

LES POLYGLYCEROPHOSPHOLIPIDES D'*EUGLENA GRACILIS*

R. CALVAYRAC

*Cytophysiologie de la Photosynthèse,  
C.N.R.S. 91 – Gif sur Yvette*

and

R. DOUCE

*Laboratoire de Biologie Végétale 4,  
Faculté des Sciences de Paris, 12, rue Cuvier, Paris vième*

In light or dark grown *Euglena gracilis* cells, the DPG content, in contrast to the PG content, is dependent on the carbon source. These results are closely related to the electron microscopy observations, showing structural changes in mitochondria varying with the carbon source of the media.

Two media have been used: the first one contains L-glutamic and DL-malic acid and the second contains DL-lactic acid. The phospholipidic analysis shows that PC and PE are the two main phospholipids.

## 1. Introduction

Les mitochondries des végétaux supérieurs possèdent une composition phospholipidique profondément différente de celle des chloroplastes. En particulier le diphosphatidylglycérol ou cardiolipide, présent dans les mitochondries en forte proportion, est totalement absent des chloroplastes, alors que le phosphatidylglycérol, présent en faible quantité dans les mitochondries, est le phospholipide le plus abondant des chloroplastes [1, 2]. Il était donc intéressant de rechercher sur d'autres organismes photosynthétiques la localisation précise de ces polyglycérophospholipides.

Après avoir étudié la composition phospholipidique globale d'Euglènes vertes et étiolées, cultivées sur différents milieux comme l'on fait Haverkate et Van Deenen [3] nous rapportons la composition en phosphatidylglycérol (PG) et en diphosphatidylglycérol (DPG) de leurs mitochondries et de leurs chloroplastes.

## 2. Matériel et méthodes

Souche: *Euglena gracilis*, lignée Z, (Cambridge no. 1224-5d).

Le premier milieu utilisé (Milieu I) qui renferme

comme source de carbone l'acide L glutamique et l'acide DL malique (GM) a été décrit par Greenblatt et Schiff [4]. Le second milieu (Milieu II) qui renferme comme source de carbone l'acide lactique, 33 mM (L) a la composition suivante:  $K_2HPO_4$  3,4 mM;  $MgSO_4$  2,04 mM;  $CaCl_2$  1,8 mM;  $(NH_4)_2HPO_4$  1,52 mM;  $FeCl_3$   $18,5 \times 10^{-3}$  mM;  $ZnSO_4$  0,30 mM;  $MnSO_4$  0,37 mM; thiamine  $2 \times 10^{-3}$  mM; cyanocobalamine  $10^{-6}$  g/l (pH = 3,5). Dans les deux cas on ajoute au milieu 0,6 mCi de  $H_3^{32}PO_4$ /l. Température d'incubation 27°.

Les cellules sont soumises (Euglènes vertes) ou non (Euglènes étiolées) à un éclairage de 3 000 lux avec alternance d'une période de 12 h d'obscurité et de 12 h de lumière. Les Euglènes ont un temps de génération de 12 h dans les deux types de milieu; elles sont prélevées en phase exponentielle de croissance.

Les chloroplastes sont extraits selon la méthode de Eisenstadt [5]. Les mitochondries sont extraites selon la méthode de Bonner adaptée au matériel [6].

Après fixation des cellules par l'éthanol bouillant, afin de détruire la phospholipase D (EC 3.1.4.4.), les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer [7]. L'extrait chloroformique des lipides est alors déposé sur une colonne de gel de silice (Biorad 325 mesh). Les graisses neutres, les acides gras et la majorité des pigments sont éliminés par lavage avec du chloroforme, les phospholipides sont ensuite élués

Tableau 1

Phospholipides	I		II	
	O	L	O	L
Phosphatidylcholine	56	47	66	56
Phosphatidyléanolamine	17	15	17	17
Phosphatidylsérine	3	4	2	3
Phosphatidylinositol	10	9	7	9
Diphosphatidylglycérol	14	14	7	7
Phosphatidylglycérol	traces	10	traces	8
Acide phosphatidique	traces	traces	traces	traces
Lysophosphatidylcholine	traces	traces	traces	traces
Lysophosphatidyléanolamine	traces	traces	traces	traces
Phospholipides totaux	19	20	28	25
Azote	270	347	227	270

Composition en phospholipides d'*Euglena gracilis* souche Z, cultivées sur milieu I et II en présence de lumière (L) ou à l'obscurité (O). (En % des phospholipides totaux). Les deux dernières lignes du tableau indiquent, pour chacune des conditions de culture la teneur en phospholipides totaux et la teneur en Azote, exprimé en  $\mu\text{g}$  pour  $10^6$  Euglènes.

par du méthanol. Les phospholipides sont dés-acylés en milieu méthylique à  $37^\circ$  durant 20 min en présence de potasse 0,1 N. Après neutralisation par l'amberlite IRC 50 sous sa forme ( $\text{H}^+$ ) [8], les composés sont séparés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman no. 2. Les phases solvantes sont les mélanges phénol, eau (100–38, v/v) et méthanol, acide formique, eau (80–13–7, v/v); les esters phosphoriques sont mis en évidence spécifiquement par le réactif du phosphore. Afin d'identifier les taches observées, on chromatographie simultanément les esters phosphoriques obtenus après désacylation de phospholipides témoins. L'extraction et la détermination de la structure du DPG ont été réalisées selon des techniques décrites par l'un d'entre nous dans une note précédente [9].

Tableau 2

Phospholipides	I		II	
	O	L	O	L
Diphosphatidylglycérol	2,7	2,8	2	1,8
Phosphatidylglycérol	traces	2	traces	2

Teneurs en diphosphatidylglycérol et en phosphatidylglycérol d'*Euglena gracilis*, souche Z, cultivée sur les milieux I et II, en présence de lumière (L) ou à l'obscurité (O), exprimées en  $\mu\text{g}$  pour  $10^6$  Euglènes.

### 3. Résultats

Les résultats des analyses et des dosages de phospholipides extraits d'*Euglena gracilis*, lignée Z, présentés par la fig. 1 sont réunis dans les tableaux 1 et 2.

On voit d'après ces chiffres que, quelle que soit la composition du milieu sur lequel elles sont cultivées, les Euglènes maintenues à la lumière sont

Tableau 3

Phospholipides	Mito- chondries	Chloro- plastes
	Milieu II O	Milieu II L
Phosphatidylcholine	62	35
Phosphatidyléanolamine	11	4
Phosphatidylsérine	—	—
Phosphatidylinositol	8	6
Diphosphatidylglycérol	22	traces
Phosphatidylglycérol	traces	50
Acide phosphatidique	16	3
Lysophosphatidylcholine	traces	traces
Lysophosphatidyléanolamine	traces	traces

Composition en phospholipides de mitochondries et de chloroplastes isolés d'*Euglena gracilis*, Souch Z (en % des phospholipides totaux). Les Euglènes cultivées sur milieu II, soit à l'obscurité (O) pour l'obtention de mitochondries, soit en présence de lumière (L) pour l'obtention des chloroplastes.

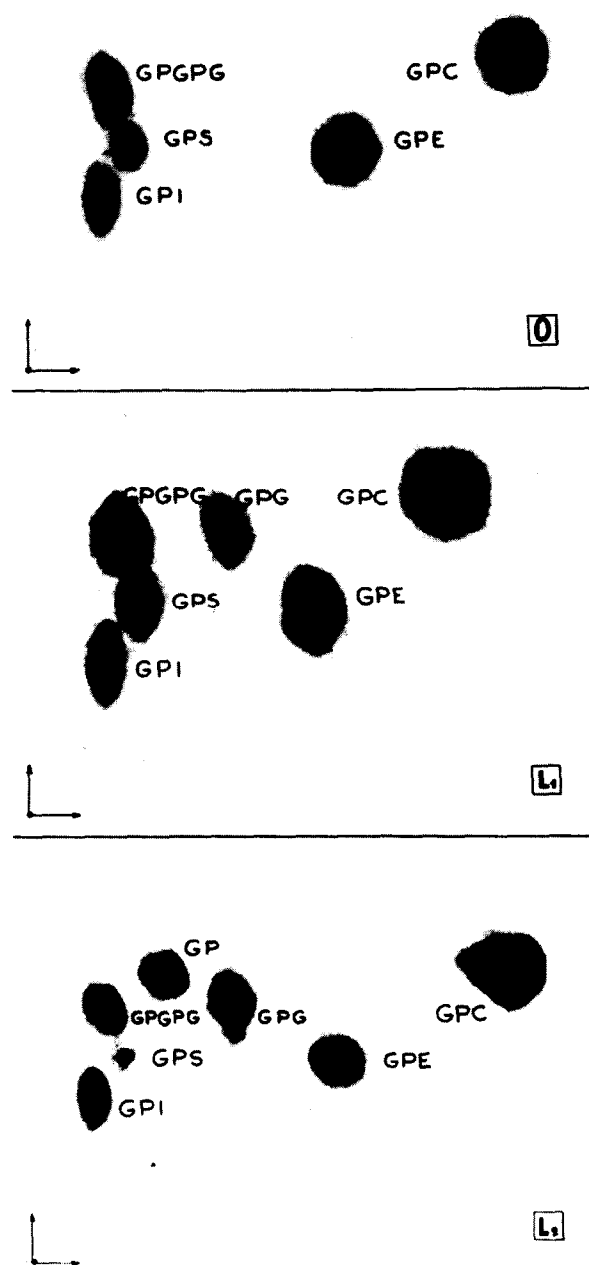


Fig. 1. Chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman no. 2 des esters phosphoriques libérés par désacylation des phospholipides d'*Euglena gracilis*. Premier solvant: phénol, eau (100–38, v/v); deuxième solvant: méthanol, acide formique, eau (80–13–7, v/v). Révélation  $^{32}\text{P}$ .

O = Euglènes cultivées à l'obscurité.

L<sub>1</sub> = Euglènes cultivées à la lumière. Dans les deux cas les phospholipides sont extraits après fixation par l'éthanol bouillant.

riches en PG, et de plus, elles renferment des quantités assez importantes de DPG. Les Euglènes maintenues à l'obscurité ne renferment en revanche que des traces difficilement décelables de PG. Cependant, dans ce dernier cas, la proportion de DPG reste très élevée.

D'autre part, si la composition du milieu ne modifie pas la teneur en PG des Euglènes, par contre elle semble jouer un rôle important sur celle du DPG. Rappelons que les deux milieux employés diffèrent essentiellement par la nature du substrat organique carboné. Dans le milieu I les substrats utilisés sont l'acide L glutamique et l'acide DL malique, dans le milieu II le substrat utilisé est l'acide lactique.

Les résultats des analyses et des dosages de phospholipides extraits des chloroplastes et des mitochondries isolées des Euglènes, sont regroupés dans le tableau 3.

Les mitochondries sont pauvres en PG, cependant, elles renferment des quantités importantes de DPG (22% de la masse de leurs phospholipides totaux). Nous avons d'autre part constaté que les mitochondries isolées sont riches en acide phosphatidique (GP). Ce phospholipide est probablement formé par dégradation des phospholipides azotés sous l'action de la phospholipase D lors de leur extraction. Nous avons en effet montré que ce phospholipide était absent des Euglènes convenablement fixées, alors qu'il apparaît en forte proportion dans les Euglènes non fixées (fig. 1).

Les chloroplastes, contrairement aux mitochondries, sont très riches en PG (50% de la masse de leurs phospholipides totaux) par contre ils ne renferment que des traces difficilement dosables de PDG.

#### 4. Discussion

L'analyse des phospholipides totaux a montré que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanol-

L<sub>2</sub> = Mêmes conditions que L<sub>1</sub>, mais extraction des phospholipides sans fixation préalable.

GPC = Phosphatidylcholine;

GPE = Phosphatidyléthanolamine;

GPI = Phosphatidylinositol;

GPS = Phosphatidylsérine;

GPG = Phosphatidylglycérol;

GPGPG = Diphosphatidylglycérol;

GP = Acide phosphatidique.

amine sont les deux phospholipides majeurs des Euglènes quelles que soient les conditions de culture. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Haverkate et Van Deenen [3] mais contredisent ceux de Hulanicka et coll. [10] qui ont montré que la phosphatidylsérine est le phospholipide majeur des Euglènes cultivées à la lumière.

Chez l'Euglène, comme chez les végétaux supérieurs la formation de chloroplaste entraîne l'apparition de forte quantité de PG, phospholipide majeur des systèmes lamellaires plastidiaux [1, 2, 11, 12].

La forte teneur en DPG, observée dans les mitochondries d'Euglènes, quelles que soient les conditions de culture, rappelle celle des mitochondries des tissus animaux [13] et des végétaux [9]. Le DPG est absent des chloroplastes.

Cependant nous avons constaté que la nature du substrat carboné utilisé entraîne une modification dans la teneur en DPG. Ces résultats sont à rapprocher d'observations faites au microscope électronique qui ont montré que suivant le substrat utilisé la morphologie des mitochondries diffère. Dans le cas où le substrat carboné est GM, les mitochondries en grand nombre, riches et crêtes, sont de taille normale. En revanche, lorsque le substrat est L, les mitochondries nous apparaissent géantes et le plus souvent anastomosées\*.

Il est intéressant de noter, comme chez les

végétaux [14], que les Euglènes présentent une activité phospholipasique D importante.

## Références

- [1] C.F.Allen, P.Good, H.F.Davis, P.Chisum et S.D.Fowler, *Am. Oil Chemist. Soc.* 43 (1966) 223–231.
- [2] R.Douce, T.Guillot-Salomon, C.Lance et M.Signal, *Bull. Soc. Franc. Physiol. Végétale* 14 (1968) 351–373.
- [3] F.Haverkate et L.L.M.Van Deenen, *Proceedings, Series B*, 68 (1965) 141–153.
- [4] C.L.Greenblatt et S.A.Schiff, *J. Protozool.* 6 (1959) 23–28.
- [5] J.M.Eisenstadt, *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. 2, ed. T.W.Goodwin (Academic Press, 1966) pp 341–349.
- [6] W.D.Bonner, *Methods in Enzymology*, Vol. 10, eds. S.P.Colowick et N.O.Kaplan (Academic Press, 1967) pp 126–133.
- [7] E.G.Bligh et W.J.Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 912.
- [8] E.H.Strickland et A.A.Benson, *Arch. Biochem. Biophys.* 88 (1965) 344–348.
- [9] M.J.Coulon-Morelec et R.Douce, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 1547.
- [10] D.Hulanicka, J.Erwin et K.Bloch, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2778.
- [11] J.F.G.M.Wintermans, *Biochim. Biophys. Acta* 44 (1960) 49–54.
- [12] A.A.Benson, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 15 (1964) 1–16.
- [13] M.G.MacFarlane, *Advan. Lipid. Res.* 2 (1964) 91–125.
- [14] F.M.Davidson et C.Long, *Biochem. J.* 69 (1958) 458.

\* Note en préparation.