

BIOSYNTHÈSE DU PHYTOL DES CHLOROPHYLLES ET DU SQUELETTE TÉTRATERPÉNIQUE DES CAROTÉNOÏDES DANS LES FEUILLES VERTES

C. COSTES

Centre National de Recherches Agronomiques
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles, France

(Reçue 28 Avril 1965)

Résumé—La biosynthèse du β -carotène, de la luteine, et du phytol des chlorophylles est étudiée à partir d'alcools diterpéniques (géranylgeraniol et géranyllinalool), dans des feuilles de Maïs étiolé que l'on fait verdir à la lumière. Dans des expériences de dilution de radioactivité par compétition métabolique, on montre que le géranylgeraniol et le géranyllinalool sont des précurseurs des caroténoïdes. Par des incorporations directes d'alcools diterpéniques, il est montré que le géranyllinalool se comporte exactement comme le géranylgeraniol dans la synthèse des caroténoïdes, et que le géranylgeraniol est le principal précurseur en C₂₀ du phytol des chlorophylles. Le phytol ne semble pas actif dans la caroténogénèse et le géranylgeraniol apparaît comme le métabolite en C₂₀ commun à la chaîne de biosynthèse du β -carotène, des xanthophylles et du phytol des chlorophylles.

Abstract—Biosynthesis of β -carotene, lutein and phytol has been examined in etiolated Maize leaves greening under illumination, from geranylgeraniol and geranyllinalool. From the dilution of radioactivity in metabolic competition experiments, it is possible to demonstrate that geranylgeraniol and geranyllinalool are located after mevalonate in the sequence of biosynthetic reactions leading to carotenoids. By direct infiltration of the diterpene alcohols into leaves, geranyllinalool is shown to have exactly the same behaviour as geranylgeraniol as a precursor of carotenoids. Phytol is not active in carotenogenesis, but geranylgeraniol is the main C₂₀ precursor of phytol of chlorophylls. Geranylgeraniol does appear to be the common C₂₀ metabolite in phytol and carotenoids biosynthesis.

INTRODUCTION

DANS les feuilles vertes, les caroténoïdes sont constitutifs des chloroplastes¹ où ils sont associés aux chlorophylles, aux quinones et aux lipoprotéines. Or, non seulement ces pigments sont associés dans les structures des organismes normalement viables, mais les variations des teneurs en chlorophylles sont souvent les mêmes que celles des teneurs en caroténoïdes dans les feuilles sous l'action des facteurs du milieu (lumière, température). Beck et Redman² chez le Trèfle, puis Hager³ chez *Veratrum album* ont remarqué le parallélisme de l'action des facteurs climatiques sur les teneurs en chlorophylles, en carotènes et en xanthophylles au cours de l'année. Dans les feuilles de Tabac en cours de maturation⁴ et dans les feuilles de Maïs placées à l'obscurité,⁵ l'évolution des trois groupes de pigments est parallèle. Ces faits suggèrent l'existence d'un maillon commun à la chaîne de biosynthèse des chlorophylles et à celle des caroténoïdes: un précurseur en C₂₀ donnerait naissance à la fois au phytol et aux caroténoïdes.⁶⁻⁹

¹ T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **68**, 503 (1958).

² W. A. BECK et R. REDMAN, *Plant Physiol.* **15**, 81 (1940).

³ A. HAGER, *Planta* **49**, 524 (1957).

⁴ R. N. JEFFREY et R. B. GRIFFITH, *Plant Physiol.* **22**, 34 (1947).

⁵ S. FRANK et A. KENNEY, *Plant Physiol.* **30**, 413 (1955).

⁶ L. Ruzicka, *Experientia* **9**, 357 (1953).

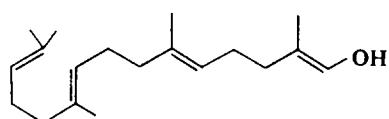
⁷ E. DEMOLE et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. France*, 1128 (1958).

⁸ A. A. SHLYK et T. N. GODNEV, *Radioisotopes in Scientific Research*, Vol. 4, p. 479. Pergamon, Oxford (1958).

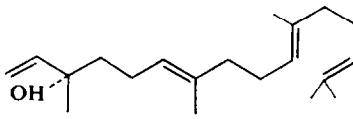
⁹ C. COSTES, *Compt. Rend.* **255**, 355 (1962).

Par ailleurs des travaux récents montrent que les acides acétique et mévalonique sont des précurseurs du phytol des chlorophylles en même temps que des caroténoïdes et des stérols.⁹⁻¹¹

Devant ces résultats nous avons repris l'hypothèse formulée par Wagner-Jauregg,¹² par Kuhn et Grundmann¹³ et par Ruzicka⁶ (voir aussi Demole et Lederer⁷), selon laquelle le géranylgeraniol (I) donnerait naissance à la fois au phytol par réduction et aux caroténoïdes par déshydrogénération et dimérisation. Mais de même que le squalène, précurseur aliphatique en C₃₀ des stérols, semble résulter de la condensation asymétrique d'une molécule de farnésol et d'une molécule de nérolidol, nous avons pensé que la chaîne tétraterpénique se synthétise par condensation d'une molécule de géranylgeraniol et d'une molécule de géranyllinalool (II).



(I) Géranylgeraniol



(II) Géranyllinalool

L'isolement du géranyllinalool dans les pétales de jasmin⁷ et du pyrophosphate de géranylgeranyle à partir de *Neurospora crassa*¹⁴ permet d'étayer cette hypothèse. Et très récemment on vient d'obtenir du géranylgeraniol et du géranyllinalool radioactifs à partir d'acide mévalonique 2-¹⁴C, de pyrophosphate de farnésyle 4-, 8-, 12-¹⁴C et d'extraits enzymatiques de Carotte et de Tomate.¹⁵ Dans le présent travail, nous nous proposons de donner des preuves expérimentales de cette hypothèse en étudiant simultanément la biosynthèse du β -carotène, de la lutéine et du phytol dans les feuilles, par la technique des traceurs radioactifs.

RESULTATS ET DISCUSSION

A partir de plusieurs substances "clé" du métabolisme (CO₂, acétate, mévalonate), nous avons observé des différences importantes entre la vitesse de biosynthèse du β -carotène et celle des xanthophylles dans les feuilles.¹⁶ Nous avons alors essayé, comme précurseurs, deux alcools en C₂₀, le géranylgeraniol (I) et son isomère, le géranyllinalool (II). Ces alcools pouvant être des précurseurs du phytol, nous avons étudié, en plus du β -carotène et de la lutéine, le phytol des chlorophylles *a* et *b*. L'étude expérimentale que nous allons décrire maintenant a été conduite sur des plantules étiolées de Maïs verdissant à la lumière, de façon à profiter d'une forte synthèse de phytol chlorophyllien, contemporaine d'une synthèse de caroténoïdes: en effet, en 30 hr, la synthèse de chlorophylle totale est de 15 molécules pour 1 molécule de β -carotène et de 18 molécules pour 1 molécule de lutéine.

Expériences de Compétition Métabolique entre un Précurseur Radioactif et les Alcools Diterpéniques

Au début de ce travail nous ne disposions pas de ces alcools marqués au ¹⁴C ou au ³H: nous avons fait des expériences de compétition métabolique entre un précurseur reconnu, radioactif (acétate ou mévalonate marqués ou ¹⁴C), et le précurseur éventuel,

¹⁰ F. G. FISHER, G. MARKEL, H. HONEL et W. RUDIGER, *Ann. Chem.* **657**, 199 (1962).

¹¹ E. I. MERCER et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **85**, 13P (1962).

¹² T. WAGNER-JAUREGG, *Ann. Chem.* **496**, 52 (1932).

¹³ R. KUHN et C. GRUNDMANN, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **65**, 1880 (1932).

¹⁴ E. C. GROB, K. KIRSHNER et F. LYNEN, *Chimia* **15**, 308 (1961).

¹⁵ D. A. BEELER, D. G. ANDERSON et J. W. PORTER, *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 26 (1963).

¹⁶ C. COSTES, *Thèse de Doctorat ès Sciences*, INRA, Paris (1964).

non marqué (alcool diterpénique).⁹ Si les alcools diterpéniques mis en compétition avec le précurseur radioactif, sont réellement des précurseurs de biosynthèse des caroténoïdes, on doit observer une dilution de la radioactivité dans ces pigments.

Suivant une technique décrite plus loin, chaque alcool diterpénique en émulsion dans une solution de Tween 80 est introduit dans un lot de feuilles de Maïs étiolé, en présence d'acétate radioactif. Les feuilles sont ensuite éclairées pendant 30 hr (4500 lx). Si l'un des alcools incorporés dilue la radioactivité du ¹⁴C provenant de l'acétate dans le pigment étudié, *il peut être considéré comme un précurseur*, situé après l'acétate, dans la biosynthèse de ce pigment.

TABLEAU 1. ACTION DE L'ISOPHYTOL ET DU PHYTOL SUR L'INCORPORATION D'ACÉTATE 2-¹⁴C DE SODIUM (5 μ c, 46 μ g) DANS LE β -CAROTÈNE ET DANS LA LUTÉINE (FEUILLES DE MAÏS)

Eclairage: 30 hr, 4500 lx

Expériences	Teneurs en pigment (μ g/g de feuille)		Radioactivités spécifiques (coups/min/ μ g de pigment)			Radioactivités incorporées (coups/min/g de feuille)		
	mesures	moyennes	mesures	moyennes	(%)	mesures	moyennes	(%)
β -carotène Témoins	28		82,5			2360		
	28		50,9			1435		
	30	29	82,1	71,8	100	2490	2095	100
+ Isophytol (68 μ g)	27		90,0			2530		
	25		42,0			1055		
	20	24	145,8	92,8	129	3030	2205	105
+ Phytol (64 μ g)	26		73,8			1955		
	24		102,3			2465		
	21	24	64,2	80,2	112	1400	1940	93
Lutéine Témoins	37		14,2			533		
	38		14,0			543		
	42	39	21,3	16,5	100	905	660	100
+ Isophytol (68 μ g)	28		17,8			506		
	37		19,4			729		
	32	32	20,2	19,1	116	664	633	96
+ Phytol (64 μ g)	41		16,0			660		
	42		19,9			848		
	32	38	11,6	15,8	96	376	628	95

Incorporation d'isophytol et de phytol non radioactifs. Dans une première série d'expériences, nous avons éprouvé notre technique de compétition métabolique avec le phytol et l'isophytol. Les résultats sont consignés dans les tableaux 1 et 2. Il convient de remarquer que la dispersion de ces résultats est grande, principalement pour les expériences faisant intervenir le phytol et l'isophytol dont la mise en suspension en milieu aqueux est difficile. La suspension étant infiltrée dans les feuilles, chaque molécule d'alcool diterpénique en solution vraie doit franchir plusieurs parois cellulaires avant de pouvoir être métabolisée dans les chloroplastes. Or ces alcools sont peu solubles et il est vraisemblable que la dispersion des résultats reflète les variations, d'un essai à l'autre, de la proportion des molécules qui peuvent effectivement atteindre les chloroplastes. *En ne considérant comme significativement différente du témoin, qu'une moyenne résultant de 3 mesures dont aucune ne recouvre les 3 mesures du témoin*, nous pensons pouvoir tirer les conclusions suivantes.

L'isophytol serait inactif sur l'incorporation de l'acétate $2-^{14}\text{C}$ dans le β -carotène, la lutéine et le phytol des chlorophylles. Cela signifierait que l'isophytol ne participe pas à la biosynthèse de ces corps. Il serait évidemment souhaitable de vérifier ce point par une incorporation directe d'isophytol marqué. Nous observons par ailleurs que cet alcool diterpénique n'est pas toxique et que l'incorporation d'une émulsion ne freine pas l'infiltration de l'acétate de sodium dans le parenchyme foliaire.

Le phytol fourni aux feuilles diminue la radioactivité incorporée dans le phytol des deux chlorophylles. On observe une dilution de radioactivité de 34 pour cent pour le phytol de la

TABLEAU 2. ACTION DE L'ISOPHYTOL ET DU PHYTOL SUR L'INCORPORATION D'ACÉTATE $2-^{14}\text{C}$ DE SODIUM (5 μc , 46 μg) DANS LE PHYTOL DES CHLOROPHYLLES *a* ET *b* (FEUILLES DE MAIS)

Eclaircement: 30 hr, 4500 lx

Expériences	Teneurs en chlorophylle ($\mu\text{g/g}$ de feuille)		Radioactivités incorporées dans le phytol				
	mesures	moyennes	mesures	moyennes	(%)	mesures	moyennes (%)
Chlorophylle a Témoins	413		13,9			5750	
	379		9,7			3670	
	395	395	11,5	11,7	100	4540	4653 100
+ Isophytol (68 μg)	444		14,7			6520	
	458		6,4			2930	
	365	422	14,6	11,9	102	5196	4882 105
+ Phytol (64 μg)	389		7,9			3090	
	404		9,1			3660	
	354	382	7,0	8,0	69	2484	3078 66
Chlorophylle b Témoins	181		12,7			2310	
	178		9,4			1670	
	183	180	13,2	11,8	100	2420	2133 100
+ Isophytol (68 μg)	195		15,1			2958	
	206		6,7			1380	
	171	191	8,2	10,0	85	1410	1916 90
+ Phytol (64 μg)	166		5,9			984	
	178		7,7			1384	
	152	165	7,3	7,0	59	1118	1162 55

chlorophylle *a* et de 45 pour cent pour le phytol de la chlorophylle *b*. Or nous savons que la dernière étape de la synthèse des chlorophylles est l'estérification du phytol par les chlorophyllides.¹⁷ La technique que nous utilisons semble donc valable puisqu'elle permet de confirmer le rôle précurseur des molécules de phytol dans la biosynthèse des chlorophylles.

Incorporation de géranylgeraniol et de géranylinalool non radioactifs. Les résultats des tableaux 3 et 4 peuvent se résumer ainsi.

Le géranylgeraniol et le géranylinalool diluent fortement (de -65 à -80 pour cent) de la radioactivité incorporée dans le β -carotène foliaire à partir de l'acétate $2-^{14}\text{C}$.

¹⁷ A. A. SHLYK, V. L. KALER et G. M. PODCHUFAROVA, *Proc. Intern. Congr. Biochem. 5th Moscow Vol. IX*, p. 514, (1961).

TABLEAU 3. ACTION DU GÉRANYLLINALOOL ET DU GÉRANYLGÉRANIOL SUR L'INCORPORATION D'ACÉTATE ^{2-14}C DE SODIUM (5 μc , 46 μc) DANS LE β -CAROTÈNE (FEUILLES DE MAIS)

Eclairage: 30 hr, 4500 lx

Expériences	Teneurs en pigment ($\mu\text{g/g}$ de feuille)		Radioactivités spécifiques (coups/min/ μg de β -carotène)			Radioactivités incorporées dans le β -carotène (coups/min/g de feuille)		
	mesures	moyennes	mesures	moyennes	(%)	mesures	moyennes	(%)
Témoins	{	24		93,1		2308		
		26		85,0		2205		
		28	26	93,8	90,6	100	2638	2383
+ Géranyllinalool (76 μg)	{	24		33,3		828		
		24		20,9		508		
		19	22	60,9	38,4	42	1187	841
+ Géranylgéraniol (66 μg)	{	20		19,1		397		
		26		21,2		567		
		19	22	28,1	22,8	25	551	505

TABLEAU 4. ACTION DU GÉRANYLLINALOOL ET DU GÉRANYLGLÉRANOL SUR L'INCORPORATION D'ACÉTATE ^{14}C DE SODIUM (5 μc , 46 μg) DANS LE PHYTOL DES CHLOROPHYLLES *a* ET *b* (FEUILLES DE MAIS)

Eclairage: 30 hr, 4500 lx

Expériences	Teneurs en chlorophylle ($\mu\text{g/g}$ de feuille)		Radioactivités incorporées dans le phytol		
	mesures	moyennes	mesures	moyennes	(%)
Chlorophylle a Témoins	428	6,0		2520	
	424	6,8		2900	
	511	454	5,2	6,0	100
+ Géranyllinalool (76 μg)	498	6,9		3450	
	422	6,8		2850	
	436	452	10,6	8,0	134
+ Géanylgeraniol (66 μg)	442	4,5		2008	
	490	2,8		1385	
	410	447	3,5	3,6	61
Chlorophylle b Témoins	193	5,9		1150	
	183	4,3		782	
	235	203	4,2	4,8	100
+ Géranyllinalool (76 μg)	232	6,2		1430	
	196	214	4,8	5,5	113
+ Géanylgeraniol (66 μg)	198	4,8		950	
	217	4,9		1062	
	180	198	4,9	4,9	101

Le géranylgeraniol diminue la radioactivité du phytol de la chlorophylle *a* (40 pour cent) exactement comme le phytol dans la série précédente d'expériences. Il faut remarquer l'absence de dilution de la radioactivité dans le phytol de la chlorophylle *b*: il est possible que que l'acétate radioactif, non métabolisé à la suite de l'utilisation de géranylgeraniol exogène lors de la synthèse des caroténoïdes, soit reporté vers la synthèse du phytol de la chlorophylle *b*.

Une dernière série d'expériences a permis d'étendre ces résultats à la lutéine (Tableau 5) dont la radioactivité, comme celle du β -carotène est très abaissée par ces deux alcools diterpéniques.

TABLEAU 5. ACTION DU GÉRANYLLINALOOL ET DU GÉRANYLGERANIOL SUR L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE $2\text{-}^{14}\text{C}$ DE SODIUM (5 μg , 46 μc) DANS LE β -CAROTÈNE ET DANS LA LUTÉINE (FEUILLES DE MAÏS)

Eclairage: 30 hr, 4500 lx

	β -carotène			Lutéine		
	Teneurs en pigment $\mu\text{g/g}$ de feuille	Radioactivités incorporées cpm/g de feuille	(%)	Teneurs en pigment $\mu\text{g/g}$ de feuille	Radioactivités incorporées cpm/g de feuille	(%)
Témoin	28	10910	100	41	2805	100
+ Géranylgeraniol (66 μg)	27	4090	37	34	1190	42
Témoin	14	1554	100	58	205	100
+ Géranyllinalool (76 μg)	10	597	38	65	50	25

Les résultats rapportés dans ce tableau représentent les moyennes de 3 séries d'expériences.

Nous devons remarquer que les dilutions observées portent sur les radioactivités incorporées, mais aussi sur les radioactivités spécifiques. *Les teneurs en pigments ne variant pas significativement, les dilutions ne peuvent pas être dues à une inhibition de la biosynthèse*, mais bien au fait que ces alcools diterpéniques sont métabolisés préférentiellement à l'acétate. Par ailleurs, nous avons vu que l'isophytol et le phytol ne paraissent pas diluer la radioactivité incorporée dans les caroténoïdes à partir de l'acétate $2\text{-}^{14}\text{C}$. On peut en conclure que non seulement ces alcools ne sont pas des précurseurs de biosynthèse, mais que leurs produits de dégradation ne servent pas non plus à la synthèse des caroténoïdes, dans nos conditions expérimentales. En raison de l'analogie structurale entre ces 4 alcools diterpéniques, il est vraisemblable que les produits de dégradation du géranylgeraniol ou du géranyllinalool ne sont pas non plus utilisés dans cette synthèse. Ainsi, les dilutions de radioactivité observées dans les pigments à partir du géranylgeraniol ou du géranyllinalool, proviennent bien d'une compétition directe entre les molécules d'acétate marqué et les molécules de ces alcools non dégradées.

Ces données semblent apporter la preuve expérimentale du rôle du géranylgeraniol comme précurseur immédiat du phytol et comme intermédiaire dans la synthèse du β -carotène et de la lutéine. Le géranylgeraniol et le géranyllinalool sont interchangeables dans la biosynthèse des caroténoides. Nous pouvons observer que la dilution de la radioactivité est sensiblement du même ordre de grandeur pour le β -carotène et pour la lutéine à partir de ces deux alcools: ce n'est donc pas à ce niveau (précurseur en C_{20}) que s'explique la différence entre la vitesse de biosynthèse du β -carotène et celle de la lutéine.

Comme nous le verrons plus loin, en l'absence d'une dégradation préalable des alcools diterpéniques, ces résultats montrent que le géranylgeraniol peut être considéré comme un précurseur biologique, et confirment sa situation après l'acide acétique dans la chaîne de biosynthèse. En répétant ce type d'expérience avec de l'acide mévalonique, nous voyons que le géranylgeraniol dilue la radioactivité du mévalonate $2-^{14}\text{C}$ de potassium dans le β -carotène des feuilles de Maïs (Tableau 6). *Nous confirmons ainsi que, dans la biosynthèse des caroténoïdes, le géranylgeraniol apparaît comme un précurseur intermédiaire situé après l'acide mévalonique.*

TABLEAU 6. ACTION DU GÉRANYLGERANIOL SUR L'INCORPORATION DU MÉVALONATE $2-^{14}\text{C}$ DE POTASSIUM DANS LE β -CAROTÈNE (FEUILLES DE MAÏS)

Eclairage: 28hr, 4500lx

Essais	Teneurs en β -carotène ($\mu\text{g/g}$ de feuille)	Radioactivités spécifiques (coups/min/ μg de pigment)	Radioactivités incorporées	
			(coups/min/g de feuille)	(%)
Mévalonate $2-^{14}\text{C}$ (1 μc)	23	598	13800	
	18	410	7620	
	21	394	8430	
	Moyenne	21	467	9950 100
Mévalonate $2-^{14}\text{C}$ (1 μc) Géranylgeraniol (66 μg)	16	280	4625	47
	21	204	4360	44
	22	266	5860	59
	Moyenne	20	250	4948 50

Incorporation d'Alcools Diterpéniques Tritiés

Afin de confirmer les résultats des expériences de compétition métabolique nous avons essayé d'infiltrer du géranylgeraniol et du géranylinalool tritiés, en présence de Tween 80, dans les feuilles excisées de plantules étiolées de Maïs. Après 30 hr d'éclairage, comme dans les expériences précédentes, les feuilles sont traitées par l'acétone: la radioactivité retrouvée dans l'extrait acétonique donne la mesure de la quantité totale d'alcool diterpénique tritié qui a *réellement* pénétré dans le lot de feuilles. Si nous comparons cette radioactivité à la radioactivité réellement fournie aux feuilles dans le tube, nous obtenons un pourcentage d'infiltration, très variable (de 3 à 72 pour cent), ce qui explique en partie les fortes variations observées par rapport à la moyenne dans les résultats des expériences de dilution de radioactivité. Cette dispersion des résultats vient de la difficulté de reproduire quantitativement à chaque expérience l'infiltration totale des émulsions dans les feuilles.

Nous mesurons l'utilisation de l'alcool incorporé dans un pigment par le pourcentage de radioactivité retrouvée dans ce pigment par rapport à la radioactivité de l'extrait acétonique. Nous avons vérifié que la radioactivité retrouvée dans les pigments ne peut pas provenir d'une contamination ou d'un simple échange isotopique de ^3H entre les molécules de géranylgeraniol marqué et les molécules de pigments. (Voir partie expérimentale.)

Dans le Tableau 7 qui regroupe les moyennes de 4 résultats expérimentaux nous voyons que près de la moitié de la radioactivité du géranylgeraniol infiltré se retrouve dans le phytol

TABLEAU 7. INTÉGRATION DU GÉRANYLGÉRANIOL ET DU GÉRANYLLINALOOL TRITIÉS DANS LE PHYTOL ET DANS CAROTÉNOÏDES DES FEUILLES DE MAÏS ÉTIOlé, À LA LUMIÈRE

(30 hr, 4500 lx)

	Radioactivités incorporées en % de l'extrait acétone	
	Géranylgéranol	Géranyllinalool
Phytol de la chlorophylle <i>a</i>	44,6	5,6
Phytol de la chlorophylle <i>b</i>	4,6	4,0
Phytol total	49,2	9,6
β-carotène	5,4	6,5
Lutéine	0,9	1,2

des chlorophylles (49,2 pour cent). En comparaison le géranyllinalool n'est que peu utilisé pour la synthèse du phytol (9,6 pour cent). Le géranylgéranol se retrouve principalement dans le phytol de la chlorophylle *a*. Comme dans les expériences de dilution de radioactivité, la synthèse du phytol de la chlorophylle *b* ne semble utiliser qu'une faible proportion du géranylgéranol: la signification précise de ce fait ne nous apparaît pas. Nous voyons aussi que le géranyllinalool est aussi actif que le géranylgéranol dans la biosynthèse du β-carotène.

Ces résultats expérimentaux confirment pleinement ceux des expériences de dilution de radioactivité par compétition métabolique.

TABLEAU 8. INCORPORATION SIMULTANÉE DE GÉRANYLGÉRANIOL ET DE GÉRANYLLINALOOL TRITIÉS DANS LES CAROTÉNOÏDES DE LA PLANTULE DE MAÏS

Eclairage: 24 hr, 4500 lx

Expériences	Géranylgéranol			Géranylgéranol + Géranyllinalool		
	Teneurs en pigments, en µg/g de feuille	Radioactivités incorporées		Teneurs en pigments, en µg/g de feuille	Radioactivités incorporées	
		en coups/min/g de feuille	en % de l'activité de l'extrait acétone		en coups/min/g de feuille	en % de l'activité de l'extrait acétone
β-Carotène	21	790	0,1	23	1100	0,21
	24	800	0,2	17	2260	0,07
	22	1410	0,25	25	1920	0,30
Lutéine	46	2580	0,33	56	2500	0,49
	46	905	0,23	54	2060	0,06
	40	910	0,16	46	1280	0,20
Radioactivité dans l'extrait acétone			0,24			0,25
	{	778 × 10 ³	100	{	509 × 10 ⁻³	100
		397 × 10 ³	100		3380 × 10 ⁻³	100
Radioactivité totale fournie aux feuilles cpm		563 × 10 ³	100		644 × 10 ⁻³	700
Géranylgéranol: 3,06 × 10 ⁶ (157 µg)			Géranyllinalool: 3,41 × 10 ⁶ (170 µg)			
Géranylgéranol: 6,12 × 10 ⁶ (314 µg)			Total: 6,47 × 10 ⁶ (327 µg)			

Le fait que le géranylinalool puisse dans une faible mesure servir de précurseur au phytol, et qu'il puisse remplacer le géranylgeraniol dans la biosynthèse des caroténoïdes conduit à penser que chacun de ces deux alcools diterpéniques peut, *in vivo*, se transformer en son isomère allylique, comme l'avaient suggéré Popjak et Cornforth²³ pour les alcools en C₁₅.

Afin d'éprouver la valeur de cette hypothèse, nous avons comparé les rendements d'incorporation dans les caroténoïdes de feuilles de Maïs de la radioactivité constituée, d'une part de géranylgeraniol tritié seul, d'autre part d'un mélange à peu près équimoléculaire de géranylgeraniol et de géranylinalool tritiés. Dans les deux séries d'expériences, la radioactivité spécifique des deux alcools est sensiblement la même. L'éclairement (4500 lx) dure 24 hr et dans ces conditions la quantité de β -carotène synthétisée est moins élevée qu'en 30 hr ce qui entraîne un plus faible rendement d'incorporation. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 8.

Nous voyons que malgré la grande dispersion des résultats, un mélange équimoléculaire de géranylgeraniol et de géranylinalool est aussi bien utilisé pour la synthèse des caroténoïdes que la quantité équivalente de géranylgeraniol pur. En d'autres termes, *il apparaît qu'une molécule de géranylgeraniol associée à une molécule de géranylinalool conduit à une molécule en C₄₀ de même que deux molécules de géranylgeraniol*. L'isomérisation de ces deux alcools diterpéniques l'un en l'autre est donc bien possible *in vivo*.

Recherche du Géranylgeraniol *in vivo*

Les expériences que nous venons de décrire font apparaître le géranylgeraniol comme la substance intermédiaire située au carrefour des voies de biosynthèse du phytol des chlorophylles et des caroténoïdes dans les chloroplastes. Dans l'introduction, nous avons vu que le géranylgeraniol et le géranylinalool avaient été isolés ou caractérisés dans plusieurs tissus végétaux. Mais jusqu'à maintenant, l'existence ces alcools dans les feuilles n'a pas été rapportée.

Nous avons d'abord recherché la présence des alcools terpéniques dans les extraits lipidiques de feuilles vertes, après extraction par l'acétone ou par l'éther de pétrole: par microchromatographie des extraits, nous n'avons jamais pu caractériser un alcool terpénique libre autre que le phytol provenant des chlorophylles après saponification.

Or nous savons qu'au cours de la biosynthèse des stérols, les alcools en C₅, C₁₀, et C₁₅ sont sous forme de pyrophosphate. Nous avons pensé que dans les feuilles il pouvait en être de même pour le géranylgeraniol et nous avons utilisé la technique décrite par Goodman et Popjak¹⁸ pour extraire les pyrophosphates de terpénoïde à partir de broyats de foie.

Dans un premier essai nous avons procédé à une extraction sur 11,7 g de folioles de Tomate. Sur chromatoplaque, l'extrait P₂ (voir partie expérimentale) donne 4 taches révélatrices par KMnO₄ dont l'une émigre comme le géranylgeraniol: de plus, cette tache est révélatrice par SbCl₃ comme le géranylgeraniol.

Nous avons alors recommandé cette extraction en partant de 582 g de folioles de Tomate prélevées en plein champ. Par microchromatographie de l'extrait P₂, nous avons révélé 6 taches par KMnO₄, dont l'une a un *R_f* très proche de celui du géranylgeraniol et cela même si l'activité des chromatoplaques varie; elle est révélatrice par SbCl₃ avec une couleur mauve virant au gris. La substance correspondant à cette tache se comporte donc comme le géranylgeraniol.

Le seuil de sensibilité des taches de géranylgeraniol révélées au permanganate de potassium étant de 0,05 μ g, nous avons calculé que la masse de "géranylgeraniol" extraite par cette

¹⁸ D. S. GOODMAN et POPJAK, *J. Lipid Res.* 1, 286 (1960).

méthode ne peut dépasser $0,1 \mu\text{g}$ par g de limbe foliaire. Pour en extraire 10 mg afin de l'identifier, il faudrait traiter 100 kg de feuilles fraîches.

Par chromatographie en phase gazeuse, les alcools diterpéniques sont séparables sur Apiezon à 190° et sortent de la colonne avec un volume de rétention élevé:¹⁹ au cours de nos essais, les faibles quantités de "géranylgeraniol" injectées (inférieures à $10 \mu\text{g}$) ont probablement été détruites sur la colonne.

Nous n'avons donc pas pu pousser plus loin la caractérisation du géranylgeraniol. Mais nous avons fait une autre extraction sur des feuilles de Tomate (11,5 g) ayant flotté 24 hr à la lumière (4500 lx) sur un milieu nutritif contenant de l'iodoacétate de sodium $0,5 \cdot 10^{-3}$ M. Nous savons que l'iodoacétate inhibe la réaction d'isomérisation de l'isopentényl pyrophosphate en diméthylallylpyrophosphate, bloquant ainsi la synthèse de tous les autres alcools terpéniques. Effectivement, dans cet essai, nous n'avons pas pu déceler la substance semblable au géranylgeraniol.

Dans les plantules de Maïs étiolées en voie de verdissement, nous avons caractérisé la même substance. Par la même technique, nous avons caractérisé le géranylgeraniol et le geraniol dans les feuilles d'un mutant de *Lycopersicum esculentum*, pauvre en chlorophylles et en caroténoïdes, type Xantha.²⁰

Il semble donc bien que le géranylgeraniol existe dans les feuilles vertes, mais comme nous l'avons vu, en très faible quantité. En revanche, nous n'avons jamais décelé de geranylinalool dans nos extraits.

Conclusions sur la Biosynthèse des Chaines Carbonées du Phytol et des Caroténoïdes

Dans le présent travail, nous confirmons expérimentalement le schéma de biosynthèse communément accepté pour les caroténoïdes: pour le β -carotène et pour la lutéine, la biosynthèse se fait comme pour les triterpènes à partir de l'acétate, puis du mévalonate.¹⁶ Par ailleurs, il est connu que chez les végétaux cette chaîne de biosynthèse se poursuit jusqu'au pyrophosphate de farnésyle. Nous avons caractérisé le géranylgeraniol dans les feuilles et nous avons montré que ce métabolite est, après l'acétate et le mévalonate, un précurseur des caroténoïdes foliaires. Cela permet de penser que, de même que 2 molécules de farnésol (C_{15}) se condensent pour donner 1 molécule de squalène (C_{30}), 2 molécules de géranylgeraniol se condensent pour conduire à 1 molécule en C_{40} comme l'avaient suggéré Kuhn et Grundmann.¹³

Certains auteurs pensent que le lycopersène est le premier produit de cette condensation^{14, 21}. Mais l'absence du lycopersène dans les feuilles vient d'être démontrée par Mercer *et al.*²² qui concluent que le premier produit en C_{40} formé à partir d'un précurseur en C_{20} doit être le phytoène. Cela suppose qu'il n'y a pas de réduction après la dimérisation, comme dans le schéma proposé par Popjak et Cornforth²³ où la condensation porte sur deux molécules asymétriques, l'une alcool primaire, l'autre alcool tertiaire. Or bien que nous n'ayons pu isoler le geranylinalool à partir des feuilles nous avons montré qu'il se comporte *exactement* comme le géranylgeraniol dans la synthèse des caroténoïdes. Certains auteurs ont considéré comme un artefact l'alcool tertiaire obtenu en même temps que l'alcool primaire lors de l'hydrolyse acide du pyrophosphate de prényle.^{18, 24} Pour la première fois, nous démontrons

¹⁹ G. POPJAK et R. H. CORNFORTH, *J. Chromatog.* **4**, 214 (1960).

²⁰ M. LEFORT, *Rev. Cytol. Biol. Vegetales* **20**, 1 (1959).

²¹ E. NUSSBAUM-CASSUTO et J. VILLOUTREIX, *Compt. Rend.* **260**, 1013 (1965).

²² E. I. MERCER, B. H. DAVIES et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **87**, 317 (1963).

²³ G. POPJACK et J. W. CORNFORTH, *Advan. Enzym.* **22**, 281 (1960).

²⁴ F. LYNN, B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING et E. M. MOSLEIN, *Angew. Chem.* **71**, 657 (1959).

que l'alcool tertiaire est biologiquement aussi actif que l'alcool primaire et ne devrait pas toujours être considéré comme un artéfact d'extraction.

En conclusion, il semble que le géranylgeraniol peut s'isomériser en géranyllinalool, et qu'ensuite une molécule de l'un se condense avec une molécule de l'autre pour donner, sans réduction, une molécule de tétraterpéne, probablement de phytoène.

Le géranylgeraniol apparaît sans équivoque comme le précurseur du phytol de la chlorophylle a, et dans une moindre mesure du phytol de la chlorophylle b.

En effet, nous avons déjà dit que nous ne savions comment interpréter la faible proportion de géranylgeraniol transformé en phytol de la chlorophylle b. Si l'on admet que la chlorophylle a est oxydée en chlorophylle b, le géranylgeraniol qui a servi à la synthèse du phytol de la chlorophylle a doit se retrouver dans le phytol de la chlorophylle b. Dans ces conditions, une hypothèse possible est que la transformation chlorophylle a → chlorophylle b porte sur le noyau tétrapyrrolique séparé du groupe phytyle, et que le phytol de la chlorophylle b ne dérive pas nécessairement du phytol de la chlorophylle a.

Il y a là un fait troublant qui repose le problème du passage de la chlorophylle a à la chlorophylle b.

Néanmoins pour la première fois nous démontrons l'existence d'un métabolite en C₂₀ commun à la biosynthèse des caroténoïdes et du phytol des chlorophylles, ce qui explique les liens observés entre ces deux classes de pigments foliaires.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans les expériences décrites ci-dessus, nous avons utilisé du phytol et de l'isophytol Light, purifiés sur acide silicique.

Géranyllinalool et Géranylgeraniol Tritiés

Nous avons préparé le géranylgeraniol par transposition allylique du géranyllinalool,* d'après la technique de Ruzicka et Firmenich.²⁵ En milieu pyridinique, le géranyllinalool traité par le tribromure de phosphore donne le bromure de géranylgeranyle. L'acétate de géranylgeranyle obtenu en faisant agir l'acétate de potassium sur ce bromure, est purifié par chromatographie sur acide silicique et par distillation. Ses caractéristiques sont les suivantes: E_{0,01} = 132°; n_D²⁰ = 1,4880; poids moléculaire mesuré = 329 (332 calculé pour C₂₂H₃₆O₂). Son spectre infrarouge montre l'absence de bande —OH à 3300 cm⁻¹, la présence de la bande —C=O des esters à 1745 cm⁻¹ et de la bande du groupe CH₃—CO— à 1020 cm⁻¹. Une saponification de cet ester permet d'obtenir le géranylgeraniol que l'on chromatographie et que l'on distille: E_{0,01} = 140°, n_D²⁰ = 1,4980. Son spectre infrarouge correspond à celui d'un alcool diterpénique insaturé et présente les bandes —OH à 3300 cm⁻¹, C—O de CH₂OH à 1000 cm⁻¹ et CH₂—OH à 1240 cm⁻¹. La microchromatographie sur plaque d'acide silicique, l'indice de réfraction et la température d'ébullition montrent que cet alcool diterpénique est différent du géranyllinalool, du phytol et de l'isophytol. Il s'agit de géranylgeraniol pur (Trouvé: C 83,3; H 11,9—Calculé pour C₂₀H₃₄O: C 82,7; H 11,8%).

Le géranylgeraniol et le géranyllinalool ont été uniformément tritiés par échange à partir de tritium gazeux sous pression. Ils sont purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique (4,5 g d'adsorbant activé pour 100 mg d'alcool diterpénique avec le système de solvant: hexane:acétate d'éthyle 98:2.

* Le géranyllinalool nous a été aimablement fourni par Monsieur E. Lederer.

²⁵ L. Ruzicka et G. Firmenich, *Helv. Chim. Acta* 22, 392 (1939).

Les impuretés radioactives étant ainsi séparées, il peut rester une radioactivité labile, due à des atomes de ^3H facilement échangeables. Nous avons éliminé cette radioactivité labile en dissolvant chaque échantillon d'alcool tritié dans 10 ml de méthanol et en renouvelant 3 fois le solvant, jusqu'à radioactivité spécifique constante du soluté. A la fin de ces opérations, les alcools tritiés sont mis en émulsion dans le Tween 80 à 0,5% afin d'être infiltrés dans les feuilles.

Infiltration sous Vide des Émulsions d'Alcools Diterpéniques dans les Feuilles de Maïs

Les infiltrations sont faites à la base des premières feuilles excisées de 6 plantules de Maïs étiolées. Les feuilles sont excisées au-dessus de la gaine (longueur moyenne 12 cm). Chaque lot de feuilles est placé dans un tube à hémolyse qui contient 0,100 ml de suspension à infiltrer dans laquelle plonge la base de toutes les feuilles. Les tubes sont alors placés dans un dessiccateur, contenant P_2O_5 , où l'on fait le vide en évitant un dégazage brutal des vaisseaux ligneux des nervures foliaires. On laisse les feuilles sous vide pendant 10 minutes. On sort alors les tubes du dessiccateur et les feuilles sont éclairées (4500 lx) pendant 30 hr. La totalité de l'émulsion pénètre dans le système vasculaire des feuilles en deux heures. On ajoute alors 2 ml d'une solution nutritive minérale. Nous avons utilisé cette technique pour les expériences d'incorporation d'acétate $2-^{14}\text{C}$ de sodium ou de mévalonate $2-^{14}\text{C}$ de potassium en présence d'alcools diterpéniques non radioactifs. C'est également par cette méthode que nous avons fait pénétrer dans les feuilles le géranylgeraniol et le géranylinalool tritiés.

Le passage pendant 10 min dans une atmosphère desséchante et raréfiée ne provoque pas d'altérations visibles sur les feuilles étiolées. Mais au cours de cette infiltration, il est difficile de savoir quelle fraction des alcools diterpéniques peut passer des vaisseaux du bois jusque dans les cellules du parenchyme où ils sont métabolisés. Cette fraction est probablement très variable d'un essai à l'autre, ce qui peut expliquer la forte dispersion des résultats qui nous a conduit à faire de nombreuses répétitions.

Extraction, Séparation et Purification des Pigments

Après fixation des lots de feuilles (0,4 à 0,8 g) dans l'azote liquide, les pigments sont extraits par l'acétone.

Séparation des chlorophylles et du phytol. A partir d'une moitié de l'extrait acétonique, les chlorophylles *a* et *b* sont séparés sur colonne de cellulose,²⁶ après avoir été dosées par la méthode de MacKinney.²⁷ Les chlorophylles *a* et *b* sont identifiées par leur spectre dans l'éther éthylique et dans l'éthanol. La pureté de la chlorophylle *a* obtenue après chromatographie peut être estimée par son spectre infrarouge.¹⁶ Afin de déterminer les radioactivités spécifiques, les densités optiques des solutions éthanoliques (10 ml) des chlorophylles *a* et *b* sont immédiatement mesurées après la chromatographie à 650 m μ pour la chlorophylle *b* ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 397$) et à 665 m μ pour la chlorophylle *a* ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 817$).

Les solutions de chlorophylle *a* et de chlorophylle *b* dans l'éthanol sont saponifiées par 2 ml de KOH à 15%, au réfrigérateur (3°) pendant 1 nuit. Le phytol est extrait du mélange réactionnel par 3 fois 5 ml d'éther de pétrole. La solution étheropétrolique est lavée par 100 ml d'eau ce qui élimine l'éthanol en excès, et aussi le méthanol libéré lors de la saponification. La solution de phytol est ajustée à 10 ml. Le phytol a été caractérisé par comparaison avec un échantillon de phytol Light par chromatographie sur chromatoplastes d'acide silicique selon Demole et Lederer.⁷

²⁶ J. DURANTON, J. M. GALMICHE et E. ROUX, *Compt. Rend.* **246**, 992 (1958).

²⁷ G. MACKINNEY, *J. Biol. Chem.* **140**, 315 (1941).

Séparation des caroténoïdes.^{16,28} L'autre moitié de la solution acétonique est saponifiée : le β -carotène et la lutéine sont séparés par chromatographie sur colonne de cellulose et dosés.²⁸ La lutéine est alors purifiée sur colonne de CaCO_3 en solution benzénique : nous avons vérifié par microchromatographie sur acide silicique, l'absence d'impureté dans ce pigment ainsi purifié. Déjà après passage sur cellulose, la lutéine est complètement séparée des stérols qui pourraient la contaminer : β -sitostérol, agnostérol et lanostérol. La lutéine est reprise dans 10 ml d'éthanol et dosée par spectrophotométrie à 445 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$). Le β -carotène est rechromatographié sur colonne d'alumine activée : le développement de la colonne est commencé avec 30 ml d'éther de pétrole (40–60°), ensuite par 30 ml d'éther de pétrole contenant 3% d'éther éthylique. Le β -carotène sort de la colonne avec environ 100 ml d'éther de pétrole contenant 10% d'éther éthylique. Seule, la partie médiane de l'anneau est recueillie : le β -carotène est repris dans 5 ou 10 ml d'éther de pétrole et dosé par spectrophotométrie à 449 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2600$). Le β -carotène ainsi obtenu est pur. En effet il n'apparaît aucune tache révélable par KMnO_4 , SbCl_3 ou en lumière ultraviolette sur des chromatoplaques développées soit avec de l'hexane, soit avec de l'hexane contenant 15% d'acétate d'éthyle. Dans ces deux systèmes de solvants, le β -carotène extrait cochromatographié avec du β -carotène synthétique Hoffman-La Roche ne donne qu'une seule tache. *Les spectres d'absorption dans le visible et l'u.v. sont identiques à ceux du β -carotène synthétique : il en est de même des spectres infrarouges.*¹⁶ Enfin nous avons vérifié qu'une telle chromatographie sur alumine sépare complètement le squalène du β -carotène.¹⁶

Contrôle de l'Absence de Contamination du β -Carotène

Nous avons observé que pendant la première chromatographie des pigments sur colonne de cellulose, le géranylgeraniol et le géranylinalool se déplacent avec le β -carotène et se trouvent ainsi parfaitement séparés des chlorophylles et de la lutéine. En revanche le β -carotène peut être contaminé par un excès d'alcool diterpénique tritié. Aussi, *dans les expériences où les alcools infiltrés sont tritiés, nous avons poussé plus loin la purification du β -carotène après chromatographie sur alumine, en le précipitant après isomérisation par l'iode selon Kuhn et Lederer.*²⁹

En soumettant à l'ensemble de nos techniques de séparation un mélange de β -carotène (104 μg) et de géranylgeraniol tritié (197.572 coups/min) nous nous sommes assurés de l'absence de toute contamination du β -carotène (Tableau 9).

TABLEAU 9. SÉPARATION D'UN MÉLANGE DE β -CAROTÈNE ET GÉRANYLGERANIOL TRITIÉ

	Radioactivité retrouvée (en coups/min)	(%)
Mélange initial (éther de pétrole)	197.572	
Solution chromatographiée sur alumine	148.179	100
Anneau de β -carotène sur la colonne	240	0,16
Partie de tête	0	0
Partie médiane, après cristallisation	910	0,51
Partie de queue	335	0,23
Liquide de rinçage des cristaux		

²⁸ C. COSTES, *Ann. Agron. suppl.* **1A**, 35 (1958).

²⁹ R. KUHN et E. LEDERER, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **65**, 637 (1932).

Ces résultats prouvent qu'après précipitation du complexe iodé, le géranylgeraniol tritié en excès qui peut contaminer le β -carotène est complètement éliminé, et qu'il n'y a pas d'échange de ^3H conduisant à un marquage stable du β -carotène à partir du géranylgeraniol tritié.

Mesure des Radioactivités

Les comptages sont faits par scintillation liquide avec un compteur Tracerlab, LSC, 10 B. Après dosage, les solutions de pigments purifiés sont décolorées par la lumière u.v. pour éviter le phénomène d'extinction.

Le rendement du compteur est de 70 pour cent pour le ^{14}C et de 4,6 % pour les composés tritiés. Les comptages sont faits en triple pendant 10 min; ils sont reproductibles à $\pm 10\%$ près. Les radioactivités spécifiques sont mesurées à $\pm 12\%$ près dans les plus mauvaises conditions.

Extraction des Esters Phosphoriques d'Alcools Terpéniques

Nous avons adapté la technique de Goodman et Popjak.¹⁸ Cette technique consiste à broyer les feuilles en présence de collidine (de 5 à 10 ml par g de feuille) en refroidissant: afin d'inhiber les phosphatases, nous avons ajouté 20 mg de NaF au cours de cette extraction. L'extrait collidinique obtenu est agité avec 2 volumes d'éther éthylique et 3 fois 1 volume d'une solution 0,01 M de KHCO_3 : c'est une délipidation qui permet de rassembler les pigments liposolubles dans l'épiphase (éther + collidine). L'hypophase aqueuse, de couleur jaune, est évaporée à sec, à froid: le résidu brun est repris par de l'éthanol à 90% à une température voisine de 0°. Au cours de cette opération, les nucléotides se séparent des pyrophosphates de terpénone qui passent en solution dans l'éthanol. La solution éthanolique est alors évaporée et le résidu est repris par une solution 0,01 M de KHCO_3 (10 ml). Cette solution est alors soumise à une hydrolyse acide (CCl_3COOH à 5%) qui libère les alcools que l'on peut rassembler dans un faible volume d'hexane (0,1 ml à 2 ml) après neutralisation: c'est dans la solution hexanique P_2 qu'on recherche les alcools terpéniques par microchromatographie sur acide silicique.

Remerciements—Nous remercions vivement Monsieur le Professeur E. Lederer de ses conseils et de l'intérêt qu'il a porté à nos recherches, ainsi que de l'aide qu'il nous a donnée.