

1420

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL
LABORATOIRE DE
PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

FACULTE DES SCIENCES
PROFESSEUR
PAUL-ANDRÉ SIEGENTHALER

**Mise en évidence d'activités diacylglycérol- et
phosphatidylinositol-kinasiques dans les
membranes de l'enveloppe du chloroplaste
d'Épinard**

**Implication d'une nucléoside diphosphate kinase
(NDPKII) dans la régulation d'une activité MGDG-
kinasique dépendante du CTP**

THESE PRESENTÉE A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES OPTION
PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE ET BIOCHIMIE

PAR MARC-OLIVIER MULLER

1998

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Mise en évidence d'activités diacylglycérol- et phosphatidylinositol-kinasiques dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard. Implication d'une nucléoside diphosphate kinase (NDPKII) dans la régulation d'une activité MGDG-kinasique dépendante du CTP

de M. Marc-Olivier Müller

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

P.-A. Siegenthaler (directeur de thèse), J.-M. Neuhaus, L. Bovet, A. Trémolières (Paris) et A. Boschetti (Beme)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 12 août 1998

Le doyen:



F. Stoeckli

**Mise en évidence d'activités diacylglycérol- et
phosphatidylinositol-kinasiques dans les
membranes de l'enveloppe du chloroplaste
d'Epinard**

**Implication d'une nucléoside diphosphate kinase
(NDPKII) dans la régulation d'une activité MGDG-
kinasique dépendante du CTP**

[...] So, whenever you eat a plant, you are tasting sunlight! And whenever you exhale, you are helping a plant to stay alive!

John C. Brown, 1995; Kansas University, Department of Microbiology. In what the heck is a chloroplast?

A Mélanie et Samuel

REMERCIEMENTS

Au terme de cette recherche sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard, je tiens à remercier très sincèrement le Professeur Paul-André Siegenthaler, ancien directeur du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel et actuellement Professeur honoraire de l'Université de Neuchâtel, pour m'avoir convié à faire partie de son équipe, ainsi que m'avoir suivi parfaitement tout au long du présent travail, tout en me laissant librement explorer, dans un climat de confiance mutuelle, le sujet de thèse passionnant qu'il m'avait confié. Je le remercie pour cette collaboration fructueuse et me permets, ici, de lui souhaiter une retraite riche en émotions et en voyages.

Je tiens également à remercier le Dr Lucien Bovet (dit Lulu), actuel chef de travaux du Laboratoire de Physiologie Végétale, qui a toujours pris le temps de regarder et apprécier mes résultats et dont les conseils scientifiques ont, sans aucun doute, contribué à l'élaboration de cette thèse. Je remercie également ce jazzman averti pour m'avoir un tant soit peu initié au plaisir de la "vraie" musique (ainsi je ne mourrai donc pas ignorant, merci Lucien).

Un grand merci également au Dr André Rawyler, ancien chef de travaux du Laboratoire de Physiologie Végétale, qui est à l'origine de ce travail ce que le Big-Bang fut à l'origine de l'univers. Merci pour toutes les discussions scientifiques et philosophiques que nous avons eues. Merci aussi à Laurence Ruffieux dont le travail de Licence aura constitué les prémisses de ce présent Mémoire.

Merci également au Dr Yinong Xu, ancien doctorant du Laboratoire de Physiologie Végétale, dont les nombreux conseils techniques m'ont permis d'avancer à grands pas.

Il va sans dire, que je remercie également le Professeur Enrico Martinoia du Laboratoire de Physiologie Végétale qui a non seulement accepté que je garde mon poste d'assistant durant cette dernière année de thèse, mais qui a également porté beaucoup d'attention à mon travail.

Je remercie Messieurs les Professeurs Antoine Trémolières de l'Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris sud, Centre d'Orsay, France; Arminio Boschetti du Département de Chimie et Biochimie de l'université de Berne; Jean-Marc Neuhaus du Laboratoire de biochimie de l'université de Neuchâtel et le Dr Lucien Bovet du Laboratoire de Physiologie Végétale et du BES de l'université de Berne pour avoir accepté d'examiner ce Mémoire et de faire partie du jury de thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également aux deux apprenties laborantines, qui grâce à leurs excellentes capacités pratiques, m'ont aidé durant deux années consécutives à réaliser la partie pratique de cette thèse. Merci également, Valérie Maire et Nathalie Simon-Vermot, pour votre bonne humeur quotidienne.

Merci également à toutes la gente féminine du Laboratoire de Physiologie Végétale, c'est-à-dire Christiane Bettinelli, notre souriante secrétaire, Marlyse Meylan, Jana Smutny et Jarmila Valino nos énergiques et très efficaces laborantines ainsi que les doctorantes Sylvie Duchêne et Bénédicte l'Eplattenier qui m'ont toujours soutenu par leur amitié et leur promptitude à m'aider.

Je remercie également toutes les personnes qui ont spontanément répondu à mes requêtes: soit les Professeurs J.B. Wissing (Braunschweig, Germany) pour les extraits de DGK et PAK de membranes plasmiques, C. Larsson et Dr M. Gustavsson (Lund, Sweden) pour les préparations de membranes plasmiques d'Epinard, R.M. Bell (Duke University, North Carolina, USA) pour les anticorps anti-DGK d'*E. coli*, Dr M.P. Wymann (Fribourg, Switzerland) pour les anticorps anti-vps 34 de *C. elegans* et le Dr T. Chuard du laboratoire de Chimie organique de l'université de Neuchâtel pour les excellents conseils qu'il m'a donné.

Je suis également très reconnaissant au Fond National Suisse de la Recherche Scientifique d'avoir financé pendant deux années ma recherche (FNSRS, requêtes N° 3100.33.693.92 et 31.432.97.95 obtenues par le Professeur Paul-André Siegenthaler et le Dr Lucien Bovet).

Je remercie tout particulièrement ma femme Mélanie d'avoir su partager mes états d'âme pendant les trois dernières années de cette thèse. Je la remercie également d'avoir bien voulu lire cette thèse et ainsi palier à mon orthographe parfois défaillante. Merci aussi à Samuel notre fils, qui est venu raviver par sa présence les idées de son papa tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci aussi à ma famille qui m'a toujours encouragé pour réaliser cette entreprise.

Enfin, merci à tous mes amis qui m'ont donné l'énergie (ou permis de dépenser mon surplus d'énergie, je pense notamment à mon équipe de volleyball) nécessaire, souvent sans le savoir, à réaliser ce Mémoire.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	9
Table des matières	13
Résumé	17
CHAPITRE 1	
1. Introduction générale	21
1.1. La composition de la cellule	21
1.2. Le chloroplaste	22
1.3. La structure du chloroplaste	22
1.4. La physiologie du chloroplaste	23
1.4.1. Le stroma	24
1.4.2. Les membranes thylacoïdales	25
1.4.3. L'enveloppe du chloroplaste, structure et fonction	26
1.4.3.1. La structure physique et la composition biochimique de l'enveloppe	26
1.4.3.2. Les rôles de l'enveloppe	29
1.4.3.2.1. Les translocateurs de l'enveloppe	30
1.4.3.2.2. Activités biosynthétiques liées aux membranes de l'enveloppe	31
1.5. "Phospholipid signaling"	33
1.5.1. Phospholipides	33
1.5.2. Phosphoinositides et "système PI"	35
1.5.3. "Phospholipid signaling" chez les plantes	38
1.5.4. Activités lipide-kinasiques chez les plantes	39
1.6. But de la recherche	42
CHAPITRE 2	
2. Matériel et méthodes	43
2.1. Matériel	43
2.2. Méthodes	43
2.2.1. Préparations de membranes d'enveloppes et de stroma	43
2.2.2. Préparation de fractions enrichies en membranes internes et externes d'enveloppes	44
2.2.3. Préparation de chloroplastes intacts et de membranes thylacoïdales possédant un degré de pureté élevé	45
2.2.3.1. Préparation de chloroplastes intacts	45
2.2.3.2. Préparation des membranes thylacoïdales	46
2.2.4. Dosage de la teneur en chlorophylles	46
2.2.5. Dosage des protéines	47
2.2.5.1. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	47
2.2.5.2. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry	47
2.2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	48

2.2.7.	Préparation de chloroplastes et d'enveloppes de chloroplastes préalablement traités à la thermolysine	48
2.2.8.	Préparation enzymatique de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en présence de NDPKII recombinante d'Épinard.	49
2.2.9.	Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités lipide-kinasiques dans des fractions membranaires	50
2.2.10.	Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités lipide-kinasiques dans un extrait protéique de stroma	50
2.2.11.	Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités protéine-kinasiques dans des fractions membranaires	51
2.2.12.	Extraction des lipides membranaires	51
2.2.13.	Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) des lipides membranaires	52
2.2.13.1.	CCM en milieu acide	52
2.2.13.2.	CCM en milieu basique	52
2.2.13.3.	CCM utilisée pour la séparation des phosphoinositides phosphorylés sur le groupement inositol en position D-3 des phosphoinositides phosphorylés sur le groupement inositol en position D-4	53
2.2.14.	Détermination par déacylation des lipides phosphorylés, et analyse des groupements résiduels (glycérodérivés)	53
2.2.15.	Quantification de monogalactosyldiacylglycérol par chromatographie en phase gazeuse (GC)	54
2.2.16.	Mesure de l'activité enzymatique de la 1,3- β -glucane synthétase	55
2.2.17.	Hydrolyse des lipides X et Y à l'aide d'une β -1,4-galactosidase	55
2.2.18.	Rupture des liaisons éthers des lipides X et Y par hydrolyse acide	56
2.2.19.	CCM d'hexoses et d'hexoses phosphatés	56
2.2.20.	Préparation enzymatique de glucose-6- ^{32}P et de galactose-6- ^{32}P	57

CHAPITRE 3

3.	Etude de la phosphorylation <i>in vitro</i> des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard: Identification et localisation des principaux lipides phosphorylés	59
3.1.	Introduction	59
3.2.	But du chapitre	60
3.3.	Résultats	60
3.4.	Conclusions	67

CHAPITRE 4

4.	Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard: Effet de divers facteurs chimiques et physiques	69
4.1.	Introduction	69
4.2.	But du chapitre	69
4.3.	Résultats	70
4.4.	Discussion	88

CHAPITRE 5

5.	X et Y, deux lipides phosphorylés d'identité inconnue de la membrane de l'enveloppe: Localisation, identification du substrat et dépendance vis-à-vis de la NDPKII de l'activité enzymatique catalysant l'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans ces deux lipides	95
5.1.	Introduction	95
5.2.	But du chapitre	97
5.3.	Résultats	97
5.4.	Discussion	114

CHAPITRE 6

6.	Phosphorylation <i>in organello</i> des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard	121
6.1.	Introduction	121
6.2.	But du chapitre	122
6.3.	Résultats	122
6.4.	Discussion	131

CHAPITRE 7

7.	Discussion générale et projets futurs	137
7.1.	Quelques réflexions générales sur l'ensemble des résultats consignés dans ce présent manuscrit	137
7.2.	Projets futurs	138
	Abréviations	141
	Bibliographie	145

RESUME

Etude de la phosphorylation *in vitro* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard: Identification et localisation des principaux lipides phosphorylés (CHAPITRE 3)

Plusieurs lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard incorporent *in vitro* du ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. L'identité des quatre lipides phosphorylés majeurs a été déterminée par déacylation et analyse par chromatographie en couches minces des composés glycéro-têtes polaires qui en résultent. Il s'agit des lipides PA, LPA, PIP et LPIP. La présence de ces lipides suggère également l'existence d'activités lipide-kinasiques (activités DG- et PI-kinasiques) dans les membranes d'enveloppes. Celles-ci ne sont pas réparties de manière uniforme dans les deux membranes de l'enveloppe. L'activité PI-kinasique est localisée principalement dans la membrane externe de l'enveloppe, alors que l'activité DG-kinasique se retrouve plutôt dans la membrane interne de l'enveloppe. L'hypothèse d'une éventuelle contamination des membranes d'enveloppes par des membranes plasmiques a été écartée par trois tests comparatifs. Les lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe sont donc bien le reflet d'activités lipide-kinasiques endogènes. Le PIP trouvé dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste s'avère être composé de deux isoformes (D-3 et D-4). Cette observation suggère la présence de deux activités PI-kinasique; c'est-à-dire d'une activité PI-4-kinasique et d'une activité PI-3-kinasique.

Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard: Effet de divers facteurs chimiques et physiques (CHAPITRE 4)

Les résultats consignés dans ce chapitre révèlent que la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste varie beaucoup en fonction de la composition du milieu d'incubation (pH, température, concentration en Mg^{2+} et Ca^{2+} , ATP, GTP, CTP et ADP). Ces résultats nous permettent également de mettre en évidence dans les membranes d'enveloppes la présence de deux nouveaux lipides inconnus que nous avons nommés X et Y. Ces deux lipides

incorporent du ^{32}P de façon majeure en présence de concentrations faibles en ATP. Ils portent le nombre total des lipides phosphorylés des membranes de l'enveloppe à six (PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y). Des expériences ayant pour but de chasser le ^{32}P des lipides marqués radioactivement, à l'aide d'une concentration élevée d'ATP non-radioactif, nous montrent que seuls certains lipides phosphorylés (LPA, LPIP et X) des membranes d'enveloppes sont sujets à une déphosphorylation. L'inhibition de l'activité PI-kinasique de la membrane de l'enveloppe en présence d'un inhibiteur de PI-3-kinase, la wortmannin, confirme la présence d'une activité PI-3-kinasique dans l'enveloppe du chloroplaste.

X et Y, deux lipides phosphorylés d'identité inconnue de la membrane de l'enveloppe: Localisation, identification du substrat et dépendance vis-à-vis de la NDPKII de l'activité enzymatique catalysant l'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans ces deux lipides (CHAPITRE 5)

Les résultats décrits dans ce chapitre concernent principalement l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Contrairement au lipide Y qui est principalement localisé dans la membrane externe, le lipide X est réparti plus ou moins uniformément dans les deux membranes de l'enveloppe. L'absence des lipides X et Y dans les membranes plasmiques suggère que ces deux lipides sont caractéristiques des membranes de l'enveloppe du chloroplaste. L'incorporation de ^{32}P dans ces deux lipides est stimulée par l'ajout d'une fraction de stroma dialysé. L'enzyme responsable de cette activation est la nucléoside diphosphate kinase du chloroplaste d'Epinard (NDPKII). Les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas d'écarter définitivement la possibilité d'un transfert de phosphate de la NDPKII vers les précurseurs des lipides X et Y. Cependant, il est clair que la NDPKII active de manière au moins indirecte l'incorporation de ^{32}P dans ces deux lipides en catalysant la formation de CTP à partir d'ATP et CDP. Ce résultat indique que le substrat nucléotidique préférentiel de la lipide kinase catalysant l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y s'avère être le CTP. L'analyse des produits de X et Y après hydrolyse acide, ainsi que la stimulation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y en présence de MGDG, signalent que ces deux lipides sont probablement des dérivés de galactolipides et plus précisément, pour le lipide X, du $\text{MG}^{\text{D}}\text{DG}$ (MGDG phosphorylé sur le groupement galactose). L'effet stimulateur,

sur les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe, d'un activateur de protéines G (le mastoparan), suggère que ces protéines sont impliquées dans la régulation des activités lipide-kinasiques de l'enveloppe. Nous concluons en stipulant que l'effet activateur du mastoparan ainsi que l'implication de la NDPKII, sur/dans les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe, permettent d'envisager une éventuelle implication des lipides issus de ces activités lipide-kinasiques dans des processus de transmission de signaux.

Phosphorylation *in organello* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard (CHAPITRE 6)

Au terme de ce chapitre nous pouvons confirmer que les activités lipide-kinasiques, mesurées *in vitro* dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste (chapitre 3, 4 et 5), sont également détectables *in organello* suite à une incubation de chloroplastes en présence de $^{32}\text{P}_i$ et de lumière. Ces activités utilisent pour la plupart (DG-kinase et MGDG-kinase) l'ATP produit par photophosphorylation tandis que d'autres (PI-kinase, LPI-kinase), se situant sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe, utilisent préférentiellement l'ATP exogène. Ce phénomène est probablement lié au transport d'ATP via le translocateur d'ATP/ADP de la membrane de l'enveloppe. En effet, la sortie de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, formé par photophosphorylation dans le chloroplaste, est faible, voire nulle étant donné que le milieu d'incubation ne contient pas d'ADP. Les activités lipide-kinasiques semblent être régulées par des mécanismes impliquant l'action de protéines de type G. Cette dernière observation tend à démontrer l'implication des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste dans des processus de transmission de signaux.

CHAPITRE 1

1. Introduction générale

Dans ce chapitre, nous présenterons les aspects essentiels de la structure, de la composition biochimique et de la physiologie du chloroplaste. Nous porterons notre attention plus particulièrement sur l'enveloppe du chloroplaste, étant donné qu'elle constitue la structure cellulaire étudiée dans ce travail de thèse. Nous parlerons également des activités lipidiques chez les végétaux, ainsi que des phospholipides impliqués dans des signaux de transmission; étant donné que leur présence dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste constitue le sujet d'étude de cette thèse.

1.1. La composition de la cellule végétale

La composition d'une cellule végétale est fondamentalement très similaire à celle d'une cellule animale. Comme la cellule animale, elle s'entoure d'une membrane plasmique qui délimite le cytoplasme dans lequel on trouve le noyau, les ribosomes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les peroxysomes, des microfilaments et des microtubules. Cependant, contrairement à la cellule animale, la cellule végétale renferme des organites appelés plastes. Parmi ceux-ci, le chloroplaste est un plaste important: il accomplit la photosynthèse, c'est-à-dire qu'il convertit l'énergie solaire en énergie chimique, et l'emmagasine sous forme de glucides et d'autres molécules organiques. La plupart des cellules végétales, et particulièrement les cellules matures, contiennent une grande vacuole dont la membrane se nomme le tonoplaste. Cet organite volumineux renferme des substances chimiques, décompose des macromolécules et, en grossissant, joue un rôle important dans la croissance de la plante. Finalement, la membrane plasmique des cellules végétales s'entoure d'une épaisse paroi cellulaire qui soutient la structure de la cellule et confère une certaine rigidité aux tissus végétaux.

1.2. Le chloroplaste

Le chloroplaste est un membre spécialisé d'une famille d'organites végétaux appelés plastides. Ces derniers naissent des protoplastes présents dans les cellules méristématiques. Au cours de la croissance, le sort des protoplastes dépend de la situation des cellules et du milieu dans lequel ces dernières vivent. Ainsi, de génération en génération, ces organites primaires vont donner des plastides matures capables d'assurer le maintien d'activités métaboliques diverses. Parmi ces plastides on trouve: les amyloplastides (que l'on observe principalement dans les racines, les cotylédons et les tubercules; ils sont incolores et renferment de l'amidon), les chromoplastes (ils élaborent des pigments qui donnent aux fruits et aux fleurs leurs teintes orangées et jaunes), les étioplastes (uniquement présents dans les feuilles des plantes supérieures croissant en pleine obscurité; ils sont capables de se transformer en chloroplastes après illumination) et les chloroplastes. Ces derniers plastides se trouvent principalement dans les feuilles et les autres organes verts des Végétaux, ainsi que chez les Algues. Ils contiennent un pigment vert appelé chlorophylle ainsi que d'autres pigments, des enzymes, de l'ADN, de l'ARN, des ribosomes et d'autres molécules nécessaires à la photosynthèse; de ce fait, les chloroplastes ont une certaine autonomie comme les mitochondries: ils peuvent synthétiser des protéines, réduire le dioxyde de carbone pour permettre son assimilation en hydrates de carbone, acides aminés, acides gras et autres terpénoïdes. Ils sont également le siège de la réduction des nitrites et des sulfates, et rendent possible leur incorporation dans les acides aminés. En bref, ils sont fondamentaux pour assurer le métabolisme cellulaire et permettre le bon développement de la plante entière.

1.3. La structure du chloroplaste

Le chloroplaste est un organite biconvexe de 5 à 10 μm . De part ses similitudes avec les prochlorons, il dériverait d'ancêtres procaryotiques [théorie endosymbiotique (Gray et Doolittle, 1982)]. Le chloroplaste dispose d'une structure complexe composée de six compartiments (*i.e.* la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne, le stroma, les membranes thylacoïdales et le lumen thylacoïdal ou espace intrathylacoïdien; Fig.1.1).

Le chloroplaste

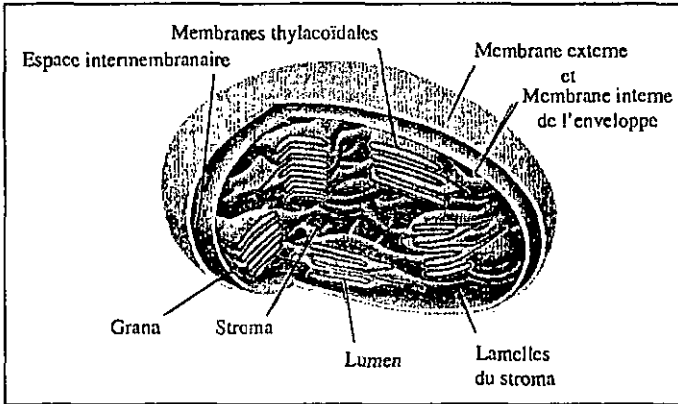


Fig.1.1. Représentation schématique du chloroplaste

Le chloroplaste est entouré par une double membrane appelée enveloppe. Les membranes externe et interne de cette enveloppe délimitent l'espace intermembranaire et fusionnent par endroits, formant ainsi des sites de contact (Cremers et al., 1988; Cline et al., 1985). L'enveloppe sépare le stroma et les thylacoïdes du reste de la cellule, conférant ainsi une intégrité structurale et fonctionnelle au chloroplaste. Les membranes thylacoïdales, qui délimitent l'espace intrathylacoïdien (lumen), sont arrangées en régions accolées (grana) et non-accolées (lamelles du stroma) (Staehlin, 1986).

1.4. La physiologie du chloroplaste

L'analyse bidimensionnelle sur gel d'électrophorèse de protéines chloroplastiques met en évidence la présence de plus de 250 spots. Environ 30 à 40% de ces protéines sont codées par le génome chloroplastique et synthétisées dans le stroma, alors que les 60% restant

sont importées dans le chloroplaste à partir du cytoplasme (Dietz et Bogorad, 1987). Ces protéines importées sont synthétisées sous la forme de précurseurs de taille plus élevée (préprotéines) que celle des protéines matures correspondantes. Les acides aminés supplémentaires, localisés aux extensions N-terminales des préprotéines, constituent un peptide de transit qui permet l'ancrage de la préprotéine à la surface du chloroplaste (Archer et Keegstra, 1990; van't Hof et al., 1993). Le passage de la protéine précurseur à travers l'enveloppe nécessite de l'énergie sous forme d'ATP; de plus, l'oligomérisation des préprotéines dans l'organite dépend de la présence de facteurs solubles internes (Flügge, 1990; Ellis et van der Vies, 1991).

Actuellement, pas moins de dix séquences nucléotidiques complètes codant pour autant de génomes chloroplastiques différents ont été déterminées: *Marchantia Polymorpha* (Ohyama et al., 1986), le tabac (Shinozaki et al., 1986), le riz (Hiratsuki et al., 1989), l'Euglène (Hallick et al., 1993), *Epiphagus virginiana* (Wolfe et al., 1992), *Cyanophora paradoxa* (Stirewalt et al., 1995), *Porphyra purpurea* (Reith et al., 1995), *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al., 1994), le maïs (Maier et al., 1995) et *Chlorella vulgaris* (Wakasugi et al., 1997). On dénombre 150 gènes structurels dans le génome chloroplastique du tabac. Ils codent pour 90 différentes protéines, dont 50 ont pu être assignées à des protéines chloroplastiques connues. De plus en plus de gènes nucléaires codant pour des protéines chloroplastiques sont isolés et séquencés, mais ils ne représentent encore qu'une infime partie du nombre de protéines d'origine extraplastidiale effectivement présentes dans le chloroplaste (Douwe de Boer et Weisbeck, 1991).

1.4.1. Le stroma

Le stroma est un milieu liquide contenant des protéines (~140 bandes après électrophorèse bidimensionnelle; Ellis R.J., 1981) qui prennent part aux nombreuses voies biosynthétiques du chloroplaste (Danks et al., 1983) et assurent les mécanismes de réplication, transcription et traduction de l'ADN chloroplastique. La fonction essentielle assurée par le stroma est la réduction du dioxyde de carbone (cycle de Calvin-Benson). Cette activité enzymatique fait partie des réactions obscures de la photosynthèse. L'enzyme clé de ce processus de fixation est la ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (RubisCO). Cet hétéroenzyme consiste (chez les plantes supérieures) en un multimère (L_4S_8) de deux sous-

unités respectives de 54 kDa (grande sous-unité; LS) et de 14 kDa (petite sous-unité; SS). La grande sous-unité de La RubisCO porte le site catalytique et est synthétisée dans le chloroplaste, alors que la petite sous-unité est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur (Roy et al., 1988).

1.4.2. Les membranes thylacoïdales

Les membranes thylacoïdales, sites des réactions claires ou photochimiques de la photosynthèse, assurent les mécanismes de transfert d'électrons provenant de la photolyse de l'eau ainsi que la photophosphorylation par le biais de la photosynthèse (Hiller et Goodchild, 1981; Staehlin, 1986). Dans les membranes thylacoïdales sont localisés quatre grands complexes protéiques distribués entre les régions granaires et agranaires des thylacoïdes. Les lamelles du stroma contiennent ainsi le photosystème I (PSI) associé à ses antennes collectrices (LHCI) et le site de la synthèse de l'ATP couplé au flux d'électrons, le complexe F_0/F_1 -ATP synthétase. Les régions granaires, quant à elles, comprennent principalement le photosystème II (PSII) et le "light harvesting complex II" (LHCII).

Le LHCII est un complexe pigments-protéines qui contient environ la moitié de la chlorophylle et un tiers des protéines thylacoïdales. Il a été démontré qu'une partie de l'énergie d'excitation d'origine lumineuse absorbée par le LHCII n'est pas transférée sur le PSII mais sur le PSI via la phosphorylation du LHCII (Horton et Black, 1981). Cette modification post traductionnelle du LHCII (phosphorylation de la partie N-terminale) permet une distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes qui est contrôlée par l'état redox des transporteurs d'électrons qui les connectent (Allen, 1992). Cette régulation en "feed back" de l'énergie photosynthétique est communément appelée le mécanisme du "spillover". Cette propriété du LHCII (couplage PSI/PSII) ainsi que les propriétés adhésives de son extrémité N-terminale, lui permettent également d'induire la formation de grana (régions accolées des membranes photosynthétiques) (Murphy, 1986; Mullet, 1983).

1.4.3. L'enveloppe du chloroplaste: structure et fonction

La structure de l'enveloppe consiste en deux membranes (externe et interne) séparées par un espace intermembranaire (Fig.1.1). Ces deux membranes contiennent environ 1 à 2% des protéines du chloroplaste (Douce et Joyard, 1979). Les enveloppes, ainsi que chacune des deux membranes (externe et interne) peuvent être facilement isolées du stroma et des thylacoïdes par des techniques mentionnées plus loin (se référer au chapitre 2).

1.4.3.1. La structure physique et la composition biochimique de l'enveloppe

La structure physique des deux membranes n'est pas identique. La membrane externe est poreuse et permet le passage de l'eau, d'ions et diverses autres molécules du milieu ambiant externe vers l'espace intermembranaire (Flügge et Benz, 1984). Ces pores, dont la composition protéique demeure inconnue, ont un diamètre de 3 nm et une limite d'exclusion moléculaire de ~10 kDa. A l'inverse, la membrane interne est imperméable aux ions et autres molécules de petite taille. Elle contient environ 1 mg de lipides/mg de protéines, alors que la membrane externe en contient 2 à 3. Cette composition biochimique différente permet de séparer aisément ces deux types de membranes sur gradient de saccharose. En effet, les membranes internes exhibent une densité plus élevée (1.12-1.13 g/cm³) que les membranes externes (1.08 g/cm³) (Block et al.; 1983). Les deux membranes de l'enveloppe sont séparées par un espace de 2 à 10 nm (Carde et al., 1982) Cet espace intermembranaire est discontinu, car les deux membranes s'accolent çà et là et forment des zones de forte densité (les sites de contact) que l'on peut observer en microscopie électronique (Cremers et al., 1988).

Les constituants biochimiques de l'enveloppe sont essentiellement des lipides, des protéines et des caroténoïdes. Récemment, Jäger-Vottero et al. (1997) ont démontré également la présence de sémiquinones, de flavosémiquinones, de centres de transfert d'électrons contenant du fer et de flavines (FAD). Par contre, la présence de cytochromes dans les enveloppes de chloroplastes n'a jamais été démontrée. La signification physiologique de ces chaînes redox serait liée à (i) la présence de désaturases et à (ii) des mécanismes impliqués dans l'export de protons dans le cytosol qui contrôlèrent le pH du stroma durant la photosynthèse (Jäger-Vottero et al., 1997).

La composition lipidique de l'enveloppe chloroplastique (Maréchal et al., 1997; Joyard et al., 1991) est caractérisée par la grande quantité de glycolipides (~70%) et par la faible proportion de phospholipides (~30%) qu'elle contient. Les glycolipides, MGDG (monogalactosyldiacylglycérol), DGDG (digalactosyldiacylglycérol) et SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycérol) représentent respectivement les 32%, 30% et 6% des lipides totaux de l'enveloppe du chloroplaste. Les phospholipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard sont essentiellement la PC (phosphatidylcholine, 20%) et le PG (phosphatidylglycérol, 9%). On trouve également du PI (phosphatidylinositol, ~4%) mais pas de PE (phosphatidyléthanolamine) ni de BPG (bis-phosphatidylglycérol) qui sont deux des trois phospholipides majeurs des mitochondries. En ce qui concerne la présence ou l'absence de PE dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste, Joyard et al. (1991) considèrent ce phospholipide comme étant un marqueur qui révèle la présence de contaminations de membranes extraplastidiales. Or, récemment, Uemura et Steponkus (1997) ont détecté la présence de PE et de PA dans des membranes d'enveloppe du chloroplaste de Seigle (*Secale cereale* L. Cv Puma).

Si les composants lipidiques des membranes externes et internes sont identiques, leurs proportions relatives varient par contre fortement. Ainsi, nous trouverons dans la membrane externe et interne les proportions respectives suivantes en lipides: MGDG (17%/49%), DGDG (29%/30%), SQDG (6%/5%), PC (32%/6%), PG (10%/8%) et PI (5%/1%). La phosphatidylcholine ne serait concentrée que dans la membrane externe, à cause de son origine extraplastidiale. Concernant la composition en acides gras des lipides de la membrane du chloroplaste, les galactolipides contiennent une très grande proportion (95%) d'acide linoléique (18:3). Certaines plantes, comme le Pois, qui possèdent un acide gras 18:3 aux deux positions *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol sont appelées plantes en 18:3. D'autres plantes, comme l'Épinard, qui possèdent un acide gras 16:3 sur la position *sn*-2 du glycérol, sont appelées plantes en 16:3. Il existe donc différentes espèces moléculaires de galactolipides. La première structure (18:3/18:3) est typique des lipides dits eucaryotiques (PC) et la seconde (18:3/16:3) correspond à celle des lipides dits procaryotiques (Heinz, 1977). En ce qui concerne cette dénomination, lipides eucaryotiques et lipides procaryotiques, Murata et Siegenthaler (1998) proposent une dénomination plus révélatrice de l'origine biosynthétique de ces lipides. Ces auteurs ont nommé respectivement lipides cytoplasmiques et lipides chloroplastiques, les lipides dits jusqu'ici eucaryotiques et procaryotiques. Certains pools de PG sont uniques puisqu'ils contiennent un acide gras, l'acide *trans*-hexadécénoïque en position *sn*-2 (C_{16:1}). Cet

acide gras est présent dans le PG de toutes les membranes chloroplastiques (enveloppes et thylacoïdes), mais des membranes d'enveloppes de chloroplastes provenant de tissus non-photosynthétiques contiennent un acide gras en C_{16:0} à la place du C_{16:1} (Alban et al., 1988).

La présence de pigments dans les enveloppes de chloroplastes se remarque déjà à l'oeil nu. En effet, ceux-ci ont une couleur jaune-orange intense due à la présence de caroténoïdes. Les caroténoïdes de l'enveloppe sont la violaxanthine (6.5 µg/mg protéine), la lutéine + zéatine (2.5 µg/mg), le β-carotène (1.42 µg/mg), l'anthéroxanthine (0.79 µg/mg) et la néoxanthine (0.4 µg/mg). On retrouve tous ces pigments dans les membranes du thylacoïde mais dans des proportions différentes (Douce et Joyard, 1982). Le rôle physiologique des caroténoïdes dans l'enveloppe du chloroplaste serait de prévenir des dommages photooxydatifs en jouant un rôle d'extincteur de l'oxygène singulet, comme c'est le cas dans les membranes photosynthétiques. Actuellement, l'implication de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste dans la biosynthèse des caroténoïdes est encore controversée (Joyard et al., 1991). Cette activité biosynthétique serait plutôt liée aux membranes thylacoïdales (Britton, 1988).

La composition protéique de la membrane de l'enveloppe diffère de celle du stroma et des membranes thylacoïdales (Siegenthaler et Nguyen, 1983; Siegenthaler et Dumont, 1990). De plus, des analyses électrophorétiques bidimensionnelles (Werner-Washburn et al., 1983; Dumont, 1991) et des partitions de phase au Triton X-114 (Siegenthaler et Dumont, 1990) ont permis de montrer des différences, mais également certaines homologies dans la composition en protéines des membranes externes et internes de l'enveloppe du chloroplaste. La présence de certaines protéines dans les deux types de membranes pourrait être due aux régions communes de celles-ci, notamment aux sites de contact (Cremers et al., 1988). Plus de 75 protéines différentes ont été identifiées dans les enveloppes du chloroplaste. La plupart de ces protéines semblent être codées par le génome nucléaire. Actuellement une dizaine de séquences de gènes nucléaires codant pour des protéines de l'enveloppe sont connues. Il s'agit des gènes codant pour (i) le translocateur de phosphate (Flügge et al., 1989; Flügge et Heldt 1991), (ii) une protéine de 6.7 kDa de la membrane externe de l'enveloppe (Salomon et al., 1990), (iii) une protéine de 24 kDa située dans la membrane externe (Fisher et al., 1994), (iv) la monogalactosyldiacylglycérol synthétase (46 kDa) (Shimajima et al., 1997), (v) une ATPase dépendante du calcium (104 kDa) (Nguyen et Siegenthaler, 1983; Huang et al., 1993) qui servirait à contrôler la concentration en calcium dans le stroma et ce faisant les activités métaboliques chloroplastiques dépendantes du Ca²⁺, (vi) une protéine de 37 kDa de la

membrane interne (Drescs-Werringloer et al., 1991) qui ne correspondrait pas à (vii) la NADPH:protochlorophyllide réductase de même poids moléculaire (Block et al., 1991), (viii) une protéine "heat shock" (70 kDa) de la membrane externe (Wu et Ko 1993) et (ix) une protéine de l'enveloppe externe de 14 kDa (Li et al., 1991). Actuellement aucune protéine, de fonction connue, de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste codée par le génome chloroplastique n'a été identifiée (Douwe de Boer et Weisbeek, 1991). Par contre Dumont-BéBoux et Siegenthaler (1994) ont identifié (par protéosynthèse *in organello*) six protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard susceptibles d'être codées par le génome chloroplastique et traduites par des ribosomes 70S.

D'autres protéines, comme des "GTP-binding" protéines ont été détectées dans les membranes de l'enveloppe. Sasaki et al. (1991) ont montré la présence d'une "GTP-binding" protéine de 24 kDa dans la membrane externe de l'enveloppe. Ce type de protéines étant impliqué dans des cascades de transmission de signaux, les auteurs suggèrent que cette protéine serait impliquée dans la communication entre le chloroplaste et le cytosol. Deux autres "GTP-binding" protéines de 34 kDa et 86 kDa seraient, quant à elles, impliquées dans le mécanisme d'import protéique (Kessler et al., 1994). Nous citerons encore l'identification, par immunoprécipitation, de deux phosphoprotéines de 14 et 26 kDa, liées à l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard, qui correspondraient, respectivement, à un pool distinct de la petite sous-unité de la RubisCO et du LHCI (Bovet et al., 1995).

1.4.3.2. Les rôles de l'enveloppe

Deux fonctions majeures ont été attribuées à la membrane de l'enveloppe. La première fait intervenir des translocateurs spécifiques de la membrane interne qui contrôlent le transport de différents métabolites entre le cytosol et le stroma. La seconde est impliquée dans la biogenèse du chloroplaste. En effet, la membrane de l'enveloppe est la plaque tournante de la biosynthèse de nombreux constituants plastidiaux: glycérolipides, pigments, prénylquinones et dérivés (hyperoxydes) d'acides gras (Maréchal et al., 1997; Blée et Joyard, 1996). Elle assure également le transport des protéines du chloroplaste qui sont codées par le génome nucléaire et synthétisées par les ribosomes du cytosol (Joyard et al., 1991).

1.4.3.2.1. Les translocateurs de l'enveloppe

Le translocateur de phosphate est le constituant principal de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste des plantes en C_3 . Il constitue environ le 15% des protéines totales de cette membrane. Cet enzyme est constitué de deux sous-unités identiques de 30 kDa (Flügge et Heldt, 1984). Il est codé par le génome nucléaire (Flügge et al., 1989; Flügge et Heldt 1991) sous la forme d'une préprotéine contenant une extension N-terminale hydrophobe de ~21 acides aminés suffisante pour permettre de cibler la protéine vers la membrane interne de l'enveloppe (Knight et Gray, 1995). Ce translocateur catalyse l'échange de trioses phosphates issus de la photoréduction du CO_2 contre du phosphate inorganique issu de l'activité métabolique du cytoplasme. Ainsi, de l'acide 3-phosphoglycérique et du dihydroxyacétone-phosphate sont exportés dans le cytosol où ils seront utilisés dans la biosynthèse de molécules essentielles (acides aminés, saccharose, etc.). Le phosphate inorganique importé sera utilisé pour la synthèse d'ATP via l'ATP-synthétase du thylacoïde (Flügge et Heldt, 1984; Flügge et Heldt, 1991).

Plusieurs autres translocateurs ont également été localisés dans la membrane de l'enveloppe du chloroplaste:

- a) Des translocateurs de composés possédant deux carboxyles. En effet de nombreux dicarboxylates, tels le L-malate, l'oxaloacétate et l' α -cétoglutarate sont capables de traverser l'enveloppe (Leliner et Heldt, 1978; Flügge et Heldt, 1991; Menzlaff et Flügge, 1993);
- b) Un translocateur d'hexose-phosphate. La présence dans l'enveloppe d'un translocateur d'hexose-phosphate responsable notamment de l'import de glucose-6-phosphate, couplé simultanément à l'import de phosphate inorganique dans le stroma, a également été démontrée (Quick et al., 1995). Le rôle physiologique de ce translocateur n'est pas encore clairement établi. Premièrement, on pense que lorsque la concentration cytosolique en hexose est élevée, la synthèse d'amidon pourrait être également possible pendant la nuit grâce à ce transporteur. Deuxièmement, lorsque la concentration en hexose dans le chloroplaste est faible, le translocateur d'hexose-phosphate apporterait l'apport d'énergie indispensable aux activités biosynthétiques du chloroplaste. On ne peut actuellement exclure la possibilité que le translocateur de triose-phosphate (via une modification allostérique de l'enzyme) soit impliqué dans ce mécanisme d'import d'hexose-phosphate (Quick et al., 1995);

- c) Un translocateur d'ATP/ADP, de pyrophosphate inorganique et de phosphoénolpyruvate (Robinson et Wiskich, 1977; Heber et Heldt, 1981; Woldegiorgis et al., 1983);
- d) Des translocateurs de nitrite localisés sur la membrane interne (Shingles et al., 1996). En effet le chloroplaste est le site de réduction du nitrite en ammoniacque via la nitrite réductase qui utilise la ferrédoxine comme agent réducteur (Joy et Hageman, 1966);
- e) Un translocateur de maltose et glucose dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard (Rost et al., 1996);
- f) Un translocateur d'acides aminés. Pohlmeier et al (1997) ont isolé et caractérisé un canal protéique, localisé dans la membrane externe de l'enveloppe, sélectif pour les acides aminés. Cette protéine de 16 kDa (OEP16) forme un homodimer qui ne possède aucune homologie de séquence ni de structure avec les porines classiques. Cette découverte remet en cause la facilité d'accès pour de petites molécules à l'espace intermembranaire;
- g) Un (des) translocateur indispensable au chloroplaste est celui des préprotéines chloroplastiques d'origine nucléocytoplasmique. La plupart des protéines chloroplastiques sont codées par le noyau, synthétisées sur des ribosomes cytosoliques puis subséquentement importées dans l'organelle. En général, les protéines destinées au chloroplaste sont synthétisées sous la forme de précurseurs (préprotéines) possédant une partie N-terminale clivable responsable du ciblage de la protéine dans le chloroplaste. Ces préprotéines doivent être ciblées vers la bonne membrane de l'organelle et être maintenues dans une conformation correcte pour le passage à travers les deux membranes de l'enveloppe. La reconnaissance et l'import de la plupart des protéines chloroplastiques sont accomplis par un système de reconnaissance et d'import qui semblent étroitement liés. Actuellement, seul un certain nombre de protéines de l'enveloppe, qui semblent être impliquées dans le système d'import de l'enveloppe du chloroplaste, ont été identifiées. Il s'agit des protéines OEP86, OEP75, OEP70 (Hsp70); OEP34 localisées dans la membrane externe et de la protéine IEP110 localisée dans la membrane interne (Lübeck et al., 1997, revue).

1.4.3.2.2. Activités biosynthétiques liées aux membranes de l'enveloppe

Les membranes de l'enveloppe du chloroplaste sont un site majeur de la biosynthèse des glycérolipides (voir figure 1.2.A.). Cette biosynthèse nécessite l'assemblage de trois parties: les acides gras, le glycérol et le groupement polaire (galactose, pour les

galactolipides; sulfoquinovose, pour les sulfolipides; et phosphorylglycérol, pour le phosphatidylglycérol). Le premier enzyme nécessaire à cette biosynthèse (une glycérol-3-phosphate acyltransférase) se trouve dans la membrane interne de l'enveloppe et catalyse le transfert d'un $C_{18:1}$ sur la position *sn*-1 du glycérol. Il en résulte la production d'un acide lysophosphatidique (LPA) qui sera lui-même acylé ($C_{16:0}$) par l'action d'une 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (située dans l'enveloppe) pour donner un acide phosphatidique (PA) de type chloroplastique. Le PA ainsi formé sera subséquentement métabolisé soit en diacylglycérol (par l'intermédiaire d'une PA phosphatase localisée dans la membrane interne) ou en PG en faisant intervenir une phosphatidate cytidyltransférase, une CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate 3-phosphatidyltransférase et finalement une phosphatidylglycérol phosphatase. La voie complète de biosynthèse du PG se situe dans la membrane interne de l'enveloppe. A partir du diacylglycérol, les membranes internes vont synthétiser du MGDG par l'intermédiaire d'une 1,2-diacylglycérol-3- β -galactosyltransférase utilisant de l'UDP-galactose comme substrat. Deux molécules de MGDG seront à leur tour métabolisées en DGDG et DAG par la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase qui se situe dans la membrane externe de l'enveloppe. Cet enzyme ne semble pas être le seul responsable de la biosynthèse de DGDG dans les enveloppes. En effet, son activité semble fortement réprimée *in vivo*; de plus les espèces moléculaires du DGDG ont une composition en acides gras très différente de celle du MGDG. La biosynthèse du sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG ou SL) nécessite également le DAG formé *de novo* dans la membrane interne. Un certain nombre d'évidences suggèrent que ce lipide est issu du transfert d'un UDP-sulfoquinovose sur une molécule de DAG. Cette réaction est catalysée par la 1,2-diacylglycérol 3- β -sulfoquinovosyltransférase (Maréchal et al., 1997; Joyard et al., 1991).

La membrane de l'enveloppe possède également les enzymes responsables de la désaturation des acides gras lorsqu'ils sont estérifiés à une tête polaire. Les membranes de l'enveloppe contiendraient toute la batterie d'enzymes, ainsi qu'une chaîne de transporteurs d'électrons (Jäger-Vottero et al., 1997), nécessaires à la désaturation des acides gras (Maréchal et al., 1997).

Dernièrement, Blée et Joyard (1996) ont démontré que les membranes d'enveloppes sont également le siège de la synthèse d'oxylipides dérivant d'hydroperoxydes d'acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique ou linoléinique. La présence d'enzymes clés catalysant la synthèse d'une variété de dérivés d'acides gras (acide traumatique, acide jasmonique) dont certains peuvent jouer un rôle de molécule régulatrice de la croissance (au

niveau des gènes) et de la défense ("signaling molecule"), confère au chloroplaste un nouveau rôle à l'intérieur de la cellule végétale.

Bien que dépourvues de pigments chlorophylliens, les membranes d'enveloppes de chloroplastes matures contiennent de petites quantités de pigments présentant les mêmes caractéristiques spectroscopiques que les pigments précurseurs de la chlorophylle. La présence de protochlorophyllide et d'une NADPH:Protochlorophyllide réductase (PCOR) dans la membrane externe de l'enveloppe suggère fortement l'implication de celle-ci dans la synthèse des pigments précurseurs de la chlorophylle (Joyard et al., 1990). La PCOR est actuellement le seul enzyme impliqué dans la synthèse de la chlorophylle dont la localisation dans la membrane de l'enveloppe soit reconnue. En effet, récemment, Walker et Weinstein (1995) ont remis en question l'éventuelle localisation de la Mg^{2+} -chelatase dans l'enveloppe chloroplastique.

Finalement, la membrane interne de l'enveloppe est également le siège de la biosynthèse d'autres molécules biologiques telles que l' α -tocophérol et la plastoquinone-9 qui fonctionnent respectivement dans la membrane du thylacoïde comme extincuteur de l'oxygène singulet et transporteur d'électrons (Friedle et al., 1982; Soll et al., 1985).

1.5. "Phospholipid signaling" (transmission de signaux via les phospholipides)

Rédiger une introduction complète sur un sujet aussi vaste que celui des phospholipides et des activités lipide-kinasiques en relation avec les mécanismes de transmission de signaux est un défi qui n'est pas l'objectif de ce travail de thèse. Nous nous contenterons donc de survoler ce domaine que nous appellerons "phospholipid signaling", tout en mettant l'accent, dans cette introduction, sur les connaissances actuelles de ce sujet au niveau des plantes.

1.5.1. Phospholipides

Les phospholipides sont connus depuis longtemps comme étant des constituants majeurs des membranes biologiques. De part leur nature, ces molécules ont une influence prépondérante sur les activités cellulaires en contrôlant la perméabilité de la membrane ainsi que les activités enzymatiques liées à cette dernière. En effet, de nombreux changements

physiologiques (sénescence de la plante, mûrissement des fruits, infections par des pathogènes), physiques (température, stress osmotique) et chimiques (hormones, herbicides) semblent être corrélés à des variations de concentrations en phospholipides chez les plantes. Ces phénomènes sont étudiés depuis plusieurs dizaines d'années. Ainsi, la composition en phospholipides de nombreuses espèces de plantes, d'organelles végétales isolées et de cellules végétales cultivées en milieu liquide a été abondamment décrite. En général, les phospholipides majeurs sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). On trouve également, mais en plus petites proportions, de la phosphatidylsérine (PS), du phosphatidylinositol (PI), du phosphatidylglycérol (PG) et du bis-phosphatidylglycérol (BPG, cardiolipide). La plupart de ces lipides se retrouvent dans tous les systèmes membranaires étudiés, mais dans des proportions différentes. Le cardiolipide est exclusivement localisé dans les membranes mitochondriales et le PG se trouve principalement dans les membranes du chloroplaste contrairement au BPG, PE et PS qui y sont absents (Moore, 1982).

La biosynthèse des phospholipides peut être résumée de manière simple comme indiqué dans la figure 1.2.

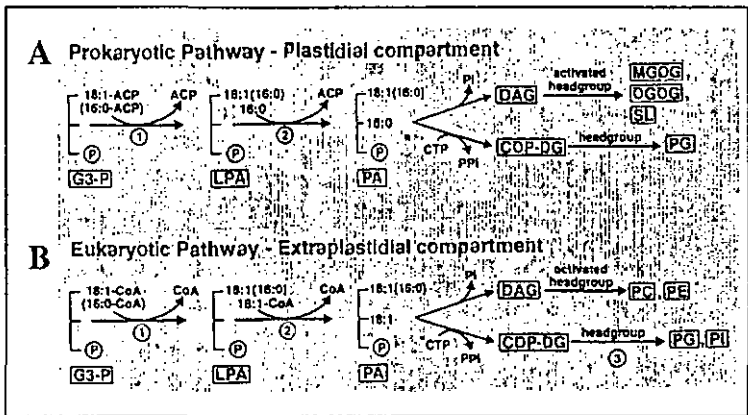


Fig. 1.2. Voie procaryotique (chloroplastique) et eucaryotique (cytoplasmique) de la biosynthèse des glycérolipides (pour les légendes se référer aux explications se trouvant dans le texte). Tiré de: Ohlrogge, J. et Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis, The Plant Cell, vol. 7, pp 957-970.

Elle débute par deux étapes d'acylation (réaction 1 et 2) du glycérol-3-phosphate (G3-P) par une G3-P acyltransférase qui conduit à la formation d'un acide phosphatidique (PA). Cette molécule, via une phosphatase spécifique, est transformée en diacylglycérol (DAG). Alternativement, une forme activée du DAG (CDP-DAG) est produite par la

phosphatidate cytidyltransférase à partir de PA et de CTP. L'énergie nécessaire à la fixation de la tête polaire durant la synthèse *de novo* des glycérolipides est fournie par une activation nucléotidique. Lorsque le DAG est le substrat lipidique, c'est la tête polaire qui est activée. Ainsi, la cytidine 5'-diphosphate (CDP)-choline, la CDP-éthanolamine et la CDP-méthyléthanolamine sont les substrats pour la biosynthèse de PC et PE. Il en va de même pour la biosynthèse du MGDG et du SQDG où les têtes polaires activées utilisées par la MGDG- et la SQDG-synthétase sont respectivement l'UDP-galactose et l'UDP-sulfoquinovose. Par contre, lorsque le CDP-DAG est le lipide substrat, la réaction avec le myo-inositol, la sérine, et le glycérol-3-phosphate (réaction 3) produit respectivement les phospholipides PI, PS et PG-3-P (précurseur de PG). Une modification ou un échange des têtes polaires des lipides peut également avoir lieu. Ainsi, la synthèse de PC peut se faire à partir d'une double méthylation de la phosphatidylméthyléthanolamine (PE) (Browse et Sommerville, 1991; Kinney, 1993). Les plantes supérieures possèdent deux voies de biosynthèse des glycérolipides: une voie chloroplastique (figure 1.2.A) localisée dans la membrane interne de l'enveloppe et une voie cytoplasmique (figure 1.2.B) située dans le réticulum endoplasmique (RE) qui débute avec du PA. De part les spécificités des acyltransférases du plastide pour certains acyl-CoA (Frentzen, 1993), le PA formé par la voie chloroplastique possède un C_{16:0} à la position *sn*-2 et, dans la plupart des cas, un C_{18:1} à la position *sn*-1. Ce PA est utilisé pour la synthèse de PG ou est converti en DAG dans la membrane interne de l'enveloppe (Joyard et al., 1993). Contrairement aux isozymes du plastide, les acyltransférases du réticulum endoplasmique utilisent des acyl-CoA enrichis en C₁₈ pour la biosynthèse du PA. Ce PA sera le substrat pour des phospholipides comme la PC, le PI, et la PE, qui sont caractéristiques des membranes extraplastidiales. Enfin, la partie DAG de la PC peut être transférée dans l'enveloppe du chloroplaste et entrer ainsi dans la voie de biosynthèse des lipides du plastide (Ohlrogge et Browse, 1995).

1.5.2. Phosphoinositides et "système PI" (transmission de signaux via les phosphoinositides) chez les mammifères

Le terme "phosphoinositides" est utilisé pour décrire un groupe de phospholipides qui inclut le phosphatidylinositol [PI=PtdIns] (voir figure 1.3.A.), le phosphatidylinositol-4-monophosphate [PI(4)P], le phosphatidylinositol-3-monophosphate [PI(3)P], le

phosphatidylinositol-4,5-biphosphate [PI(4,5)P₂], le phosphatidylinositol-3,4-biphosphate [PI(3,4)P₂], le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate [PI(3,4,5)P₃] et leur lysodérivé LPI, LPI(4)P, LPI(4,5)P₂, LPI(3,4,5)P₃.

Parmi les phospholipides, les phosphoinositides font l'objet d'études de plus en plus nombreuses en relation avec la transmission des signaux. En effet, dès le début des années 80, il a été reconnu que certains phospholipides n'avaient pas uniquement un rôle structural mais étaient également une source de messagers secondaires. Plusieurs phospholipides peuvent être hydrolysés par des phospholipases afin de générer des messagers secondaires; parmi ceux-ci, le PI(4,5)P₂ (impliqué dans un mécanisme de transmission de signaux appelé "système PI") est le plus connu.

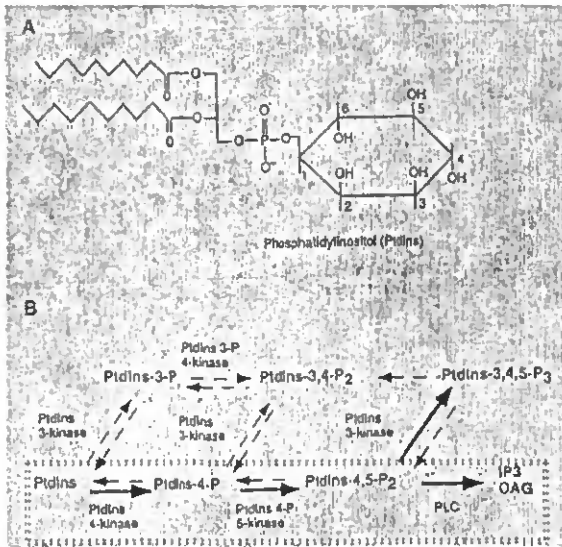


Fig. 1.3. Structure et biosynthèse des phosphoinositides. A) Structure du phosphatidylinositol montrant la numérotation des carbones du groupement inositol. Cette numérotation est équivalente à celle utilisée pour définir la position des groupements phosphates des différents phosphoinositides. B) Représentation schématique de la biosynthèse des phosphoinositides à partir du phosphatidylinositol (PtdIns). Les enzymes qui catalysent les diverses réactions sont indiquées à côté des flèches. La voie de biosynthèse des phosphoinositides impliqués dans le système PI, aboutissant à la formation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG) via une phospholipase C (PLC), est entourée par un double traitillé.

Le système PI (Fig. 1.4.) génère, dans la membrane plasmique des cellules animales, du PI(4,5)P₂. Ce lipide est hydrolysé par une phospholipase C spécifique aux phosphoinositides (PIC) activée soit par une protéine-G (G), elle-même activée par un

activateur (A) via un récepteur membranaire (R), ou soit par une tyrosine kinase. L'hydrolyse du lipide résulte en deux produits ayant chacun une activité de messenger secondaire. Le premier produit, l'inositol 1,4,5-tisphosphate [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$], est libéré dans le cytosol où il provoquera un efflux de Ca^{2+} (via des canaux ioniques) contenus dans des compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE). Le deuxième produit d'hydrolyse, le diacylglycérol (DG), reste dans la membrane plasmique où il activera des protéines kinases C (PKC). Ces protéines kinases C activeront d'autres enzymes en les phosphorylant (protéine-P) Il a également été démontré chez les animaux qu'un grand nombre de molécules dérivées des phospholipides sont impliquées dans différents systèmes de transmission de signaux. Celles-ci comprennent notamment des dérivés de phosphoinositides phosphorylés en position 3 [$\text{PI}(3)\text{P}$, $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$], mais également l'acide phosphatidique (PA), qui est le produit de la phosphorylation du DAG, et son lysodérivé le LPA.

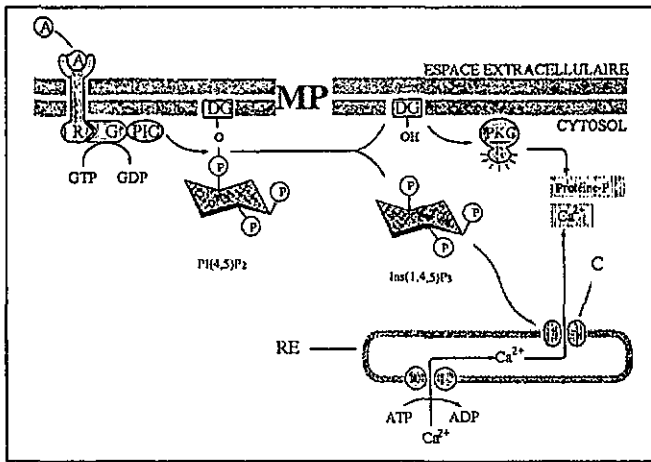


Fig. 1.4. Schéma simplifié du système PI des mammifères (Abréviations: A, activateur; R, récepteur; G, protéine-G; PIC, phospholipase C (isoforme β); DG, diacylglycérol; PKC, protéine kinase C; RE, réticulum endoplasmique; $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, inositol-1,4,5-trisphosphate; C, canal ionique; MP, membrane plasmique).

1.5.3. "Phospholipid signaling" chez les plantes

Alors même que les mécanismes du "phospholipid signaling" dans les cellules animales devaient de plus en plus complexes (Divecha et Irvine, 1995, revue), et bien que la plupart des composants du système PI des mammifères se retrouve dans les cellules des plantes, la preuve définitive que des phosphoinositides sont aussi impliqués dans les mécanismes de transmission de signaux chez les végétaux reste à trouver. Il y a maintenant treize ans que Boss et Massel (1985) proposaient pour la première fois l'existence de $PI(4,5)P_2$ dans les cellules végétales et neuf ans que ce phospholipide était définitivement identifié chez les plantes supérieures par Côté et al. (1989) et Irvine et al. (1989). Actuellement, et malgré ces découvertes, l'implication de ce lipide (uniquement présent sous forme de traces) dans la régulation d'activités métaboliques et physiologiques à l'intérieur des cellules végétales reste une question ouverte. Néanmoins, de nombreuses évidences, reliant le métabolisme de ce lipide avec des changements physiologiques rapides dans les algues unicellulaires et les plantes supérieures, s'accumulent. Ainsi, la libération de calcium dans le cytosol, à partir des vacuoles et probablement d'autres organelles, est étroitement lié à la présence de $Ins(1,4,5)P_3$. Cette corrélation est intéressante si l'on tient compte du fait que le Ca^{2+} est également impliqué dans la transmission des signaux chez les plantes. Gilroy et al. (1990) ont montré qu'un accroissement de la concentration en $Ins(1,4,5)P_3$ dans le cytosol des cellules stomatales provoque une augmentation de la concentration en calcium libre et la fermeture des stomates. D'autres exemples, comme la déflagellation de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, mettent en évidence qu'une relation existe entre un stimulus et une réponse cellulaire, via les inositols phosphates et le Ca^{2+} . En effet, cette algue, qui se sépare de son flagelle sous l'effet d'un stress environnemental (chaleur, acidification du milieu), exhibe le même phénomène lorsqu'elle est traitée avec du calcium ou de l' $Ins(1,4,5)P_3$ (Quarmby et al., 1995). De plus, une déflagellation induite par un stress est accompagnée par une élévation de la concentration en $Ins(1,4,5)P_3$ et en acide phosphatidique. Toutefois, il reste encore à démontrer que des stress environnementaux peuvent provoquer l'hydrolyse du $PI(4,5)P_2$ et l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique.

D'autres indices, indiquant l'implication des phosphoinositides dans la transmission de signaux chez les plantes, proviennent de l'observation de l'effet de certains modulateurs des protéines-G sur la déflagellation, l'ouverture stomatale et d'autres processus susceptibles d'être régulés par les phosphoinositides. Ces observations sont importantes car dans les cellules

animales, les récepteurs de signaux extracellulaires couplés à des protéines G activent certains isozymes de PI-PLC (forme β). Les protéines-G sont également connues pour activer des phospholipases D (PLD) dans certaines cellules animales. Ces PLD hydrolysent la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine pour générer du PA qui est un messenger secondaire (Boarder, 1994). Par ailleurs, Munnik et al. (1995) ont démontré que l'augmentation de la concentration en PA dans des cellules de *Chlamydomonas eugametos* traitées avec des activateurs de protéines G était due à la présence de PLD. L'intérêt biologique de cette découverte est renforcée par la capacité du PA à induire une déflagellation chez cette algue unicellulaire. Ainsi, à une probable implication d'une PI-PLC dans la transmission de signaux chez les plantes doit s'ajouter une éventuelle participation de PLDs.

Selon Boss et al. (1995), les phosphoinositides auraient également un rôle majeur à jouer dans la régulation de la structure du cytosquelette. Cette interaction cytosquelette-phosphoinositides se ferait par l'intermédiaire d'une protéine PIK-A49 capable de stimuler l'activité PI-4-kinasique du cycle PI. La PIK-A49 est une protéine multifonctionnelle qui fixe et lie les filaments d'actine et possède également une activité de facteur d'élongation de la traduction EF-1 α . Lorsque la PIK-A49 est phosphorylée par une protéine kinase dépendante du Ca²⁺, elle se libère du cytosquelette. Une fois libre dans le cytosol, cet enzyme pourrait soit se diriger vers les ribosomes (et fonctionner comme facteur d'élongation) ou, alors, fonctionner comme stimulateur de l'activité PI-4-kinasique de la membrane plasmique. De part sa nature multifonctionnelle, la PIK-A49 assurerait un lien entre le cytosquelette, la synthèse protéique, la membrane plasmique et le cycle PI.

D'autres implications des phosphoinositides comme activateurs d'H⁺-ATPases de la membrane plasmique ont également été démontrées chez les plantes (Memon et Boss, 1990).

1.5.4. Activités lipide-kinasiques chez les plantes.

Un grand nombre d'activités lipide-kinasiques ont été démontrées dans les cellules des végétaux. Ces activités se retrouvent dans la membrane plasmique, les membranes mitochondriales et la membrane nucléaire (Wissing et al., 1992). Certaines lipides kinases semblent également être présentes dans le cytosquelette (Tan et al., 1992) et des compartiments solubles (Okpodu et al., 1995).

La diacylglycérol kinase (DGK) est un enzyme qui permet de recycler le diacylglycérol (un activateur de protéines kinases C, Kanoh et al., 1990; Nishizuka, 1992) généré par différentes sources et notamment les phospholipases C (Shi et al., 1995; Pical et al., 1992) et la PA phosphatase (Malherbe et al., 1995; Kanoh et al., 1993). Cet enzyme a été purifié, caractérisé et localisé à partir de cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (Heim et al., 1987; Wissing et al., 1989; Wissing et al., 1992). Récemment, Katagiri et al. (1996) ont cloné le gène (cATDGK1) codant pour la DGK d'*Arabidopsis thaliana*. La protéine issue de ce gène a un poids moléculaire de 79.4 kDa. La séquence en acides aminés exhibe des similarités significatives avec les DGK du rat, du cochon et de la drosophile. L'ARNm de cette protéine se retrouve dans les racines, les tiges et les feuilles. Les auteurs concluent que la présence de gènes codant pour une DGK et des PLC (Yamamoto et al., 1995) suggère l'existence d'un cycle PI et *de facto* la présence d'une PKC chez les plantes. En ce qui concerne le rôle de la DGK, on pense qu'elle diminuerait la quantité de DG et permettrait par ce biais de contrôler l'activité des PKC (Kanoh et al., 1990). Enfin, le PA produit par la DGK et son lysodérivé le LPA sont connus pour leur rôle de messagers secondaires (Moolenaar, 1995; Moolenaar et al., 1986; Murayama et al., 1987; Schaap et al., 1993; Kanoh et al., 1993). L'importance au sein d'une membrane, d'un enzyme qui utilise un messager secondaire (DG) pour en produire un autre (PA), afin de modifier ou d'amplifier un signal, paraît alors évidente.

La phosphatidate kinase (PAK) est un enzyme découvert assez récemment dans les membranes plasmiques de *Catharanthus roseus* (Wissing et al., 1993). Il catalyse la phosphorylation du PA en diacylglycérol pyrophosphate (DGPP). L'activité de cet enzyme a été détectée dans différentes plantes et différents tissus et semble donc ubiquitaire dans le règne des végétaux. Le nouveau phospholipide généré par cet enzyme semble également impliqué dans des systèmes de transmission de signaux (Munnik et al., 1996). La formation de DGPP semble étroitement liée à l'activation des protéines G. Comme les protéines G peuvent être activées par du PA (Munnik et al., 1995), la PA-kinase permettrait l'atténuation du signal induit par le PA par une autre voie que celle de la PA-phosphatase. D'autres rôles sont attribués à ce phospholipide: (i) un rôle de précurseur de la biosynthèse des phospholipides. En effet, le DGPP est une molécule activée telle le CMP-PA; ainsi en présence d'une phosphatidyltransférase et d'un substrat approprié (inositol) il pourrait être converti en un autre lipide (phospholipides). (ii) un autre rôle pour le DGPP serait celui d'avoir la capacité, via un autre enzyme de phosphoryler des protéines (Munnik et al., 1996). L'implication de ce lipide

dans des systèmes de transmission de signaux est étayée par le fait qu'il peut être déphosphorylé via une DGPP phosphatase (Ricci et al., 1997).

Les phosphatidylinositol kinase (PI-4-K) et phosphatidylinositolphosphate kinase (PIP-5-K) des plantes ont été caractérisés pour la première fois dans les membranes plasmiques des tiges et des racines du blé (Sommarin et Sandelius, 1988). Ces enzymes se trouvent dans les membranes plasmiques, dans des fractions solubles et également liés au cytosquelette. Actuellement aucun gène codant pour une PI-4-kinase n'a été isolé. Récemment, Okpodu et al. (1995) ont purifié une PI 4-kinase soluble de 80 kDa à partir de cultures cellulaires de carottes. Cet enzyme ne correspond pas totalement aux caractéristiques des PI-4-kinases de type II ou III de la classification de Pike (1992). Une PI-4-kinase de la membrane plasmique a également été partiellement purifiée par Hanenberg et al. (1995). Les propriétés enzymatiques de ces deux protéines (PI-4-kinase soluble et membranaire) sont très différentes. La présence de cet enzyme catalysant la première réaction dans la biosynthèse du PIP_2 suggère fortement qu'un cycle PI est présent dans les cellules végétales.

Les cellules végétales semblent également posséder des phosphatidylinositol-3-phosphate kinases catalysant la formation de phosphoinositides phosphorylés en position D-3 de l'inositol. Ces lipides kinases furent initialement découvertes dans des cellules oncogéniques et décrites par Whitman et al. (1988). Ce type de lipides (PI-3-P; PI-3,4-P; PI-3,4,5-P) représente une nouvelle voie de transmission de signaux, distincte de celle du système PI. La formation de ces lipides est rapidement couplée à des réponses cellulaires, et ils ne semblent pas être hydrolysés par des phospholipases connues (Fry, 1994). Ainsi, il apparaît que le lipide lui-même serait le messager secondaire. Ces lipides seraient principalement impliqués dans le transport vésiculaire de protéines issues du réticulum endoplasmique via l'appareil de Golgi (Shepherd et al., 1996, revue). Actuellement, seules quelques publications font état de la présence de ce type de phospholipides et de lipide kinases chez les plantes. Cependant, aucune n'indique clairement qu'ils/elles sont impliqué(s) dans des mécanismes de transmission de signaux (Welters et al., 1994; Dove et al., 1994; Munnik et al., 1994; Parmar et al., 1995). Toutefois, Munnik et al. (1994) et Parmar et al. (1995) ont établi la présence d'un métabolisme rapide de ces lipides (PI-3-P) dans des cellules végétales, suggérant que les phosphoinositides phosphorylés en position D-3 jouent un rôle de messager secondaire. En effet, une propriété inhérente et indispensable aux lipides impliqués dans la transmission des signaux, comparés aux lipides structuraux, est un ana- et catabolisme rapide. En effet, en tant que molécules vectrices

de signaux, ces lipides doivent être rapidement détruits afin d'éviter des stimulations non-régulées et continues du métabolisme de la cellule.

1.6. But de la recherche

Premièrement, cette recherche doit établir si les membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard recèlent, à l'image des membranes plasmiques, nucléaires et mitochondriales, des activités lipide-kinasiques lorsqu'elles sont incubées *in vitro* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

Deuxièmement, nous déterminerons quelle est la répartition de ces activités entre les membranes externe et interne de l'enveloppe du chloroplaste.

Troisièmement, nous étudierons l'effet de divers paramètres d'incubation sur les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste.

Quatrièmement, nous déterminerons s'il est possible de phosphoryler *in organello* les mêmes lipides que lors de la phosphorylation *in vitro*.

Cinquièmement, nous tenterons de déterminer quel(s) rôle(s) physiologique(s) possèdent ces activités lipide-kinasiques au sein du chloroplaste.

CHAPITRE 2

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les feuilles d'Épinard (*Spinacia oleracea* L.) proviennent du marché local et les préparations de membranes plasmiques d'Épinard nous ont été aimablement fournies par le Professeur Christer Larsson (Département of Plant Biochemistry, Lund University, Sweden). Le [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmmole) et le [32 P]Pi sont distribués par la maison Amersham-Rhan (Zürich, Switzerland). Les produits chimiques et les enzymes ont été essentiellement achetés chez Sigma. Les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM-ou CCMHP-plates, silicagel 60 pre coated) sont fournies par Merck (Darmstadt, D).

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation de membranes d'enveloppes et de stroma

L'isolement des membranes de l'enveloppe a été effectué à 4°C, selon des méthodes proches de celles décrites par Douce et Joyard (1982) et Nguyen (1984). Après le détachement de la nervure centrale, des feuilles d'Épinard (~800 gr) sont broyées dans un mélangeur de type Waring-Blender pendant 10 s (à faible vitesse) dans environ 2000 ml de milieu de broyage (MB): 25 mM Mops-KOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA-Na₂ et 2 mM isoascorbate. L'homogénat est filtré à travers six couches de gaze et une couche de Miracloth, puis centrifugé à 1550 x g pendant 1 min (3600 rpm, rotor GSA). Les surnageants sont éliminés par inversion des tubes à centrifuger et les culots dilués dans 100 ml de MB.

La suspension ainsi obtenue est déposée sur l'équivalent d'un volume et demi d'une solution de MB contenant 40% (v/v) de Percoll (Pharmacia), centrifugée à 2640 x g

(4000 rpm, rotor HB-4) pendant 15 min sous accélération lente. *L'utilisation du Percoll permet de séparer dans des conditions isoosmotiques les chloroplastes intacts des débris cellulaires et des chloroplastes brisés contenus dans l'homogénat.* Après élimination des surnageants par aspiration, les culots sont mis en suspension dans du MB, puis centrifugés à 1900 x g (4000 rpm, rotor SS-34) pendant 3 min, afin de se débarrasser du Percoll résiduel. Les culots de chloroplastes intacts remis en suspension dans 40 ml (volume final) d'une solution hypotonique (ME: milieu d'éclatement): 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 5mM MgCl₂ et 2 mM EDTA-Na₂. Après la lyse des chloroplastes (~2 min), l'osmolarité est rétablie par l'adjonction de 4 ml d'une solution de sorbitol 3 M. Une centrifugation à 17200 x g (12000 rpm, rotor SS-34) pendant 10 min permet de séparer les enveloppes et le stroma (surnageant) des thylacoïdes (culot). Afin de séparer les enveloppes du stroma, 10 ml du mélange sont déposés sur un gradient discontinu de saccharose (0.65 et 1.0 M) tamponné avec ME. Les tubes contenant les gradients sont ensuite centrifugés à 92000 x g (22500 rpm, rotor Beckman SW-28) pendant 90 min sous accélération lente. Le stroma (haut du tube) ainsi que la bande jaune (localisée à l'interface des deux couches de saccharose) correspondant aux enveloppes sont récoltés à l'aide d'une pipette Pasteur. Les enveloppes, diluées deux à trois fois avec du ME, sont lavées par sédimentation à 112500 x g (25000 rpm rotor SW-28) pendant 60 min afin d'éliminer le sucre résiduel. Les culots de membranes d'enveloppes sont mis en suspension dans un volume minimum contenant 50 mM Mops-NaOH (pH 7.6), puis la concentration en protéine dosée comme celle du stroma par la méthode de Bradford (voir 2.2.5.1) Les extraits d'enveloppes et de stroma sont conservés à -30°C avant leur utilisation.

2.2.2. Préparation de fractions enrichies en membranes internes et externes d'enveloppes

Les membranes internes et externes d'enveloppes ont été purifiées selon la méthode décrite par Keegstra et Youssif (1986), adaptée dans notre laboratoire par Dumont (1991). Les chloroplastes, isolés comme indiqué sous 2.2.1, sont mis en suspension dans un milieu hypertonique contenant 10 mM Tricine-KOH (pH 7.6), 0.65 M saccharose, 2 mM EDTA-Na₂ et ajustés à 2,5 mg de chlorophylle/ml. Après 15 min d'incubation à 4°C, les chloroplastes sont brisés dans un homogénéisateur Dounce, à raison de 20 à 30 coups de piston pour 7 ml de suspension; le degré de lyse des chloroplastes est contrôlé au microscope à contraste de phase. La suspension est ensuite diluée deux fois dans une solution hypotonique contenant 10 mM

Tricine-KOH (pH 7.6), 2 mM EDTA-Na₂, puis centrifugée sous accélération lente pendant 30 min à 23500 x g (12000 rpm, rotor HB-4). Le surnageant contenant le stroma et les vésicules enrichies en membranes internes et externes d'enveloppes est déposé sur un gradient discontinu composé de trois couches de 8 ml de saccharose (0.4, 0.65, 1.0 M) tamponné avec ME (voir sous 2.2.1). Après centrifugation à 100000 x g (23500 rpm, rotor SW-28) pendant 6 h, les fractions enrichies respectivement en membranes internes et externes sont prélevées aux interfaces des couches de 0.65/1 M et 0.4/0.65 M saccharose, puis diluées trois fois dans du ME et finalement sédimentées à 112500 x g (25000 rpm, rotor SW-28) pendant 60 min. Les culots de membranes internes et externes sont alors mis en suspension dans un volume minimum de Mops-NaOH (pH 7.6) et dosés selon la méthode de Bradford (2.2.5.1). Les extraits sont conservés à -30°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.3. Préparation de chloroplastes intacts et de membranes thylacoïdales possédant un degré de pureté élevé

2.2.3.1. Préparation de chloroplastes intacts

La purification de chloroplastes intacts est effectuée selon la méthode décrite par Mourieux et Douce (1981). Après le détachement de la nervure centrale, des feuilles d'Epinard (120 gr) sont broyées dans un mélangeur de type Waring-Blender pendant 15 s (à faible vitesse) dans environ 500 ml de milieu de broyage (MB*): 30 mM Mops-KOH (pH 7.8), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA-Na₂ et 0.15% (p/v) BSA. L'homogénat est filtré à travers quatre couches de gaze et une couche de Miracloth, puis centrifugé à 750 x g pendant 1 min (2200 rpm, rotor GSA). Le surnageant est éliminé par aspiration et le culot (remis en suspension dans du MB*) est déposé sur un gradient continu de Percoll 50 [solution de MB* contenant 50% (v/v) de Percoll préalablement centrifugé à 41000 x g (18500 rpm, rotor SS-34) pendant 20 min]. La suspension est ensuite centrifugée à 5050 x g (6500 rpm, rotor SS-34) pendant 15 min sous accélération lente. La bande verte inférieure constituée de chloroplastes intacts est prélevée (la bande supérieure contient essentiellement des chloroplastes brisés), puis diluée dans un milieu isoosmotique (MIO): 50 mM Mops-NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol et 5 mM MgCl₂, puis centrifugée à 1900 x g (4000 rpm, rotor SS-34) pendant 90 s. Le surnageant est

écarté et le culot mis en suspension dans un volume minimum de MIO, puis ajusté à 2 mg de chlorophylle/ml.

2.2.3.2. Préparation des membranes thylacoïdales

Une préparation de membranes thylacoïdales non purifiées peut être obtenue après simple éclatement de chloroplastes intacts (non-purifiés sur Percoll 40%) dans une solution tamponnée hypotonique (voir 2.2.1. premier paragraphe). Mais une préparation de membranes thylacoïdales exempte de contaminants de membranes extrachloroplastidiales et d'enveloppes n'est obtenue qu'après purification sur Percoll (Rawlyer et al., 1992). A l'équivalent d'un mg de chlorophylle d'une suspension de chloroplastes intacts, préparés comme sous 2.2.3.1, sont ajoutés 30 ml de milieu de lyse (ML) qui contient: 10 mM Tricine-KOH (pH 7.8) et 2mM EDTA-Na₂. Après une agitation douce pendant 1 min, l'osmolarité est restaurée par l'addition de 3.6 ml de sorbitol 3M. La suspension est centrifugée à 16500 x g (12000 rpm, rotor SS-34) pendant 5 min. Le surnageant est écarté et le culot dilué dans un volume final de 18 ml de milieu de suspension (MS) contenant 10 mM Tricine-KOH (pH 7.8) et 0.3 M sorbitol. A l'aide d'une seringue, 5 ml d'une solution de MS contenant 5% (v/v) de Percoll sont injectés au bas du tube. La suspension est alors centrifugée à 20000 x g (11000 rpm, rotor HB-4) pendant 15 min. Les membranes thylacoïdales sont finalement remises en suspension dans environ 0.5 ml de MIO et la concentration en protéines déterminée par la méthode de Lowry (2.2.5.2).

2.2.4. Dosage de la teneur en chlorophylles

Les quantités de chlorophylles sont estimées par la méthode de Bruinsma (1961). Une suspension de chloroplastes intacts ou de thylacoïdes (50 µl) est mélangée à 10 ml d'acétone 80% (v/v), puis la suspension ainsi obtenue est centrifugée à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200) pendant 5 min. L'absorbance du surnageant est lue à 652 nm avec pour référence une solution d'acétone 80%. La concentration des chlorophylles en mg/ml est obtenue en multipliant l'absorbance (A_{652}) par un facteur de 5.55.

2.2.5. Dosage des protéines

La concentration des protéines d'enveloppes et du stroma est estimée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), alors que celle des protéines thylacoïdales l'est par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.2.5.1. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

A des protéines (5 à 20 µg) diluées dans 0.8 ml d'H₂O, on ajoute 0.2 ml de réactif concentré (Bio-Rad) et l'on "vortex" immédiatement pendant 20 s. Après 15 min, l'absorbance est mesurée à 595 nm avec pour référence un échantillon contenant uniquement de l'eau et du réactif. Dans ces conditions (Spector, 1978), le rapport de la mesure de l'absorbance à 595 nm divisé par le produit du volume de la prise de protéine (µl) par un facteur de 0.06 donne la concentration des protéines en mg/ml (Accessoirement, une courbe étalon réalisée à l'aide de concentrations croissantes de BSA permet également de calculer la concentration des protéines dans les échantillons).

2.2.5.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La méthode de Lowry et al. (1951), modifiée par Markwell et al. (1981), est plus adaptée que celle de Bradford pour estimer la concentration des protéines thylacoïdales, car on évite dans ce cas toute interférence entre les pigments chlorophylliens et le colorant lui-même. La BSA est utilisée comme protéine de référence. Un échantillon contenant moins de 100 µg de protéines membranaires est ajusté à 1 ml avec de l'H₂O. Un réactif (3 ml) constitué de cent volumes de la solution A [2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.16% tartrate de Na et 1% (p/v) SDS] et de un volume de la solution B (4% CuSO₄ x 5 H₂O) est ajouté à l'échantillon. Après agitation et incubation pendant 10 min, 0.3 ml de réactif de Folin dilué deux fois avec H₂O sont ajoutés. Après 45 min à l'obscurité, l'absorbance est lue à 750 nm avec pour référence un échantillon constitué par l'ensemble des réactifs à l'exception des protéines.

2.2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques, contenant jusqu'à 40 µg de protéines, sont dilués 1:1 avec du tampon pour échantillon SDS-PAGE [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% (p/v) bleu de bromophénol, 4% (p/v) SDS, 12.5% (v/v) glycérol et 10% (v/v) mercaptoéthanol], pour être ensuite dénaturés à 100°C pendant 3 min. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse selon la méthode classique de Laemmli (1970). Les gels de séparation (0.8 mm ou 1.5 mm d'épaisseur) contiennent: 13 ou 15% (p/v) d'acrylamide (le rapport acrylamide/bisacrylamide est de 30/0.8), 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% (p/v) SDS, 0.04% (v/v) TEMED et 0.0015% (p/v) persulfate d'ammonium). Le tampon d'électrophorèse contient 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 nM glycine et 0.1% (p/v) SDS. Après la migration des protéines, les gels sont fixés pendant 30 min dans une solution contenant 25% d'alcool dénaturé et 8% d'acide acétique, puis colorés au bleu de Coomassie R-250 (Weber et Osborn, 1969). Les poids moléculaires apparents sont estimés en calculant la mobilité relative des polypeptides par rapport aux protéines de référence suivantes: phosphorylase b (94 kDa), albumine sérique de boeuf (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur trypsique du soja (20.1 kDa) et α -albumine du lait (14.4 kDa).

2.2.7. Préparation de chloroplastes et d'enveloppes de chloroplastes préalablement traités à la thermolysine (*Bacillus thermoproteolyticus*, Calbiochem)

Des chloroplastes sont préparés comme sous 2.2.3.1 puis traités à la thermolysine selon Joyard et al. (Methods in Enzymology vol. 148, pp 195-206, 1987). Les chloroplastes (1 mg chlorophylle/ml) sont incubés, 1 h à 4°C sous agitation faible et constante, dans 20 ml d'une solution de digestion contenant: 330 mM de saccharose, 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 1 mM CaCl_2 et 200 µg/ml thermolysine (concentration finale). La digestion est stoppée par l'ajout de 10 mM EGTA. Les chloroplastes servant de contrôle sont incubés dans les mêmes conditions, mais la solution de digestion contient déjà l'EGTA. Après la digestion, les chloroplastes intacts sont repurifiés par centrifugation 5000 x g (5500 rpm, rotor HB-4) à travers une solution contenant: 40% Percoll, 330 mM sucrose, 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8) et des inhibiteurs de

protéases (5 mM acide ϵ -aminocaproïque, 1 mM benzamidine-HCl et 1 mM "phenylmethylsulfonyl fluoride"). Le culot ainsi obtenu est lavé deux fois par centrifugation à 3500 x g (1500 rpm, rotor SS-34) avec une solution de lavage (10 volumes pour 1 volume de suspension de chloroplastes) contenant: 330 mM saccharose, 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 5 mM acide ϵ -aminocaproïque, 1 mM benzamidine-HCl et 1 mM "phenylmethylsulfonyl fluoride". On obtient finalement des chloroplastes intacts traités à la thermolysine dont on peut purifier les enveloppes selon 2.2.1, en prenant soin d'ajouter des inhibiteurs de protéases aux solutions utilisées.

2.2.8. Préparation enzymatique de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en présence de NDPKII recombinante d'Epinard.

La conversion de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ est réalisée en présence de 10 mM Mops-NaOH (pH 7.6), 0.01 mM CDP, 5 mM MgCl_2 , 30 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et 0.1 μg d'une enzyme recombinant cloné à partir d'une banque cDNA d'Epinard, la nucléoside diphosphate kinase II (Bovet et al., 1997; T. Eggmann travail de diplôme, Laboratoire de Physiologie Végétale, Neuchâtel, 1997). L'échantillon, d'un volume final de 20 μl , est incubé 5 min à 25°C puis filtré par centrifugation à l'aide du système microcon 10 (Amicon, microconcentrateurs, N° 42406) afin d'éliminer les protéines. L'échantillon ainsi obtenu contient du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, CDP, MgCl_2 et du Mops-NaOH. Afin de purifier le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, l'échantillon est déposé sur une plaque de PEI-Cellulose (TLC PEI-Cellulose F, Merck) puis séparé par chromatographie dans une cuve à l'aide d'un solvant contenant 0.75 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 3.65) pendant 1 h. La plaque est placée 1 min en autoradiographie (film Kodak X-OMAT AR) afin de déterminer l'emplacement du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ sur la plaque de PEI-cellulose. Le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ est gratté à l'aide d'une lame de rasoir, puis élué dans un tube Eppendorf à l'aide de 50 μl de 50 mM Mops-NaOH (pH 7.6). L'échantillon est alors centrifugé à 16000 x g (14000 rpm, Centrifuge 5415 Eppendorf) pendant 30 s. L'activité du surnageant, contenant le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ pur, est quantifiée par le procédé de Cerenkov. Le surnageant est finalement conservé à -30°C.

2.2.9. Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités lipide-kinasiques dans des fractions membranaires

Des fractions aliquotes de membranes d'enveloppes (totales, internes ou externes) ou de membranes plasmiques (200 µg) sont incubées à 25°C pendant 5 min dans une solution (200 µl) contenant 50 mM Mops-NaOH (pH 7.6), 10 µCi [γ -³²P]ATP, 0.01 mM ATP et 5 mM MgCl₂. L'incubation est démarrée, selon le type d'incubation, par l'ajout des membranes ou de l'ATP ([γ -³²P]ATP + ATP). La réaction est arrêtée en déposant les échantillons dans des tubes en verre contenant 1.5 ml d'une solution froide de chloroforme/méthanol (1:2, v/v).

2.2.10. Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités lipide-kinasiques dans un extrait protéique de stroma

Les activités lipide-kinasiques sont déterminées par la mesure de l'incorporation de [γ -³²P]ATP dans les lipides phosphorylés à 25°C, selon une méthode proche de celle établie par Wissing et al. (1989). Le milieu d'incubation standard contient dans un volume total de 200 µl: 25 à 50 µl de fraction enzymatique à tester (stroma), 40 mM Bis-Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA-Na₂, 1 mM spermine (polyamine, polycation, neutralise les charges de surface), 0.5 mM DTT (antioxydant), 0.03% Triton X-100, 1 mM déoxycholate de sodium, 500 µM dioleoylglycérol, 500 µM phosphatidylinositol, 250 µM cardiolipin et 0.01 mM ATP (contenant 10 µCi de [γ -³²P]ATP). Une solution stock de déoxycholate de sodium 8.3 fois concentrée permet de resuspendre le dioleoylglycérol, le phosphatidylinositol et la cardiolipine évaporés à sec par l'intermédiaire de quatre cycles de sonication de 20 s (50 W, Branson sonifier) suivis chaque fois par un refroidissement dans la glace pendant 2 min. Le milieu d'incubation (excepté l'ATP) est préincubé pendant 5 min à 25°C. L'incubation proprement dite est démarrée par l'ajout de l'ATP (0.01 mM ATP, contenant 10 µCi de [γ -³²P]ATP), puis stoppée 2 h plus tard en déposant l'échantillon sur une solution de chloroforme/méthanol (1:2, v/v) froid. L'extraction des lipides se fait comme sous 2.2.12.

2.2.11. Condition d'incubation standard pour la mise en évidence d'activités protéine-kinasiques dans des fractions membranaires

Des fractions aliquotes de membranes d'enveloppes (totales, internes ou externes) ou de membranes plasmiques (20 µg) sont incubées 5 min à 25°C dans une solution (20 µl) contenant 50 mM Mops-NaOH (pH 7.6), 1 µCi [γ -³²P]ATP, 0.01 mM ATP et 5 mM MgCl₂. L'incubation est démarrée, selon le type d'incubation, par l'ajout des membranes ou de l'ATP ([γ -³²P]ATP + ATP). La réaction est stoppée par l'ajout de 20 µl de tampon pour échantillon (voir sous 2.2.6) puis les fractions aliquotes sont chauffées à 100°C pendant 5 min.

2.2.12. Extraction des lipides membranaires

Une fois les échantillons déposés sur 1.5 ml de chloroforme/méthanol (1:2, v/v) froid, on ajoute successivement 100 nmoles de PA et LPA, 600 nmoles d'un mélange de phospholipides (PIP, PIP₂, PS et PI), 10 µl de 100 mM MgATP comme "carriers" non radioactifs, 0.8 ml HCl/EDTA-Na₂ (1.25N:0.5 mM) froid et 0.5 ml de chloroforme froid. Les échantillons sont vigoureusement agités à l'aide d'un vortex pendant 1 min, puis centrifugés 1 min à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200). La phase inférieure est récoltée à l'aide d'une pipette Pasteur et lavée une première fois avec 1 ml d'une solution froide de méthanol/HCl 1N (1:1, v/v) et finalement avec 1 ml d'une solution froide de méthanol/H₂O/25% NH₃ (10:8:2, v/v/v). La phase inférieure contenant les lipides est évaporée sous flux d'azote puis dissoute dans 100 µl d'une solution froide de chloroforme/méthanol (3:1, v/v). Toutes ces opérations se font à ~ 4°C dans de la glace. *Afin de prendre en compte d'éventuelles pertes lors de l'extraction des lipides, la quantité d'acides gras du MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) de chaque échantillon a été quantifiée selon la méthode décrite sous 2.2.15. Le MGDG est, dans notre système de solvant (chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau, 40:15.13:12:8), le lipide qui possède le Rf le plus distinct par rapport aux lipides phosphorylés.*

2.2.13. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) des lipides membranaires

2.2.13.1. CCM en milieu acide

Les échantillons contenant les lipides membranaires sont déposés automatiquement sur une plaque de silicagel 60 (Merck) à l'aide d'un applicateur Linomat (Camag). Cette dernière est préalablement plongée dans une solution contenant 250 ml 100 mM $K_2C_2O_4$ (pH 7.6), 4 ml 250 mM EDTA- Na_2 (pH 7.6) et 250 ml éthanol, séchée une nuit à 80°C et activée juste avant usage à 110°C pendant 20 min (Heim et Wagner, 1986). La migration des lipides se fait à température ambiante à l'aide d'un solvant formé de chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (40:15:13:12:8, v/v/v/v/v). Après 45 min, la plaque de silicagel est séchée sous un courant d'air puis sprayée avec une solution d'acétone/eau (60:40, v/v) contenant 0.01% de primuline (p/v). Les lipides peuvent être ainsi visualisés sous une lampe UV. La plaque est ensuite placée en autoradiographie (film Kodak X-OMAT AR) pendant une à deux nuits à -30°C, parfois en présence d'un écran intensifiant (Lightning Plus, Dupont de Nemours). L'incorporation de [γ - ^{32}P]ATP dans les phospholipides est quantifiée par comptage Cerenkov (les lipides marqués au ^{32}P sont grattés à l'aide d'une lame de rasoir, placés dans des tubes à scintillation, hydratés avec 100 μ l d' H_2O et placés dans un compteur à scintillation Kontron BETAmatic) ou à l'aide d'un système de mesure de la densité optique des tâches observées sur les autoradiographies (Bioimage).

2.2.13.2. CCM en milieu basique

Mis à part le solvant de migration utilisé, chloroforme/méthanol/ammoniaque/eau (90:90:7:22, v/v/v/v), le procédé est le même que sous 2.2.13.1.

2.2.13.3. CCM utilisée pour la séparation des phosphoinositides phosphorylés sur le groupement inositol en position D-3, des phosphoinositides phosphorylés sur le groupement inositol en position D-4

Les lipides marqués (phosphoinositides) séparés comme sous 2.2.13.1 sont grattés de la plaque de silicagel et extraits de la silice à l'aide de 2 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (53:37, v,v) et de 1 ml de KCl 500 mM. Ce mélange est vigoureusement agité (Vortex) pendant 1 min, puis centrifugé à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200) pendant 1 min. La phase inférieure est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur, séchée sous flux d'azote et finalement dissoute dans 20 µl de chloroforme/méthanol (3:1, v/v). La séparation des lipides par chromatographie sur couche mince se fait selon Hegewald (1996). Les échantillons contenant les lipides sont déposés (spot de 2 mm) automatiquement sur une plaque de silicagel HPTLC-NH₂ (art. 1.12572, Merck) [(préalablement imprégnée dans une solution de méthanol contenant 5% d'acide borique (p/v)] à l'aide d'un applicateur Linomat (Camag) à 10 mm du bas de la plaque. Cette dernière est équilibrée 2h avec le solvant de migration, 1-propyl acétate:2-propanol:éthanol/6% ammoniac (3:9:3:9, v/v/v/v), avant d'être développée jusque en haut (9 cm, ~2 h). Finalement, la visualisation des lipides se fait comme sous 2.2.13.1.

2.2.14. Détermination par déacylation des lipides phosphorylés, et analyse des groupements résiduels (glycérodérivés)

La réaction de déacylation des lipides se fait dans un milieu alcalin selon la méthode de Clarke et Dawson (1981). On ajoute aux lipides phosphorylés ainsi qu'à des lipides témoins 2 ml d'un réactif de méthylamine (tubes à vis) qui contient: 38.5% CH₃NH₂ dans du méthanol/cau/n-butanol (4:3:1, v/v/v). Les tubes contenant les échantillons sont fermés puis incubés 45 min à 53°C sous agitation intermittente. On ajoute aux échantillons, une fois refroidis dans de la glace, 1 ml de n-propanol froid. Ceux-ci sont ensuite centrifugés à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200) pendant 5 min. Les surnageants sont transférés dans des tubes de 10 ml puis évaporés à sec sous vide par distillation. On ajoute aux résidus secs 1 ml d'H₂O dist. et 1.2 ml d'une solution BEE composée de n-butanol/éther de pétrole 40°-70°/éthyl formiate (20:4:1). Les échantillons sont mélangés vigoureusement puis

centrifugés à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200) pendant 1 min. La phase supérieure est éliminée et la phase inférieure (aqueuse) lavée une deuxième fois avec 0.8 ml de BEE. On ajoute à la phase inférieure 10 mg de résine Dowex 50 W X 4 (forme H⁺) que l'on éliminera par centrifugation. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube puis complètement évaporée sous vide. Les résidus sont dissous dans 150 µl d'éthanol/H₂O (1:1). Les échantillons (60 µl) sont déposés (7 mm) à l'aide d'un applicateur Linomat (Camag) sur une plaque de silicagel 60 (HPTLC) préchauffée 20 min à 110°C. La plaque est développée (10 cm) dans un solvant contenant: 26 mM HCOOH/1mM EDTA-Na₂ dans une solution de méthanol/eau (40:10). Une fois la migration des groupements formés des têtes polaires et du glycérol terminée, la plaque est séchée sous un courant d'air puis giclée avec une solution de révélation pour esters phosphatés (1.5 g de molybdate d'ammonium dissout dans 20 ml de HClO₄ 70% + 1 ml de HCl conc. + 129 ml d'H₂O). La plaque est soumise à l'action des rayons UV (254 nm) pendant au moins 1 h ce qui permet la visualisation des esters phosphatés qui apparaissent en bleu sur fond blanc. La plaque, recouverte d'une feuille de plastique autocollante, est placée en autoradiographie (film Kodak X-OMAT AR) pendant une à deux nuits à -30°C, parfois en présence d'un écran intensifiant (Lightning Plus, Dupont de Nemours). Les Rf's des taches radioactives sont comparés avec les Rf's d'esters phosphatés connus.

2.2.15. Quantification du monogalactosyldiacylglycérol par chromatographie en phase gaseuse (GC)

Les zones de silices contenant le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) sont grattées individuellement à l'aide d'une lame de rasoir. La silice contenant le lipide à quantifier par GC (MGDG, rarement DGDG) est récupérée dans un tube contenant une quantité connue (30 à 50µg) d'acide arachidonique (C20:0) qui sert de standard interne. On ajoute une solution de méthanol contenant 5% d'acide sulfurique (1 ml) puis le tube est saturé en azote, fermé et finalement placé 1h dans un bloc chauffant à 85°C. Après refroidissement, 2 ml de pentane et 1 ml d'eau sont ajoutés; les tubes sont agités 30 secondes et centrifugés à 2100 x g (3800 rpm, centrifugeuse universelle Hettich 1200) pendant 5 min pour former deux phases distinctes. L'épiphase contenant les méthylesters est prélevée et séchée sous azote. Les échantillons sont

resuspendus dans 120 μ l d'hexane puis injectés dans le chromatographe en phase gazeuse afin de déterminer et quantifier les acides gras. Le chromatographe est un appareil de marque Hewlett-Packard (modèle 5890, série II) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire de 30 m de longueur et 0.53 mm de diamètre intérieur renfermant un film de 1 μ m de polyéthylène-glycol-TPA modifié (HP-FFAP). La température du four est de 190°C, celles du détecteur et de l'injecteur de 230°C. Les méthylesters sont élués par un flux d'hélium (vitesse : 15 ml/min.). L'identité des méthylesters est obtenue par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des substances de référence. La quantification se fait par comparaison de la surface des pics avec celle du standard interne.

2.2.16. Mesure de l'activité enzymatique de la 1,3- β -glucane synthétase

L'activité de la 1,3- β -glucane synthétase est mesurée selon Ray (1977). Le milieu d'incubation (100 μ l) contient: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20% glycérol, 10 mM CaCl_2 , 0.05% digitonine, 0.5 mM UDP-glucose (0.36 nCi/nmol) et 3 à 7 μ g de protéines d'échantillon. L'incubation est stoppée après 10 min à 30°C par l'ajout de 1 ml d'éthanol 94%. Les échantillons sont laissés une nuit à 4°C. Après l'ajout d'une pointe de spatule de cellulose WCF11 fibrous (Sigma), les échantillons sont énergétiquement agités (Vortex) pendant 10 s puis centrifugés 3 min à 16000 x g (14000 rpm, Centrifuge 5415 Eppendorf). Le surnageant est éliminé, et le culot lavé trois fois avec de l'éthanol 70% puis redissous dans du liquide à scintillation. Finalement la radioactivité contenue dans les polymères de glucose formés est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Kontron BETAmatic et comparée à celle d'un échantillon ne contenant pas d'extrait enzymatique.

2.2.17. Hydrolyse des lipides X et Y à l'aide d'une β -1,4-galactosidase

Les zones de silice contenant les lipides X et Y sont grattées à l'aide d'une lame de rasoir. Les lipides sont extraits de la silice à l'aide de 4 ml de chloroforme/méthanol (53:37) auxquels on ajoute 2 ml de KCl 500 mM. La phase inférieure contenant les lipides est récupérée puis évaporée sous un flux d'azote. Les lipides subissent alors une deuxième CCM

sur des plaques de silicagel 60 (Merck) à l'aide d'un solvant de migration composé de chloroforme/méthanol/ammoniaque/eau (90:90:7:22, v/v/v/v). Cette ultime séparation permet d'éliminer d'éventuels chevauchement des lipides X et Y avec d'autres lipides. Les lipides X et Y sont à nouveau récupérés, comme indiqué ci-dessus.

2.2.18. Rupture des liaisons éthers des lipides X et Y par hydrolyse acide

Les lipides X et Y sont récupérés comme sous 2.2.17. Les résidus lipidiques secs subissent alors une hydrolyse acide à 90°C pendant 2h en présence de 0.1 M HCl dans un volume minimum. L'échantillon est alors évaporé à sec sous vide par distillation et remis en suspension dans 20 µl d'une solution d'éthanol/H₂O (1:1) puis on ajoute à chaque échantillon quelques mg de résine Dowex 50 W x 4 (forme H⁺).

2.2.19. CCM d'hexoses et d'hexoses phosphatés

Des échantillons d'hexoses (100 mM glucose, 100 mM galactose), d'hexoses phosphates (100 mM glucose-1-P, 100 mM glucose-6-P, 100 mM galactose-1-P et 100 mM galactose-6-P) et d'hexoses phosphates marqués au ³²P (glucose-6-³²P et galactose-6-³²P) sont traités avec quelques mg de résine Dowex 50 W x 4 (forme H⁺). Environ 2 µl de chaque hexose ainsi que 2 µl des échantillons X et Y préparés selon 2.2.24. sont déposés à l'aide d'une pipette automatique sur une plaque de silicagel 60 (Merck) ou une plaque de cellulose. Deux types de solvant de migration sont utilisés pour séparer les sucres. Si on utilise une plaque de silicagel, le solvant de migration sera composé d'une solution de méthanol/eau (40:10) contenant 26 mM HCOOH/1mM EDTA-Na₂; par contre, si on utilise une plaque de cellulose, le solvant de migration sera composé d'une solution de méthanol/acide formique/eau (85:15:5).

2.2.20. Préparation enzymatique de glucose-6-³²P et de galactose-6-³²P

Le glucose-6-³²P et de galactose-6-³²P sont préparés en incubant pendant 10 minutes à 25°C du glucose 100 mM ou du galactose 100 mM en présence de [γ -³²P]ATP 10 μ Ci et d'une unité d'hexokinase de Levure (EC 2.7.1.1) dans un milieu constitué de Mops 50 mM et MgCl₂ 5 mM. Les sucres sont analysés comme sous 2.2.19 puis récupérés à partir de la plaque par grattage et élués de la silice à l'aide du solvant de migration.

CHAPITRE 3

Etude de la phosphorylation *in vitro* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard: Identification et localisation des principaux lipides phosphorylés.

3.1. Introduction

De nombreuses publications démontrent l'implication de certains lipides tels le diacylglycérol, l'acide phosphatidique, l'acide lysophosphatidique et les phosphoinositides dans des processus de transmission de signaux et comme activateurs d'activités enzymatiques (PKC) dans les cellules animales et végétales. Certains de ces lipides dérivent d'activités lipide-kinasiques qui modulent la transmission des signaux en produisant ou transformant les lipides cités plus haut. Ces activités sont impliquées notamment dans un mécanisme de transmission de signaux au niveau de la membrane plasmique appelé le système PI ou cycle PI (voir chapitre 1).

Chez les végétaux, les activités lipide-kinasiques en relation avec la transmission des signaux sont un sujet d'intérêt grandissant depuis une dizaine d'années. On retrouve ces activités lipide-kinasiques dans différents compartiments cellulaires (voir chapitre 1). Selon Wissing et al. (1992), parmi les membranes cellulaires végétales (membranes mitochondriales, membranes du tonoplaste et membranes nucléaires), la membrane plasmique est celle qui exhibe les plus fortes activités diacylglycérol-, phosphatidylinositol- et phosphatidate-kinasiques. L'activité diacylglycérol-kinasique, que l'on peut observer dans des préparations de microsomes, est même considérée comme un marqueur spécifique de la membrane plasmique (Wissing et Wagner 1992).

Le chloroplaste, qui est le siège de nombreuses voies métaboliques, doit échanger des métabolites, des ions et d'autres composés avec le cytosol; il doit également importer des protéines importantes pour son fonctionnement physiologique. Ainsi, afin de communiquer avec le reste de la cellule, il n'est pas exagéré d'imaginer que le chloroplaste (via la membrane

de l'enveloppe) pourrait utiliser certains des mécanismes de transmission de signaux observés dans d'autres membranes (Siegenthaler et al., 1997).

3.2. But du chapitre

Bien que de nombreux travaux relatent la présence d'activités lipide-kinasiques dans les cellules végétales, la phosphorylation *in vitro* de lipides dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste n'a pas encore été démontrée.

Le but de ce chapitre est de déterminer si les membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard présentent des activités lipide-kinasiques. Ce type d'activités étant l'apanage des membranes plasmiques, nous devons également déterminer si nos préparations d'enveloppes sont dépourvues de contaminations issues de la membrane plasmique.

3.3. Résultats

Comme on peut le voir dans la bande 2 de la figure 3.1, suite à une incubation *in vitro* des membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard avec du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, quatre lipides radioactifs majeurs (A, B, C, D) peuvent être séparés sur plaques de CCM. L'incorporation de ^{32}P dans les lipides A et B est plus marquée que dans les lipides C et D. Une faible bande additionnelle (*) apparaît également (mais pas dans toutes les expériences) entre le Rf des lipides A et B. Si l'on se réfère uniquement aux Rfs des lipides marqueurs, l'identité des lipides A, B, C et D peut être respectivement attribuée au PA, LPA, PIP et PIP_2 . Les lipides que l'on trouve habituellement dans les membranes d'enveloppes (Douce et Joyard, 1982) sont également montrés dans la figure 3.1. (bande 1). On remarque qu'à l'exception du lipide B, aucun des lipides phosphorylés ne comigre avec les lipides de l'enveloppe que l'on peut visualiser après révélation par carbonisation (voir chapitre 2).

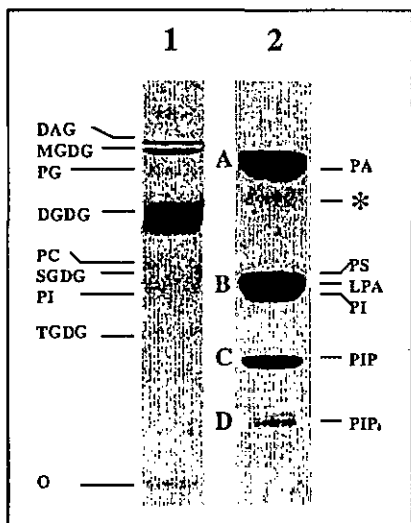


Fig. 3.1. Séparation des lipides et des lipides phosphorylés de membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Colonne 1: Après extraction et séparation des lipides par CCM, ceux-ci sont révélés par carbonisation. Les différents lipides sont indiqués sur la gauche de la colonne 1. Colonne 2: Autoradiographie des lipides phosphorylés. Les lipides des membranes de l'enveloppe sont phosphorylés comme indiqué dans le chapitre 2. Ceux-ci sont ensuite extraits en présence de lipides "carriers" (PA, LPA, PS, phosphoinositides), puis séparés par CCM et détectés par autoradiographie. A, B, C et D indiquent les quatre lipides phosphorylés majeurs. La position de migration des lipides "carriers" est indiquée sur la droite de la colonne 2. L'étoile (*) indique la position d'un lipide phosphorylé non-identifié.

Afin de confirmer l'identité des lipides A, B, C, et D, nous les avons tout d'abord déacylés (voir chapitre 2), puis nous avons séparé les groupements glycérol-têtes polaires, résultant de la déacylation des lipides, par CCM à haute performance (CCMHP). Le Rf de ces groupements est ensuite comparé avec celui de marqueurs que l'on fait comigrer. La figure 3.2 montre que les groupements glycérol-têtes polaires des lipides A et B sont identiques et correspondent à du glycérol-3-phosphate (GP).

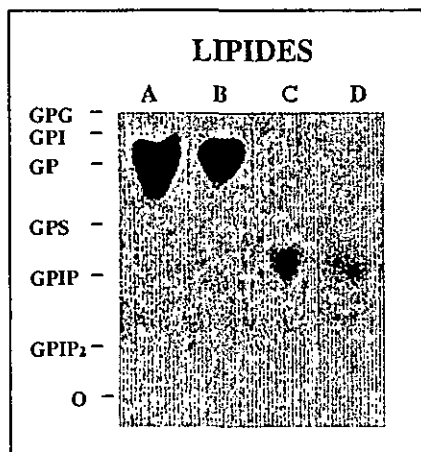


Fig. 3.2. Autoradiographie des groupements glycérol-têtes polaires des lipides phosphorylés A, B, C et D de l'enveloppe (voir Fig. 3.1.). Les lipides phosphorylés A, B, C et D sont récupérés à partir de la CCM à l'aide d'une lame de rasoir puis déacylés comme indiqué dans le chapitre 2. Les têtes polaires sont ensuite séparées sur des plaques de CCMHP en présence de références (GPG, GPI, GP, GPS, GPIIP et GPIIP₂).

Ce résultat indique que ces deux lipides A et B diffèrent uniquement par le nombre de leurs chaînes d'acides gras et correspondent, respectivement, à l'acide phosphatidique (PA) et l'acide lysophosphatidique (LPA), comme nous l'avions déduit en comparant leur Rf avec celui du PA et du LPA (voir Fig. 3.1.). Les groupements glycérol-têtes polaires des lipides C et D sont également les mêmes et comigrent avec le glycérophospho-D-myo-inositol-4-monophosphate (GPIP). Ce résultat confirme notre supposition, à savoir que l'identité du lipide C est du phosphatidylinositol-4-monophosphate (PIP). Par contre, la déacylation du lipide D (présumé être du PIP₂, voir Fig. 3.1.) aurait dû aboutir à la formation de glycérophospho-D-myo-inositol-4,5-bisphosphate (GPIP₂) ce qui n'est pas le cas. Cette observation suggère fortement que le lipide D correspond en fait au lysophosphatidylinositol-4-monophosphate.

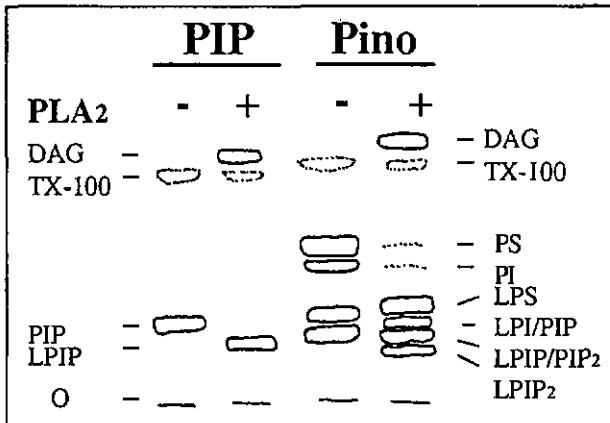


Fig. 3.3. Séparation par CCM du phosphatidylinositol-4-monophosphate (PIP) et des phosphoinositides PS, PI, PIP et PIP₂ (Pino), préalablement traités (+) ou non-traités (-) avec de la PLA₂ de pancréas de porc (1h à 30°C) dans un milieu contenant de la Tricine 50 mM pH 8.5, du CaCl₂ 2 mM, du NaCl 35 mM et du Triton X-100 0.03%. Après avoir "sprayé" la plaque de CCM à l'aide d'une solution de primuline, les lipides sont visualisés sous une lampe U.V. Les bandes correspondant aux différents lipides sont reportées sur un papier calque.

Lorsque l'on traite *in vitro* du PIP avec une phospholipase A₂ de pancréas de porc (PLA₂), le lysodérivé résultant (LPIP) comigre avec PIP₂ dans nos conditions expérimentales (voir Fig. 3.3.). L'ensemble de ces résultats confirme donc que le lipide D est bien du LPIP.

La figure 3.4 montre que le profil ainsi que l'intensité du marquage des lipides phosphorylés sont différents dans des préparations de membranes totales, externes et internes de l'enveloppe du chloroplaste. En général, l'intensité du marquage au ³²P des lipides phosphorylés est plus grande dans les vésicules totales d'enveloppes que dans les vésicules externes ou internes. Le PIP et le LPIP marqués radioactivement se retrouvent exclusivement localisés dans la membrane externe de l'enveloppe, contrairement au PA et LPA marqués radioactivement qui se trouvent principalement situés dans la membrane interne de celle-ci. La

présence de petites quantités de PA et LPA (env. 15%) dans la membrane externe est probablement le reflet d'une contamination par la membrane interne et/ou d'une petite activité DAG-kinasique.

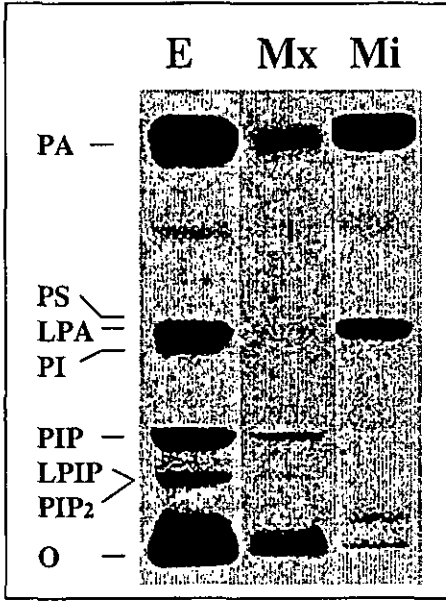


Fig. 3.4. Comparaison du profil autoradiographique des lipides marqués au ³²P dans les membranes totales (E), externes (Mx) et internes (Mi) de l'enveloppe. La position de migration des lipides marqueurs est indiquée sur la gauche de la figure. O, origine de la migration. On remarque que le lipide LPIP possède le même Rf que le lipide PIP₂, voir explication ci-dessus dans le texte.

A notre connaissance, il s'agit de la première fois que l'on fait état de la présence de lipides phosphorylés dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Il est dès lors nécessaire de démontrer que les préparations de membranes d'enveloppes ne sont pas contaminées par d'autres systèmes membranaires. L'absence de contamination des chloroplastes par d'autres compartiments cellulaires a déjà été démontrée par Douce et Joyard (1982) et Uemura et Steponkus (1997). Il en résulte que les préparations de chloroplastes ne sont contaminées ni par des membranes des mitochondries, du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou du tonoplaste, ni par des membranes plasmiques. Néanmoins, comme la membrane plasmique végétale est reconnue pour présenter les activités DAG- et PI-kinasiques les plus élevées parmi les membranes végétales (Wissing et al., 1992), il nous a semblé important de démontrer que nos préparations de membranes de l'enveloppe du chloroplaste sont dépourvues d'une éventuelle contamination par des membranes plasmiques. En effet,

lorsque l'on compare les activités DAG- et PI-kinasiques de l'enveloppe (voir Tableau 3.1.) avec celles de la membrane plasmique (Hanenberg et al., 1995; Sommarin et Sandelius, 1988), ces deux activités enzymatiques sont respectivement 2000 et 3000 fois plus faibles dans l'enveloppe du chloroplaste. Toutefois, ce type de comparaison doit être considéré avec circonspection car les milieux d'incubations des essais enzymatiques (par exemple la concentration d'ATP) diffèrent fortement.

Tableau 3.1.

Incorporation de phosphate [^{32}P] et de phosphate total dans les quatre lipides marqués majeurs de l'enveloppe			
Lipide	Cpm	^{32}P incorporé ($\text{fmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Pi total incorporé ($\text{fmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
PA	3465 \pm 133	1.05 \pm 0.04	630 \pm 24
LPA	781 \pm 110	0.23 \pm 0.03	138 \pm 18
PIP	527 \pm 54	0.15 \pm 0.016	90 \pm 9
LPIP	57 \pm 13	0.017 \pm 0.003	10.2 \pm 1.8

Les résultats sont exprimés en cpm ou $\text{fmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ et représentent une moyenne \pm SD (n=4). Le Pi total incorporé ($\text{fmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) = ^{32}P incorporé ($\text{fmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) \times concentration totale de l'ATP dans le milieu réactionnel (fmol)/concentration totale de ^{32}P ATP dans le milieu réactionnel (fmol).

Trois tests ont été effectués dans le but de démontrer l'absence de contamination par la membrane plasmique dans nos préparations d'enveloppes de chloroplaste. Premièrement, comme illustré dans la figure 3.5A, les profils électrophorétiques des protéines de la membrane de l'enveloppe (E) et de la membrane plasmique (P) sont très différents. En particulier, nous pouvons désigner au moins quatre bandes (★) exclusivement localisées dans la membrane plasmique. De plus, le profil autoradiographique correspondant, qui montre les protéines phosphorylées de ces deux types de membranes, révèle la présence de bandes spécifiques (★) dans chacune des deux membranes (Fig. 3.5.B). Deuxièmement, la comparaison des profils autoradiographiques des lipides phosphorylés des membranes de l'enveloppe (E) et des membranes plasmiques (P) montrent que les membranes plasmiques contiennent un certain nombre de lipides phosphorylés (★) qui ne sont pas détectés dans les membranes de l'enveloppe (Fig. 3.6.). Cette figure montre également que les activités lipide-kinasiques (pour une même quantité de protéines) sont plus importantes dans les membranes plasmiques que dans les membranes de l'enveloppe. Troisièmement, la figure 3.7 indique que l'activité 1,3- β -

glucane synthétase, spécifiquement associée aux membranes plasmiques (Ray, 1977), est uniquement détectée dans ces dernières et pas dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste.

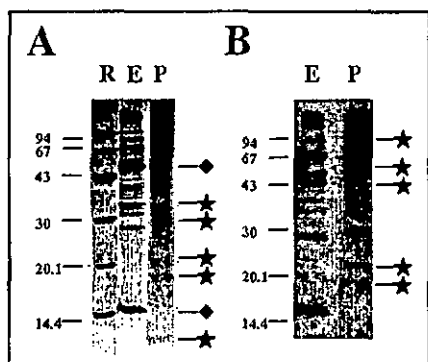


Fig. 3.5. Comparaison des protéines (A) et des protéines phosphorylées (B) dans les membranes de l'enveloppe (20 µg) du chloroplaste d'Epinard et les membranes plasmiques (20 µg). A: Protéines révélées au bleu de Coomassie. B: Protéines phosphorylées détectées par autoradiographie. R, protéines de référence (LMW); E, membrane de l'enveloppe; P, membrane plasmique; ◆, petite et grande sous-unités de la RubisCO, associées principalement à la membrane de l'enveloppe; ★, position des protéines majeures de la membrane plasmique qui sont distinctes de la membrane de l'enveloppe.

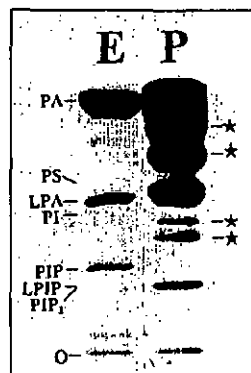


Fig. 3.6. Comparaison des profils autoradiographiques des lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe (E) et de la membrane plasmique (P) pour une même quantité de protéines (0.2 mg). La position de migration des lipides de référence est indiquée sur la gauche de la figure. O, origine de la migration; ★, lipides phosphorylés exclusivement trouvés dans la membrane plasmique.

Ainsi, ces trois tests, *i.e.* la comparaison des protéines (Fig. 3.5.A), des protéines et lipides phosphorylés (Fig. 3.5.B et 3.6) ainsi que l'activité de la 1,3- β -glucane synthétase (Fig. 3.7) dans ces deux types de membranes excluent la possibilité d'une contamination des membranes de l'enveloppe par des membranes plasmiques. Cette dernière conclusion est en accord avec les travaux de Douce et Joyard (1982) et Blée et Joyard (1996).

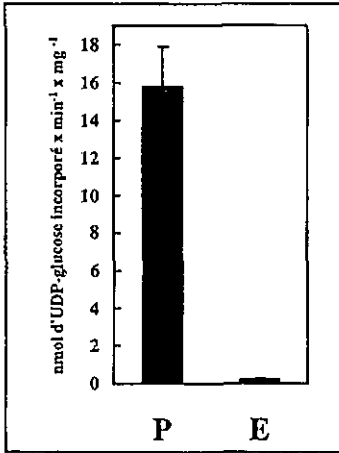


Fig.3.7. Comparaison de l'activité de la 1,3-β-glucane synthétase dans des échantillons de membranes d'enveloppes (E) et de membranes plasmiques (P).

La figure 3.8 montre une autoradiographie de la séparation du PIP phosphorylé de l'enveloppe sur plaque de silice CCMHP NH₂ imprégnée de borate (voir chapitre 2). Dans la colonne A de cette figure, nous remarquons que, dans ce système, le PIP se sépare en deux taches distinctes. Ce résultat est dû à la propriété de l'isomère D-4, mais pas D-3 de l'inositol, de former des complexes avec l'acide borique et ainsi d'être retardé lors de la chromatographie (Hegewald, 1996).

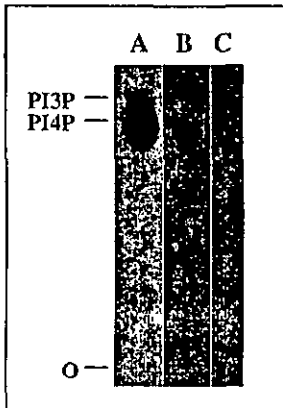


Fig. 3.8. Autoradiographie du PIP phosphorylé dans les membranes de l'enveloppe après séparation sur plaque de silice CCMHP NH₂ imprégnée de borate. A, PIP phosphorylé dans la membrane de l'enveloppe; B et C, taches, respectivement inférieure et supérieure, récupérées de la colonne A. PI4P, position de migration du phosphatidylinositol-4-monophosphate. PI3P, position de migration supposée du phosphatidylinositol-3-monophosphate selon la méthode de séparation des lipides utilisée (cf. texte). O, origine de migration.

Les colonnes B et C montrent respectivement les isomères D-4 et D-3 séparés dans ce même système après avoir été récupérés de la colonne A. Il paraît donc probable que les membranes

de l'enveloppe du chloroplaste recèlent non seulement une activité PI-4-kinasique mais également une légère activité PI-3-kinasique.

Afin de confirmer le résultat obtenu ci-dessus, nous avons phosphorylé les membranes de l'enveloppe en présence de Triton X-100. En effet, les activités PI-3-kinasiques (PI-kinase de type I) sont inhibées par des détergents non-ioniques (Triton X-100), alors que les deux autres types de PI-kinases connus (PI-4-kinase de type II et PI-4-kinase de type III) ne le sont pas (Okpodu et al., 1995). La figure 3.9 montre l'effet du Triton X-100 sur la phosphorylation du PI dans la membrane de l'enveloppe du chloroplaste.

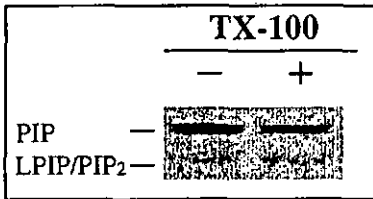


Fig. 3.9. Autoradiographie après séparation sur CCM du PIP et LPIP phosphorylés de membranes d'enveloppes du chloroplaste incubées en présence (+) ou en absence (-) de Triton X-100 (TX-100). Les Rf des lipides de références sont indiqués sur la gauche de la figure.

Nous remarquons qu'une concentration de 0.03% de Triton X-100 inhibe partiellement (65 +/- 5% d'inhibition; comptage Cerenkov: PIP-, 331 +/- 14 cpm; PIP+, 146 +/- 15 cpm) le marquage du PIP et donc par corrélation la phosphorylation du PI par la (les) PI-kinase(s) de l'enveloppe du chloroplaste. Par contre, la présence de détergent n'inhibe pas ou peu (<7% d'inhibition) le marquage du LPIP. Ce résultat suggère également la présence d'une activité PI-kinasique de type I sensible aux détergents non-ioniques. De plus, comme nous l'indiquons dans le chapitre 4, la wortmannin, un inhibiteur des activités PI-3-kinasiques (Fry, 1994), inhibe fortement la phosphorylation du PI en PIP dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Ces résultats suggèrent la présence de deux types d'activités PI-kinasiques (PI3- et PI4-kinasique).

3.4. Conclusions

En conclusion, les résultats du chapitre 3 montrent pour la première fois que des produits d'activités lipide-kinasiques (PA, LPA, PIP et LPIP) sont présents dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste suite à une phosphorylation *in vitro* en présence de [γ -³²P]ATP (Fig. 3.1.). Bien que nous n'ayons pas mis en évidence, par déacylation, la présence de PIP₂

dans les membranes d'enveloppes, nous avons la conviction que ce lipide y est également présent. En effet, de nombreuses figures (Fig. 4.9, 5.2, 6.3, 6.6) indiquent la présence de deux bandes distinctes marquées radioactivement au niveau du Rf du PIP₂. La comparaison des activités lipide-kinasiques des membranes de l'enveloppe avec celles de membranes plasmiques nous montre que ces dernières ont des activités lipide-kinasiques bien plus fortes (Fig. 3.6.). Cette différence d'intensité d'activité explique probablement pourquoi les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste ont jusqu'ici échappées à l'observation. La présence de deux types de familles de lipides phosphorylés (PA/LPA et PIP/LPIP) suggère qu'au moins deux types d'activités lipide-kinasiques sont présentes dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Cependant, selon les résultats montrés dans les figures 3.8 et 3.9, il est très probable que la présence de PIP soit due à deux types d'activités PI-kinasiques (PI-3-K et PI-4-K). De plus, la présence simultanée de PA et PIP, et de leurs lysodérivés, peut-être due soit à une activité phospholipase A₂(ou A₁) endogène ou alors à deux autres types de lipides kinases; notamment une lysodiacylglycérol kinase et une lysophosphatidylinositol kinase. Etant donné que l'incorporation de ³²P dans le LPIP n'est, contrairement à celle du PIP, pas inhibée par un détergent non-ionique; il est probable que le LPIP serait issu plutôt d'une activité LPI-kinasique (insensible au détergent) que d'une éventuelle hydrolyse par une PLA₂. A ce stade de notre recherche, nous ne pouvons que spéculer sur les rôles physiologiques des lipides kinases de l'enveloppe du chloroplaste. En effet, nous pouvons imaginer que les lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste sont impliqués dans des mécanismes de transmission de signaux ou de régulations métaboliques, comme c'est le cas dans d'autres compartiments cellulaires (Kano et al., 1993; Boss, 1989; Drobach, 1993; Moolenaar, 1995; Coté and Crain, 1993). Néanmoins, ce chapitre nous permet d'entrer dans un sujet de la physiologie végétale aussi intéressant qu'encore mal compris. Quel est, en effet, le rôle précis des lipides phosphorylés comme messagers secondaires et régulateurs d'activités enzymatiques?

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication récente ainsi que de deux présentations de posters qui comprennent l'essentiel du travail consigné ci-dessus (Siegenthaler, Müller et Bovet, 1997; Müller et al., 1995; Müller et al., 1996).

CHAPITRE 4

Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinaud: Effet de divers facteurs chimiques et physiques

4.1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre 3 que les membranes de l'enveloppe du chloroplaste possèdent au moins deux types d'activités lipide-kinasiques (DAG-kinasique et PI-kinasique). Ces deux types d'activités ne sont pas réparties de manière égale entre les membranes externes et internes de l'enveloppe du chloroplaste. En effet, nous avons mesuré une activité PI-kinasique nettement plus élevée dans les membranes externes que dans les membranes internes. Ces dernières, contrairement aux membranes externes, semblent contenir essentiellement une activité DAG-kinasique.

De même que les protéines kinases, les lipides kinases ont besoin d'un certain nombre de facteurs chimiques et physiques pour être pleinement actives. Ainsi, l'amplitude des activités lipide-kinasiques dans les végétaux dépend fortement (*in vitro*) de la concentration de Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP et de détergents dans le milieu d'incubation. D'autres facteurs comme la température et le pH du milieu d'incubation ont également une influence sur ce type d'activités. La dépendance des activités lipide-kinasiques vis-à-vis de ces différents facteurs chimiques et physiques varie fortement d'une espèce végétale à l'autre. Elle varie également en fonction de l'origine (fraction cellulaire membranaire ou soluble) de celles-ci (Sommarin et al., 1988; Hancock et al., 1995; Okpodu et al., 1995; Wissing et al., 1992).

4.2. But du chapitre

Aucune étude sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinaud n'a été réalisée jusqu'à présent. Ainsi, nous établirons dans ce chapitre, les conditions

expérimentales optimales qui permettent de mettre en évidence les différentes activités lipide-kinasiques endogènes de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste.

A cette fin, nous étudierons l'effet de divers paramètres chimiques et physiques susceptibles d'influencer la phosphorylation *in vitro* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinarde. De cette façon, nous espérons mieux caractériser les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste et permettre ainsi une comparaison avec d'autres activités lipide-kinasiques connues.

4.3. Résultats

Afin de déterminer le temps d'incubation pendant lequel l'incorporation de ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe du chloroplaste est croissante et linéaire, ainsi que le temps d'incubation nécessaire à une incorporation maximum, nous avons phosphorylé des membranes d'enveloppes et récolté des fractions aliquotes en fonction du temps.

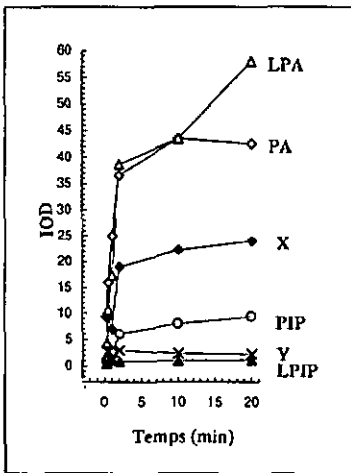


Fig. 4.1. Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinarde en fonction du temps d'incubation. IOD: densité optique intégrée. La linéarité de la relation entre les cpm et l'IOD mesurée à partir de l'autoradiographie a été vérifiée par comptage Cerenkov. X et Y: lipides non-identifiés apparaissant parfois marqués radioactivement dans ces conditions expérimentales. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mole.

La figure 4.1 montre en A le profil autoradiographique des lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste que l'on obtient après un temps d'incubation de 10 minutes. Sur le graphique de cette même figure en B on peut voir que l'incorporation du ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe est plus ou moins linéaire pendant un temps d'incubation ne dépassant pas 3

minutes. Un temps d'incubation plus élevé mène à un plateau d'incorporation maximum qui est atteint pour la plupart des lipides déjà après 5 à 15 minutes d'incubation. Seule la quantité de ^{32}P incorporé dans l'acide lysophosphatidique augmente après un temps d'incubation dépassant 15 minutes. Pour un temps d'incubation de 5 minutes, près de 90% du maximum d'incorporation du ^{32}P dans chaque lipide est atteint (sauf pour LPA). Pour cette raison, nous avons décidé de choisir une période d'incubation de 5 minutes pour la suite de nos expériences. Le lecteur remarquera que nous avons également indiqué dans la figure 4.1 la présence de deux lipides phosphorylés mineurs non-identifiés (X et Y) dont il sera question plus loin (voir chapitre 5).

Afin de déterminer la concentration minimale de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ requise dans le milieu d'incubation pour mesurer l'incorporation de ^{32}P dans les lipides des membranes de l'enveloppe du chloroplaste, nous avons incubé ces dernières en présence de concentrations croissantes d'ATP radioactif (N.B.: le milieu ne contient pas d'ATP non-radioactif).

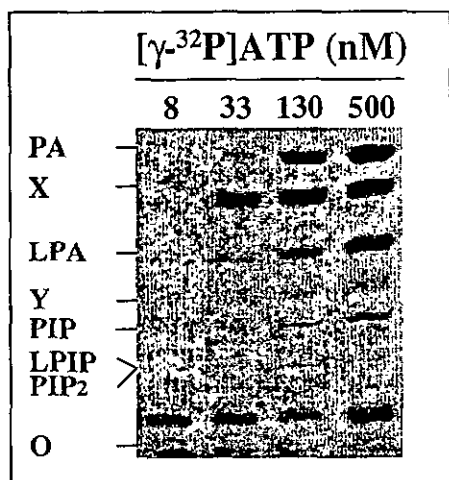


Fig. 4.2. Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste en présence de quantités croissantes d'ATP radioactif. Dans des conditions d'incubation sans ATP non-radioactif, des membranes d'enveloppes sont phosphorylées en présence de concentrations croissantes de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (8 nM, 33 nM, 133 nM, 500 nM). Les lipides sont ensuite extraits et séparés par CCM comme indiqué dans le chapitre 2. Activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmoles.

La figure 4.2 montre clairement qu'en absence d'ATP non-radioactif, les deux lipides (X et Y, mais préférentiellement X) apparaissent nettement plus marqués (proportionnellement aux autres lipides) qu'en présence d'ATP non-radioactif (comparez la figure 3.1. avec la figure 4.2. représentant la condition à 33 nM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$). Cette particularité, propre à ces deux lipides (marqués radioactivement dans ces conditions bien particulières), sera discutée plus loin dans ce chapitre. Dès lors, nous ne pouvons plus

uniquement parler de quatre lipides majeurs phosphorylés dans les enveloppes de chloroplaste mais bien de six lipides phosphorylés majeurs et distincts.

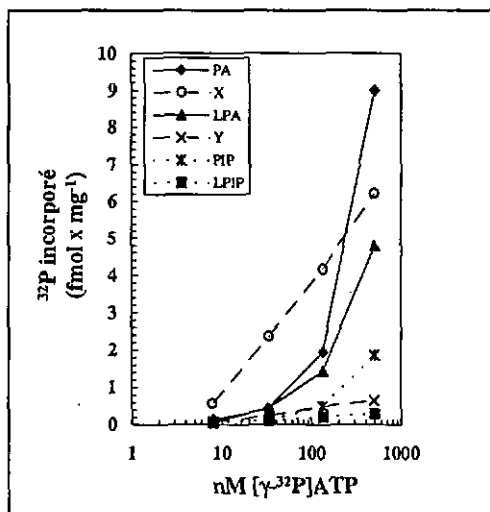


Fig. 4.3. Analyse par comptage Cerenkov de l'incorporation du ^{32}P dans les lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste, en fonction de la quantité de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ajoutée.

La figure 4.3 indique que la phosphorylation de trois lipides (PA, LPA et PIP) semble plus fortement stimulée que celle des autres lipides (X, Y et LPIP) en présence de quantités croissantes d'ATP radioactif. En effet, ces trois lipides présentent une courbe d'incorporation du ^{32}P en fonction de la quantité d'ATP qui augmente plus rapidement que celle des autres lipides (X, Y et LPIP). Ainsi, le lipide X qui incorpore le ^{32}P de façon majeure à des concentrations de 8, 33 et 130 nM est relégué au second, voir au troisième rang, par le PA et LPA lorsque la concentration en ATP radioactif atteint 500 nM. En extrapolant la courbe d'incorporation de ^{32}P dans le PIP, on peut imaginer que le marquage de ce lipide dépassera également l'incorporation de ^{32}P par le lipide X pour des concentrations plus élevées d'ATP radioactif dans le milieu (voir figure 4.13). Ce résultat nous permet également de déterminer qu'une quantité de 10 $\mu\text{Ci}/\text{échantillon}$ (16.5 à 33 nM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) est suffisante pour détecter par comptage Cerenkov les six lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. Cette figure montre également que dans cette expérience, le facteur limitant de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe est la quantité de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ disponible.

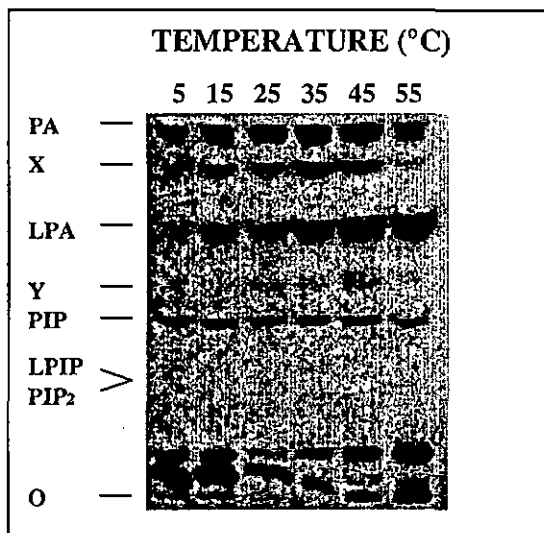


Fig.4.4. Phosphorylation des lipides de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste en fonction de la température. Les membranes d'enveloppes sont incubées dans des conditions standard à différentes températures: 5, 15, 25, 35, 45, 55°C. La position de migration des différents lipides phosphorylés est indiquée sur la gauche de l'autoradiographie. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/m mole.

La figure 4.4 montre l'autoradiographie résultant de la séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées dans différentes conditions de température. La phosphorylation des lipides est réalisée dans des conditions standard comme décrit dans le chapitre 2, alors que les températures d'incubation ont été choisies de façon arbitraire (5, 15, 25, 35, 45 et 55°C). Cette expérience nous indique que la phosphorylation des lipides de l'enveloppe supporte une vaste gamme de températures (15°C à 45°C) dans laquelle le profil autoradiographique de la séparation des lipides par CCM ne diffère que peu. Une température basse (de 5°C) semble inhiber de manière générale les activités lipide-kinasiques. Une température élevée (de 55°C) inhibe également la plupart des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. Seule la formation de l'acide lysophosphatidique n'est pas inhibée à une telle température. Par ailleurs, les activités lipide-kinasiques sont complètement abolies lorsqu'on incube des membranes d'enveloppes pendant 5 minutes à 95°C (résultats non-montrés). Pour la suite des expériences, une température d'incubation de 25°C a été choisie. D'une part cette température est proche de la température optimale (35°C) pour la phosphorylation des lipides de l'enveloppe; d'autre part elle correspond à une température d'incubation généralement utilisée pour mesurer les activités lipide-kinasiques dans les systèmes végétaux.

La figure 4.5 montre l'autoradiographie des lipides de l'enveloppe séparés par CCM après une phosphorylation dans des conditions standards à différents pH (5, 6, 7, 8, 9 et 11.5).

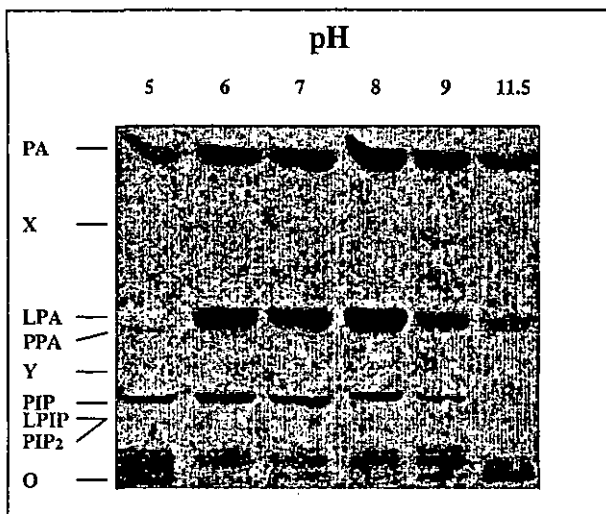


Fig. 4.5. Effet du pH sur la formation des lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste (PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y) en présence de 0.01 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 10 μCi (activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmmole). Les solutions tamponnées suivantes sont utilisées: MES 50 mM (pH 5 à 7), Mops 50 mM (pH 7 à 9), Tricine 50 mM (pH 9 à 11.5). Autoradiographie de la séparation des lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. La valeur du pH du milieu d'incubation est indiquée en haut de la figure. La position de migration des différents lipides phosphorylés est indiquée à gauche de l'autoradiographie.

D'une manière générale, la phosphorylation des lipides de l'enveloppe est très sensible au pH du milieu d'incubation. On constate cependant que le pH optimum diffère d'une catégorie de lipide à l'autre (pH optimum pour PA et LPA > pH optimum pour PIP et LPIP). On observe également la présence, à pH 5, d'un nouveau lipide phosphorylé comigrant avec l'acide pyrophosphatidique (PPA) juste en dessous du Rf du LPA (l'acide pyrophosphatidique a été obtenu en phosphorylant de l'acide phosphatidique en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et d'un extrait enzymatique purifié de PA-kinase de la membrane plasmique que nous a aimablement procuré le Dr J.B. Wissing de l'institut de *Enzymologie, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany*). Pour quantifier l'incorporation de ^{32}P dans les six lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste (PA, LPA, X, Y, PIP et LPIP) nous avons déterminé la quantité de radioactivité contenue dans chacun d'eux par comptage Cerenkov. La figure 4.6 montre, à un pH donné, le pourcentage d'incorporation de ^{32}P (cpm %) dans les différents lipides par rapport à l'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés à pH 5. Le pH optimum pour PA et LPA se situe à environ pH 8. On remarque que la phosphorylation de ces deux lipides est très sensible à la concentration en ions H^+ dans le milieu. En effet, on observe une différence de l'incorporation de ^{32}P dans PA et

LPA, entre les échantillons phosphorylés à pH 5 et à pH 8, de l'ordre de respectivement 4 à 20 fois supérieure. Le pH optimum pour l'incorporation de ^{32}P dans PIP et LPIP est lui nettement plus acide; il se situe environ à pH 6. Des pH plus basiques semblent totalement inopportuns pour l'activité des enzymes responsables de la phosphorylation de ces deux lipides. La phosphorylation des lipides X et Y semble quant à elle moins sensible au pH du milieu d'incubation et supporte un plus vaste domaine de pH allant de pH 6 à pH 9 pour une activité maximum de phosphorylation.

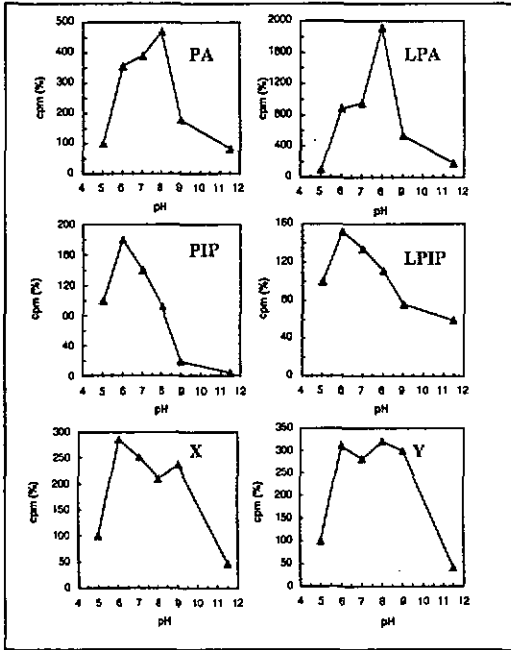


Fig. 4.6. Effet du pH sur la formation des lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste (PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y) en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmmole). Les solutions tamponnées suivantes sont utilisées: MES 50 mM (pH 5 à 7), Mops 50 mM (pH 7 à 9), Tricine 50 mM (pH 9 à 11.5). Les valeurs à des pH identiques pour deux tampons différents (pH superposés) sont très semblables (< 10%). L'échelle de l'ordonnée représente les cpm relatifs à la valeur du cent pourcent correspond respectivement à 1970 cpm, 510 cpm, 1440 cpm, 120 cpm, 156 cpm, 30 cpm pour PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y.

La figure 4.7 montre quelle est la dépendance de la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste vis-à-vis du ion Mg^{2+} . Des membranes d'enveloppes sont phosphorylées soit en absence de Mg^{2+} et en absence d'EDTA- Na_2 , soit en absence de Mg^{2+} et en présence d'EDTA- Na_2 5 mM et soit en présence de Mg^{2+} 10 mM et d'EDTA- Na_2 5 mM. D'une façon générale l'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés de l'enveloppe est très dépendante de la présence de ions Mg^{2+} ; seul le marquage du LPIP ne semble pas dépendre de la concentration en Mg^{2+} dans le milieu d'incubation. La présence d'un agent chélateur tel

l'EDTA-Na₂ inhibe l'incorporation de ³²P dans le PA et le LPA de plus de 90%, le PIP de 90%, le X de 85% et le Y de 75%. L'ajout de 10 mM Mg²⁺ rétablit, voir augmente l'incorporation du ³²P dans ces lipides. L'augmentation maximale de la phosphorylation de ces lipides se situe à une concentration en Mg²⁺ de 10 à 15 mM pour une concentration en EDTA-Na₂ de 5 mM.

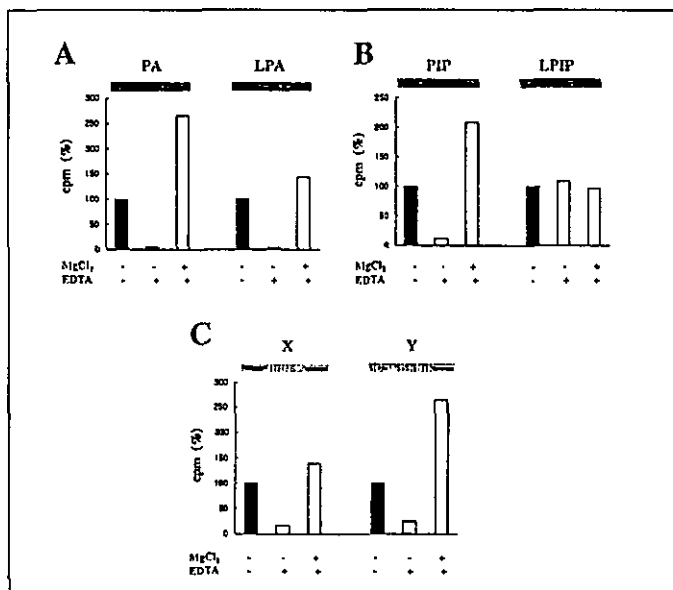


Fig. 4.7. Dépendance vis-à-vis du Mg²⁺ de la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste. Pour chaque condition expérimentale (absence de MgCl₂ et d'EDTA, présence de d'EDTA 5 mM, présence d'EDTA 5mM et de MgCl₂ 10 mM) la quantité de ³²P incorporée dans chaque lipide est représentée par une autoradiographie (en dessus des histogrammes) et par un histogramme dont l'échelle de l'ordonnée représente les cpm relatifs à la condition absence d'EDTA et de MgCl₂. La valeur du cent pourcent correspond respectivement à 1520 cpm, 1360 cpm, 280 cpm, 170 cpm, 310 cpm, 50 cpm pour PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmmole.

La figure 4.8 est le pendant, pour le Ca²⁺, de l'expérience réalisée pour le Mg²⁺ représentée par la figure 4.7. Des enveloppes sont phosphorylées dans des conditions standard sans Mg²⁺ soit en absence d'EGTA-Na₂ et de Ca²⁺, soit en présence d'EGTA-Na₂ 5 mM et absence de Ca²⁺ ou soit en présence d'EGTA-Na₂ 5 mM et de Ca²⁺ 10 mM. Nous remarquons que d'une manière générale l'incorporation de ³²P dans les lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste est sensible à la présence de ions Ca²⁺; à nouveau, seul le marquage du LPIP ne semble pas dépendre de la concentration en Ca²⁺ dans le milieu d'incubation. Cette dépendance

des activités lipide-kinasiques de l'enveloppe vis-à-vis du calcium est cependant moins marquée qu'elle ne l'est pour le ion Mg^{2+} . En effet, la présence d'EGTA- Na_2 inhibe l'incorporation de ^{32}P dans respectivement PA, LPA, PIP, X et Y de seulement 23%, 43%, 50%, 66% et 64%. L'ajout de 10 mM Ca^{2+} permet de rétablir l'incorporation du ^{32}P dans ces lipides. L'augmentation maximum de la phosphorylation de ces lipides se situe à une concentration de 5 à 10 mM Ca^{2+} pour une concentration en EGTA- Na_2 de 5 mM.

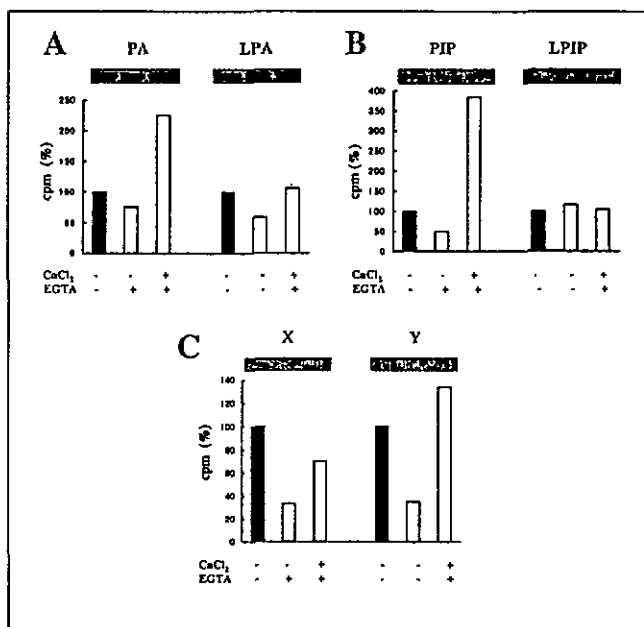


Fig. 4.8. Dépendance vis-à-vis du Ca^{2+} de la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste. Pour chaque condition expérimentale (absence de $CaCl_2$ et d'EGTA, présence de d'EGTA 5 mM, présence d'EGTA 5mM et de $CaCl_2$ 10 mM) la quantité de ^{32}P incorporée dans chaque lipide est représentée par une autoradiographie (en dessus des histogrammes) et par un histogramme dont l'échelle de l'ordonnée représente les cpm relatifs à la condition absence d'EGTA et de $CaCl_2$. La valeur du cent pourcent correspond respectivement à 2500 cpm, 1490 cpm, 390 cpm, 150 cpm, 210 cpm, 60 cpm pour PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmmole.

La figure 4.9 montre l'autoradiographie des lipides séparés par CCM après phosphorylation de membranes d'enveloppes en présence ou en absence d'ATP 0.05 mM non-radioactif. Nous remarquons qu'en absence d'ATP non-radioactif le profil autoradiographique change très nettement. En effet, comme nous l'avions déjà observé en comparant les figures

4.1.A et 4.2, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y est clairement plus importante en absence d'ATP non-radioactif; cela semble également être le cas pour le LPIP.

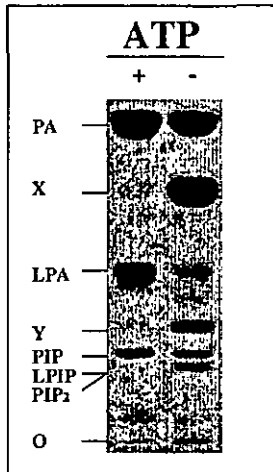


Fig. 4.9. Phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste en présence ou en absence d'ATP froid. Autoradiographie de la CCM. +, ATP 0.05 mM (2 Ci/mmol); -, ATP 0 mM (3000 Ci/mmol).

La figure 4.10 montre l'effet de différentes concentrations d'ATP non-radioactif sur l'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés de l'enveloppe.

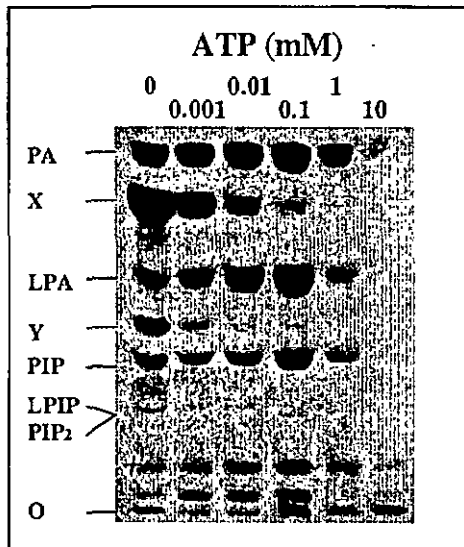


Fig. 4.10. Influence de l'ATP non-radioactif sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste. Les enveloppes sont incubées dans des conditions standard en présence de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mM ATP non-radioactif. La réaction commence par l'ajout des membranes dans le milieu d'incubation. La position de migration des différents lipides phosphorylés est indiquée sur la gauche de la figure. Cette expérience a été réalisée trois fois. L'autoradiographie ci-contre est représentative des trois expériences réalisées.

Sur cette figure nous pouvons observer que les lipides X, Y et LPIP réagissent de manière similaire en ce qui concerne l'incorporation de ^{32}P , par rapport à la concentration en ATP non-radioactif dans le milieu. En effet l'incorporation de ^{32}P dans ces trois lipides diminue en présence d'ATP non-radioactif contrairement à ce qui se passe pour les autres lipides. L'incorporation de ^{32}P dans PA, LPA et PIP diminue seulement à partir de concentrations en ATP non-radioactif supérieures à 0.1 mM.

La figure 4.11 représente graphiquement les variations de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides marqués en fonction de la concentration en ATP non-radioactif dans le milieu d'incubation.

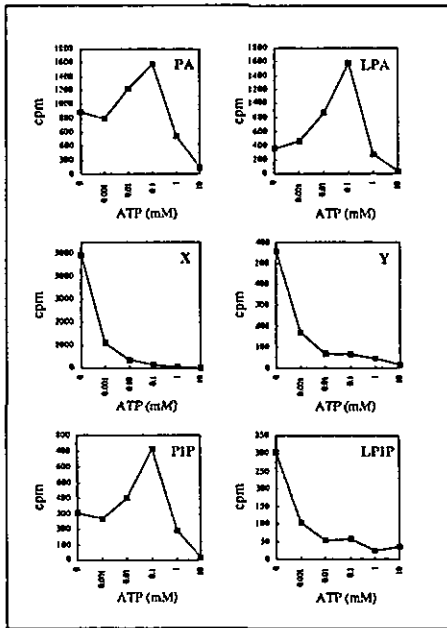


Fig. 4.11. Influence de quantités croissantes d'ATP non-radioactif sur le marquage des lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste. Nous avons reporté l'incorporation de ^{32}P (cpm) mesurée par comptage Cerenkov en fonction de la concentration d'ATP non-radioactif dans le milieu (activité spécifique: 0 mM = 3000 Ci/mmmole, 0.001 mM = 100 Ci/mmmole, 0.01 mM = 10 Ci/mmmole, 0.1 mM = 1 Ci/mmmole, 1 mM = 0.1 Ci/mmmole, 10 mM = 0.01 Ci/mmmole). Les valeurs obtenues dans ce graphique sont issues de l'expérience représentée par l'autoradiographie de la figure précédente. NB: L'échelle des valeurs de l'ordonnée (cpm) est différente pour chaque lipide.

On remarque que pour une concentration nulle en ATP non-radioactif, les lipides les plus phosphorylés se présentent, dans un ordre décroissant d'incorporation du ^{32}P , ainsi: X (5000 cpm), PA (900 cpm), Y (550 cpm), LPA (400 cpm), puis PIP et LPIP (~300 cpm), (incorporation totale = ~7500 cpm). Il apparaît clairement que dans ces conditions le lipide phosphorylé majeur est le lipide X (67% du ^{32}P incorporé dans les lipides phosphorylés totaux). Par contre, pour une concentration en ATP non-radioactif de 0.1 mM, le marquage des

lipides se présente, dans un ordre décroissant d'incorporation du ^{32}P , de la façon suivante: PA et LPA (1600 epm), PIP (700 epm), X (145 epm), Y (67 epm) et LPIP (58 epm), (incorporation totale = ~4170 epm). Dans ces conditions (0.1 mM ATP) l'incorporation totale de ^{32}P dans les lipides représente seulement les 55% de l'incorporation totale en absence d'ATP non-radioactif. De plus, le lipide le plus marqué n'est plus le lipide X mais le PA et le LPA qui se partagent les 77% du ^{32}P incorporé dans les lipides phosphorylés totaux. Ces résultats, et notamment ceux concernant le PA, LPA et PIP, sont surprenants. En effet, on peut concevoir que l'apport d'ATP non-radioactif diminue l'incorporation de ^{32}P dans les lipides [comme c'est le cas pour X (3%), Y (12%) et LPIP (19%)] par simple effet de dilution du substrat radioactif ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$); par contre il est nettement moins aisé d'expliquer l'augmentation (par rapport à la condition d'incubation sans ATP non-radioactif) de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA (177%), LPA (400%) et PIP (233%) en présence d'ATP non-radioactif 0.1 mM. L'effet de dilution de l'ATP non-radioactif sur l'incorporation de ^{32}P dans ces lipides (PA, LPA et PIP) s'observe même à des concentrations plus élevées de ce nucléotide (1 et 10 mM).

La figure 4.12 illustre graphiquement l'incorporation de phosphate total (P total fmol/mg après 5 minutes d'incubation, échelle logarithmique) dans chacun des lipides phosphorylés de l'enveloppe en fonction de la concentration logarithmique d'ATP (échelle logarithmique).

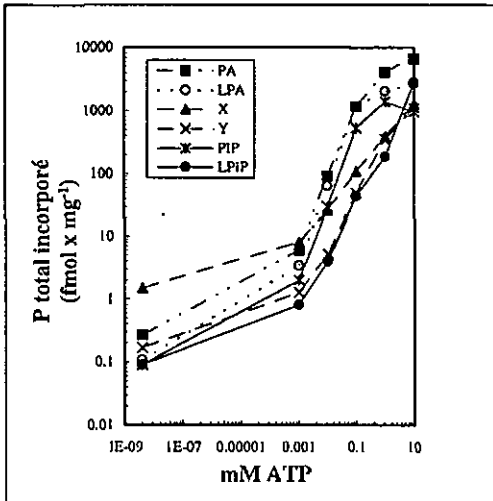


Fig. 4.12. Influence de quantités croissantes d'ATP non-radioactif dans le milieu d'incubation sur l'incorporation de phosphate total ($^{32}\text{P} + \text{P}$) dans les lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste.

Nous remarquons, d'une manière générale, que la quantité de P total incorporé augmente en présence de concentrations croissantes d'ATP allant de 0.001 à 10 mM; seule l'incorporation de P dans le PIP n'augmente plus à des concentrations en ATP dépassant 1 mM. Afin de déterminer dans lequel de ces lipides l'incorporation de P total est la plus forte en présence de concentrations croissantes d'ATP, nous avons reporté dans la figure 4.13 le pourcentage d'incorporation total de P (par rapport à l'échantillon ne contenant pas d'ATP non-radioactif) en fonction de la concentration d'ATP dans le milieu (échelles logarithmiques).

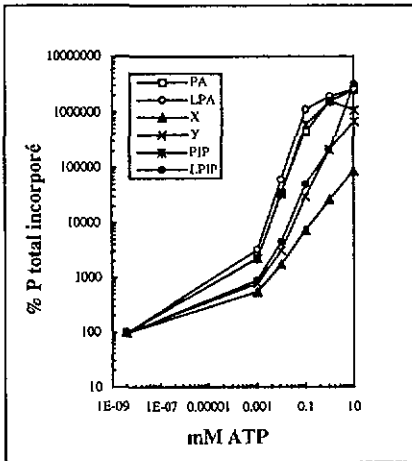


Fig. 4.13. Incorporation de phosphate total (exprimé en pourcentage de l'incorporation de phosphate total de l'échantillon sans ATP non-radioactif) dans les lipides phosphorylés en fonction de la concentration en ATP non-radioactif dans le milieu d'incubation.

Nous pouvons voir sur cette figure que la stimulation de l'incorporation de P total ($^{32}\text{P} + \text{P}$) dans chaque lipide phosphorylé de l'enveloppe est "linéaire" pour des concentrations en ATP allant de 0.001 à 0.1 mM. Nous pouvons également observer sur cette figure que, comme nous l'avions déjà suspecté (voir figure 4.3), l'incorporation de P total dans le PA, le LPA et le PIP est nettement plus stimulée par la présence d'ATP que celle des trois autres lipides (X, Y et LPIP). En effet, l'incorporation de P total dans les lipides PA, LPA et PIP par rapport à X, Y et LPIP est nettement plus fortement stimulée (~ 100 fois plus) pour une concentration en ATP non-radioactif de 0.1 mM. Cette stimulation 100 fois supérieure serait donc responsable de l'augmentation de l'incorporation de ^{32}P radioactif dans les lipides PA, LPA et PIP malgré la diminution du rapport $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}/\text{ATP}$ [diminution de l'activité spécifique](voir figure 4.11).

Afin de déterminer si les lipides phosphorylés de l'enveloppe du chloroplaste subissent un cycle de phosphorylation/déphosphorylation (chasse), nous avons procédé à une expérience de "pulse and chase". Des enveloppes sont phosphorylées en absence d'ATP non-radioactif pendant 5 minutes (pulse) puis soumises à une concentration en ATP non-radioactif de 1 mM (chase). Nous avons choisi cette concentration de 1 mM ATP car elle est suffisante selon les résultats exposés dans la figure 4.11 pour diluer l'ATP radioactif présent dans le milieu et diminuer l'incorporation relative de ^{32}P dans les lipides PA, LPA et PIP. La figure 4.14 illustre l'autoradiographie de la séparation par CCM des lipides phosphorylés de l'enveloppe suite à l'expérience de "pulse/chase" effectuée.

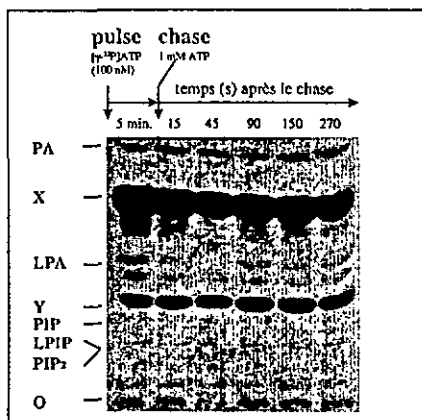


Fig. 4.14. Expérience de "pulse-chase" sur les membranes d'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. La phosphorylation des lipides de l'enveloppe est réalisée selon des conditions standard sans ATP non-radioactif (Mops 50 mM, MgCl_2 5mM, enveloppes 0.6 mg, 60 μCi [γ - ^{32}P]ATP, activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmmole.). Une fraction aliquote est récoltée après 5 minutes d'incubation, puis l'on ajoute au reste des membranes une concentration finale de 1 mM d'ATP non-radioactif. Des fractions aliquotes sont récoltées durant les dernières 270 secondes de l'expérience. Les lipides des différentes fractions sont ensuite analysés de manière standard selon le chapitre 2.

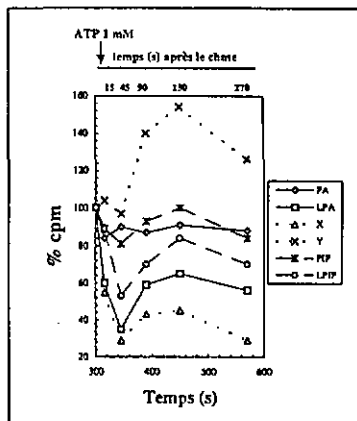


Fig. 4.15. Représentation graphique de l'expérience de "pulse-chase" dont l'autoradiographie est montrée dans la figure 4.14. L'incorporation de ^{32}P a été mesurée par comptage Cerenkov. La valeur de 100 % correspond à 350 cpm pour PA, 400 cpm pour LPA, 25000 cpm pour X, 1900 cpm pour Y, 150 cpm pour PIP et 140 cpm pour LPIP.

La figure 4.15 représente graphiquement le pourcentage de radioactivité incorporée dans les six lipides phosphorylés de l'enveloppe en fonction du temps (s) après le "chase". D'une manière générale nous pouvons voir que l'incorporation de ^{32}P dans les lipides

de l'enveloppe après l'ajout de 1mM ATP est affectée de trois façons distinctes selon les lipides considérés. Dans le premier cas de figure, le marquage radioactif au ^{32}P pour des lipides comme le PA et le PIP est chassé très faiblement après l'ajout d'ATP 1mM. Dans le deuxième cas de figure, le marquage radioactif est fortement chassé (29% à 53% du marquage initial) après 45 secondes, puis semble se stabiliser (40% à 80%) après 150 secondes; c'est le cas pour X, LPA et LPIP. Dans le troisième cas de figure, le marquage au ^{32}P n'est pas chassé mais augmente (140%) après 90 secondes; c'est le cas du lipide Y.

La figure 4.16 montre l'effet du CTP et du GTP 0.01 mM sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et de 0.01 mM ATP.

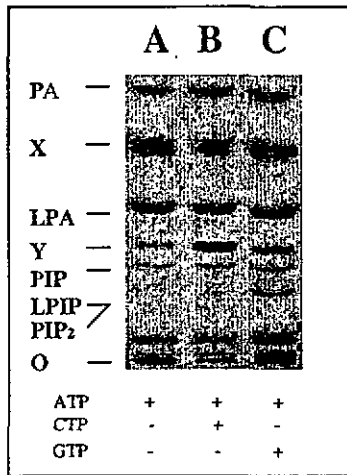


Fig. 4.16. Phosphorylation des lipides de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste en présence de CTP ou de GTP non-radioactif. A) Incubation standard (+ATP 0.01 mM non-radioactif). B) Incubation standard en présence de CTP 0.01 mM non-radioactif. C) Incubation standard en présence de GTP 0.01 mM non-radioactif. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmole.

D'une façon générale la cytidine triphosphate et la guanosine triphosphate diminuent l'incorporation de ^{32}P dans PA et le lipide X. Le lipide Y, contrairement au lipide X, est stimulé par la présence de CTP. La phosphorylation du LPA, de même que celle du PIP, est plus forte en présence de GTP qu'en présence de CTP. Ces observations nous montrent que la phosphorylation des lipides de l'enveloppe est sensible et modulable suivant la nature du nucléotide triphosphaté présent dans le milieu. Il est également intéressant de mentionner l'effet fortement stimulateur du GTP (par rapport à l'ATP qui inhibe l'incorporation de ^{32}P dans le

LPIP, voir figure 9) sur le marquage du LPIP. Ce lipide étant essentiellement localisé dans la membrane externe, nous avons voulu tester l'effet du GTP sur la phosphorylation des lipides de cette dernière.

La figure 4.17 nous montre l'autoradiographie, après CCM, des lipides de la membrane externe de l'enveloppe phosphorylés en absence ou en présence de GTP 0.001mM. L'incorporation de ^{32}P dans le LPIP (~300%) et le PIP (~180%) est stimulée par la présence de GTP dans le milieu d'incubation, alors que le marquage des autres lipides phosphorylés ne l'est pas.

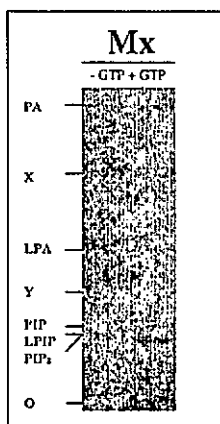


Fig. 4.17. Phosphorylation de membranes externes de l'enveloppe du chloroplaste en présence de GTP 0.01 mM non-radioactif. Des membranes externes d'enveloppes sont incubées dans des conditions sans ATP non-radioactif (activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmmole) en présence (+ GTP) ou en absence (- GTP) de GTP 0.01mM non-radioactif.

Nous avons également testé l'effet de quelques inhibiteurs spécifiques et non-spécifiques des activités DAG-kinasique et PI-kinasique. Un inhibiteur non-spécifique de ces deux types d'activités est l'ADP (adénosine diphosphate). Il inhibe l'activité PI-kinasique de la membrane plasmique de *Catharanthus roseus* (Hancenberg et al., 1995), mais ne semble pas inhiber l'activité PI-kinasique soluble de *Daucus carota* (Okpodu et al., 1995). Il inhibe également, comme la plupart des nucléosides diphosphates l'activité DAG-kinasique de *Catharanthus roseus* (Wissing et Wagner, 1992). La figure 4.18 illustre l'effet de concentrations croissantes d'ADP (0, 0.001, 0.01, 0.05 mM) sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste en présence d'ATP non-radioactif 0.01 mM.

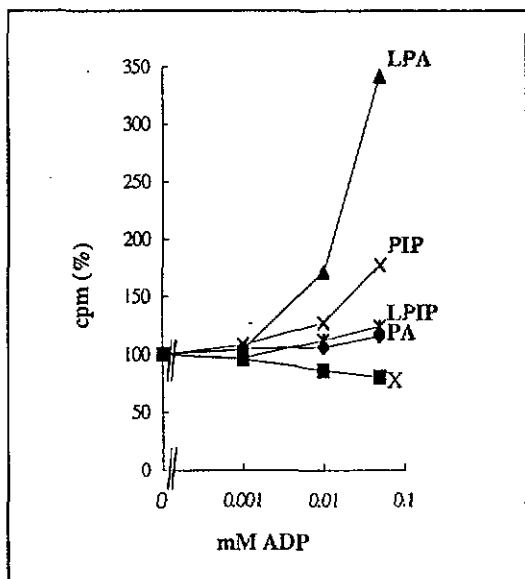


Fig. 4.18. Phosphorylation des lipides de la membrane de l'enveloppe en présence d'ADP. Des membranes d'enveloppes sont incubées dans des conditions standard (+ ATP 0.01 mM) en présence de concentrations croissantes d'ADP (0.001, 0.01, 0.05 mM). L'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés est reportée en cpm % du témoin sans ADP. Les valeurs en cpm des témoins sont de 1500 cpm pour PA, 300 cpm pour LPA, 800 cpm pour PIP, 130 cpm pour LPIP et 170 cpm pour X. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmole.

D'une façon générale l'ADP stimule l'incorporation de ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe, exception faite du lipide X (inhibition de 20% avec 0.05 mM ADP). Pour une concentration de 0.05 mM en ADP, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA, LPA et PIP est stimulée de respectivement 16%, 242% et 77% par rapport à un témoin incubé sans ADP. Les activités PI- et DAG-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste semblent donc être stimulées plutôt qu'inhibées par l'ADP. Nous avons également testé l'effet de divers inhibiteurs spécifiques (drogues) des activités DAG- et PI-kinasiques animales. Les inhibiteurs des DAG-kinases des mammifères, Diacylglycerol kinase inhibitor I (R59022) et Diacylglycerol kinase inhibitor II (D5794) se sont révélés inefficaces, dans nos conditions d'incubation, envers l'activité DAG-kinasique de l'enveloppe chloroplastique (résultats non-montrés). Par contre, un inhibiteur spécifique des activités PI-3-kinasiques, la wortmannin (Rheinhold et al., 1990; Arcaro et Wyman, 1993), inhibe l'incorporation de ^{32}P dans le PIP des membranes de l'enveloppe du chloroplaste (figure 4.19). La figure 4.19.A montre quelle est l'incorporation de ^{32}P dans le PA et le PIP obtenue après phosphorylation de membranes totales d'enveloppes en présence de concentrations croissantes de wortmannin. Nous pouvons voir que l'incorporation de ^{32}P dans le PA n'est pas affectée par la wortmannin, contrairement au PIP dont le marquage diminue de 43% en présence de 0.5 μM de cette drogue. La figure 4.19.B nous montre

l'incorporation de ^{32}P dans le PA et le PIP obtenue après phosphorylation de membranes externes de l'enveloppe en présence de concentrations croissantes de wortmannin.





A	μM wortmannin				B	μM wortmannin			
	0	0.5	1	2		0	0.5	1	2
PA					PA				
%	100	108	105	106	%	100	97	97	96
PIP					PIP				
%	100	57	44	29	%	100	24	11	15

Fig. 4.19. Phosphorylation de membranes d'enveloppes en présence d'un inhibiteur de phosphatidylinositol-3-kinase, la wortmannin. Des concentrations croissantes de wortmannin (0, 0.5, 1, 2 μM) sont ajoutées aux membranes d'enveloppes 5 min. avant l'ajout simultané d'ATP radioactif et non-radioactif. La figure représente l'effet de cette drogue sur l'incorporation de ^{32}P dans deux lipides (PA et PIP) de membranes totales (A) ou externes (B) d'enveloppes dont la phosphorylation est liée à une activité enzymatique insensible (PA) ou sensible (PIP) à la wortmannin. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmoles.

Nous observons une diminution de la phosphorylation du PIP (en présence de 0.5 μM de cette drogue) qui est nettement plus marquée (76%) par rapport à la diminution observée (figure 4.19.A) dans les enveloppes totales (43%). De même que nous l'avions observé dans les membranes totales de l'enveloppe, l'activité DAG-kinasique ne semble pas inhibée par la wortmannin. La différence d'intensité d'inhibition de la PI-kinase de fractions de membranes totales ou externes est probablement due à la propriété de cette drogue de se fixer aussi de manière non-spécifique à d'autres protéines que les PI-3-kinases. Comme les membranes externes sont enrichies en activités PI-kinasiques (voir chapitre 3), il y aura dans celles-ci un plus grand rapport PI-kinase/protéines totales. Ainsi la wortmannin se fixera aléatoirement plus fréquemment sur la PI-kinase d'une fraction de membranes externes de l'enveloppe que sur la PI-kinase contenue dans la membrane de l'enveloppe totale, du fait qu'il y a dans celle-ci une plus grande quantité d'autres protéines (communication personnelle du Dr. M.P. Wyman). On peut donc s'attendre à ce que l'activité de la PI-kinase de l'enveloppe purifiée soit inhibée de façon encore plus marquée par des concentrations identiques ou voire même plus faibles de wortmannin. La wortmannin, qui semble inhiber spécifiquement l'activité PI-kinasique de la membrane de l'enveloppe s'avère être, par rapport à cette propriété, un outil intéressant pour

déterminer un éventuel rôle à la présence d'une telle activité lipide-kinasique dans l'enveloppe du chloroplaste.

La membrane de l'enveloppe du chloroplaste possède au moins deux activités protéine-kinasiques distinctes (Siegenthaler et Bovet, 1993), l'une responsable de la phosphorylation de pools distincts du LHCII et de la petite sous-unité de la RubisCO (Bovet et al., 1995) et l'autre responsable de la phosphorylation d'une protéine de 67 kDa qui semble être liée à une activité de phosphoglucomutase (Salvucci et al., 1990). Nous avons voulu déterminer à l'aide de la wortmannin, si l'activité PI-kinasique de l'enveloppe, via son produit (PIP), pouvait moduler les activités protéine-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste. La figure 4.20 montre l'autoradiographie des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Epineard, après séparation de celles-ci par SDS-PAGE, phosphorylées en absence ou en présence d'ATP non-radioactif 0.01 mM et en absence ou en présence de wortmannin 0.2 mM.

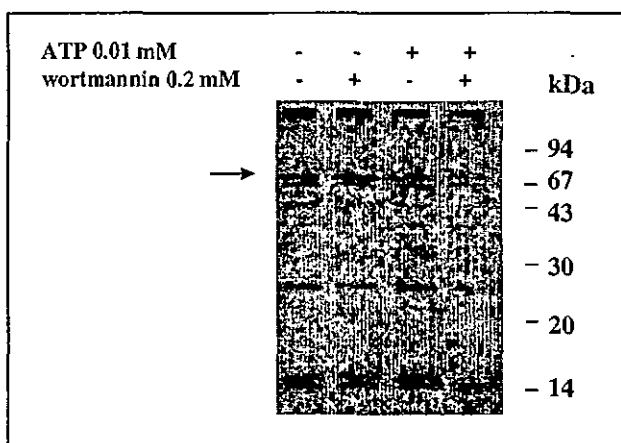


Fig. 4.20. Effet de la wortmannin (0.2 mM) sur les activités protéine-kinasiques des membranes de l'enveloppe du chloroplaste. La flèche indique la seule protéine dont la phosphorylation semble stimulée par la wortmannin par opposition à toutes les autres phosphoprotéines. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmole.

Cette figure nous montre qu'en absence d'ATP non-radioactif, la wortmannin inhibe la phosphorylation de la plupart des protéines phosphorylées à l'exception de celle de la protéine de 67 kDa (flèche). En présence d'ATP non-radioactif, l'inhibition des activités protéine-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste par la wortmannin semble encore plus marquée (voir tableau 4.1). Nous avons reporté dans le tableau 4.1 le pourcentage d'inhibition

ou d'activation de l'incorporation de ^{32}P (calculé en pourcent cpm du témoin sans wortmannin) pour quatre phosphoprotéines ayant des poids moléculaires de 14, 26, 51 et 67 kDa.

% (- wt.)	-ATP		+ATP	
	-wt.	+wt.	-wt.	+wt.
67 kDa	100	129	100	36
51 kDa	100	90	100	28
26 kDa	100	78	100	43
14 kDa	100	66	100	46

Fig. 4.21. Quantification de l'inhibition due à la wortmannin de la phosphorylation de quatre protéines différentes de la membrane de l'enveloppe. Ecart type < 10 %.

Nous remarquons que la wortmannin inhibe d'une manière non-négligeable la phosphorylation des protéines de 14, 26 et 51 kDa. Cette inhibition est environ deux fois plus marquée en présence d'ATP froid. La phosphorylation de la protéine de 67 kDa est, contrairement à la plupart des autres protéines phosphorylées, stimulée par la présence de wortmannin en absence d'ATP non-radioactif. Cette différence de sensibilité, de la part de la protéine de 67 kDa (par rapport aux autres phosphoprotéines) envers la wortmannin, reflète probablement le mécanisme de phosphorylation différent (autophosphorylation) de cette protéine par rapport celui (protéine-kinase) impliqué dans la phosphorylation des protéines de 14, 26 et 51 kDa. Cette conclusion est en accord avec celle énoncée par Siegenthaler et Bovet (1993).

4.4. Discussion

Les résultats obtenus dans ce chapitre nous ont permis de mettre en évidence plusieurs activités lipide-kinasiques différentes dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste de l'Epinard.

Mis à part les quatre lipides majeurs de l'enveloppe (PA, LPA, PIP et LPIP) qui incorporent du ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dont l'identité ainsi que la localisation constituent la majeure partie du chapitre 3, deux autres lipides (X et Y) qui incorporent également du phosphate radioactif ont été mis en évidence dans ce chapitre. Ainsi, ce ne sont plus quatre mais bien six lipides incorporant du ^{32}P que l'on peut observer dans les membranes

d'enveloppes du chloroplaste. L'incorporation de ^{32}P dans ces différents lipides varie selon la composition du milieu d'incubation (Mg^{2+} , Ca^{2+} , pH, ATP, GTP, CTP, ADP et température). Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence différentes caractéristiques des activités lipide-kinasiques responsables de la phosphorylation de ces six lipides.

Premièrement, nous avons déterminé qu'un temps d'incubation de 5 minutes est suffisant pour permettre à la plupart des lipides phosphorylés d'atteindre le maximum d'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans nos conditions d'incubation (voir figure 4.1). Ce maximum reflète probablement un équilibre entre la production (phosphorylation) et la dégradation (déphosphorylation, hydrolyse etc.) de ces lipides. Seul l'incorporation de ^{32}P dans le LPA semble encore augmenter après un temps d'incubation supérieure à 20 minutes. Cette observation nous suggère que le LPA pourrait être issu: (i) du PA via une phospholipase A_2 endogène, une fois sous cette forme (LPA) ce lipide serait alors moins sujet à une éventuelle dégradation (déphosphorylation); (ii) du lyso-diaéylglycérol via une lipase hydrolysant le DAG et une lysodiacylglycérol kinase phosphorylant le LDAG en LPA.

Deuxièmement, nous avons déterminé la quantité minimale de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ nécessaire afin de détecter aisément les différents lipides phosphorylés (voir figure 4.2). Il s'est avéré que l'incorporation de ^{32}P dans les lipides en fonction de la concentration de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est plus fortement stimulée pour certains lipides (PA, LPA et PIP) que pour d'autres (X, Y et LPIP) (voir figure 4.3). Cette différence de sensibilité vis-à-vis de la concentration en $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ peut être expliquée comme étant, soit le reflet d'une stimulation de l'activité des lipides kinases responsables de la formation du PA (DAG-kinase) et du PIP (PI-kinase) par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ lui-même, ou, soit l'intervention d'un intermédiaire (enzyme ou cofacteur) sensible à l'ATP capable de moduler l'activité de ces deux lipides kinases en fonction de la concentration d'ATP disponible.

Troisièmement (voir figure 4.4), les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe semblent être inhibées à des températures d'incubation basses (5°C). Cette inhibition générale de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides est due, d'une part à la diminution de l'agitation moléculaire et, d'autre part, à la diminution de la fluidité membranaire qui réduisent (ou ralentissent) l'accès des enzymes aux substrats. L'activité de l'enzyme responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y est plus fortement inhibée par des températures élevées (35°C à 55°C) que ne le sont les activités des autres enzymes responsables du marquage de PA, LPA, PIP et LPIP. Ce résultat nous indique que la lipide kinase responsable

de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y est déjà en partie dénaturée à des températures dépassant les 35°C , alors que les autres lipides kinases ne le sont pas. La stimulation de l'incorporation de ^{32}P dans le LPA à une température de 55°C (alors que les autres activités semblent être dénaturées) peut être le reflet soit d'une stimulation de la phospholipase A_2 hydrolysant le PA en LPA, soit d'une stimulation d'une activité lysodiacylglycérol kinase, qui pourrait également être responsable de l'incorporation de ^{32}P dans le LPA en utilisant le produit d'une hydrolyse du DAG en LDAG par une lipase également susceptible d'être stimulée par des températures élevées.

Quatrièmement, les pH optimums (voir figure 4.6) différents pour les couples de lipides PA/LPA, PIP/LPIP et X/Y nous indiquent que, probablement, au moins trois activités lipide-kinasiques différentes sont liées aux membranes de l'enveloppe du chloroplaste; une responsable de la présence de PA et LPA (avec un pH optimum de 8), une autre pour la présence de PIP et LPIP (pH 6) et une troisième pour la présence de X et Y (pH 6 à 9). Comme le pH physiologique du stroma ne varie qu'entre 7 et 8 en fonction du degré d'illumination du chloroplaste (Heldt et al., 1973), l'activation des lipides kinases de l'enveloppe (si elles ont un rôle physiologique au sein du chloroplaste) ne devrait être optimale qu'à ces pH-là. Ceci se révèle être le cas pour les kinases responsables de l'incorporation de ^{32}P dans le PA, LPA et également X et Y, qui possèdent un pH optimum très proche du pH physiologique du stroma. Par contre, on peut imaginer que le pH optimum pour le marquage du PIP et du LPIP, même s'il ne correspond pas au pH physiologique du stroma, pourrait refléter la présence de micro-domaines de pH (dus à la présence d' H^+ -ATPases) au niveau de la membrane de l'enveloppe où le pH serait plus acide que celui mesuré dans le stroma. Ainsi la présence au niveau de la membrane externe de micro-domaines de pH acide (par exemple dans l'espace intermembranaire, ou sur la face cytosolique de la membrane externe) pouvant activer des enzymes responsables de la formation de phospholipides précurseurs de messagers secondaires conférerait un rôle physiologique à l'activation de l'incorporation de ^{32}P dans PIP et LPIP à pH 6. L'implication des phospholipides de la famille des inositols dans l'activation d' H^+ -ATPase a été mise en évidence notamment dans la membrane plasmique par Memon et al. (1989 et 1990). Le transport électrogénique de ions H^+ à travers la membrane plasmique permet le transport de nutriments dans la cellule de la plante. Ainsi, la H^+ -ATPase de la membrane plasmique, activée via des messagers secondaires d'origine lipidique, joue un rôle fondamental en régulant le développement et la croissance de la plante. Ainsi, on peut imaginer que la présence simultanée d'ATPases (Nguyen et al., 1987; McCarty et al., 1984; Huang et al.,

1993) et de PI-kinases (Siegenthaler et al., 1997) dans la membrane de l'enveloppe pourrait jouer un rôle similaire dans la régulation du transport de métabolites à travers cette dernière.

Cinquièmement, les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste sont d'une façon générale dépendantes du Mg^{2+} et du Ca^{2+} (voir figure 4.7 et 4.8). La dépendance de ces activités vis-à-vis du magnésium est beaucoup plus prononcée que celle vis-à-vis du calcium. En effet, la suppression du Mg^{2+} dans le milieu d'incubation provoque une inhibition des activités lipide-kinasiques de plus de 70%; alors que l'absence de Ca^{2+} inhibe ces mêmes activités de 40 à 50% en moyenne. Il est connu (Buchanan, 1980) que l'illumination des chloroplastes induit un flux de protons à travers la membrane thylacoïdale ainsi qu'une augmentation de la concentration de Mg^{2+} dans le stroma de l'ordre de 1 mM (Krause, 1977) à 15 mM (Barber, 1976). On peut donc suspecter que l'activation des lipides kinases de l'enveloppe par le Mg^{2+} rend ces dernières indirectement dépendantes de la lumière. Ce résultat suggère également que le substrat des lipides kinases de l'enveloppe est le MgATP plutôt que l'ATP. La forte stimulation (250%) de l'activité PI-kinasique de la membrane de l'enveloppe en présence de 10 mM Ca^{2+} est peut-être révélatrice d'une synergie de l'implication du calcium et des dérivés de phosphoinositides dans un mécanisme de transmission de signaux.

Sixièmement, nous avons vu qu'il faut une concentration de 0.1 à 1 μ M ATP pour commencer à stimuler les activités PI- et DAG-kinasiques elles-mêmes (figure 4.3). Cette stimulation des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe par l'ATP (figures 4.2 et 4.3) nous indique l'importance du degré énergétique du chloroplaste dans la régulation de ces activités lipide-kinasiques (l'ATP requis étant fourni en grande partie par les thylacoïdes, voir chapitre 6).

Septièmement, l'effet stimulateur de l'ATP non-radioactif (figures 4.9 à 4.13) sur l'incorporation du phosphate total montre une relation linéaire, pour des concentrations en ATP allant de 0.001 à 1 mM, entre le logarithme de la concentration d'ATP et le phosphate incorporé dans les lipides (figure 4.12). Cette stimulation est plus prononcée pour les lipides PA, LPA et PIP. Cette stimulation peut s'expliquer soit par une activation directe de la lipide kinase par l'ATP (modification conformationnelle de l'enzyme en présence de concentrations élevées d'ATP), soit par un enzyme intermédiaire nécessitant de grandes quantités d'ATP pour activer ensuite la lipide kinase. Dans le premier cas, les kinases responsables de la phosphorylation de PA, LPA et PIP seraient caractérisées par des K_m pour l'ATP relativement élevés et fonctionneraient au maximum de leur activité que lorsque l'ATP serait en quantité suffisante dans le milieu. Dans le second cas, l'activité des lipides kinases serait

contrôlée par un autre enzyme capable d'activer les enzymes responsables de la production de PA, LPA et PIP uniquement en présence de grandes quantités d'ATP. Il apparaît ainsi que le processus dépendant de l'ATP, qui conduit à la stimulation de l'incorporation de ^{32}P dans ces lipides, pourrait être couplé à un mécanisme enzymatique différent de celui qui implique le site catalytique de la lipide kinase elle-même. La première hypothèse semble confirmée par le résultat de la figure 4.18, qui indique un effet stimulateur de l'ADP sur l'incorporation de phosphate dans les lipides PA, LPA, PIP et LPIP. Ce résultat tend à montrer que c'est probablement la base nucléotidique qui stimule les lipides kinases impliquées dans le marquage de ces lipides.

Huitièmement, le PA et le PIP ne sont pas sujets à une forte activité de phosphorylation/déphosphorylation (chasse), contrairement aux lipides X, LPA et LPIP qui semblent être sujets à des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation. Quant au lipide Y, l'augmentation de son marquage après ajout d'ATP peut être expliqué que s'il est le produit de la transformation d'un autre lipide marqué suite à l'ajout d'ATP. En effet, d'après le résultat présenté dans la figure 4.15, on peut facilement imaginer que le lipide Y serait un dérivé du lipide X suite à une phosphorylation ou à une hydrolyse d'un acide gras (lipase A_2 spécifique pour X) de ce dernier. La position de migration du lipide Y par rapport au lipide X (figure 4.14) ainsi que les effets quasi similaires de divers facteurs chimiques et physiques ($T^\circ\text{C}$, pH, Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP non-radioactif) sur la phosphorylation de ces deux lipides semblent montrer que le métabolisme de ces deux lipides est étroitement lié. Nous remarquons également qu'après 45 secondes de chasse, l'incorporation de ^{32}P dans tous les lipides phosphorylés augmente. Ce phénomène a été observé dans toutes les expériences de "pulse and chase" effectuées en présence d'ATP radioactif. Il est difficilement explicable, et impliquerait soit une biosynthèse de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, soit une libération d'un pool de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fixé par des protéines (heat shock protéine, NDPK), ou alors une suractivation des activités lipide-kinasiques 45 secondes après l'ajout d'ATP froid (chasse). Ce phénomène semble être particulier au métabolisme du chloroplaste et a déjà été observé en relation avec la phosphorylation des protéines (Bovet, L., 1993).

Neuvièmement, l'inhibition des activités protéine-kinasiques de l'enveloppe en présence d'un inhibiteur de PI-3-kinase, nous indique que des lipides tel le PIP et les phospholipides jouent probablement un rôle dans le contrôle des activités protéine-kinasiques de la membrane de l'enveloppe et, par conséquent, un rôle modulateur dans le contrôle de potentiels mécanismes de transmission de signaux au travers du chloroplaste ou d'enzymes

impliqués dans des activités métaboliques (ATPasés). Cette hypothèse est corroborée par différents travaux qui relatent que des phosphoinositides et des phospholipides sont impliqués dans la stimulation d'activités protéine-kinasiques et ATPasiques dans des systèmes végétaux (Karibe et al., 1995; Martiny-Baron et Scherer, 1989; Schäfer et al., 1985; Memon et al., 1989; Memon et Boss, 1990). Bien qu'aucun travail ne relate un effet inhibiteur direct de la wortmannin sur les protéines kinases, nous ne pouvons pas exclure cette dernière hypothèse comme explication de l'inhibition des activités protéine-kinasiques de l'enveloppe en présence de cette drogue. La wortmannin étant un inhibiteur des PI-3-kinases, l'inhibition de l'incorporation de ^{32}P dans le PIP des membranes de l'enveloppe, due à cette drogue, suggère fortement la présence d'une activité de type PI-3-kinasique dans ces membranes.

Dixièmement, la présence des nucléotides triphosphatés ATP, CTP et GTP (voir figure 4.16) dans le milieu d'incubation stimule/inhibe, chacun, de manière différente les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe. Ce résultat nous indique que l'équilibre des nucléotides triphosphatés au sein du chloroplaste est important. En effet, la concentration relative en nucléotides pourrait être un moyen de réguler les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste et d'orienter le métabolisme du chloroplaste vers certaines voies métaboliques. Dans cet ordre d'idée, un enzyme tel la nucléoside diphosphate kinase, présent dans les chloroplastes (Bovet et al., 1997), pourrait se révéler très important dans la régulation du métabolisme de cette organelle. L'effet stimulateur du GTP sur le marquage du LPIP et du PIP (figure 4.17) nous laisse envisager que des protéines de type G (GTP-binding protein) seraient impliquées dans l'activation de la lipide kinase responsable de la présence de ces lipides. Le lecteur se souviendra que cette activité lipide-kinasique est principalement localisée dans la membrane externe de l'enveloppe (chapitre 3). Ainsi, une cascade de signaux (G-protéine \rightarrow lipide kinase \rightarrow protéine kinase \rightarrow métabolisme ?) qui permet de transmettre des informations du cytosol au chloroplaste via la membrane de l'enveloppe est dès lors envisageable.

Nous pouvons conclure ce chapitre en postulant qu'un tel degré de régulation des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe (contrôlées par de nombreux paramètres: T°C , Mg^{2+} , Ca^{2+} , pH, nucléotides bis et triphosphatés) est, sans aucun doute, vital aux fonctions du chloroplaste.

CHAPITRE 5

X et Y, deux lipides phosphorylés d'identité inconnue de la membrane de l'enveloppe: Localisation, identification du substrat et dépendance vis-à-vis de la NDPKII de l'activité enzymatique catalysant l'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans ces deux lipides

5.1. Introduction

Une des informations majeures révélée dans le chapitre 4 est la présence de deux lipides phosphorylés supplémentaires, d'identité inconnue, dans la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. Ces deux lipides X et Y portent le total des lipides phosphorylés de l'enveloppe, suite à une incubation *in vitro* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, à six (PA, LPA, PIP, LPIP, X et Y). L'incorporation de phosphate, en présence de faibles concentrations d'ATP (33 nM), dans les lipides X et Y, représente les 74% du phosphate total accumulé dans les six lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe. Par contre, en présence de concentrations plus élevées d'ATP (p.ex. 0.1 mM), l'incorporation de phosphate dans X et Y ne représente plus que les 5% de l'incorporation totale de phosphate dans les six lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe (voir figure 5.1).

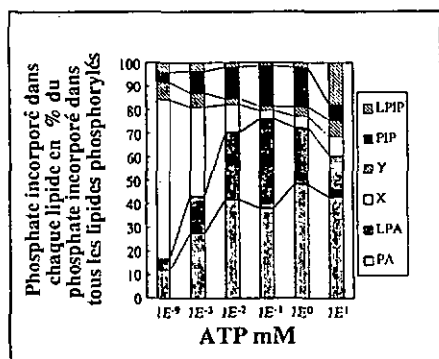


Fig. 5.1. Incorporation de phosphate dans les lipides de l'enveloppe en fonction de la concentration en ATP dans le milieu. L'incorporation de phosphate dans un lipide donné est exprimée en pourcent du phosphate total incorporé dans les lipides phosphorylés. $1\text{E}^{-2} = 1 \times 10^{-2}$, etc.

Cette diminution relative de l'incorporation de phosphate dans ces deux lipides, en fonction de concentrations croissantes en ATP dans le milieu d'incubation, suggère un mécanisme de phosphorylation différent de celui impliqué dans la phosphorylation des autres lipides. En effet, l'incorporation de phosphate dans ceux-ci (PA, LPA et PIP) augmente en présence de concentrations plus élevée d'ATP alors que celle des lipides X et Y diminue.

La présence d'activités lipide-kinasiques (Siegenthaler et al., 1997; voir chapitre 3 et 4) et protéine-kinasiques dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste (Bovet, 1993) suggère que des systèmes de transmission de signaux, qui sont présents dans les cellules animales et végétales (voir chapitre 1), opèrent également dans le chloroplaste. Par contre, la présence de lipides phosphorylés différents de ceux habituellement impliqués dans les systèmes de transmission de signaux des végétaux comme le PA, LPA, PIP, PIP₂, PPA et PAP (analogue du PAF des animaux) révèle peut-être la présence d'un mécanisme de transmission de signaux, impliquant les lipides X et Y, différent des autres et particulier aux chloroplastes.

L'affinité pour un nucléoside triphosphate donné ne semble pas être la même pour toutes les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe (voir chapitre 4). Ainsi, l'équilibre des nucléosides triphosphates au sein du chloroplaste semble être un moyen important pour réguler les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe. Il existe un enzyme capable de varier la proportion des "pools" de nucléosides triphosphates. Il s'agit de la nucléoside diphosphate kinase (NDPK). C'est un enzyme ubiquitaire recensé chez les procaryotes (Almaula et al., 1995) et les eucaryotes (Jong et Ma, 1991; Gilles et al., 1991). Il catalyse, par un mécanisme de type ping-pong, le transfert du phosphate-γ d'un nucléoside triphosphate sur un nucléoside diphosphate, comme indiqué ci-dessous:



Le rôle majeur de la NDPK est de maintenir à un certain niveau physiologique la quantité de nucléosides triphosphates autres que l'ATP (Parks et Argawal, 1973; Gilles et al., 1991). L'enzyme montre normalement peu de spécificité vis-à-vis des bases des nucléotides et transfère le phosphate via un intermédiaire très labile, la phosphohistidine (Moréra et al., 1994). La présence de cet enzyme dans une fraction soluble (stroma?) de chloroplaste d'Epinard a été établie par Bovet et Siegenthaler (1997); il s'agit de l'isoforme II de la NDPK de l'Epinard qui a été cloné dans *E.coli* par Eggman (1997). In *organello*, cette NDPKII

chloroplastique montre une plus grande spécificité pour l'UDP et le CDP que pour le GDP et l'ADP. En effet, lorsqu'on incube des chloroplastes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et d'un mélange de nucléosides diphosphates, les principaux nucléotides marqués en fonction du temps sont l'UTP et le CTP (Bovet et al., 1998). De plus, la déphosphorylation (*in organello*) de la NDPKII en fonction du temps est corrélée avec le marquage radioactif du CDP en $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ au dépens de la disparition du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ présent dans le milieu. Ce mécanisme de transfert préférentiel est dépendant de la structure intacte du chloroplaste (communication du Dr. L. Bovet, Laboratoire de Physiologie Végétale de Neuchâtel). Le chloroplaste possède donc un enzyme capable de maintenir un équilibre adéquat entre le pool d'ATP formé par photophosphorylation et le pool des autres nucléosides triphosphates. Par ce biais-là, le chloroplaste serait capable de distribuer de manière orientée l'énergie disponible vers des voies de biosynthèses (par exemple la biosynthèse des galactolipides en produisant de l'UTP) et/ou des activités lipide-kinasiques et protéine-kinasiques de l'enveloppe.

5.2. But du chapitre

Les études menées dans ce chapitre serviront essentiellement à déterminer:

- i) Dans quelle membrane (externe ou interne) de l'enveloppe se situe l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de phosphate dans les lipides X et Y.
- ii) Quelle est l'identité des lipides X et Y, et quel est le nucléotide préférentiel impliqué dans leur phosphorylation.
- iii) Si l'activité lipide-kinasique est catalysée directement par la NDPKII du chloroplaste.
- iv) Quel est le rôle de cette activité lipide-kinasique.

5.3. Résultats

Afin de déterminer la localisation des lipides X et Y dans les membranes de l'enveloppe, nous avons phosphorylé des membranes externes et internes de l'enveloppe dans un milieu d'incubation standard dépourvu d'ATP non-radioactif. Les lipides phosphorylés sont extraits puis séparés par CCM comme indiqué dans le chapitre 2. La figure 5.2 montre

l'autoradiographie de la séparation par CCM des lipides phosphorylés de membranes externes et internes de l'enveloppe incubées en absence d'ATP non-radioactif. D'une manière générale nous pouvons voir que les lipides PA et LPA sont, dans nos conditions expérimentales, principalement localisés dans la membrane interne (voir aussi la figure 3.4). Contrairement aux résultats obtenus dans le chapitre 3 (figure 3.4), le PIP est principalement localisé dans la membrane interne alors que le LPIP, reste quant à lui, plus marqué dans la membrane externe. De plus, nous pouvons clairement distinguer la présence d'un autre lipide situé entre le Rf de PIP et celui de PIP₂. Curieusement, nous pouvons observer deux lipides marqués distincts qui migrent au niveau du Rf correspondant à PIP₂. Ces deux bandes sont peut-être le reflet de la présence simultanée de LPIP et PIP₂. Ce résultat suggère la présence de PIP₂ dans les membranes externes de l'enveloppe; celui-ci serait principalement détectable dans des conditions particulières d'incubation (membranes externes phosphorylées en absence d'ATP froid). Le lipide X ne semble pas être spécifiquement localisé dans l'une ou l'autre des membranes de l'enveloppe; par contre le lipide Y, bien que présent dans les deux membranes, est environ six fois plus abondant (comptage Cerenkov) dans la membrane externe.

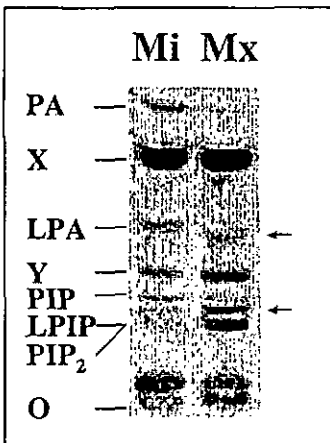


Fig. 5.2. Séparation des lipides de membranes externes (Mx) et internes (Mi) d'enveloppes phosphorylées dans des conditions standards sans ATP non-radioactif. Les flèches indiquent deux lipides phosphorylés d'identité inconnue, dont la présence est pour la première fois observée dans ce travail. Activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmmole.

La figure 5.3 représente les autoradiographies des lipides phosphorylés de membranes d'enveloppes ou de membranes plasmiques incubées en absence d'ATP non-radioactif, en présence d'ATP 0.01 mM ou en présence de CTP 0.01 mM. Cette figure montre que les lipides X et Y sont peu (Y), voire pas (X) présents dans les membranes plasmiques. L'incorporation de ³²P dans les lipides X et surtout Y de l'enveloppe est fortement stimulée

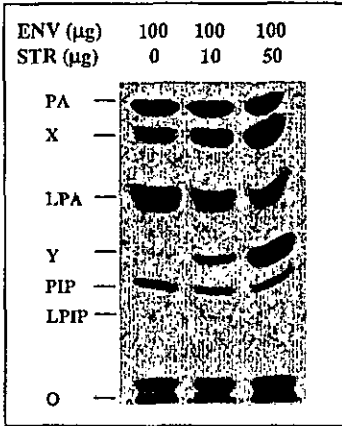


Fig. 5.4. Séparation des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées dans des conditions standard (activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mmole) en absence ou en présence d'une fraction de stroma dialysé. ENV, membranes d'enveloppes du chloroplaste; STR, fraction de stroma dialysé. Les quantités de stroma dialysé ajoutées sont indiquées sur le haut de la figure.

La figure 5.5 représente graphiquement l'effet d'une fraction de stroma sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe.

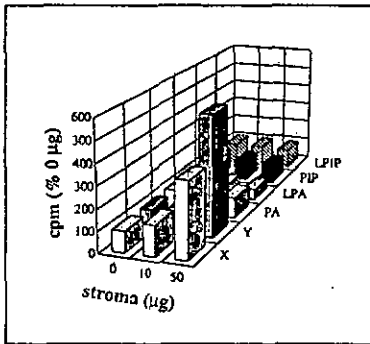


Fig. 5.5. Histogrammes représentant graphiquement l'effet de l'ajout d'une fraction stromatique sur l'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés de l'enveloppe (comptage Cerenkov).

Selon ces résultats, on peut imaginer la présence d'une éventuelle lipide kinase dans le stroma. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en incubant, dans un milieu contenant du TX-100, un extrait lipidique total d'enveloppes en présence de stroma dialysé. La figure 5.6 montre que vraisemblablement aucune protéine du stroma n'est directement impliquée dans la phosphorylation des lipides de l'enveloppe.

Néanmoins, bien que le stroma lui-même ne semble pas contenir une quelconque activité lipide-kinasique (figure 5.6), les résultats exposés ci-dessus (figures 5.3 et 5.4)

démontrent que le CTP et un facteur protéique du stroma sont impliqués dans le mécanisme de phosphorylation des lipides X et Y.

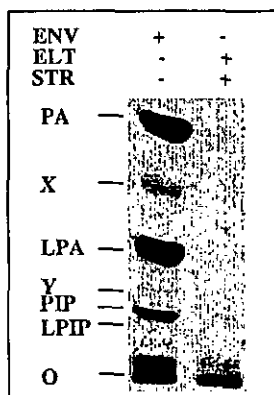


Fig. 5.6. Phosphorylation d'un extrait lipidique total (ELT) d'enveloppes en présence de stroma dialysé. Colonne 1: Phosphorylation de membranes d'enveloppes dans des conditions standard. Colonne 2: Phosphorylation d'un ELT de membranes d'enveloppes (0.2 mg) en présence de stroma dialysé dans un milieu d'incubation composé de Mops 50 mM pH 7.6, TX-100 0.03%, Na-deoxycholate 1mM, ATP 0.01mM, MgCl₂ 5mM et 10 μ Ci [γ -³²P]ATP. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mole.

Nous avons voulu déterminer dans quelle mesure un enzyme tel la NDPKII, qui peut générer du CTP à partir de CDP et d'ATP, est impliqué dans la phosphorylation des lipides de l'enveloppe du chloroplaste. A cette fin, nous avons incubé des membranes d'enveloppes en présence d'ATP non-radioactif et de NDPKII recombinante de l'Epinard. La figure 5.7 montre l'autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées en absence ou en présence de NDPKII recombinante.

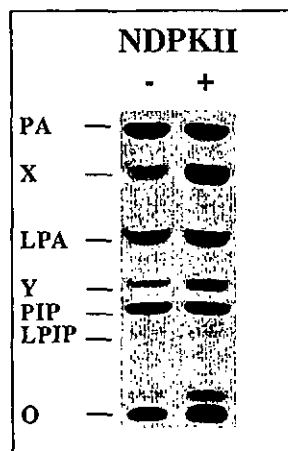


Fig. 5.7. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées dans des conditions standard en absence (-) ou en présence (+) de 1 μ g NDPKII recombinante. Activité spécifique de l'ATP: 10 Ci/mole.

D'une manière générale la NDPKII stimule l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. L'ajout de cet enzyme à des membranes d'enveloppe ne semble pas affecter de façon significative le marquage radioactif des autres lipides phosphorylés. A ce stade de la recherche, nous observons que le CTP et la NDPKII stimulent fortement l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Il s'agit donc d'établir un point commun entre ces deux facteurs (CTP et NDPKII) et leur effet sur l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Etant donné la nature de l'activité enzymatique de la NDPKII, le lien unissant cette dernière et le CTP ne pouvait être que le CDP. Nous avons donc phosphorylé des membranes d'enveloppes en absence ou en présence de CDP et d'ATP non-radioactif afin de déterminer l'effet du CDP sur la phosphorylation des lipides X et Y. La figure 5.8.A montre l'autoradiographie des lipides de membranes d'enveloppes incubées dans différentes conditions comprenant de l'ATP non-radioactif et +/- CDP, ainsi que +/- NDPKII. La figure 5.8.B représente les résultats de la figure 5.8.A sous la forme d'histogrammes.

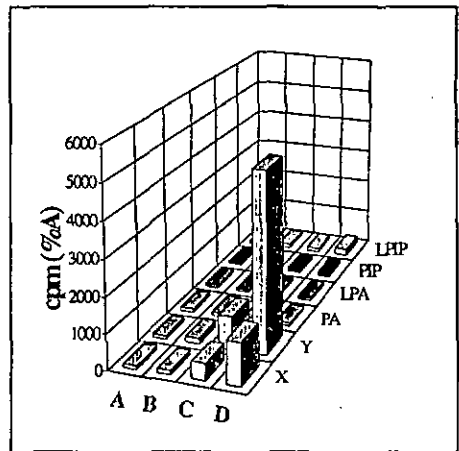
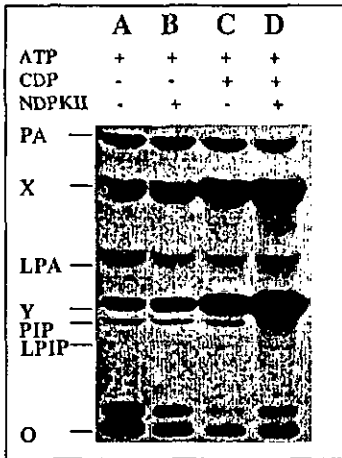


Fig. 5.8.A. Autoradiographie d'une séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylés dans des conditions standard en présence de +/- CDP ainsi que de +/- NDPKII. A: condition standard d'incubation (0.05 mM ATP, Activité spécifique de l'ATP: 2 Ci/mmmole); B: A + NDPKII (1 μg); C: A + CDP 0.05 mM; D: B + CDP 0.05 mM.

Fig. 5.8.B. Histogrammes représentant les résultats montrés dans la figure 5.8.A. Cpm (%A): cpm mesurés pour un lipide dans une condition donnée/cpm du même lipide mesurés dans la condition d'incubation standard (A). Les cpm sont mesurés par comptage Cerenkov. A, B, C, D: conditions d'incubation décrites dans la légende de la Fig. 5.8.A.

Nous remarquons que le CDP stimule fortement l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Par rapport à l'ajout de CDP seul, l'ajout simultané de NDPKII et de CDP provoque un marquage encore plus intense des lipides X et Y.

Nous avons également déterminé l'effet conjoint du CDP et de la NDPKII sur la phosphorylation des lipides X et Y en absence d'ATP non-radioactif. La figure 5.9 montre l'effet de concentrations croissantes de NDPKII, en présence d'une concentration fixe en CDP, sur la phosphorylation des lipides de l'enveloppe.

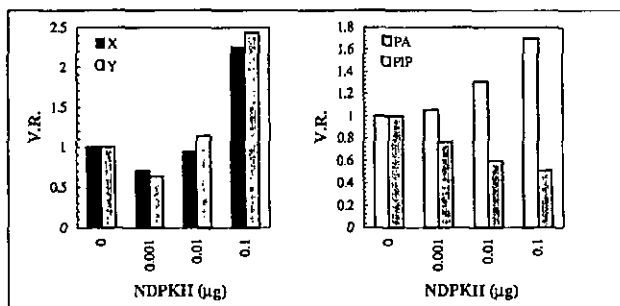


Fig 5.9. Effet de concentrations croissantes de NDPKII sur la phosphorylation des lipides des membranes d'enveloppes. Des membranes d'enveloppes sont incubées en absence d'ATP froid (Activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmmole) mais en présence de CDP 0.01 mM et de concentrations croissantes de NDPKII. Les lipides sont extraits et séparés sur CCM comme indiqué dans le chapitre 2. Nous avons représenté graphiquement l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X, Y, PA et PIP en fonction de la quantité de NDPKII ajoutée au milieu d'incubation. V.R.: valeur relative, représentant l'incorporation de ^{32}P en cpm pour un lipide donné en présence d'une quantité donnée de NDPKII/ l'incorporation de ^{32}P en cpm pour le même lipide dans la condition d'incubation sans NDPKII.

Sur cette figure, nous observons que l'addition de NDPKII à des concentrations variées dans le milieu d'incubation influence de la même manière l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. En effet, le marquage de ceux-ci est inhibé par de faibles quantités de NDPKII (0.001 µg), alors que la présence de quantité 100 fois plus importante de NDPKII (0.1 µg) stimule le marquage des lipides X et Y dans des proportions quasi identiques (stimulation de 2.3 à 2.4 fois). Sur le graphique situé à droite de cette même figure, nous constatons que l'incorporation de ^{32}P dans PA est également stimulée par la présence de concentrations croissantes de NDPKII. Contrairement à ce que l'on observe pour les lipides X et Y, cette dernière stimule déjà le marquage du PA à de faibles concentrations (0.001 µg). La stimulation, en présence de NDPKII, de l'incorporation de ^{32}P dans le PA reste toutefois proportionnellement plus faible (stimulation de 1.7 fois) que celle observée pour les lipides X

et Y (stimulation de 2.3 à 2.4 fois). L'incorporation de ^{32}P dans le PIP est, quant à elle, inhibée par la présence de NDPKII dans le milieu d'incubation.

Les résultats présentés ci-dessus indiquent que la NDPKII, le CTP et le CDP sont impliqués dans le processus d'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Selon ces mêmes résultats, le CTP plutôt que l'ATP serait le substrat nucléotidique de la lipide kinase responsable du marquage des lipides X et Y. Afin de démontrer définitivement l'implication du CTP dans la phosphorylation de ces lipides, nous avons phosphorylé des membranes d'enveloppes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$.

Le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ n'étant pas disponible sur le marché, nous l'avons produit enzymatiquement dans un milieu composé de Mops 50 mM, CDP 2.5 μM , MgCl_2 5 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1.7 μM et \pm -NDPKII 1 μM . Après 10 minutes d'incubation à 23°C, les milieux sont filtrés afin d'éliminer la NDPKII.

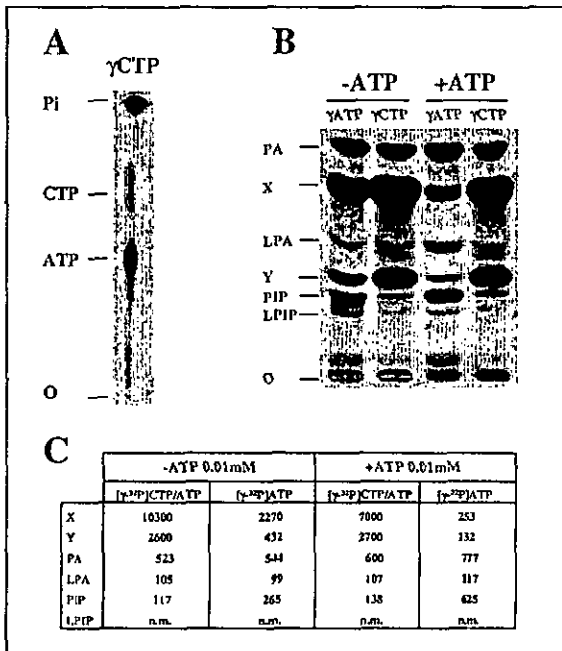


Fig. 5.10. Préparation enzymatique d'une fraction mixte de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ et de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes en présence de ce mélange de nucléotides. A: Séparation sur CCM PEI-cellulose des nucléotides obtenus à partir d'un milieu d'incubation contenant de Mops 50 mM, CDP 2.5 μM , MgCl_2 5 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1.7 μM et NDPKII 1 μM . B: Autoradiographie d'une séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylés dans des conditions standards en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 5 μCi (γATP) ou de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ 5 μCi (γCTP). C: Tableau représentant les comptages Cerenkov (cpm) des lipides phosphorylés pour chacune des conditions d'incubation.

L'analyse des radionucléotides présents dans les filtrats est faite par CCM PEI-cellulose (voir chapitre 2). Des membranes d'enveloppes sont ensuite incubées en présence d'une fraction

aliquote de l'un ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) ou l'autre ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP} + [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) des filtrats. Les lipides phosphorylés sont extraits et séparés sur CCM (voir chapitre 2). La figure 5.10 en A montre la séparation sur CCM PEI-cellulose du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ produit comme indiqué ci-dessus. Nous constatons que si du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ est bel et bien produit, il reste malgré tout une forte proportion de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. La figure 5.10 en B montre l'autoradiographie de la CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées en présence d'une fraction aliquote contenant du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP/ATP}$ ou du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et +/- d'ATP non-radioactif. Nous remarquons d'une manière générale que les lipides X et Y sont plus fortement marqués (~5 fois) en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP/ATP}$ (10300 cpm et 2600 cpm) qu'en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2270 cpm et 432 cpm). L'incorporation de ^{32}P dans PA, LPA, PIP et LPIP est plus faible en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP/ATP}$ qu'en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (voir figure 5.10 en C).

Afin de produire du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ pur, nous avons incubé la NDPKII dans un milieu contenant du CDP en excès (100 μM). Comme nous pouvons le voir sur la figure 5.11 en A représentant la séparation sur CCM PEI-cellulose des nucléotides radioactifs produits ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ non-purifié, NP), l'excès de CDP dans le milieu d'incubation permet de produire quasi intégralement du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$. Afin d'éliminer le CDP et le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ présent dans notre échantillon de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, nous avons gratté le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ de la plaque de PEI-cellulose après avoir séparé la totalité de l'échantillon contenant les nucléotides radioactifs et le CDP. Le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ récupéré est ensuite élué de la cellulose par filtration. La figure 5.11 en A, colonne P, représente la séparation sur CCM PEI-cellulose du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ainsi purifié. Nous remarquons que le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ n'est plus présent dans l'échantillon purifié (P). Seul du phosphate radioactif (P_i) et le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ subsiste dans cet échantillon purifié. De cette manière nous avons également éliminé le CDP contenu dans l'échantillon de nucléotides non-purifié (NP). Nous avons ensuite phosphorylé des membranes d'enveloppes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 0.05 nM (5 nCi). La figure 5.11 en B représente l'autoradiographie des lipides marqués radioactivement issus de membranes d'enveloppes phosphorylées en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ou de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Cette figure indique clairement que l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y utilise préférentiellement le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ comme substrat nucléotidique. Les autres activités lipide-kinasiques des membranes d'enveloppes ne sont que peu ou pas détectables en présence d'une si faible concentration (0.05 nM/5 nCi) en radionucléotides. L'enzyme responsable du marquage de X et Y semble donc posséder une très forte affinité pour le CTP.

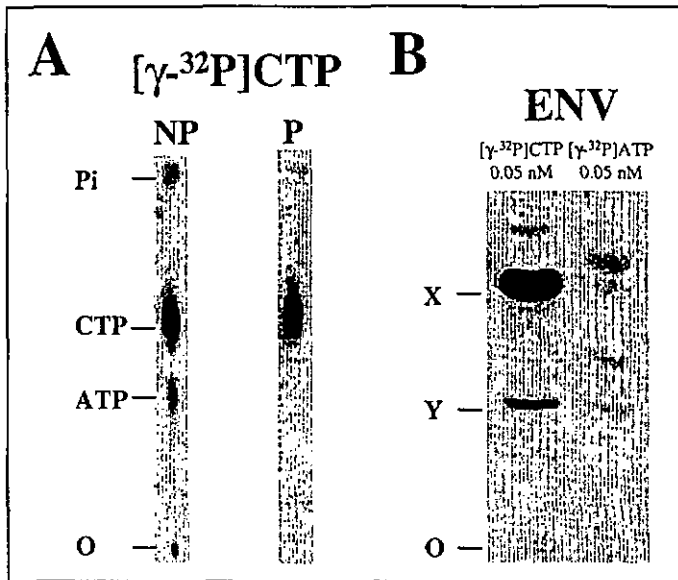


Fig. 5.11. Préparation d'une fraction pure de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ et phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes en présence de celle-ci. A) NP: Séparation par CCM PEI-cellulose d'une fraction non-purifiée (NP) mais enrichie en $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ préparée en incubant la NDPKII dans un milieu contenant du CDP en excès ($100\ \mu\text{M}$) par rapport au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. P: Séparation par CCM PEI-cellulose d'une fraction pure de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ obtenue par grattage de la cellulose contenant le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ suite à une première séparation sur PEI-cellulose de l'échantillon NP et élution du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ de la cellulose par filtration. B) Autoradiographie d'une séparation par CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées dans des conditions standard d'incubation sans ATP non-radioactif en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ $0.05\ \text{nM}$ ($5\ \text{nCi}$). Activité spécifique de l'ATP ou CTP: $1\ \text{Ci}/\text{mmole}$.

Nous avons mentionné (voir paragraphe 5.1) que mis à part le CTP, l'UTP était également préférentiellement produit *in organello* par la NDPKII en présence d'un mélange de nucléosides diphosphates. Nous avons donc voulu déterminer si le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ pouvait également être un substrat pour l'activité lipide-kinasique responsable du marquage des lipides X et Y. Dans ce but nous avons phosphorylé des membranes d'enveloppes (E) et des membranes plasmiques (MP, pour comparaison), en présence soit de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ ($5\ \text{nCi}/0.05\ \text{nM}$) ou de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ($5\ \text{nCi}/0.05\ \text{nM}$). Sur la figure 5.12, nous voyons que le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ est un moins bon substrat que le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ pour la lipide kinase responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Sur cette figure, nous observons également que les membranes plasmiques ne possèdent pas (ou peu, éventuelle contamination par des membranes d'enveloppes) d'activité lipide-kinasique semblable à celle des membranes d'enveloppes utilisant le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ comme substrat nucléotidique.

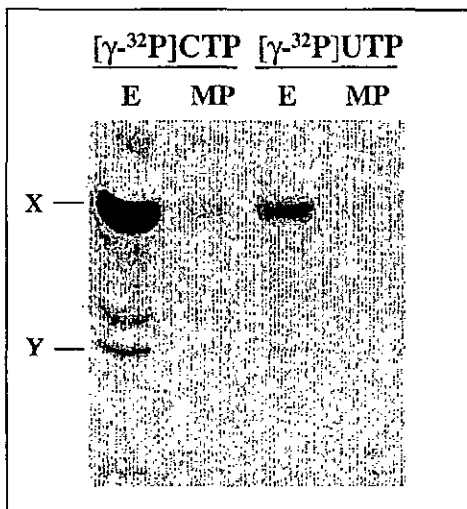


Fig. 5.12. Phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes ou de membranes plasmiques en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ou de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ 5 nCi préparé comme expliqué dans la figure 5.11. E: membranes d'enveloppes. MP: membranes plasmiques.

Afin de déterminer si les lipides X et Y subissent un cycle de phosphorylation/déphosphorylation, nous avons procédé à une expérience de "pulse and chase". Des membranes d'enveloppes sont phosphorylées en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ pendant 5 minutes (pulse), puis l'on ajoute 1 mM CTP dans le milieu d'incubation (chase). La figure 5.13.A montre l'autoradiographie, après séparation par CCM, des lipides phosphorylés suite à l'expérience de "pulse and chase". Nous pouvons voir que le lipide X est sujet à une forte et rapide déphosphorylation (53% en 15 secondes). Contrairement à celle du lipide X, l'incorporation de ^{32}P dans le lipide Y est fortement et rapidement stimulée par l'ajout de CTP 1 mM (445% en 15 secondes). Nous remarquons également que le PA et le LPA sont faiblement marqués en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$. L'incorporation de ^{32}P dans ces deux lipides ne varie que très peu après l'ajout de CTP 1 mM dans le milieu. La figure 5.13.B représente graphiquement les résultats montrés par la figure 5.13.A.

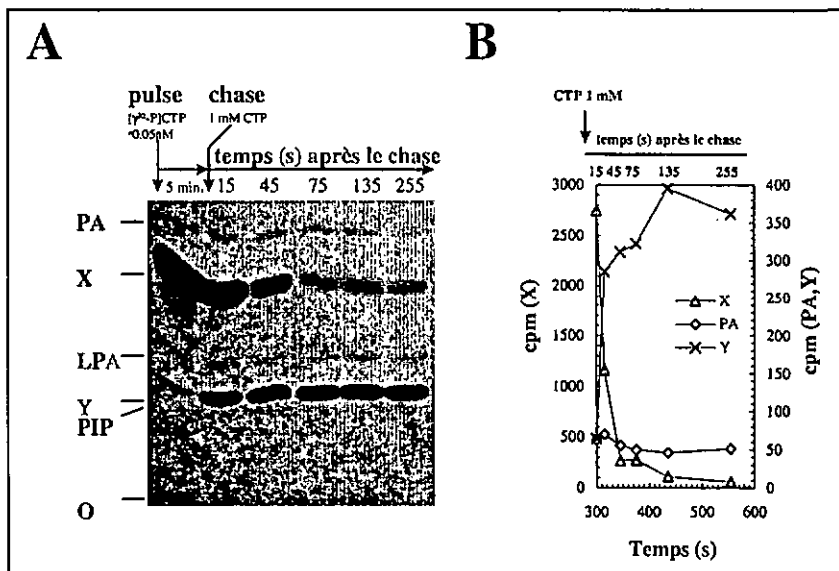


Fig. 5.13. Expérience de "pulse-chase" sur des membranes d'enveloppes du chloroplast d'Epinarid. La phosphorylation des lipides de l'enveloppe est réalisée dans un milieu composé de Mops 50 mM, MgCl_2 5 mM, membranes d'enveloppes 0.6 mg, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ 100 nCi. Une fraction aliquote est récoltée après 5 minutes d'incubation, puis on ajoute au reste du milieu d'incubation une concentration finale de 1 mM CTP non-radioactif. Des fractions aliquotes sont récoltées durant les dernières 255 secondes de l'expérience. Les lipides des différentes fractions ainsi récoltées sont ensuite analysés de manière classique selon la méthode indiquée dans le chapitre 2. A) Autoradiographie de la séparation des lipides par CCM. B) Représentation graphique des résultats obtenus après comptage Cerenkov de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X, Y et PA.

A ce stade de notre recherche, nous connaissons le substrat nucléotidique de la lipide kinase qui est responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Il s'agit maintenant de déterminer l'identité des lipides X et Y. Dans le système de solvant acide (voir chapitre 2), les lipides X et Y ne comigrent avec aucun lipide phosphorylé (issu d'une activité lipide-kinasique) connu. Ainsi, les Rfs de X et Y ne correspondent ni à celui du PPA, ni à celui du PAP (PAF) et ni à celui du céramide-1-P. Dans le système de solvant acide, le lipide X possède un Rf semblable à celui du PG, alors que le Rf du lipide Y est très proche du CDP-DAG (cytidinc-5'-diphospho-diacylglycérol). Afin de confirmer ou d'infirmer la similarité des Rfs des lipides X et Y avec ceux des lipides sus-mentionnés, nous avons séparé les lipides X et Y purs ainsi que des lipides de référence dans un autre système de solvant qui contient de l'ammoniaque (solvant basique). La figure 5.14 représente l'autoradiographie des lipides X et Y séparés à l'aide du solvant basique. Nous pouvons voir sur cette figure que les lipides X et Y ne migrent ni avec le PG, ni avec le CDP-DAG, en présence de ce solvant.

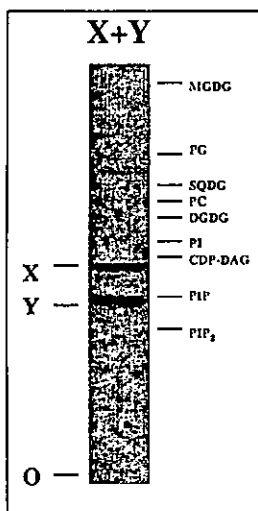


Fig. 5.14. Séparation des lipides X et Y par CCM en présence d'un solvant basique composé de chloroforme/méthanol/ammoniaque/eau (90:90:7:22, v/v/v/v). Les lipides X et Y sont grattés et extraits à partir d'une plaque de CCM sur laquelle on fait migrer un extrait de lipides phosphorylés de l'enveloppe à l'aide du solvant de migration acide. Les lipides X et Y sont ensuite déposés sur une nouvelle plaque de CCM qui est développée cette fois en présence du solvant basique.

Afin de désigner un candidat lipidique susceptible d'être phosphorylé, nous avons répertorié les lipides connus que l'on trouve dans les membranes de l'enveloppe et comparé les Rf de ceux-ci avec les lipides X et Y. En effet, sachant que l'incorporation d'un phosphate sur un lipide diminue le Rf de ce dernier, nous avons cherché quel(s) lipide(s) connu(s) de l'enveloppe, possédant un Rf supérieur à X et Y, était susceptible d'être phosphorylé. Les deux seuls lipides possédant un Rf supérieur au Rf de X, dans notre système de solvant acide, sont (mis-à-part les pigments) le DAG et le MGDG (voir chapitre 3). Le DAG étant le substrat lipidique de la DG-kinase, nous avons donc supposé que le MGDG pourrait être le substrat de la lipide kinase qui produit le lipide X.

Le galactose contenu dans le MGDG est susceptible d'accepter un phosphate sur un de ces groupements OH. Afin de déterminer si nous pouvons inhiber compétitivement l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X en présence de galactose, nous avons phosphorylé des membranes d'enveloppes dans un milieu contenant des concentrations différentes en galactose. La figure 5.15 nous montre un graphique représentant l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X, Y, PA et LPA en fonction de la concentration de galactose dans le milieu. Nous voyons que l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y, par rapport à celle dans les lipides PA et LPA, est fortement inhibée par la présence de galactose dans le milieu d'incubation. Ainsi le galactose semble inhiber de manière assez spécifique l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y.

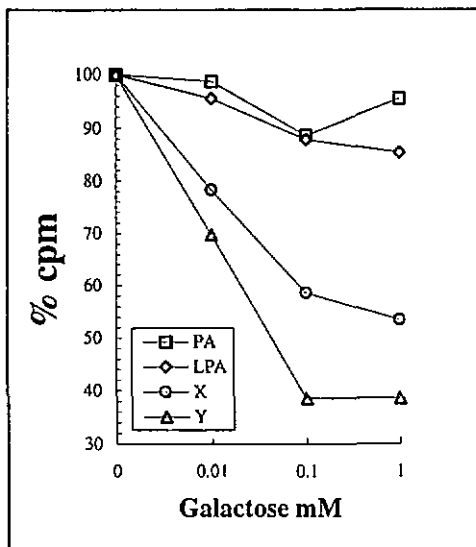


Fig. 5.15. Phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes dans un milieu contenant des concentrations différentes en galactose (0, 0.01, 0.1, 1 mM). L'incorporation de ^{32}P (cpm) dans les lipides X, Y, PA et LPA en fonction de la concentration de galactose dans le milieu d'incubation est exprimée en pourcent de l'échantillon incubé en absence de galactose.

Dans le but de déterminer si le MGDG pouvait servir de substrat lipidique à la lipide kinase produisant le lipide X, nous avons phosphorylé des membranes d'enveloppes dans un milieu d'incubation contenant du TX-100 0.06%, du BPG (1 mM) et +/- de MGDG (1 mM). La figure 5.16 représente l'autoradiographie de la CCM des lipides de membranes d'enveloppes phosphorylées en absence ou en présence de MGDG. D'une façon générale, nous observons que l'ajout de MGDG stimule l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y de respectivement 7 à 10 fois par rapport à un témoin sans MGDG. L'incorporation de ^{32}P dans le PA est également stimulée (1,8 fois) par la présence de MGDG dans le milieu d'incubation.

Les deux résultats exposés dans les figures 5.15 et 5.16, suggèrent fortement que le substrat de la lipide kinase produisant le lipide X serait le MGDG. D'autres expériences, comme le traitement de membranes d'enveloppes avec des enzymes qui hydrolysent le MGDG (β -galactosidase et LRA), suggèrent également que le MGDG est le précurseur du lipide X (voir également le chapitre 6, traitement avec la thermolysine). En effet, de tels traitements inhibent partiellement (β -galactosidase) ou totalement (LRA) l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X (résultats non-montrés).

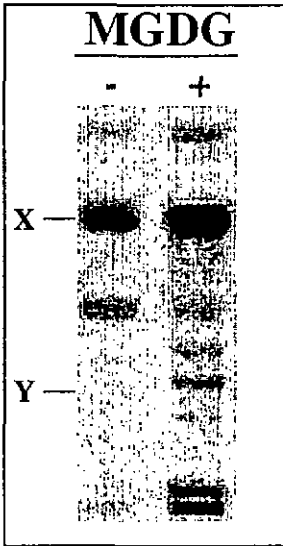


Fig. 5.16. Phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes en absence (-) ou en présence (+) de 1 mM de MGDG. Des membranes d'enveloppes sont incubées dans un milieu contenant du TX-100 0.06%, du BPG (1 mM), +/- de MGDG (1 mM), Mops 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM et $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ 1 μCi (activité spécifique de l'ATP: 3000 Ci/mmoles). Les lipides sont extraits et séparés par CCM comme indiqué dans le chapitre 2.

Afin de déterminer si le lipide X est bel et bien du $MGDGP$ (MGDG phosphorylé) nous avons fragmenté celui-ci (X) pour nous assurer qu'il contient bien du galactose-P. A cette fin, nous avons procédé à une hydrolyse acide (voir chapitre 2) du lipide X permettant de rompre la liaison β -1,4 entre le DAG et le galactose du MGDG (ce traitement chimique a été mis au point avec le Dr T. Chuard de l'institut de Chimie de l'université de Neuchâtel). Nous avons d'abord procédé à quelques tests préliminaires dont le but était de vérifier que le traitement infligé (i) hydrolysait la liaison éther entre le DAG et le galactose du MGDG, (ii) ne rompait pas la liaison ester entre le phosphate et le galactose du galactose-6-P. La figure 5.17 représente une plaque de CCM sur laquelle nous avons fait migrer des hexoses (galactose, galactose-6-P) ainsi que du MGDG et du galactose-6-P ayant subi une hydrolyse acide. Nous observons que le MGDG est bel et bien hydrolysé en glycérol et en galactose (colonne 5), alors que la liaison ester du galactose-6-P n'est que partiellement rompue (colonne 6). Nous avons donc procédé à l'hydrolyse acide des lipides X et Y, puis nous avons séparé par CCM (avec deux types de solvant, voir chapitre 2) les produits de cette hydrolyse en présence de marqueurs non-radioactifs (galactose, glucose, galactose-6-P, glucose-6-P, galactose-1-P, glucose-1-P) et radioactifs (galactose-6- ^{32}P et glucose-6- ^{32}P).

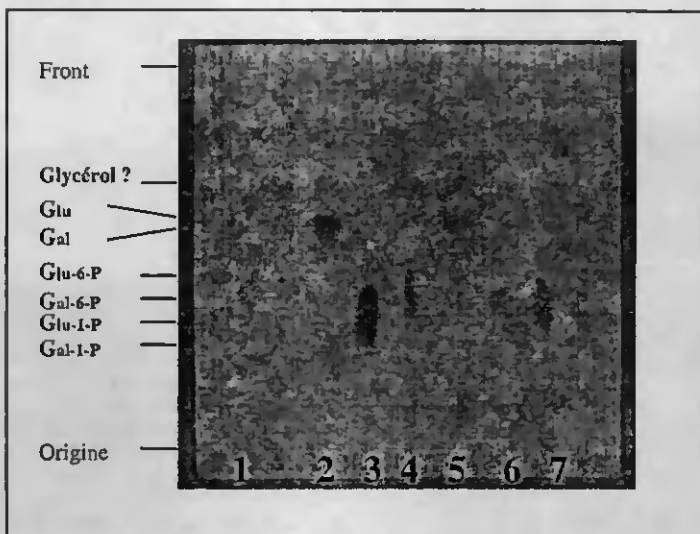


Fig. 5.17. Séparation de glucose, de galactose, de MGDG hydrolysé, de galactose-6-phosphate hydrolysé ainsi que de dérivés phosphatés de ces hexoses par CCMHP à l'aide d'un solvant composé de méthanol/eau (40:10) contenant 52 mM HCOOH/1mM EDTA-Na₂. 1: 100 nmoles glucose (G_{lu}). 2: 100 nmoles galactose (G_{al}). 3 et 7: 100 nmoles galactose-6-phosphate (G_{al-6-P}). 4: 10 nmoles galactose-6-phosphate (G_{al-6-P}). 5: 100 nmoles MGDG hydrolysé. 6: 100 nmoles galactose-6-phosphate (G_{al-6-P}) hydrolysé.

Les marqueurs radioactifs ont été produits à partir de galactose et de glucose dans un milieu tamponné contenant du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et un extrait d'hexokinase de Levure (EC 2.7.1.1). La figure 5.18 représente la séparation des produits d'hydrolyse de X et Y sur CCM à l'aide de deux solvants différents (A et B). Nous remarquons qu'un produit marqué radioactivement, issu de l'hydrolyse acide des lipides X et Y, possède le même Rf que le galactose-6-P (G_{al6P}) dans les deux systèmes de solvant utilisés. Nous pouvons également remarquer que le G_{al6P} et le G_{lu6P} (glucose-6-P) ne possèdent pas les mêmes Rfs et que ces deux hexoses phosphatés inversent leurs positions respectives suivant le solvant utilisé. Il est important de noter que l'ajout de G_{al6P} non-radioactif dans les échantillons que l'on fait migrer (X* et G_{al6P}*) retarde la migration de ceux-ci (Figure 5.18.A). Ces résultats indiquent la présence d'un groupement galactose-6(?)P dans les lipides X et Y.

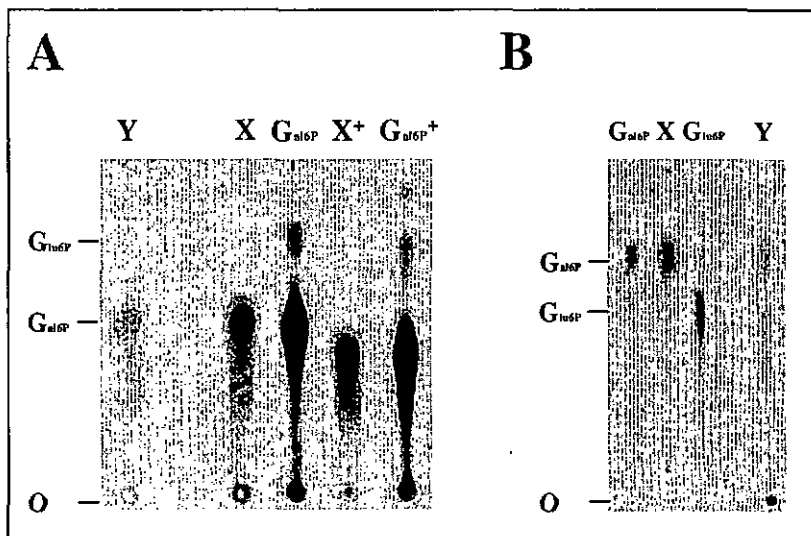


Fig. 5.18. Hydrolyse acide des lipides X et Y, séparation et identification des produits d'hydrolyse par CCM. A) Séparation des produits d'hydrolyse par CCMHP sur plaque de silice à l'aide d'un solvant composé de méthanol/eau (40:10) contenant 52 mM HCOOH/1mM EDTA- Na_2 . B) Séparation des produits d'hydrolyse par CCM sur plaque de cellulose à l'aide d'un solvant composé de méthanol/acide formique/eau (85:15:5). Gal6P: Galactose-6-phosphate [^{32}P]. Glu6P: Glucose-6-phosphate [^{32}P]. Gal6P $^+$: Galactose-6-phosphate [^{32}P] + 100 nmoles galactose-6-phosphate. X: lipide X hydrolysé. X $^+$: lipides X hydrolysé + 100 nmoles galactose-6-phosphate.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre 4, les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe du chloroplaste sont fortement régulées par divers facteurs chimiques et physiques. Les produits de ces activités (les lipides phosphorylés) servent certainement aux fonctions vitales du chloroplaste. Nous avons tenté de déterminer si l'activité lipide-kinasique responsable du marquage des lipides X et Y pouvait être impliquée/stimulée dans/par un éventuel mécanisme de transmission de signaux. Dans ce but, nous avons incubé des membranes d'enveloppes en présence d'un activateur des protéines G (protéine impliquée dans le mécanisme classique de transmission de signaux, voir paragraphe 1.5.2), le mastoparan. Les figures 5.19 et 5.20 représentent graphiquement le pourcentage d'activation (par rapport à un témoin sans mastoparan) de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe en présence de 10 μM de mastoparan et 0.01mM d'ATP (figure 5.19) ou de 10 μM de mastoparan sans ATP non-radioactif (figure 5.20). Nous pouvons voir sur ces deux figures que le mastoparan stimule fortement (1.5 à 1.9 fois) l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. L'incorporation

de ^{32}P dans les autres lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe est moins stimulée (activation variant de -1.1 à 1.6 fois) par la présence de $10\ \mu\text{M}$ de mastoparan.

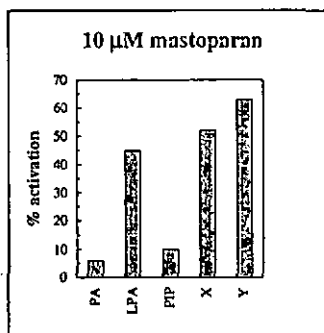


Fig. 5.19. Phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes dans des conditions standards ($0.01\ \text{mM}$ ATP) en présence de $10\ \mu\text{M}$ mastoparan. Histogramme représentant le pourcent d'activation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA, LPA, X, Y et PIP par rapport à un témoin incubé sans mastoparan.

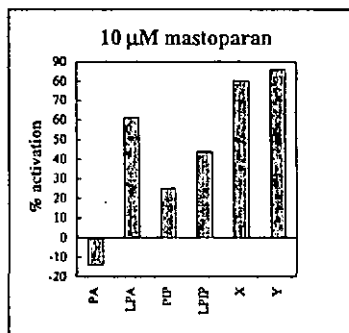


Fig. 5.20. Phosphorylation des lipides de membranes d'enveloppes dans des conditions standards sans ATP non-radioactif en présence de $10\ \mu\text{M}$ mastoparan. Histogramme représentant le pourcent d'activation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA, LPA, X, Y, PIP et LPIP par rapport à un témoin incubé sans mastoparan.

Selon ces résultats, la lipide kinase responsable de la phosphorylation de X et Y pourrait être stimulée de manière directe ou indirecte par des protéines G. Ces observations suggèrent à nouveau fortement que des lipides phosphorylés de l'enveloppe sont impliqués dans des mécanismes de transmission de signaux.

5.4. Discussion

Les résultats obtenus dans ce chapitre nous ont permis de mieux caractériser l'activité lipide-kinasique qui produit les lipides phosphorylés X et Y dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Nous pouvons ainsi mentionner que:

- 1) L'activité lipide-kinasique de l'enveloppe du chloroplaste responsable de l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X est uniformément présente dans les deux membranes, externes et internes,

de l'enveloppe. Par contre l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans le lipide Y est préférentiellement localisée dans la membrane externe (voir figure 5.2).

2) L'activité enzymatique sus-mentionnée est stimulée par la présence de CTP dans le milieu d'incubation (voir figure 5.3). Elle n'est pas ou peu présente dans les membranes plasmiques dont les diverses activités lipide-kinasiques (DG-kinasique, PA-kinasique, PI-kinasique, PIP-kinasique) ont fait et font actuellement encore l'objet de nombreuses recherches. L'activité(s) lipide-kinasique(s) étudiée dans ce chapitre semble(nt) donc être spécifique à la membrane de l'enveloppe (voir également le point 7). En effet, nous n'avons trouvé aucune information dans la bibliographie faisant part d'une telle activité lipide-kinasique dans d'autres systèmes membranaires ou d'autres compartiments cellulaires. Il s'agit à notre connaissance de la première fois que l'on fait état d'une activité lipide-kinasique utilisant préférentiellement le CTP comme substrat nucléotidique (voir point 7 du paragraphe 5.4). Ainsi, et jusqu'à preuve du contraire, cette activité lipide-kinasique pourrait servir de marqueur spécifique des membranes de l'enveloppe.

3) Un facteur protéique du stroma (stroma dialysé) semble stimuler l'activité lipide-kinasique spécifique à l'enveloppe du chloroplaste (fig. 5.4). En effet, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y est stimulée par l'ajout de stroma dans le milieu d'incubation (fig 5.4). Ce résultat, ainsi que la stimulation de cette activité lipide-kinasique par du CTP exogène, suggère fortement qu'un enzyme tel la NDPKII est impliqué dans la régulation de l'incorporation de phosphate dans les lipides X et Y. En effet, la NDPKII peut varier la balance nucléotidique au sein du chloroplaste au profit du CTP (Bovet et al, 1998) et de cette manière réguler l'activité lipide-kinasique propre à l'enveloppe du chloroplaste. Selon le résultat montré dans la figure 5.6, le stroma lui-même ne comprend aucune activité lipide-kinasique soluble pouvant utiliser comme substrat un ELT (extrait lipidique total) de membranes d'enveloppes.

4) Comme nous l'avons mentionné dans le point 3, la NDPKII (recombinante) semble réguler de manière positive (stimulation) l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Dans le point 3 nous mentionnons également que le stroma ne contient pas d'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Ce résultat suggère fortement que la NDPKII n'est pas capable de catalyser directement le transfert de phosphate sur du MGDG (supposé substrat de l'activité lipide-kinasique propre

aux membranes d'enveloppes; voir point 9). Cette dernière assertion doit encore être considérée avec prudence. En effet, certaines expériences en cours dans notre laboratoire suggèrent fortement l'existence d'une activité de phosphotransfert (*in vitro*) de la NDPKII sur du galactose (test enzymatique photométrique de Lasco et al., 1983, où le XDP est remplacé par du galactose; voir schéma ci-dessous) et sur du MGDG (test enzymatique de phosphotransfert avec de la NDPKII marquée au ^{32}P). L'activité de phosphotransfert de la NDPKII en présence de MGDG est cependant trop faible pour être prise en compte. D'autres expériences seront encore nécessaires pour trouver le milieu d'incubation (détergent, sels etc.) dans lequel la NDPKII peut transférer de manière optimale son phosphate labile sur le groupement galactose du MGDG.

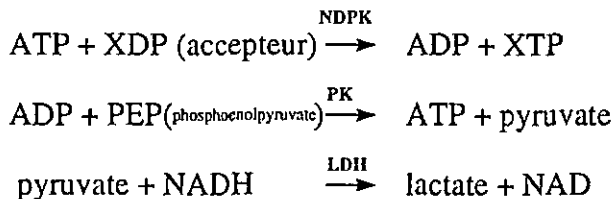


Fig. 5.21. Principe du test enzymatique photométrique de Lasco et al. (1983) pour mesurer l'activité de la NDPK. Afin de démontrer que la NDPKII peut transférer du phosphate sur du galactose, nous avons remplacé le XDP par du galactose dans le milieu d'incubation. NDPK: Nucléoside diphosphate kinase, PK: Pyruvate kinase, LDH: Lactate déhydrogénase.

5) La présence de CDP dans le milieu d'incubation contenant de l'ATP non-radioactif stimule fortement l'activité lipide-kinasique spécifique à la membrane de l'enveloppe. Cette stimulation est plus conséquente que celle obtenue par l'ajout de NDPKII seul. La présence simultanée de CDP et de NDPKII provoque une énorme stimulation (100 à 600 fois) de l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y. Ces résultats (fig. 5.8) signifient que du CTP est impliqué dans le mécanisme de phosphorylation de ces deux lipides. En effet, la présence simultanée de NDPKII, de CDP et d'ATP dans le milieu favorise la formation de CTP. La stimulation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y, obtenue en présence de CDP seul, est probablement due à la présence de NDPKII endogène dans nos préparations de membranes d'enveloppes. La présence de cet enzyme dans nos enveloppes peut être le reflet d'une contamination des enveloppes par du stroma, même si la présence de

NDPKII située dans l'espace intermembranaire ne peut pas être exclue (communication personnelle du Dr Lucien Bovet).

6) L'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et de CDP est stimulée de manière identique (intensité identique) par l'ajout de quantités croissantes de NDPKII (fig. 5.9). Ce résultat suggère l'implication d'une même lipide kinase, dont le substrat nucléotidique serait le CTP, dans le processus de phosphorylation des lipides X et Y.

7) Les résultats montrés dans les figures 5.10, 5.11 et 5.12 indiquent sans équivoque que le substrat nucléotidique de la lipide kinase spécifique à l'enveloppe est le CTP. Ces résultats (fig. 5.12) confirment également que cette activité lipide-kinasique n'est pas présente dans les membranes plasmiques. La DG-kinase de la membrane de l'enveloppe semble également pouvoir utiliser le CTP comme substrat. Même si cette activité DG-kinasique en présence de CTP est très faible, cet enzyme semble quand même posséder une affinité plus forte pour le CTP que la DG-kinase de la membrane plasmique. Cette observation nous paraît importante, car elle permet de différencier la DG-kinase de la membrane de l'enveloppe de celle de la membrane plasmique.

8) Les résultats exposés dans la figure 5.13 montrent que le lipide X est sujet à un cycle rapide de phosphorylation et déphosphorylation. En effet, il est possible de chasser le ^{32}P fixé sur ce lipide à l'aide de CTP non-radioactif. Ce résultat suggère donc la présence d'une lipide X phosphatase dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste. La présence d'un tel enzyme (c'est-à-dire une phospholipide phosphatase) dans les membranes d'enveloppes du chloroplaste n'est pas invraisemblable. En effet, Malherbe et al. (1995) ont purifié une PA phosphatase impliquée dans le métabolisme des glycérolipides (voir chapitre 1) à partir de membranes d'enveloppes. L'incorporation de ^{32}P dans le lipide Y est par contre stimulée par la présence de CTP non-radioactif. Ce résultat peut être expliqué de deux manières différentes. 1) L'incorporation de ^{32}P dans le lipide Y est très fortement stimulée par la présence de CTP. Cette stimulation est plus importante que l'effet de dilution du CTP radioactif et provoque donc l'augmentation de ^{32}P dans le lipide Y. Ce phénomène serait le corollaire de celui observé pour les lipides PA, LPA et PIP en présence d'ATP non-radioactif (voir chapitre 4). 2) Le lipide Y est un sous-produit du lipide X (lysoX ou X phosphorylé) qui ne peut plus être sujet à une déphosphorylation ultérieure via une phosphatase. En présence d'une grande quantité de

CTP, le lipide X serait donc transformé en lipide Y par une lipide kinase ou une lipase A_2 spécifique à X. Cette deuxième hypothèse est illustrée par le schéma ci-dessous. Dans ce schéma, nous admettons à nouveau que le lipide X est en fait du MGDG phosphorylé (voir point 9).

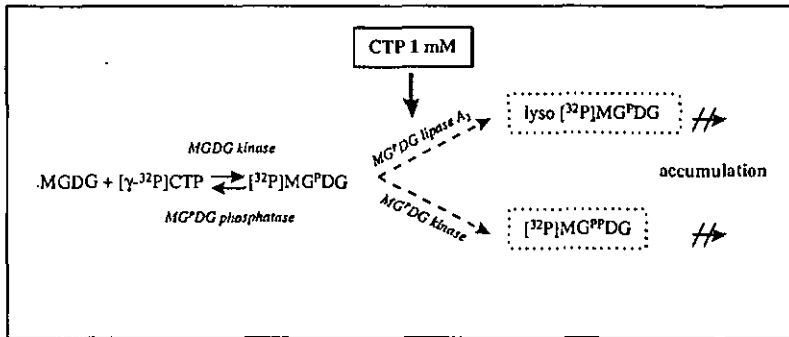


Fig. 5.22. Représentation schématique de l'interprétation N°2 concernant l'accumulation du lipide Y après ajout de 1 mM CTP lors de l'expérience de "pulse and chase" dont les résultats sont illustrés par la figure 5.13 (voir explication dans le texte, point 8). $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}=(\text{X})$: MGDG phosphorylé en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}=(\text{Y})$: $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}$ phosphorylé suite à la stimulation d'une hypothétique MGD^PDG kinase par le CTP, lyso $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}=(\text{lysoY})$: lysodérivé issu du $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}$ suite à l'activation par le CTP d'une éventuelle $^{32}\text{P}]\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}$ lipase A_2 .

9) Les figures 5.14, 5.15 et 5.16 suggèrent que le lipide X serait en fait du MGDG phosphorylé probablement sur le groupement galactose. Le Rf du lipide X, séparé dans nos conditions de CCM, laisse apparaître que seul le MGDG (mis à part les pigments) pourrait être le lipide précurseur non-phosphorylé à l'origine du lipide X. En effet, le MGDG possède un Rf supérieur au lipide X et son groupement galactose fait de lui un bon substrat potentiel pour une kinase. Des expériences d'inhibition spécifique de l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X avec du galactose, ainsi que l'effet stimulateur de l'ajout de MGDG sur la phosphorylation du lipide X, laissent supposer que le lipide X est en fait du MGDG. L'identification d'un composé marqué au ^{32}P , issu de l'hydrolyse acide (rompant les liaisons éthers) des lipides X ou Y, comme étant du galactose-6-phosphate, corrobore en effet cette supposition (fig. 5.17 et 5.18).

10) L'effet activateur du mastoparan (un activateur des protéines G et de la NDPK, Klinker et al., 1996) sur l'incorporation de ^{32}P dans les lipides de l'enveloppe et plus particulièrement dans les lipides X et Y, suggère l'implication de protéines G dans la régulation des activités lipide-kinasiques de l'enveloppe. L'effet activateur du mastoparan ainsi que l'implication de la

NDPKII, sur/dans les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe, permettent d'envisager une éventuelle participation des lipides issus de ces activités lipide-kinasiques dans des processus de transmission de signaux. En effet, Klinker et al. (1996) mentionnent que la NDPK pourrait, en stimulant les protéines G indirectement, jouer un rôle autrement plus important dans des processus de transmission de signaux que ce qu'on pensait jusqu'à présent.

En conclusion, nous pouvons spécifier que:

A) Le lipide X est probablement issu du MGDG, suite à une phosphorylation de ce dernier par une lipase spécifique qui utilise préférentiellement le CTP comme substrat nucléotidique. Bien que le lipide Y contienne également du galactose-6-phosphate, nous ne pouvons que postuler sur son identité. Dans l'état actuel de nos connaissances, et vu le résultat obtenu par l'expérience de "pulse-chase", le lipide Y serait en fait un dérivé du lipide X (lysoX ou X phosphorylé).

B) La très grande affinité de la MGDG-kinase pour le CTP, ainsi que la forte incorporation de phosphate dans les lipides X et Y en présence de faibles concentrations d'ATP (voir fig. 5.1 et le chapitre 4), laissent supposer un rôle important pour ces deux lipides lorsque la quantité en ATP dans le milieu est faible ou lorsque la balance nucléotidique est déséquilibrée au profit du CTP. La dépendance de l'activité MGDG-kinasique vis-à-vis du CTP et *de facto* vis-à-vis de la NDPKII pourrait refléter la présence d'un nouveau système de transmission de signaux propre au chloroplaste dont le messager secondaire serait le $MG^P DG$. En effet, il se peut que la NDPKII soit régulée par un mécanisme impliquant les protéines G; une fois activé cet enzyme produirait préférentiellement du CTP (comme on peut l'observer *in organello*) et de ce fait activerait la MGDG-kinase. Le $MG^P DG$ pourrait alors à son tour activer d'autres systèmes enzymatiques, ou alors, de part ses propriétés chimiques différentes (charge négative) de celle du MGDG, il pourrait modifier la conformation de la membrane de l'enveloppe. Une éventuelle modification de la conformation de la membrane de l'enveloppe (accolement des membranes, formation de sites de contacts) pourrait être hautement bénéfique dans des processus de transports tels que l'import de protéines d'origine cytoplasmique.

C) Le galactose phosphorylé contenu dans le $MG^P DG$ confère également à ce lipide un rôle de stockage d'énergie transitoire au niveau de la membrane. Cette énergie pourrait être récupérée

ultérieurement par un enzyme (phosphoglucomutase, NDPKII) capable d'échanger le phosphate sur une autre molécule (sucre, nucléoside etc.) et utilisée à d'autres fins. Nous pouvons également imaginer qu'un enzyme hydrolytique (galactosidase) peut libérer le galactose-6-phosphate contenu dans le MG^PDG et ainsi fournir au métabolisme du chloroplaste de l'énergie sous forme d'un sucre phosphorylé.

D) Ce phénomène montre pour la première fois l'implication directe de la NDPKII dans la régulation d'une activité enzymatique chloroplastique. En effet, la NDPKII peut, en raison de son activité de phosphotransfert sur les nucléosides diphosphatés, réguler positivement ou négativement l'activité MGDG-kinasique CTP dépendante de l'enveloppe du chloroplaste. Actuellement, et bien qu'*in vitro* il soit possible de transférer du ³²P de la NDPKII sur du galactose ou du MGDG (expériences préliminaires), nous ne pouvons affirmer que l'activité MGDG-kinasique est catalysée par la NDPKII. En effet, cette activité de phosphotransfert observée *in vitro* est trop faible comparée à l'activité lipide-kinasique que l'on observe *in membrano*. Cependant, le transfert préférentiel de phosphate sur le CDP catalysé *in organello* par la NDPKII, ainsi que la présence d'une activité lipide-kinasique qui dépend du CTP dans la membrane de l'enveloppe du chloroplaste, semblent montrer une interdépendance de ces deux activités enzymatiques. Ainsi, le véritable rôle physiologique au sein du chloroplaste de l'interdépendance de ces deux activités enzymatiques doit encore être déterminé.

Finalement, nous sommes convaincus que cette(ces) activité(s) lipide-kinasique(s) exhibée(s) par les membranes de l'enveloppe du chloroplaste, utilisant du CTP de manière spécifique, dont la présence (du CTP) dépend d'un enzyme (NDPKII) qui est connu pour interagir avec les protéines G elles-mêmes impliquées dans des mécanismes de transmission de signaux (Klinker et al., 1994; Klinker et al., 1996), reflètent la présence, si ce n'est d'un nouveau mécanisme de transmission de signaux, du moins d'un mécanisme indispensable aux fonctions du chloroplaste.

CHAPITRE 6

Phosphorylation *in organello* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard

6.1. Introduction

Les chapitres 3, 4 et 5 de ce Mémoire mettent clairement en évidence la présence d'activités lipide-kinasiques dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. Selon les résultats obtenus dans ces chapitres, nous pouvons distinguer au minimum trois types d'activités lipide-kinasiques. Parmi celles-ci, deux sont déjà bien caractérisées dans les membranes plasmiques (DG-kinase et PI-kinase) ou dans des fractions solubles (PI-kinase) des cellules végétales (voir chapitre 1). La troisième activité lipide-kinasique, que nous avons mise en évidence dans les membranes d'enveloppes (chapitre 5), n'a, à notre connaissance, jamais été observée dans d'autres types de membranes ou d'autres compartiments cellulaires. Cette activité lipide-kinasique catalyse la phosphorylation du MGDG en MGPDG (MGDG phosphorylé sur le groupement galactose) et utilise préférentiellement du CTP comme substrat nucléotidique. L'activité de cet enzyme, de part son substrat nucléotidique, est dépendante ou peut-être même régulée de/par la NDPKII soluble du chloroplaste (voir chapitre 5).

Le chloroplaste est le siège de nombreuses activités biosynthétiques. L'enveloppe de celui-ci est notamment impliquée dans la biosynthèse des acides gras et des lipides dits chloroplastiques (voir chapitre 1). Les études des activités enzymatiques liées à l'enveloppe du chloroplaste, au cours desquelles nous avons utilisé des membranes purifiées selon les méthodes classiques décrites dans le chapitre 2, ne reflètent pas toujours ce qui se passe *in vivo*. En effet, une préparation de membranes d'enveloppes est une entité que l'on sépare d'un tout (le chloroplaste) et dont les activités enzymatiques ont souvent besoin dudit tout afin d'être régulées. Un bon exemple illustrant les propos tenus ci-dessus est celui de la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT, localisée dans la membrane externe de l'enveloppe) dont l'activité n'est plus régulée lorsque l'on prépare des membranes

d'enveloppes. Ainsi, les quantités de diacylglycérol, de monogalactosyl-diacylglycérol et de digalactosyl-diacylglycérol mesurées dans une préparation de membrane d'enveloppes de chloroplaste d'Épinard (*in vitro*) ne correspondent pas aux quantités réelles (*in vivo*) de ces trois glycérolipides contenues dans les membranes d'enveloppes (Dorne et al., 1982; Douce et al., 1984). Ces auteurs ont proposé un traitement à la thermolysine des préparations de chloroplastes qui permet de digérer la GGGT (la thermolysine a pour effet d'hydrolyser les protéines situées à la surface de l'enveloppe du chloroplaste sans endommager cette dernière) et ainsi de supprimer l'activité non-régulée de celle-ci lors de la purification des membranes d'enveloppes.

En conclusion des faits exposés ci-dessus, nous retenons qu'il est indispensable de s'assurer que les activités enzymatiques mesurées *in vitro* dans des préparations de membranes d'enveloppes de chloroplaste reflètent bien ce qui se passe *in organello*.

6.2 But du chapitre

Les études menées dans ce chapitre serviront essentiellement à déterminer:

- i) Si les activités lipide-kinasiques mesurées *in vitro* qui sont décrites dans les chapitres précédents peuvent être décelées *in organello*.
- ii) Si l'ATP généré par photophosphorylation au niveau des membranes thylacoïdales peut servir de substrat aux activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe.
- iii) Si les activités lipide-kinasiques mesurées *in organello* peuvent être modulées via des hormones ou des activateurs de transmission de signaux.

6.3 Résultats

Nous avons tout d'abord voulu déterminer si la membrane thylacoïdale possède également une ou des activités lipide-kinasiques. En effet, s'il s'avère que la membrane de l'enveloppe du chloroplaste est la seule structure de cette organelle qui exhibe des activités lipide-kinasiques, nous n'aurons pas à isoler par la suite les membranes de l'enveloppe après la phosphorylation *in organello* dans le but d'extraire uniquement les lipides phosphorylés de cette membrane. La figure 6.1 montre l'autoradiographie de la séparation par CCM des lipides

phosphorylés de membranes d'enveloppes, de membranes thylacoïdales non-purifiées et de membranes thylacoïdales purifiées.

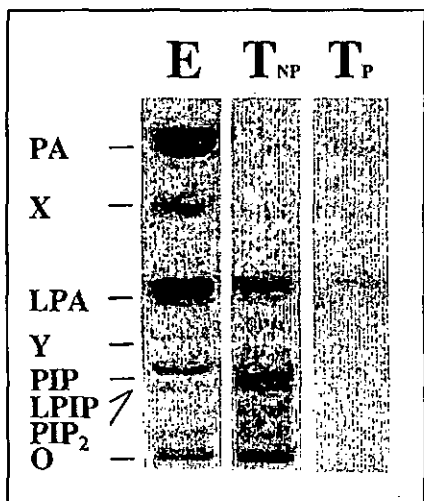


Fig. 6.1. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides phosphorylés de membranes thylacoïdales et d'enveloppes (0.1 mg) incubés en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 0.01 mM (10 μCi), Mops 50 mM pH 7.6 et MgCl_2 5 mM durant 5 minutes à 23 °C. E: lipides phosphorylés de membranes d'enveloppes. T_{NP} : lipides phosphorylés de membranes thylacoïdales non-purifiées. T_P : lipides phosphorylés de membranes thylacoïdales purifiées. Pour les détails concernant la préparation des différentes fractions membranaires utilisées, se référer au chapitre 2.

Sur cette figure, nous observons que les membranes thylacoïdales purifiées contiennent pas ou peu d'activités lipide-kinasiques par rapport aux membranes de l'enveloppe. Les membranes thylacoïdales non purifiées et qui proviennent de chloroplastes également non-purifiés (voir chapitre 2) contiennent une activité PI-kinasique relativement élevée. Celle-ci est probablement due à la présence de contaminations de membranes extraplastidiales. Ces résultats montrent donc qu'il n'est pas nécessaire d'isoler la membrane de l'enveloppe des autres membranes du chloroplaste dans le but de déterminer les activités lipide-kinasiques de cette dernière *in organello*. Nous pouvons dès lors, dans le but de mesurer les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe *in organello*, phosphoryler des chloroplastes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ puis en extraire les lipides totaux et analyser ceux-ci par CCM.

Afin de vérifier si les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe s'observent également *in organello*, nous avons incubé des chloroplastes en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durant 4 ou 12 minutes à une température d'incubation de 4°C ou 23°C. La figure 6.2 montre l'autoradiographie de la séparation des lipides totaux de chloroplaste par CCM après phosphorylation *in organello* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et 0.05 mM ATP non-radioactif.

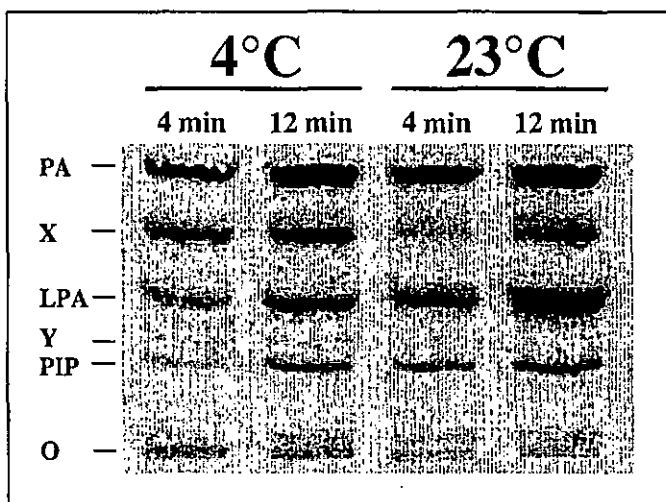


Fig. 6.2. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de chloroplastes d'Épinard (0.4 mg chlorophylle) phosphorylés suite à une incubation *in organello* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 0.05 mM (10 μCi), MgCl_2 10 mM, CaCl_2 2 mM, sorbitol 330 mM, Mops 30 mM pH 7.6, EDTA-Na_2 2mM et isoascorbate 2 mM durant 4 ou 12 minutes à 4°C ou 23°C à l'obscurité. Activité spécifique de l'ATP 2 Ci/mmol.

D'une manière générale, cette figure nous montre que la phosphorylation des lipides de l'enveloppe se déroule également *in organello*. Nous constatons aussi que les activités lipide-kinasiques sont sensibles à la température d'incubation. Ainsi, une température d'incubation de 23°C est plus optimale qu'une température d'incubation de 4°C pour les activités lipide-kinasiques catalysant l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA, LPA, Y et PIP. Seule l'activité lipide-kinasique catalysant l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X semble être moins sensible à la température du milieu d'incubation. Un temps d'incubation de 4 minutes est, contrairement à l'incubation *in vitro* (voir chapitre 4), largement insuffisant pour obtenir le maximum d'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés. En effet, sur la figure 6.2, nous voyons une très grande différence d'intensité d'incorporation de ^{32}P , surtout pour une température d'incubation de 23°C, entre les échantillons incubés durant 4 minutes et ceux incubés durant 12 minutes.

Il était important de déterminer si l'intégrité structurale des chloroplastes pouvait influencer l'intensité de l'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans les lipides phosphorylés. Dans ce but, nous avons comparé la phosphorylation des lipides de chloroplastes intacts et brisés incubés en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. La figure 6.3 illustre le résultat obtenu.

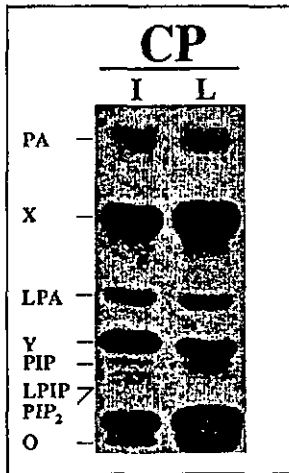


Fig. 6.3. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de chloroplastes d'Épinard (0.1 mg chlorophylle) phosphorylés suite à une incubation *in organello* en présence de I) [γ - ^{32}P]ATP (10 μCi), MgCl_2 20 mM, sorbitol 330 mM et Mops 50 mM pH 7.6 ou L) [γ - ^{32}P]ATP (10 μCi), MgCl_2 20 mM et Mops 50 mM pH 7.6 durant 5 minutes à 4°C. I: chloroplastes intacts. L: chloroplastes lysés. CP: chloroplastes. Activité spécifique de l'ATP 3000 Ci/mmole.

D'une façon générale, nous remarquons que l'intensité de l'incorporation de ^{32}P dans tous les lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe varie en fonction de l'intégrité structurale du chloroplaste. En effet, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X, LPA et PIP de chloroplastes brisés est respectivement 2.3, 2.1 et 2.3 fois plus élevée (comptage Cerenkov) par rapport à l'incorporation de ^{32}P dans les mêmes lipides de chloroplastes intacts. Par contre, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA et Y de chloroplastes brisés est respectivement 0.9 et 0.8 fois plus basse par rapport à l'incorporation de ^{32}P dans les mêmes lipides de chloroplastes intacts. En ce qui concerne l'incorporation de ^{32}P dans le lipide LPIP, elle est faible voire nulle dans les chloroplastes brisés.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 5, un léger doute subsiste concernant la localisation des activités PI-kinasiques et MGDG-kinasiques au sein de la membrane de l'enveloppe. En effet, l'activité PI-kinasique, suivant la présence ou non d'ATP froid dans le milieu d'incubation, est localisée, soit dans la membrane externe, soit dans la membrane interne de l'enveloppe. Quant à l'activité MGDG-kinasique, elle semble être uniformément répartie dans ces deux types de membranes de l'enveloppe. Nous avons également mentionné dans le paragraphe 6.1 que l'activité GGGT, responsable de la synthèse de DGDG et DAG à partir de deux molécules de MGDG, n'était plus régulée dans des

préparations de membranes d'enveloppes. Ainsi, nous avons traité des chloroplastes avec de la thermolysine dans le but de déterminer si un tel traitement:

- i) Inhibe l'activité PI-kinasique et, dans ce cas, démontrerait que la PI-kinase de la membrane de l'enveloppe se trouve dans la membrane externe, face au cytosol.
- ii) Qui inhibe l'activité de la GGGT peut, stimuler l'activité MGDG-Kinasique, étant donné que des enveloppes provenant de chloroplastes traités à la thermolysine contiennent plus de MGDG.
- iii) Inhibe ou active l'activité DG-Kinasique.

La figure 6.4 illustre l'effet d'un traitement des chloroplastes par la thermolysine sur l'incorporation *in organello* (A) ou *in vitro* (B) de ^{32}P dans les lipides de la membrane de l'enveloppe.

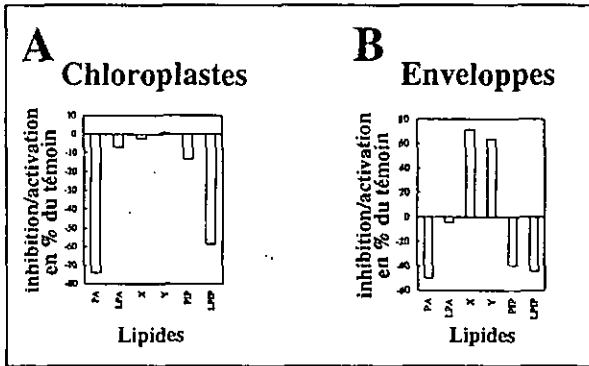


Fig. 6.4. Histogramme représentant les % d'activation/inhibition de l'incorporation de ^{32}P à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans les lipides phosphorylés extraits de chloroplastes traités à la thermolysine puis phosphorylés *in organello* ou de membranes d'enveloppes (issues des chloroplastes traités à la thermolysine) phosphorylés *in vitro*, par rapport à respectivement, l'incorporation de ^{32}P dans les lipides phosphorylés extraits de chloroplastes non-traités à la thermolysine phosphorylés *in organello* ou de membranes d'enveloppes (issues des chloroplastes non-traités à la thermolysine) phosphorylés *in vitro*. Il nous paraît important de rendre le lecteur attentif au fait que l'expression "non-traité à la thermolysine" signifie que le traitement comprend de la thermolysine mais que l'activité protéasique de celle-ci est inhibée par la présence d'EGTA- Na_2 1 mM et d'inhibiteurs de protéases (PMSF 0.5 mM, BZA 1 mM, AHA 2 mM).

Nous remarquons que les activités lipide-kinasiques *in organello*, responsables de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA, LPA, PIP et LPPI, sont inhibées lorsque les

chloroplastes sont traités avec de la thermolysine. La plus forte inhibition de l'incorporation de ^{32}P concerne les lipides PA (74% d'inhibition) et LPIP (58% d'inhibition). L'incorporation de ^{32}P *in organello* dans les lipides X et Y ne semble pas être influencée par un traitement des chloroplastes avec de la thermolysine. Les activités lipide-kinasiques mesurées *in vitro* dans des membranes d'enveloppes issues de chloroplastes traités à la thermolysine, comparées à des activités lipide-kinasiques mesurées *in vitro* dans des membranes d'enveloppes non-traitées, montrent deux types de réponses vis-à-vis d'un tel traitement. La première réponse est une inhibition de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA (49% d'inhibition), PIP (39% d'inhibition) et LPIP (44% d'inhibition); la deuxième est une activation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X (71% d'activation) et Y (63% d'activation). De plus, les quantités de MGDG que nous avons mesurées dans ces deux types de préparations de membranes d'enveloppes sont très différentes. En effet, les membranes d'enveloppes issues de chloroplastes traités à la thermolysine contiennent 3 à 4 fois plus de MGDG par rapport aux membranes d'enveloppes issues de chloroplastes non-traités à la thermolysine. Ce résultat suggère que la GGGT, hydrolysée après un tel traitement, empêche la métabolisation non-régulée par celle-ci de deux molécules, à savoir la transformation de deux MGDG en DGDG et DAG durant l'isolement des membranes d'enveloppes (voir paragraphe 6.1).

La figure 6.5 illustre l'effet d'un inhibiteur de PI-3-kinase sur la phosphorylation *in organello* des lipides de la membrane de l'enveloppe.

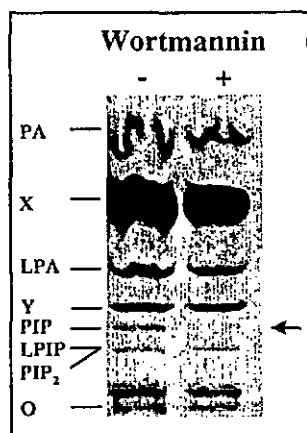


Fig. 6.5. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de chloroplastes d'Epineard (0.12 mg chlorophylle) phosphorylés suite à une incubation *in organello* en présence de [γ - ^{32}P]ATP (10 μCi), MgCl_2 10 mM, sorbitol 330 mM, Mops 50 mM pH 7.6 et \pm 10 μM wortmannin à 4°C pendant 5 minutes. -: chloroplastes incubés en absence de wortmannin. +: chloroplastes incubés en présence de 10 μM wortmannin. La flèche (\rightarrow) indique la position du lipide PIP dont l'incorporation de ^{32}P est fortement inhibée par la wortmannin. Activité spécifique de l'ATP 2 Ci/mmoles.

Sur cette figure nous

observons que l'activité PI-kinasique (*in organello*) de la membrane de l'enveloppe est très

fortement inhibée (93% d'inhibition, comptage Cerenkov) par la wortmannin. Les autres activités lipide-kinasiques (*in organello*) sont beaucoup moins inhibées par la présence de 10 μM wortmannin (de 15 à 40% d'inhibition, comptage Cerenkov).

Nous avons déterminé dans quelle mesure l'ATP généré par photophosphorylation pouvait être le substrat des différentes activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe. A cette fin, nous avons incubé des chloroplastes intacts à la lumière pendant 5 minutes en présence de $^{32}\text{P}_i$ et de NaHCO_3 . La figure 6.6 illustre l'autoradiographie de la séparation par CCM des lipides marqués radioactivement au ^{32}P de chloroplastes phosphorylés *in organello* par du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ généré par photophosphorylation en présence de $^{32}\text{P}_i$, de NaHCO_3 et de lumière ou du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ donné artificiellement.

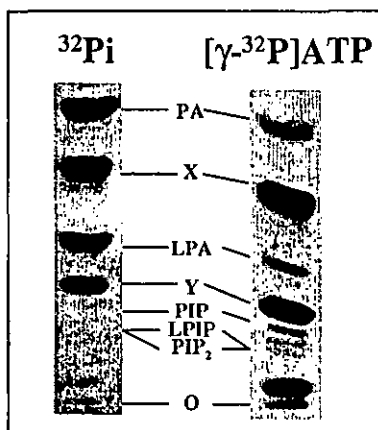


Fig. 6.6. Autoradiographie de la séparation par CCM des lipides de chloroplastes d'Epinard (0.12 mg chlorophylle) phosphorylés suite à une incubation *in organello* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10 μCi), MgCl_2 10 mM, sorbitol 330 mM, Mops 50 mM pH 7.6 à l'obscurité à 4°C ou de $^{32}\text{P}_i$ (50 μCi), MgCl_2 10 mM, sorbitol 330 mM, Mops 50 mM pH 7.6 et NaHCO_3 1 mM à la lumière 30'000 lux (1 lx (lux) = 1 candéla x stéradian \times m⁻², dans l'unité SI) à 20°C. Pour comparaison, nous indiquons que la lumière du soleil est égale à 100'000 lux et que l'obscurité atteinte lors de nos expériences était de < 2 lx. Le temps d'incubation est de 5 minutes.

Sur cette figure les lipides PIP et LPIP apparaissent moins fortement ou pas du tout marqués lorsqu'on phosphoryle des chloroplastes en présence de $^{32}\text{P}_i$. Nous ne pouvons comparer les deux types d'incubations étant donné qu'elles diffèrent fortement; cependant, nous pouvons comparer les rapports de l'incorporation de ^{32}P dans un lipide/l'incorporation totale de ^{32}P dans les lipides marqués dans les mêmes conditions avec les mêmes rapports mesurés dans l'autre condition d'incubation. Ainsi, dans la condition d'incubation avec le $^{32}\text{P}_i$, le PA représente les 30%, le LPA les 23%, le lipide X les 29%, le lipide Y les 17% et le PIP les ~1% de l'incorporation totale de ^{32}P dans les lipides phosphorylés; par contre, dans la condition d'incubation en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, le PA représente les 5%, le LPA les 13%, le lipide X les 47%, le lipide Y les 30%, le PIP les 3% et le LPIP les 2% de l'incorporation totale de ^{32}P .

dans les lipides phosphorylés. D'une manière générale nous pouvons dire que l'incorporation de ^{32}P *in organello* dans les lipides PIP et LPIP en présence de ^{32}P est faible voire nulle.

Comme il est possible que les lipides de l'enveloppe soient phosphorylés *in organello* à partir du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ produit par photophosphorylation, nous avons déterminé quelle était la cinétique de l'incorporation de ^{32}P dans les différents lipides phosphorylés. La figure 6.7 illustre, par une autoradiographie des lipides phosphorylés séparés par CCM ainsi que par un graphique, l'incorporation de ^{32}P en fonction du temps d'incubation dans les différents lipides phosphorylés.

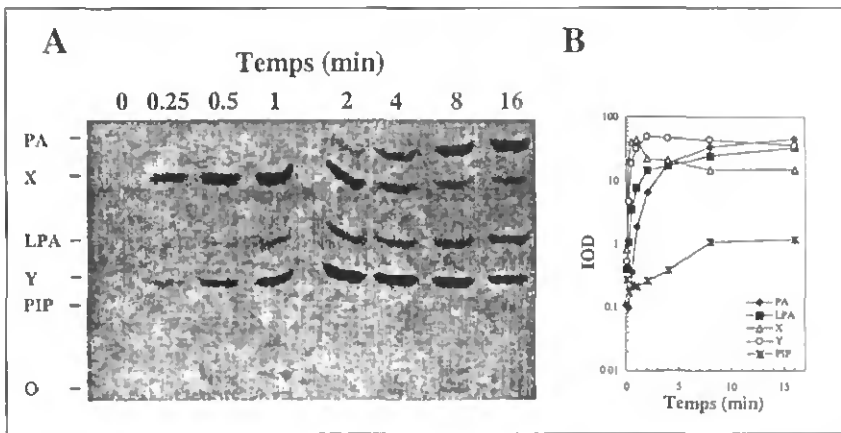


Fig. 6.7. Phosphorylation *in organello* en fonction du temps des lipides de chloroplastes d'Epinard (0.12 mg de chlorophylle) incubés en présence de ^{32}P ($50 \mu\text{Ci}$), MgCl_2 10 mM, sorbitol 330 mM, Mops 50 mM pH 7.6 et NaHCO_3 1 mM à la lumière 30'000 lux à 20°C. A: autoradiographie de la séparation par CCM des lipides phosphorylés de chloroplastes. B) graphique représentant l'incorporation de ^{32}P dans chaque lipide (IOD) en fonction du temps d'incubation.

Nous remarquons que les premiers lipides phosphorylés sont les lipides X et Y. Ces deux lipides sont déjà marqués dans les premières secondes d'incubation. Ces deux lipides incorporent le ^{32}P de façon majeure pendant les quatre à cinq premières minutes, puis le marquage du lipide X diminue progressivement alors que le marquage du lipide Y se stabilise après 2 minutes d'incubation. Les autres lipides (PA, LPA et PIP) suivent une tout autre cinétique d'incorporation du ^{32}P . Ces trois lipides incorporent progressivement, et de manière moins rapide que les lipides X et Y, le ^{32}P en fonction du temps pour atteindre un plateau d'incorporation après 8 minutes environ.

Nous avons également testé l'effet du mastoparan (un activateur de protéines G) sur l'incorporation *in organello* de ^{32}P dans les lipides phosphorylés de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. La figure 6.8 illustre par un histogramme l'effet du mastoparan sur les activités lipide-kinasiques de l'enveloppe.

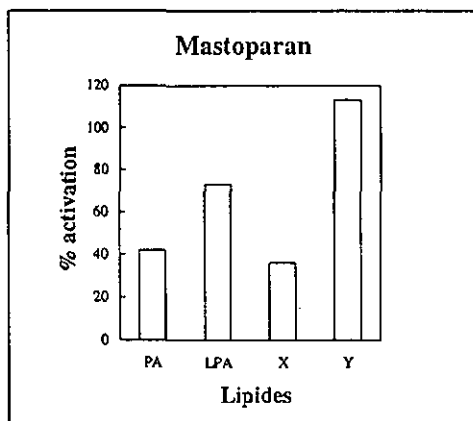


Fig. 6.8. Effet du mastoparan sur l'incorporation *in organello* de ^{32}P dans les quatre lipides phosphorylés majeurs du chloroplaste. Le milieu d'incubation contient des chloroplastes d'Epinaud (0.12 mg de chlorophylle), du $^{32}\text{P}_i$ (50 μCi), MgCl_2 10 mM, sorbitol 330 mM, Mops 50 mM pH 7.6 et NaHCO_3 1 mM et se déroule à la lumière 30'000 lux à 20°C durant 5 minutes. Le graphique représente le % d'activation de l'incorporation de ^{32}P par rapport à un témoin sans mastoparan dans le milieu d'incubation. Mastoparan: mastoparan 10 μM . Ces expériences ont été réalisées que deux fois.

Nous constatons que ce composé a un effet très positif sur la phosphorylation *in organello* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinaud. L'effet stimulateur du mastoparan, mesuré *in vitro*, sur les activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe (voir chapitre 5) est donc également observé lorsqu'on phosphoryle des chloroplastes *in organello* en présence de $^{32}\text{P}_i$. Nous n'avons pas mentionné l'effet de ce composé sur l'incorporation de ^{32}P dans le PIP, car l'activité PI-kinasique (*in organello* en présence de $^{32}\text{P}_i$) est trop faible pour être comparée dans ces deux conditions (\pm mastoparan) d'incubation.

6.4. Discussion

D'une manière générale ce chapitre nous permet d'affirmer que les activités lipide-kinasiques observées jusqu'ici *in vitro* dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste s'expriment également *in organello*. Les résultats obtenus dans ce chapitre permettent de tirer les conclusions suivantes:

1) Les activités lipide-kinasiques mesurées *in organello* dans les chloroplastes sont localisées uniquement dans la membrane de l'enveloppe. En effet, selon la figure 6.1, les membranes thylacoïdales ne contiennent pas d'activité lipide-kinasique, et les éventuelles traces d'activités décelées sont certainement dues à des contaminations des membranes thylacoïdales par des membranes d'enveloppes. En effet, Rawlyer et al. (1995) ont démontré que malgré la purification des membranes thylacoïdales, celles-ci contiennent toujours ~1% de contaminations par des membranes d'enveloppes.

2) Les activités lipide-kinasiques, mesurées *in organello* en présence de [γ - 32 P]ATP, sont sensibles à la température d'incubation (figure 6.2). Ces activités nécessitent un temps d'incubation plus long (12 minutes), en comparaison des activités mesurées *in vitro* (chapitre 4), pour atteindre un maximum d'incorporation de 32 P dans les lipides phosphorylés.

3) L'intensité des activités lipide-kinasiques mesurées *in organello* en présence de [γ - 32 P]ATP dépend, dans une certaine mesure, de l'intégrité structurale du chloroplaste (figure 6.3).

4) Les résultats obtenus par le traitement des chloroplastes par la thermolysine (voir figure 6.4) suggèrent que l'activité PI-kinasique de la membrane de l'enveloppe se situe sur la face cytosolique de la membrane externe. En effet, la thermolysine hydrolyse les peptides qui se trouvent à la surface du chloroplaste; l'inhibition de l'activité PI-kinasique suite à un traitement des chloroplastes par la thermolysine suggère donc que celle-ci est hydrolysée par cette protéase.

L'inhibition de l'activité DG-kinasique, mesurée *in organello*, suite au même traitement est difficilement explicable. Cette activité lipide-kinasique se situe dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (chapitre 3 et 5) et ne devrait logiquement pas être hydrolysée par la thermolysine. Si tel est le cas, alors, l'inhibition de l'incorporation de 32 P dans le PA signale peut-être la présence d'un cofacteur protéique de la DG-kinase situé dans la membrane externe de l'enveloppe. On peut également imaginer que le traitement par la thermolysine affecte d'une

manière ou d'une autre (digestion du transporteur ADP/ATP) le transport de l'ATP vers la DG-kinase située dans la membrane interne de l'enveloppe. Nous pouvons également supposer que la thermolysine hydrolyse les enzymes impliqués dans la biosynthèse du diacylglycérol dans la membrane externe. Ainsi, durant l'heure d'incubation en présence de thermolysine, plus aucune molécule de diacylglycérol ne serait produite. Nous pouvons alors imaginer que le pool endogène de diacylglycérol diminuerait rapidement et que cette diminution de substrat serait à l'origine de l'inhibition de l'activité DG-kinasique observée.

La stimulation de l'activité lipide-kinasique responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y, mesurée *in vitro* dans des membranes d'enveloppes issues de chloroplastes traités à la thermolysine, confirme l'identité de cette lipide kinase comme étant une MGDG-kinase. En effet, nous avons mentionné que les membranes d'enveloppes issues des chloroplastes traités à la thermolysine contiennent 3 à 4 fois plus de MGDG. Ainsi un tel traitement augmente le pool de substrat endogène pour la MGDG-kinase et conduit, par conséquent, à une augmentation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y.

Les enveloppes issues de chloroplastes traités à la thermolysine contiennent également moins de diacylglycérol par rapport aux membranes d'enveloppes isolées de chloroplastes non-traités à la thermolysine. En effet, l'hydrolyse de la GGGT a pour conséquence de diminuer la quantité de DGDG et de DAG produits par cet enzyme. Comme nous le voyons sur la figure 6.4, l'incorporation de ^{32}P dans le PA est inhibée *in vitro* par un traitement à la thermolysine. Cette inhibition serait donc la conséquence indirecte du traitement des chloroplastes avec de la thermolysine qui provoque une diminution de la quantité de DAG dans la membrane de l'enveloppe.

La diminution de l'activité PI-kinasique dans des membranes d'enveloppes issues de chloroplastes traités à la thermolysine, par rapport à des enveloppes isolées à partir de chloroplastes non-traités, indique clairement que cette activité se trouve dans la membrane externe (coté cytosolique) de l'enveloppe.

5) L'inhibition de l'activité PI-kinasique, en présence d'un inhibiteur de PI-3-kinase (figure 6.5), suggère la présence soit d'une activité PI-3-kinasique, ou alors d'une activité PI-4-kinasique sensible à la wortmannin (Meyers et al., 1997), dans les membranes d'enveloppes. Cette observation correspond aux résultats obtenus au sujet de la présence d'une activité PI-3-kinasique dans les membranes d'enveloppes (voir chapitres 3 et 4).

6) La plupart des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe (DG-kinase et MGDG-kinase) utilisent l'ATP généré par la photophosphorylation dans le chloroplaste (figure 6.6). Seule la PI-kinase de la membrane de l'enveloppe a de la peine à utiliser l'ATP produit dans le chloroplaste comme substrat nucléotidique. Inversement, l'ATP fourni par voie exogène, s'il est un bon substrat pour la PI-kinase, l'est nettement moins pour la DG-kinase. Ces résultats suggèrent que les activités de ces enzymes, mesurées *in organello*, dépendent fortement du transport de l'ATP via le transporteur ATP/ADP de la membrane de l'enveloppe et de la localisation de celles-ci dans l'enveloppe. On peut en effet imaginer que dans le cas de la phosphorylation *in organello*, le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ produit par photophosphorylation reste principalement à l'intérieur du chloroplaste car le milieu extérieur (milieu d'incubation) ne contient pas d'ADP qui permettrait, via le transporteur ATP/ADP, une sortie de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Ainsi, le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ produit par photophosphorylation ne pourra pas (ou que très peu) entrer en contact avec la PI-kinase. Inversement, le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fourni dans le milieu d'incubation n'entrera que très peu dans le chloroplaste via le transporteur ATP/ADP. En fait, l'entrée de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dépendra principalement de la quantité d'ADP contenue dans le chloroplaste. Ainsi, ce seront principalement les kinases situées dans la membrane externe ou l'espace intermembranaire qui pourront utiliser le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ contenu dans le milieu d'incubation. En définitive, nous pouvons situer une kinase dans l'enveloppe (membrane interne, membrane externe, espace intermembranaire) suivant l'activité de celle-ci en fonction de la localisation de la source de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fournie. Ainsi, selon les résultats obtenus dans la figure 6.6, nous confirmons que:

i) La DG-kinase se situe dans la membrane interne (face interne, car elle est peu active en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ exogène).

ii) La PI-kinase se situe dans la membrane externe (côté cytosolique, voir point 4).

iii) La MGDG-kinase se situe entre ces deux membranes, soit dans l'espace intermembranaire, soit au niveau des sites de contact ou alors dans les deux membranes.

Ces résultats nous permettent de penser qu'*in vivo* l'activité des lipides kinases de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste dépend fortement de l'état énergétique (ATP/ADP x Pi) du chloroplaste.

7) Les lipides X et Y incorporent rapidement (dans les premières secondes) du ^{32}P *in organello* à partir de [γ - ^{32}P]ATP produit de manière endogène par photophosphorylation, puis subissent une déphosphorylation après deux minutes d'incubation (figure 6.7). Ce mécanisme rapide de phosphorylation puis déphosphorylation suggère que ces lipides sont impliqués dans des mécanismes de transmission de signaux liés à la photophosphorylation. On peut en effet imaginer que le chloroplaste utilise ces deux lipides comme messagers reflétant son état d'énergétisation. Ainsi, le reste de la cellule serait informée sur l'activité métabolique du chloroplaste via un signal véhiculé par ces deux lipides.

La lipide kinase responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides X et Y semble être la même. En effet, ces deux lipides ont une cinétique d'incorporation de ^{32}P très semblable durant les deux premières minutes d'incubation. Par contre, la déphosphorylation de ces deux lipides est différente; elle est plus rapide pour le lipide X que pour le lipide Y. La disparition du lipide X peut être expliquée de deux façons:

i) Le lipide X est déphosphorylé par une phosphatase spécifique. Dans ce cas, il faut que la lipide kinase, responsable de l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X, diminue d'activité après deux minutes; ou que la lipide X phosphatase soit stimulée de telle sorte qu'après deux minutes d'incubation, elle possède un "turnover" plus grand que la lipide kinase.

ii) Le lipide X est métabolisé (catabolisé) en lipide Y. Cette hypothèse sous-entend que la lipide kinase, responsable de l'incorporation de ^{32}P dans le lipide X, diminue d'activité après deux minutes d'incubation, et que le lipide X est métabolisé, via une lipase A_2 ou une lipide X-kinase, en lipide Y (voir chapitre 5).

Les lipides PA et LPA incorporent le ^{32}P de manière beaucoup plus lente que les lipides X et Y et nécessitent un temps d'incubation de plus de 16 minutes pour atteindre le maximum d'incorporation de ^{32}P (fig. 6.7). La lipide kinase, responsable de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides PA et LPA, est probablement la même, malgré le fait que ces deux lipides n'ont pas exactement la même cinétique d'incorporation du ^{32}P (le LPA apparaît plus rapidement que le

PA). Selon le chapitre 4, l'incorporation de ^{32}P dans ces deux lipides varie de la même façon en fonction de divers facteurs chimiques et physiques. Néanmoins, nous ne pouvons pas déterminer de manière sûre si le LPA est plutôt issu du PA via une phospholipase A_2 , ou du lysoDAG via la DG-kinase ou une lysoDAG-kinase. Les résultats obtenus dans le chapitre 4, ainsi que ceux obtenus en incubant des membranes d'enveloppes (chapitre 5) et des chloroplastes (figure 6.8) avec du mastoparan (un activateur des protéines G et des lipases), où l'on voit que l'incorporation de ^{32}P dans le LPA est plus fortement stimulée par un tel traitement que l'incorporation de ^{32}P dans le PA, suggèrent plutôt que le LPA est issu du PA via une phospholipase A_2 .

8) Le mastoparan peut également moduler la phosphorylation *in organello* des lipides de la membrane de l'enveloppe. Cet effet stimulateur du mastoparan est intéressant si l'on stipule que les activités lipide-kinasiques sont impliquées dans des processus de transmission de signaux (voir chapitre 5). De plus, l'activation de l'incorporation de ^{32}P dans les lipides LPA et Y est plus importante que dans les lipides PA et X. Cette différence de stimulation indique que les lipides LPA et Y sont probablement les produits d'une phospholipase A_2 (PLA $_2$) ou lipase A_2 . En effet, le mastoparan est un activateur des protéines G et également des lipases (Argiolas et al., 1983).

Au terme de ce chapitre nous pouvons confirmer que les activités lipide-kinasiques, mesurées *in vitro* dans les membranes de l'enveloppe du chloroplaste (chapitre 3, 4 et 5), sont également détectables *in organello* suite à une incubation de chloroplastes en présence de ^{32}P et de lumière. Ces activités utilisent pour la plupart (DG-kinase et MGDG-kinase) l'ATP produit par photophosphorylation tandis que d'autres (PI-kinase, LPI-kinase), se situant sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe, utilisent préférentiellement l'ATP exogène. Ce phénomène est certainement lié au transport d'ATP via le translocateur d'ATP/ADP de la membrane de l'enveloppe. En effet, la sortie de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, formé par photophosphorylation dans le chloroplaste, est probablement faible, voire nulle, étant donné que le milieu d'incubation ne contient pas d'ADP. Les activités lipide-kinasiques semblent être régulées par des mécanismes impliquant l'action de protéines de type G. Cette dernière observation suggère fortement que des activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste sont impliquées dans des processus de transmission de signaux.

CHAPITRE 7

Discussion générale et projets futurs

7.1. Quelques réflexions générales sur l'ensemble des résultats consignés dans ce Mémoire

A notre connaissance, il s'agit de la première étude détaillée consacrée à la phosphorylation *in vitro* et *in organello* des lipides de l'enveloppe du chloroplaste d'Epinard. Les résultats obtenus dans ce travail répondent aux buts que nous nous étions fixés (voir chapitre 1). Ainsi, nous pouvons affirmer que:

- A) Les membranes d'enveloppes du chloroplaste recèlent au moins trois activités lipide-kinasiques (DG-kinase, PI-kinase et MGDG-kinase).
- B) Les activités lipide-kinasiques ne sont pas réparties de manière uniforme dans les deux membranes de l'enveloppe.
- C) Chacune de ces activités dépend de divers paramètres physiques et chimiques.
- D) Ces activités sont probablement impliquées dans des mécanismes de transmission de signaux.

Les lysodérivés LPA, LPIP des lipides phosphorylés PA, PIP suggèrent fortement qu'une phospholipase A_2 ou une lipase A_2 est présente dans les membranes d'enveloppe.

Dans ce travail, nous avons également mis en évidence un nouveau type d'activité lipide-kinasique. Les résultats obtenus dans le chapitre 5 nous indiquent qu'il s'agit très probablement d'une activité MGDG-kinasique qui produit du MGPDG. Si nous sommes aussi prudents dans notre manière d'affirmer qu'il s'agit d'une MGDG-kinase, c'est que jusqu'à présent aucun travail n'a fait état ni d'une telle activité kinasique, ni de la présence d'un tel lipide phosphorylé. Une preuve définitive concernant l'identité du lipide X ne pourra être apportée qu'une fois ce lipide analysé par spectroscopie de masse comme Wissing et al. (1993) l'ont fait pour le lipide PPA. A notre avis, cette activité lipide-kinasique, spécifique aux membranes d'enveloppe du chloroplaste, mérite une attention particulière. En effet il s'agit de la

première fois que l'on fait état d'une activité lipide-kinasique, voire même d'une activité kinasique, dont le substrat préférentiel est le CTP. De surcroît, cette activité peut être indirectement (voire même directement) modulée par la NDPKII. Cet enzyme semble être également activé par des protéines G. Ces derniers faits suggèrent fortement que cette MGDG-kinase est impliquée dans des processus de transmission de signaux. Il reste maintenant à élucider, comme c'est également le cas pour les autres activités lipide-kinasiques de la membrane de l'enveloppe, le rôle exact joué par cette activité lipide-kinasique dans l'enveloppe du chloroplaste.

7.2. Projets futurs

Comme mentionné ci-dessus, les résultats que nous avons obtenus prendront toute leur signification lorsque le rôle physiologique de ces activités lipide-kinasiques au sein du chloroplaste sera mieux compris. Dans cet ordre d'idée, nous pourrions proposer les projets de recherches suivants:

A) Isoler et cloner les lipides kinases qui phosphorylent le DG, le PI. Mentionnons que des essais préliminaires d'immunodétection de lipides kinases à l'aide d'anticorps anti-DG-kinase de *E.coli*, anti-PI-4-kinase humaine sensible à la wortmannin et à l'anti-PI-3-kinase (vps 34 de *C. elegans*) nous ont permis d'identifier plusieurs protéines lipides kinases potentielles dans les membranes de l'enveloppe. Ainsi l'anticorps anti-DG-kinase reconnaît une protéine de 19 kDa et une protéine de 14 kDa situées principalement dans la membrane interne de l'enveloppe. Quant aux anticorps anti-PI-kinase, ils reconnaissent une protéine de 110 kDa et également une autre de 75 kDa.

A notre avis, tenter de purifier ces activités lipide-kinasiques à partir de membranes d'enveloppes n'est pas la bonne voie expérimentale pour identifier ces enzymes. Il nous semble plus judicieux d'opter pour une approche utilisant les outils de la biologie moléculaire afin d'isoler les gènes codant pour la DG- et PI-kinase de l'enveloppe du chloroplaste et ainsi déterminer quelles protéines de l'enveloppe du chloroplaste sont responsables des activités lipide-kinasiques.

B) Purifier la MGDG-kinase, la séquencer et obtenir le gène codant à l'aide d'une sonde nucléotidique synthétisée à partir d'une séquence interne à la protéine.

C) Une fois isolés, étudier les caractéristiques biochimiques de ces enzymes (lipides kinases).

D) Produire des anticorps contre ces enzymes et déterminer par immunofluorescence et immunocytochimie la localisation exacte de ces protéines dans les membranes du chloroplaste.

E) Etudier la phosphorylation de ces lipides *in vivo* en incubant des feuilles entières d'Epinard en présence de $^{32}\text{P}_i$ et de lumière. Varier les paramètres du milieu d'incubation (lumière, hormones, phosphate, osmolarité, CO_2 etc...) et observer les variations du degré de phosphorylation des lipides au niveau de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste.

F) Etudier la variation des activités lipide-kinasiques *in organello* de l'enveloppe du chloroplaste en fonction de l'import protéique, du transport de phosphate, du transport de divers métabolites, d'un stress osmotique, de la présence d'hormones végétales, etc.

G) Incuber des chloroplastes en présence de wortmannin et étudier l'effet de cet inhibiteur des activités PI-3-kinases sur les fonctions physiologiques du chloroplaste (importation et exportation de métabolites, import de protéines, biosynthèse, photosynthèse, etc...).

A l'heure actuelle, seul un de ces projets est en cours de recherche au Laboratoire de Physiologie Végétale. Il s'agit d'une expérience qui tente d'établir un lien entre l'import protéique et la phosphorylation du lipide X ($\text{MG}^{\text{P}}\text{DG}$).

A mon grand regret et par la force des choses, il apparaît que les projets mentionnés ci-dessus, qui seraient la suite logique du travail de thèse qui m'a maintenu en haleine durant pas moins de quatre années, ne sont pas réalisables. En effet, la fin de mon travail de thèse coïncide avec un changement radical d'orientation de recherche au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale de Neuchâtel. En effet, le Professeur P.A. Siegenthaler directeur de ma thèse, a passé le "témoin" à son successeur, le Professeur E. Martinoia.

Abréviations

A:	
ADN:	acide desoxyribonucléique
ADP:	adénosine diphosphate
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adénosine triphosphate
[γ - ³² P]ATP:	adénosine triphosphate avec du ³² P en position γ
B:	
BPG:	bisphosphatidylglycérol
BSA:	albumine sérique de bœuf
C:	
CCM:	chromatographie sur couche mince
CCMHP:	chromatographie sur couche mince de haute performance
CDP:	cytidine diphosphate
CDP-DAG:	cytidine diphosphate-diacylglycérol
chl:	chlorophylle
CMP:	cytidine monophosphate
CTP:	cytidine triphosphate
[γ - ³² P]CTP:	cytidine triphosphate avec du ³² P en position γ
D:	
DAG:	diacylglycérol
DG:	diacylglycérol
DGDG:	digalactosyldiacylglycérol
DGPP:	diacylglycérol pyrophosphate
DTT:	dithiothréitol
E:	
EDTA-Na ₂ :	éthylène diamine tétra acétate de sodium
EF-1 α :	"elongation factor 1 α "
EGTA-Na ₂ :	éthylène glycol-bis(β -aminométhyléthér)tétra acétate de sodium
F:	
FAD:	flavine adénine dinucléotide
G:	
GGGT:	galactolipide-galactolipide galactosyl transférase
GP:	glycérophosphate
GPC:	glycérophosphorylcholine
GPG:	glycérophosphorylglycérol
GPI:	glycérophosphorylinositol
GPIP:	glycérophosphorylinositol 4-monophosphate
GPIP ₂ :	glycérophosphorylinositol 4,5-bisphosphate

GPS:	glycérophosphorylsérine
GTP:	guanosine triphosphate
H:	
Hsp:	"heat shock protein"
I:	
IEP:	"inner envelope protein"
Ins:	inositol
IOD:	densité optique intégrée
K:	
kDa:	kilodalton
L:	
LHC:	"light harvesting complex"
LPA:	acide lysophosphatidique
LPI:	lysophosphatidylinositol
LPIP:	lysophosphatidylinositol 4-monophosphate
LRA:	lipase de <i>Rhizopus arrhizus</i>
LS:	"large subunit"
M:	
MES:	acide morpholinoéthane-sulfonique
MGDG:	monogalactosyldiacylglycérol
MG ^P DG:	monogalactosylmonophosphate diacylglycérol
MG ^{PP} DG:	monogalactosylpyrophosphate diacylglycérol
Mi:	membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste
Mops.	acide morpholinopropane-sulfonique
MP:	membrane plasmique d' <i>Epinard</i>
Mx:	membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste
N:	
NADPH:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NDPK:	nucléoside diphosphate kinase
O:	
O:	origine de migration
OEP:	"outer envelope protein"
P:	
PA:	acide phosphatidique (phosphatidate)
PAF:	"platelet activating factor"
PAGE:	"polyacrylamide gel electrophoresis"
PAP:	"proton transport activating phospholipid"
PC:	phosphatidylcholine
PE:	phosphatidyléthanolamine
PEI:	polyéthylènimine

PG:	phosphatidylglycérol
PI:	phosphatidylinositol
³² Pi:	isotope radioactif de l'orthophosphate
PIK-A49:	"phosphatidylinositol-kinase activating protein 49"
PIP:	phosphatidylinositol 4-monophosphate
PIP ₂ :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC:	protéine kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLC:	phospholipase C
PLD:	phospholipase D
PPA:	diacylglycérol pyrophosphate
PS:	phosphatidylsérine
PSI:	photosystème I, P ₇₀₀
PSII:	photosystème II, P ₆₈₀
R:	
RE:	réticulum endoplasmique
Rf:	"retention factor"
RubisCO:	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase
S:	
SDS:	sodium dodecyl sulfate
sm:	"standard nomenclature"
SQDG:	sulfoquinovosyldiacylglycérol
SS:	"small subunit"
T:	
TEMED:	tétraméthyl-éthylènediamine
Tricine:	N-tris-(hydroxyméthyl)-méthylglycine
Tris:	N-tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TX-100:	triton X-100
U:	
UDP:	uridine diphosphate
UTP:	uridine triphosphate
[γ- ³² P]UTP:	uridine triphosphate avec du ³² P en position γ
UV:	rayon ultraviolet
X:	
XDP:	nucléoside diphosphate quelconque
XTP:	nucléoside triphosphate quelconque

Bibliographie

- Alban, C., Joyard, J., Douce, R. (1988). Preparation and characterization of envelope membranes from nongreen plastids. *Plant Physiol.* 88: 709-717.
- Allen, J.P. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Almaula, N., Lu, Q., Delgado, J., Belkin, S., Inouye, M. (1995) Nucleoside diphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 2524-2529.
- Arcaro, A., Wyman, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil response. *Biochem. J.*, 296: 297-301.
- Archer, E.K., Keegstra, K. (1990) Current views on chloroplast protein import and hypotheses on the origin of the transport mechanism. *J. Bioenerg. biomem.* 22: 789-810.
- Argiolas, A., Pisano, J.J. (1983) Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* 258: 13697-13702.
- Barber, J. (1976) The intact chloroplast. Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Netherlands, pp 89-134.
- Bléc, E., Joyard, J. (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110: 445-454.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fraction enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. I. Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.* 258: 13273-13280.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fraction enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 13280-13286.
- Block, M.A., Joyard, J., Douce, R. (1991) Purification and characterization of E37, a major chloroplast envelope protein. *FEBS* 287: 167-170.
- Boarder, M.R. (1994) A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 57-62.
- Boss, W.F., Massel, M.O. (1985) Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 1018-1023.
- Boss, W.F., Yang, Y., Tan, Z., Cho, M. (1995) Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by protein phosphorylation: a plasma membrane-cytoskeletal connection. *Dans*, *Plant Lipid Metabolism*. J.C. Kader and P. Mazliack eds. pp. 219-223. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands.
- Bovet, L. (1993) Phosphorylation des protéines de l'enveloppe du chloroplaste d'Épinard et rôle possible des protéines "heat-shock" comme catalyseurs d'activités protéine-kinasiques. Mémoire de thèse présenté à la Faculté des Sciences de l'université de Neuchâtel, Laboratoire de Physiologie Végétale et Biochimie.
- Bovet, L., Meylan-Bettex, M., Eggman, T. (1998) Spinach chloroplast NDPKII: role and function. Poster presented at The 7th Swiss Plant and Molecular Biology Conference, Engelberg Meeting, Switzerland.
- Bovet, L., Müller, M.-O., Siegenthaler, P.-A. (1995) The 26- and 14-kDa phosphoproteins associated with spinach chloroplast envelope membranes are distinct membrane-bound pools of the light-harvesting complex of photosystem II and the small subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Planta* 195: 563-569.

- Bovet, L., Siegenhaler, P.A. (1997) Mg²⁺-dependent dichotomic properties of the spinach chloroplast nucleoside diphosphate kinase-II: Serine/threonine phosphorylation and nucleotide phosphotransfer. *Plant Physiol. Biochem.* 35:455-465.
- Britton, G. (1988) Biosynthesis of carotenoids. *Dans Plant pigments*, ed T.W. Goodwin, London: Academic, pp 132-182.
- Browse, J., Somerville, C. (1991) Glycerolipid synthesis: Biochemistry and Regulation. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 42: 467-506.
- Buchanan, B.B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 341-374.
- Cardé, J.P., Joyard, J., Douce, R. (1982) Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids. *Biol. Cell.* 44: 315-324.
- Cline, K., Keegstra, K., Staehlin, L.A. (1985) Freeze-fracture electron microscopic analysis of ultrarapidly frozen envelope membranes on intact chloroplasts and after purification. *Protoplasma* 125: 11-123.
- Coté, G.G., Cmin, R.C. (1993) Why do plants have phosphoinositides. *Bioassay* 16: 39-46.
- Coté, G.G., DePass, A.L., Quarmby, L.M., Tate, B.F., Morse, M.J. (1989) Separation and characterization of inositol phospholipids from pulvini of *Samanea saman*. *Plant Physiol.* 90: 1422-1428.
- Cremers, F.F.M., Voorhout, W.F., Van der Krift, T.P., Leunissen-Bijvelt, J.J.M., Verkleij, A.J. (1988) Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 334-340.
- Danks, S.M., Evans, E.H., Whittaker, P.A. (1983) *Dans photosynthetic systems: structure, function and assembly*, ed John Whitley & Sons, New-York.
- Dietz, K.J., Bogorad, L. (1987) Plastid development in *Pisum sativum* leaves during greening. *Plant Physiol.* 85: 816-822.
- Divocha, N., Irvine, R.F. (1995) Phospholipid signaling. *Cell* 80: 269-278.
- Dome, A.J., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R. (1982) The galactolipid:galactolipid galactosyltransferase is located on the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.* 145: 30-34.
- Douce, R., Joyard, J. (1979) Structure and function of the plastid envelope. *Adv. Bot. Res.* 7: 1-116.
- Douce, R., Joyard, R. (1982) *Purification of the chloroplast envelope. Dans Methods in chloroplast molecular biology*, chap. 16. Eds Edelman et al., Elsevier Biomedical Press.
- Douce, R., Block, M.A., Dome, A.J., Joyard, J. (1984) The plastid envelope membranes: their structure, composition, and role in the chloroplast biogenesis. In *DB Roodyn, ed, Subcellular Biochemistry*, Vol 10. Plenum Press, NY, pp 1-84.
- Douwe de Boer, A., Weisbeek, P.J. (1991) Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 221-253.
- Dove, S.K., Lloyd, C.W., Drobak, K. (1994) Identification of a phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase in plant cells: association with the cytoskeleton. *Biochem. J.* 303: 347-350.
- Drees-Werringloer, U., Fisher, K., Wachter, E., Link, T.A., Flugge, U-L (1991) cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the precursor of the 37-kDa inner envelope membrane polypeptide from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 195: 361-368.
- Droback, B.K. (1993) Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol.* 102: 705-709.
- Dumont, N. (1991) Etude des protéines radiolées associées à l'enveloppe du chloroplaste de l'épinard après protéosynthèse *in arganella* en présence de ³⁵S-méthionine. Thèse de Docteur-ès-Science, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.

- Dumont-BéBoux, N., Siegenthaler, P.-A. (1994) Involvement of 70S ribosomes in the synthesis of some polypeptides constitutives of inner and outer envelope membranes of spinach chloroplast. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (2): 303-312.
- Eggman, T. (1997) Nucleoside diphosphate kinase II du chloroplaste d'Epinard: clonage, expression, purification et détermination de l'activité de la protéine recombinante. Travail de Diplôme, Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Neuchâtel.
- Ellis, R.J. (1981) Chloroplast proteins: synthesis, transport, and assembly. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 111-138.
- Ellis, R.J., van der Vies, S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Fisher, K., Weber, A., Arbinger, B., Brink, S., Eckerskorn, C., Flügge, U.-I. (1994) The 24 kDa outer envelope membrane protein from spinach chloroplasts: molecular cloning, *in vitro* expression and import pathway of a protein with unusual properties. *Plant Mol. Biol.* 25: 167-177.
- Flügge, U.I. (1990) On the translocation of proteins across chloroplast envelope. *J. Bioenerg. Biomem.* 22: 769-787.
- Flügge, U.I., Benz, R. (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS* 169: 85-89.
- Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C. (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO. J.* 8: 39-46.
- Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1984) The phosphate triose phosphate-phosphoglycerate translocator of chloroplasts. *Trends Biochem. Sci.* 9: 530-533.
- Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 129-144.
- Frentzen, M. (1993) Acyltransferases and triacylglycerol. *Dans, Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore, Jr., eds Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 195-231.
- Friedle, E., Soll, J., Schulz, G. (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* 155: 511-515.
- Fry, M.J. (1994) Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1226: 237-268.
- Gilles, A., Presecan, E., Vonica, A., Lascu, I. (1991) Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 8784-8789.
- Gilroy, S., Read, N.D., Trewas, A.J. (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771.
- Gray, M.W., Doolittle, W.E. (1982) *Microbiol. Rev.* Has the endosymbiont hypothesis been proven? 46: 1-42.
- Hallick R.B., Hong L., Drager R.G., Favreau M., Monfort A., Orsat B., Spielmann A., Stutz E. (1993) "Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA"; *Nucleic Acids Res.* 21: 3537-3544.
- Hananberger, A., Wissing, J.B., Wagner, K.C. (1995) *Properties of phosphatidylinositol 4-kinase from suspension cultured Catharanthus roseus cells.* *Plant Sci.* 112: 53-63.
- Heber, U., Heldt, H.W. (1981) The chloroplast envelope structure, function and role in leaf metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 139-168.
- Hegewald, H. (1996) One dimensional thin-layer chromatography of all known D-3 and D-4 isomers of phosphoinositides. *Anal. Biochem.* 242: 152-155.

- Heinz, E. (1977). *Dans* Lipids and Lipids polymers. Eds Tevini, M. & Lichtenthaler, H.K., Springer-Verlag, Berlin, pp 102-120.
- Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G. (1973) Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta* 314: 224-241.
- Hüller, R.G., Goodehild, D.J. (1981) Thylacoid membrane and pigment organization. *Dans* The biochemistry of plants: Photosynthesis vol.8. Eds Hatch, M.D. et Boardman, N.K., Academic press, New-York, pp 2-46.
- Hiratsuki, J., Shimada, H., Whittier, R., Sakamoto, M., Ishibashi, T., Mori, M., Honji, Y., Kondo, C., Nishizawa, Y., Kanno, A., Hirai, A., Sun, C.R., Meng, B.Y., Li, Y.Q., Shinozaki, K., Sugiura, M. (1989) *Mol. gen. Genet.* 217: 185-194.
- Horton, P., Black, M.T. (1981) Light-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in pea chloroplasts induced by adenosine 5'-triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 635: 53-62.
- Huang, L., Berkelman, T., Franklin, A.E., Hoffman, N.E. (1993) Characterization of a gene encoding a Ca^{2+} -ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10066-10070.
- Irvine, R.F., Letcher, A.J., Lander, D.J., Drobak, B.K., Dawson, A.P. (1989) Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate and phosphatidylinositol(4)phosphate in plant tissues. *Plant Physiol.* 89: 888-892.
- Jäger-Vottero, P., Dorne, A.-J., Jordanov, J., Douce, R. (1997). Redox chains in chloroplast envelope membranes: Spectroscopic evidence for the presence of electron carriers, including iron-sulfur centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1597-1602.
- Jong, A.Y., Ma, J.J. (1991) *Saccharomyces cerevisiae* nucleoside diphosphate kinase: purification, characterization and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 291: 241-246.
- Joy, K.W., Hageman, R.H. (1966) The purification and properties of nitrite reductase from higher plants, and its dependence on ferredoxin. *Biochem. J.* 100: 263-273.
- Joyard, J., Block, M., Pineau, B., Albrieux, C., Douce, R. (1990) Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH:Protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 265: 21820-21827.
- Joyard, J., Block, M.A., Douce, R. (1991). Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. *Eur. J. Biochem.* 199: 489-509.
- Joyard, J., Block, M.A., Malherbe, A., Marcehal, E., Douce, R. (1993) Origin and synthesis of galactolipid and sulfolipid head-groups. *Dans*, *Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore, Jr., eds Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 231-258.
- Knoh, H., Sakane, F., Imai, S.-I., Wada, I. (1993) Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase-enzymes metabolizing lipid second messengers. *Cell. Sign.* 5: 495-503.
- Kanoh, H., Yamada, K., Sakane, F. (1990) Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends Biochem. Sci.* 15: 47-50.
- Karibe, H., Komatsu, S., Hirano, H. (1995) A calcium- and phospholipid-dependant protein kinase from rice (*Oryza sativa*) leaves. *Physiol. Plantarum* 95: 127-133.
- Katagiri, T., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. (1996) Molecular cloning of a cDNA encoding diacylglycerol kinase (DGK) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30: 647-653.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H.A., Schnell, D.J. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast import machinery. *Science* 266: 1035-1039.
- Kinney, A.J. (1993) Phospholipid headgroups. *Dans*, *Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore, Jr., eds Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 259-284.

Klinker, J.F., Hagelüken, A., Grünbaum, L., Heilmann, I., Nürnberg, B., Harhammer, R., Offermans, S., Schwaner, I., Ervens, J., Wenzel-Seifert, K., Müller, T., Seifert, R. (1994) Mastoparan may activate GTP hydrolysis by Gi-proteins in HL-60 membranes indirectly through interaction with nucleoside diphosphate kinase. *Biochem. J.* 304: 377-383.

Klinker, J.F., Laugwitz, K.L., Hagelüken, A., Seifert, R. (1996) Activation of GTP formation and high-affinity GTP hydrolysis by mastoparan in various cell membranes. *Biochem. Pharmacol.* 51: 217-223.

Knight, J.S., Gray, J.C. (1995) The N-terminal hydrophobic region of the mature phosphate translocator is sufficient for targeting to the chloroplast inner envelope membrane. *The Plant Cell* 7: 1421-1432.

Krause, G.H. (1977) Light induced movement of magnesium ions in the intact chloroplasts. Spectroscopic determination with eriochrome blue se. *Biochim. Biophys. Acta.* 465:50-51.

Lascu, I., Pop, R., Porumb, H., Presecan, E., Proinov, I. (1983) Pig heart nucleosidediphosphate kinase. *Eur. J. Biochem.* 135: 497-453.

Lehner, K., Heldt, H.W. (1978) Dicarboxylate transport across the inner membrane of the chloroplast envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 501: 531-544.

Li, H-M., Moore, T., Keegstra, K. (1991) Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *The Plant Cell* 3: 709-717.

Lübeck, J., Hcias, L., Soll, J. (1997) Protein import into chloroplasts. *Physiol. Plant.* 100: 53-64.

McCarty, D.R., Keegstra, K., Selman, B.R. (1984) Characterization and localization of the ATPase associated with Pea chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.* 76:584-588.

Maier R.M., Neckermann K., Igloi G.L., Koessel H. (1995) "Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing." *J. Mol. Biol.* 251: 614-628.

Malherbe, A., Block, M.A., Douce, R., Joyard, J. (1995) Solubilization and biochemical properties of phosphatidate phosphatase from spinach chloroplast envelope membranes. *Plant physiol. Biochem.* 33: 149-161.

Maréchal, E., Block, M.A., Dorne, A-J., Douce, R., Joyard, J. (1997). Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiol. Plant.* 100: 65-77.

Martiny-Baron, G., Scherer, G.F.E. (1989) Phospholipid-stimulated protein kinase in plant. *J. Biol. Chem.* 264: 18052-18059.

Memon A.R., Boss, W.F. (1990) Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinase and H^+ -ATPase in plasma membrane of sunflower of hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 265: 14817-14821.

Memon, A.R., Chen, Q., Boss, W.F. (1989) Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162: 1295-1301.

Menzlaff, E., Flügge, U.I. (1993) Purification and functional reconstitution of the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1147: 13-18.

Meyers, R., Cantley, L.C. (1997) Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 272 (07): 4384-4390.

Moolenaar, W.H. (1995) Lysophosphatidic acid signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 203-210.

Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J., de Laat, S.W. (1986) Growth factor like action of phosphatidic acid. *Nature* 323: 171-173.

Moore, T.S. (1982) Phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 235-259.

- Moréra, S., Chiodmi, M., LeBras, G., Briozzo, P., Véron, M., Janin, J. (1994) Adenosine 5'-diphosphate binding and the active site of nucleoside diphosphate kinase. *Biochemistry*, 33: 459-467.
- Müller, M.O., Ruffieux, L., Rawlyer, A., Bovet, L., Siegenthaler, P.A. (1995) Phosphorylation of lipids in spinach chloroplast envelope membranes. *Experientia*, 51, poster presentation A12.
- Müller, M.O., Bovet, L., Siegenthaler, P.A. (1996) Lipid kinase activities in spinach chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol. and Biochem. Special issue*, poster presentation S09-19.
- Mullet, J.E. (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segments which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 258: 9941-9948.
- Munnik, T., Arisz, S.A., de Vrije, T., Musgrave, A. (1995) G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell* 7: 2197-2210.
- Munnik, T., de Vrije, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1996) Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J. Biol. Chem.* 271: 15708-15715.
- Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1994) Rapid turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate in the green alga *Chlamydomonas eugametos*: signs of a phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in lower plants? *Biochem. J.* 298: 269-273.
- Murata, M., Siegenthaler, P.A. (1998) Lipids in photosynthesis: an overview. In: Siegenthaler P.A. and Murata M. (eds) *Lipids in photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, pp 1-20, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Murayama, T., Ui, M. (1987) Phosphatidic acid may stimulate membrane receptors mediating adenylate cyclase inhibition and phospholipid breakdown in 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262: 5522-5529.
- Murphy, D.J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membrane in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 864: 33-94.
- Nguyen, T.D., Miquel, M., Dubacq, J.P., Siegenthaler, P.A. (1987) Localization and some properties of a Mg^{2+} -dependent ATPase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Science* 50: 57-63.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 957-970.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., Ozeki, H. (1986) *Nature* 322: 572-574.
- Okpodu, C.M., Gross, W., Burkhart, W., Boss, W.F. (1995) Purification and characterization of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from carrot suspension culture cells. *Plant Physiol.* 107: 491-500.
- Parks, R.E., Argawal, R.P. (1973) Nucleoside diphosphokinases. In *The enzymes*, 8, Boyer P.D., ed., Academic Press, New York: 307-333.
- Parmar, P.N., Brearley, C.A. (1995) Metabolism of 3- and 4-phosphorylated phosphatidylinositols in stomatal guard cells of *Commelina communis* L. *The Plant J.* 8: 425-433.
- Pical, C., Sandelius, A.S., Melin, P-M., Sommarin, M. (1992) Polyphosphoinositide phospholipase C in plant plasma membranes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 100: 1296-1303.
- Pike, L.J. (1992) Phosphatidylinositol 4-kinase and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation. *Endocr. Rev.* 13: 692-706.

- Pohlmeier, K., Soll, J., Steinkamp, T., Hinnah, S., Wagner, R. (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (17): 9504-9509.
- Quarumby, L.M., Yuch, Y.G., Cheshire, J.L., Keller, L.R., Snell, W.J., Crain, R.C. (1995) Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 116: 734-744.
- Quick, W.P., Scheibe, R., Neuhaus, H.E. (1995) Induction of hexose-phosphate translocator activity in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 109: 113-121.
- Rawley, A., Meylan-Bettex, M., Siegenthaler, P.A. (1995) (Galacto)lipid export from envelope to thylakoid membranes in intact chloroplasts. II. A general process with a key role for the envelope in the establishment of lipid asymmetry in thylakoid membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1233: 123-133.
- Roy, P.M. (1977) Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 59: 594-599.
- Reinhold, S.L., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. (1990) Activation of human neutrophil phospholipase D by three separable mechanisms. *FASEB*, 4: 208-214.
- Reith M.E., Munholland J. (1995) "Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome" *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 333-335.
- Riedel, B., Morr, M., Wu, W-I., Carman, G.M., Wissing, J.B. (1997) Metabolism of diacylglycerol pyrophosphate by suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. Identification and characterization of diacylglycerol pyrophosphate phosphatase in plants. *Plant Sci.* 128: 1-10.
- Robinson, S.P., Wiskich, J.T. (1977) Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides. *Plant Physiol.* 59: 422-427.
- Rost, S., Frank, C., Eeck, E (1996). The chloroplast envelope is permeable for maltose but not for maltodextrins. *Biochem. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1291(3): 221-227.
- Roy, H., Cannon, S., Gilson, M (1988) Assembly of rubisco from native subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 957: 323-334.
- Salomon, M., Fisher, K., Flügge, U.I., Soll, J. (1990) Sequence analysis and protein import studies of an outer chloroplast envelope polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5778-5782.
- Salvucci, M.E., Drake, R.R., Broadbent, K.P., Haley, B.E., Hanson, K.R., McHale, N.A. (1990) Identification of the 64 kDa chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 93: 105-109.
- Sasaki, Y., Scziguchi, K., Nagano, Y., Matsuno, R. (1991) Detection of small GTP-binding proteins in the outer envelope membrane of pea chloroplasts. *FEBS* 293: 124-126.
- Schaap, D., van der Wal, J., van Blitterswijk, W.J., van der Bend R.L., Ploegh, H.L. (1993) Diacylglycerol kinase is phosphorylated *in vivo* upon stimulation of the epidermal growth factor receptor and serine/threonine kinases, including protein kinase C. *Biochem. J.* 289: 875-881.
- Schäfer, A., Bygrave, F., Matzenauer, S., Marmé, D. (1985) Identification of a calcium- and phospholipid-dependent protein kinase in plant tissue. *FEBS* 187: 25-28.
- Shepherd, P.R., Reaves, B.J., Davidson, H.W. (1996) Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic. *trends in Cell Biol.* Vol. 6, pp. 92-97.
- Shi, J., Gonzales, R.A., Dhattacharyya, M.K. (1995) Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *The Plant J.* 8: 381-390.

- Shimajima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y., Takamiya, K.-I. (1997) Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 333-337.
- Shingles, R., Roh, M.H., McCarty, R.E. (1996) Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles. *Plant Physiol.* 112: 1375-1381.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakusugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986) *EMBO J.* 5: 2043-2049.
- Siegenthaler, P.-A., Bovef, L. (1993) A unique protein-kinase activity is responsible for the phosphorylation of the 26- and 14-kDa proteins but not the 67-kDa protein in the chloroplast envelope membranes of spinach. *Planta* 190: 231-240.
- Siegenthaler, P.-A., Dumont, N. (1990) Characteristics of spinach chloroplast envelope, thylacoid and stroma polypeptides as revealed by Triton X-114 phase partition. *Plant Cell Physiol.* 31: 1101-1108.
- Siegenthaler, P.-A., Müller, M.-O., Bovef, L. (1997) Evidence for lipid kinase activities in spinach chloroplast envelope membranes. *FEBS* 416: 57-60.
- Siegenthaler, P.-A., Nguyen, T.D. (1983) Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Isoelectric focusing and SOS-PAGE separations. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 226-233.
- Soll, J., Schulz, G., Joyard, J., Dauce, R., Block, M.A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membrane from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290-299.
- Sommarin, M., Sandelius, A.S. (1988) Phosphatidylinositol and phosphatidylinositolphosphate kinases in plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 958: 268-278.
- Staehlin, L.A. (1986) *Dans Encyclopedia of plant physiology: new series*, vol. 19. Eds Staehlin, L.A. and Arntzen, C.J., Springer-Verlag, New-York, pp. 1-84.
- Stewart, V.L., Michalowski, C.b., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Bryant, D.A. (1995) "Complete nucleotide sequence of the *Cyanophora paradoxa*." *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 327-332.
- Tan, Z., Boss, W.f. (1992) Association of phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol monophosphate kinase, and diacylglycerol kinase with the cytoskeleton and F-actin fractions of carrot (*Daucus carota* L.) cells grown in suspension culture. *Plant Physiol.* 100: 2116-2120.
- Uemura, M., Steponkus, L. (1997). Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from Rye leaves. *Plant. Physiol.* 114: 1493-1500.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Shinozaki, K. (1994) An *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding Ca²⁺-dependent protein kinase. *Plant physiol.* 105: 1461-1462.
- van't Hof, R., van Klompenburg, W., Pilon, M., Kozubek, A., de Korte-Kool, G., Demel, R.A., Weissbeek, P.J., de Kruijff, B. (1993) The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane lipids. *J. Biol. Chem.* 268: 4037-4042.
- Wakusugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M. (1994) "Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9794-9798.
- Wakusugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K., Sugiura, M. (1997) "Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (11): 5967-5972
- Walker, C.J., Weinstein, J.D. (1995) Re-examination of the localization of Mg-chelatase within the chloroplast. *Physiol. Plant.* 94: 419-424.

- Welters, P., Takegawa, K., Emr, S.D., Chrispeels, M.J. (1994) *AtVPS34*, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11398-11402.
- Werner-Washburn, M., Cline, K., Keegstra, K. (1983) Analysis of pea chloroplast inner and outer envelope membrane proteins by two-dimensional gel electrophoresis and their comparison with stromal proteins. *Plant Physiol.* 73:569-575.
- Whilman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., Canley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, 332: 644-646.
- Wissing, J.B., Behrbohm, H. (1993) Phosphatidate kinase, a novel enzyme in phospholipid metabolism. *Plant Physiol.* 102: 1243-1249.
- Wissing, J.B., Behrbohm, H. (1993) Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound, *FEBS* 315: 95-99.
- Wissing, J.B., Grabowski, L., Drewitz, E., Hanenberg, C., Wylegalla, c., Wagner, K.G. (1992) Plasma membrane preparation of suspension cultured plant cells contain the enzyme for the recycling of phosphatidic acid and diacylglycerol. *Plant Sci.* 87: 29-37.
- Wissing, J.B., Wagner, K.G. (1992) Diacylglycerol kinase from suspension cultured plant cells. *Plant Physiol.* 98: 1148-1153.
- Woldegiorgis, G., Voss, S., Shrago, E., Werner-Washburne, M., Keegstra, K. (1983) An adenine nucleotide-phosphoenolpyruvate counter-transport system in C3 et C4 plant chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 945-951.
- Wolfe, K.H., Morden, C.W., Palmer, J.D. (1992) "Complete nucleotide sequence of the *Epiphagus virginiana*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10648-10652
- Wu, C., Ko, K. (1993) Identification of uncleavable targeting signal in the 70-kilodalton spinach chloroplast outer envelope membrane protein. *J. Biol. Chem.* 268 (26): 19384-19391.
- Yamamoto, Y.T., Conkling, M.A., Sussex, I.M., Irish, V.F. (1995) An *Arabidopsis thaliana* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. *Plant Physiol.* 107: 1029-1030.