorèse dont le pH est ajusté à 8,4 a la composi-

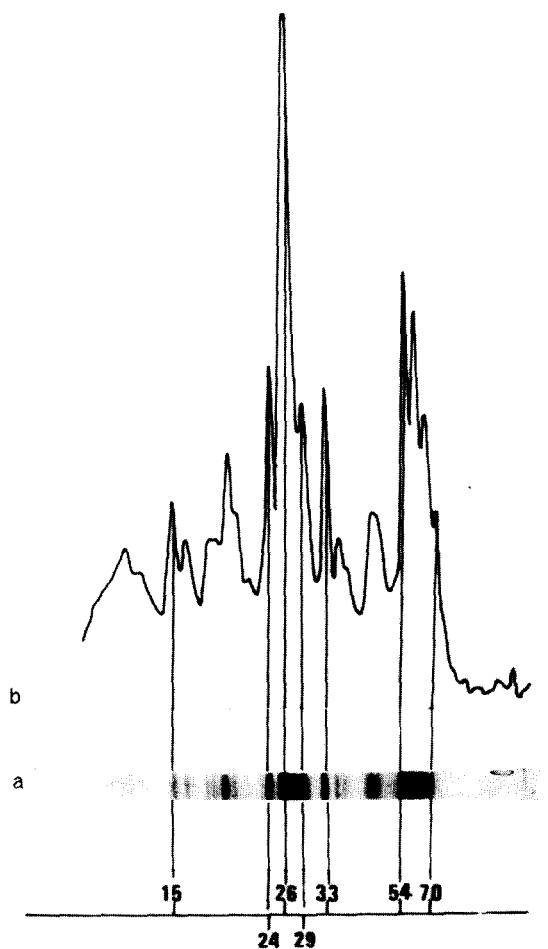


Fig. 1. Electrophorèse des polypeptides des thylacoïdes (SDS M.C.B.): a) gel chargé avec 90 µg de protéines; b) profil densitométrique correspondant obtenu au Chromoscan MK2 (Joyce Loebl). Les poids moléculaires (en kilodaltons) sont indiqués en correspondance des principales bandes colorées et des pics densitométriques au-dessous des gels.

tion suivante: Tris-HCl 25 mM; Glycine 190 mM; SDS 0,1%. L'électrophorèse est réalisée à ampérage constant soit 2 mA/gel pendant 4 hr à température ambiante. Les gels sont colorés par le bleu de Coomassie (Sigma). Les poids moléculaires des divers polypeptides sont déterminés par référence à des protéines de poids moléculaire connu [10]: albumine de sérum de bovins (68 000 daltons); albumine du jaune d'oeuf (43 000 daltons); α -chymotrypsinogène (25 000 daltons); cytochrome *c* (12 400 daltons).

Le dosage des protéines est effectué d'après la méthode de Lowry et al. [11].

3. Résultats et discussion

3.1. Séparation des polypeptides des thylacoïdes

Une vingtaine de composants polypeptidiques peuvent être séparés par électrophorèse (fig. 1). Leurs poids moléculaires s'échelonnent entre 12 000 et 70 000 daltons avec un composant majoritaire à 26 000 daltons. Les profils obtenus s'accordent bien avec ceux qui sont généralement rapportés, chez les végétaux supérieurs, par Rémy [12], Klein et Vernon [13], Levine et al. [14], Anderson et Levine [15], Eaglesham et Ellis [16] et Lagoutte et Duranton [17].

3.2. Séparation des polypeptides du stroma

Dans les profils électrophorétiques obtenus, très différents de ceux des thylacoïdes, 18 bandes sont clairement résolues (fig. 2) et parmi celles-ci, deux sont largement majoritaires. Elles représentent la grande sous unité (52 000 daltons) et la petite sous unité (14 000 daltons) de la ribulose diphosphate carboxylase [13,18-21].

3.3. Séparation des polypeptides de l'enveloppe

Une vingtaine de composants polypeptidiques sont séparés par électrophorèse (fig. 3). Le composant majoritaire est dissociable en 2 ou 3 bandes suivant les électrophorèses (29 000 et 33 000 daltons), une bande importante est située vers 14 000 daltons et une huitaine de bandes bien visibles entre 40 000 et plus de 200 000 daltons. Les autres bandes moins marquées représentent des espèces mineures. Certaines différences dans les poids moléculaires apparents de ces polypeptides peuvent se produire en fonction de l'origine du SDS utilisé [22] sans modification importante du profil général.

Les profils obtenus sont donc très différents de ceux qui sont associés aux thylacoïdes. Or, on sait que toutes les activités enzymatiques associées au fonctionnement des deux photosystèmes ne sont pas représentées dans l'enveloppe des chloroplastes [1]. Le polypeptide majeur (26 000 daltons) constitutif des thylacoïdes et qui serait associé à l'activité du photosystème II, à l'existence d'accolements lamellaires et à la présence

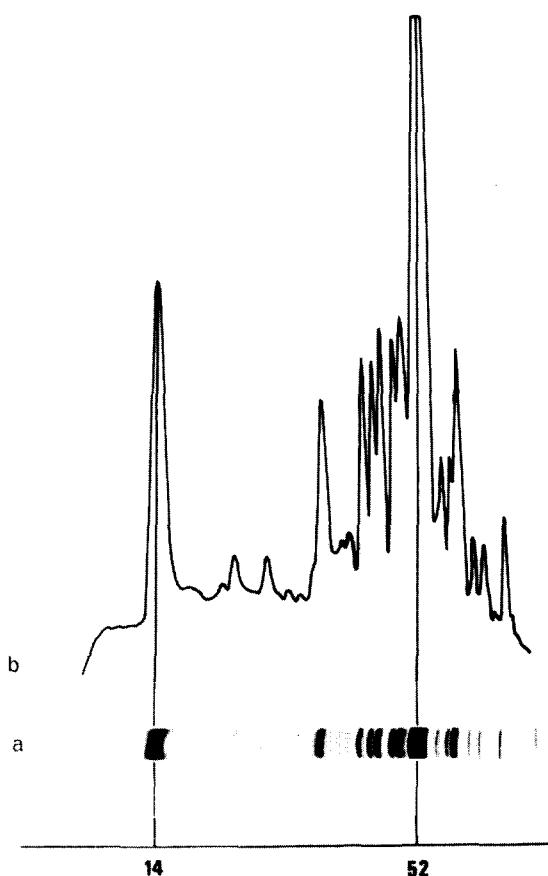


Fig. 2. Electrophorèse des protéines du stroma (SDS M.C.B.):
a) gel chargé avec 55 µg de protéines; b) profil densitométrique correspondant.

de chlorophylle *b* [12-14,23,24] n'est pas sensiblement représenté dans l'enveloppe. Il en est de même pour les quatre polypeptides des thylacoïdes dont les poids moléculaires sont compris entre 50 000 et 70 000 daltons et qui seraient liés à l'activité du photosystème I, à la présence de chlorophylle *a* [12-14] et peut-être aux deux plus grandes sous-unités du facteur de couplage [25,26]. Néanmoins, certains polypeptides présentent, dans les deux cas, des mobilités très voisines, notamment ceux qui se localisent à 29 000 et 33 000 daltons.

Les profils électrophorétiques associés à l'enveloppe (fig. 3) et au stroma (fig. 2) sont également très différents. Mais un des polypeptides importants de l'enveloppe (14 000 daltons) présente une mobilité

identique à celle d'un des polypeptides majeurs du stroma, la petite sous-unité de la Ribulose disphosphate carboxylase. Or, tout au moins chez les végétaux supérieurs, il semble que la grande sous-unité de cette enzyme soit synthétisée dans les chloroplastes [27,28] et sous la dépendance du génome du chloroplaste [29], alors que la petite sous-unité est synthétisée dans le cytoplasme et sous la dépendance du génome moléculaire [30]. De plus, récemment, il a été précisé que cette dernière est synthétisée sur des ribosomes cytoplasmiques (80 S) liés à des membranes [18] et que son assemblage avec la grande sous-unité se ferait avant qu'elle ne se détache des ribosomes. C'est pourquoi si le polypeptide de 14 000 daltons représentait effectivement la petite sous-unité de la RuDPcarboxylase on pourrait alors penser que sa synthèse s'effectue sur des ribosomes de type cytoplasmique liés à l'enveloppe. L'enveloppe purifiée renferme environ 50 µg d'ARN/mg de protéines. (Douce: résultats

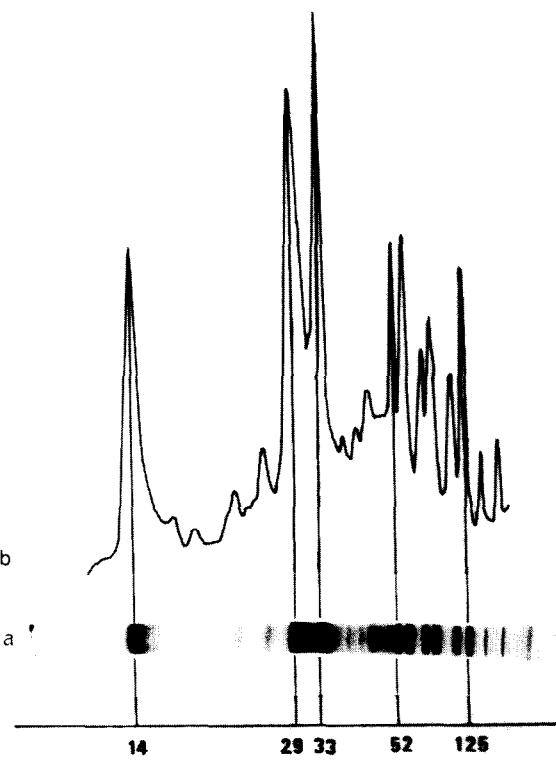


Fig. 3. Electrophorèse des polypeptides de l'enveloppe (SDS M.C.B.): a) gel chargé avec 90 µg de protéines; b) profil densitométrique correspondant.

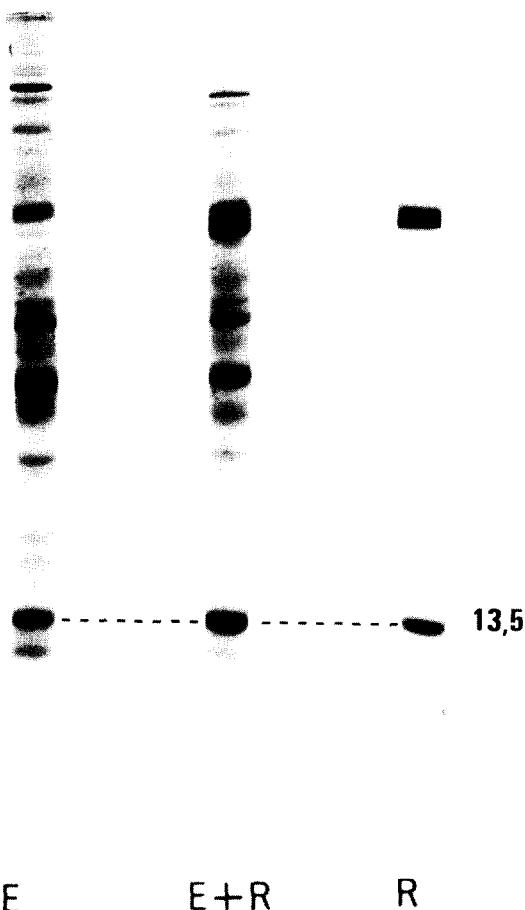


Fig. 4. Séparation électrophorétique de: a) 100 µg de protéines d'enveloppe (E); b) 30 µg de RudPcarboxylase + 25 g de protéines d'enveloppe (E + R); c) 40 µg de RudPcarboxylase (R) (SDS B.D.H.).

non publiés). Afin de vérifier l'identité de migration entre la petite sous-unité de la RudPcarboxylase et le polypeptide de l'enveloppe, les protéines de l'enveloppe et l'enzyme ont été soumis à une coélectrophorèse. Dans nos conditions d'étude, la bande importante de faible poids moléculaire de l'enveloppe est résolue en deux bandes d'importance inégale: l'une majoritaire à 13 500 daltons, et l'autre minoritaire à 12 500 daltons. (fig. 4). Ce polypeptide de 13 500 daltons est indiscernable de la petite sous-unité de la RudPcarboxylase. Une identification chimique plus précise est cependant nécessaire

pour affirmer que la petite sous-unité de l'enzyme se retrouve dans la fraction purifiée d'enveloppe.

La grande hétérogénéité en polypeptides de l'enveloppe permet de penser que celle-ci est le siège de nombreuses activités enzymatiques. Cette hétérogénéité témoigne par ailleurs des fonctions diverses attribuées à ce double système membranaire. Il maintient, d'abord, en étroit contact avec les thylacoïdes les enzymes impliquées dans la fixation du CO₂. Il contrôle le mouvement de très nombreuses molécules entre le cytoplasme et la phase mobile du chloroplaste, en particulier celui des sucres phosphorylés en c₃ [31-38]. Enfin, une fonction importante qui pourrait être attribuée à l'enveloppe est sa participation dans la biogénése des thylacoïdes. Ce rôle est attesté par le fait qu'au cours du développement des chloroplastes, la membrane interne de l'enveloppe présente de nombreuses figures d'invaginations [39]. De plus, il a été montré, récemment, qu'elle était le siège d'une synthèse intense de galactolipides [40]. Il est difficile, cependant de soutenir qu'il existerait une filiation tout à fait directe entre l'enveloppe et les thylacoïdes fonctionnels, les profils électrophorétiques des protéines des deux systèmes membranaires étant très dissemblables.

Remerciements

Nous remercions vivement le professeur Andrew A. Benson pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail dès son origine et ses nombreux conseils précieux. Nous sommes également reconnaissants envers Madame le Professeur M. Lefort-Tran de nous avoir fourni de fructueux avis. Nous remercions beaucoup C. Maillefer pour sa collaboration technique. Ce travail a été réalisé à l'aide des subventions du CNRS dont une partie attribuée sous la forme de la R.C.P. n° 282.

Bibliographie

- [1] Douce, R., Holtz, R. B. and Benson, A. A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7215-7222.
- [2] Mackender, L. R. O. and Leech, R. M. in: *Proceedings of the 2nd International Congress of Photosynthesis Research* (1972) (Forti, G., Avron, M. and Melandri, A., eds.) Vol. 2 p 1431, Dr W. Juk, N. V. Publishers, The Hague.
- [3] Mackender, L. R. O. and Leech, R. M. (1974) *Plant Physiol.* 53, 496-502.

- [4] Poincrot, R. P. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 134–142.
- [5] Sabin, D. D., Gordon, M. and Galston, A. W. (1970) *Plant Physiol.* 45, 25–82.
- [6] Walker, D. A. (1971) *Methods in Enzymology* 23, 211–220. San Pietro, Academic Press, New York.
- [7] Hall, D. O. (1972) *Nature New Biology* 235, 125–126.
- [8] Leech, R. M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 79, 637–639.
- [9] Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [10] Weber, K. and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
- [11] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, N. J. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- [12] Rémy, R. (1971) *FEBS Letters* 13, 313–317.
- [13] Klein, S. M. and Vernon, L. P. (1974) *Photochem. and Photobiol.* 19, 43–49.
- [14] Levine, R. P., Burton, W. G. and Duram, H. A. (1972) *Nature New Biology* 237, 176–177.
- [15] Anderson, J. M. and Levine, R. P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 378–387.
- [16] Eaglesham, A. R. J. and Ellis, R. J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 335, 396–407.
- [17] Lagoutte, B. and Duranton, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 253, 232–239.
- [18] Gooding, L. R., Roy, H. and Jagendorf, A. T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 324–335.
- [19] Rutner, A. C. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 923–929.
- [20] Kawashima, N. and Wildman, S. G. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1463–1468.
- [21] Hoober, J. K. (1972) *J. cell. Biol.* 52, 84–96.
- [22] Swaney, J. B., Van de Woude, G. F. and Bachrach, H. L. (1974) *Analytical Biochem.* 58, 337–346.
- [23] Rémy, R. (1973) *FEBS Letters* 31, 308–312.
- [24] Jenning, R. C. and Eytan, G. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 813–820.
- [25] McEvoy, F. A. and Lynn, W. S. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 335–341.
- [26] Nelson, N., Deters, D. W., Nelson, H. and Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2049–2055.
- [27] Blair, G. E. and Ellis, R. J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 319, 223–234.
- [28] Criddle, R. S., Dau, B., Kleinkopf, G. E. and Huffaker, R. C. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 621–627.
- [29] Pak-Hoo Chan and Wildman, S. G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 277, 677–680.
- [30] Kawashima, N. and Wildman, S. G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 262, 42–49.
- [31] Bassham, J. A. (1971) *Science* 172, 526–534.
- [32] Heldt, H. W. and Rapley, L. (1970) *FEBS Letters* 10, 143–148.
- [33] Bassham, J. A., Kirk, M. and Jensen, R. G. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 211–218.
- [34] Heber, U. and Krause, G. H. (1971) in: *Photosynthesis and Photorespiration* (Hatch, M. D., Osmond, C. B. and Slattery, R. O., eds.) p. 218, Wiley-Interscience, New York.
- [35] Schwenn, J. D., Lilley, R. Mc. C. and Walker, D. A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325, 586–595.
- [36] Walker, D. A. and Crofts, A. R. (1970) *Annual Rev. Biochem.* 39, 389–428.
- [37] Kelly, G. J. and Gibbs, M. (1973) *Plant Physiol.* 52, 674–676.
- [38] Pfluger, R. (1973) *Z. Naturforsch.* 28c, 11/12, 779.
- [39] Kirk, J. T. O. and Tilnet-Basset, R. A. E. (1967) in: *The Plastids*, p. 477–524, W. F. Freeman and Company, London and San Francisco.
- [40] Douce, R. (1974) *Science* 183, 852–853.