



ETUDE DES REMANIEMENTS LIPIDIQUES DES CELLULES VEGETALES EN CARENCE DE PHOSPHATE

Juliette Jouhet

► **To cite this version:**

Juliette Jouhet. ETUDE DES REMANIEMENTS LIPIDIQUES DES CELLULES VEGETALES EN CARENCE DE PHOSPHATE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. <tel-00011166>

HAL Id: tel-00011166

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00011166>

Submitted on 7 Dec 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : biologie

Présentée par

Juliette Jouhet

Le 25 novembre 2005

ETUDE DES REMANIEMENTS LIPIDIQUES DES CELLULES VEGETALES EN CARENCE DE PHOSPHATE

Directrice de thèse : Maryse Block

Composition du Jury :

Président : Christelle Breton

Rapporteur : Elizabeth Blée

Rapporteur : Alain Zachowski

Examineur : Sébastien Mongrand

Examineur : Jacques Joyard

Examineur : Maryse Block

Thèse préparée au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale
CEA-Grenoble

A Fabien,

Remerciements

Je remercie chaleureusement Monsieur Jacques Joyard, directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Physiologie cellulaire et pour son oeil critique sur mon travail.

Merci également à Madame Marylin Vantard qui m'a renouvelé sa confiance après avoir pris la direction du laboratoire.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mesdames Christelle Breton, professeur à l'Université Joseph Fourier, Elizabeth Blée, directeur de recherche au CNRS à Strasbourg, Messieurs Alain Zachowski, directeur de recherche au CNRS à Paris, Sébastien Mongrand, chargé de recherche au CNRS à Bordeaux, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Je remercie du fond du cœur Madame Maryse Block, directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir encadrée dans cette thèse. Elle s'est énormément investie dans mon travail, et j'aurais beaucoup de mal à résumer en quelques lignes tout ce qu'elle m'a appris scientifiquement et humainement.

Merci à Monsieur Eric Maréchal, pour m'avoir soutenue tout au long de cette thèse, pour m'avoir supportée dans la dernière ligne droite. Tous ces travaux n'auraient pu s'effectuer sans ses conseils avisés.

Un grand merci aussi à Monsieur Olivier Bastien, mon partenaire de bureau, sans qui la thèse n'aurait pas été aussi amusante.

Merci à Richard Bligny, Barbara Baldan, Marie-Christine Thibaud et Julie Misson pour leurs collaborations.

Toutes ces données n'auraient pu être collectées sans la participation quotidienne ou épisodique de Catherine Albrieux, Julia Revol, Emmanuelle Dubots, Bernadette Gambonnet et Anne-Marie Boisson.

Merci à tous les thésards et post-doc du laboratoire, passés ou encore présents, sans qui je n'aurais pu avoir toutes ces conversations passionnantes.

J'exprime toute ma sympathie à tous les membres du laboratoire PCV, pour tous les moments de détente au coin café !

Je ne voudrais surtout pas oublier Florence Courtois, Maître de conférence à l'université Joseph Fourier, qui m'a soutenue tout au long du monitorat et m'a fait découvrir l'univers passionnant de l'enseignement et Madame Malavieille, mon institutrice de CM1, qui m'a fait découvrir le monde des plantes que je ne veux plus quitter depuis...

Enfin, merci Fabien pour m'avoir supportée pendant toute ces années et pour m'encourager dans cette voie malgré tous les efforts que cela demande.

Sommaire

Introduction	1
Données bibliographiques : les synthèses lipidiques dans la cellule végétale et la mobilité lipidique associée	4
I. SYNTHÈSE DES GLYCEROLIPIDES MEMBRANAIRES	4
<i>A- Biosynthèse des précurseurs des glycérolipides membranaires</i>	5
1. Synthèse des acides gras	5
2. Biosynthèse de l'acide phosphatidique.....	7
a) Voie procaryote de synthèse d'acide phosphatidique	7
b) Voie eucaryote de synthèse d'acide phosphatidique.....	8
3. Synthèse du diacylglycérol.....	10
4. Synthèse du CDP-diacylglycérol.....	11
<i>B- Synthèse des phospholipides</i>	12
1. Synthèse des phospholipides dérivés du CDP-diacylglycérol.....	13
a) Phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol	13
b) Phosphoinositides	14
c) Phosphatidylsérine.....	14
2. Synthèse des phospholipides dérivés du diacylglycérol	15
a) Phosphatidyléthanolamine.....	15
b) Phosphatidylcholine.....	16
4. Echange et catabolisme des têtes polaires	17
a) Les phospholipases C	17
b) Les phospholipases D	19
<i>C- Synthèse des glycolipides</i>	20
1. Transfert du DAG eucaryote vers les plastes	20
2. Synthèse du sulfolipide	22
3. Synthèse du monogalactosyldiacylglycérol.....	23
4. Synthèse du DGDG	25
II. TRAFIC LIPIDIQUE	26
<i>A- Homéostasie lipidique des compartiments membranaires</i>	26
<i>B- Mouvements flip-flop</i>	27
1. Les flippases énergie-indépendantes	27
2. Les translocases énergie-dépendantes.....	28
<i>C- Transfert de lipides par l'intermédiaire de vésicules</i>	29
1. Voie sécrétrice.....	29
a) Echanges entre le réticulum et le Golgi	32
b) Transfert vers les vacuoles.....	33
c) Transfert vers la membrane plasmique.....	34
d) Endocytose et exocytose	36
2. Transfert de l'enveloppe vers les thylacoïdes.	37
<i>D- Transfert par contact membranaire</i>	38
1. Zones de contact intermembranaires.	38
2. Les protéines de transfert de lipides ou LTP.	40
III. REPONSE INTEGREE DU METABOLISME DES LIPIDES CHEZ LA PLANTE EN CARENCE DE PHOSPHATE	44
<i>A- Le phosphate dans la plante</i>	44
1. Disponibilité du phosphate dans le sol	44

2. Le transport du phosphate.....	45
a) Transport du phosphate dans la plante	45
b) Transport du phosphate au sein de la cellule	46
3. Homéostasie du phosphate dans la cellule	47
B- Le signal phosphate	48
1. La perception du manque de phosphate.....	48
2. Transduction du signal	49
C- Les réponses de la plante à une carence de phosphate.....	50
1. Réponses morphologiques.....	50
2. Réponses métaboliques et physiologiques	51
a) Acquisition du phosphate	51
b) Adaptation du métabolisme intracellulaire.....	51
3. Modifications du métabolisme des lipides.	54
a) Concomitance de la chute de PG et de l'augmentation de SQDG	54
b) Concomitance de la chute de PC et de l'augmentation de DGDG	55
 Matériel et Méthodes.....	 58
I. MATERIEL VEGETAL.....	58
A- Cultures de cellules.....	58
1. Cellules d'érable sycomore (<i>Acer pseudoplatanus</i>)	58
2. Cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
B- Culture de plantes entières	59
1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
2. Pois (<i>Pisum sativum</i>).....	59
II. PREPARATIONS DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES.....	60
A- Préparation d'extraits cellulaires	60
B- Préparation de fractions mitochondriales	60
C- Préparation de fractions chloroplastiques	61
III. ANALYSE DE LIPIDES	61
A- Extraction de lipides	61
1. Extraction selon Bligh et Dyer.....	61
2. Extraction selon Folch	61
B- Séparation et dosage des lipides.....	62
1. chromatographie sur couche mince (CCM).....	62
a) Séparation des principaux lipides.....	62
b) Séparation du DAG.....	63
2. Méthanolyse.....	63
3. Chromatographie en phase gazeuse.....	63
C- Analyse des lipides par RMN	63
1. Dosage des phospholipides par RMN du ³¹ P	63
2. Caractérisation des galactolipides par RMN du ¹ H.....	64
IV. ANALYSE DES PROTEINES	64
A- Dosage des protéines.....	64
B- Analyse des protéines par électrophorèse	65
C- Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	65
D- Immuno-marquage.....	65
V. QUANTIFICATION DE PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES	66

A-	<i>Quantification de l'activité de synthèse de galactolipides</i>	66
B-	<i>Dosage du phosphate inorganique intracellulaire</i>	67
VI.	TECHNIQUES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES	67
A-	<i>Techniques d'analyse de plants d'Arabidopsis thaliana mutés par insertion</i>	67
1.	Extraction d'ADN génomique	67
2.	Amplification in vitro de fragments d'ADN	68
B-	<i>Techniques de clonage en système procaryote</i>	68
1.	Souches bactériennes utilisées	68
2.	Vecteurs d'expression utilisés	69
3.	Extraction de plasmides présents dans les bactéries	69
4.	Extraction de fragments d'ADN présents dans un gel d'agarose	69
5.	Insertion des ADNc dans les vecteurs	70
6.	Transformation des bactéries	70
VII.	EXPRESSION DE PROTEINES FUSIONNEES A LA GFP.....	71
A-	<i>Transformation par biolistique et expression transitoire chez le pois</i>	71
B-	<i>Transformation et expression stable chez Arabidopsis thaliana</i>	72
VIII.	ANALYSE PAR MICROSCOPIE.....	72
A-	<i>Visualisation de l'immunoagglutination d'organites</i>	72
B-	<i>Visualisation par épifluorescence indirecte sur cellules d'Arabidopsis</i>	72
C-	<i>Visualisation des structures membranaires subcellulaires par microscopie électronique en transmission</i>	73
Remaniement lipidique de la cellule végétale en carence de phosphate		75
I.	EVOLUTION DE LA QUANTITE EN ACIDE GRAS DES CELLULES LORS DE L'ETABLISSEMENT DE LA CARENCE DE PHOSPHATE	75
II.	ANALYSE DES LIPIDES CELLULAIRES AU COURS DE LA CARENCE DE PHOSPHATE.....	77
A-	<i>Composition lipidique de suspensions cellulaires au cours de la carence de phosphate</i>	77
1.	Composition lipidique des cellules d'érable	77
2.	Composition lipidique des cellules d'Arabidopsis thaliana	80
B-	<i>Composition en acide gras des lipides au cours de la carence de phosphate</i> ... 81	
1.	Evolution de la composition en acide gras des différents lipides au cours de la carence de phosphate	81
2.	Evolution de la répartition du C16:0 dans les différents lipides dans des cellules d'érable au cours de la carence de phosphate.	84
III.	DISCUSSION	85
A-	<i>Influence de l'activité des enzymes de synthèse des galactolipides sur la composition en acide gras des galactolipides</i>	86
1.	Les particularités des DGDG synthases et leur incidence sur la synthèse du DGDG	86
2.	Les caractéristiques cinétiques des MGDG synthases et leur incidence sur les synthèses de MGDG	88
B-	<i>Approvisionnement en DAG des plastes</i>	89

Transfert de DGDG vers des membranes non plastidiales en carence de phosphate 92

I. LOCALISATION DU DGDG EN CARENCE DE PHOSPHATE 92

II. TRANSFERT DU DGDG DES CHLOROPLASTES VERS LES MITOCHONDRIES EN CARENCE DE PHOSPHATE 95

A- Purification de mitochondries et détermination de la présence de DGDG en carence de phosphate..... 95

1. Caractérisation des fractions mitochondriales purifiées..... 95

2. Analyse des lipides totaux de cellules et de fractions mitochondriales d'*Arabidopsis*.. 98

3. Agglutination des mitochondries carencées en phosphate par l'anticorps anti-DGDG 101

B- Structure et origine du DGDG mitochondrial en carence de phosphate 103

1. Composition en acide gras du DGDG 103

2. Structure de la tête polaire du DGDG 104

3. Localisation de la synthèse des galactolipides en carence de phosphate 106

III. TRANSFERT DU DGDG DES PLASTES VERS LES MITOCHONDRIES PAR CONTACT 108

A- Augmentation des zones de contact chloroplastes-mitochondries en carence de phosphate 108

B- Analyse des domaines de l'enveloppe des chloroplastes..... 110

C- Transfert in vitro du DGDG de l'enveloppe des plastes vers les mitochondries 113

IV- DISCUSSION 115

Identification de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en carence de phosphate 120

I. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE PLANTES D'*ARABIDOPSIS THALIANA* AU COURS DE LA CARENCE DE PHOSPHATE..... 120

A- Validité des conditions et du matériel d'étude..... 121

*B- Résultats des analyses transcriptomiques du génome d'*Arabidopsis thaliana* 122*

1. Analyse globale des expressions des gènes en carence de phosphate 122

2. Modification transcriptionnelle des gènes impliqués dans les réponses élémentaires de la plantes en carence de phosphate 129

a) Analyse des gènes intervenant dans l'acquisition du phosphate..... 129

b) Identification de gènes intervenant dans le métabolisme intracellulaire 130

C- Sélection des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des lipides 133

II. ETUDE D'UN MUTANT NUL DU GENE *PLDζ2*..... 136

*A- Caractérisation de la *PLDζ2* et identification d'un mutant knock-out..... 136*

*B- Etude du rôle possible de la *PLDζ2*..... 137*

1. Analyse du phénotype et de la teneur en phosphate de *pldζ2*..... 137

2. Analyse de lipides du mutant *pldζ2*..... 140

III. DISCUSSION 142

Conclusion 146

Bibliographie	149
Annexe	161
PUBLICATIONS	161
COMMUNICATIONS.....	161

Abréviations

ACCCase : complexe Acétyl-CoA Carboxylase
ACP : Acyl Carrier Protein
ACS : Acétyl-CoA Synthétase
AP : Acide Phosphatidique
BCCP1 : Biotin Carboxyl Carrier Protein 1 (protéine du complexe ACCase)
C16 : Acide gras à 16 atomes de carbone
C18 : Acide gras à 18 atomes de carbone
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CDP : Cytidine Diphosphate
CoA : Coenzyme A
CTP : Cytidine Triphosphate
DAG : Diacylglycérol
DGDG : Digalactosyldiacylglycérol
DPG : Diphosphatidylglycérol
EGTA : Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther) N, N, N', N'- tétraacétique
FAS : Fatty Acid Synthase
Gal : Galactose
Glc : Glucose
HPPK-DHPS : Dihydroptérine Pyrophosphokinase-Dihydroptéroate Synthase
IEP37 : Protéine de la membrane interne de l'enveloppe des plastes de 37 kDa
LB : Luria-Broth
LHCII : Light Harvesting Complex II
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
MOPS : Acide N-morpholino-3-propane sulfonique
MS : Murashige et Skoog
NAD9 : Sous-unité 9 du complexe I NADH deshydrogénase de la membrane interne des mitochondries
OEP21 : Protéine de la membrane externe de l'enveloppe des plastes de 21 kDa
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PS : Phosphatidylsérine
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SAB : Sérumalbumine bovine
Sq : Sulfoquinovose
SOB : Milieu de culture bactérienne
SOC : SOB + glucose
SQDG : Sulfoquinovosyldiacylglycérol
TOM : Translocator Outer Membrane
TOM20 : Protéine de 20 kDa de la membrane externe des mitochondries appartenant au complexe TOM
TOM40 : Protéine de 40 kDa de la membrane externe des mitochondries appartenant au complexe TOM
UDP : Uridine Diphosphate

Introduction

Introduction

Les plantes vivent dans un milieu dont les paramètres physiques (humidité, température, luminosité, qualité du sol) et les interactions avec les organismes environnants varient à l'échelle de l'heure, de la journée et des saisons. Cet environnement extérieur, avec lequel la plante établit un équilibre physico-chimique, exerce continuellement une pression sur son métabolisme. Le changement brutal de facteurs du milieu peut être à l'origine d'un stress. En multipliant les réponses possibles aux différents stress, la diversité et la plasticité des voies métaboliques confèrent aux plantes une grande souplesse dans leur faculté d'adaptation.

Le phosphate est un nutriment nécessaire mais sa disponibilité est limitée dans les sols. Il n'est donc pas rare que le phosphate inorganique, capté par les racines, devienne un facteur limitant de la croissance. Selon les besoins, les plantes ont développé plusieurs stratégies permettant d'une part d'augmenter l'acquisition de phosphate et d'autre part d'améliorer la gestion de ses réserves. Dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, un tiers du phosphore est contenu dans les phospholipides. Les lipides prépondérants de la cellule végétale, les glycolipides plastidiaux, ne contiennent pas de phosphate (Figure 1). La carence de phosphate provoque une dégradation importante des phospholipides (Rebeillé, 1983) et des travaux récents montrent que la biosynthèse des glycolipides plastidiaux est aussi bouleversée au cours de cette carence (Essigman *et al.*, 1998 ; Härtel *et al.*, 1998 ; Awai *et al.*, 2001).

Existe-t-il une relation entre les remaniements de glycolipides, non phosphatés, et les phospholipides au cours de la carence de phosphate ? Si ces remaniements sont orchestrés, quel en est le schéma intégré ? Pour répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à la nature et à la localisation membranaire des remaniements lipidiques. La composition lipidique des membranes cellulaires est relativement bien conservée d'un tissu à un autre et d'une plante à une autre (Tableau 1). D'une part, les glycéroglycolipides, i.e. sulfolipides et galactolipides, sont décrits comme étant présents uniquement dans les plastes et d'autre part, les phospholipides sont décrits comme les constituants principaux des membranes extraplastidiales. La phosphatidyléthanolamine (PE) est exclue des membranes plastidiales ; elle est donc un marqueur privilégié de contaminations lors de préparation de fraction d'enveloppe ou de thylacoïdes. Le diphosphatidylglycérol (DPG) est localisé uniquement

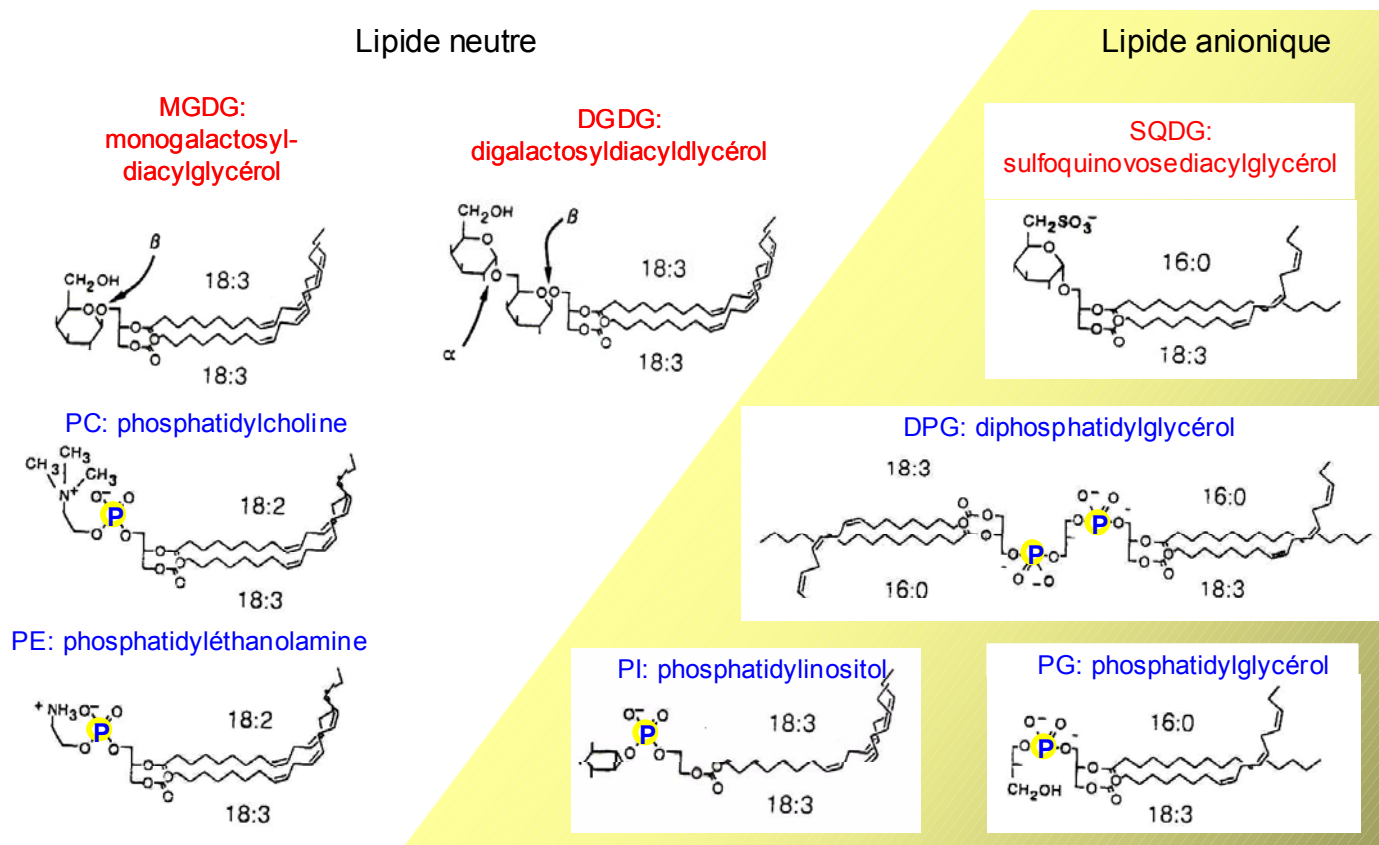


Figure 1 : Structure des principaux glycérolipides de plantes. En rouge sont représentés les glycolipides : le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) neutre et s'organisant en structure cristalline hexagonale II, le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) neutre et formant des bicouches et le Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) anionique et formant des bicouches. En bleu les phospholipides avec leurs atomes de phosphore : la phosphatidylcholine (PC) neutre et formant des bicouches, la phosphatidyléthanolamine (PE) neutre et préférentiellement de structure hexagonale II, le diphosphatidylglycérol (DPG) ou cardiolipide anionique et hexagonal II, le phosphatidylglycérol (PG) anionique et formant des bicouches et le phosphatidylinositol (PI) anionique et formant des bicouches.

Membranes	Phosphoglycérolipides					Glycoglycérolipides			stérols	Glyco-sphingolipides	
	PC	PE	PG	PI	PS	DPG	MGDG	DGDG			SQDG
Endomembranes											
Réticulum +Golgi	43-48	23-26	6	6	3					4-15	
Tonoplaste	15-28	15-28	2	5-9	2					14-43	12-17
Membrane plasmique	8-36	9-32	1-5	1-6	1-10					5-60	6-30
Chloroplastes											
Membrane externe	32		10	5			17	30	6		
Membrane interne			9	1			55	30	5		
Thylacoïdes			7	1			58	27	7		
Mitochondries											
Membrane externe	52	22	3	10						13	
Membrane interne	37	33	2	4		11				13	

Tableau 1 : Composition lipidique des membranes de cellules végétales d'après Moreau *et al.*, 1998. L'analyse des endomembranes est présentée par Hartmann et Benveniste (1987), Tavernier *et al.* (1993), et Bertho *et al.* (1991). L'analyse des membranes plastidiales et mitochondriales ont été effectuées respectivement par Block *et al.* (1983) et Douce (1985).

dans la membrane interne des mitochondries, et permet ainsi de quantifier la proportion de mitochondries dans une cellule. Les stérols et glycosphingolipides sont localisés essentiellement dans le tonoplaste et la membrane plasmique et participent vraisemblablement à l'organisation de domaines particuliers tels que les rafts. En carence de phosphate, mis à part la baisse générale des phospholipides et l'augmentation des glycolipides, très peu de données étaient connues sur les modifications de la composition lipidique de chaque compartiment. De plus, comme les phospholipides constituent une part de la réserve de phosphate de la plante, l'hypothèse de leur dégradation directement compensée par des glycolipides non phosphorés dans l'ensemble des membranes a été très vite proposée, sans qu'elle soit formellement démontrée. Nous avons donc entrepris une étude des remaniements lipidiques des cellules végétales lors de la carence de phosphate, afin de préciser et de comprendre cette articulation possible entre dégradation de phospholipides et accumulation de glycolipides.

L'état des connaissances sur la synthèse des lipides, leur mobilité au sein de la cellule et leur implication dans l'ensemble des mécanismes mis en oeuvre par la plante en réponse à la carence de phosphate sont exposés dans la partie bibliographique. Nos résultats expérimentaux sont ensuite présentés en abordant (1) la mise en place des remaniements lipidiques lors de l'installation de la carence de phosphate, (2) le transfert du DGDG vers les membranes extraplastidiales et (3) l'identification d'acteurs potentiellement impliqués dans ces remaniements.

Données Bibliographiques

Données bibliographiques : les synthèses lipidiques dans la cellule végétale et la mobilité lipidique associée

Le phosphate est un macro-élément essentiel pour la croissance des plantes et leur développement ; cependant, dans la plupart des sols, celui-ci est peu disponible. Les plantes ont adapté des mécanismes de protection, diminuant leur consommation en phosphate et mobilisant leurs réserves. Les phospholipides contiennent une part importante du phosphate intracellulaire et constituent à ce titre une réserve de phosphate, dans laquelle la cellule pourrait puiser en gérant le déficit de lipides polaires au moyen des glycolipides. Dans ce chapitre, nous présentons l'état des connaissances sur les synthèses de lipides, la localisation de ces synthèses et la mobilité des lipides au sein de la cellule, en tant que système apte à répondre à la carence de phosphate.

I. Synthèse des glycérolipides membranaires

Les lipides membranaires sont essentiellement des glycérolipides composés d'un squelette tricarboné, dérivé du glycérol, sur lequel s'insèrent deux acides gras en position *sn-1* et *sn-2* et une tête polaire en position *sn-3* (Figure 2). La base commune aux glycérolipides correspond donc au squelette diacylglycérol (DAG)

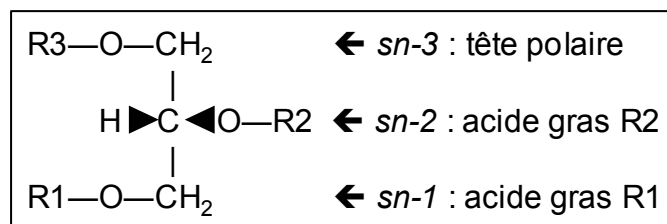


Figure 2 : Nomenclature *sn-* (stereospecific number) du glycérol dans les glycérolipides. Dans la suite de ce mémoire, les acides gras seront qualifiés par le nombre de carbones (C16 ou C18) et de désaturation (C18:0, C18:1, C18:2 ou C18:3).

Les glycérolipides sont synthétisés à partir de glycérol-3-P sur lequel sont estérifiés deux acides gras. L'acide phosphatidique (AP), ainsi formé, sert de précurseur à la néosynthèse de tous les glycérolipides (Figure 3). Les phospholipides et les glycolipides sont générés à partir du diacylglycérol ou du CDP-diacylglycérol, dérivant de l'AP. Dans cette partie, nous présentons la synthèse des différents précurseurs puis des lipides polaires qui en dérivent.

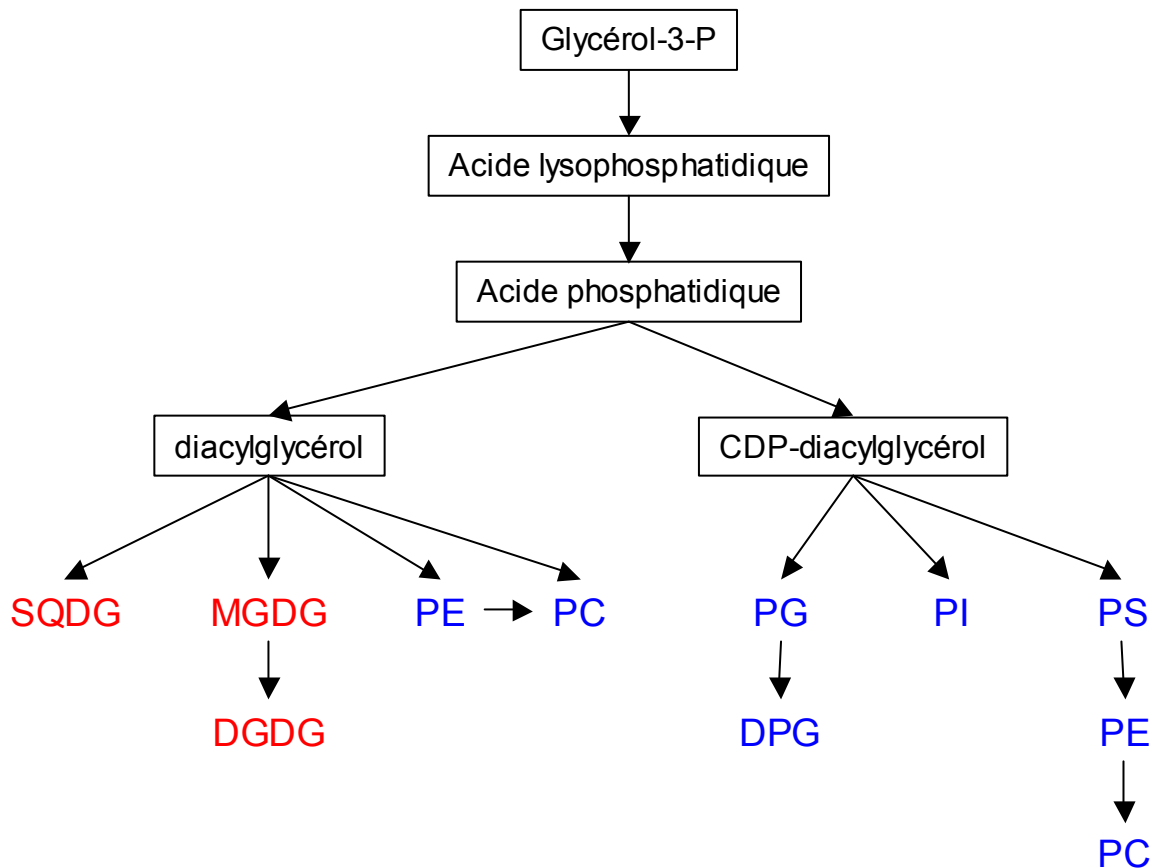


Figure 3 : Voies potentielles de synthèse des glycérolipides. Les glycolipides sont indiqués en rouge, les phospholipides en bleu et les précurseurs de ces lipides sont encadrés.

A- Biosynthèse des précurseurs des glycérolipides membranaires

Les glycérolipides polaires résultent de l'assemblage d'acides gras, de glycérol et de têtes polaires. Cette synthèse s'effectue en plusieurs étapes et dans différents compartiments.

1. Synthèse des acides gras

Le stroma est le site de production prépondérant des acides gras. Cette synthèse, résumée sur la Figure 4, dépend de l'approvisionnement des plastes en substrats carbonés provenant du cytosol, métabolisés ensuite en acétyl-CoA à l'intérieur du stroma. Elle s'effectue en deux étapes, une phase d'initiation utilisant de l'acétyl-CoA et une phase d'élongation correspondant à l'ajout de deux carbones par le donneur malonyl-CoA. La synthèse du malonyl-CoA est catalysée par une acétyl-CoA carboxylase (ACCase) dépendante de l'hydrolyse d'ATP. La plupart des ACCases plastidiales sont de type II, correspondant à un complexe multienzymatique analogue à celui décrit chez les procaryotes. L'ACCase de type I, une enzyme multifonctionnelle semblable à celles trouvées chez la levure et les mammifères, est présente aussi dans les plastes mais son activité semble minoritaire (Rawsthorne, 2002).

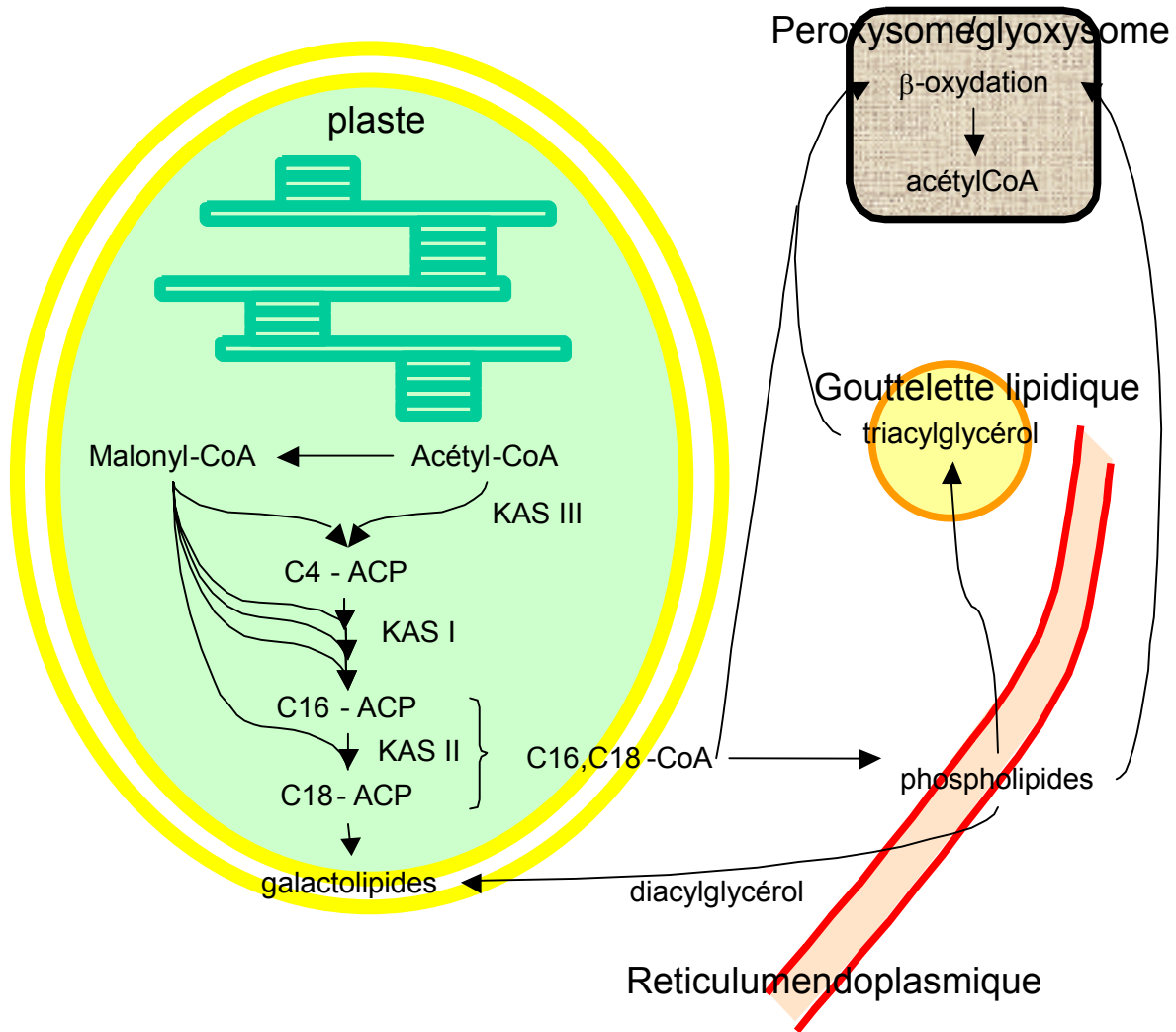


Figure 4 : Schéma simplifié du flux de carbone à travers le métabolisme des acides gras et des lipides. Les acides gras sont produits essentiellement dans les plastes et utilisés dans chaque compartiment cellulaire. Des mécanismes de transfert et des communications intracellulaires permettent le contrôle de la production et de cette utilisation d'acides gras.

La Malonyl-CoA:ACP malonyltransférase catalyse le transfert du squelette malonyl sur l'Acyl Carrier Protein (ACP), produisant ainsi le malonyl-ACP qui est le substrat permettant des élongations séquentielles de deux carbones catalysées par le complexe de l'acide gras synthase (fatty acid synthase ou FAS), constitué de quatre enzymes (β -cétol-ACP-synthase ou KAS, β -cétol-ACP-réductase, β -hydroxyacyl-ACP déshydratase, énoyl-ACP-réductase). La première réaction du complexe FAS est catalysée par KAS III, qui condense l'acétyl-CoA avec le malonyl-ACP. Les condensations suivantes sont catalysées par KAS I (C4 à C16) et KAS II (C16 à C18) (Figure 4). L'ensemble de ces réactions produit un acyl-ACP de 16 ou 18 atomes de carbones, qui peut être hydrolysé par des acyl-ACP thioestérases, produisant un acide gras libre. Les acides gras sont disponibles pour le métabolisme extraplastidial sous forme d'acyl-CoA par des processus de transfert que nous décrirons plus loin.

Les acides gras couplés à l'ACP ou au CoA sont les substrats de nombreuses voies métaboliques (Rawsthorne, 2002) telles que les synthèses des glycérolipides de l'enveloppe des plastes et du réticulum endoplasmique, la production de réserve de triglycérides, la synthèse des cires et des cutines après élongation des acides gras (Kunst et Samuels, 2003) ou encore la formation des phyto-oxylipines, sous leur forme libre, après transformations oxydatives (pour revue, voir Blée, 2002). Bien que la majorité des gènes intervenant dans la synthèse des acides gras soit aujourd'hui identifiée, la régulation du schéma métabolique menant à la formation des acides gras n'est pas encore complètement connue. Nous connaissons mal, par exemple, les activations ou inhibitions partielles des gènes responsables de la biosynthèse des acides gras, tels que l'ACCase de type II, qui mènent à une altération de la quantité d'acide gras et à une modification du rapport C16/C18 (Thelen et Ohlrogge, 2002).

2. Biosynthèse de l'acide phosphatidique

Les données cinétiques *in vitro* d'incorporation d'acétate dans les lipides plastidiaux montrent que les plastes isolés peuvent synthétiser des glycolipides contenant un squelette diacylglycérol (DAG) C18/C16 mais sont incapables de synthétiser de l'AP et du DAG contenant uniquement du C18. Il existe donc deux voies de synthèse de l'AP, l'une dans les plastes et l'autre dans le réticulum.

Suivant les lieux de synthèse de l'AP, la distribution des acides gras est différente. Deux grands groupes structuraux de lipides ont été ainsi définis. Le premier possède en position *sn-2* des acides gras en C16 uniquement, la position *sn-1* du glycérol pouvant être estérifiée par des acides gras en C18 ou en C16. Il est dit de structure "procaryote" par analogie avec la composition en acides gras des glycérolipides des cyanobactéries (Heinz, 1977). Le second groupe possède des acides gras en C18 en position *sn-2* et est dit de structure "eucaryote", car cette structure est typique des glycérolipides extraplastidiaux eucaryotes, tels que la PE.

a) Voie procaryote de synthèse d'acide phosphatidique

Les acyl-ACPs présents dans le stroma des plastes sont successivement transférés sur un glycérol-3-phosphate en position *sn-1* puis en position *sn-2* de l'acide lysophosphatidique (lyso-AP). La première enzyme de cette voie, la glycérol-3-phosphate acyltransférase, qui produit le lyso-AP, est étroitement associée à l'enveloppe (Joyard et Douce, 1977) et catalyse préférentiellement le transfert d'un acyl du C18:1-ACP à la position *sn-1* du glycérol (Frentzen *et al.*, 1983). La protéine identifiée responsable de cette activité, ATS1 ou ACT1, a effectivement une spécificité plus importante pour les acyls à 18 atomes de carbone (Yokoi *et*

al., 1998) et le mutant knock-out correspondant (gène At1g32200) conduit à la perte de la synthèse des glycérolipides de structure procaryote. Trois isoformes de cette enzyme ont été répertoriées chez les plantes ; elles diffèrent par leur localisation (chloroplastique, cytosolique et mitochondriale) et par leur spécificité pour les chaînes des acides gras (Nishida *et al.*, 1987 ; 2000 ; Murata et Tasaka, 1997).

Le lyso-AP est acylé en position *sn-2* générant l'AP suivant une réaction catalysée par une 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase, présente dans l'enveloppe des chloroplastes (Joyard et Douce, 1977) et des plastes non chlorophylliens (Alban *et al.*, 1989). Dans les chloroplastes d'épinard, cette activité a été détectée à la fois dans les membranes interne et externe de l'enveloppe (Block *et al.*, 1983). Cette enzyme transfère préférentiellement un acide gras C16:0 en position *sn-2* à la différence des 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférases non plastidiales qui ont une meilleure affinité pour des acides gras en C18 (Frentzen *et al.*, 1983). La spécificité de l'enzyme du stroma ne permet donc pas la formation d'AP et de DAG contenant des acides gras en C18 en position *sn-2* du glycérol, expliquant ainsi l'incapacité des plastes à synthétiser du DAG de structure eucaryote. Une forme plastidiale de l'enzyme spécifique du C16:0 a été identifiée chez *Brassica napus* (BAT2) (Bourgis *et al.*, 1999) et chez *Arabidopsis* (ATS2) (Yu *et al.*, 2004). La protéine ATS2 a été identifiée par analyse protéomique dans les membranes de l'enveloppe aussi bien chez l'épinard que chez *Arabidopsis* (Ferro *et al.*, 2002, 2003). L'inactivation du gène *ats2*, correspondant au locus At4g30580, d'*Arabidopsis* provoque la mort de l'embryon, au stade de développement correspondant à la formation des chloroplastes (Yu *et al.*, 2004), démontrant l'importance vitale de cette enzyme.

L'AP produit est à l'origine de la synthèse du PG plastidial et des glycolipides contenant du C16 en position *sn-2*.

b) Voie eucaryote de synthèse d'acide phosphatidique

L'AP de structure eucaryote est synthétisé à partir d'acyl-CoA présent dans le cytosol (Williams *et al.*, 2000). Cet acyl-CoA est généré à partir des acides gras synthétisés dans les plastes. Il existe donc un processus de transfert entre les plastes et le cytosol, encore mal connu à ce jour (Figure 5).

L'export des acides gras des plastes vers le cytosol passe par un acide gras libre et utilise un mécanisme comprenant une acyl-ACP thioestérase et une acyl-CoA synthétase (Joyard et Stumpf, 1980 ; Pollard et Ohlrogge, 1999). Le modèle actuel propose que les acyl-ACPs soient hydrolysés par les acyl-ACP thioestérases du stroma, décrites précédemment.

Les acides gras ainsi libérés sont ensuite transférés à la membrane externe de l'enveloppe des plastes, par un processus encore méconnu, où ils seraient réactivés en acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase (ACS) (Figure 5) (Koo *et al.*, 2004). Un transporteur potentiel d'acide gras a été identifié dans le génome d'*Arabidopsis* : At1g54350 appartenant à la famille des transporteurs ABC. Cette protéine pourrait transporter les acides gras jusqu'à l'ACS (Beisson *et al.*, 2003) de la membrane externe de l'enveloppe (Block *et al.*, 1983). Des zones de contacts ont été observées entre les membranes interne et externe de l'enveloppe (voir par exemple, Douce et Joyard, 1990), et pourraient être le site des interactions entre l'acyl-ACP thioestérases et l'ACS.

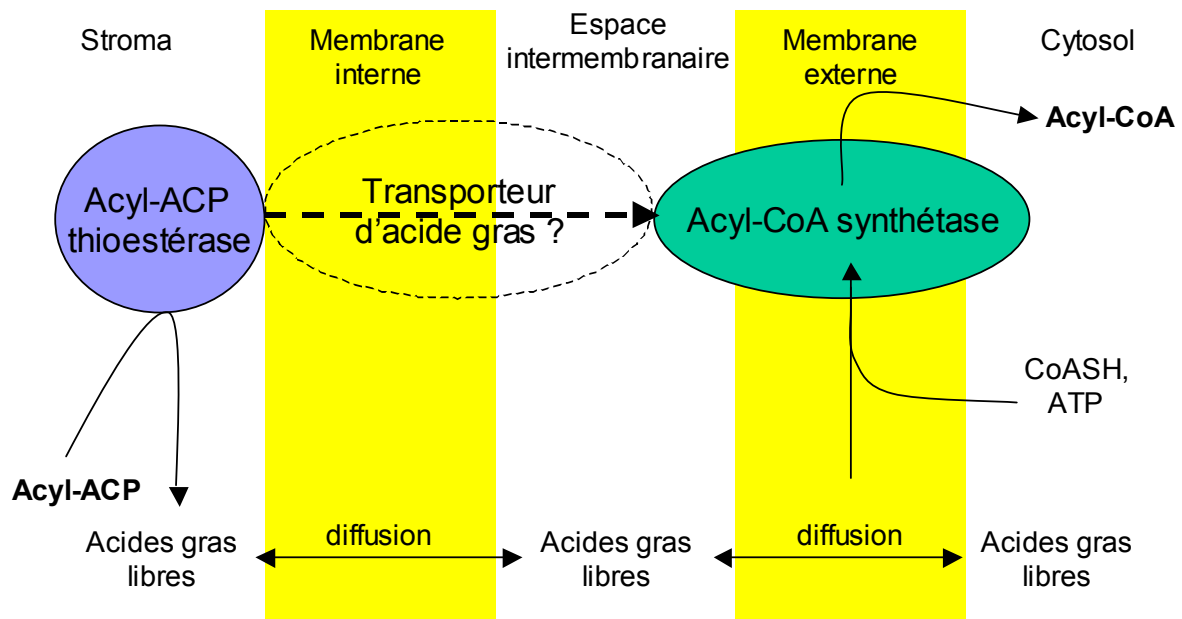


Figure 5 : Schéma de l'export des acides gras des plastes vers le cytosol d'après Koo *et al.*, 2004. Deux modèles simplifiés sont présentés : la voie la plus lente s'effectue par simple diffusion, et la plus rapide par un transporteur d'acide gras.

Aujourd'hui, neuf ACS d'acide gras à longue chaîne carbonée d'*Arabidopsis thaliana* ont été clonées et caractérisées (Tableau 2) (Shockey *et al.*, 2002). Dans cette famille, l'isoforme LACS9 est adressée à l'enveloppe des plastes et est responsable de 10 % de l'activité ACS du chloroplaste. Bien que d'autres isoenzymes contribuent à l'activation des acides gras au cours de leur export, LACS9 est une ACS prépondérante des plastes (Schnurr *et al.*, 2002).

L'acyl-CoA est utilisé pour synthétiser de l'AP à l'extérieur des plastes, majoritairement dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans les mitochondries qui sont aussi capables de synthétiser une partie de leurs lipides (Frentzen *et al.*, 1990). L'acyl couplé au coenzyme A est tout d'abord transféré sur du glycérol-3-phosphate par une glycérol-3-phosphate acyltransférase. Cette activité présente dans le réticulum ne possède pas de

spécificité particulière pour les acides gras, utilisant aussi bien du C16:0-CoA que du C18:1-CoA. Par contre, l'activité 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase, qui transfère un acyl-CoA sur le lyso-AP, est spécifique du C18:1-CoA, et produit de ce fait l'AP contenant uniquement du C18 en position *sn*-2 du glycérol (Frentzen, 1990). Les enzymes porteuses de ces deux activités n'ont pas encore été caractérisées moléculairement dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Beisson et al., 2003).

Activité	EC	Locus Arabidopsis	Protéine	Caractérisation	TM	Localisation
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At1g77590	LACS9	Expression <i>in vitro</i>	0	E
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At1g49430	LACS2	Expression <i>in vitro</i>	0	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At1g64400	LACS3	Expression <i>in vitro</i>	0	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At2g04350	LACS8	Expression <i>in vitro</i>	2	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At2g47240	LACS1	Expression <i>in vitro</i>	0	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At4g11030	LACS5	Expression <i>in vitro</i>	0	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At4g23850	LACS4	Expression <i>in vitro</i>	0	-
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At3g05970	LACS6	Expression <i>in vitro</i>	0	perox
Acyl-CoA synthétase	6.2.1.3	At5g27600	LACS7	Expression <i>in vitro</i>	0	perox

Tableau 2 : Identification des neufs ACS d'acide gras à longue chaîne. LACS9 serait l'isoforme responsable du transfert des acides gras des plastides vers le cytosol (Schnurr et al., 2002), LACS2 interviendrait dans la synthèse de la cuticule (Schnurr et al., 2004) et LACS6 et LACS7 dans la β -oxydation des acides gras dans les péroxysomes (Fulda et al., 2002). TM : nombre de domaines transmembranaires.

L'AP produit dans le réticulum est à l'origine des triglycérides et des phospholipides caractéristiques de la voie eucaryote.

3. Synthèse du diacylglycérol

L'AP peut être converti en DAG par une phosphatidate phosphatase. Cette activité a été mesurée dans le cytosol et dans le réticulum de cellules de ricins et de *Vigna radiata* (Moore, 1982) et est probablement responsable de la formation du DAG de structure eucaryote. Les enzymes porteuses de l'activité phosphatidate phosphatase n'ont toutefois pas encore été caractérisées en détail, leur spécificité et leur importance biologique restent à établir. Le DAG ainsi produit est à l'origine de la synthèse de la PE, de la PC et des glycolipides de structure eucaryote.

Dans les plastides, l'activité phosphatidate phosphatase n'a été détectée que dans les plantes en C16:3. Ces dernières possèdent des glycolipides contenant un squelette DAG provenant des deux voies alors que chez les plantes en C18:3, seul le PG, synthétisé à partir d'AP, est produit par la voie procaryote, le reste des lipides plastidiaux étant synthétisé par la voie eucaryote. L'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) appartient à la famille des plantes en C18:3 et *Arabidopsis thaliana* est une plante en C16:3 (Mongrand et al., 1998). Sur le plan phylogénique, la différence entre les plantes en C16:3 et C18:3 est liée à la présence d'une

phosphatidate phosphatase plastidiale chez les plantes en C16:3, perdue au cours de l'évolution chez les plantes en C18:3.

L'enzyme chloroplastique est clairement différente des autres phosphatidate phosphatases de la cellule car elle est membranaire, fortement associée à la membrane interne de l'enveloppe, possède un pH optimum alcalin et est inhibée par des cations tels que Mg^{2+} (Joyard et Douce, 1977, 1979 ; Block *et al.*, 1983). Comme la concentration en Mg^{2+} dans le chloroplaste varie de 1 à 6 mM (Leegood *et al.*, 1985), la sensibilité de la phosphatidate phosphatase au Mg^{2+} suggère un contrôle possible de cette enzyme. De plus, l'activité phosphatidate phosphatase est rétro-inhibée par le DAG (Malherbe *et al.*, 1992). L'inhibition de cette enzyme pourrait conduire à l'accumulation d'AP et favoriser la synthèse de PG, directement dépendante de la quantité d'AP. Par comparaison avec la phosphatidate phosphatase de *Vigna unguiculata*, appartenant à la famille PAP2, un gène (*pap1*, locus At2g01180) a été identifié chez *Arabidopsis* codant pour une phosphatidate phosphatase plastidiale (Marcel *et al.*, 2000). Le DAG ainsi produit est à l'origine des glycolipides de structure procaryote.

4. Synthèse du CDP-diacylglycérol

L'AP peut être converti en CDP-DAG par l'action d'une CTP phosphatidate cytidyltransférase. Cette enzyme catalyse la réaction entre une molécule d'AP et une molécule de CTP pour former du CDP-DAG et du pyrophosphate. Cette activité a été localisée dans plusieurs systèmes membranaires chez les plantes : les plastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

Dans la membrane interne de l'enveloppe des plastes, une CTP phosphatidate cytidyltransférase est impliquée dans la synthèse du PG plastidial (Andrews et Mudd, 1985). Dans la membrane interne des mitochondries, une CTP phosphatidate cytidyltransférase approvisionne la PG phosphate synthase et la DPG synthase pour la synthèse du DPG (Frentzen et Griebau, 1994). Enfin, la majorité de l'activité CTP phosphatidate cytidyltransférase est détectée dans le réticulum où a lieu ensuite la synthèse du PI, de la PS et d'une partie du PG. Actuellement, seule une enzyme a été identifiée génétiquement chez *Arabidopsis thaliana*, AtCDS1 (locus At1g62430). Elle a été exprimée *in vitro*, présente une activité CTP phosphatidate cytidyltransférase (Kopka *et al.*, 1997) et serait localisée dans le réticulum d'après une analyse *in silico* (Beisson *et al.*, 2003).

Cette activité est la première étape de la synthèse de certains phospholipides tels que le PG, le DPG, le PI et la PS.

B- Synthèse des phospholipides

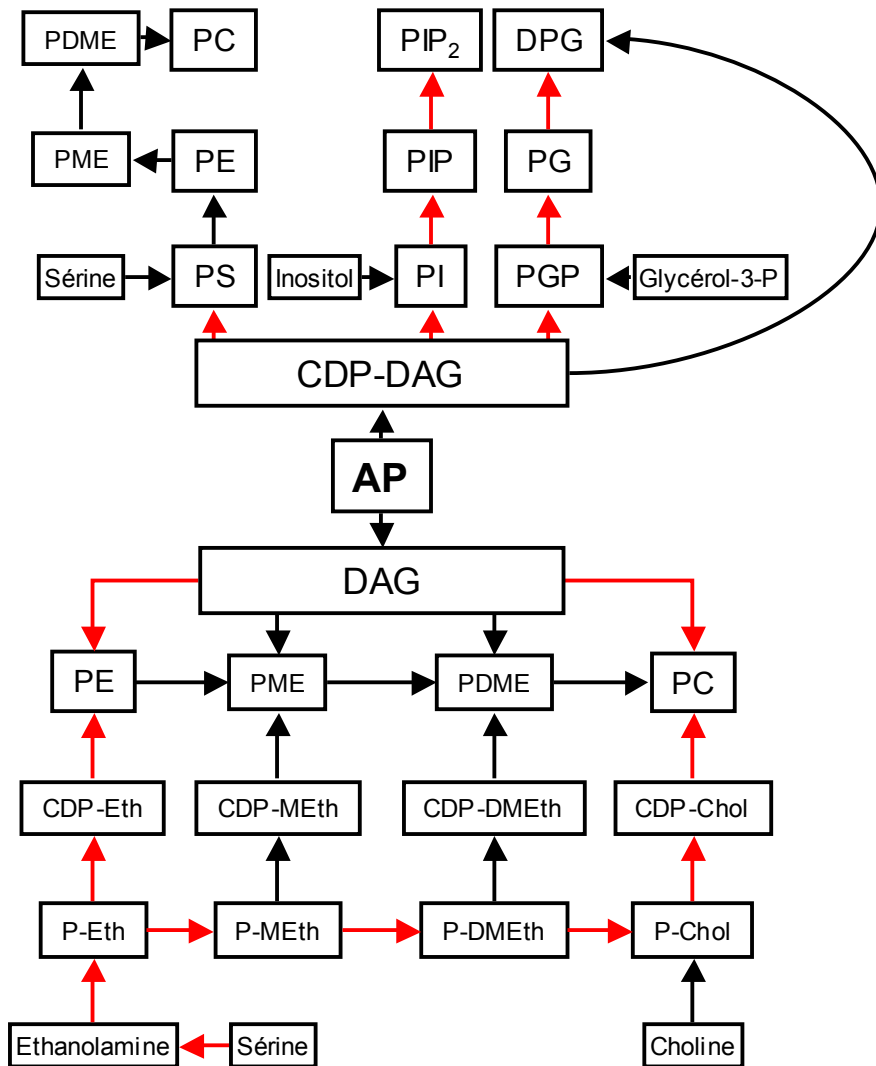


Figure 6 : Voies potentielles d'incorporation des têtes polaires des phospholipides dans les acylglycérols dérivés de l'acide phosphatidique d'après Kinney, 1993. Les voies principales des plantes sont indiquées par des flèches en rouge. CDP-Chol : cytidine diphosphate-choline, CDP-Eth : cytidine diphosphate-éthanolamine, CDP-DMEth : cytidine diphosphate-diméthyléthanolamine, CDP-MEth : cytidine diphosphate-méthyléthanolamine, P-Chol : phosphocholine, P-DME : phosphodiméthyléthanolamine, P-E : phosphoéthanolamine, P-ME : phosphométhyléthanolamine, PDME : phosphatidyl-diméthyléthanolamine, PGP : phosphatidylglycérol phosphate, PIP : phosphatidylinositol phosphate, PIP₂ : phosphatidylinositol biphosphate, PME : phosphatidylméthyléthanolamine.

Les principaux phospholipides trouvés dans les tissus végétaux ont une structure similaire à celle des lipides eucaryotes, excepté pour le PG plastidial. Les voies de synthèse de ces différents lipides ont été longuement étudiées mais leur fonctionnement intégré n'est pas complètement établi *in vivo*. En général, la synthèse des phospholipides est séparée en trois voies : les phospholipides dérivés du cytidine diphosphate (CDP)-DAG, ceux dérivés du DAG (Figure 6) et ceux provenant d'échange de têtes polaires appartenant à d'autres phospholipides.

1. Synthèse des phospholipides dérivés du CDP-diacylglycérol

Les synthèses de phospholipides dérivés du CDP-diacylglycérol sont catalysées par des enzymes capables d'utiliser un alcool et du CDP-DAG pour former une molécule de CMP et une molécule de phospholipide. Ces voies concernent la synthèse du PG et du DPG et également celle du PI et de la PS.

a) Phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol

La synthèse du PG a lieu dans les plastes, le réticulum et les mitochondries. Dans les chloroplastes, le PG est généré dans la membrane interne de l'enveloppe où les activités phosphatidylglycérol-phosphate synthase et phosphatidylglycérol-phosphate phosphatase ont été détectées (Andrews et Mudd, 1985). Dans les plantes en C18 comme dans les plantes en C16, le PG plastidial a la même structure de type procaryote que celle de l'AP synthétisé dans l'enveloppe.

Chez *Arabidopsis*, deux gènes ont été caractérisés codant pour des phosphatidylglycérol-phosphate synthases : PGP1 et PGP2 (Frentzen, 2004; Müller et Frentzen, 2001). L'expression fonctionnelle chez la levure montre que PGP2 est une protéine du réticulum alors que PGP1 possède un peptide de transit qui l'adresse aux mitochondries de levures, clivé dans la forme mature. Xu *et al.* (2002) ont montré l'importance de PGP1 dans la synthèse du PG plastidial : un mutant d'*Arabidopsis* affecté dans le gène *pgp1*, a une teneur en PG diminuée de 30% et une réduction de l'activité phosphatidylglycérol-phosphate synthase des plastes de 80%. PGP1 pourrait donc catalyser la première étape de la synthèse du PG chloroplastique.

Babiychuk *et al.* (2003) ont montré que le gène *pgp1* codait pour un précurseur qui est adressé *in vivo* à la fois aux chloroplastes et aux mitochondries. Toutefois, PGP1 serait indispensable à la différenciation des chloroplastes et à la synthèse du PG plastidial, mais serait superflu pour celle du PG mitochondrial. En effet, l'activité phosphatidylglycérol synthase des mitochondries a les mêmes propriétés que celles du réticulum (Moore, 1982) ; les mitochondries seraient donc capables d'importer du PG du réticulum. Le PG plastidial serait donc synthétisé par PGP1, celui du réticulum par PGP2 et celui des mitochondries vraisemblablement par une combinaison des deux enzymes.

Aucun gène n'a été identifié pour les phosphatidylglycérol-phosphate phosphatase. Seules les activités et parfois la présence de PGP ont été détectées dans le réticulum de feuilles d'épinard (Marshall et Kates, 1972), dans les chloroplastes de pois (Andrews et Mudd, 1985) et les mitochondries de *Vigna radiata* (Griebau et Frentzen, 1994).

Le DPG est quant à lui synthétisé exclusivement dans la membrane interne des mitochondries à partir de PG et de CDP-DAG par une DPG synthase. Cette enzyme utilise préférentiellement le CDP-dioléoylglycérol (C18/C18) et le PG C18/C18 par rapport au CDP-dipalmitoylglycérol (C16/C16) et au PG C16/C18 (Frentzen et Griebau, 1994). Le DPG possède donc un squelette DAG riche en C18. Chez *Arabidopsis*, le gène *cls*, codant pour l'enzyme responsable de cette activité, a été identifié au locus At4g04870 (Katayama *et al.*, 2004 ; Nowicki *et al.*, 2005). Il était préalablement référencé comme *pgp3* mais n'a aucune activité phosphatidylglycérol synthase. L'adressage de cette enzyme est mitochondrial d'après les études *in silico* et *in vivo* (Beisson *et al.*, 2003 ; Katayama *et al.*, 2004).

b) Phosphoinositides

La PI synthase catalyse la réaction entre un inositol libre et du CDP-DAG. Cette activité a été mesurée dans des fractions du réticulum de feuilles d'épinard et nécessite des cations divalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}) pour son activité (Moore, 1982). Une PI synthase d'*Arabidopsis*, AtPIS1, a été identifiée par complémentation chez la levure (Xue *et al.*, 2000).

Les phosphoinositides représentent un groupe important et de structure complexe. Le PI représente 93% des phosphoinositides alors que le PIP (principalement le PI-3P et le PI-4P) et le PIP₂ (PI-(4,5)P₂) en représente moins de 1% (Kinney, 1993). Ces derniers phosphoinositides joueraient un rôle prépondérant dans le trafic vésiculaire et dans des processus de signalisation (pour revue, voir Meijer et Munnik, 2003). Le PI-3P est formé à partir d'une PI 3-kinase, dont le gène a été cloné chez le soja et *Arabidopsis* (At1g60490), mais la compartimentation cellulaire de l'enzyme reste inconnue. Le PI-4P est synthétisé à l'aide de PI 4-kinases, dont 12 isoformes ont été identifiées chez *Arabidopsis* par similarité de séquence. Enfin, le PIP₂ est formé à partir de PI-4P par une activité PI-4P 5-kinase, pour laquelle 9 isoformes ont été prédites mais une seule caractérisée fonctionnellement chez *Arabidopsis* (At1g21980). La localisation et la régulation de toutes ces enzymes restent à découvrir.

c) Phosphatidylsérine

Chez les plantes, le schéma de synthèse de la PS n'est pas encore clair. La PS serait synthétisée à partir de deux voies différentes : une réaction d'échange de têtes polaires et une réaction impliquant le CDP-DAG (Moore, 1982). Delhaize *et al.* (1999) ont montré la présence d'une PS synthase, catalysant l'addition d'une sérine sur un CDP-DAG, en clonant le gène correspondant chez le blé et en détectant l'activité de synthèse de PS dans des plantes transgéniques. Le devenir de la PS comme précurseur de la PE et de la PC n'a pas encore été

clairement défini chez les plantes bien qu'une activité PS décarboxylase ait déjà été caractérisée dans les membranes mitochondriales et que son gène ait été cloné chez *Arabidopsis* et *Lycopersicon esculentum* (Rontein *et al.*, 2003b). La décarboxylation nécessite un transfert de la PS synthétisée dans le réticulum vers les mitochondries.

2. Synthèse des phospholipides dérivés du diacylglycérol

Les voies de synthèses des phospholipides impliquant le DAG sont communément définies comme voie de Kennedy (Kennedy pathway) ou voie nucléotidique (nucleotide pathway). Elles comportent trois étapes successives catalysées par une aminoalcool kinase, une CTP:phosphoaminoalcool cytidyltransférase et une CDP-aminoalcool:DAG-aminoalcoolphosphotransférase (Moore, 1982). Cette voie de synthèse permet la formation de la PE et de la PC.

a) Phosphatidyléthanolamine

Les plantes synthétisent la PE après une étape de décarboxylation qui peut s'effectuer soit au niveau de la PS ou à celui de la sérine (Mudd et Datko, 1989). La décarboxylation de la sérine est la voie principale (Rontein *et al.*, 2003a), catalysée par une enzyme soluble, la sérine décarboxylase, spécifique des plantes. Cette enzyme a été caractérisée chez *Arabidopsis* et chez *Brassica napus* (Rontein *et al.*, 2001).

L'éthanolamine libre synthétisée est ensuite phosphorylée par une éthanolamine kinase. Aucune étude récente n'a été effectuée sur cette activité. Les seules données connues ont été obtenues chez l'épinard et le soja et montrent que l'enzyme est spécifique de l'éthanolamine et est différente de la choline kinase (Macher et Mudd, 1976 ; Wharfe et Harwood, 1979). La phosphoéthanolamine est ensuite transformée en CDP-éthanolamine par une CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase. Chez le ricin, il semble que deux enzymes soient responsables de cette activité : l'une, localisée dans la membrane externe des mitochondries, représente 80% de l'activité de la cellule et l'autre, dans le réticulum, est six fois moins active que celle des mitochondries (Wang et Moore, 1991). La dernière activité impliquée dans la synthèse de la PE est la CDP-éthanolamine:DAG-éthanolaminephosphotransférase catalysée par une aminoalcoolphosphotransférase. Deux isoformes ont été identifiées chez le chou chinois et une chez le soja ; elles synthétisent aussi bien de la PE que de la PC à partir de DAG et de CDP-éthanolamine, CDP-méthyléthanolamine, CDP-diméthyléthanolamine ou CDP-choline (Choi *et al.*, 2000 ; Dewey *et al.*, 1994) (Figure 6). La localisation de ces enzymes n'est pas connue.

b) Phosphatidylcholine

Tout comme la biosynthèse de PE, la PC peut aussi être synthétisée par deux voies différentes, soit par méthylation de la PE par une PE-N-méthyltransférase, soit par addition de CDP-choline sur du DAG. Cependant, au contraire des levures, chez aucune plante, l'activité PE N-méthyltransférase n'a été détectée bien que les activités phosphatidylméthyléthanolamine N-méthyltransférase et phosphatidyltriméthyléthanolamine N-méthyltransférase soient présentes (Kinney, 1993). La voie utilisant la CDP-choline est prépondérante.

La phosphocholine peut-être produite par deux voies différentes : par une choline kinase ou par méthylation de la phosphoéthanolamine. Le clonage des gènes de la choline kinase chez le soja a révélé l'existence de plusieurs isoformes, solubles, toutes spécifiques de la choline, mais pouvant être inhibées à des degrés divers par l'éthanolamine, la méthyléthanolamine ou la diméthyléthanolamine (Monks *et al.*, 1996). Le pool de choline libre étant toutefois limité dans les cellules, les cholines kinases interviendraient plutôt dans la régulation de la synthèse de la PC en cas de stress, par exemple de stress osmotique, la voie majoritaire étant la méthylation de la phosphoéthanolamine (Tasseva *et al.*, 2004). Les trois méthylations successives de la phosphoéthanolamine pour produire de la phosphocholine sont catalysées par une seule enzyme soluble, une phosphoéthanolamine N-méthyltransférase S- adénosylméthionine dépendante. Cette enzyme a été clonée chez l'épinard et *Arabidopsis* (At3g18000) (Nuccio *et al.*, 2000 ; Bolognese et McGraw, 2000), et catalyse les trois méthylations à partir de la phosphoéthanolamine ainsi que les deux méthylations à partir de la phosphatidylméthyléthanolamine (Figure 6).

La phosphocholine est ensuite transformée en CDP-choline par une CTP:phosphocholine cytidyltransférase. La caractérisation de cette enzyme purifiée a montré qu'elle pouvait fixer le CTP au niveau de la phosphocholine mais aussi de la phosphométhyléthanolamine et de la phosphodiméthyléthanolamine (Wang et Moore, 1990). Deux isoformes ont été identifiées chez *Arabidopsis* et quatre chez *Brassica napus* (Inatsugi et al., 2002) ; ces différentes isoformes permettraient des régulations de la synthèse de la PC lors de stress notamment à basse température. Enfin, la CDP-choline est transférée sur un DAG par une aminoalcoolphosphotransférase déjà décrite précédemment dans la synthèse de la PE.

4. Echange et catabolisme des têtes polaires

Les phospholipides, produits selon les voies de biosynthèses “verticales” que nous venons de décrire, peuvent aussi échanger leur tête polaire. L'exemple le mieux connu est celui de la PE qui, en présence de sérine, serait transformée en PS par une enzyme échangeuse de sérine. Cette activité a été détectée dans la membrane plasmique et pourrait être catalysée par le produit du gène At1g15110 (Vincent *et al.*, 1999 ; Beisson *et al.*, 2003). La réalité et l'importance physiologique de l'échange de têtes polaires sont sujet à discussion puisque la majorité de ces échanges se font suivant des mécanismes indirects, par l'intermédiaire du DAG ou de l'AP, donc après hydrolyse de la tête polaire par des phospholipases (Figure 7), suivie d'une nouvelle fixation de tête polaire. Les phospholipases impliquées dans ce métabolisme sont les phospholipases C et D.

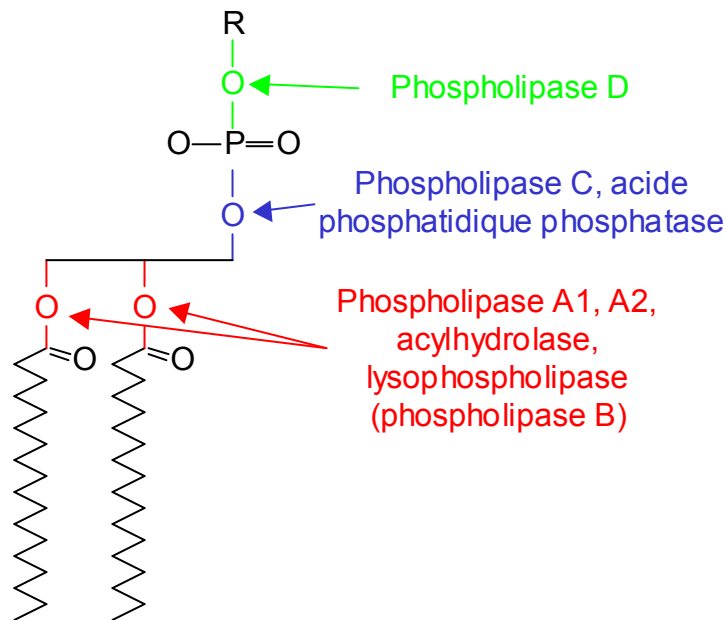


Figure 7 : Action des différentes phospholipases sur un phospholipide.

a) Les phospholipases C

Les phospholipases C (PLC) hydrolysent un phospholipide en DAG et une tête polaire phosphorylée. Chez les plantes, deux familles sont identifiées : des PLC spécifiques des phosphoinositides ou PI-PLC et des PLC non spécifiques. Les PI-PLC sont les protéines les plus étudiées ; elles possèdent en plus des domaines catalytiques caractéristiques X et Y, un domaine EF et un domaine C2, capable de lier du calcium et d'autres effecteurs comme des phosphoinositides (Mueller-Roeber et Pical, 2002). L'enzyme PLC1 d'*Arabidopsis* a été étudiée *in vitro* et a servi de modèles pour les autres PI-PLC. Neuf gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis* appartenant à cette famille par homologie avec PLC1 (Tableau 3). Le rôle

des PI-PLC d'*Arabidopsis* n'est pas encore établi bien qu'elles semblent impliquées dans des cascades de transductions de signaux. Le DAG produit n'est vraisemblablement pas un second messager, de par l'absence de protéine kinase C chez les plantes. L'inositol-3-P libéré par l'action des PI-PLC est, quant à lui, capable d'induire un flux calcique dans la cellule. Par exemple, certaines PI-PLC seraient impliquées dans l'ouverture des stomates, la résistance à la sécheresse et au froid, la germination des graines, la sensibilité lumineuse et la réponse à l'acide abscissique et aux stress osmotiques (Wang, 2004).

Phospholipases	EC	Locus Arabidopsis	Protéine	Caractérisation	TM	Localisation
Phospholipase C						
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At2g40116	PLC6	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At3g08510	PLC2	Similarité de séquence	0	M
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At3g47220		Similarité de séquence	0	M
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At3g47290		Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At3g55940	PLC7	Similarité de séquence	0	M
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At4g38530	PLC3	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At5g58670	PLC1	Expression <i>in vitro</i> .	0	—
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At5g58690	PLC5	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C PI-spécifique	3.1.4.11	At5g58700	PLC4	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At1g07230	NPC1	Similarité de séquence	0	S
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At2g26870	NPC2	Similarité de séquence	0	S
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At3g03520	NPC3	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At3g03530	NPC4	Expression <i>in vitro</i> et caractérisation d'un mutant d'insertion	0	(MP)
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At3g03540	NPC5	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase C non spécifique	3.1.4.11	At3g48610	NPC6	Similarité de séquence	0	S
Phospholipase D						
Phospholipase D α	3.1.4.4	At1g52570	PLD α 2	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D α	3.1.4.4	At1g55180	PLD α 4	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D α	3.1.4.4	At3g15730	PLD α 1	Caractérisation de mutant anti-sens	0	—
Phospholipase D α	3.1.4.4	At5g25370	PLD α 3	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D β	3.1.4.4	At2g42010	PLD β 1	Expression <i>in vitro</i> .	0	—
Phospholipase D β	3.1.4.4	At4g00240	PLD β 2	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D γ	3.1.4.4	At4g11830	PLD γ 2	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D γ	3.1.4.4	At4g11840	PLD γ 3	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D γ	3.1.4.4	At4g11850	PLD γ 1	Expression <i>in vitro</i> .	0	—
Phospholipase D δ	3.1.4.4	At4g35790	PLD δ	Expression <i>in vitro</i> .	0	—
Phospholipase D ζ	3.1.4.4	At3g05630	PLD ζ 2	Similarité de séquence	0	—
Phospholipase D ζ	3.1.4.4	At3g16785	PLD ζ 1	Expression <i>in vitro</i>	0	P

Tableau 3 : Phospholipases potentielles d'*Arabidopsis thaliana*. Les références des gènes ont été collectées à partir de la base de données des gènes intervenant dans le métabolisme des lipides d'*Arabidopsis* établie par Beisson *et al.*, 2003. La localisation des protéines déterminée par TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) est indiquée par la lettre P pour les plastes, S pour un transit peptide et M pour les mitochondries. Les détails des localisations obtenues à partir de données biochimiques sont reportées dans le tableau entre parenthèses avec MP pour membrane plasmique (Nakamura *et al.*, 2005). TM : nombre de domaines transmembranaires.

La deuxième famille est appelée "PLC non spécifique" par opposition au PI-PLC car elles n'ont pas de spécificité de substrat en commun. Chez *Arabidopsis*, six gènes ont été identifiés par homologie avec une PC-PLC bactérienne (Nakamura *et al.*, 2005). Ces gènes sont fortement conservés de la bactérie à la plante mais les enzymes correspondantes ne possèdent pas de domaines caractéristiques connus, tels que les motifs X et Y ou le domaine C2. En théorie, ces PLC peuvent hydrolyser la plupart des phospholipides, bien que NPC4

semble préférer la PC (Nakamura *et al.*, 2005) et NPC5 la PE (Ohta, communication personnelle). Seul le rôle de NPC4 a été décrit, intervenant dans l'hydrolyse de PC lors de la carence de phosphate.

Le DAG peut ensuite être transformé en AP par une DAG kinase. De nombreuses isoformes ont été identifiées chez *Arabidopsis* (Wang, 2004). Leur rôle principal ne serait pas de produire l'AP comme intermédiaire de synthèse dans des voies métaboliques mais plutôt comme molécule signal (Munnik, 2001).

En conclusion, les fonctions des PLC sont recherchées dans les processus transitoires de signalisation et ces enzymes interviendraient donc peu dans les échanges de tête polaires entre phospholipides.

b) Les phospholipases D

Les phospholipases D (PLD) catalysent la formation d'AP à partir de phospholipides. Elles contiennent deux motifs "HKD", indispensables pour l'activité catalytique, et un motif "YIENQFF", important pour la fixation du phospholipide. Ces phospholipases sont classées en cinq familles (Tableau 4).

Famille PLD	Domaine	Effecteurs	Substrats
PLD α	C2	Ca ²⁺	PC, PE, PG
PLD β	C2	Ca ²⁺ , PIP ₂	PC, PE, PS
PLD γ	C2	Ca ²⁺ , PIP ₂	PC, PE, PS
PLD δ	C2	Ca ²⁺ , oléate	PE > PC
PLD ζ	PX, PH	PIP ₂	PC

Tableau 4 : Comparaison des propriétés des familles de PLD d'après Qin et Wang, 2002. Excepté la famille PLD ζ , qui possède les domaines régulateurs PX et PH capables d'interagir avec des phosphoinositides, les PLD possèdent un domaine C2 capable de lier le calcium.

L'AP étant un second messager impliqué dans de nombreux stress (Munnik, 2001), les PLD ont un rôle très important dans les phénomènes de signalisation. Par exemple, la PLD α 1 est impliquée dans la production d'acide jasmonique et d'ion superoxyde ; elle a un rôle dans la résistance au froid et l'ouverture des stomates (Wang, 2004). Cette enzyme interagit avec des protéines G dont le rôle reste à découvrir chez les plantes. La PLD β 1 est capable de se lier à l'actine et la PLD δ est activée par H₂O₂, ralentissant alors la mort cellulaire des plantes (Wang, 2004). Enfin, l'expression du gène *pld ζ 1* est inhibée par l'homeobox *GLABRA2*, qui est un inhibiteur du développement du poil absorbant. L'activation de *pld ζ 1* induit la formation des poils absorbants en régulant le trafic vésiculaire et l'exocytose (Ohashi *et al.*, 2003).

L'AP peut ensuite être hydrolysé pour former du DAG par une acide phosphatidique phosphatase décrite précédemment. La protéine PAP2, codée par un gène au locus At1g15080, a été identifiée chez *Arabidopsis* mais son expression n'est pas affectée par des stress aux radiations ultra-violettes au contraire de la protéine PAP1 plastidiale (Pierrugues *et al.*, 2001). L'importance de cette activité n'est donc pas encore bien comprise dans la dégradation et la régulation de l'AP.

C- Synthèse des glycolipides

Le DAG, de structure eucaryote ou procaryote, est le précurseur de la synthèse des glycolipides (SQDG, MGDG et DGDG). Il existe donc deux types de glycolipides : les procaryotes dont le squelette DAG provient des plastes et les eucaryotes dont le DAG est issu de la PC. La synthèse des glycolipides, étant localisée dans les membranes de l'enveloppe des plastes, requiert donc un mécanisme d'import du DAG de structure eucaryote.

1. Transfert du DAG eucaryote vers les plastes

Des études de cinétiques *in vivo* d'incorporation d'acétate et de glycérol marqué dans les lipides plastidiaux indiquent que la PC fournit son squelette DAG aux glycérolipides plastidiaux de type eucaryote (Heinz, 1977; Slack *et al.*, 1977). Ce transfert s'effectue à partir de PC désaturée du fait que le mutant *fad2* d'*Arabidopsis*, qui est déficient dans la désaturation du C18:1 dans le réticulum, contient une proportion de MGDG eucaryote par rapport au MGDG procaryote plus faible que dans le plant sauvage (Okuley *et al.*, 1994). Bien que la PC soit présente aussi dans la membrane externe des plastes, le seul site connu de synthèse *de novo* de la PC se trouve au niveau du réticulum. Un import direct de PC, de DAG ou d'intermédiaires provenant de la PC du réticulum vers les plastes est donc nécessaire (Figure 8).

Il a été proposé que des protéines de transfert de phospholipides de type LTP puissent transporter la PC (Kader, 1996). Cette hypothèse est invalidée du fait que les produits des gènes appartenant à cette famille possèdent pratiquement tous un peptide signal et que les protéines caractérisées biochimiquement sont localisées dans la paroi pectocellulosique. Il reste néanmoins possible que le transfert de PC se fasse par d'autres protéines (voir plus loin paragraphe II-,D-,2.).

Une seconde hypothèse serait le transfert de lysoPC plutôt que de PC. Ce transfert entre le réticulum et les plastes impliquerait une hydrolyse partielle de la PC, une répartition de cette lysoPC entre le réticulum, le cytosol et l'enveloppe suivie d'une ré-acylation de la

tendance à déstabiliser les membranes (pour revue, voir Burger, 2000) et donc favoriser les échanges entre membranes (Figure 8).

Le mécanisme de transfert de lipides entre le réticulum et le chloroplaste reste encore à élucider. Si l'on étudie les mécanismes connus chez l'animal et la levure, il est possible que les contacts entre les membranes jouent un rôle important dans les transferts de lipides (Hanada *et al.*, 2003; Levine, 2004). Sandelius et ses collaborateurs travaillent sur cette possibilité en étudiant une fraction particulière de membranes du réticulum étroitement associées aux chloroplastes (Sandelius et Andersson, 2003).

En analysant un mutant déficient dans la synthèse des lipides plastidiaux dérivés du réticulum, Benning et ses collaborateurs ont identifié chez *Arabidopsis* une protéine de type perméase (TGD1) au locus At1g19800 et proposent que cette protéine appartienne à un complexe de l'enveloppe des plastes intervenant dans le transfert de lipides (Xu *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2005). Cette protéine ressemble à une sous-unité de la perméase ABC appartenant au complexe transporteur bactérien multipartite de type ABC (Higgins et Linton, 2001) et de nombreuses protéines de type ABC sont connues pour avoir une activité liée aux lipides telles que des flippases (Smith *et al.*, 2002; Borst *et al.*, 2000). Elle favoriserait donc l'import de DAG eucaryote pour la synthèse des glycolipides.

2. Synthèse du sulfolipide

La première étape de synthèse du sulfolipide est la formation d'UDP-sulfoquinovose (UDP-Sq), groupe donneur de la tête polaire, catalysée par SQD1 chez *Arabidopsis* (Sanda *et al.*, 2001). Le mécanisme de cette réaction, qui correspond à la condensation d'une molécule d'UDP-Glc avec un sulfite, générant l'UDP-Sq, a été décrit par Essigmann *et al.* (1999) et Mulichak *et al.* (1999). La deuxième réaction est catalysée chez *Arabidopsis* par SQD2 qui transfère le Sq à partir d'UDP-Sq sur une molécule de DAG (Yu *et al.*, 2002) (Figure 9).

Cette activité est présente dans la membrane interne de l'enveloppe (Tietje et Heinz, 1998). Des expériences de compétition entre la MGDG synthase et la sulfolipide synthase ont été réalisées sur de l'enveloppe isolée en approvisionnant le milieu avec de l'UDP-Gal, de l'UDP-Sq et du DAG de structure C16:0/C16:0 et/ou C18:1/C16:0 (Joyard *et al.*, 1986 ; Seifert et Heinz, 1992). Les deux espèces de DAG peuvent être utilisées par les deux enzymes, mais le C16:0/C16:0 est incorporé préférentiellement dans le sulfolipide. Cette observation montre que la spécificité de l'enzyme est essentielle car directement responsable de la structure du DAG présent dans le sulfolipide.

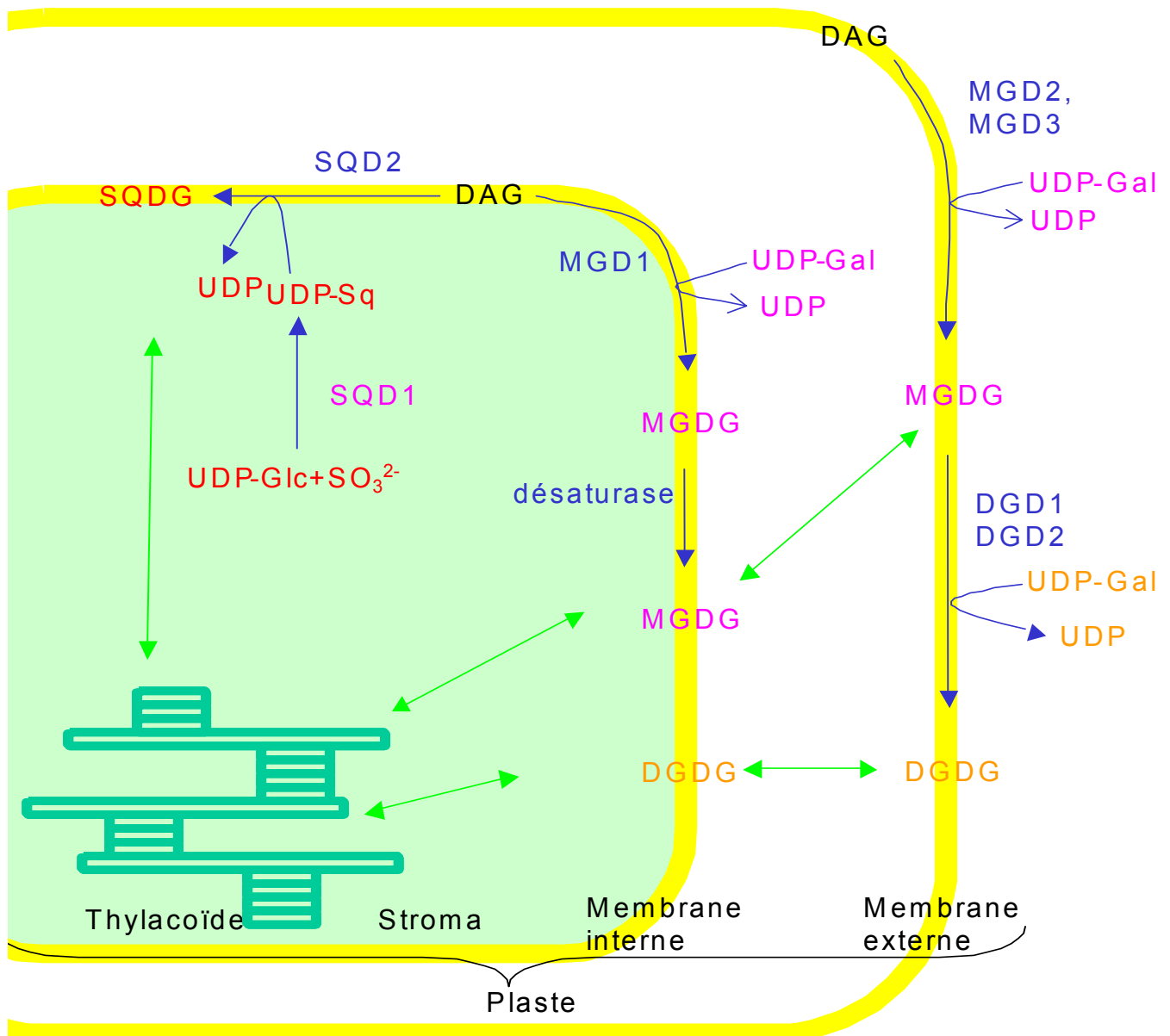


Figure 9 : Synthèse des glycolipides chez *Arabidopsis*. Gal : galactose, Sq : sulfoquinovose, Glc : glucose.

3. Synthèse du monogalactosyldiacylglycérol

La synthèse du MGDG s'effectue en une seule étape par une 1,2-DAG 3- β -galactosyltransférase (ou MGDG synthase) qui transfère un galactose à partir d'UDP-Gal sur du DAG via une liaison glycosidique $\beta 1 \rightarrow 3$ (Carter *et al.*, 1956 ; Douce, 1974). Les propriétés biochimiques de l'activité MGDG synthase ont été analysées principalement sur des fractions membranaires de l'enveloppe de chloroplastes d'épinard. Maréchal *et al.* (1994a) ont montré que cette activité était capable d'utiliser différentes espèces de DAG avec différentes affinités. Cependant, le DAG procaryote C18:1/C16:0 synthétisé dans les chloroplastes est utilisé avec une meilleure spécificité que le C16:0/C18:1, la plus grande affinité étant pour le C18:2/C18:2 (Maréchal *et al.*, 1994b).

Shimajima *et al.* (1997) ont identifié la première séquence codant une MGDG synthase, puis plusieurs homologues ont été identifiés (Miège *et al.*, 1999; Awai *et al.*, 2001). A partir des analyses de séquences, les enzymes MGDG synthases ont été classées en deux familles : le type A avec MGD1 et le type B avec MGD2 et MGD3 chez *Arabidopsis*. Les deux familles diffèrent par (1) la présence d'un transit peptide clivable pour le type A et son absence pour le type B, (2) la localisation dans la membrane interne de l'enveloppe pour le type A alors que le type B est probablement associé à la membrane externe, (3) une expression élevée pour le type A dans des conditions standard de culture et dans les tissus chlorophylliens et (4) une expression activée pour les enzymes de type B en carence de phosphate (Awai *et al.*, 2001) (Figure 9).

MGD1 catalyse la synthèse des molécules eucaryotes et procaryotes du MGDG *in vitro* sans spécificité apparente pour l'une ou l'autre structure (Awai *et al.*, 2001). Chez un mutant d'*Arabidopsis* contenant une insertion dans le gène *mgd1*, où l'abondance de l'ARN messager correspondant est réduite de 75 %, la quantité de MGDG dans des feuilles matures est réduite de 42 % comparée à celle de feuilles sauvages (Jarvis *et al.*, 2000). L'activité MGDG synthase est aussi réduite de 75 %, soulignant que MGD1 est la principale MGDG synthase des feuilles. MGD1 contribue essentiellement au développement des membranes chloroplastiques car les chloroplastes mutants sont plus petits et contiennent moins de thylacoïdes. Par ailleurs, l'état redox des chloroplastes semble affecter l'activité de MGD1 (Yamaryo *et al.*, 2003; Benning et Ohta, 2005).

MGD1 est donc à l'origine de la majorité du MGDG synthétisé en condition standard. Sa localisation dans la membrane interne de l'enveloppe a été confirmée par Western blot, par son insensibilité à la thermolysine après import *in vitro* et par visualisation de fusion GFP après expression transitoire dans des cellules de feuilles d'*Arabidopsis*. En revanche, MGD2 et MGD3, les enzymes de type B, sont localisées vraisemblablement dans la membrane externe, car d'une part les fusions GFP permettent de les localiser dans les plastes et d'autre part, après des expériences d'import *in vitro*, MGD2 et MGD3 sont sensibles à la thermolysine (Awai *et al.*, 2001).

Le rôle des MGDG synthases de type B est moins évident. Ces enzymes ont une meilleure affinité pour le DAG eucaryote (C18:2/C18:2) par rapport au procaryote (C18:1/C16:0) (Awai *et al.*, 2001). Leur expression est observée dans des zones restreintes de la plante telles que les extrémités foliaires et les tissus floraux (Kobayashi *et al.*, 2004). De plus, ces enzymes sont précocement et fortement induites lors de la carence de phosphate et

sont vraisemblablement impliquées dans l'approvisionnement en MGDG pour la synthèse de DGDG (Awai *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2004).

4. Synthèse du DGDG

La caractérisation du mutant *dgd1* d'*Arabidopsis*, sévèrement affecté dans la synthèse du DGDG, a permis l'identification du premier gène de DGDG synthase (Dörmann *et al.*, 1995). Ce mutant est altéré au niveau de la photosynthèse (Dörmann *et al.*, 1995, Härtel *et al.*, 1997) et de l'import des protéines dans les chloroplastes (Chen et Li, 1998). Par similarité avec *dgd1*, un second gène (*dgd2*) a été identifié dans le génome d'*Arabidopsis* (Dörmann *et al.*, 1999). Le gène *dgd2* n'est pas essentiel pour la synthèse du DGDG dans des conditions standard de culture (Kelly *et al.*, 2003). Alors que la protéine DGD1 est composée de deux domaines, un domaine N-terminal de fonction inconnue et un domaine C-terminal de type glycosyltransférase, DGD2 ne possède que le domaine glycosyltransférase.

Les deux enzymes catalysent la synthèse du DGDG par addition d'un Gal à partir d'UDP-Gal sur du MGDG *via* une liaison glycosidique $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Kelly et Dörmann, 2002; Kelly *et al.*, 2003). L'analyse des mutants nuls *dgd1* et *dgd2* indiquent qu'*in vivo* DGD1 agit préférentiellement sur du MGDG C18/C18 alors que DGD2 semble avoir une affinité pour le MGDG avec du C16 en position *sn-1* et du C18 en position *sn-2* (Kelly *et al.*, 2003). Des expériences d'import *in vitro* et des analyses biochimiques ont montré que ces deux enzymes étaient localisés dans les plastes, vraisemblablement dans la membrane externe de l'enveloppe (Froehlich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003) (Figure 9). Toutefois, une localisation additionnelle pourrait être envisagée pour DGD1 car la protéine a été détectée dans le protéome des mitochondries (Heazlewood *et al.*, 2004).

Une autre activité formant du DGDG a été caractérisée dans des plastes isolés. Il s'agit d'une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (Dorne *et al.*, 1982). Cette activité est présente dans la membrane externe de l'enveloppe, catalyse l'échange de galactose entre deux galactolipides en produisant du DAG. Cette activité est différente de celle de DGD1 et DGD2 du fait de la formation d'oligogalactolipides TriGDG et TetraGDG et de son indépendance vis à vis de l'UDP-Gal. Les oligogalactolipides synthétisés par cette enzyme ont des galactoses liés par des liaisons glycosidiques β (Xu *et al.*, 2003). Cette protéine n'est pas caractérisée moléculairement et son rôle est énigmatique. Elle ne contribue pas à la synthèse du DGDG dans des conditions standard vu que le double mutant *dgd1,dgd2* contient seulement des traces de DGDG (Kelly *et al.*, 2003). Cependant, il existe des conditions dans lesquelles l'activité galactolipide:galactolipide galactosyltransférase est stimulée : lors de stress tels

qu'un traitement à l'ozone (Sakaki *et al.*, 1990), lorsque la compartimentation cellulaire est perturbée, comme au cours de la préparation d'enveloppe (Dorne *et al.*, 1982) ou dans des plantes dont les transferts de lipides entre le réticulum et le plaste sont affectés (Xu *et al.*, 2003), et enfin dans les protoplastes (Klaus *et al.*, 2002).

La synthèse de tous ces lipides, phospholipides et glycolipides, est localisée dans des membranes particulières. Cependant, une grande partie des lipides ainsi générés est présente dans d'autres membranes que celles où ils sont synthétisés (vacuole, membrane plasmique, thylacoïdes). La cellule dispose donc de mécanismes de transport de lipides. Nous présentons maintenant une synthèse des données bibliographiques relative au trafic des lipides, dans la cellule en interphase, au sein d'une bicouche lipidique ainsi qu'entre différents organites par le biais de vésicules ou de zones de contact.

II. Trafic lipidique

A- Homéostasie lipidique des compartiments membranaires

Les lipides sont capables de diffuser rapidement dans le plan latéral de la membrane ($0,1$ à $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Suivant ce principe, la distribution en lipides dans des organites connectés par des vésicules devrait s'équilibrer rapidement. Cet état n'est pas observé ; il existe donc des mécanismes homéostatiques capables de préserver la composition lipidique de chaque organite.

Par contraste avec la diffusion latérale, la diffusion des lipides entre les deux feuillets d'une membrane ou d'une membrane à l'autre est lente (Figure 10). Le mouvement à travers une bicouche a été désigné par le terme de "flip-flop" (pour revue, voir Holthuis et Levine, 2005). Il est très rapide pour le DAG alors qu'il prend plusieurs heures pour des phospholipides ou des glycolipides. Ces mouvements sont facilités par des protéines appelées flippases.

Les échanges de lipides entre différentes membranes sont eux très rapides pour des lipides possédant une seule chaîne d'acides gras, comme la lysoPC ou des acides gras courts (4 à 6 carbones) qui se partitionnent entre phases lipidiques et aqueuses. Au contraire, les transferts de lipides possédant deux longues chaînes d'acides gras sont quasi inexistantes alors qu'ils sont essentiels pour la survie des organites et donc de la cellule. La cellule dispose de systèmes de transport de lipides par des voies vésiculaires ou non vésiculaires, permettant d'assurer et de contrôler ces mouvements lipidiques. Les protéines sont des acteurs

indispensables à ces transports car elles facilitent le déplacement des lipides à travers une bicouche et d'une membrane à l'autre.

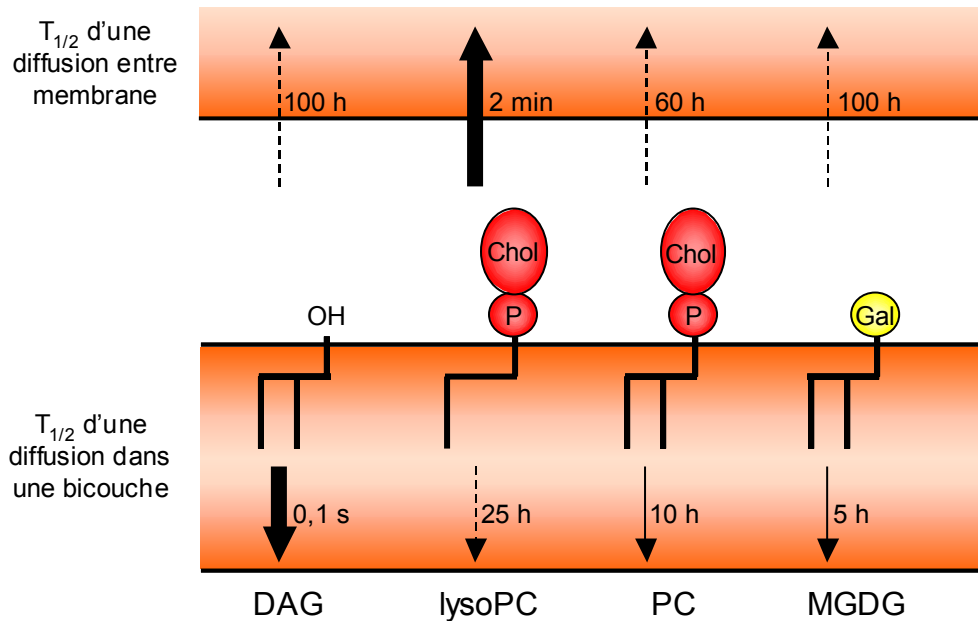


Figure 10 : Diffusion des lipides au sein et entre bicouches lipidiques. La figure montre les temps de demi-vie des mouvements spontanés des lipides d'après Holthuis et Levine, 2005. Les flèches larges indiquent les mouvements rapides alors que les flèches en pointillé indiquent les mouvements lents. P : phosphate, Chol : choline, Gal : galactose.

B- Mouvements flip-flop

Il existe plusieurs mécanismes pour les mouvements flip-flop. Il peut s'agir d'un mouvement spontané à travers la bicouche, déterminé directement par les propriétés physico-chimiques du lipide et de la membrane. La diffusion simple semble importante pour le DAG mais négligeable pour les autres glycérolipides. Des protéines sont donc impliquées pour le flip-flop des phospholipides et des glycolipides. Des flippases énergie-indépendantes, catalysent un mouvement ATP-indépendant, où les lipides peuvent glisser le long de la surface polaire créée par la protéine. Les flippases peuvent être spécifiques d'un type de lipide mais ne peuvent cependant pas les déplacer contre un gradient. Les flippases maintiennent une symétrie des deux feuillettes. En revanche, le mouvement peut-être une translocation ATP-dépendante. Un lipide spécifique est alors translaté par une protéine, appelée translocase, avec couplage à l'hydrolyse d'ATP, ce qui permet de déplacer le lipide contre un gradient et de maintenir, par exemple, l'asymétrie d'une membrane.

1. Les flippases énergie-indépendantes

Chez les plantes, aucune flippase n'a été caractérisée bien que la nécessité de cette activité soit démontrée. En effet, l'utilisation de protéases et d'inhibiteurs solubles ont montré

que la biosynthèse des phospholipides dans le réticulum a lieu dans le feuillet cytosolique (Bell *et al.*, 1981), la moitié des lipides nouvellement synthétisés doit donc être transférée sur l'autre feuillet. Par ailleurs, chez les levures et les cellules de mammifères, des mouvements flip-flop ATP-indépendants ont été détectés dans des membranes du réticulum au moins dix fois plus rapides que dans des membranes sans protéines et ce mouvement est sensible aux protéases (Pomorski *et al.*, 2004). La même nécessité est posée pour les mitochondries, les chloroplastes et les péroxysomes dont une partie des lipides vient du réticulum par une voie non vésiculaire (voir ci-dessous). Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée chez les plantes, dans des zones de contact entre des membranes, les lipides sont supposés être délivrés par le feuillet cytosolique de la membrane donneuse et transférés à celui de la membrane réceptrice (Voelker, 2003).

Les seules flippases qui soient caractérisées chez les eucaryotes sont RFT1, une pyrophosphorylologosaccharides-dolichol flippase du réticulum des levures (Helenius *et al.*, 2002), et une scramblase calcium dépendante de la membrane plasmique des hématies (Zhou *et al.*, 1997). Dans les membranes des hématies, la sphingomyéline et la majorité de la PC sont localisées dans le feuillet externe de la bicouche alors que la PS et une partie de la PE sont dans le feuillet cytosolique. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, provenant du plasma, active la scramblase qui équilibre la composition en phospholipides des deux feuillets de la membrane plasmique en facilitant le transfert bidirectionnel de toutes les classes de phospholipides. L'externalisation de la PS permet de déclencher entre autre la coagulation sanguine.

2. Les translocases énergie-dépendantes

Chez les plantes, la distribution asymétrique des lipides dans les feuillets de différentes membranes est un phénomène pour lequel il existe de nombreuses observations. Dans l'enveloppe des plastes, la PC n'est présente que dans le feuillet cytosolique de la membrane externe (Dorne *et al.*, 1985). La membrane plasmique des plantes est aussi asymétrique comme dans les hématies, l'exposition de PS à la surface de la cellule étant à l'origine de mécanismes de mort cellulaire (O'Brien *et al.*, 1997). Enfin, le tonoplaste possède une dissymétrie avérée, la PE étant plus abondante dans le feuillet cytosolique (Tavernier et Pugin, 1995). Cependant, la signification biologique de cette asymétrie est encore mal connue.

Deux familles de translocases ont été identifiées à ce jour. La famille la mieux caractérisée est celle des translocases à aminophospholipides appartenant aux groupes des

ATPases de type P. La première protéine identifiée de cette famille est DRS2, une translocase de levure (Tang *et al.*, 1996) dont le rôle est controversé. Le mutant *drs2* est affecté dans son internalisation de PS au niveau de la membrane plasmique et est sensible au froid. Cependant, cette étude n'a pu être reproduite et de nouvelles données semblent montrer que DRS2 n'est pas la translocase exclusive de la membrane plasmique : DRS2 est localisée dans le trans-Golgi, interagit avec de nombreux partenaires et semble impliquée dans la formation de vésicules membranaires (pour revue, voir Pomorski *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis*, onze gènes ont été identifiés appartenant à cette famille (ALA1 à 11). ALA1 présente la plus forte homologie avec DRS2 et son expression dans le mutant *drs2* restaure l'internalisation de PS au niveau de la membrane plasmique et la résistance au froid (Gomès *et al.*, 2000). Bien que la fonction d'ALA1 semble aujourd'hui identifiée, sa localisation et son importance dans la plante ainsi que les rôles des autres protéines ALA restent à caractériser.

La deuxième famille correspond à celle des transporteurs ABC. Des études de résistance multi-drogues dans des cellules cancéreuses et chez la levure ont montré que certains transporteurs ABC intervenaient dans l'externalisation de lipides au niveau de la membrane plasmique (pour revue, voir Raggars *et al.*, 2000). *Arabidopsis* contient cinquante-trois gènes appartenant à cette famille de grosses protéines d'environ 150 kDa, contenant deux domaines hydrophobes et deux domaines hydrophiles. Les données récentes sur les transporteurs ABC montrent que les fonctions de cette famille de protéines ne sont pas réduites au processus de détoxification : elles participent à la biosynthèse des chlorophylles, à la formation des centres fer-soufre, au mouvement des stomates et probablement aux flux ioniques ; les translocateurs ABC ont un rôle central dans la croissance et le développement de la plante (pour revue, voir Martinoia *et al.*, 2002). TGD1, décrite précédemment, appartient à cette famille et serait impliqué dans le transfert du DAG du réticulum vers les plastes (Xu *et al.*, 2003). De plus, le transporteur potentiel d'acide gras des plastes, identifié dans le génome d'*Arabidopsis* (At1g54350), appartient aussi à cette famille des transporteurs ABC. Le rôle des transporteurs ABC dans la translocation de lipides semble donc important mais il reste à caractériser.

C- Transfert de lipides par l'intermédiaire de vésicules

1. Voie sécrétrice

Le réticulum endoplasmique, site de synthèse de la majorité des phospholipides, des stérols, des sphingolipides et de nombreuses protéines, est un organite central de la cellule, en

relation avec tous les autres compartiments. Lors de l'interphase, il est en contact direct avec le noyau ; en microscopie électronique, les membranes du réticulum et du noyau sont en continuité bien qu'un rétrécissement du lumen du réticulum soit observé au niveau de leur jonction (Staelin, 1997). Avec ou sans l'intervention de l'appareil de Golgi, le réticulum contribue à l'approvisionnement en protéines et lipides des vacuoles et de la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules se déplaçant le long de filaments d'actine (Samaj *et al.*, 2004).

Le mécanisme général de transfert par vésicules implique des transferts de bicouche lipidique. Il s'effectue en plusieurs étapes. Des petites GTPases de type Ras, couplées avec des facteurs échangeurs de GTP permettent le recrutement et l'ancrage à la membrane donneuse des complexes impliqués dans la formation des vésicules. Des protéines de manteau de type adaptatine ou clathrine peuvent éventuellement faire partie de ces complexes. Les vésicules se séparent de la membrane donneuse par des mécanismes peu connus et se déplacent par le biais du cytosquelette d'actine, de moteurs moléculaires tels que les myosines et de dynamines. L'ancrage et la fusion à la membrane réceptrice s'effectuent par l'intermédiaire de protéines de type SNARE, présentes à la fois sur les vésicules et la membrane réceptrice, et des petites GTPases.

Malheureusement, bien que le transfert par vésicule implique une bicouche lipidique, le mécanisme de formation vésiculaire a surtout été étudié du point de vue des protéines et très peu de données sont connues au niveau des lipides. Aucune information concernant la composition lipidique de ces vésicules, quand elles ont pu être caractérisées, n'est documentée. De même, la vitesse de transfert de ces lipides et leur taux de renouvellement n'ont pas été étudiés chez les plantes. L'ensemble du paragraphe suivant a pour objectif de regrouper les informations connues aujourd'hui du point de vue des lipides. La Figure 11 présente l'ensemble des voies impliquées dans ces transferts.

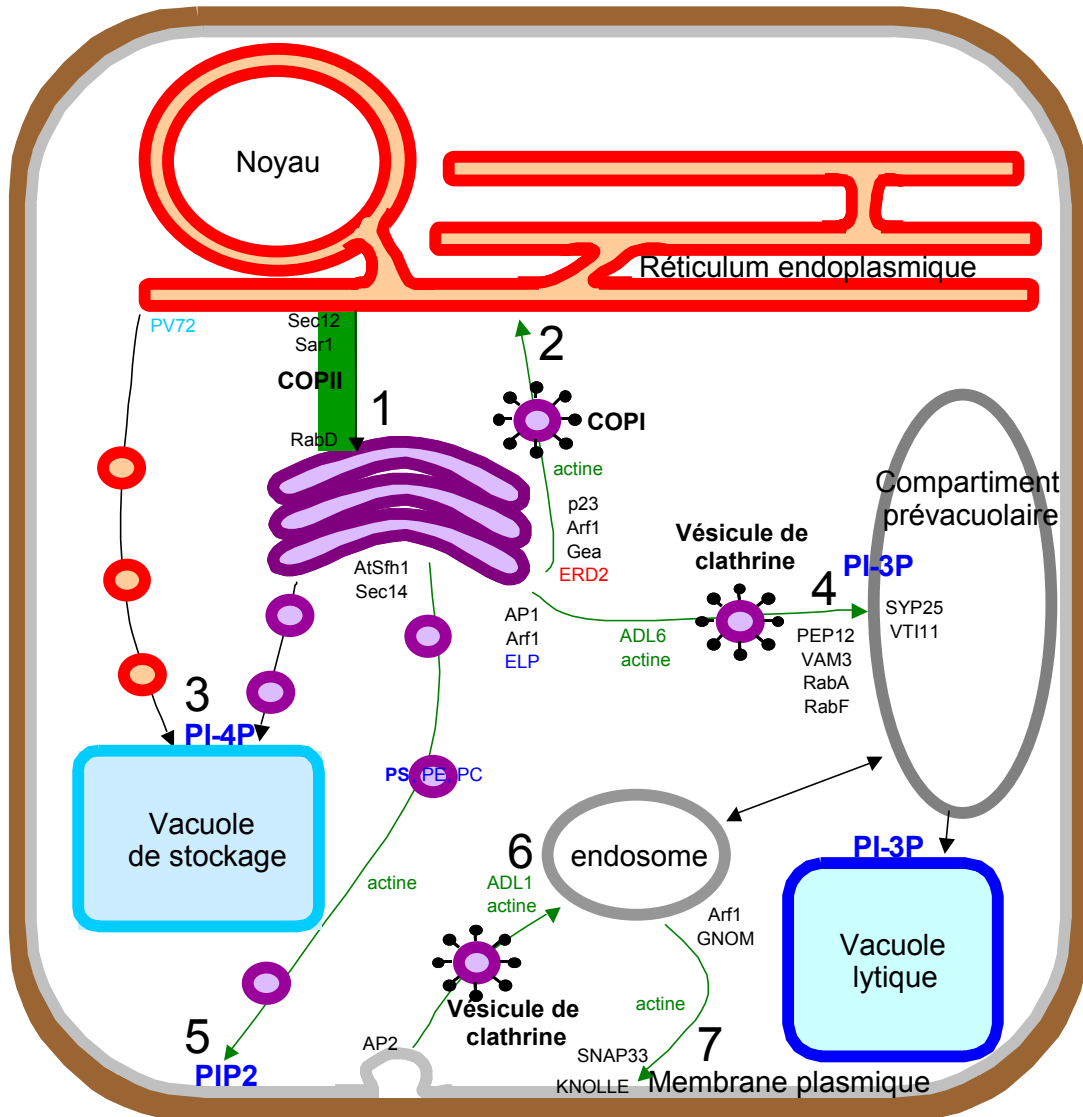


Figure 11 : Schéma simplifié de la voie sécrétrice des plantes d'après Hawes, 2005. Ce schéma montre les différentes voies à partir du réticulum endoplasmique et les différentes protéines impliquées dans le trafic vésiculaire. Les formes phosphorylées du PI adressent les vésicules dans différents compartiments : PI-4P à la vacuole de stockage, PI-3P à la vacuole lytique et PIP2 à la membrane plasmique. 1- Le transfert antérograde du réticulum vers le Golgi fait intervenir une machinerie vésiculaire de type COPII. Les protéines identifiées dans ce transfert sont la GTPase Sar1, le facteur échangeur de GTP Sec12, les complexes Sec13 et Sec23 du manteau, et la GTPase RabD. 2- Le transfert rétrograde du Golgi vers le réticulum fait intervenir une machinerie vésiculaire de type COPI. Les protéines identifiées dans ce transfert sont la GTPase Arf1, en interaction avec une protéine transmembranaire p23, le facteur échangeur de GTP Gea, le récepteur du motif H/KDEL responsable du trafic protéique rétrograde ERD2. Ce transfert est dépendant de l'actine. 3- Le transfert du réticulum et du Golgi vers la vacuole de stockage par le biais de vésicules denses n'est pas caractérisé. La seule protéine identifiée dans ce transfert est le récepteur d'adressage à la vacuole de stockage PV72. 4- Le transfert du Golgi vers la vacuole lytique en passant par le compartiment prévacuolaire fait intervenir une machinerie vésiculaire de type clathrine. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont la GTPase Arf1, le récepteur du motif d'adressage à la vacuole BP80 capable de recruter AP1, le complexe adaptateur AP1, et la clathrine. La fusion au compartiment prévacuolaire implique les v-SNARE PEP12 et VAM3, les t-SNARE SYP25 et VTI11, et les GTPases RabA et RabF. Ce transfert est dépendant de l'actine et de la dynamine ADL6. 5- Le transfert du Golgi vers la membrane plasmique n'est pas identifié. Aucune protéine intervenant dans la formation et la fusion des vésicules n'a été trouvée. Seules deux PI-TP, Sec14 et Sfh1, ont été caractérisées. Ce transfert est dépendant de l'actine. 6- L'endocytose fait intervenir une machinerie vésiculaire de type clathrine. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont le complexe adaptateur AP2, et la clathrine. Ce transfert est dépendant de l'actine et de la dynamine ADL1. et 7- L'exocytose fait intervenir une machinerie vésiculaire non caractérisée. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont la GTPase Arf1 et le facteur échangeur de GTP GNOM. La fusion à la membrane plasmique implique la t-SNARE KNOLLE et la v-SNARE SNAP33.

a) Echanges entre le réticulum et le Golgi

La voie antérograde du réticulum vers le Golgi transfère à la fois des phospholipides, des stérols et des sphingolipides. Cependant, la composition en lipides du Golgi est intermédiaire entre celle du réticulum et de la membrane plasmique (Keenan et Morre, 1970 ; Moreau *et al.*, 1998), c'est à dire que ces membranes s'enrichissent progressivement en stérols et sphingolipides, sans enrichissement particulier en glycérolipides. Ce transfert est spécifique des stérols et des sphingolipides. Chez les mammifères et les levures, le transfert de lipides et de protéines entre le réticulum et le Golgi a lieu par l'intermédiaire de vésicules mantelées appelées COPII (Figure 12). Chez les plantes, l'appareil de Golgi est présent en plusieurs exemplaires très proches du réticulum et aucune vésicule de type COPII n'a été identifiée, bien que des protéines homologues à celles des levures et des animaux intervenant dans la formation de COPII aient été identifiées (Hawes, 2005).

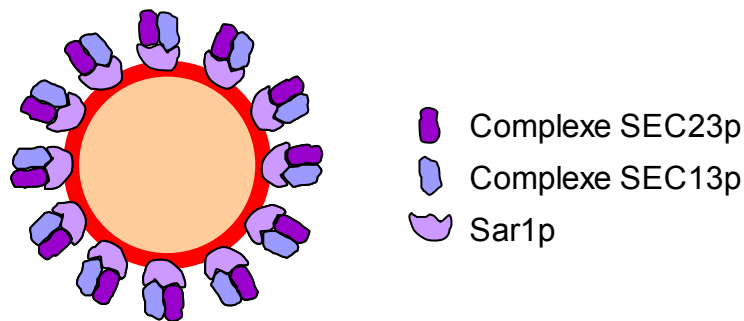


Figure 12 : Représentation schématique d'une vésicule COPII. La plupart des homologues de Sar1, Sec13 et Sec 23 ont été clonés et caractérisés chez les plantes. Sar1p appartient à la superfamille des petites GTPases Ras. Sec12, une protéine transmembranaire du réticulum, catalyse l'échange du GDP par du GTP sur Sar1p et favorise son recrutement dans le réticulum ; elle ne fait qu'initier la formation des vésicules car elle est absente des vésicules. Le recrutement de Sar1p induit l'assemblage des protéines du manteau, composées des complexes SEC23 et SEC13. La fusion des vésicules avec la membrane réceptrice du Golgi est catalysée par une petite GTPase de type RabD, vraisemblablement Rab1 (Jürgens, 2004).

Chez les plantes, le transfert antérograde fait intervenir des fusions membranaires, utilise la machinerie COPII mais ne semble pas passer par une étape de vésicules isolées. Il ne dépend pas du fonctionnement des microtubules et de l'actine et pourrait s'effectuer par contact prolongé entre le réticulum et le Golgi (Brandizzi *et al.*, 2002).

La voie rétrograde du Golgi vers le réticulum est assurée par des vésicules de type COPI identifiées chez les plantes (Figure 13). Ce processus transfère des protéines adressées au réticulum par le motif H/KDEL présent à l'extrémité C-terminal de la protéine mais aucune donnée n'est connue sur une éventuelle ségrégation des lipides. Le mouvement nécessite la participation de filament d'actine et de myosine mais les interactions n'ont pas encore été clairement caractérisées.

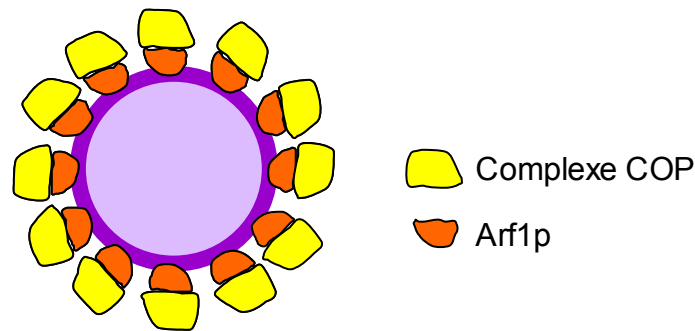


Figure 13 : Représentation schématique d'une vésicule de type COPI. Un récepteur du motif H/KDEL, ERD2, a été identifié chez les plantes et est présent dans les vésicules COPI. De la même manière que COPII, la machinerie est composée d'une GTPase, Arf1p, qui interagit avec une protéine transmembranaire du Golgi, p23. Les protéines qui catalysent l'échange du GDP avec le GTP affectent le devenir des vésicules. Pour la formation de COPI, il s'agit vraisemblablement de Gea qui a été identifié chez *Arabidopsis* et qui est recruté par ERD2 (pour revue, voir Hanton *et al.*, 2005).

b) Transfert vers les vacuoles

Chez les plantes, il existe deux formes de vacuoles. D'une part, une vacuole de stockage est présente dans les tissus de réserves, cotylédons et endospermes ; elle est caractérisée par un pH neutre, la présence d' α -TIP (tonoplast integral protein) et de protéines de réserves, telles que les prolamines et les globulines. D'autre part, une vacuole lytique correspond à la vacuole classique des tissus végétatifs ; la vacuole lytique est caractérisée par un pH acide, la présence de γ -TIP et de protéases luménales. Ces deux vacuoles possèdent des mécanismes d'adressage de protéines différents (Staehelein, 1997), mais peu de données sont connues quant à l'adressage des lipides.

La composition lipidique de la vacuole de stockage n'est pas caractérisée et les mécanismes de transfert, suivant les tissus et les espèces étudiées, diffèrent. Deux types d'approvisionnement en lipides de cette vacuole ont pu être identifiés : l'un provenant du réticulum, correspondant aux vésicules appelées "precursor-accumulating compartment" contenant les prolamines, et l'autre dérivant du Golgi correspondant aux vésicules denses, contenant les globulines (Matsuoka et Bednarek, 1998). Les mécanismes communs semblent indiquer que les protéines adressées à la vacuole de stockage possèdent un domaine d'adressage en C-terminal et que cette voie de transfert implique une activation par le PI-4P, car elle est sensible à la Wortmannin, un inhibiteur de PI-kinase (Matsuoka *et al.*, 1995).

La vacuole lytique peut-être comparée aux lysosomes des animaux. Les lipides sont issus de vésicules mantelées de clathrine (Figure 14) qui sont transférées du réticulum vers un compartiment prévacuolaire, vraisemblablement grâce au cytosquelette d'actine et à la dynamine, capable de lier l'actine (Samaj *et al.*, 2004). Malheureusement, les transferts entre

le compartiment prévacuolaire et la vacuole sont encore très peu connus et aucune donnée n'existe sur les transferts de lipides qu'ils impliquent, du réticulum jusqu'à la vacuole.

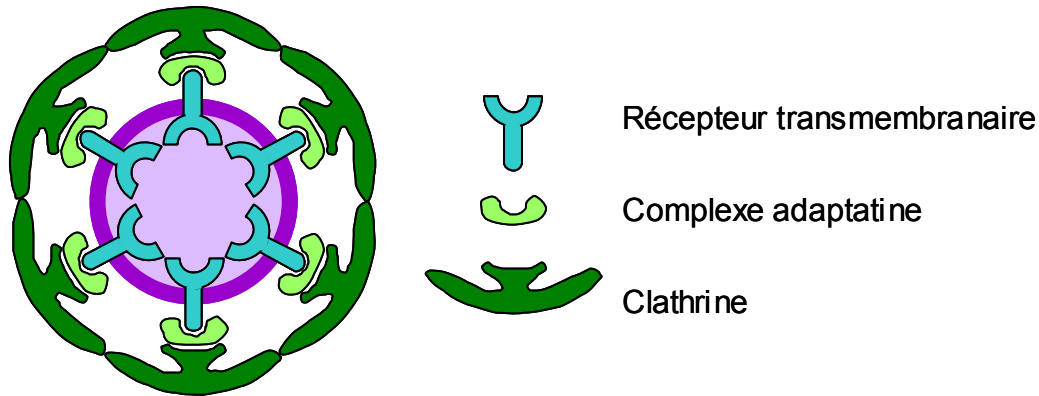


Figure 14 : Représentation schématique d'une vésicule mantelée de clathrine. Le récepteur membranaire intervenant dans l'adressage des protéines à la vacuole lytique appartient à la famille des récepteurs d'adressage à la vacuole, il s'agit de BP80 pour le pois ou AtELP pour *Arabidopsis*. Ces récepteurs possèdent un motif tyrosine YMPL qui se lie au complexe adaptatine AP1. L'adaptatine recrute ensuite les molécules de clathrine pour former les vésicules mantelées de clathrine sous la dépendance de la GTPase Arf1 (Jürgens, 2004). La fusion de ces vésicules avec le compartiment prévacuolaire s'effectue grâce à des protéines de type SNARE : deux complexes v-SNARE sont localisés sur les vésicules PEP12 et VAM3 et se lient aux complexes t-SNARE SYP25 et VTI11 du compartiment. Pour catalyser cette fusion, l'implication de GTPases de type RabA semblent nécessaire (Jürgens, 2004).

Le PI-3P intervient dans le transfert des vésicules du Golgi vers la vacuole lytique. Chez les animaux et les levures : une protéine appelée EEA (early endosome antigen) lie le PI-3P avec l'intervention de RabF et permet la fusion des endosomes. La surexpression du domaine de EEA liant le PI-3P chez *Arabidopsis* indique qu'il est adressé progressivement du Golgi vers la vacuole en passant par le compartiment prévacuolaire et, par compétition, la surexpression de ce domaine inhibe le trafic de protéines classiquement adressées à la vacuole en piégeant le PI-3P disponible (Kim *et al.*, 2001). La dynamine ADL6, capable de se lier à l'adaptatine et à l'actine, possède un domaine PH spécifique du PI-3P. Or, sa mutation supprime le trafic des protéines adressées à la vacuole. Elle pourrait être le lien entre le PI-3P et l'adressage à la vacuole (Lee *et al.*, 2002).

c) Transfert vers la membrane plasmique

La membrane plasmique des cellules végétales contient des domaines lipidiques et/ou protéiques. Un domaine correspond à une zone de membrane, organisée ou non, qui a une composition en lipides et/ou en protéines différente de la membrane dans sa globalité. Par exemple, un type de domaine défini correspond aux rafts ; il s'agit de domaines membranaires résistants aux détergents, enrichis en stérols et sphingolipides et récemment caractérisés chez le tabac et *Arabidopsis* (Mongrand *et al.*, 2004 ; Borner *et al.*, 2005). Ces domaines recrutent un ensemble spécifique de protéines. Les autres domaines connus de la membrane plasmique

sont des domaines qui diffèrent dans leur composition protéique en fonction de leur position dans la cellule : par exemple, dans les cellules vasculaires, le transporteur responsable de l'efflux d'auxine, PIN1, est localisé au pôle basal alors que celui responsable de l'influx, AUX1, est au pôle apical (Jürgens, 2004). En revanche, aucune donnée fine concernant la composition lipidique de ces domaines protéiques n'est connue ni dans le domaine végétal, ni dans le domaine animal. La membrane plasmique est formée à partir de vésicules issues du Golgi. Excepté pour les rafts, qui d'après les données obtenues sur cellules animales, seraient organisés dans le Golgi et ensuite exportés dans la membrane plasmique (Ikonen, 2001), nous ne savons pas comment ces domaines sont constitués, ni où ils ont pu être formés.

Le trafic lipidique du Golgi vers la membrane plasmique utilise en partie des vésicules de transport dont la nature et les séquences d'adressage protéiques n'ont pas encore été identifiées bien que des données prouvent qu'elles existent (Lefebvre *et al.*, 2004). Elles sont transportées par l'intermédiaire de filaments d'actine (Samaj *et al.*, 2004).

Le PIP₂ semble jouer un rôle dans le trafic vers la membrane plasmique (Meijer et Munnik, 2003). Un homologue de SEC14, une PI-TP (PI transfer protein), a été identifié chez *Arabidopsis* et complémente un mutant *sec14* de la levure. Chez la levure, l'inactivation de SEC14 bloque la sécrétion des protéines au niveau du Golgi. Or, une mutation dans les gènes impliqués dans la voie nucléotidique de la synthèse de PC supprime l'effet d'une mutation de *sec14*. En effet, SEC14 pourrait lier le PI aussi bien que la PC et serait un inhibiteur de la CTP:phosphocholine cytidyltransferase. SEC14 servirait de "senseur" de la composition lipidique de la membrane plasmique et inhiberait la synthèse de la PC quand celle-ci serait trop abondante. Ce rôle hypothétique n'a pas encore été caractérisé chez les plantes (Jouannic *et al.*, 1998). Une autre PI-TP, AtSfh1p, appartenant à la famille SEC14-noduline, a été caractérisée chez *Arabidopsis*. Elle régulerait le trafic intracellulaire des poils racinaires en transférant du PIP₂ dans les zones de la membrane plasmique où doivent être adressées les vésicules (Vincent *et al.*, 2005).

L'utilisation de monensine, un inhibiteur de la voie sécrétrice, a permis de déterminer quels lipides étaient acheminés à la membrane plasmique par cette voie : les lipides à très longues chaînes d'acide gras ainsi que la PS ne sont plus présents dans la membrane plasmique en présence de monensine, alors que la teneur en PI n'est absolument pas affectée et que celle en PE et PC est réduite de moitié (Moreau *et al.*, 1998). La PS de la membrane plasmique est donc exclusivement transférée à partir de la voie vésiculaire bien qu'une partie puisse être synthétisée sur place par échange de tête polaire (Vincent *et al.*, 1999), la PE et la PC proviennent en partie de cette voie et le PI passe par un autre chemin.

d) Endocytose et exocytose

L'endocytose chez les plantes a été longtemps remise en question à cause de la pression de turgescence et de la rigidité de la paroi. Cependant, il a été montré que la brefeldine A, un inhibiteur de l'exocytose, provoque l'internalisation de plusieurs protéines de la membrane plasmique, comme AUX1 et PIN1, dans un compartiment appelé endosome (Samaj *et al.*, 2004). La distinction entre l'endosome et le compartiment prévacuolaire n'est pas encore claire (Holstein, 2002). Le devenir des protéines internalisées est double : elles peuvent être recyclées dans la membrane plasmique ou envoyées à la vacuole lytique, d'où l'idée que l'endosome et le compartiment prévacuolaire se confondent. Cependant, aucune donnée spécifique sur les lipides participant à ces phénomènes ainsi que sur leur trafic n'est connue.

Deux voies ont été montrées pour l'endocytose chez les plantes : l'une est catalysée par la formation de vésicules de clathrine qui sont transportées grâce aux cytosquelette d'actine (Samaj *et al.*, 2004) ; l'autre comme l'endocytose de PIN dépendrait de la présence de stérol et des rafts (Murphy *et al.*, 2005). Chez les végétaux, aucun récepteur de motif d'adressage protéique, malgré la détection de certaines homologues avec les récepteurs de levures, n'a été identifié permettant la formation de vésicules de clathrines (Holstein, 2002). En revanche, deux sous-unités, α C-adaptatine et AP180, du complexe adaptateur AP2 ont été caractérisées chez *Arabidopsis* : AP180 est une protéine qui catalyse l'assemblage des clathrines et l' α C-adaptatine lie AP180 ainsi que des protéines similaires à celles intervenant dans l'endocytose des mammifères, telles que la dynamine, vraisemblablement ADL1 chez *Arabidopsis*. Les protéines intervenant ensuite dans la fusion de ces vésicules avec l'endosome ne sont pas encore caractérisées (Samaj *et al.*, 2004).

Le transfert de l'endosome/compartiment prévacuolaire vers la vacuole n'est pas connu à part la participation vraisemblable de PI-3P (Jürgens, 2004 ; voir paragraphe b) ; cependant, le recyclage vers la membrane plasmique a été en partie caractérisé. La voie de recyclage est appelée Arf1/GNOM/PIN et est dépendante de l'actine. En effet, la brefeldine A supprime le recyclage à la membrane plasmique de la protéine PIN en inhibant GNOM, une protéine qui catalyse l'échange du GDP par du GTP sur Arf1, la petite GTPase citée précédemment dans le trafic vésiculaire vers le Golgi et la vacuole lytique (voir paragraphe b). Ce trafic intervient sur d'autres protéines que PIN, comme des ATPases et AUX1. La fusion des vésicules avec la membrane plasmique serait catalysée par la t-SNARE, KNOLLE, et la v-SNARE, SNAP33.

Le trafic vésiculaire de la voie sécrétrice a été très peu étudié du point de vue du trafic des glycérolipides. Pour résumer, le trafic réticulum-Golgi ne possède pas de spécificité pour les glycérolipides, la spécificité du trafic vers les vacuoles est inconnue ; alors que dans le trafic vers la membrane plasmique, la PS est exclusivement transférée par les vésicules alors que la PE et la PC ne le sont qu'en partie et que le PI n'est pas transféré par ces vésicules. Enfin, les formes phosphorylées du PI activent l'orientation spécifique des vésicules aux différents compartiments : PI-4P dans la vacuole de stockage, PI-3P dans la vacuole lytique et PIP2 dans la membrane plasmique.

2. Transfert de l'enveloppe vers les thylacoïdes.

Les glycérolipides synthétisés dans l'enveloppe plastidiale sont exportés de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes vers les thylacoïdes (Rawlyer *et al.*, 1995). Le mécanisme détaillé de ce transfert est très imprécis mais les données existantes soutiennent l'existence d'un trafic vésiculaire. La formation de vésicules à partir de la membrane interne a été observée en microscopie électronique (Carde *et al.*, 1982; Morré *et al.*, 1991a). Des études de bio-informatique ont aussi montré qu'une machinerie similaire à celle des vésicules COPII de la voie cytosolique a été trouvée dans les chloroplastes (Andersson et Sandelius, 2004). La voie vésiculaire des plastes est dépendante de l'ATP et de protéines du stroma (Morré *et al.*, 1991b; Röntfors *et al.*, 2000). Certaines ont été identifiées intervenant dans ce processus : une protéine homologue à NSF (Huguency *et al.*, 1995), une protéine homologue de la dynamine (Park *et al.*, 1998) et une protéine induisant la formation de vésicules (VIPP1) (Kroll *et al.*, 2001). Dans un mutant de délétion de *vipp1*, la formation des membranes des thylacoïdes est supprimée indiquant que VIPP1 est essentiel pour la maintenance des thylacoïdes par une voie de transport vésiculaire. Le lien entre toutes ces protéines et leur mécanisme d'intervention reste cependant à déterminer.

Le transfert vésiculaire est donc impliqué dans l'approvisionnement en lipides des organites de la voie sécrétrice et des thylacoïdes. Cependant, il ne fournit pas tous les lipides nécessaires à la membrane plasmique et il n'intervient pas dans le transfert des lipides vers les mitochondries et les plastes. Il existe un autre mode de transfert de lipides, le contact membranaire entre deux organites. Par opposition au transfert vésiculaire, le transfert par contact ne fait pas intervenir de fusion membranaire.

D- Transfert par contact membranaire

Chaque organite possède son propre mécanisme pour se positionner dans la cellule et les positions sont coordonnées permettant à chaque organite d'accomplir sa fonction. Les mouvements des organites sont majoritairement actine-dépendant dans des cellules végétatives en interphase et cette mobilité permet le rapprochement des organites et la formation de zones de contacts. Ces zones de contacts peuvent favoriser le transfert de lipides par l'intervention de protéines de transfert de lipides (lipid transfer protein ou LTP) qui sont enrichies dans ces régions d'accolement membranaire.

1. Zones de contact intermembranaires.

Sur un plan topologique à l'échelle de la cellule, le réticulum possède de nombreux sous-domaines spécialisés qui interagissent avec d'autres organites comme les mitochondries, la vacuole, la membrane plasmique, les gouttelettes lipidiques et les chloroplastes (Staehelein, 1997) (Figure 15).

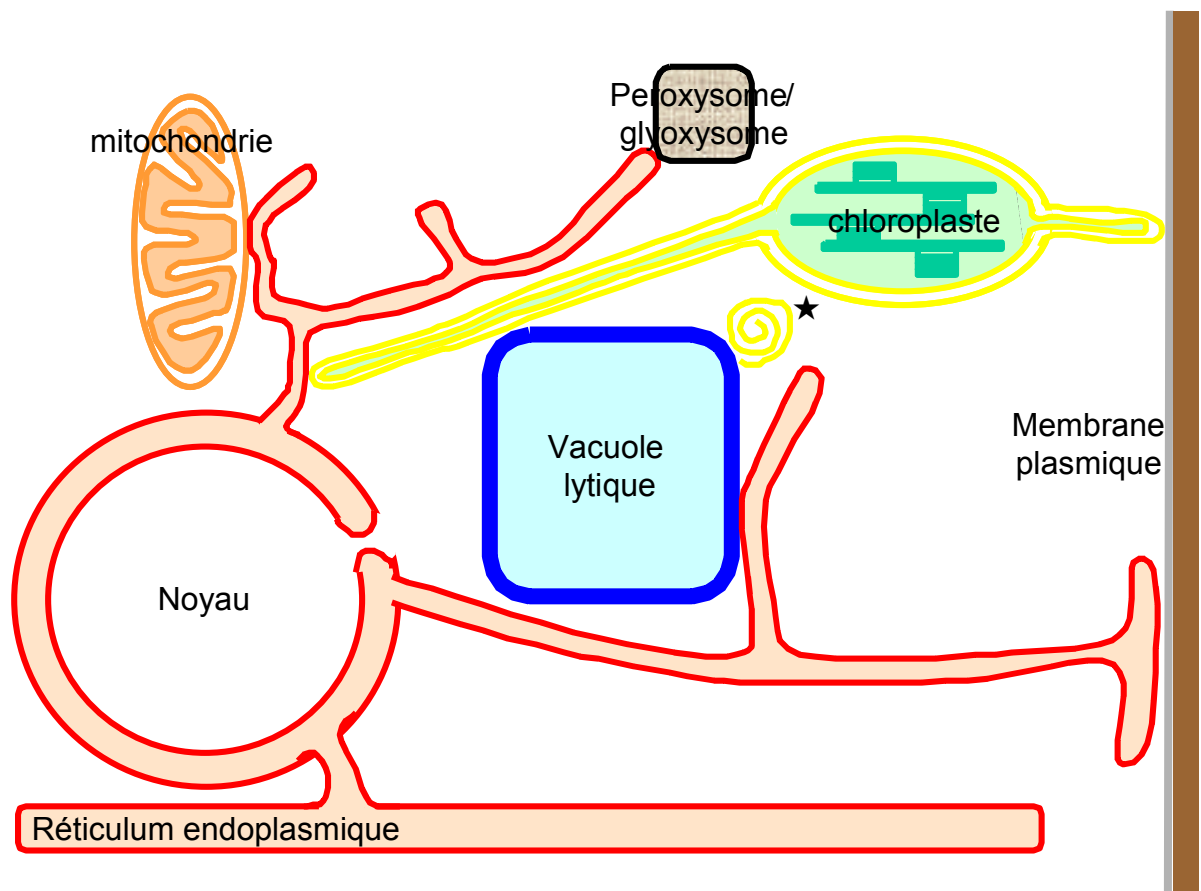


Figure 15 : Transfert de lipides au niveau de zones de contact. Le réticulum forme un réseau qui facilite le transfert de lipides entre les organites. Les chloroplastes créent des extensions de l'enveloppe sous forme de stromules ou de structure myélinique, indiquée par une étoile.

Dans les zones de contact membranaires, les membranes sont distantes de moins de 10 nm (Holthuis et Levine, 2005). La zone de contact la mieux caractérisée, sur le plan structurel et dynamique est, chez les levures, celle entre les mitochondries et le réticulum. En effet, la synthèse de PE de ces organismes a lieu dans les mitochondries par décarboxylation de la PS qui est synthétisée dans le réticulum. Des domaines particuliers du réticulum appelés MAM (Mitochondria Associated Membrane) sont enrichis en PS synthase, permettant l'approvisionnement des mitochondries en PS. Le transport de la PS vers la membrane externe des mitochondries n'est pas entièrement caractérisé. A ce jour, les données relatives au transfert de la PS sont la dépendance en ATP, la stimulation par le calcium, le magnésium et une protéine S100B qui fixe le calcium et interagirait avec l'annexine, et un mécanisme régulateur faisant intervenir une SCF (Skp1-Cul1-F-box protein) ubiquitine ligase (Voelker, 2003). La PS est ensuite insérée dans la membrane interne par un mécanisme encore inconnu, vraisemblablement facilité par la présence de sites de contact entre les membranes interne et externe des mitochondries (Reichert et Neupert, 2002). Puis, la PS est décarboxylée dans la membrane interne pour former de la PE, qui peut retourner au réticulum sans doute par le biais des MAM, même si aucune caractéristique n'est connue sur ce transfert. Chez les plantes, le mécanisme de synthèse et de transfert de la PE semble exister mais il n'apparaît pas comme majoritaire (Rontein *et al.*, 2003a ; Rontein *et al.*, 2003b). Le fonctionnement des MAM pourrait aussi expliquer le transfert des phospholipides constitutif des membranes mitochondriales, qui sont majoritairement synthétisés dans le réticulum.

Chez les levures, la PE peut aussi être transférée du réticulum à la membrane plasmique selon le même mécanisme au niveau de domaine PAM (Plasma membrane Associated Membrane) (Holthuis et Levine, 2005). Les interactions PAM-membrane plasmique contiennent des éléments du cytosquelette d'actine et sont sensibles aux enzymes de digestion de la paroi (Kunst et Samuels, 2003). Des interactions similaires ont aussi été observées entre le réticulum et la vacuole. L'ancrage du réticulum à la vacuole ou à la membrane plasmique pourrait servir de plateformes semi-immobiles auxquelles s'attacheraient les filaments d'actine pour faire migrer les extensions du réticulum (Staelin, 1997). Ces zones de contact pourraient expliquer le transfert de PE, PC et PI insensible à la monensine, molécule inhibitrice de la voie sécrétrice, et feraient intervenir des protéines de transfert de lipides (voir ci-dessous).

Par analogie aux MAM, les PLAM (PLastid Associated Membrane) ont été caractérisées (Sandelius et Andersson, 2003). Les PLAM pourraient permettre le transfert du DAG de structure eucaryote du réticulum vers les plastes pour la synthèse des galactolipides.

Les plastes sont aussi capables de produire des structures tubulaires appelées stromules capables d'interagir avec d'autres plastes voire avec d'autres organites (Figure 15). Les stromules sont des structures très dynamiques impliquant les deux membranes de l'enveloppe et le stroma des plastes (pour revue, voir Natesan *et al.*, 2005). Dans différents tissus de tabac et d'*Arabidopsis*, les stromules interagissent avec le noyau, la membrane plasmique et les mitochondries. Ils pourraient donc intervenir dans des transferts entre ces membranes même si le rôle des stromules n'est pas encore connu (Kwok et Hanson, 2004a et 2004b). D'autres évaginations de l'enveloppe ont aussi été visualisées, ressemblant à des structures de type myélinique, et semblent intervenir dans un transfert de substances des plastes vers la vacuole (Vaughn et Duke, 1981).

Dans toutes ces zones de rapprochement, il n'y a pas de fusion de membrane. Des protéines interviennent donc certainement dans la formation de "ponts" entre les organites pour stabiliser les zones de contact et permettent le transfert des lipides dans ces zones.

2. Les protéines de transfert de lipides ou LTP.

Au niveau des zones de contact, deux modèles d'actions des LTP sont possibles (Holtuis et Levine, 2005). En effet, les LTP possèdent vraisemblablement deux domaines de reconnaissance, l'un de la membrane donneuse et l'autre de la membrane réceptrice. Elles peuvent soit se déplacer d'une membrane à l'autre, soit être déjà fixées aux deux membranes (Figure 16). Actuellement, seul un "pont" protéique inter-organite a été caractérisé chez la levure entre le noyau et la vacuole (Pan *et al.*, 2000). Ce "pont" contient une protéine de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire qui se lie à une protéine présente en surface de la vacuole, permettant la création d'une zone de contact entre ces deux organites sans fusion membranaire. Ce système de "pont" peut être envisagé pour d'autres organites et d'autres espèces.

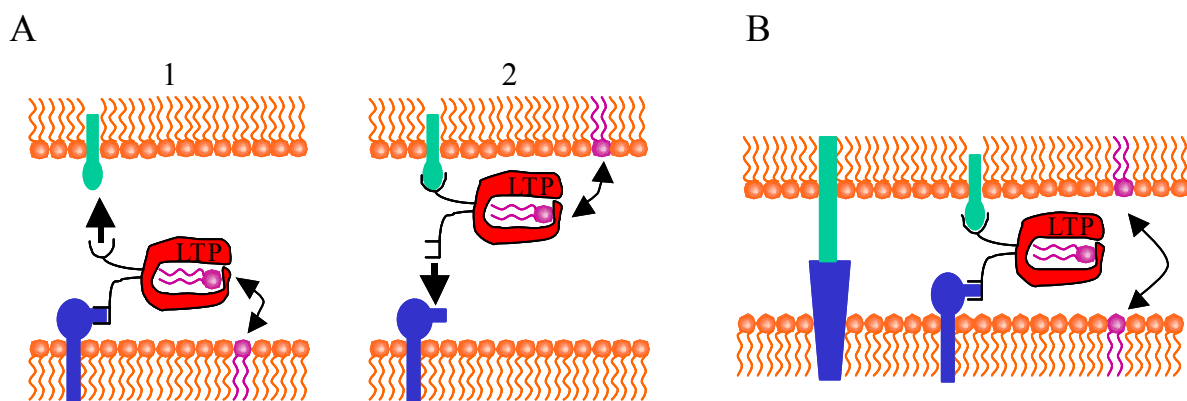


Figure 16 : Modes d'action possibles des LTP d'après Holtuis et Levine, 2005. A- La LTP navigue entre les deux membranes. B- La LTP interagit avec les deux membranes simultanément, ce modèle est privilégié pour les LTP possédant des domaines transmembranaires.

Chez la levure, certaines LTP (Osh1, 2 et 3) ont été localisées au niveau de zones de contact du réticulum (Holtuis et Levine, 2005). Elles appartiennent à la famille des oxysterol binding protein (OSBP), leur spécificité reste indéterminée. Chez *Arabidopsis*, douze homologues ont été identifiés mais aucun n'a été étudié (Tableau 5).

LTP	Lipide fixé	Locus Arabidopsis	Protéine	Caractérisation	TM	Localisation
Oxysterol binding protein						
Oxysterol binding protein	?	At1g13170	Osh3	Similarité de séquence	0	P
Oxysterol binding protein	?	At2g31020		Similarité de séquence	0	P
Oxysterol binding protein	?	At2g31030		Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At3g09300		Similarité de séquence	0	P
Oxysterol binding protein	?	At4g08180	OSBP	Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At4g12460	Osh1	Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At4g22540	Osh2	Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At4g25850		Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At4g25860		Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At5g02100		Similarité de séquence	0	P
Oxysterol binding protein	?	At5g57240	KES1	Similarité de séquence	0	-
Oxysterol binding protein	?	At5g59240		Similarité de séquence	0	-
StART impliqué dans les transferts de lipides						
PC transfer protein	PC	At1g55960		Similarité de séquence	1	P
PC transfer protein	PC	At1g64720	CP5	Similarité de séquence	1	S
PC transfer protein	PC	At3g13062		Similarité de séquence	1	M
PC transfer protein	PC	At3g23080		Similarité de séquence	1	-
PC transfer protein	PC	At4g14500		Similarité de séquence	2	-
PC transfer protein CERT	Céramide	At5g54170 ?		Similarité de séquence	2	S
PITP						
Type SEC14	PI/PC	At1g55840	SEC14	Complémentation fonctionnelle	0	-
Type SEC14	PI	At4g34580	AtSfh1/ COW1	Caractérisation d'un mutant d'insertion et complémentation fonctionnelle	1	-(Golgi)
Glycolipid transfer protein						
GLTP	sphingosine	At2g34690	ACD11	Caractérisation d'un mutant d'insertion, complémentation fonctionnelle et expression in vitro	0	-
GLTP	?	At4g39670		Similarité de séquence	0	-
GLTP	?	At2g33470		Similarité de séquence	0	-
GLTP	?	At3g21260		Similarité de séquence	0	-
Sterol carrier protein						
SCP	PL, stérol	At5g42890	SCP2	Expression in vitro	0	-(perox)
Lipid transfer protein non spécifique						
Lipid Transfer Protein type 1	-	At2g38540	LTP1	Expression in vitro	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At2g38530	LTP2	Expression in vitro	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At5g59320	LTP3	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At5g59310	LTP4	Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At3g51600	LTP5	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At3g08770	LTP6	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At2g18370	LTP7	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At2g15050	LTP8	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At2g15325	LTP9	Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At5g01870	LTP10	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At4g33555	LTP11	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At3g51590	LTP12	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 1	-	At4g08530	LTP15	Similarité de séquence	0	-
Lipid Transfer Protein type 2	-	At1g48750		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At1g66850		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At1g73780		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At3g18280		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At3g57310		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At5g38160		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At5g38170		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 2	-	At5g38180		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At1g32280		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At3g07450		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At3g52130		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At4g30880		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At4g33550		Similarité de séquence	0	S

LTP	Lipide fixé	Locus Arabidopsis	Protéine	Caractérisation	TM	Localisation
Lipid transfer protein non spécifique						
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g07230	A9	Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g48485		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g48490		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g52160		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g55410		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g55450		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g55460		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g56480		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 3	-	At5g62080		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 4	-	At3g53980		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 4	-	At5g05960		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g18280		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g27950		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g36150		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g55260		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g62790		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g70240		Similarité de séquence	0	
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g73550		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g73560		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At1g73890		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g13820		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g27130		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g37870		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g44290		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g44300		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g48130		Similarité de séquence	0	M
Lipid Transfer Protein type 5	-	At2g48140		Similarité de séquence	0	
Lipid Transfer Protein type 5	-	At3g22570		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At3g22580		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At3g22600		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At3g22620		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At3g43720		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At4g08670		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At4g12360		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At4g14815		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At4g22630		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At4g22640		Similarité de séquence	1	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At5g09370		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At5g13900		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 5	-	At5g64080		Similarité de séquence	2	S
Lipid Transfer Protein type 6	-	At4g22490		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 6	-	At4g22520		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 7	-	At3g58550		Similarité de séquence	0	S
Lipid Transfer Protein type 8	-	At4g28395	ATA7	Similarité de séquence	0	-

Tableau 5 : Gènes d'*Arabidopsis thaliana* potentiellement impliqués dans le transfert des lipides. La localisation des protéines déterminée par TargetP (Emanuelsson et al., 2000) est indiquée par la lettre P, pour plastidiale, M pour mitochondriale, S pour la présence d'un transit peptide. Les détails des localisations obtenues à partir de données biochimiques sont reportés dans le tableau entre parenthèses (Vincent *et al.*, 2005 ; Edqvist *et al.*, 2004). TM : nombre de domaines transmembranaires.

D'autres familles de LTP ont été caractérisées mais indépendamment des zones de contact. Les protéines StART (StAR (Steroidogenic-Acute-Response protein) related lipid Transfer protein) possèdent un domaine conservé d'environ 200 acides aminés impliqués dans des liaisons avec des lipides ou des stérols. 35 protéines contenant des domaines StART ont été identifiées chez *Arabidopsis*, elles ont différentes fonctions : facteur de transcription (protéines à homéodomaines ou leucine zipper), facteur activateur de GTPase ou transferts de lipides. Chez *Arabidopsis*, 6 homologues à StARD2, une PC-TP impliquée dans le réapprovisionnement en PC de la membrane plasmique, ont été identifiées (Schrick *et al.*, 2004). L'étude *in silico* des homologues de StARD2 montre que les produits de ces gènes

sont adressés aux trois compartiments, mitochondries, plastes et voie sécrétrice (Tableau 5). Sans oublier le transfert par l'intermédiaire de la lysoPC, ces protéines peuvent expliquer une partie du trafic intracellulaire de la PC, indépendante des voies vésiculaires. Une autre protéine de la famille StART, CERT (CEramide Related Transfer protein), a été récemment caractérisée chez les mammifères (Hanada *et al.*, 2003). Elle possède un domaine de liaison au réticulum et un autre au Golgi et permet ainsi le transfert des céramides du réticulum vers le Golgi. Cette protéine sert aujourd'hui de modèle pour les transferts de lipides inter-organites (Figure 16). Bien qu'aucun homologue proche n'ait été trouvé chez les plantes, il n'est pas exclu que d'autres protéines de type StART soient impliquées dans ces transferts.

Des PI-TP, n'appartenant pas à la famille StART, existent aussi chez les plantes ; SEC14 et Sfh1, déjà décrites, en sont des exemples. Il existe vraisemblablement d'autres types de PI-TP mais elles n'ont pas encore été étudiées (Vincent *et al.*, 2005). La famille des GLTP (GLycolipid Transfer Protein) correspond à des protéines intervenant principalement dans le transfert des glycosphingolipides ; elle comporte quatre gènes chez *Arabidopsis*. La protéine ACD11 est impliquée dans les mécanismes de mort cellulaire chez les plantes et, contrairement aux protéines de mammifères, elle transfère uniquement de la sphingosine (Brodersen *et al.*, 2002). Aujourd'hui, aucune donnée sur l'intervention éventuelle de ces protéines dans le transfert des galactolipides n'a été documentée chez les plantes mais du fait de leur ressemblance avec les galactocérobrosides, l'hypothèse n'est pas improbable. Enfin, une SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) a été identifiée chez *Arabidopsis*, transférant aussi bien des stérols que des phospholipides. SCP2 intervient dans le transfert des lipides vers les péroxysomes pour leur catabolisme (Edqvist *et al.*, 2004).

Chez les plantes, la famille de LTP la plus représentée ne possède pas de spécificité pour ses substrats lipidiques. Elle a été très bien caractérisée génétiquement et structurellement (pour revue Kader, 1996 ; Breiteneder et Mills, 2005). Il s'agit de petites protéines solubles de 7 à 9 kDa, qui transfèrent des lipides *in vitro* entre deux membranes. Une soixantaine de gènes a été identifiée chez *Arabidopsis* (Tableau 5), dont la majorité possède un peptide signal, signe qu'elles sont excrétées. Le rôle biologique de ces protéines n'est pas clairement identifié. Elles sont probablement impliquées dans l'embryogenèse, la formation de la paroi et la défense contre les pathogènes (Blein *et al.*, 2002).

Le trafic inter-organites a été peu étudié du point de vue des lipides. Maintenant que de nombreuses données ont été collectées au niveau des protéines, plusieurs études sont actuellement en cours au niveau des lipides. Des protéines intervenant dans le transfert lipidique tels que les flippases, les translocases ou les LTP commencent à être caractérisées.

Les spécificités des modes de transport de lipides d'une membrane à une autre ne sont pas connues, exceptées pour la membrane plasmique. L'ensemble de ces mécanismes et de leur régulation au sein de la cellule, en particulier végétale, reste à découvrir.

En outre, tous les trafics ne sont possibles que dans une cellule dynamique avec des organites mobiles. L'intervention de moteurs moléculaires et du cytosquelette est indispensable à la réalisation de l'ensemble des mécanismes décrits précédemment. L'utilisation d'inhibiteurs du cytosquelette ou des différentes voies décrites est d'ailleurs un outil précieux pour l'étude de ces trafics lipidiques.

Lors de ma thèse, nous avons choisi d'étudier la carence de phosphate car elle entraîne de grandes modifications de la composition lipidique des cellules végétales qui impliquent des transferts de lipides.

III. Réponse intégrée du métabolisme des lipides chez la plante en carence de phosphate

Le métabolisme des lipides est intégré à l'ensemble du métabolisme cellulaire. Pour comprendre les modifications lipidiques induites, il est important de situer des processus dans une vision d'ensemble de la réponse des plantes à la carence de phosphate.

A- Le phosphate dans la plante

1. Disponibilité du phosphate dans le sol

Le phosphore, peu abondant dans le sol, est assimilé par les plantes sous forme de phosphate (PO_4^{3-}). La concentration en phosphate dans la solution du sol est en général très faible, le plus souvent de l'ordre du μM . Les interactions électrostatiques du phosphate avec les particules du sol et la séquestration à la surface des argiles font que le phosphate est l'ion majeur le moins diffusible (Ragothama, 1999). Ainsi, dans la plupart des sols cultivés, 80 % de l'apport externe en engrais phosphaté est piégé et inutilisable par la plante. Le prélèvement du phosphate par les racines peut être plus rapide que sa diffusion dans le sol, provoquant une zone d'épuisement autour des racines. L'étape limitante de son absorption est la concentration à la surface de la racine près des sites de transport. La morphologie du système racinaire est un des premiers facteurs déterminants qui conditionnent les possibilités de croissance de la plante.

2. Le transport du phosphate

a) Transport du phosphate dans la plante

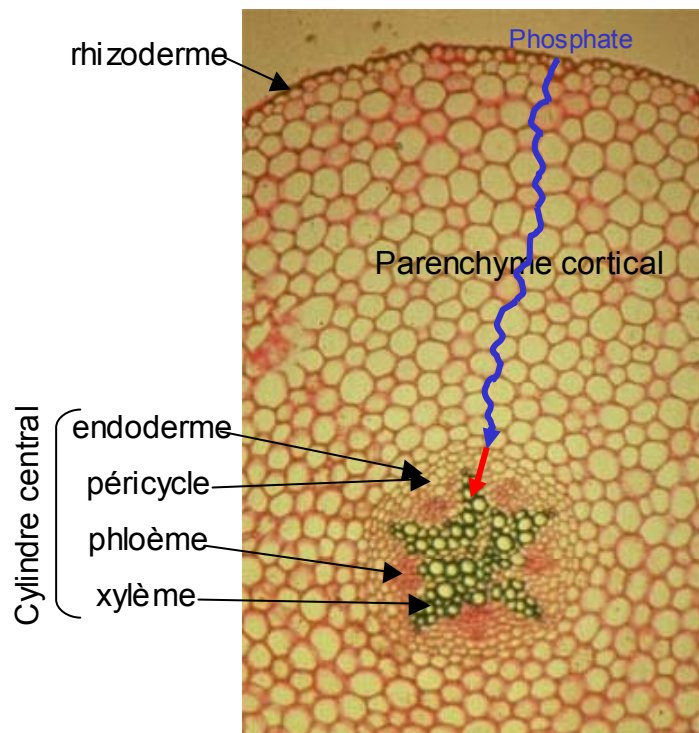


Figure 17 : Visualisation du trajet du phosphate dans la coupe transversale d'une racine d'hellébore. Le trajet apoplastique est représenté en bleu et la voie symplastique en rouge (photographie Hubert, 2001).

Le phosphate entre dans la racine par la voie apoplastique. Le maillage lâche de la paroi des jeunes cellules racinaires permet une filtration de la solution du sol jusqu'à l'endoderme. La paroi épaisse de l'endoderme bloque la diffusion et oblige les nutriments à pénétrer dans le cylindre central par la voie symplastique (intracellulaire) (Figure 17) (Smith, 2002). Ce transfert à travers l'endoderme nécessite l'intervention de transporteurs de phosphate, principalement de type Pht1 (Rausch et Bucher, 2002).

Après avoir pénétré dans les cellules racinaires, le phosphate est soit utilisé localement, soit stocké dans la vacuole, soit transporté dans le cytoplasme jusqu'au xylème pour un transport vers les autres organes de la plante. Une partie du phosphate absorbé est perdue par des phénomènes d'efflux, minimisé lors de la carence de phosphate (Ragothama, 1999).

Le phosphate circule librement dans le xylème et le phloème. Le chargement et le déchargement de ces tissus conducteurs sont encore très mal connus. L'étude des mutants *pho1* et *pho2* d'*Arabidopsis* donne des indications sur ces transports. Le mutant *pho1* est déficient dans le transfert du phosphate des racines vers le xylème ; Ses feuilles sont donc constitutivement carencées en phosphate (Poirier *et al.*, 1991). Les données récentes montrent

que PHO1 n'effectue pas directement le transport de phosphate mais contrôle son chargement dans le xylème en régulant un transporteur Pht1, directement ou indirectement par une chaîne de transduction du signal (Hamburger *et al.*, 2002). Le mutant *pho2* accumule le phosphate dans les feuilles à des concentrations supérieures à celles des plantes sauvages (Delhaize et Randall, 1995). Le gène *pho2* pourrait en fait intervenir dans la régulation de l'homéostasie cellulaire des feuilles en participant à la dégradation de protéines impliquées dans ce processus (Misson, 2004).

b) Transport du phosphate au sein de la cellule

Le phosphate sort des vaisseaux conducteurs par un mécanisme inconnu et pénètre dans les cellules par des transporteurs appartenant à la famille Pht1 ; il est ensuite distribué entre les organites par d'autres transporteurs (Figure 18).

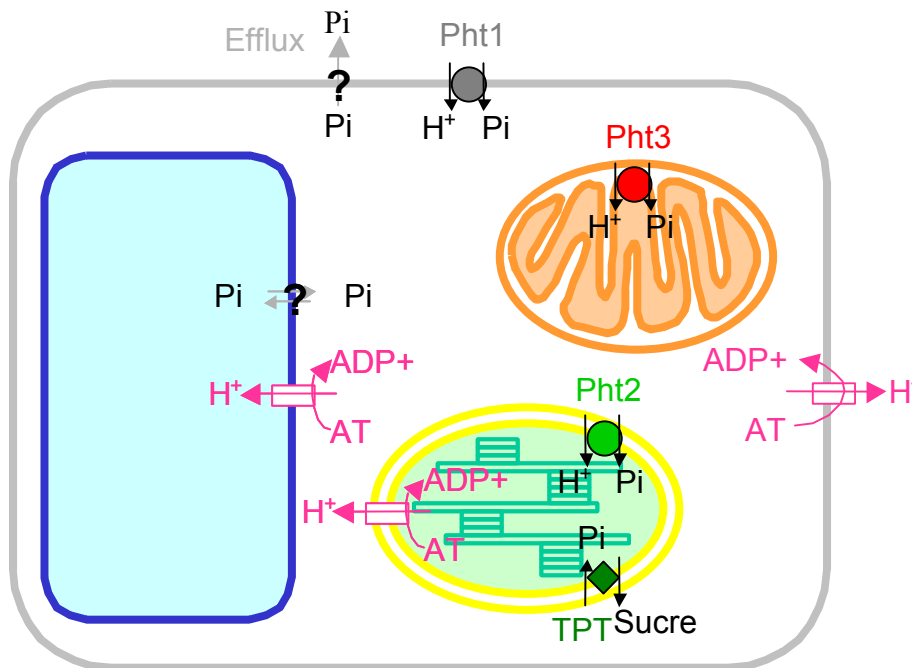


Figure 18 : Transport du phosphate au niveau cellulaire d'après Misson, 2004.

Les transporteurs de la famille Pht1, Pht2, Pht3 sont localisés respectivement dans la membrane plasmique (Ragothama, 2000), l'enveloppe des plastes (Ferro *et al.*, 2002) et des mitochondries (Rausch et Bucher, 2002), et sont responsables d'un influx de phosphate dans la cellule ou l'organite par symport avec des protons (Tableau 6). La présence de ces transporteurs est donc couplée à des pompes à protons ATPase dépendantes. L'approvisionnement en phosphate des plastes est aussi dépendant de la présence d'antiports sucres/phosphate inorganique (Tableau 6).

Famille	Locus Arabidopsis	Protéine	Fonction potentielle	TM	Localisation
Transporteurs Pht					
Pht1	At5g43350	Pht1;1	Transporteur de phosphate	12	MP
	At5g43370	Pht1;2	Transporteur de phosphate	11	MP
	At5g43360	Pht1;3	Transporteur de phosphate	11	MP
	At2g38940	Pht1;4	Transporteur de phosphate	11	MP
	At2g32830	Pht1;5	Transporteur de phosphate	10	MP
	At5g43340	Pht1;6	Transporteur de phosphate	12	MP
	At3g54700	Pht1;7	Transporteur de phosphate	8	MP
	At1g20860	Pht1;8	Transporteur de phosphate	12	MP
	At1g76430	Pht1;9	Transporteur de phosphate	12	MP
Pht2	At3g26570	Pht2;1	Transporteur de phosphate chloroplastique	12	P
Pht3	At5g14040	Pht3;1	Transporteur de phosphate mitochondrial	4	M
	At3g48850	Pht3;2	Transporteur de phosphate mitochondrial	4	M
	At2g17270	Pht3;3	Transporteur de phosphate mitochondrial	4	M
Translocateurs sucres/phosphate					
TPT	At5g46110	TPT	Antiport triose phosphate/phosphate	8	P
PPT	At5g33320	PPT	Antiport phosphoénolpyruvate/phosphate	6	P
GPT	At5g54800	GPT1	Antiport glucose-6-phosphate/phosphate	8	P
	At1g61800	GPT2	Antiport glucose-6-phosphate/phosphate	7	P
XPT	At5g17640	XPT	Antiport xylulose-5-phosphate/phosphate	2	P

Tableau 6 : Liste des membres des différentes familles de gènes de transporteurs de phosphate chez *Arabidopsis thaliana* et leur localisation d'après Misson, 2004. La localisation des protéines est indiquée par la lettre P, pour plastidiale, M pour mitochondriale, MP pour la membrane plasmique. TM : nombre de domaines transmembranaires.

Dans la cellule, il existe encore d'autres transports de phosphate caractérisés de manière biochimique mais qui n'ont pas été encore caractérisés au point de vue moléculaire. C'est le cas pour les transporteurs de la vacuole et celui de la membrane plasmique responsable de l'efflux de phosphate de la cellule. Ces activités sont primordiales pour le maintien de l'homéostasie cellulaire en phosphate.

3. Homéostasie du phosphate dans la cellule

Le cytosol est le compartiment dont la concentration en phosphate est la mieux régulée ; elle est de l'ordre de 10 μM (Bligny, communication personnelle). La concentration cytosolique est essentiellement contrôlée par les échanges avec le milieu extracellulaire et avec la vacuole : l'efflux de phosphate est régulé en fonction de la quantité présente dans le milieu externe (Ragothama, 1999) et la vacuole est le principal réservoir de phosphate de la cellule (85 à 95% du phosphate libre) (Rausch et Bucher, 2002). La vacuole est d'ailleurs le premier compartiment à se vider en phosphate lors de la carence de phosphate.

La quantité de phosphate des mitochondries varie en fonction de l'activité des cellules. Plus les cellules ont besoin d'énergie, plus les mitochondries contiennent de phosphate. Il en est de même pour les chloroplastes. Ainsi, à l'obscurité, ceux-ci contiennent moins de phosphate car ils ne photosynthétisent pas. La teneur en phosphate de ces organites (Figure

19) varie et est régulée en fonction du milieu extracellulaire et des besoins physiologiques de la cellule.

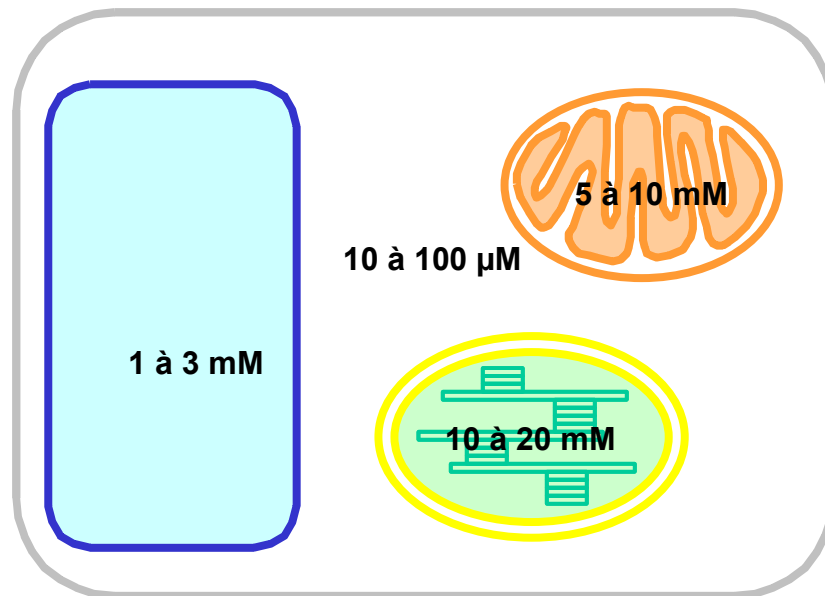


Figure 19 : Concentration en phosphate des principaux compartiments de la cellule végétale d'après Bligny, communication personnelle d'analyses RMN *in vivo*. La vacuole est le lieu de stockage du phosphate dans la cellule et régule l'homéostasie du cytosol. Ce dernier est très pauvre en phosphate libre, car il approvisionne à la fois les mitochondries et les chloroplastes qui ont un fort besoin en phosphate.

Pour ajuster ses imports et exports en phosphate en fonction de la teneur en phosphate du milieu extérieur, la plante perçoit un signal lui permettant d'adapter son métabolisme.

B- Le signal phosphate

1. La perception du manque de phosphate

Les molécules responsables de la perception du phosphate dans la plante ne sont pas encore identifiées. Cependant, quelques données préliminaires peuvent être mentionnées. L'application de phosphite (PO_3^{3-}), un analogue assimilable mais non métabolisable, a montré que la teneur en phosphate est à l'origine de l'induction de gènes répondant à la carence de phosphate (Ticconi *et al.*, 2001). De plus, sur des cellules de tomate en culture, la concentration en phosphate interne, et non celle du milieu extérieur, est responsable de la régulation transcriptionnelle (Köck *et al.*, 1998). Ainsi, au niveau cellulaire, la concentration en phosphate est mesurée par la plante qui répond en conséquence.

A l'échelle de la plante, les mécanismes de perception sont plus complexes et intégrés au niveau multicellulaire. Deux types de signaux, local et systémique, ont été mis en évidence pour différentes réponses de la plante à la carence de phosphate, par la technique du "split root" qui consiste à séparer le système racinaire d'une même plante en deux et à plonger

chaque partie dans des milieux de concentrations différentes en phosphate. Dans ce type d'expérience, si seule la partie carencée exprime une réponse, elle est régulée localement ; en revanche si tout le système racinaire exprime cette réponse, la régulation est systémique. Il a été ainsi possible de montrer que la sécrétion de phosphatases et l'induction des poils absorbants étaient régulées localement alors que l'architecture racinaire et l'induction des transporteurs de phosphate Pht1 étaient contrôlées de manière systémique (Misson, 2004).

Par contre, pour les feuilles, la régulation locale n'existe pas. En effet, après 4 heures de carence, l'expression des gènes foliaires est modifiée alors que la concentration en phosphate des feuilles n'est pas affectée. Les feuilles perçoivent donc un signal de carence différent, peut-être *via* la concentration en phosphate du xylème (Misson, 2004).

2. Transduction du signal

Aucun senseur de la teneur en phosphate n'a été identifié chez les plantes. L'ordre même des réponses à la carence de phosphate reste hypothétique malgré quelques éléments connus (Figure 20). Quelques acteurs ont été cependant indépendamment caractérisés.

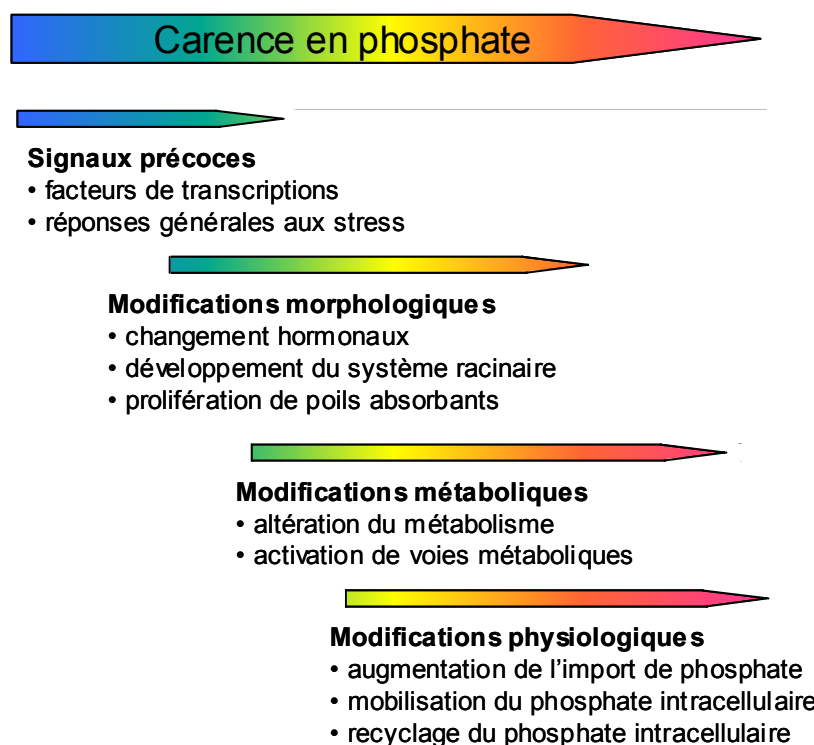


Figure 20 : Chronologie hypothétique des gènes impliqués dans la carence de phosphate d'après Hammond et al., 2004. Ce déroulement a été ordonné selon une échelle arbitraire de carence de phosphate allant d'une carence courte à longue.

Le premier facteur identifié est PHR1. Il s'agit d'une protéine apparentée à la famille MYB pour son domaine de liaison à la séquence d'ADN palindromique GNATATNC et possédant un domaine "coiled coil" d'interaction avec des protéines. Le mutant d'*Arabidopsis*

phr1 a été caractérisé par une inactivation de six gènes en carence de phosphate, l'absence d'augmentation du système racinaire et la réduction d'accumulation d'anthocyanes (Rubio *et al.*, 2001).

Chez les levures, la réponse à la carence de phosphate est bien connue et fait intervenir le régulon PHO. Aucun orthologue des facteurs de transcriptions *pho* de la levure n'a été trouvé chez les plantes bien que des séquences promotrices (CGCGTGGG) similaires aux boîtes PHO aient été identifiées chez *Arabidopsis* (Hammond *et al.*, 2004). En conditions standard, chez la plante, des répresseurs transcriptionnels inhiberaient les gènes impliqués dans la réponse à la carence de phosphate. Des motifs génomiques, qui fixeraient ces répresseurs, ont été identifiés, tels que le septamère ATGCCAT et un motif de liaison de type NIT-2 (Hammond *et al.*, 2004).

Chez les plantes, les phytohormones pourraient aussi être impliquées dans les réponses à la carence de phosphate. Les cytokinines ont été identifiées comme inhibiteur des gènes activés en carence de phosphate. L'auxine et l'éthylène provoquent des modifications d'architecture racinaire proches de celles induites par la carence phosphatée. Les données récentes indiquent que l'auxine et l'éthylène jouent probablement un rôle dans la réponse à la carence mais leur implication n'est pas clairement établie (Misson, 2004).

Les gènes, dont l'expression est affectée, incluent des facteurs de transcription, qui pourraient coordonner la réponse des plantes à la carence, mais aussi des gènes jouant un rôle dans la réponse elle-même, impliqués en particulier dans l'acquisition du phosphate et son économie au niveau des tissus.

C- Les réponses de la plante à une carence de phosphate.

Etant donné l'importance du phosphore au sein de la plante, une quantité limitante en cet élément a des conséquences majeures pour son métabolisme et son développement. Une description chronologique hypothétique des réponses peut-être proposée en regroupant les réponses en trois catégories : morphologique, métabolique et physiologique (Figure 20).

1. Réponses morphologiques

En condition de carence de phosphate, l'architecture racinaire est modifiée pour augmenter la surface d'échange et explorer le sol au-delà de la zone d'épuisement présente autour des racines (développement de racines secondaires latérales et augmentation du nombre et de la taille des poils absorbants) (Hammond *et al.*, 2004). La plante s'adapte aussi à une distribution hétérogène du phosphate dans un sol. Les racines latérales se développent

fortement dans les zones les plus riches en phosphate alors que leur croissance est inhibée dans les zones les plus pauvres. Le système racinaire est plus ramifié permettant la colonisation d'une plus grande étendue près de la surface du sol, la disponibilité du phosphate dans le sol diminuant avec la profondeur (Hammond *et al.*, 2004).

En parallèle au développement du système racinaire, la croissance générale de la plante est ralentie. Le phosphate est d'ailleurs considéré comme un facteur limitant de la division cellulaire (Sano *et al.*, 1999).

2. Réponses métaboliques et physiologiques

a) Acquisition du phosphate

La plante induit des mécanismes biochimiques et moléculaires permettant d'augmenter la quantité de phosphate soluble disponible pour l'absorption par les racines. Elle sécrète des acides organiques (citrate, malate), capables de mobiliser les ions phosphates complexés dans le sol, et des enzymes, tels que des phosphatases ou des ribonucléases, permettant la récupération de phosphate piégé dans des molécules organiques (Hammond *et al.*, 2004). En plus, certaines espèces comme le lupin développent des structures spécialisées appelées "protéoides" qui sécrètent ces acides organiques. Enfin, certaines plantes s'associent à des champignons mycorhiziens qui assurent une augmentation supplémentaire de la surface d'absorption (pour revue, Ragothama, 1999). L'ensemble de ces processus est stimulé par la carence de phosphate.

La plante augmente également sa capacité d'absorption. Des transporteurs Pht1 sont fortement induits en condition de carence, ce qui augmente la vitesse d'absorption du phosphate, et l'efflux de phosphate par les racines est en revanche réduit pour maintenir la concentration intracellulaire en phosphate (Misson, 2004).

b) Adaptation du métabolisme intracellulaire

La plante adapte aussi ses réactions métaboliques consommant le phosphate intracellulaire. Le phosphore intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques et par les mécanismes de phosphorylation, il est un régulateur métabolique important. Il participe à de nombreuses réactions métaboliques de la plante, comme la respiration ou la photosynthèse.

Lors de la glycolyse, beaucoup d'enzymes utilisent le phosphate, l'ATP et/ou l'ADP comme co-substrats. Or, dans la cellule, la quantité de pyrophosphate est moins sensible aux perturbations environnementales que la teneur en phosphate, ATP et ADP. La cellule développe alors des voies alternatives qui consomment du pyrophosphate (Figure 21, réaction

5 et 10). De plus, le phosphate stimule l'activité de la phosphofructokinase ATP dépendante et inhibe celle de la phosphofructokinase pyrophosphate dépendante, suggérant que ces deux enzymes interviennent alternativement en fonction de la concentration en phosphate intracellulaire. De même, les réactions 13, 15, 16, Figure 21, permettent de maintenir le flux de carbone en consommant moins de phosphate, ATP et ADP que la voie classique (Hammond *et al.*, 2004).

Deux nouvelles voies métaboliques n'utilisant pas de réactions de phosphorylations sont mises en place dans la mitochondrie. Il s'agit de la voie résistante au cyanure, contenant l'alternative oxydase qui détourne le flux d'électron du complexe IV (contenant le cytochrome a3), et la voie insensible à la roténone, pour laquelle le transfert d'électron contourne le complexe I. Ainsi, le cycle de Krebs et le transport d'électrons sont assurés tout en produisant moins d'ATP, permettant d'économiser le phosphate intracellulaire (Misson, 2004).

L'influence de la carence de phosphate sur la photosynthèse est un point important controversé. Sur le mutant *pho1*, l'ultrastructure des thylacoïdes est modifiée, ils comportent un plus grand nombre de membranes avec une augmentation de la teneur en chlorophylle par unité de surface de feuille. Cependant, peu d'effets ont été observés sur la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons (Härtel *et al.*, 1998). La faible influence de la carence de phosphate sur l'efficacité de la photosynthèse (production d'oxygène) avait déjà été observée dans des feuilles d'orge (Mimura *et al.*, 1990). En revanche, lorsque le phosphate du cytosol est piégé par addition et phosphorylation de mannose exogène, la photosynthèse est rapidement inhibée (Harris *et al.*, 1983). Ces résultats montrent que les plantes carencées en phosphate maintiennent les concentrations cytoplasmiques et chloroplastiques en phosphate à des niveaux permettant d'assurer la photosynthèse. Cette conclusion doit cependant être considérée avec précaution car une étude récente a tout de même montré une baisse de 30 % du transport d'électrons photosynthétique chez le mutant *pho1* par rapport au sauvage non carencé (Hurry *et al.*, 2000).

L'accumulation d'amidon dans les feuilles est une autre caractéristique de la carence de phosphate (Poirier et Bucher, 2002). Cette accumulation a un intérêt pour le métabolisme de la plante car la conversion du triose-phosphate en amidon permet de libérer du phosphate dans le chloroplaste qui pourra être ensuite réutilisé pour la photosynthèse. En contrepartie, le transport triose-phosphate/phosphate est fortement réduit en carence de phosphate.

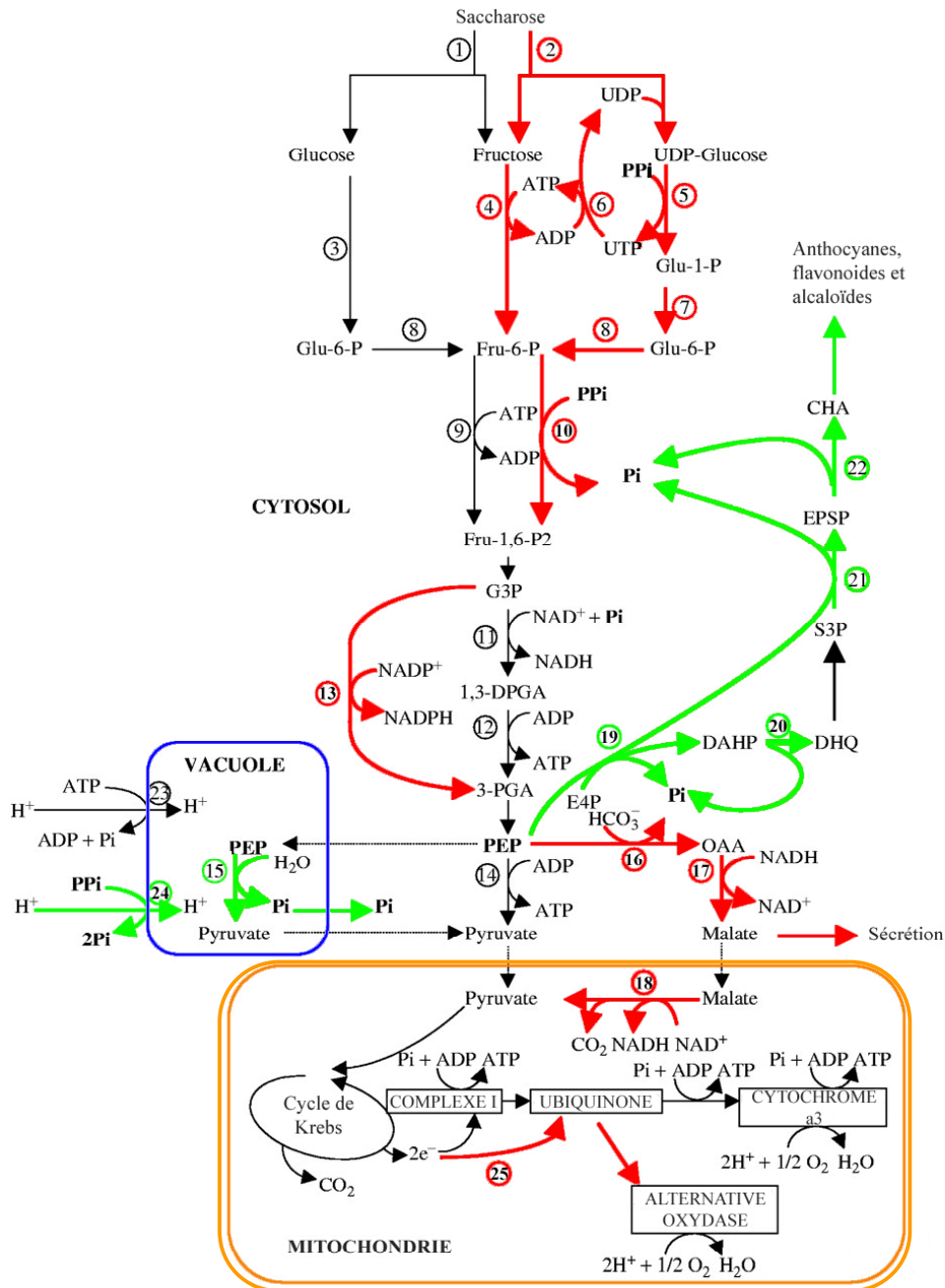


Figure 21 : Voies métaboliques alternatives pour la glycolyse, la chaîne respiratoire mitochondriale et le pompage des ions H^+ qui permettent à la plante de survivre d'après Hammond *et al.*, 2004. En rouge : voies utilisant le pyrophosphate qui contournent l'utilisation de phosphate, d'ATP et d'ADP ; en vert : voies libérant du phosphate. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont : (1) invertase, (2) saccharose synthase, (3) hexokinase, (4) fructokinase, (5) UDP-glucose pyrophosphorylase, (6) nucléoside diphosphate kinase, (7) phosphoglucomutase, (8) phosphoglucose isomérase, (9) phosphofructokinase (ATP dépendante), (10) phosphofructokinase (pyrophosphate dépendante), (11) glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase NAD dépendante (G3PDH; phosphorylée), (12) 3-phosphoglycérate (PGA) kinase, (13) G3PDH NADP dépendante (non-phosphorylée), (14) pyruvate kinase, (15) phosphoénolpyruvate (PEP) phosphatase, (16) PEP carboxylase, (17) malate déshydrogénase, (18) enzyme malique, (19) 3-deoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphate (DAHP) synthase, (20) 3-déhydroquinone (DHQ) déshydratase, (21) 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase, (22) chorismate (CHA) synthase, (23) tonoplaste H^+ -ATPase, (24) tonoplaste H^+ -pyrophosphatase et (25) NADH déshydrogénase. Abréviations des composés : Glu-1-P, glucose 1-phosphate; Glu-6-P, glucose 6-phosphate; Fru-6-P, fructose 6-phosphate; Fru-1,6-P2, fructose 1,6-bisphosphate; G3P, glycéraldéhyde-3-phosphate; 1,3-DPGA, 1,3-diphosphoglycérate; OAA, oxaloacétate; E4P, érythrose 4-phosphate; S3P, shikimate-3-phosphate.

Les plantes carencées modifient d'autres voies métaboliques, elles réorganisent notamment leurs lipides membranaires (voir paragraphe suivant) et accumulent des métabolites secondaires non spécifiques de la carence de phosphate, comme les anthocyanes, qui provoquent une coloration rouge foncé des feuilles (Figure 22). La voie de synthèse des anthocyanes permet, en effet, une libération de phosphate, à partir du phosphoénolpyruvate (Figure 21, réaction 19, 20, 21, 22). Les anthocyanes pourraient intervenir dans un processus d'économie du phosphate. En plus de cette économie de phosphate, ils protégeraient les acides nucléiques des rayons UV et les chloroplastes de la photo-oxydation (Poirier et Bucher, 2002).

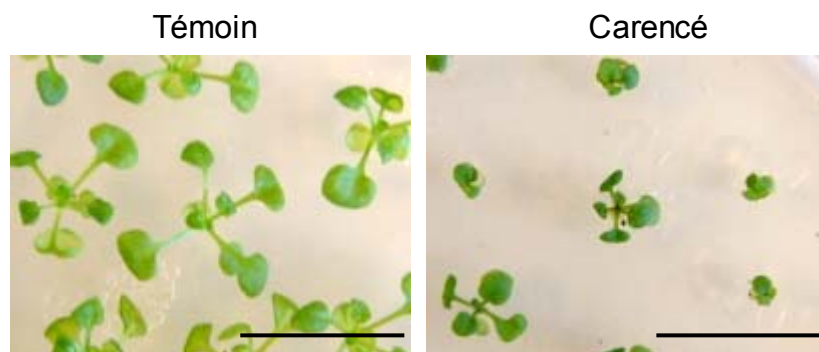


Figure 22 : Photographies de plants d'*Arabidopsis thaliana* de 20 jours cultivés avec ou sans phosphate. Echelle : 1 cm.

3. Modifications du métabolisme des lipides.

Les phospholipides, les acides nucléiques et les petits métabolites contribuent à part égale à la teneur en phosphate d'une feuille (Ticconi et Abel, 2004). Il n'est donc pas surprenant que le métabolisme des phospholipides soit modifié en carence de phosphate. En effet, la teneur en phospholipides des plantes diminue fortement au cours de la carence de phosphate (Rebeillé, 1983). Dans le même temps, la teneur en glycolipides des cellules augmente, notamment en SQDG (Essigman *et al.*, 1998) et DGDG (Härtel *et al.*, 1998). Deux concomitances ont alors été étudiées. La première concerne le remplacement du PG par le SQDG au sein des plastes. La seconde est plus complexe car elle concerne la diminution de la PC et l'augmentation du DGDG à l'échelle de la cellule.

a) Concomitance de la chute de PG et de l'augmentation de SQDG

De nombreuses informations relatives à la réorganisation du métabolisme des lipides ont été obtenues grâce à l'analyse de mutants. Dans les feuilles du mutant *pho1*, l'augmentation du SQDG est concomitante à une diminution du PG (Härtel *et al.*, 1998). Yu et Benning (2003) ont disséqué les réponses au niveau du SQDG et du PG en analysant les

mutants simples ou doubles d'*Arabidopsis* affectés dans la synthèse du SQDG (*sqd2*) et du PG (*pgp1*). Le mutant *pgp1* est partiellement déficient dans la synthèse du PG plastidial et, en condition standard, sa capacité photosynthétique est réduite. En effet, le PG joue un rôle dans l'organisation structurale de la protéine LHCII (Light Harvesting Complex of photosystem II) et sa présence apparaît comme indispensable aux activités photosynthétiques de transport d'électrons, à l'assemblage et au fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Härtel *et al.*, 1998). Or, une diminution de la disponibilité en phosphate entraîne une réduction de la quantité de PG au profit d'une augmentation de SQDG. L'expression de *sqd1* et *sqd2*, les gènes essentiels à la synthèse du SQDG, est stimulée (Essigman *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2002) et dans le mutant nul *sqd2*, la teneur en PG ne diminue pas au cours de la carence de phosphate (Yu et Benning, 2003). En conclusion de ces analyses, la proportion du couple PG-SQDG par rapport à la quantité totale de glycérolipides apparaît comme conservée, quelles que soient les conditions de culture.

Comme le SQDG et le PG sont anioniques et ont la même capacité à former des bicouches lipidiques, il a été suggéré que le SQDG pouvait remplacer une partie du PG non essentiel pour la plante en carence de phosphate (Härtel *et al.*, 1998; Essigmann *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2004). En effet, si la synthèse des deux lipides est affectée, comme dans le double mutant *sqd2 pgp1*, des perturbations majeures de la plante sont observées : la surface des feuilles est réduite de 30 %, la teneur en pigments (caroténoïdes et chlorophylles) diminue, le transfert d'électrons est affecté et la proportion de photosystèmes II réduits augmente (Yu et Benning, 2003). Ces résultats montrent que ces deux lipides jouent un rôle essentiel et qu'une partie du PG peut être remplacé en carence de phosphate par du SQDG permettant de maintenir le bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

b) Concomitance de la chute de PC et de l'augmentation de DGDG

La PC est le phospholipide le plus abondant des cellules végétales. En carence de phosphate, la teneur en PC des cellules végétales diminue (Rebeillé, 1983). En comparaison, en carence de phosphate, la teneur en DGDG, qui possède les mêmes propriétés de structure que la PC (lipide neutre formant des bicouches), augmente fortement. Cette augmentation est liée à l'augmentation de l'expression des gènes *mgd* d'une part et *dgd* d'autre part.

Chez *Arabidopsis*, l'expression de *mgd2* et *mgd3* est fortement augmentée alors que celle de *mgd1* est stable (Awai *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2004). Cependant, la teneur en MGDG n'augmente pas, bien que sa composition en acide gras soit modifiée par un enrichissement en structure eucaryote (Klaus *et al.*, 2002). Cet enrichissement est cohérent

avec l'augmentation de l'activité de MGD2 et MGD3, qui ont une affinité plus forte pour le DAG eucaryote *in vitro* (Awai *et al.*, 2001). Néanmoins, le rapport C16/C18 du MGDG reste constant (Kelly *et al.*, 2003) indiquant que le MGDG est préférentiellement formé à partir du DAG C16/C18 plutôt que du C18/C16. Les deux gènes *dgd1* et *dgd2* sont aussi surexprimés montrant que, à la fois, DGD1 et DGD2 sont toutes deux impliquées dans la réponse à la carence de phosphate, même si une plus forte implication est suggérée pour DGD2 (Klaus *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2003, Benning et Ohta, 2005).

Pouvons nous déduire, comme pour le couple PG-SQDG, que le DGDG remplace sélectivement la PC en carence de phosphate ? Par rapport au SQDG, l'augmentation de la teneur en DGDG est beaucoup plus forte et par rapport au PG, dans les chloroplastes, la teneur en PC est plus faible, puisque la PC est localisée uniquement dans le feuillet cytosolique de la membrane externe de l'enveloppe des plastes (Dorne *et al.*, 1985). Pour interpréter la concomitance entre l'augmentation de la teneur en DGDG et la diminution de la teneur en PC, deux hypothèses ont été établies.

La première propose un remplacement de la PC par du DGDG, en carence de phosphate, uniquement dans la membrane externe de l'enveloppe. Cette hypothèse implique une augmentation importante de surface de la membrane externe de l'enveloppe des plastes, indépendamment de la membrane interne. En effet, la membrane externe contient peu de MGDG par rapport à la membrane interne ; une augmentation de surface de l'enveloppe restreinte à la membrane externe pourrait étayer l'absence d'augmentation du MGDG.

La deuxième hypothèse propose aussi un remplacement de la PC par du DGDG mais cette fois aussi bien dans les membranes plastidiales que dans les membranes non plastidiales, bien que, dans des conditions standards de culture, le DGDG soit localisé exclusivement dans les plastes. Cette hypothèse a été étayée par des expériences de fractionnements subcellulaires sommaires réalisées par Härtel *et al.* (2000) et Härtel et Benning (2000).

L'objectif de cette thèse était donc d'étudier d'une part ces hypothèses de remplacement de la PC par du DGDG en carence de phosphate et d'autre part les remaniements et transferts de lipides relatifs à ce remplacement. Nous avons tout d'abord analysé l'évolution de la composition lipidique de cellule lors de la mise en place de la carence de phosphate afin de comprendre l'importance des remaniements induits par la carence. Nous avons ensuite cherché à identifier où le DGDG nouvellement synthétisé pouvait être localisé. Enfin, pour tenter d'identifier les acteurs potentiellement impliqués dans ces mécanismes de remaniements et transferts, nous avons collaboré à l'analyse

transcriptionnelle du génome d'*Arabidopsis thaliana* en carence de phosphate et identifié quelques protéines candidates qui pourraient au sein de la réponse intégrée de la plante répondre à nos interrogations.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

A- Cultures de cellules

1. Cellules d'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*)

L'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) est un modèle de plante en C18:3. A ce titre, ses galactolipides contiennent un squelette hydrophobe dérivé de la PC, uniquement de type eucaryote, i.e. avec du C18 en position *sn-2* du glycérol (voir Données bibliographiques I-). La souche utilisée dérive de cellules méristématiques de cambium. Ces cellules ne sont pas photosynthétiques, ne possédant pas de chloroplastes mais des amyloplast. Les cellules ont été isolées par Gautheret (1934) et sont cultivées en suspension liquide dans le milieu de culture défini par Lamport (1964) et modifié par Bligny (1977). Ce milieu contient en particulier 4 mM de phosphate et du saccharose à 20 g/L. Les cellules sont cultivées à 22°C dans des ballons Kjeldahl contenant 250 mL de milieu de culture. Une agitation permanente de 125 rpm sur un agitateur vertical permet de maintenir les cellules en suspension et d'assurer une meilleure solubilisation des gaz atmosphériques. Tous les 7 jours, 50 mL de suspension sont transférés dans 200 mL de milieu neuf. Avant de commencer les analyses, les cellules sont lavées 3 fois dans du milieu neuf contenant (4 mM) ou non (0 mM) du phosphate et transférées dans 250 mL de milieu neuf contenant ou non du phosphate. Le temps initial (zéro) de l'expérience correspond au transfert dans les 250 mL de milieu neuf.

2. Cellules d'*Arabidopsis thaliana*

L'arabette (*Arabidopsis thaliana*) est un modèle de plante en C16:3. A ce titre, son métabolisme lipidique se caractérise par la présence des deux voies de synthèse, eucaryote et procaryote, du squelette hydrophobe des galactolipides. Ceux-ci contiennent du C18 (voie eucaryote) ou du C16 (voie procaryote) en position *sn-2* du glycérol (voir Données bibliographiques I-). De plus, *Arabidopsis thaliana* est le modèle de plante pour lequel les données génomiques sont à ce jour les plus complètes. La souche utilisée dérive du méristème foliaire (Axelos *et al.*, 1992). Bien que possédant des chloroplastes et effectuant la photosynthèse, les cellules d'*Arabidopsis* sont hétérotrophes. Elles sont cultivées en

suspension liquide dans le milieu défini par Gamborg *et al.*, (1968), contenant entre autre 1 mM de phosphate et 15 g/L de saccharose. Les cellules sont cultivées à 22°C dans des ballons Kjeldahl contenant 200 mL de milieu de culture, maintenues sous agitation permanente de 125 rpm par un agitateur horizontal et sous éclairage constant de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le repiquage est effectué tous les 7 jours avec 10 mL de cellules sédimentées dans 200 mL de milieu neuf. Pour effectuer les analyses en carence de phosphate, les cellules sont lavées 3 fois dans du milieu neuf contenant (1 mM) ou non (0 mM) du phosphate et transférées dans 200 mL de milieu neuf contenant ou non du phosphate. Le temps initial (zéro) de l'expérience correspond au transfert dans les 200 mL de milieu neuf.

B- Culture de plantes entières

1. Arabidopsis thaliana

Toutes les études ont été effectuées avec l'écotype Columbia d'*Arabidopsis thaliana*. La lignée transgénique surexprimant AtOEP7-GFP est un don de Yong Jik Lee (Université de Corée). La lignée homozygote *pldζ2* (At3g05630) est issue de la collection du Salk Institute (N594369), générée par insertion d'ADN-T.

Pour toutes les lignées cultivées, les graines sont stérilisées pendant 10 min dans de l'éthanol 90%, triton X100 0,05%, barychlore 0,1%. Elles sont ensuite rincées à l'eau stérile. Les plantules sont cultivées en terre ou en boîte stérile contenant du milieu gélosé (Agar 0,8%) Murashige et Skoog (MS) sans phosphate (Duchefa), du saccharose 5 g/L, pH 5,7 (Murashige et Skoog, 1962). Le phosphate est ajouté à partir d'une solution de KH_2PO_4 1M pour une concentration finale de 0, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 400, 1000, 1250, 2000 ou 4000 μM de phosphate. De la kanamycine à 50 mg/L est additionnée au milieu pour sélectionner des mutants porteurs du gène de résistance. Les boîtes sont ensuite placées à 4°C pendant 2 jours. Les plantes sont cultivées à 22°C, avec une photopériode de 10 h d'éclairage à 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et 14 h d'obscurité.

2. Pois (*Pisum sativum*)

Les graines de pois (*Pisum sativum*) sont imbibées pendant 18h dans de l'eau puis transférées dans des bacs de vermiculite. Les plantules sont transférées en phytotron, avec un éclairage de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une photopériode de 12 h, une température de 22°C le jour et 20°C la nuit et une hygrométrie de 70%. L'arrosage est fréquent, afin de maintenir la vermiculite toujours humide.

II. Préparations de fractions subcellulaires

Les préparations d'organites s'effectuent à partir de cellules d'*Arabidopsis thaliana* 12 heures ou 3 jours après repiquage.

A- Préparation d'extraits cellulaires

Environ 70 g de cellules sont filtrées et remises en suspension à 4°C dans 50 mL de tampon de broyage (0,3 M mannitol, 15 mM MOPS, 2 mM EGTA, 0,6 % (m/v) polyvinylpyrrolidone 25, 0,5 % SAB, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM acide α -aminocaproïque, 1 mM benzamidine, pH 8,0). Les cellules sont broyées dans un mortier avec 10 mL de sable de Fontainebleau. Après addition de 300 mL de tampon de broyage, le broyat est centrifugé 10 min à 150 x g. Le surnageant est appelé “**extrait cellulaire**”.

B- Préparation de fractions mitochondriales

Les mitochondries sont purifiées par trois étapes de centrifugation à partir de l'extrait cellulaire : deux centrifugations de 5 min à 3000 x g, à la suite desquelles le surnageant est récupéré, puis une centrifugation de 15 min à 18000 x g, à la suite de laquelle le culot est récupéré. Le culot est remis en suspension dans du milieu de lavage (0,3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM PMSF, 5 mM acide α -aminocaproïque, 1 mM benzamidine, pH 7,4) et déposé au sommet d'un gradient de 3 couches de Percoll (Pharmacia) (18 % (v/v), 23 % (v/v), 40 % (v/v) Percoll dans 0,3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, 0,1 % SAB, pH 7,2). Après une centrifugation de 45 min à 70000 x g, les mitochondries sont isolées à l'interface 23%/40 % du gradient. Pour éliminer le Percoll, les mitochondries sont centrifugées deux fois dans du milieu de lavage à 17000 x g pendant 15 min. Le culot, remis en suspension dans un minimum de volume de milieu de lavage, correspond à la fraction de **mitochondries brutes**. Cette fraction est ensuite déposée sur une couche de 28 % de Percoll dans 0,3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, 0,1 % SAB, pH 7,2. Après une centrifugation d'1 h à 40000 x g, les mitochondries sont isolées au milieu du gradient. Pour éliminer le Percoll, les mitochondries purifiées sont centrifugées trois fois à 17000 x g pendant 15 min dans du milieu de lavage. Le culot est remis en suspension dans un minimum de volume de milieu de lavage et est appelé fraction de **mitochondries purifiées**.

Pour vérifier l'état des fractions mitochondriales, un test de respiration à l'électrode à oxygène est effectué. L'électrode d'O₂ (Oxygraph Hansatech) est calibrée dans de l'eau,

équilibrée 5 min dans 1 mL de 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1% SAB, pH 7,5. La consommation en O_2 est mesurée autour de 300 nmol $\text{d}'\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines, après addition de 10 μL de fraction mitochondriale, 10 μL de succinate 1 M et 10 μL d'ADP 100 mM. 10 μL de KCN 100 mM est ajouté ensuite pour mesurer la sensibilité au cyanure. Les fractions sont ensuite conservées à -80°C .

C- Préparation de fractions chloroplastiques

Les chloroplastes sont purifiés à partir d'extraits cellulaires par une centrifugation de 5 min à 3000 x g. Le culot est remis en suspension dans du milieu de lavage et déposé par aliquotes de 2 mL sur un gradient de Percoll discontinu (33 % (v/v), 50 % (v/v) Percoll dans 0,3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, 0,1 % SAB, pH 7,2). Après une centrifugation de 15 min à 3000 x g, les chloroplastes sont collectés à l'interface 33 %/50 % du gradient. Pour éliminer le Percoll, les chloroplastes purifiés sont centrifugés deux fois à 2000 x g pendant 5 min dans du milieu de lavage. Le culot est remis en suspension dans un minimum de volume de milieu de lavage et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

III. Analyse de lipides

A- Extraction de lipides

1. Extraction selon Bligh et Dyer

Pour 400 μL d'échantillon aqueux contenant environ 500 μg de protéines, 1,5 mL de chloroforme-méthanol (1:2 ; v/v) sont ajoutés et le mélange est homogénéisé. 500 μL de chloroforme et 500 μL d'eau sont rajoutés. Après agitation, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 3000 x g et forme un biphasé. La phase inférieure chloroformique, contenant l'ensemble des lipides, est collectée à l'aide d'une pipette pasteur. Après évaporation sous argon, les lipides sont repris dans 200 μL de chloroforme puis conservés à -20°C .

2. Extraction selon Folch

2 g de feuilles d'*Arabidopsis* broyées dans l'azote liquide ou de cellules sont transférées dans 30 mL d'éthanol bouillant pendant 5 min afin de bloquer l'action des lipases présentes dans l'échantillon. Après addition de 10 mL de méthanol et 40 mL de chloroforme, l'extrait est incubé 1 h sous agitation. L'extrait est ensuite soumis à une filtration, une addition de 15 mL de chloroforme – méthanol (2:1 ;v/v) et 17 mL de NaCl 1%, puis une

centrifugation de 10 min à 3000 x g. Alternativement, l'extrait est transféré dans une ampoule à décanter sur la nuit. La phase inférieure contenant les lipides est récupérée puis évaporée sous argon. Les lipides sont ensuite repris dans 3 mL de chloroforme et stockés à -20°C . Pendant l'ensemble de ces manipulations les suspensions sont maintenues sous argon pour éviter leur oxydation.

B- Séparation et dosage des lipides

1. chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM repose sur des phénomènes d'adsorption différentielle : une phase mobile constituée de solvant progresse le long d'une phase stationnaire (silice) fixée sur une plaque de verre (Merck).

a) Séparation des principaux lipides.

Les lipides sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice (silica gel 60, Merck). L'extrait lipidique contenant entre 250 μg et 1 mg de lipides est déposé sur la silice. Les solvants utilisés sont présentés Figure 23.

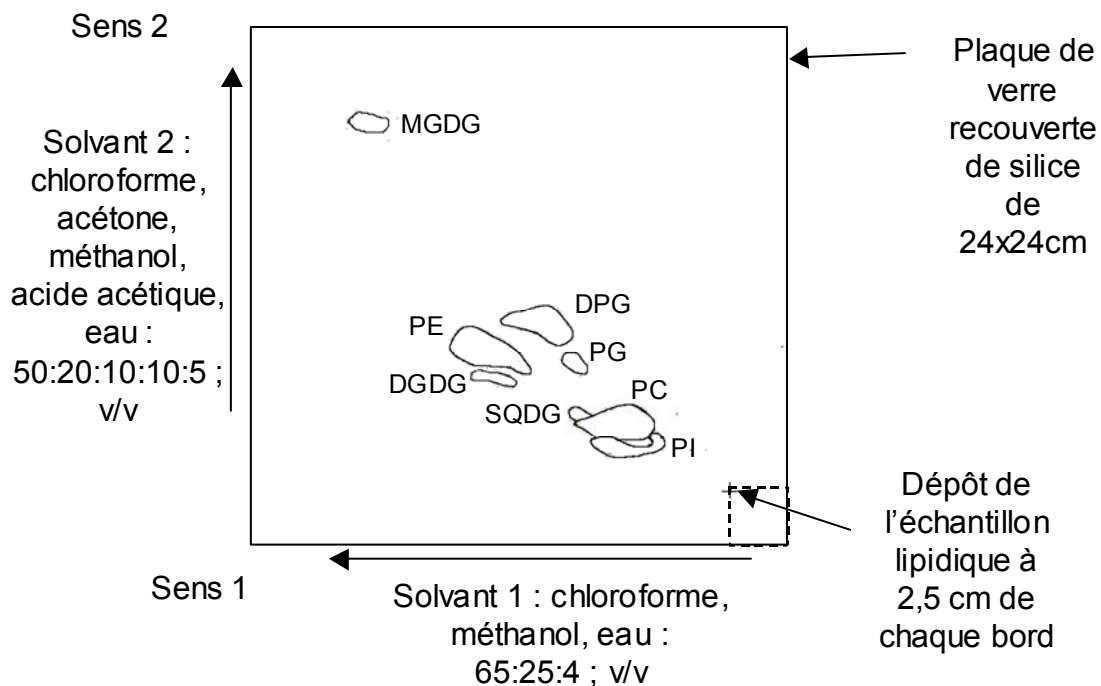


Figure 23 : Analyse de lipides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (conditions d'après Douce *et al.*, 1990)

Entre les deux sens de migration, les plaques sont conservées sous argon afin d'assurer le séchage de la couche mince de silice et d'éviter une mauvaise migration des lipides dans le deuxième sens. Après migration, les différents lipides sont visualisés soit sous lumière ultra-

violette, après pulvérisation d'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique 0,2% (p/v) dans le méthanol), soit par autoradiographie si les lipides à analyser sont radioactifs. Les glycolipides peuvent être visualisés par une coloration violette des sucres réducteurs après pulvérisation d' α -naphtol (1 % α -naphtol, 5 % H_2SO_4 dans l'éthanol) et 3 min de chauffage à 110°C. Les lipides repérés par l'une de ces trois méthodes sont identifiés en comparant leurs caractéristiques de migration à celles de lipides témoins chromatographiés dans les mêmes conditions.

b) Séparation du DAG

Pour isoler le DAG, les extraits lipidiques sont séparés par chromatographie unidimensionnelle. Le solvant utilisé pour la migration est du di-isopropylether/acide acétique (96/4, v/v). Le DAG est identifié par comparaison avec la migration d'un témoin.

2. Méthanolyse

Les lipides, visualisés à l'ANS et obtenus après grattage des plaques de silice, sont méthanolysés à 100°C pendant 1 h dans un mélange de 2,5 % H_2SO_4 dans du méthanol afin de préparer les esters méthylés d'acides gras. Un volume égal d'eau est ensuite ajouté et les acides gras méthylés sont extraits par lavages successifs à l'hexane. L'hexane est ensuite évaporé sous argon et les acides gras méthylés sont conservés à sec à -20°C

3. Chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthylés d'acides gras à analyser sont repris dans 10 μ L d'hexane et séparés par chromatographie en phase gazeuse (colonne de cyanopropyl polysilphène-siloxane (BPX70, SGE), détecteur par ionisation de flamme, gaz vecteur azote, température croissante de 130 à 180°C). Les différents acides gras sont identifiés en comparant les temps de rétention de leurs esters méthylés avec ceux de témoins ; ce temps dépend du nombre de carbone et du degré d'insaturation de la molécule considérée. La quantification des acides gras méthylés composant le mélange injecté est rendu possible par addition avant méthanolyse d'une quantité connue de témoin interne (C21:0).

C- Analyse des lipides par RMN

1. Dosage des phospholipides par RMN du ^{31}P

Un extrait lipidique, préparé selon les méthodes décrites en III-A-, est évaporé à sec sous argon puis dissout dans 2475 μ L de chloroforme, 450 μ L de méthanol et 75 μ L d'eau

deutérée. Des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont obtenus à 162 MHz sur un spectromètre Bruker AMX400 (Bruker, Billerica, MA, USA) à 20°C. La résonance du deutérium est utilisée comme signal référence. Les paramètres d'acquisitions sont les suivants : 15 μ s d'excitation à 70 degrés, 3,6 s de délai entre les excitations et 256 répétitions d'acquisition avec un délai de 20 s entre chaque répétition pour permettre le relâchement complet des spectres. La séquence de découplage "Waltz-16 ^1H " est utilisée afin d'éliminer le bruit de fond créé par les protons. Sur une ouverture spectrale de 8200 Hz, 8000 points de données sont collectés, 8000 points intercalaires sont ajoutés et l'ensemble du spectre est affiné avec un élargissement exponentiel de la ligne de base de 0,2 Hz. L'identification et la quantification des pics sont effectuées par addition de quantités connues de chaque phospholipide.

2. Caractérisation des galactolipides par RMN du ^1H

Les galactolipides d'un extrait lipidique sont identifiés par TLC, comme décrit précédemment, isolés par grattage de la zone de silice contenant les lipides et extraits de la silice par addition de 1,5 mL de chloroforme/méthanol, 2/1 et 400 μ L de NaCl 10 g/L dans de l'eau. La phase organique est récupérée, séchée sous argon et dissoute dans 440 μ L de chloroforme deutéré et 220 μ L de méthanol deutéré (Merck). Les spectres de RMN ^1H sont obtenus à l'aide un spectromètre Varian Unity+ 500 MHz (Bruker, Billerica, MA, USA) à 10°C avec une sonde à détection indirecte de 5 mm. La résonance du méthanol est utilisée comme référence. Les paramètres d'acquisition sont les suivants : 19 μ s d'excitation à 90 degrés, 3 s de délai entre les excitations et 64 répétitions d'acquisition avec un délai de 1 s entre chaque répétition pour permettre le relâchement complet des spectres. Sur une ouverture spectrale de 4993 Hz, 30000 points de données sont collectés, 35000 points intercalaires sont ajoutés et l'ensemble du spectre est affiné avec un élargissement exponentiel de la ligne de base de 0,18 Hz.

IV. Analyse des protéines

A- Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée selon deux méthodes : la technique de Lowry *et al.* (1951) pour la majorité des échantillons et la méthode de Bradford (1976) pour les échantillons contenant du dithiotreitol. Dans les deux cas, le dosage s'effectue par

comparaison avec une gamme étalon réalisée pour chaque série de dosages avec la SAB (Sérum Albumine Bovine).

B- Analyse des protéines par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) permet de séparer les polypeptides en fonction de leur poids moléculaire. Les échantillons sont repris dans du tampon de dépôt (Tris-HCl 50 mM, saccharose 10 % (m/v), SDS 2 % (m/v), Bleu de bromophénol 0,01 % (m/v), DTT 25 mM, pH 6,8)) pour obtenir les concentrations protéiques voulues.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5% (v/v) d'acrylamide et d'un gel de séparation contenant 12 % (v/v) d'acrylamide. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (120 V) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,2 %, pH 8,3). Après électrophorèse, les protéines peuvent être soit transférées sur membrane de nitrocellulose pour permettre un immuno-marquage avec un anticorps spécifique, soit colorées au bleu de Coomassie. Le gel est alors incubé pendant 1 h dans du milieu de coloration (bleu de Coomassie R250 5 g/L, isopropanol 25 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v)). L'excès de colorant est ensuite enlevé par des lavages successifs dans du décolorant (isopropanol 25 %, acide acétique 10 %).

C- Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les polypeptides séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont transférés électriquement sur une membrane de nitrocellulose de 0,18 µm (Shleicher et Schuell). Après équilibration du gel à deux reprises pendant 5 min dans du tampon de transfert (Tris-HCl 21 mM, glycine 160 mM, pH 8,3, éthanol 17 %), le transfert est effectué durant 1 h à 4°C sous voltage constant (90V) dans le tampon de transfert complété avec du SDS 0,1 % (v/v). La membrane de nitrocellulose est rincée à l'eau à deux reprises pendant 5 min. L'efficacité du transfert et la position des marqueurs de poids moléculaire (Amersham) sont vérifiées par coloration des protéines au rouge ponceau 0, 2% (m/v) dans TCA 3 % (v/v).

D- Immuno-marquage

Après électro-transfert, la membrane de nitrocellulose est rincée dans de l'eau distillée puis saturée en protéines dans un tampon de TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 9 g/L, pH 7,5)

contenant 5 % (m/v) de lait écrémé déshydraté pendant 1h sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite incubée à 4°C pendant 16 h dans une solution de TBS-lait 5 %, contenant l'anticorps primaire spécifique de la protéine à détecter. Les anticorps primaires sont utilisés aux concentrations suivantes : OEP21 (membrane externe des chloroplastes) au 1/100^{ème}, IEP37 (membrane interne des chloroplastes) au 1/10000^{ème}, LHC2 (thylacoïdes) au 1/500^{ème}, TOM40 (membrane externe des mitochondries) au 1/1000^{ème}, NAD9 (membrane interne des mitochondries) au 1/5000^{ème} et HPPK-DHPS (matrice des mitochondries) au 1/1000^{ème}. La fixation non spécifique de l'anticorps est éliminée par trois lavages successifs de 10 min de la membrane dans un tampon de TBS-tween 0,1 % (m/v). La membrane est ensuite incubée 1 h dans du TBS-lait 5% contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/10000^{ème}. Cet anticorps secondaire, anti-lapin ou anti-cobaye suivant la nature de l'anticorps primaire, est couplé à une enzyme peroxydase (Amersham).

Après incubation en présence du deuxième anticorps, la membrane est lavée à deux reprises pendant 10 min dans un tampon de TBS-tween 0,1 % et une fois pendant 10 min dans un tampon TBS. Le complexe protéine/anticorps primaire/anticorps secondaire est révélé à l'aide de luminol, substrat chemiluminescent de la peroxydase. La réaction chemiluminescente se traduit par une émission de lumière bleue après clivage du luminol. La réaction est réalisée à l'aide du kit ECL (Amersham) suivant les instructions du fournisseur. Un film autoradiographique sensible à la lumière émise (Hyperfilm ECL, Amersham) est appliqué contre la membrane pendant des temps d'exposition variable (de 30s à 10 min) puis est développé. Le temps d'exposition est ajusté pour permettre l'obtention d'un signal non saturant.

V. Quantification de paramètres physiologiques

A- Quantification de l'activité de synthèse de galactolipides

Des fractions subcellulaires, décrites précédemment, sont solubilisées dans du milieu de lavage (0,3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM PMSF, 5 mM acide α -aminocaproïque, 1 mM benzamidine, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, pH 7,4). Afin de mesurer la synthèse de galactolipides, 10 mM UDP-[¹⁴C]galactose 10000 dpm/nmol sont ajoutés à une fraction aliquote de 100 μ L et le mélange est incubé à 25°C. La réaction est arrêtée par une extraction de lipide selon la technique de Bligh et Dyer (voir III-A-1.). Un échantillon est prélevé 30 min et 1 h après le début de l'incubation afin de contrôler la linéarité de la réaction. Nous avons vérifié que la sonication et l'addition de DAG dans le milieu d'incubation n'augmentaient pas

l'incorporation de galactose dans les lipides. Les lipides sont séparés ensuite par CCM bidimensionnelle comme décrit précédemment, la silice contenant les lipides radioactifs est récupérée, la radioactivité incorporée dans les lipides est comptée par scintillation en désintégrations par min (dpm). L'activité mesurée en dpm par heures et par mg de protéines est exprimée en nmol de galactose incorporé.h⁻¹.mg⁻¹.

B- Dosage du phosphate inorganique intracellulaire

Les parties aériennes de plants d'*Arabidopsis* sont récoltées, pesées, congelées dans de l'azote liquide et broyées dans 250 µL de tampon MES 0,7 M, pH 5,8. Quatre répliques sont effectuées pour chaque expérience. Après 30 min de centrifugation à 10000 x g, le surnageant est récupéré. La teneur en phosphate est mesurée sur microplaque en utilisant la méthode du vert de malachite d'après Delhaize et Randall (1995). 143 µL d'échantillon, contenant de 2 à 8 µL du surnageant complété avec de l'eau, est incubé avec 30 µL de réactif I (17,55 g/L molybdate d'ammonium tétrahydraté, 2 M H₂SO₄) pendant 10 min ; 30 µL de réactif II (3,5 g/L alcool polyvinylique, 0,35 g/L vert de malachite) est ensuite ajouté. Les mesures d'absorbance sont effectuées à 610 nm après 2 h d'incubation. Les concentrations en phosphate sont déterminées à partir d'une gamme étalon, réalisée à l'aide d'une solution de KH₂PO₄, et exprimées en ng de phosphate par mg de masse fraîche.

VI. Techniques d'étude des acides nucléiques

A- Techniques d'analyse de plants d'Arabidopsis thaliana mutés par insertion

1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait de feuilles de petite taille prélevées au centre de la rosette d'*Arabidopsis thaliana*, après un mois de culture en terre. Les feuilles sont broyées dans 20 µL de sable et 1 mL de tampon CTAB (100 mM Tris-HCl, 2 % cetyltriméthylammonium bromide, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % β-mercaptoéthanol, pH 7,5) puis chauffées 30 min à 60°C. Après 10 min de centrifugation, 500 µL de surnageant est récupéré et mélangé à 500 µL de chloroforme-isoamylalcool. Après centrifugation, de la phase aqueuse est collectée (400 µL) et est mélangée pendant 1 h à -20°C à 400 µL d'isopropanol froid, conduisant à la précipitation de l'ADN. Après centrifugation 15 min à 4°C, le culot contenant l'ADN est rincé avec de l'éthanol 70% froid puis séché à l'étuve à

37°C jusqu'à évaporation complète de l'alcool. Les culots sont repris dans 50 µL d'eau stérile, l'ADN est dosé par spectrophotométrie à 260 nm puis conservé à -20°C.

2. Amplification in vitro de fragments d'ADN

Afin d'amplifier les fragments d'ADN, nous avons utilisé la *Taq* polymérase "Advantage cDNA polymerase" (Clontech) suivant une séquence d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'ADN matrice est dilué dans 50 µL de tampon *Taq* polymérase (Clontech), en présence de 25 µM de chaque désoxynucléotides, 250 µM de chaque amorce, 0,3 µL de *Taq* polymérase (Clontech). Les tubes contenant le mélange sont placés dans un incubateur programmable (Robocycler/Stratagene). L'amplification s'effectue en plusieurs cycles contenant trois étapes : une phase de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation de 65 à 53°C suivant le cycle et une phase d'élongation à 72°C. Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- 1 cycle de 5 min à 94°C, 30 s à 65°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 64°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 63°C, 2 min à 72°C



- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 54°C, 2 min à 72°C

- 34 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 53°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 53°C, 5 min à 72°C

L'efficacité de la réaction d'amplification est validée par analyse de 10 µL du mélange réactionnel par électrophorèse sur gel d'agarose.

B- Techniques de clonage en système procaryote

1. Souches bactériennes utilisées

La souche d'*Escherichia coli* DH5α a été utilisée pour le clonage des gènes fusionnés à la GFP et la production de plasmides recombinants. Cette souche est déficiente pour le processus de recombinaison (*RecA*). Les bactéries utilisées pour les transformations sont thermo-compétentes (Novagen).

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie pathogène pour les plantes supérieures qui induit une tumeur chez la plante parasitée. Elle possède un plasmide Ti, de 214 kb, permettant à la bactérie de transférer un fragment d'ADN-T qui contient des gènes induisant la tumeur chez la plante. Ce fragment d'ADN s'intègre de manière aléatoire dans le génome nucléaire

de la cellule hôte. Les gènes portés par cet ADN-T peuvent être remplacés par des gènes d'intérêt, suivant les techniques classiques de biologie moléculaire. Cette bactérie est donc très utilisée pour construire des plantes transgéniques. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée est la souche C58, résistante à la rifampicilline et à la carbenicilline et ne possédant pas de plasmide Ti. Les bactéries sont rendues électrocompétentes par centrifugation et lavages successifs dans de l'eau. Elles sont ensuite conservées dans du glycérol 10 %.

2. Vecteurs d'expression utilisés

Les vecteurs pUC18, résistants à la carbenicilline, contenant le promoteur fort et constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, le gène de la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP et le terminateur du gène de la nopaline synthase, ont été construits par Awai et al. (2001). Six vecteurs ont été utilisés avec des protéines d'intérêt différentes : GFP seul, TP-GFP (peptide de transit de la rubisco fusionné à la GFP), OEP21-GFP (protéine de la membrane externe de l'enveloppe fusionnée à la GFP), MGD2-GFP et MGD3-GFP (MGDG synthases de type B fusionnées à la GFP).

Le vecteur binaire *E. coli/Agrobacterium* pEL103 (créé par Eric Lam, Université du New Jersey, USA) est dérivé du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, il confère une résistance à la kanamycine à son hôte. Ce vecteur comporte entre les bords droit et gauche de l'ADN-T une construction destinée à l'expression de protéines chez les plantes, comprenant le promoteur 35S, un activateur traductionnel Ω et le terminateur du gène de la nopaline synthase.

Le vecteur pKS, résistant à la carbenicilline, a été utilisé pour le clonage intermédiaire des fusions GFP, TP-GFP et MGD3-GFP avant leur insertion dans pEL103.

3. Extraction de plasmides présents dans les bactéries

Les plasmides sont extraits par lyse alcaline des bactéries et purification sur colonne d'affinité à partir des kits de mini ou midi-préparations (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

4. Extraction de fragments d'ADN présents dans un gel d'agarose

Les fragments d'ADN issus d'une digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose contenant 0,005 % de bromure d'éthidium (v/v). Les inserts sont localisés après exposition courte sous un éclairage ultra-violet et la bande d'agarose contenant le fragment à

purifier est découpée. Le kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) est utilisé pour extraire l'ADN de l'agarose.

5. Insertion des ADNc dans les vecteurs

Les séquences de la GFP, des fusions TP-GFP et MGD3-GFP n'ont pas de site SacI, HindIII et NotI. Les plasmides pUC18 contenant la GFP, TP-GFP et MGD3-GFP, ainsi que le vecteur pKS, sont digérés avec HindIII et NotI. Les inserts sont récupérés après séparation du vecteur par migration sur gel d'agarose et clonés dans le vecteur pKS. La présence des inserts est vérifiée par digestion, PCR et séquençage. Les plasmides pKS, contenant la GFP, TP-GFP et MGD3-GFP, ainsi que pEL103, sont digérées avec HindIII et SacI, et les inserts sont clonés dans pEL103.

L'insert MGD2-GFP n'a pas de site HindIII mais possède un site EcoRI. Le plasmide pUC18 porteur de la construction MGD2-GFP est digéré complètement avec HindIII. La linéarisation totale du vecteur est vérifiée sur gel d'agarose. Ensuite, le vecteur est digéré partiellement avec EcoRI pour obtenir un fragment correspondant à l'insert MGD2-GFP entier. Le fragment est isolé sur gel d'agarose, purifié, puis cloné dans pEL103 coupé avec EcoRI et HindIII.

L'insert OEP21-GFP n'a pas de site EcoRI mais possède un site HindIII. La même stratégie que pour l'insert MGD2-GFP est donc effectuée avec une digestion totale par EcoRI puis une digestion partielle par HindIII. Le fragment correspondant à l'insert complet OEP21-GFP est inséré dans pEL103 digéré complètement avec EcoRI et HindIII.

L'ensemble des constructions obtenues dans pEL103 est vérifié par séquençage de l'ADN présent avant le gène de la GFP.

6. Transformation des bactéries

Les bactéries DH5 α sont transformées par choc thermique. Après incubation pendant 30 min en présence de 10 ng de plasmide, les bactéries compétentes sont chauffées 40 s à 42°C puis transférées 2 min dans la glace afin de laisser pénétrer le plasmide dans la bactérie. La suspension bactérienne est ensuite incubée 1 h dans du milieu SOC (20 g/L bacto-tryptone, 5g/L extrait bactérie-levure, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose, pH 7) à 37°C. Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide, la suspension bactérienne est étalée sur boîte de Pétri, contenant du milieu Luria-Broth (LB) et l'antibiotique dont le plasmide possède le gène de résistance, et cultivée à 37°C pendant 12 h pour permettre le développement des colonies.

Les *Agrobacterium* sont transformés par électroporation. Les bactéries compétentes sont incubées pendant 1 min dans la glace avec les constructions pEL103 dans une cuve d'électroporation. Les *Agrobacterium* sont transformées par un choc électrique à 2,5 kV. La suspension bactérienne est ensuite incubée pendant 1h30 dans du milieu SOC à 28°C. Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide, la suspension est étalée sur boîte de Pétri, contenant du milieu LB et les antibiotiques rifampicilline, carbenicilline, kanamycine, et cultivée à 28°C pendant 2 jours pour permettre le développement des colonies.

VII. Expression de protéines fusionnées à la GFP

A- Transformation par biolistique et expression transitoire chez le pois

La biolistique permet de forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales, pour exprimer un gène d'intérêt de manière transitoire. Le principe consiste à projeter sur le tissu à transformer de toutes petites billes d'or enrobées d'ADN.

Des feuilles de pois d'une dizaine de jours sont déposées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MS (Duchefa), Agar 0,8%, saccharose 5 g/L. 5 µg d'ADN des constructions pUC18 contenant les différentes fusions GFP et 3 µg de billes d'or de 1 µm de diamètre (Bio-rad) sont mélangés dans un volume de 55 µL d'eau. Après addition de 50 µL de 2,5 M CaCl₂ dans l'éthanol et 20 µL de spermidine 0,1 M, l'ADN se fixe sur les billes d'or. Les billes enrobées d'ADN sont ensuite récupérées par centrifugation, puis rincées à l'éthanol et conservées dans 60 µL d'éthanol. Les billes sont déposées et séchées sur un disque "macrocarrier" pour le bombardement.

Les feuilles, dans la boîte de Pétri, sont placées sous vide dans un canon à particule (Biolistic PDS -1000 /He BioRad), puis transformées par bombardement des billes d'or. Les billes d'or sont projetées sur les feuilles par un jet d'hélium de 1350 psi, libéré par la rupture d'un disque (Bio-rad). Les feuilles bombardées sont exposées à la lumière pendant 36 h et observées au microscope confocal sous lame et lamelle. Les lames sont observées avec un objectif à immersion x 40 à température ambiante avec un système Leica TCS-SP2. La GFP et la chlorophylle sont excitées en utilisant respectivement les longueurs d'onde 488 nm provenant d'un laser argon et 633 nm d'un laser He-Ne. Les fluorescences sont collectées aux longueurs d'onde de 498 nm à 533 nm pour la GFP et de 645 nm à 705 nm pour la chlorophylle.

B- Transformation et expression stable chez Arabidopsis thaliana

La transgénèse végétale utilise les propriétés du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est capable de transférer un fragment d'ADN-T dans le génome de la plante. Après quatre semaines de culture, les plants d'*Arabidopsis* sont transformés en incubant leur inflorescences de 5 à 45 s dans une solution de 5 % saccharose (m/v), 0,02 % (v/v) du surfactant Silwett L-77, dans laquelle des *Agrobacterium tumefaciens*, contenant les constructions pEL103, ont été remis en suspension (densité optique 0,8). Les graines sont ensuite récupérées après maturation et les plants transformés sont sélectionnés sur milieu MS (Duchefa), Agar 0,8%, saccharose 5 g/L et kanamycine 50 µg/mL. Les feuilles des plants résistants sont observées par microscopie confocale de la même manière que les feuilles de pois bombardées.

VIII. Analyse par microscopie

A- Visualisation de l'immunoagglutination d'organites

L'immunoagglutination permet d'agréger des organites par l'utilisation d'anticorps reconnaissant des antigènes présents à leur surface. Les anticorps dirigés contre du DGDG (Maréchal *et al.*, 2002) ou des protéines de l'enveloppe des plastes et de la membrane externe des mitochondries sont utilisés pour rechercher leur présence éventuelle à la surface externe de chloroplastes ou de mitochondries purifiés. Pour les expériences d'agglutination, les suspensions de mitochondries ou de chloroplastes, correspondant respectivement à une respiration de 15 nmol O₂/min ou à 18 µg de chlorophylle, dans un volume final de 6 µL de milieu de lavage, ont été incubées pendant 10 min sur une lame de verre avec 6 µL d'anticorps. La suspension est ensuite observée à température ambiante par microscopie optique (Axioplan 2, Zeiss) en utilisant l'objectif à immersion x 100 et une caméra CCD Hamamatsu pour suivre le phénomène d'agglutination.

B- Visualisation par épifluorescence indirecte sur cellules d'Arabidopsis

La technique d'épifluorescence permet de localiser par immuno-marquage indirect un antigène dans la cellule, en utilisant des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, ici Bodipy et Alexa 594. Les cellules d'*Arabidopsis* sont fixées 20 min dans un tampon TBS (1,3 M NaCl, 13 mM KCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7,4), contenant 5% de formaldéhyde sans méthanol (Polyscience). Les cellules sont ensuite rincées avec du TBS, perméabilisées 15 min

avec du TBS, 0,01% saponine et saturée 1 h avec du TBS, contenant 5% FBS (Fetal Bovin Serum) et 5% sérum de chèvre. Différentes étapes se succèdent ensuite pour permettre le marquage des cellules :

- Une incubation pendant 1 h avec du sérum de lapin anti-DGDG ou anti-OEP21 au $1/10^{\text{ème}}$ et du sérum de cobaye anti-BCCP1 ou anti-HPPK-DHPS au $1/100^{\text{ème}}$ dans du TBS, 1% FBS, 0,1% saponine
- Trois lavages de 10 min dans du TBS, 1% FBS, 0,1% saponine
- Une incubation pendant 1 h avec des anticorps de chèvre anti-lapin couplés au Bodipy au $1/100^{\text{ème}}$ et des anticorps de chèvre anti-cobaye couplés à l'Alexa 594 au $1/20^{\text{ème}}$ (Molecular Probes) dans du TBS, 1% FBS, 0,1% saponine à l'obscurité
- Trois lavages de 10 min dans du TBS, 1% FBS, 0,1% saponine à l'obscurité
- Un lavage dans du TBS à l'obscurité

Enfin, les cellules sont déposées sur lame de verre dans du milieu du prolong antifade kit (Molecular Probes), afin de diminuer la diffusion de la fluorescence, et conservées à l'obscurité. Avant la fixation, certaines cellules sont incubées pendant 1 h, dans leur milieu de culture, en présence du Mitotracker orange CMTMRos (Molecular Probes), permettant un marquage des mitochondries, et rincées deux fois dans du TBS.

Les lames sont observées avec un objectif à immersion x 40 à température ambiante le jour suivant, par microscopie confocale avec un système Leica TCS-SP2. Le Bodipy, l'Alexa 594 et le Mitotracker sont excités en utilisant les longueurs d'onde 488 nm provenant d'un laser argon pour le Bodipy et 543 nm d'un laser He-Ne pour l'Alexa 594 et le Mitotracker. Les fluorescences sont collectées séquentiellement (400 Hz, longueur d'onde par longueur d'onde) aux longueurs d'onde de 498 nm à 533 nm, 580 nm à 650 nm, 553 nm à 607 nm, pour le Bodipy, l'Alexa 594 et le Mitotracker respectivement.

C- Visualisation des structures membranaires subcellulaires par microscopie électronique en transmission

Un microscope électronique en transmission (MET) peut-être comparé au microscope optique. Au lieu de la lumière visible (onde électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 400 et 800 nm), un MET utilise des électrons hautement énergétiques (dont la longueur d'onde est 100.000 fois plus petite que celle de la lumière) qui permettent de visualiser des objets beaucoup plus petits qu'au microscope optique (2.10^{-10} m au lieu de 2.10^{-7} m). Ainsi,

dans une cellule visualisée par microscopie électronique en transmission, les membranes sont observables.

Les cellules d'*Arabidopsis* sont fixées pendant 16 h à 4°C dans 1 mL de tampon 0,1 M cacodylate de sodium, 1,5% glutaraldéhyde, à pH 6,9. Les cellules sont ensuite à nouveau fixées dans 1 mL de tampon 0,1 M cacodylate de sodium, 1% tetroxide d'osmium pendant 2 h. Après cette double fixation, les cellules fixées sont incubées pendant 30 min dans une solution de 0,1 M cacodylate de sodium, 1% d'acide tannique à température ambiante, déshydratées par une augmentation croissante d'éthanol et d'oxyde de propylène et finalement incluses dans un mélange Epon-Araldite. Des sections fines sont coupées par un ultramicrotome (Ultracut, Reichert-Jung, Wien, Austria), colorées par du citrate de plomb et analysées au microscope électronique à transmission (Hitachi 300, Tokyo, Japan) à 75 kV.

Chapitre I :

Remaniement lipidique de
la cellule végétale en
carence de phosphate

Remaniement lipidique de la cellule végétale en carence de phosphate

Chez les plantes, la carence de phosphate induit une diminution de la teneur en phospholipides, permettant une mobilisation de cette réserve en phosphate, et à l'inverse une augmentation de la teneur en glycolipides plastidiaux, tels que le DGDG. Afin de mieux comprendre la relation possible entre ces deux phénomènes suivant des échanges de squelette hydrophobe entre phospholipides et glycolipides, nous avons analysé l'évolution de la composition lipidique lors de l'établissement de la carence de phosphate. Quand une plante est exposée à un manque de phosphate, les racines sont affectées avant les autres tissus. Les changements métaboliques intervenant dans les temps courts de la carence sont donc masqués par la variabilité de l'exposition des différents tissus. Pour s'affranchir du décalage de réponses entre tissus et débiter notre étude par une analyse simple, nous avons entrepris de suivre l'évolution des différents lipides de suspensions cellulaires d'érable ou d'*Arabidopsis*.

Nous avons dans un premier temps vérifié que les variations de teneur en lipides étaient dues à des échanges de têtes polaires et non pas à des néosynthèses. Ensuite, nous avons analysé l'évolution de chaque lipide et de leur composition en acide gras au cours de la carence et enfin nous avons tenté, à partir de ces données et des connaissances que nous avons sur les enzymes de synthèse des galactolipides, d'établir un schéma métabolique cohérent avec les transferts de squelette hydrophobe que nous avons pu mettre en évidence.

I. Evolution de la quantité en acide gras des cellules lors de l'établissement de la carence de phosphate

Avant d'analyser l'influence de la carence de phosphate sur les têtes polaires des glycérolipides, contenant ou non du phosphate, nous avons étudié l'incidence possible de la carence de phosphate sur la néosynthèse des acides gras. Nous avons pour cela analysé la quantité d'acide gras par volume de culture de cellules d'érable au cours du temps (Figure 24). Les cellules cultivées en conditions non carencées (témoin) se divisent en continu dans leur milieu de culture, le temps de division étant approximativement de deux jours. La quantité d'acide gras est proportionnelle au poids sec des cellules et suit de ce fait la division cellulaire. Quand les cellules d'érable sont transférées dans un milieu sans phosphate, le taux

de croissance est maintenu pendant deux jours, correspondant à une seule étape de division cellulaire puis il se stabilise après deux jours. L'évolution de la quantité d'acide gras à 18 et 16 atomes de carbones (C18 et C16) suit l'aspect de la courbe de croissance cellulaire (Figure 24). Ces observations sont cohérentes avec les propriétés du phosphate, en tant que facteur limitant de la division cellulaire dans son ensemble (Sano *et al.*, 1999). La néosynthèse des acides gras est donc dépendante de la teneur en phosphate, par l'intermédiaire de la croissance cellulaire.

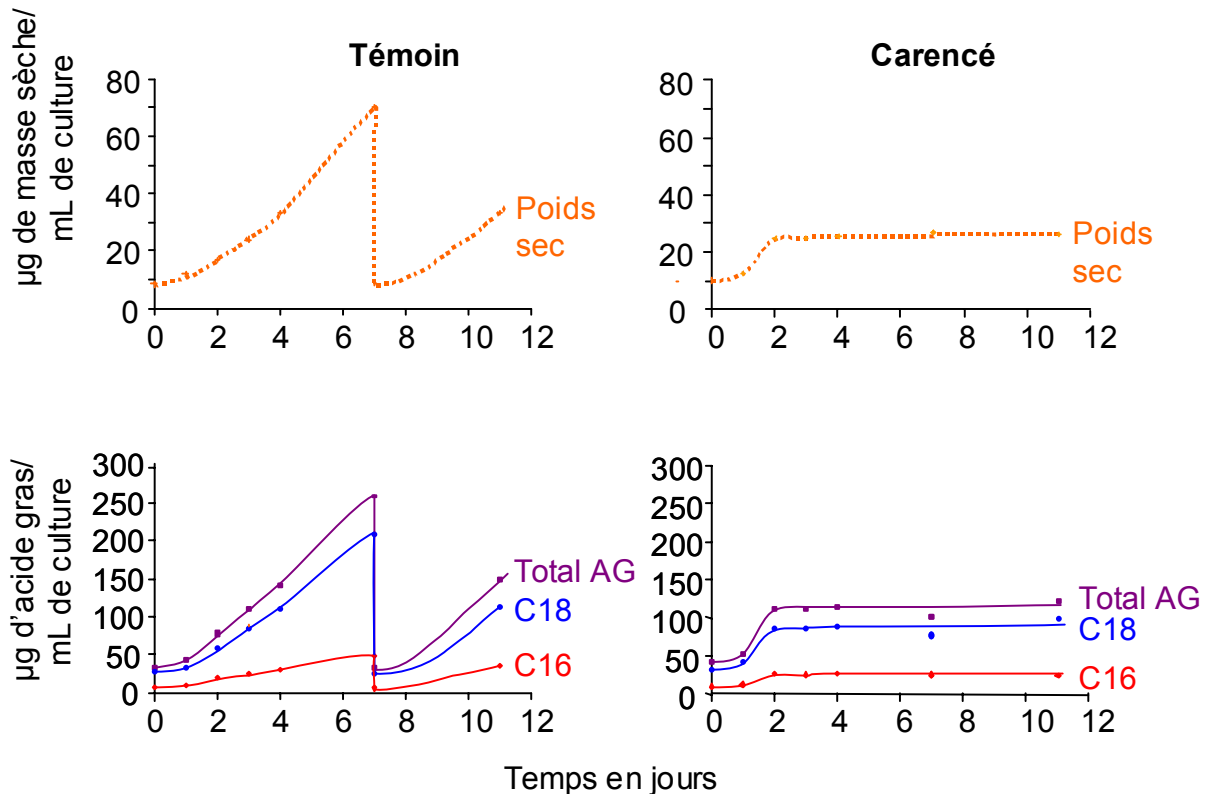


Figure 24 : Evolution au cours du temps de la masse sèche et de la quantité d'acide gras des cultures d'*Acer pseudoplatanus*. Les cellules sont cultivées pendant 11 jours à partir d'une concentration de 9 mg de matière sèche/mL de milieu de culture contenant 0 (Carencé) ou 4 mM (Témoin) de phosphate. Après 7 jours de culture, les cellules sont transférées dans du milieu neuf sans dilution pour les cellules carencées et avec un facteur de dilution 8 pour les cellules témoin.

Dans cette analyse, nous notons, de plus, que pendant les deux premiers jours de la carence de phosphate, les cellules d'érable possèdent encore suffisamment de phosphate pour se diviser une dernière fois. Ensuite, les cellules stoppent leurs divisions et arrêtent de synthétiser des acides gras. Ainsi, tous les changements de composition lipidique que nous observons en carence de phosphate sont dus à des remaniements des squelettes hydrophobes et non pas à des néosynthèses.

II. Analyse des lipides cellulaires au cours de la carence de phosphate

Les données connues sur la carence de phosphate au niveau des lipides n'étaient disponibles que sur des temps longs : les graines germent sur des milieux carencés ou non, et la composition lipidique des tissus est comparée entre les deux types de culture, souvent dix jours après germination. Pour essayer de comprendre la mise en place des modifications lipidiques, nous avons étudié les changements intervenant lors de l'établissement de la carence. Dans cette optique, nous avons analysé la composition en lipides et en acides gras des cellules d'érable et d'*Arabidopsis* au cours du temps dans des milieux de culture contenant ou non du phosphate.

A- Composition lipidique de suspensions cellulaires au cours de la carence de phosphate

Nous avons tout d'abord étudié l'évolution de la composition en lipides sur les cellules d'érable, un modèle de plante simple. En effet, l'érable sycomore est un exemple de plante de type C18:3 ; ses glycolipides ne sont donc synthétisés qu'à partir de la voie eucaryote. L'interprétation des changements mis en œuvre est donc plus simple que chez *Arabidopsis* qui possède les deux voies eucaryote et procaryote pour la synthèse de ses glycolipides.

1. Composition lipidique des cellules d'érable

Dans les mêmes conditions d'études que celles décrites précédemment (voir ce chapitre, I-), nous avons suivi, sur onze jours, l'évolution de la répartition des glycolipides chez *Acer pseudoplatanus*, dans des conditions de culture avec ou sans phosphate (Figure 25). La composition en lipides des cellules témoin est stable au cours du temps, malgré une synthèse permanente de lipides. La distribution des lipides est donc finement régulée dans la cellule. En comparaison, la distribution des lipides en carence de phosphate est rapidement modifiée.

D'une part, la teneur en glycolipides, ne contenant pas de phosphore, augmente après un jour de carence de phosphate. Cette augmentation est particulièrement forte pour le DGDG. D'autre part, une redistribution complexe des phospholipides s'opère. Les proportions de PE et de PG diminuent dès le premier jour de carence et jusqu'à la fin de l'expérience. La teneur en PI amorce une légère baisse le premier jour puis est restauré à son niveau initial après trois jours ; peut-être joue-t-il un rôle dans la transduction du signal phosphate. La proportion de DPG reste stable, voire augmente légèrement, comme si ce

phospholipide mitochondrial était préservé de la carence de phosphate. Le plus étonnant est une augmentation transitoire de la PC : la proportion de PC augmente significativement le premier jour, reste élevée trois jours avant de décroître en dessous de son niveau initial (Figure 25).

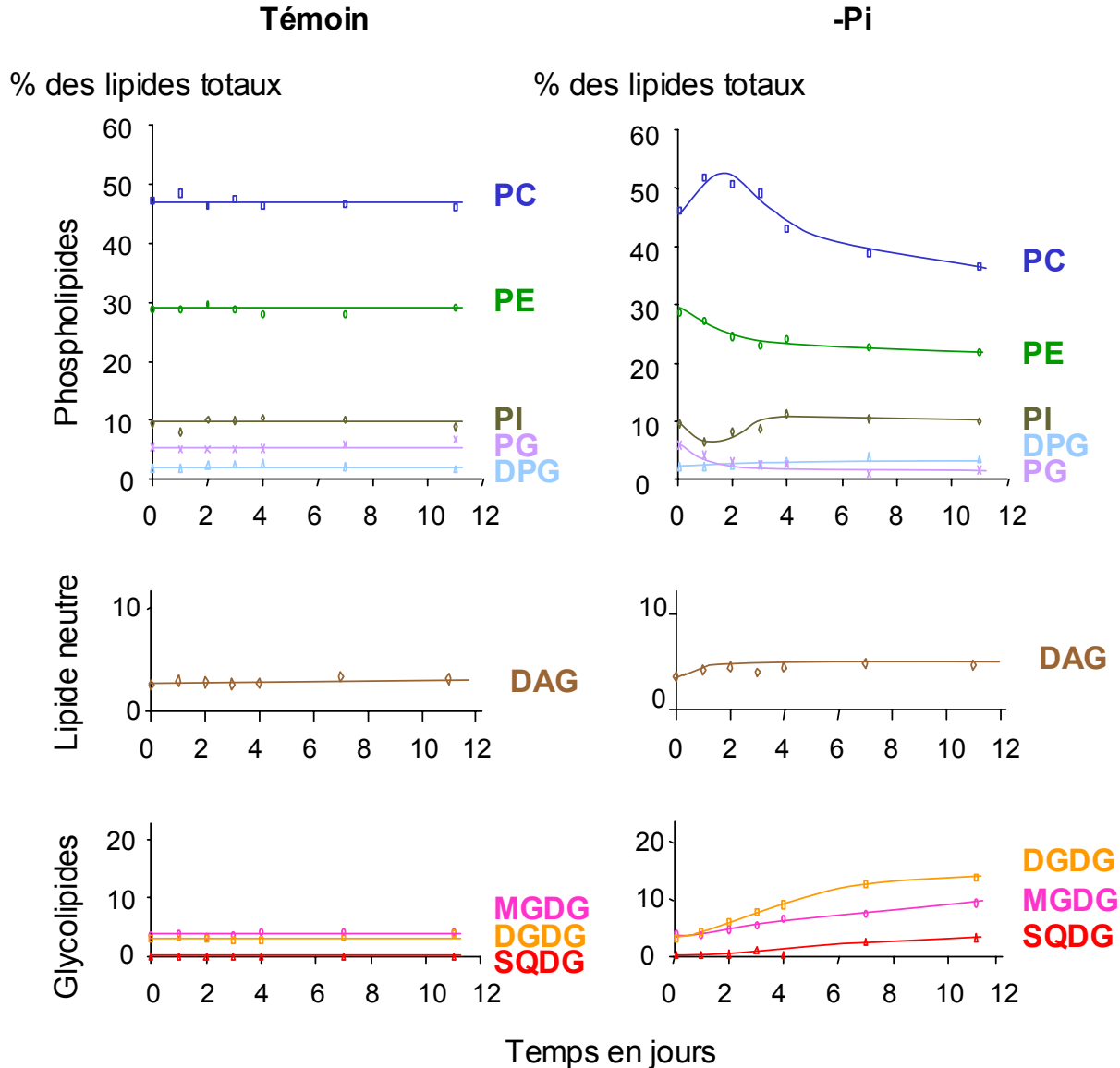


Figure 25 : Evolution de la teneur en lipide des cellules d'érable cultivées dans des milieux contenant 0 ou 4 mM de phosphate. Les phospholipides, glycolipides et diacylglycérol ont été analysés par chromatographie sur couche mince et par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats des jours 0, 1 et 2 sont des valeurs moyennes de respectivement quatre, trois et deux expériences avec variabilité maximum de 5% pour la PC et la PE, 10% pour le DPG, le PG, le MGDG et le DGDG et 15% pour le PI.

Les données concernant les phospholipides ont été confirmées par RMN du ^{31}P , confirmant la baisse précoce de la PE et du PG, la stabilité du DPG et l'augmentation transitoire de la PC. La RMN du ^{31}P permet aussi de voir la disparition des formes méthylées de la PE, intermédiaires dans la synthèse de la PC, suggérant une transformation de la PE en PC (Figure 26).

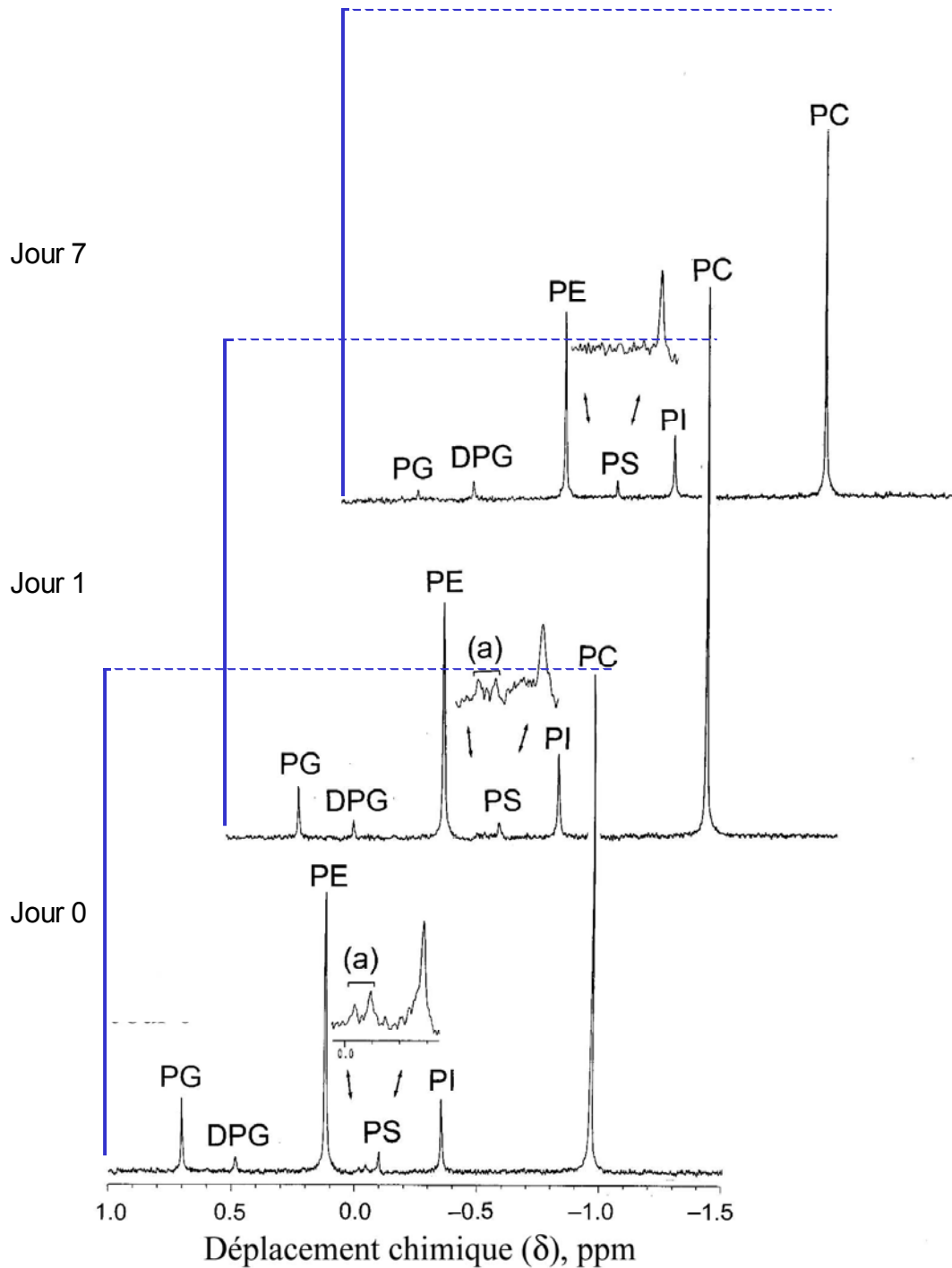


Figure 26 : Spectres RMN du ³¹P représentant les phospholipides extraits *in vitro* de cellules d'érable cultivées depuis les jours indiquées en milieu dépourvu de phosphate. La détermination des pics a été effectuée par addition des composés authentiques. (a) : cette paire de pics correspond à la phosphatidylmonométhyléthanolamine et à la phosphatidyl diméthyléthanolamine. Le trait bleu représente la hauteur du pic de PC au jour 0.

La PC est considérée comme la principale source de DAG pour les galactolipides plastidiaux de type eucaryote et l'érable ne possède que des galactolipides de type eucaryote. Nous pouvons donc supposer que le PG et la PE "fournissent" leur squelette hydrophobe à la PC, ce qui se traduit par leur diminution relative et l'augmentation de la PC. La PC est ensuite hydrolysée, générant du DAG nécessaire à la synthèse des galactolipides chez l'érable,

phénomène qui se traduit par une diminution relative de la teneur en PC. En effet, la teneur en DAG par rapport aux lipides totaux augmente de 2,5 % à 5 % (Figure 25). L'articulation entre cette augmentation de DAG et le pic transitoire de PC est cohérente si la PC joue un rôle de donneur de squelette hydrophobe aux galactolipides en carence de phosphate. Pour savoir si ce phénomène était ou non spécifique des plantes en C18:3, nous avons analysé de la même manière les lipides d'*Arabidopsis thaliana*.

2. Composition lipidique des cellules d'*Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis est une plante en C16:3 et peut donc synthétiser ses galactolipides par la voie eucaryote et aussi par la voie procaryote qui n'implique pas la PC. Les cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* sont vertes et possèdent des membranes de thylacoïdes dans leurs chloroplastes, en comparaison avec les cellules d'érable qui contiennent uniquement des amyloplast. La proportion de galactolipides est donc plus importante dans ces cellules même en condition standard (Figure 27).

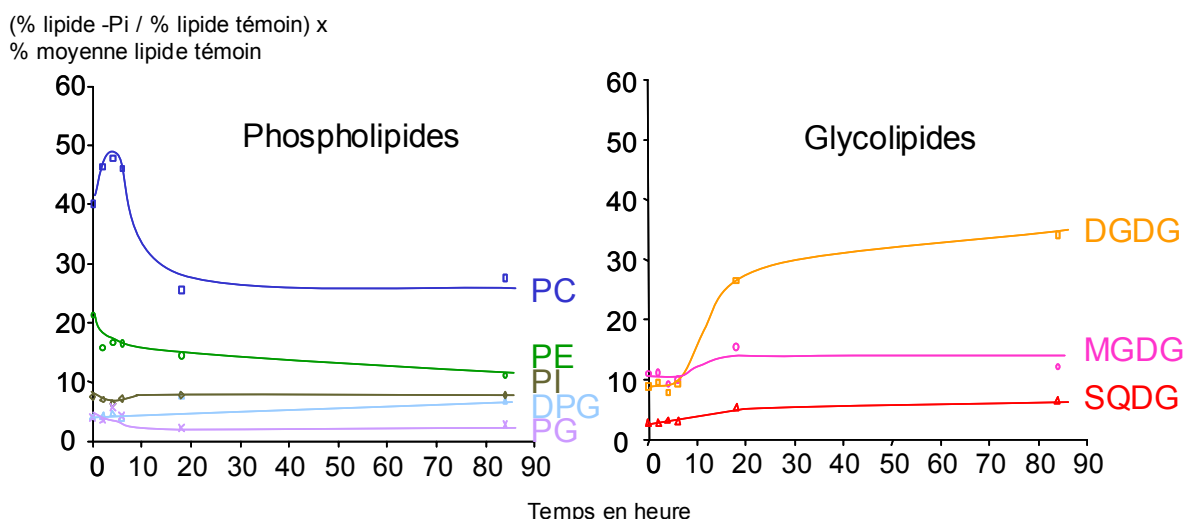


Figure 27 : Evolution de la teneur en lipide des cellules d'*Arabidopsis* cultivées dans des milieux contenant 0 mM de phosphate par comparaison à la teneur en lipide de cellules témoin. Trois lots de cellules à 10 mg de matière fraîche par mL, cultivés précédemment dans un milieu contenant 1 mM de phosphate, ont été cultivés pendant 2-4-6 heures, 18 heures et 4 jours dans un milieu sans phosphate. Comme des variations dans la composition en lipide initiale des cellules ont été observées, la composition en lipide des cellules carencées a été rapportée à une composition initiale moyenne. Les phospholipides, glycolipides et diacylglycérol ont été analysés par chromatographie sur couche mince et par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés.

Si nous suivons la proportion de chaque lipide dans les cellules d'*Arabidopsis*, nous observons une augmentation transitoire de PC en carence de phosphate. A la différence de ce que nous avons observé chez l'érable, le pic de PC se produit beaucoup plus tôt dans les cellules d'*Arabidopsis*. En effet, le pic de PC est détecté 2 heures après le transfert en milieu carencé. La concentration maximum de PC est synchronisée avec le début de l'augmentation de DGDG, 4 heures après le transfert. De plus, l'augmentation de la teneur en DGDG et la

diminution de la teneur en PC sont beaucoup plus importantes dans les cellules d'*Arabidopsis* que dans les cellules d'érable.

Les expériences, réalisées sur des plantes en C18:3 et en C16:3, montrent que la carence de phosphate induit une augmentation transitoire de PC précédant celle des galactolipides, indépendamment de la présence de la voie procaryote de synthèse des galactolipides. La PC est probablement le glycérolipide affecté par la carence de phosphate à l'origine du DAG, qui s'accumule dans les cellules. En cohérence avec ce scénario, comme dans les cellules d'érable, la teneur en DAG augmente dans les cellules d'*Arabidopsis* (5,5 % des lipides totaux après 18 heures de carence au lieu de 2,7 % dans les cellules témoin).

L'accumulation de PC mesurée au début de la carence de phosphate est un état transitoire entre un état initial de synthèse liée à la croissance cellulaire et un nouvel état métabolique. Au cours de cette transition, la production de PC est stimulée puis la PC est utilisée par une nouvelle voie métabolique dans laquelle sa consommation est plus rapide que sa production. Puisqu'en carence de phosphate, il n'y a plus de synthèse d'acides gras, l'hypothèse la plus simple est que la nouvelle voie métabolique d'utilisation de la PC génère, comme nous l'avons observé, du DAG, qui serait ensuite une source de squelette hydrophobe pour la synthèse des galactolipides. Pour vérifier ce rôle de donneur de squelette hydrophobe de la PC, nous avons analysé l'évolution de la composition en acide gras de chaque classe de lipides au cours de la carence de phosphate.

B- Composition en acide gras des lipides au cours de la carence de phosphate

Acer pseudoplatanus, plante en C18:3, ne possède pas d'acide gras à 16 carbones désaturés au contraire d'*Arabidopsis*. Nous avons d'abord étudié l'évolution de la composition en acide gras de chaque lipide lors de l'établissement de la carence de phosphate chez ce modèle de plante, puis pour mieux comprendre les transferts de squelettes hydrophobes nous avons suivi les quantités de C16:0 réparties dans les différentes classes de lipides au cours de la carence.

1. Evolution de la composition en acide gras des différents lipides au cours de la carence de phosphate

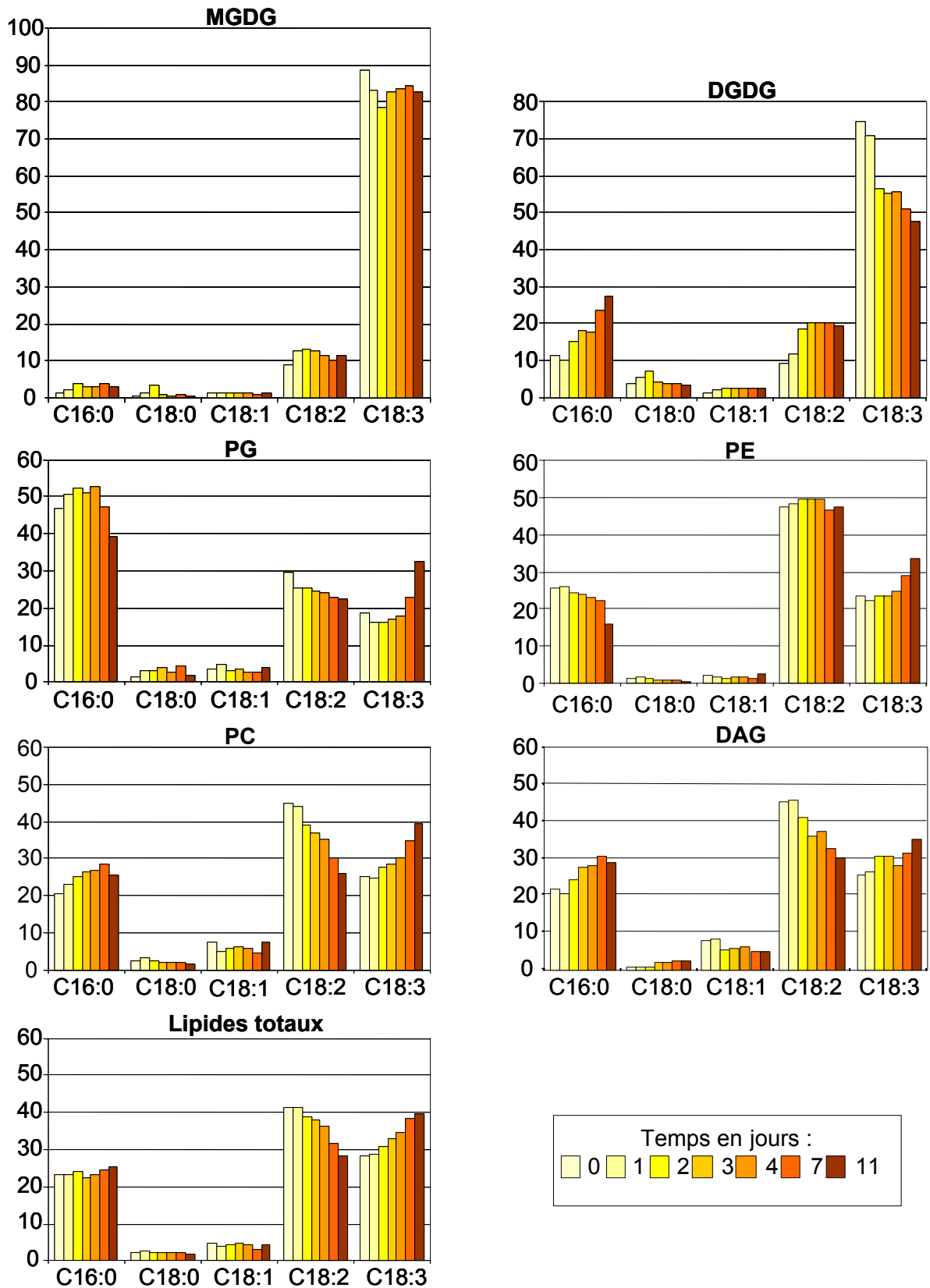


Figure 28 : Evolution au cours du temps de la composition en acide gras des lipides des cellules d'érable soumises à une carence de phosphate. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale d'acide gras de chaque lipide.

Au temps 0, les phospholipides, tels que la PE, la PC et le PG, possèdent une teneur élevée en C16:0, un acide gras qui est toujours estérifié en position sn-1 du glycérol et qui n'est jamais désaturé dans les plantes en C18:3. En comparaison, la teneur en C16:0 des galactolipides est beaucoup plus faible. Bien que la proportion en C18:2 soit plus élevée dans les phospholipides que celle en C16:0, le C18:2 ne peut être utilisé comme signature de squelette hydrophobe car il peut être à la fois transféré et désaturé en C18:3. Ainsi, une diminution de la teneur en C18:2 au profit du C18:3 est observée au cours de la carence dans le profil des lipides totaux de la cellule (Figure 28) suggérant la stimulation de cette étape de désaturation par la carence de phosphate.

La PC, dès le début de la carence de phosphate, a une teneur en C16:0 et en C18:3 qui augmente alors que celle en C18:2 diminue. Cette variation traduit vraisemblablement une dégradation de la PE possédant du C16:0 (nous observons globalement au cours de la carence une baisse de la teneur en C16:0 de la PE) ainsi que du PG qui est plus riche en C16:0 que la PC. De plus, ces phospholipides peuvent transmettre leur squelette hydrophobe contenant du C16:0 à la PC.

Le DAG possède une composition en acide gras quasi-identique à celle de la PC, indiquant qu'il dérive directement d'une hydrolyse de la PC. Le pool de DAG cellulaire est vraisemblablement en équilibre avec le pool de PC. En revanche, la composition en acide gras des galactolipides est différente de celle du DAG. De manière surprenante, la composition du MGDG reste stable alors que la teneur en C16:0 et en C18:2 du DGDG augmente et celle en C18:3 diminue. Ces résultats indiquent que l'évolution du profil moléculaire du DGDG nouvellement synthétisé est compatible avec l'utilisation du DAG issu de l'hydrolyse de la PC, mais que la sélection des espèces moléculaires d'acides gras du DGDG serait vraisemblablement finement régulée par les enzymes de synthèse des galactolipides. De plus, le transfert du squelette hydrophobe entre le DAG et le DGDG s'effectue transitoirement par le MGDG car aucune variation de sa composition en acide gras n'est observée au cours de la carence de phosphate.

Afin d'étayer ces hypothèses, nous avons suivi la répartition du C16:0 entre les différentes classes de lipides, le C16:0 étant considéré comme la signature primaire d'un transfert de squelette hydrophobe d'origine eucaryote, pour cette étude réalisée dans une plante en C18:3.

2. Evolution de la répartition du C16:0 dans les différents lipides dans des cellules d'érable au cours de la carence de phosphate.

Nous avons étudié la distribution du C16:0 dans les différentes classes de lipides après le transfert des cellules d'érable dans un milieu de culture sans phosphate (Figure 29). Par comparaison avec la Figure 25, si nous considérons le C16:0 de la PE, nous constatons que la diminution de la PE est sélective : les espèces de la PE contenant du C16:0 sont hydrolysées préférentiellement. Le C16:0 du PG diminue aussi, mais, l'évolution des acides gras du PG est légèrement plus complexe car pratiquement tout le PG est hydrolysé. En revanche, le C16:0 est stocké transitoirement dans la PC. Ces données nous permettent d'enrichir notre hypothèse sur le mécanisme de l'augmentation transitoire de PC, suivant une conversion directe ou indirecte des autres phospholipides en PC avant son hydrolyse en DAG.

% de C16:0 dans les lipides polaires

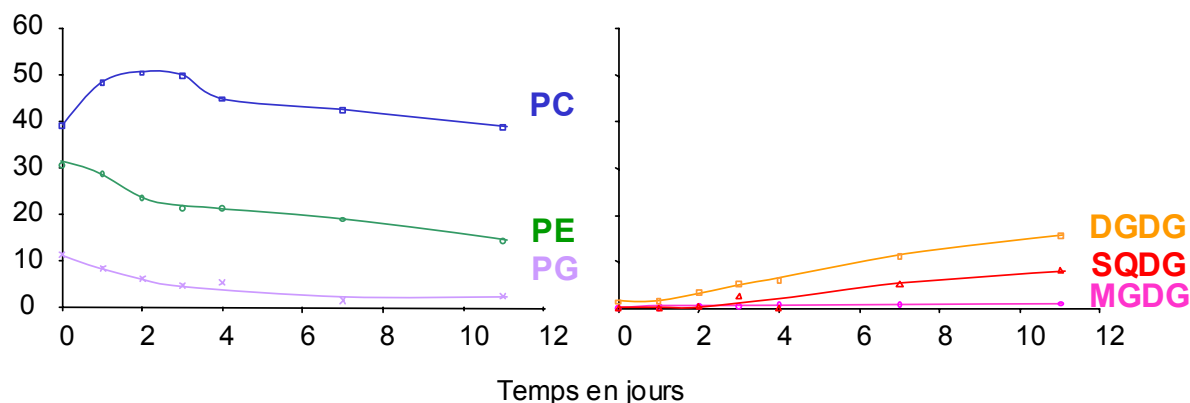


Figure 29 : Evolution de la répartition du C16:0 dans les différentes classes de lipides. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale de C16:0 dans les glycérolipides. Dans les cellules témoin, la répartition du C16:0 reste stable durant toute la période de culture.

Le C16:0 de la PC commence à diminuer à partir du moment où la quantité de C16:0 du DGDG et du SQDG augmente. Le C16:0 suit donc le trajet suivant :



Cependant, le MGDG produit pour la synthèse du DGDG est transitoire puisque la composition en acides gras du MGDG et sa teneur en C16:0 ne varient pas au cours de la carence de phosphate. Le pool de MGDG présent dans les plastes doit donc être différent de celui utilisé par les DGDG synthases et nous pouvons supposer qu'il existe un couplage entre la synthèse du MGDG et du DGDG en carence de phosphate. Les enzymes de synthèse du MGDG sont donc les facteurs clés de la production du DGDG en carence de phosphate.

III. Discussion

Les analyses de chaque classe de lipides au cours de la carence de phosphate fournissent de nouvelles informations sur la synthèse de DGDG et sur la source de galactolipides eucaryotes. Il nous est possible d'établir une séquence d'évènements qui articulent les remaniements du métabolisme des lipides. Au cours de la carence de phosphate, les phospholipides PE et PG sont dégradés très tôt et transmettent leur squelette DAG à la PC. Dans un premier temps, suivant cet échange et indépendamment de toute néosynthèse, la teneur en PC des cellules augmente rapidement. Dans un second temps, la synthèse en DGDG est activée. Approvisionnant cette synthèse, la PC est hydrolysé en DAG ; ainsi, la teneur en PC diminue et la quantité de DAG, en équilibre avec la PC, augmente légèrement. De façon surprenante, le MGDG, qui est un intermédiaire de la synthèse du DGDG, n'est pas affecté par la carence de phosphate. Nous nous sommes donc demandé quelle était l'importance des enzymes de synthèse des galactolipides dans ce phénomène.

La synthèse du DGDG en carence de phosphate est liée à la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des galactolipides, les MGDG synthases de type B (*mgd2* et *mgd3* chez *Arabidopsis*) et les DGDG synthases (*dgd1* et *dgd2* chez *Arabidopsis*) (Awai *et al.*, 2001 ; Kelly et Dörmann, 2002). MGD2 et MGD3 ont une plus forte affinité pour le DAG de structure eucaryote que pour le DAG procaryote. Ces enzymes sont donc vraisemblablement responsables de la sélection des molécules de DAG et de la formation du pool de MGDG nécessaire à la production du DGDG en carence de phosphate. Quant aux DGDG synthases, leur affinité n'a pas été caractérisée pour l'instant. Afin de déterminer les affinités des DGDG synthases vis à vis du MGDG et l'influence de ces enzymes sur la composition en lipides, nous avons utilisé les données publiées par Kelly *et al.*, 2003 et Klaus *et al.*, 2002. Nous avons comparé les analyses de galactolipides avec ou sans phosphate de plants d'*Arabidopsis* sauvage, *dgd1*, *dgd2* avec celles des cellules d'érable obtenues au cours de notre travail.

A partir de ces données et des résultats précédents, nous avons établi un schéma bilan du transfert du squelette DAG des phospholipides vers le DGDG synthétisé en carence de phosphate.

A- Influence de l'activité des enzymes de synthèse des galactolipides sur la composition en acide gras des galactolipides

1. Les particularités des DGDG synthèses et leur incidence sur la synthèse du DGDG

Le Tableau 7 présente les compositions en acide gras du DGDG et du MGDG en présence ou non de phosphate des différents mutants *dgd1* et *dgd2* d'*Arabidopsis* comparées à celles obtenues dans les plantes sauvages et les cellules d'érable.

mutant		Arabidopsis				Erable	
		<i>dgd1</i>	sauvage	<i>dgd2</i>	sauvage		
Enzymes fonctionnelles		DGD2	DGD1 et DGD2	DGD1	DGD1 et DGD2 ?		
DGDG	+Pi	%	1,3	14,5	15,9	3,3	
		<i>Sn-1</i>	C16	65 %	25 %	21 %	22 %
			C18	35 %	75 %	79 %	78 %
		<i>Sn-2</i>	C16	5 %	18 %	17 %	0 %
	C18		95 %	82 %	83 %	100 %	
	-Pi	%	9,9	26,3	22,4	13,8	
		<i>Sn-1</i>	C16	62 %	45 %	18 %	54 %
			C18	38 %	55 %	82 %	46 %
		<i>Sn-2</i>	C16	5 %	17 %	17 %	0 %
	C18		95 %	83 %	83 %	100 %	
Structure majoritaire	+Pi	C16/C18	C18/C18	C18/C18	C18/C18		
	-Pi	C16/C18	C16/C18 et C18/C18	C18/C18	C16/C18 et C18/C18		
MGDG	+Pi	%	45,8	48,9	44,0	4,1	
		<i>Sn-1</i>	C16	11 %	0 %	1 %	3 %
			C18	89 %	100 %	99 %	97 %
		<i>Sn-2</i>	C16	30 %	75 %	69 %	0
	C18		70 %	25 %	31 %	100	
	-Pi	%	44,1	45,5	47,2	9,3	
		<i>Sn-1</i>	C16	19 %	9 %	5 %	6 %
			C18	81 %	91 %	95 %	94 %
		<i>Sn-2</i>	C16	15 %	57 %	60 %	0
	C18		85 %	43 %	40 %	100	
Structure majoritaire	+Pi	C18/C18	C18/C16	C18/C16	C18/C18		
	-Pi	C18/C18	C18/C16 et C18/C18	C18/C16 et C18/C18	C18/C18		

Tableau 7 : Composition et structure du DAG des galactolipides des cellules d'érable et de plants d'*Arabidopsis* sauvages ou mutés dans les gènes des enzymes de synthèse du DGDG. Les valeurs décrites pour les plants d'*Arabidopsis* sont tirées des travaux de Kelly *et al.*, 2003 et Klaus *et al.*, 2002. +Pi : avec phosphate, -Pi : en carence de phosphate.

Quel que soit le mutant ou l'espèce étudiée, la structure du DGDG est majoritairement eucaryote (C18 en position *sn-2* supérieur à 80 %). Cependant, si le gène d'une des deux enzymes responsables de la synthèse du DGDG est invalidé par mutation, la composition du DGDG est affectée.

Chez le mutant nul *dgd2*, seul DGD1 fonctionne. En conditions standard, la quantité et la composition du DGDG du mutant sont similaires à celles du sauvage, indiquant que DGD1

est l'enzyme responsable de la majorité du DGDG synthétisé dans ces conditions standard de culture. Chez le mutant *dgd2*, en carence de phosphate, la quantité de DGDG augmente, signifiant que DGD1 est impliquée dans l'augmentation de la teneur en DGDG. De plus, la composition en acide gras du DGDG est stable quelle que soit la teneur en phosphate du milieu, ce qui implique que DGD1 a une plus forte affinité pour le MGDG eucaryote de structure C18/C18. Cependant, dans le sauvage, en carence de phosphate, la composition en acide gras du DGDG diffère de celle du mutant, indiquant qu'une autre enzyme est impliquée. La présence d'une voie supplémentaire de synthèse de DGDG est confirmée par l'étude du mutant *dgd1*.

En effet, chez le mutant *dgd1*, seul DGD2 fonctionne. La quantité de DGDG est fortement diminuée en conditions +Pi et -Pi, ce qui est cohérent avec l'hypothèse que DGD1 soit responsable de la majorité du DGDG synthétisé en conditions standard de culture. Néanmoins, en carence de phosphate la teneur en DGDG augmente, donc DGD2 est impliqué dans l'augmentation de la teneur en DGDG en carence de phosphate. Du fait que la composition en acide gras du DGDG est enrichie en DAG de structure C16/C18 quelle que soit la teneur en phosphate du milieu, nous déduisons que DGD2 a une plus forte affinité pour le MGDG eucaryote de structure C16/C18 et est très probablement responsable chez le sauvage de l'approvisionnement en DGDG C16/C18.

En résumé, dans des conditions standard de culture, DGD1 serait responsable de la synthèse du DGDG alors qu'en carence de phosphate les deux enzymes, DGD1 et DGD2, seraient activées et impliquées dans la synthèse du DGDG (Kelly et Dörmann, 2002 ; Kelly *et al.*, 2003). De plus, DGD1 a une plus grande affinité pour le MGDG C18/C18 alors que DGD2 a une plus grande affinité pour le MGDG C16/C18. Les résultats obtenus chez l'érable sont similaires de ceux obtenus chez *Arabidopsis*, en sachant que l'érable ne possède pas de galactolipides procaryotes. Ces observations suggèrent en outre que deux types de DGDG synthèses existent aussi chez l'érable, sans que cela ait pu être vérifié moléculairement.

Le plus surprenant est l'influence de l'inactivation de DGD1 sur la composition en acide gras du MGDG, qui en condition standard est synthétisé par MGD1. En effet, dans les plants *dgd1*, l'espèce majoritaire du MGDG possède un squelette hydrophobe eucaryote C18/C18 au lieu d'un DAG procaryote C18/C16 présent dans les plants sauvages et *dgd2*, alors que les quantités de MGDG ne sont pas affectées. Ces données impliquent qu'il existe une relation étroite entre MGD1 et DGD1. MGD1 ne sélectionne pas de molécules de DAG *in vitro* (Awai *et al.*, 2001), elle produit donc aussi bien du MGDG eucaryote que procaryote. En revanche, elle régule finement la quantité de MGDG dans la plante. DGD1 consomme

essentiellement le pool eucaryote de MGDG, ce qui implique que, dans les plants sauvages, le MGDG soit principalement de structure procaryote. Dans le mutant *dgd1*, le pool eucaryote de MGDG n'est pas consommé par la synthèse du DGDG, MGDG est donc enrichi en structure eucaryote. Cette étude peut aussi nous permettre d'évaluer le pool de DAG disponible pour MGD1, qui serait donc composé à 30 % de DAG procaryote contre 70 % de DAG eucaryote, et la proportion de MGDG utilisée pour synthétiser du DGDG, qui serait d'environ 40 %.

2. Les caractéristiques cinétiques des MGDG synthèses et leur incidence sur les synthèses de MGDG

Lors de la carence de phosphate, MGD2 et MGD3, qui utilisent avec une plus forte affinité le DAG de structure eucaryote, sont surexprimées (Awai *et al.*, 2001). Cette induction de l'expression de MGD2 et MGD3 est cohérente avec l'enrichissement du MGDG en structure eucaryote, du fait que la quantité du MGDG reste toujours identique et régulée par MGD1, mais qu'un nouvel approvisionnement en structure eucaryote est créé. Suivant ce schéma, le pool de DAG disponible devient à 15% procaryote et à 85 % eucaryote, avec une légère augmentation du C16/C18 par rapport au C18/C18, ce qui est cohérent avec un approvisionnement en DAG provenant de la PC.

En résumé, l'activité de MGD1 régule très vraisemblablement la quantité de MGDG présent dans la plante mais pas sa composition, qui est déterminée en amont par la composition du pool de DAG et en aval par la production de DGDG. L'augmentation de la proportion de C16/C18 dans le MGDG par rapport au C18/C18 est faible comparée à celle qui a lieu dans le pool de DAG. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation immédiate de ce pool de DAG par l'action de MGD2 et MGD3 puis la consommation de MGDG C16/C18 par DGD1 et DGD2. La localisation des quatre enzymes, MGD2, MGD3, DGD1 et DGD2, dans la membrane externe de l'enveloppe des plastes pourrait faciliter cette séquence (Awai *et al.*, 2001; Froehlich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003).

La question d'une association physique, temporaire ou non, de MGD2 et MGD3 avec les DGDG synthèses reste ouverte. En effet, malgré leur localisation similaire et l'utilisation d'un pool spécifique de MGDG en carence de phosphate, aucune expérience n'a encore montré de lien entre ces deux types d'enzymes. Nous pouvons seulement conclure qu'en carence de phosphate la membrane externe de l'enveloppe des plastes est le compartiment essentiel pour la synthèse des galactolipides car c'est elle qui contient les enzymes de synthèses et qui est approvisionnée en DAG par le réticulum.

Dans des conditions standards de culture, l'activité de MGD1 est responsable de la synthèse de MGDG et donc de l'approvisionnement en précurseur pour les DGDG synthèses. Cependant, la présence de DGD1 est déterminante pour la composition en acide gras du MGDG. Peut-être existe-t-il une interaction entre DGD1 et MGD1 qui expliquerait les résultats que nous rapportons, bien que les deux enzymes soient localisées dans des membranes différentes.

A partir de nos résultats et de l'ensemble des données bibliographiques nous pouvons donc construire un schéma intégré qui permette de résumer nos connaissances. Ce schéma indique les voies de synthèses des galactolipides activées en carence de phosphate et leur approvisionnement en substrat.

B- Approvisionnement en DAG des plastes

Les galactolipides sont synthétisés dans l'enveloppe des chloroplastes à partir de DAG et d'UDP-galactose pour former du MGDG puis du DGDG grâce aux enzymes MGD et DGD. Chez *Arabidopsis*, le DAG est synthétisé directement dans les plastes ou est formé à partir du squelette hydrophobe de la PC. En carence de phosphate, nous avons établi que la synthèse du DGDG contenant du DAG provenant de la PC était activée. Il est important de comprendre par quel mécanisme le DAG parviendrait aux plastes pour synthétiser le DGDG en carence de phosphate. La PC étant générée dans le réticulum endoplasmique, un transfert de lipides est donc nécessaire (Figure 30).

Le réticulum est riche en phospholipides et contient en particulier du PG, de la PE et de la PC. Etant donné que le DAG n'a jamais été détecté en quantité notable dans les mitochondries et les plastes, nous pouvons supposer que la majeure partie du DAG que nous détectons est aussi localisée dans le réticulum. Nous avons déduit de nos analyses que la PE et le PG fournissaient leur squelette hydrophobe à la PC en carence de phosphate. Nous pouvons supposer que cet échange a lieu dans le réticulum car c'est dans ce compartiment qu'ont été détectées les activités de synthèse de la PC.

Pour le transfert de la PC vers les chloroplastes, plusieurs hypothèses ont été proposées. Kader (1996) propose que la PC soit transférée par des lipid transfer protein (LTP) non spécifiques (voir données bibliographiques, II.D-3-). Toutefois, toutes les protéines de cette famille déjà caractérisées à ce jour sont localisées dans la paroi et la majorité des séquences homologues possèdent un signal peptide. L'hypothèse d'un transfert impliquant ce type de LTP est donc peu probable. Mongrand *et al.* (2000) ont identifié une activité lysoPC-

acyltransférase dans les chloroplastes. Ces auteurs proposent logiquement un transfert direct de la lysoPC du réticulum vers les plastes. En soutien de cette hypothèse, des phospholipases A2 sont présentes dans la plupart des compartiments cellulaires, donc au niveau du réticulum, et la lysoPC est une molécule amphiphile qui se partitionne et diffuse à travers le cytosol (Figure 30).

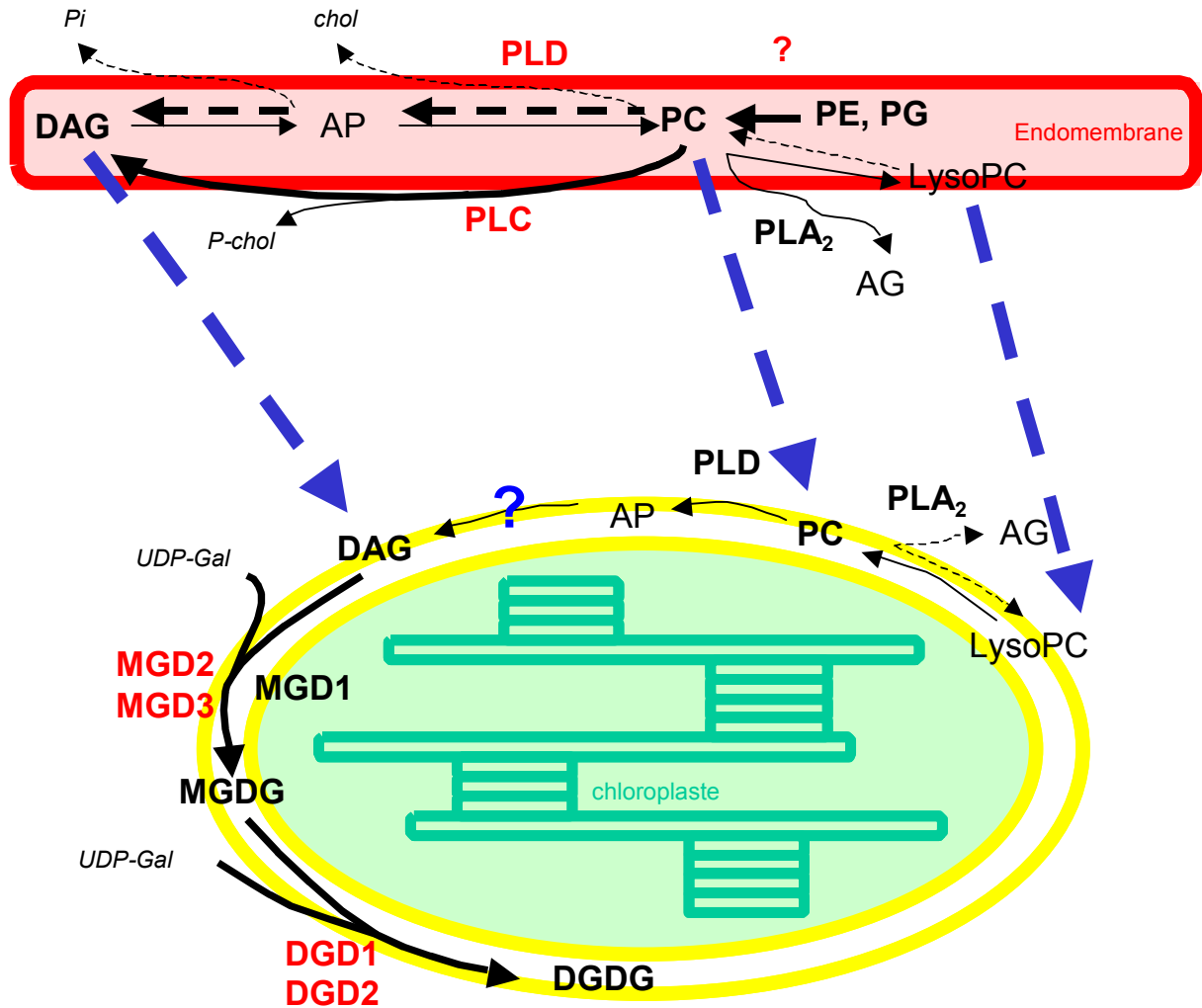


Figure 30 : Schéma bilan du transfert des squelettes DAG des phospholipides jusqu'au DGDG en carence de phosphate. Les flèches en gras correspondent aux voies activées en carence de phosphate avec leurs enzymes correspondantes en rouge. L'ensemble des hypothèses de transfert de lipides du réticulum vers les plastes est présenté ici et détaillé dans le texte. Les PLD ou PLC indiquées en rouge ne sont pas encore clairement identifiées et feront l'objet d'une partie du chapitre III. AG : acide gras, AP : acide phosphatidique, chol : choline, P-chol : phosphocholine, Pi : phosphate, UDP-Gal : UDP-galactose.

Ces modèles permettent de décrire des voies possibles de transfert de la PC du réticulum vers les plastes et donc la présence de PC dans la membrane externe des plastes. Cependant, ils ne suffisent pas à décrire complètement le transfert du squelette hydrophobe de la PC au DGDG. En effet, Andersson *et al.* (2004) ont montré que le transfert du squelette hydrophobe de la PC vers les galactolipides dépendait d'une phospholipase D cytosolique, qui

produit de l'acide phosphatidique. Puisque dans les plastes des plantes en C18:3, il n'existe pas d'activité acide phosphatidique phosphatase, le transfert à partir de la PC plastidiale serait bloqué au niveau de l'AP.

Alternativement, nous proposons que le DAG du réticulum endoplasmique soit directement transféré à la membrane externe de l'enveloppe des plastes et soit ensuite utilisé pour synthétiser du DGDG. En effet, nous avons déduit de nos expériences que la PC était en équilibre avec le DAG car leurs compositions en acide gras étaient similaires. D'autre part, nous avons observé qu'en carence de phosphate, la dégradation de la PE et du PG est activée, la PC s'accumule transitoirement et la teneur en DAG et DGDG des cellules augmente, suite à l'augmentation transitoire de PC. Par ailleurs, d'après les études de fractions subcellulaires réalisées par Sandelius et Andersson (2003), il est possible que des PLAM (PLastid Associated Membrane) existent et éventuellement qu'ils jouent un rôle dans le transfert du DAG ; le contact entre l'enveloppe et les PLAM faciliterait le transfert intermembranaire du DAG (Figure 10).

Les quantités de DGDG produites et de PC affectées par la carence de phosphate sont trop élevées pour impliquer uniquement le compartiment plastidial. En effet, suivant un schéma n'impliquant que le plaste, l'augmentation de DGDG serait supposée compenser la diminution de la PC plastidiale de la même manière que le SQDG remplace une partie du PG plastidial. Or, la PC plastidiale est localisée uniquement dans le feuillet externe de la membrane externe de l'enveloppe des plastes (Dorne *et al.*, 1985). Cette quantité est trop faible pour expliquer la forte augmentation du DGDG. De plus, suite à l'analyse de fractions cellulaires sommaires Härtel *et al.* (2000) ont noté une accumulation de DGDG dans des fractions endomembranaires et proposé que le remplacement de la PC par le DGDG ne soit pas restreint aux plastes. Nous avons donc poursuivi notre étude par une analyse fine de la compartimentation subcellulaire des lipides au cours de la carence de phosphate, objet du chapitre II de ce mémoire.

Chapitre II :

Transfert de DGDG vers
des membranes non
plastidiales en carence de
phosphate

Transfert de DGDG vers des membranes non plastidiales en carence de phosphate

Les galactolipides sont synthétisés dans les plastes et les traces qui ont été détectées par le passé dans d'autres fractions cellulaires comme le tonoplaste (Haschke *et al.*, 1990) ont été considérées comme des contaminations de membranes plastidiales. Quand une plante est carencée en phosphate, la teneur en DGDG augmente que ce soit dans des tissus chlorophylliens, feuilles ou cellules d'*Arabidopsis*, ou non chlorophylliens, racines ou cellules d'érable. Cette augmentation importante de la teneur en galactolipides suivant une diminution des phospholipides, peu abondants dans les plastes, suggère que le DGDG nouvellement synthétisé est associé à des membranes non plastidiales (Härtel et Benning, 2000). L'accumulation de DGDG dans des tissus non photosynthétiques a conduit Härtel *et al.* (2000) à fractionner sommairement des membranes plastidiales et extraplastidiales à partir de feuilles carencées en phosphate afin de déterminer leur composition lipidique. En utilisant la PE comme marqueur extraplastidial et le MGDG comme marqueur plastidial, ces auteurs ont constaté qu'en carence de phosphate, une grande partie du DGDG était localisée dans des fractions extraplastidiales. Ce résultat inattendu nous a conduit à rechercher la localisation fine du DGDG par des techniques d'épifluorescence. Nous avons ensuite étudié plus en détail sa localisation mitochondriale en carence de phosphate et enfin nous avons analysé comment le DGDG était fourni à ces organites.

I. Localisation du DGDG en carence de phosphate

Trois jours après le début de la carence de phosphate, les cellules d'*Arabidopsis thaliana* ne se divisent plus. Leur composition en lipides a été modifiée par rapport à celle des cellules témoin (voir chapitre I-, II-A-2.). Le niveau de DGDG est passé de 10 % à 35 % des glycérolipides, et, à trois jours de carence, ce niveau est stable. Pour comprendre où le DGDG est localisé à ce stade, des cellules d'*Arabidopsis* ont été transférées dans un milieu contenant 1 mM (cellules témoin) ou 0 mM de phosphate (cellules carencées). La localisation du DGDG a été suivie par épifluorescence sur ces cellules (Figure 31).

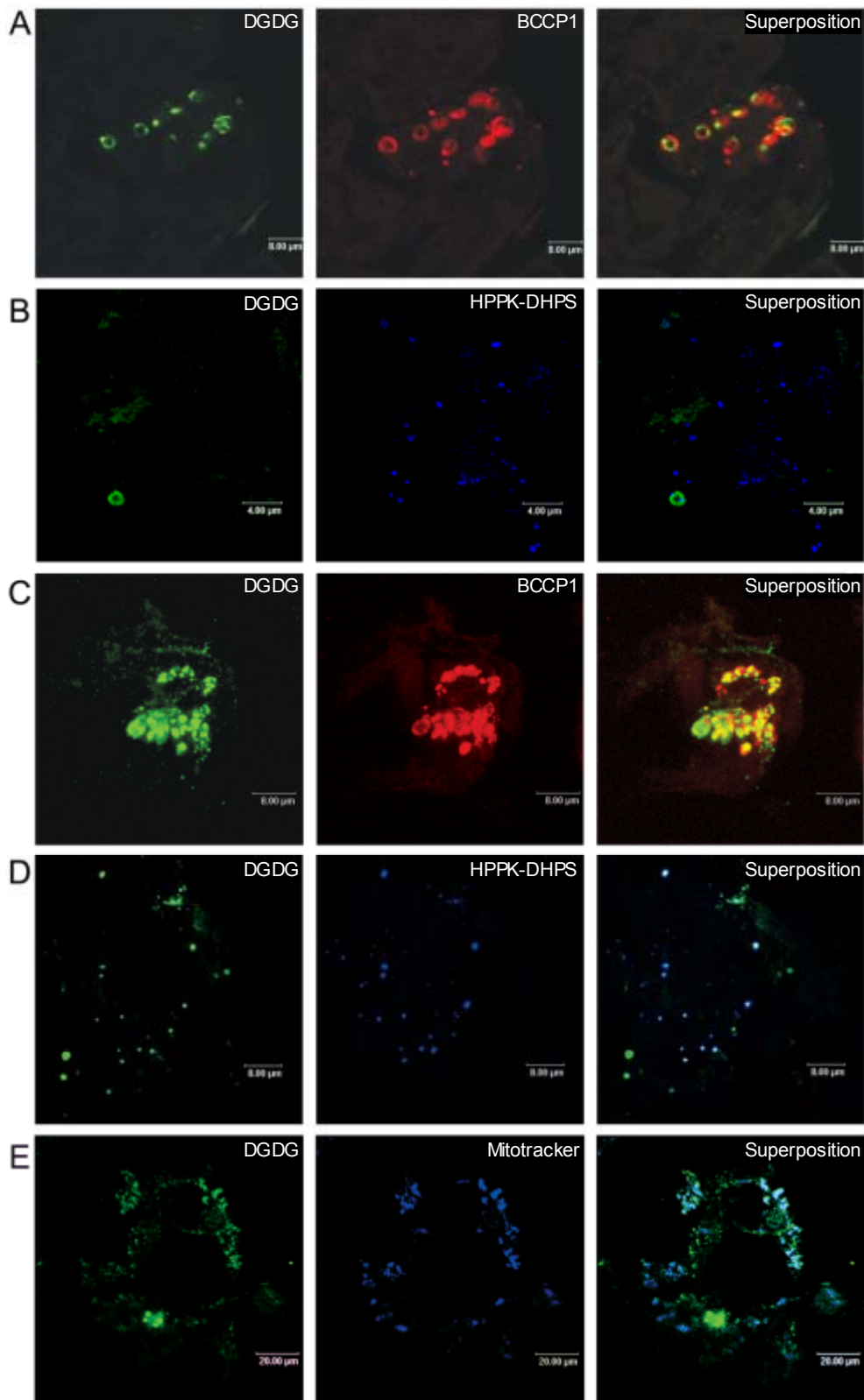


Figure 31 : Localisation du DGDG dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana* en carence de phosphate depuis trois jours. Les cellules (A et B : cellules témoin, C, D, E : cellules carencées) sont traitées par marquage immunofluorescent indirect avec anti-DGDG reconnu par un anticorps secondaire couplé au Bodipy et soit anti-BCCP1 pour la détection des chloroplastes (A et C), soit anti-HPPK-DHPS pour la détection des mitochondries (B et D) reconnu par un anticorps secondaire couplé à Alexa 594. En E, les mitochondries sont visualisées par marquage avec du Mitotracker Orange CMTMRos (Molecular Probes, Inc). Les cellules sont observées au microscope confocal. Echelle : B : 4 µm, A, C, D : 8 µm, E : 20µm.

Un anticorps polyclonal dirigé contre le DGDG (anti-DGDG) a été mis au point au laboratoire (Maréchal *et al.*, 2002). Cet anticorps est spécifique du DGDG, ne reconnaît aucun autre lipide et protéine d'extraits totaux de plantes. Nous avons analysé la présence du DGDG dans les plastes en suivant la colocalisation des anti-DGDG avec un anticorps anti-BCCP1 (Alban *et al.*, 1994), une sous unité stromale de l'acétyl-CoA carboxylase, et dans les mitochondries en suivant la colocalisation du DGDG avec un anticorps anti-HPPK-DHPS (Mouillon *et al.*, 2002), une enzyme de la matrice des mitochondries intervenant dans la voie de biosynthèse du folate.

La Figure 31A montre que, dans les cellules témoin, le DGDG est localisé uniquement dans les plastes, puisque la fluorescence liée au DGDG est associée à la fluorescence liée à BCCP1. De même, dans les cellules témoin, aucune fluorescence du DGDG n'est associée aux mitochondries marquées par la présence d'HPPK-DHPS (Figure 31B). Dans les cellules carencées en phosphate, la situation est plus complexe parce que la fluorescence du DGDG n'est plus restreinte aux plastes, elle est aussi visible au niveau de nombreux petits spots distincts des plastes (Figure 31C). Par comparaison avec l'épifluorescence de la HPPK-DHPS, nous observons que la fluorescence du DGDG est en partie associée à celle du marqueur mitochondrial (Figure 31D). De même, le co-marquage des cellules avec l'anticorps anti-DGDG et le Mitotracker, un marqueur fluorescent spécifique des mitochondries, confirme cette observation (Figure 31E). Sur cette même image, nous observons des spots de DGDG de grande dimension correspondant vraisemblablement à des plastes, les spots associés au Mitotracker indiquant la présence de DGDG dans les mitochondries et des spots alignés à la périphérie et à l'intérieur de la cellule, indiquant la présence possible de DGDG dans la membrane plasmique et le tonoplaste. Ces deux localisations ont été aujourd'hui démontrées par d'autres techniques biochimiques (Andersson *et al.*, 2003 ; Andersson *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données montre qu'en carence de phosphate le DGDG est présent dans les plastes mais aussi à l'extérieur, dans la membrane plasmique, le tonoplaste et aussi dans les mitochondries. A ce jour, aucune localisation dans le réticulum n'a été observée.

Les mitochondries sont des organites limités, comme les plastes, par une double membrane. Dans les cellules d'érable, elles représentent environ 10 % des membranes cellulaires et contribuent à environ 10 % de la quantité de PC des cellules (Douce, 1985). Comme les cellules d'*Arabidopsis* contiennent plus de DPG, un lipide spécifique des mitochondries, que les cellules d'érable (3 % contre 2 %), nous pouvons supposer que les mitochondries des cellules d'*Arabidopsis* représentent environ 15 % des membranes cellulaires et contiennent environ 15 % de la PC des cellules. En carence de phosphate, la

teneur globale des lipides qui lui sont spécifiques semble indiquer que les mitochondries sont relativement préservées de ce stress. En effet, la proportion de DPG dans les cellules ne diminue pas (voir chapitre I, II-, A-). De plus, la respiration n'est pas affectée exceptée une légère stimulation de la voie résistante au cyanure (Rebeillé *et al.*, 1984). Nous avons donc supposé que le transfert de DGDG aux mitochondries était un des mécanismes possibles de l'adaptation de cet organe à la carence de phosphate. Pour étayer cette hypothèse, nous avons purifié des mitochondries issues de cellules carencées ou non, à différents temps de culture. Nous avons dosé la quantité de DGDG présent dans les mitochondries, vérifié l'origine plastidiale du DGDG et mis en évidence le transfert du DGDG des plastes vers les mitochondries.

II. Transfert du DGDG des chloroplastes vers les mitochondries en carence de phosphate

A- Purification de mitochondries et détermination de la présence de DGDG en carence de phosphate

1. Caractérisation des fractions mitochondriales purifiées

Pour déterminer leur composition lipidique, des mitochondries ont été isolées et purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis* carencées en phosphate depuis trois jours ou suffisamment approvisionnées en phosphate. La consommation en oxygène des mitochondries isolées a été analysée pour chaque fraction purifiée (Figure 32A), et en comparaison avec les données obtenues par Neuburger *et al.* (1982) (consommation d'O₂ de 250 nmol.min⁻¹.mg⁻¹), nos préparations (consommation d'O₂ de 300 nmol.min⁻¹.mg⁻¹) sont fortement enrichies en mitochondries fonctionnelles et intactes. Pour obtenir suffisamment de quantité de lipides à analyser, trois préparations de chaque condition ont été groupées. Le taux de pureté des mitochondries a ensuite été établi par analyse par Western blot sur ce mélange à l'aide de marqueurs spécifiques des organites, en comparaison avec les extraits cellulaires. Nous avons détecté dans les deux types de fractions un enrichissement d'approximativement un facteur 5 pour NAD9, une sous-unité du complexe NADH déshydrogénase localisée dans la membrane interne des mitochondries (Lamattina *et al.*, 1993), pour TOM20 et TOM40, des sous-unités du translocon localisée dans la membrane externe des mitochondries (Werhahn *et al.*, 2001), et pour HPPK-DHPS, une enzyme de la matrice des mitochondries intervenant dans la voie de biosynthèse du folate (Mouillon *et al.*, 2002) (Figure 32B). Si nous considérons que les

mitochondries représentent 15 à 20 % des protéines de la cellule, l'enrichissement en marqueur mitochondrial indique que nos fractions mitochondriales sont relativement pures.

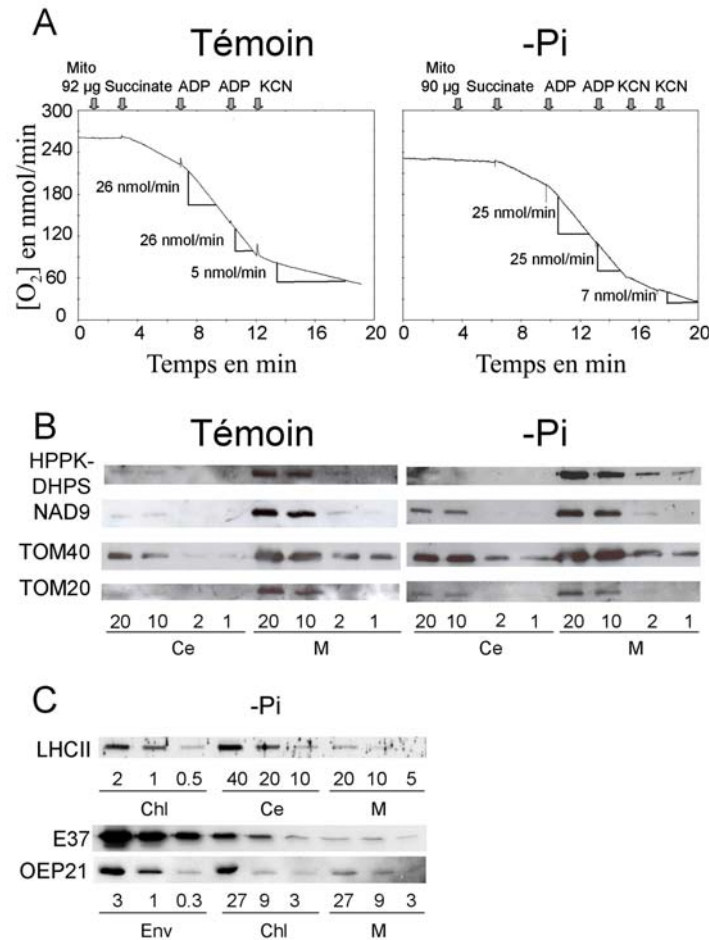


Figure 32 : Caractérisation des fractions mitochondriales isolées à partir de cellules d'*Arabidopsis* cultivées pendant 3 jours avec ou sans phosphate. A- Pour vérifier la pureté et l'intégrité des mitochondries isolées, l'oxydation du succinate est suivie par la mesure de la consommation d'O₂. En moyenne, chaque fraction consomme 280 nmol d'O₂.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines en présence de succinate et d'ADP, avec une consommation stimulée 2,4 fois par l'addition d'ADP. Ainsi, nos fractions sont enrichies en mitochondries intactes et fonctionnelles. La voie de résistance au cyanure est légèrement activée en carence de phosphate, ce qui était attendu par rapport aux données de la littérature (Rebeillé *et al.*, 1984). B- Des analyses comparatives entre 20, 10, 2 et 1 µg de protéines d'extraits cellulaires (Ce) et 20, 10, 2 et 1 µg de protéines des fractions mitochondriales (M) ont été effectuées par Western blot en utilisant les anticorps dirigés contre des protéines mitochondriales : HPPK-DHPS, une protéine de la matrice mitochondriale ; NAD9, une protéine de la membrane interne ; TOM20 et TOM40, des protéines de la membrane externe. C- Analyse par Western blot de 27, 9 et 3 µg de protéines des mitochondries (M), 27, 9 et 3 µg de protéines des chloroplastes (Chl) et de 40, 20 et 10 µg de protéines d'extraits cellulaires (Ce), issues des cellules d'*Arabidopsis* carencées en phosphate, et de 3, 1 et 0,3 µg de protéines de l'enveloppe de chloroplastes (Env) préparée à partir de plants d'*Arabidopsis* (Awai *et al.*, 2001) en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines des membranes chloroplastiques : LHCII pour les thylacoïdes, IEP37 pour la membrane interne de l'enveloppe et OEP21 pour la membrane externe de l'enveloppe.

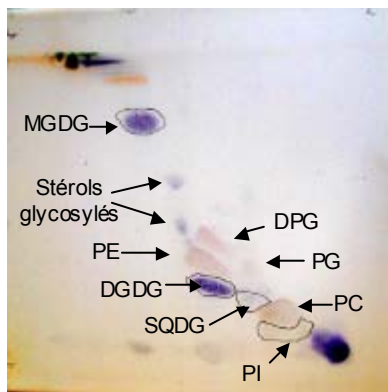
Afin de déterminer la teneur en galactolipides des mitochondries carencées, nous avons mesuré la contamination de nos fractions par des membranes plastidiales, constitutivement riches en galactolipides. La contamination par les chloroplastes est suivie par des marqueurs des thylacoïdes LHCII, impliqués dans la chaîne photosynthétique (Vallon *et*

al., 1986), de la membrane interne de l'enveloppe IEP37, une méthyltransférase (Teyssier *et al.*, 1996), et de la membrane externe de l'enveloppe OEP21, un canal ATP-dépendant (Bolter *et al.*, 1999) (Figure 32C). La contamination par les thylacoïdes est négligeable car les mitochondries contiennent 40 fois moins de LHCII que les chloroplastes. Les marqueurs de l'enveloppe, IEP37 et OEP21, sont tous les deux 5 fois moins abondants dans les mitochondries par rapport aux chloroplastes. Le rapport OEP21/IEP37 est conservé entre les mitochondries et les chloroplastes des cellules d'*Arabidopsis* ; en revanche, il est différent dans l'enveloppe d'épinard. Cette analyse par Western blot ne peut donc pas fournir de renseignements précis sur la teneur en enveloppe des plastes. Comme nous ne pouvons pas préparer d'enveloppe de chloroplastes de cellules carencées par manque de matériel, nous considérons que les protéines de l'enveloppe (membrane interne et externe) représentent environ 4 % des protéines du chloroplaste (habituellement, elle représente moins de 2 % - Block *et al.*, 1983- mais les cellules d'*Arabidopsis* sur lesquelles nous travaillons possèdent peu de membranes de thylacoïdes en comparaison avec des cellules de feuilles). Ainsi, nous pouvons estimer que les mitochondries contiennent moins de 0,8 % d'enveloppe (soit pour 1 mg de protéines de mitochondries purifiées, 8 µg de protéines d'enveloppe).

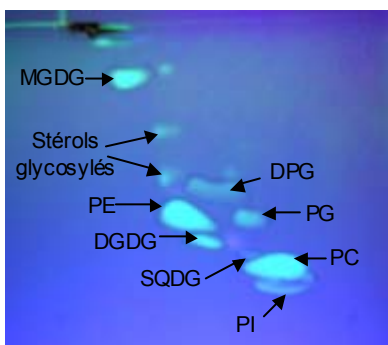
Nous savons par ailleurs que la membrane plasmique et le tonoplaste contiennent du DGDG en carence de phosphate (Andersson *et al.*, 2003 ; Andersson *et al.*, 2005). Nous avons donc contrôlé les contaminations éventuelles par ces deux membranes, en déterminant la présence de stérols glycosylés. En effet, la membrane plasmique et le tonoplaste en sont pourvues alors que les mitochondries n'en possèdent pas (Moreau *et al.*, 1998). Après chromatographie sur couche mince de silice, la position des stérols est détectée à l'ANS et la présence des résidus glycosylés est révélée par vaporisation d' α -naphtol, colorant les sucres réducteurs en violet foncé. Dans les extraits lipidiques de nos fractions cellulaires témoin ou carencées, deux taches correspondant à deux formes de stérols glycosylés sont présentes alors qu'aucun stérol glycosylé n'est détecté dans les fractions mitochondriales (Figure 33). Les fractions mitochondriales que nous avons obtenues, ne contiennent donc pas de quantité significative de membrane plasmique et/ou de tonoplaste.

L'ensemble de ces expériences indique que les fractions mitochondriales préparées à partir de cellules d'*Arabidopsis* sont fortement enrichies en mitochondries intactes et contiennent très peu de contamination par des membranes extra-mitochondriales. Ces fractions permettent donc d'analyser la composition en lipides des mitochondries en carence de phosphate.

A Lipides des cellules témoins



B Lipides des cellules témoins



Lipides des mitochondries témoins



Lipides des cellules carencées



Lipides des mitochondries carencées



Figure 33 : Détection des stérols glycosylés dans les extraits lipidiques de fractions cellulaires et mitochondriales issues de cellules d'*Arabidopsis* cultivées depuis trois jours en présence ou non de phosphate. A- Chromatographie sur couche mince de l'extrait lipidique cellulaire des cellules témoin coloré à l' α -naphthol. Les galactolipides et les stérols glycosylés sont identifiés par leur coloration violette. La position sur la plaque des différents lipides est indiquée par des flèches. B- Chromatographie sur couche mince des extraits lipidiques révélés à l'ANS. La position des lipides est indiquée par des flèches sur la plaque des lipides des cellules témoins. Aucun stérol glycosylé n'est détecté dans les fractions mitochondriales.

2. Analyse des lipides totaux de cellules et de fractions mitochondriales d'*Arabidopsis*

Les lipides sont extraits à partir des fractions mitochondriales carencées ou non et leur composition est comparée avec celle des cellules. Les résultats des analyses des glycérolipides

sont normalisés par rapport à la quantité totale de glycérolipides dans chaque fraction (Figure 34).

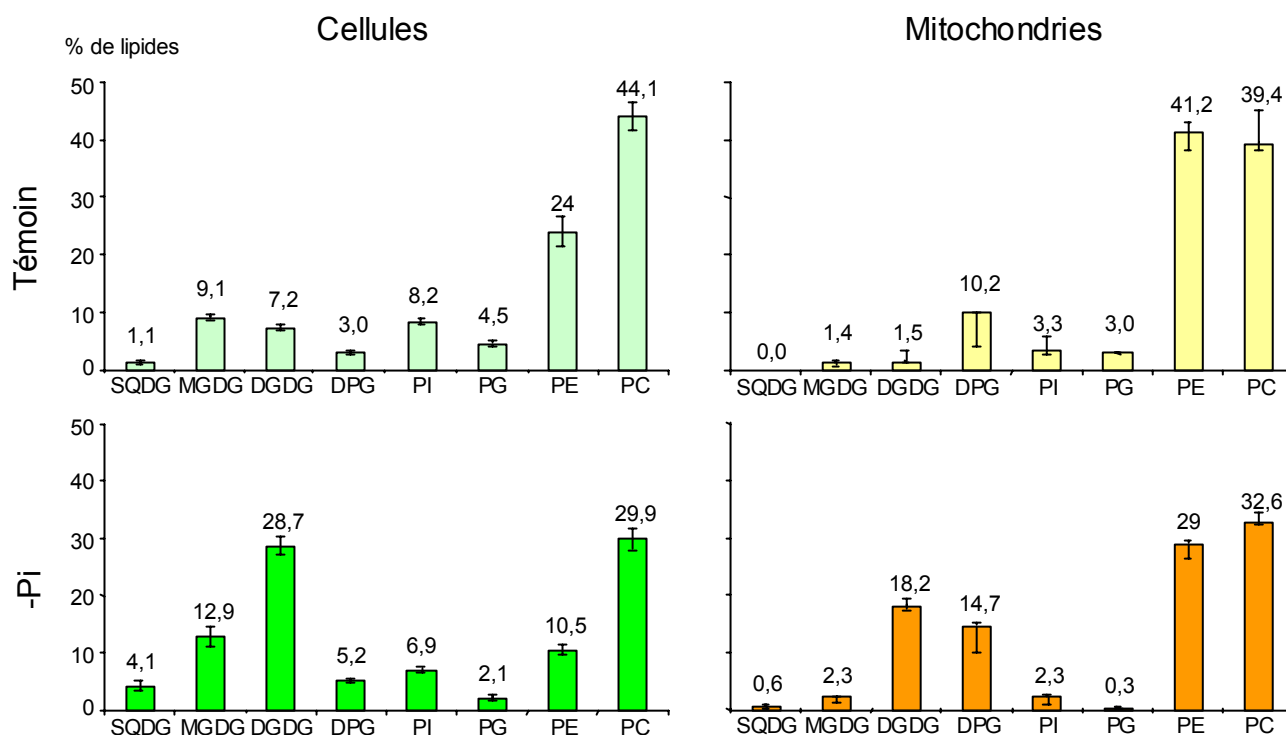


Figure 34 : Analyse des glycérolipides des cellules entières et des fractions mitochondriales de culture de cellules d'*Arabidopsis thaliana* avec (témoin) ou sans (-Pi) phosphate. Les déviations standards sont calculées à partir de quatre expériences indépendantes pour chaque condition.

La composition lipidique des cellules témoin ou carencées en phosphate est cohérente avec les données précédemment publiées (Essigman *et al.*, 1998 ; Härtel *et al.*, 1998 ; chapitre I- A- 2-). Le DPG est présent en quantité relativement importante dans les cellules, montrant que les lipides des mitochondries représentent une proportion non négligeable de l'ensemble des lipides présents dans les cellules d'*Arabidopsis*. Dans les cellules témoin, la PC est le lipide majoritaire alors que dans les cellules carencées, nous observons une diminution de la teneur en phospholipides et une augmentation du SQDG et du DGDG ; le DGDG devient aussi abondant que la PC.

La composition lipidique des mitochondries isolées à partir des cellules témoin est similaire à celle décrite dans la littérature, contenant principalement de la PE et de la PC (Douce, 1985 ; Harwood, 1987). Seules quelques traces de MGDG et DGDG sont détectées et la teneur en DPG est environ trois fois plus grande dans les mitochondries isolées que dans les cellules. Cette proportion est conservée entre les cellules et les mitochondries carencées. Dans les mitochondries isolées à partir des cellules carencées, le niveau des phospholipides (PG, PE et PC) est plus faible que dans les mitochondries issues de cellules témoin. Les teneurs en

MGDG et SQDG augmentent un peu par rapport aux mitochondries témoin, mais elles restent peu élevées. En revanche, la quantité de DGDG est beaucoup plus importante, elle représente plus de 18 % des lipides des mitochondries carencées.

En analysant la contamination des lipides due à l'enveloppe des chloroplastes dans les fractions mitochondriales, nous avons calculé que la quantité de DGDG provenant de l'enveloppe est bien plus faible que celle qui est mesurée dans les fractions mitochondriales carencées.

Dans les mitochondries carencées, le DGDG correspond à 18 % des lipides totaux et nous avons mesuré un rapport lipide/protéine de 0,14. Ainsi le DGDG représente 25 µg/mg de protéine (Tableau 8). De la même manière, nous obtenons une quantité de MGDG de 3.2 µg/mg de protéine (Tableau 8).

	Chloroplaste	Mitochondrie
OEP21 (membrane externe de l'enveloppe), unités relatives	100	14,4
IEP37 (membrane interne de l'enveloppe), unités relatives	100	13,4
Protéine de l'enveloppe (membrane externe et interne), en µg par mg de protéine de la fraction	40	5,6
Lipide de l'enveloppe, en µg par mg de protéine de la fraction	56	7,8
MGDG de l'enveloppe, en µg par mg de protéine de la fraction	22,4	3,1
MGDG présent dans la fraction mitochondriale, en µg par mg de protéine de la fraction	n.a.	3,2
DGDG de l'enveloppe, en µg par mg de protéine de la fraction	16,8-33,6	2,3-4,7
DGDG présent dans la fraction mitochondriale, en µg par mg de protéine de la fraction	n.a.	25

Tableau 8 : Analyse de l'origine des galactolipides présents dans les fractions mitochondriales. La contamination en lipide de l'enveloppe des chloroplastes est comparée aux données obtenues sur la fraction mitochondriale carencée. Les données montrent que la quantité calculée de DGDG issue de l'enveloppe contaminante est bien plus faible que celle mesurée dans la fraction mitochondriale, alors que les quantités de MGDG sont similaires. n.a. : ne s'applique pas.

Nous considérons que d'une part les protéines de l'enveloppe (membrane interne et externe) correspondent à environ 4 % des protéines du chloroplaste (voir paragraphe précédent) et que d'autre part le rapport lipide/protéine est de 1,4 dans l'enveloppe d'après Block *et al.* (1983). Pour des raisons de faible abondance de matériel, nous ne sommes pas en mesure de fractionner l'enveloppe de chloroplastes à partir de cellules carencées. Nous avons donc estimé la composition lipidique de l'enveloppe carencée en phosphate sur les points suivants : l'enveloppe (membrane interne et externe) contient en condition standard environ 40 % de MGDG et 30 % de DGDG (Block *et al.*, 1983), la composition lipidique de la membrane interne est supposée proche de celle des thylacoïdes et Yang *et al.* (2004) ont montré que la composition en galactolipides des thylacoïdes était relativement conservée lors de la carence de phosphate avec 50 % de MGDG et 30 à 35 % de DGDG. Ainsi seule la teneur en DGDG de la membrane externe de l'enveloppe est supposée augmenter. Comme en

condition normale la teneur en DGDG de la membrane externe est de 30% et que celle en phospholipides est d'environ 50 % (Block *et al.*, 2003), il est peu vraisemblable que le DGDG représente plus de 80 % de la membrane externe. Ainsi, nous pouvons considérer que l'enveloppe des cellules carencées en phosphate contient environ 40 % de MGDG et de 30 à 60 % de DGDG.

En utilisant ces données, nous avons calculé la quantité de DGDG et MGDG, due aux contaminations de l'enveloppe, présente dans la fraction mitochondriale carencée. Suivant cette estimation, le MGDG provenant des contaminations par l'enveloppe représenterait 3,1 µg/mg de protéine, ce qui est similaire à ce que nous trouvons dans nos fractions mitochondriales (Tableau 8). Nous pouvons donc déduire que le MGDG présent dans cette fraction est uniquement dû à de l'enveloppe contaminante. En revanche, le DGDG de l'enveloppe représente au maximum 4,7 µg/mg de protéine et nous mesurons 25 µg de DGDG par mg de protéine dans les fractions mitochondriales. La majorité du DGDG trouvé dans ces fractions est donc bien localisée dans les membranes mitochondriales.

Pour confirmer ce résultat, nous avons décidé de déterminer l'existence du DGDG dans les membranes mitochondriales par une autre technique. Nous avons en particulier établi la présence du DGDG à la surface des mitochondries par des expériences d'agglutination.

3. Agglutination des mitochondries carencées en phosphate par l'anticorps anti-DGDG

L'anticorps anti-DGDG a été utilisé pour tester une agglutination potentielle des mitochondries purifiées (Figure 35). En absence d'anticorps, les mitochondries témoin et carencées apparaissent non agglutinées en microscopie optique, alors qu'en présence d'anticorps dirigés contre des protéines de la membrane externe des mitochondries TOM20 et TOM40, elles sont agglutinées. Ces anticorps sont spécifiques des mitochondries, ils n'agglutinent pas des chloroplastes. Lorsque les anticorps dirigés contre des protéines de l'enveloppe des chloroplastes, OEP21 (membrane externe) et IEP37 (membrane interne), sont ajoutés aux mitochondries, aucune agglutination n'est visible alors que l'anticorps anti-OEP21 agglutine les chloroplastes.

L'anticorps anti-DGDG agglutine les chloroplastes, ce qui est attendu, du fait que le DGDG est présent à la surface de l'enveloppe des chloroplastes (Billecocq, 1974). De même, comme attendu, aucune agglutination n'est observée dans les mitochondries témoin. En revanche, dans les mitochondries carencées, une forte agglutination est observée. Ainsi, ces

essais d'immunoagglutination indiquent qu'en carence de phosphate, le DGDG est présent à la surface de la membrane externe des mitochondries.

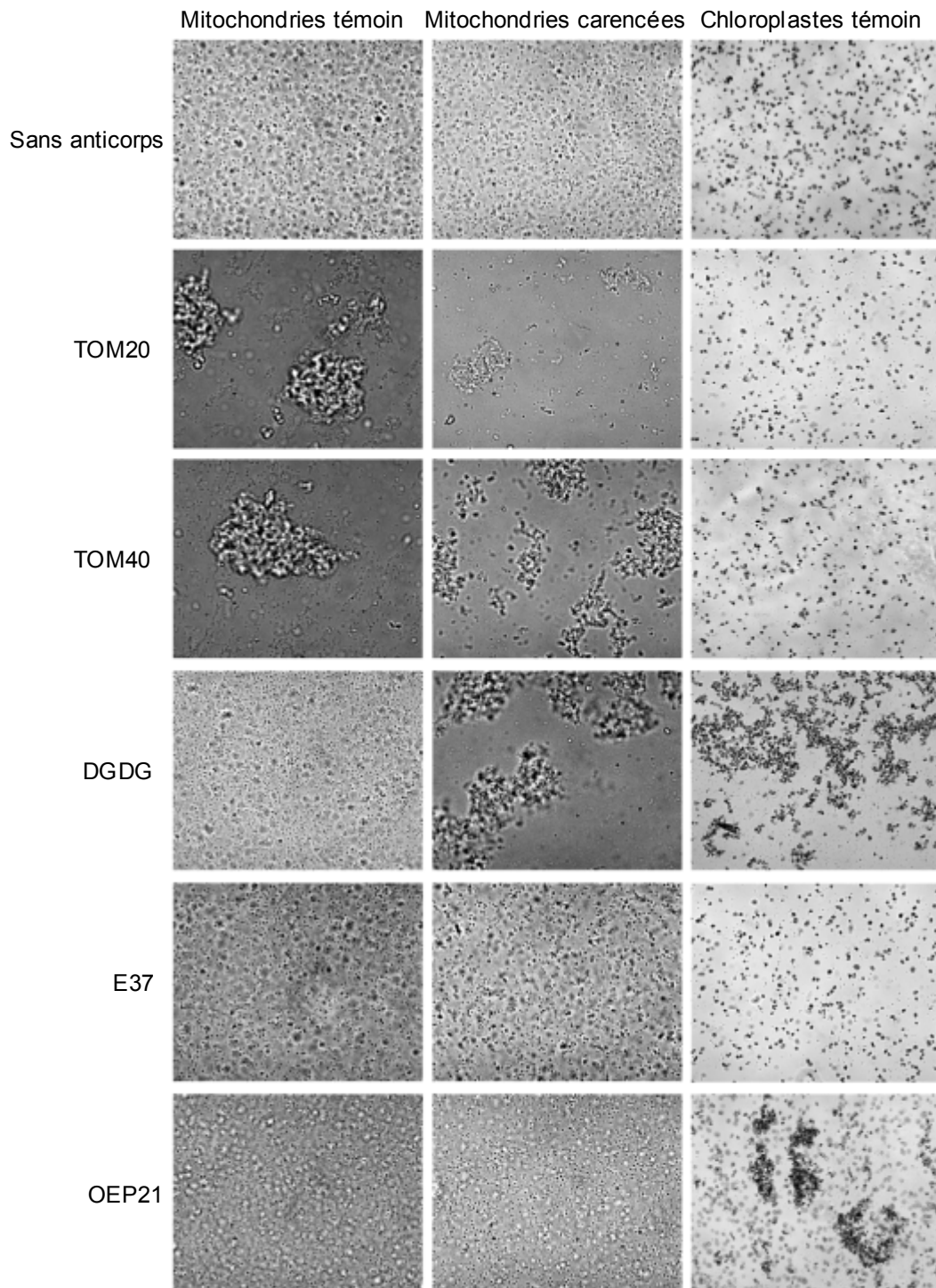


Figure 35 : Expériences d'immunoagglutination de mitochondries isolées à partir de cellules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées depuis trois jours en présence ou non de phosphate. Les mitochondries des cellules témoin ou carencées et les chloroplastes sont incubés avec les anticorps dirigés contre les protéines ou lipide indiqués. L'addition d'anticorps anti-DGDG conduit à une agglutination des chloroplastes et uniquement des mitochondries carencées en phosphate. Les anticorps de contrôle sont dirigés contre IEP37 et OEP21, respectivement des protéines de la membrane interne et externe de l'enveloppe des chloroplastes, et contre TOM20 et TOM40, des protéines de la membrane externe des mitochondries.

Ces expériences ne donnent pas d'indication directe sur la présence de DGDG dans la membrane interne des mitochondries. Cependant, à cause de ses circonvolutions, la membrane interne représente une surface de membrane environ quatre fois plus grande que celle de la membrane externe (Douce, 1985). La composition globale en lipide des mitochondries ressemble donc beaucoup plus à celle de leur membrane interne qu'à celle de leur membrane externe. Or, la teneur en DGDG des mitochondries en carence de phosphate représente 18 % des lipides mitochondriaux. Même si un fort pourcentage du DGDG est localisé à la surface de la membrane externe des mitochondries, l'ensemble du DGDG ne peut vraisemblablement pas être localisé uniquement à la surface des mitochondries et est certainement aussi présent dans le feuillet interne de la membrane externe ainsi que dans la membrane interne. De plus, il est possible que la carence de phosphate induise des développements de la membrane interne parce que la teneur en DPG, lipide spécifique de la membrane interne des mitochondries, augmente d'environ 45 % dans les cellules et les mitochondries. Nous pouvons donc supposer que le DGDG est présent dans les deux membranes.

L'ensemble de ces expériences permet donc de conclure que les mitochondries de cellules carencées en phosphate contiennent une forte teneur en DGDG. En considérant l'abondance des mitochondries dans les cellules à partir de la quantité de DPG, la quantité de DGDG présente dans les mitochondries est significative au niveau cellulaire et peut expliquer une partie de l'augmentation importante de DGDG observée dans les plantes en carence de phosphate (Härtel *et al.*, 1998). Or, aucune donnée sur la localisation de la synthèse des galactolipides en carence de phosphate n'est connue. Pour rechercher l'origine de ce DGDG mitochondrial, nous avons étudié la structure du DGDG et la localisation de sa synthèse, et tenté de déterminer les enzymes responsables de cette synthèse.

B- Structure et origine du DGDG mitochondrial en carence de phosphate

Pour caractériser le DGDG présent dans les mitochondries, nous avons étudié sa composition en acide gras et la structure de sa tête polaire. Puis à partir de ces données, nous avons recherché les enzymes impliquées dans cette synthèse et déterminé leur localisation.

1. Composition en acide gras du DGDG

La Figure 36 présente la composition en acide gras du DGDG isolé à partir de différentes fractions. Le DGDG présent dans les cellules d'*Arabidopsis* témoin a la même composition en acide gras que celui des feuilles témoin (Tableau 7), il est majoritairement

riche en C18/C18. De la même manière en carence de phosphate, la composition du DGDG des cellules est similaire à celle des feuilles, elle s'enrichit en C16, traduisant l'activation de DGD2. La composition du DGDG mitochondrial en carence de phosphate est similaire à celle des cellules carencées. En comparaison avec le DGDG des cellules témoin, les principales caractéristiques de la composition en acide gras du DGDG mitochondrial sont une augmentation du rapport C16/C18 avec plus de C16:0 et une augmentation de C18:1 et C18:2 par rapport au C18:3, même si globalement le C18:3 reste l'espèce prédominante.

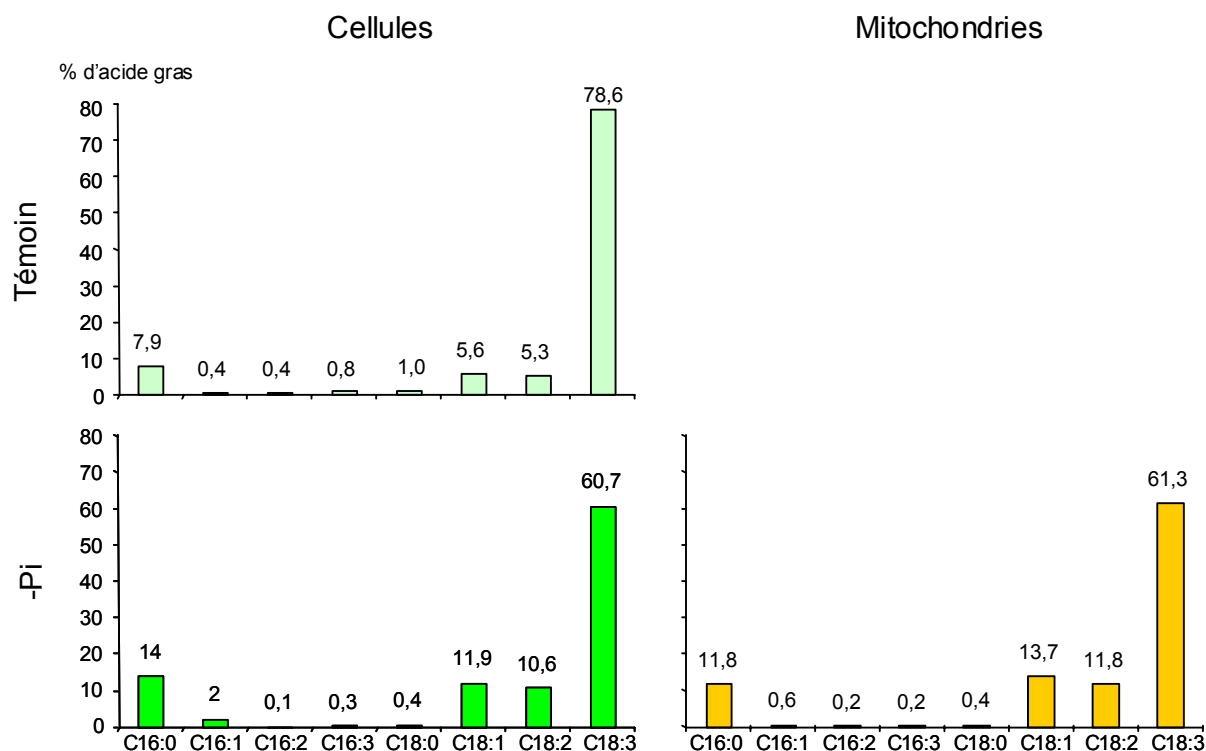


Figure 36 : Analyse de la composition en acide gras du DGDG isolé à partir de cellules de trois jours carencées ou non ou à partir de mitochondries issues de cellules carencées en phosphate.

Nous pouvons donc supposer que le DGDG mitochondrial est synthétisé comme le reste du DGDG des cellules. Les enzymes capables de synthétiser du DGDG peuvent être les DGDG synthases, DGD1 et DGD2, ou une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (appelée aussi l'enzyme de Wintermans). La structure de la tête polaire du DGDG permet d'identifier l'origine enzymatique du DGDG.

2. Structure de la tête polaire du DGDG

Deux formes de DGDG ont été décrites précédemment chez les plantes (Kojima *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 2003). La forme principale du DGDG contient une liaison β -glycosidique sur le premier galactose lié au DAG et une liaison α -glycosidique sur le deuxième galactose (Carter *et al.*, 1956). Les enzymes responsables de la synthèse de ce DGDG sont DGD1 et

DGD2 chez *Arabidopsis*. La deuxième forme de DGDG contient deux liaisons β -glycosidiques. La structure β_1 - β_2 du DGDG résulte du fonctionnement d'une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase activée, par exemple, au cours de la purification d'enveloppe de chloroplastes (Xu *et al.*, 2003). Cette enzyme est aussi appelée enzyme de Wintermans (van Besouw et Wintermans, 1978).

Les deux structures anomériques de la tête polaire du DGDG peuvent être résolues par résonance magnétique nucléaire. En ^1H -RMN, les positions α ou β du proton anomérique du galactose donnent comme signaux des doublets qui ont respectivement un déplacement chimique élevé (autour de 5,0 ppm) ou faible (environ 4,0 ppm). La position exacte du signal dépend du solvant, de la température et de l'environnement moléculaire. Pour identifier la position précise des doublets α et β , différentes molécules de galactolipides ont été analysées par RMN et comparées (Figure 37).

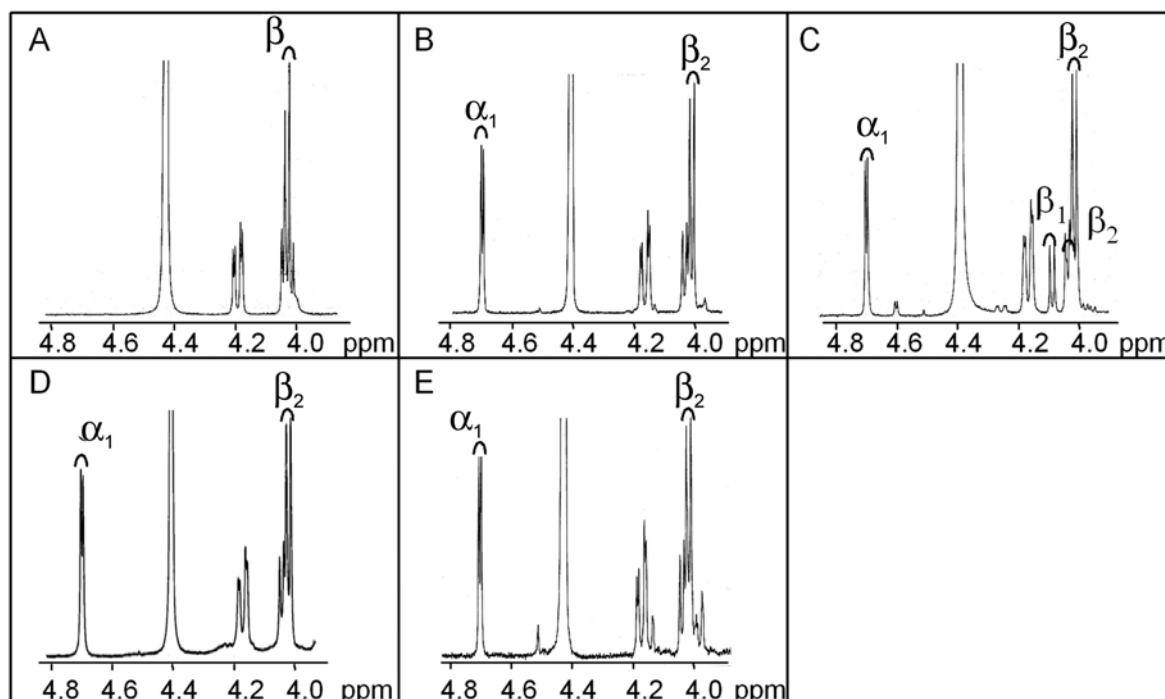


Figure 37 : Analyse par RMN du proton des galactolipides. Le pic α est caractérisé par un doublet à 4,7 ppm et le pic β par un doublet à 4,0 ppm. A- β -MGDG provenant de cellules témoin d'*Arabidopsis*. B- α_1 - β_2 -DGDG provenant de cellules témoin d'*Arabidopsis*. C- DGDG provenant d'enveloppe de chloroplaste purifiée d'épinard (*Spinacia oleracea*). Dans l'enveloppe isolée, deux types de DGDG sont visibles : α_1 - β_2 et β_1 - β_2 . D- α_1 - β_2 -DGDG provenant de cellules carencées d'*Arabidopsis*. E- α_1 - β_2 -DGDG provenant de mitochondries isolées à partir de cellules carencées d'*Arabidopsis*.

Le MGDG des plantes supérieures contient seulement un galactose en position β sur le DAG (Carter *et al.*, 1956), et en effet, le MGDG des cellules d'*Arabidopsis* génère un signal à 4,0 ppm (Figure 37A). Le DGDG extrait à partir des cellules témoin ou carencées correspond à la forme α_1 - β_2 , avec un doublet à 4,0 ppm pour la liaison β et à 4,7 ppm pour la liaison α

(Figure 37B et D). En plus d'un doublet à 4,7 ppm, le DGDG extrait d'une fraction d'enveloppe de chloroplastes isolée à partir de feuilles d'épinard contient trois doublets dans la région des signaux β à 4,0, 4,05 et 4,1 ppm (Figure 37C) qui indiquent la présence attendue à la fois de DGDG α - β et de DGDG β_1 - β_2 .

Ainsi, le DGDG α_1 - β_2 est caractérisé par deux doublets à 4,7 ppm et à 4,0 ppm et le DGDG β_1 - β_2 par deux doublets à 4,1 ppm et 4,05 ppm. Dans le spectre RMN du DGDG mitochondrial (Figure 37E), nous observons un signal caractéristique d'une liaison glycosidique α à 4,7 ppm et un signal d'une liaison glycosidique β à 4,0 ppm. Aucun signal n'est présent à 4,1 ppm. La structure du DGDG mitochondrial est donc du 1,2-diacyl-3-*O*-(α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycérol.

Cette structure est cohérente avec une synthèse du DGDG mitochondrial par les enzymes de type DGD et non pas par l'enzyme de Wintermans. Or, en analysant le double mutant *dgd1 dgd2*, Kelly *et al.*, 2003, ont montré que seulement DGD1 et DGD2 contribuaient à la synthèse du DGDG en carence de phosphate. De plus la composition et la position des acides gras du DGDG mitochondrial donnent des indications sur les implications de DGD1 et DGD2. En effet, en reprenant les données du Tableau 7, la légère augmentation en C16:0 du DGDG mitochondrial par rapport au DGDG des cellules témoin montre l'implication de DGD2 alors que la présence de C18:3 est un indicateur du fonctionnement de DGD1.

Jusque là, toutes les enzymes de synthèse du DGDG, la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase, DGD1 et DGD2, n'ont été localisées que dans l'enveloppe des chloroplastes (Dorne *et al.*, 1982 ; Froehlich *et al.*, 2001 ; Kelly *et al.*, 2003). Parce que DGD1 et DGD2 sont responsables de la synthèse du DGDG de structure α_1 - β_2 et parce que jusqu'à présent, la synthèse des galactolipides n'a jamais été mesurée dans un autre organe que les plastes, il est vraisemblable que le DGDG soit synthétisé dans les plastes avant d'être transféré aux mitochondries. Cependant, aucune étude de localisation n'a été reprise en carence de phosphate. Nous avons donc analysé si en carence de phosphate la localisation des synthèses de galactolipides exclusivement dans les plastes était toujours valide.

3. Localisation de la synthèse des galactolipides en carence de phosphate

Nous avons analysé des fractions issues de cellules transférées depuis 12 h dans du milieu frais contenant ou non du phosphate, pour avoir une synthèse en DGDG la plus grande possible (Tableau 9). En effet, à 12 h de carence, les cellules d'*Arabidopsis* augmentent fortement leur teneur en DGDG alors qu'à trois jours, comme dans les études précédentes, les

remaniements de lipides sont terminés (Figure 27). A 12 h, la production de DGDG est donc à son maximum.

Le Tableau 9 montre que l'incorporation du galactose marqué au ^{14}C dans les galactolipides est de l'ordre de 3 à 17 $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans les mitochondries, ce qui est plus faible que dans les chloroplastes (environ 25 $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et beaucoup plus faible que ce qui a été décrit pour l'enveloppe isolée (environ 1 $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans Block *et al.*, 1983). De plus, l'activité de synthèse présente dans les mitochondries décroît avec l'augmentation de la pureté des mitochondries. L'activité galactosyltransférase des fractions est proportionnelle à la quantité d'enveloppe représentée par la teneur en IEP37 et OEP21, indiquant ainsi que cette activité présente dans les fractions mitochondriales est due aux contaminations croisées des membranes de l'enveloppe des plastes. Ces expériences indiquent que la synthèse du DGDG est localisée dans l'enveloppe des plastes, vraisemblablement réalisée par DGD1 et DGD2, et que les mitochondries ne synthétisent pas le DGDG.

	IEP37	OEP21	Galactose incorporé	
	Unités relatives	Unités relatives	$\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Unités relatives
Chloroplastes	100	100	25.9	100
Cellules	9.6	9.5	1.8	6.9
Mitochondries brutes	67.2	64.5	16.6	64.1
Mitochondries purifiées	13.4	14.4	2.8	10.8

Tableau 9 : Comparaison de l'activité de synthèse des galactolipides et de la contamination en enveloppe de différentes fractions issues de cellules carencées en phosphate depuis 12h. Les fractions mitochondriales sont issues de différentes étapes de purification comme le décrit le matériel et méthodes. Les protéines sont analysées par SDS-PAGE et Western blot, et la teneur en enveloppe est déterminée par comparaison de l'intensité des signaux ECL anti-IEP37 et anti-OEP21 de 10, 5 et 2,5 μg d'une unique fraction chloroplastique et de 20, 10 et 5 μg des trois autres fractions.

L'ensemble de ces expériences a montré qu'en carence de phosphate, les mitochondries contiennent du DGDG et que celui-ci est synthétisé dans les plastes par DGD1 et DGD2. Une question majeure est donc de comprendre le mécanisme par lequel le DGDG est transféré des plastes vers les mitochondries. Le transfert de lipides entre organites peut être activé par des contacts entre les membranes (Données bibliographiques, II-D-). Du fait que dans nos expériences, nous avons observé qu'il était très difficile de séparer l'enveloppe des mitochondries issues de cellules carencées depuis 12 h et que les membranes interne et externe de l'enveloppe contaminaient nos fractions dans les mêmes proportions, nous avons supposé qu'il existait une interaction forte entre les membranes de l'enveloppe et des mitochondries dans les temps précoces de la carence et que cette interaction pouvait être à l'origine du transfert de DGDG des plastes vers les mitochondries. En soutien de cette hypothèse, nous avons observé les cellules en microscopie électronique et noté l'existence de zones de contact entre les mitochondries et les chloroplastes. Nous avons ensuite déterminé si

ces contacts pouvaient impliquer des régions particulières de l'enveloppe. En donnée supplémentaire, étayant cette hypothèse de transfert par contact, nous avons reproduit le transfert de DGDG *in vitro*.

III. Transfert du DGDG des plastes vers les mitochondries par contact

A- Augmentation des zones de contact chloroplastes-mitochondries en carence de phosphate

Des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* ont été observées par microscopie électronique (Figure 38).

Dans les cellules témoin cultivées depuis trois jours, nous observons des mitochondries de sections circulaires ou allongées et des plastes contenant un gros grain d'amidon et des membranes thylacoïdiennes peu développées. Bien que les cellules soient photosynthétiques (Axelos *et al.*, 1992), elles ne sont pas complètement autotrophes et leur croissance est dépendante de la présence de sucre dans le milieu. Pour les cellules carencées depuis trois jours, les mitochondries sont en apparence similaires à celles de cellules témoin mais les plastes sont déformés avec un grain d'amidon fragmenté et des thylacoïdes encore plus réduits que dans les cellules témoin. De plus, l'enveloppe des plastes semble distendue comme si le volume interne des plastes avait diminué. En revanche, quand les cellules sont observées après seulement six heures de culture, elles ont un aspect semblable que le phosphate soit présent ou non. Les grains d'amidon sont moins développés que dans les cellules de trois jours, les thylacoïdes sont un peu plus développés et les grana plus épais. De nombreuses mitochondries de sections circulaires ou allongées peuvent aussi être observées.

Dans toutes les conditions, les mitochondries et les chloroplastes sont proches les uns des autres, mais dans les cellules carencées depuis six heures, les contacts sont observés avec une plus grande fréquence. En effet, bien qu'un rapprochement des mitochondries et des chloroplastes ait lieu dans des conditions standard de culture, le nombre de contact entre les mitochondries et les chloroplastes est multiplié par trois dans les cellules carencées depuis six heures par rapport aux cellules témoin (Tableau 10).

L'analyse des images obtenues par une coupe sériée d'une cellule carencée depuis six heures montre que ces contacts couvrent une assez large surface et ne correspondent pas à un unique point de contact entre les plastes et les mitochondries. De plus, dans ces cellules, certains chloroplastes présentent des constriction et semblent se diviser. Les mitochondries

sont souvent localisées à proximité de ces constriction. Nous avons concentré notre attention sur ces constriction et recherché si ces zones pouvaient correspondre à des domaines de l'enveloppe de composition protéique particulière.

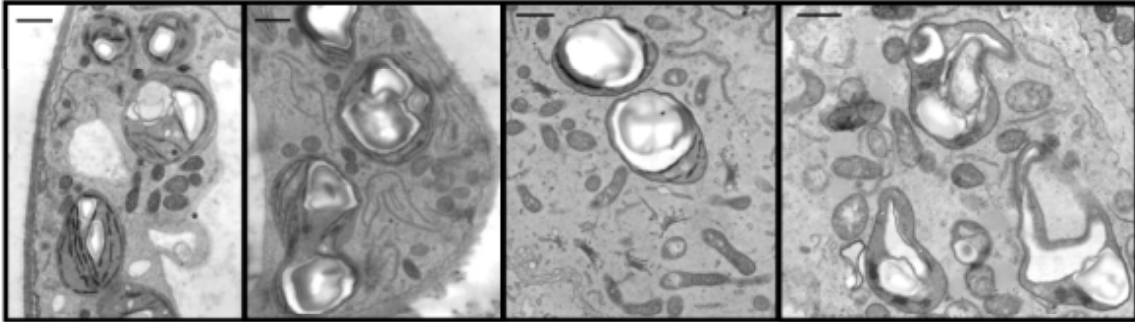
A

Témoin 6 heures

Carencé 6 heures

Témoin 3 jours

Carencé 3 jours



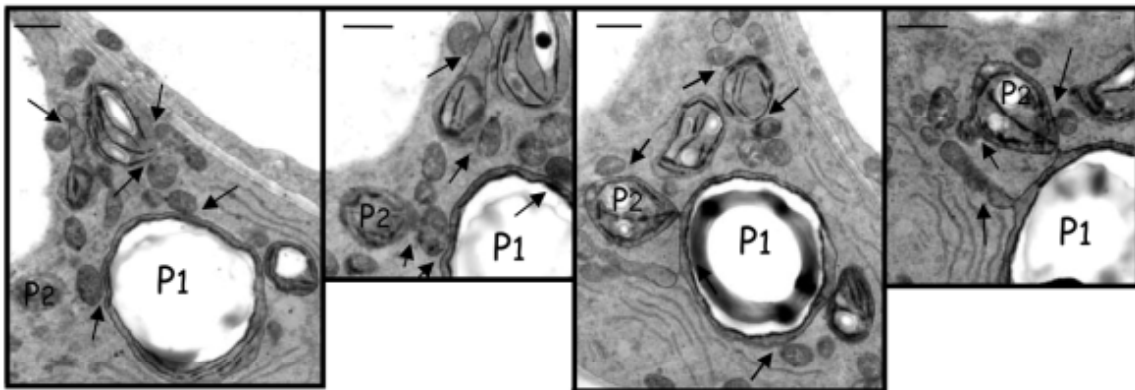
B

1

2

3

4



C

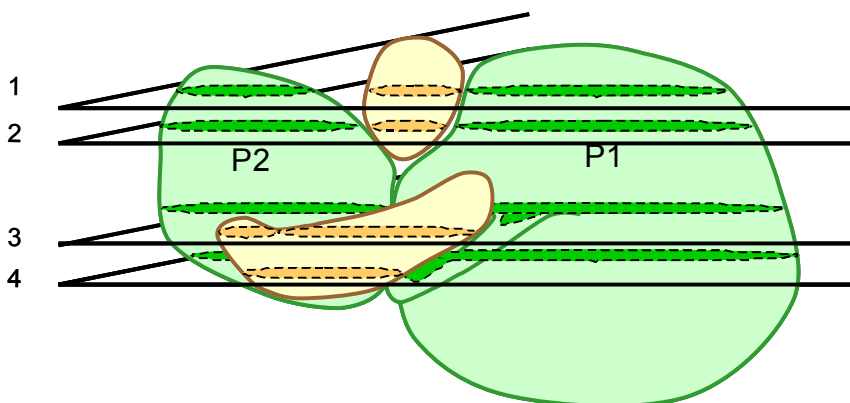


Figure 38 : Observation en microscopie électronique de chloroplastes et mitochondries de cellules d'Arabidopsis en culture. A- Comparaison de cellules à différents temps de croissance (6 h ou 3 j) dans du milieu contenant ou non du phosphate. B- Coupe sériée d'une cellule cultivée depuis 6 h en milieu sans phosphate. Les flèches indiquent les zones de contact entre les mitochondries et les chloroplastes. C- Interprétation tridimensionnelle des positions des chloroplastes P1 et P2 en vert (en référence à P1 et P2 du B-) et de deux mitochondries en orangé. Le numéro des sections se réfère au numéro des images du B-. Echelle : 1 μ m.

	Témoin	Carencé	Comparaison
Nombre de chloroplastes étudiés	87	84	-
Nombre de mitochondries étudiées	319	346	-
Nombre de contacts entre les mitochondries et les chloroplastes	40	114	x 3
Nombre de contacts par chloroplaste	0,46	1,36	x 3
Nombre de contacts par mitochondrie	0,125	0,33	x 2,5

Tableau 10 : Dénombrement contacts entre chloroplastes et mitochondries dans les cellules d'*Arabidopsis* cultivées depuis six en présence ou non de phosphate. Les comptages ont été effectués sur les images de microscopie électronique saisies à partir de plusieurs échantillons. Trente photos du même agrandissement, acquises au hasard, ont été utilisées pour chaque échantillon.

B- Analyse des domaines de l'enveloppe des chloroplastes

Les membranes des organites ne sont vraisemblablement pas uniformes sur l'ensemble de leur surface. Il est possible qu'elles se spécialisent en domaines telles que les rafts dans la membrane plasmique ou les MAM (Mitochondria Associated Membrane) et PLAM (PLastid Associated Membrane) du réticulum. Afin de comprendre si l'enveloppe des chloroplastes, notamment la membrane externe, possédait ce type de régionalisation, nous avons analysé la localisation de OEP21, une protéine de la membrane externe (Bolter *et al.*, 1999). L'observation a été effectuée sur des plantes exprimant la protéine fusionnée à la GFP de manière stable ou transitoire. Elle a été complétée sur des plantes sauvages par visualisation en épifluorescence à l'aide d'anticorps anti-OEP21 (Figure 39).

Nous constatons que la fluorescence de la GFP ou du Bodipy, liée à la présence d'OEP21, est localisée en partie autour de la chlorophylle ou de BCCP1, ce qui était attendu pour une protéine de la membrane externe. Cependant, quelle que soit la méthode utilisée, le marquage n'est pas uniforme autour du plaste. Nous pouvons expliquer la présence de ces spots ou de ces extensions liés à l'expression d'OEP21-GFP soit par une agrégation des protéines au niveau des systèmes d'import des protéines dans les plastes, soit par une organisation de la membrane externe en domaine comportant des zones enrichies en certaines espèces protéiques. Or, la présence de ces spots est confirmée par immuno-marquage indirect avec l'utilisation d'anticorps anti-OEP21 visualisé en microscopie à épifluorescence, et donc indépendamment de l'expression d'une protéine de fusion. De plus, ces images ne sont pas spécifiques d'OEP21, puisque nous avons aussi observé cette hétérogénéité de surface dans des plastes d'une plante transgénique surexprimant OEP7-GFP (Lee *et al.*, 2001) (Figure 40). Nous déduisons de ces observations que la membrane externe de l'enveloppe des plastes possède des domaines d'organisations protéiques.

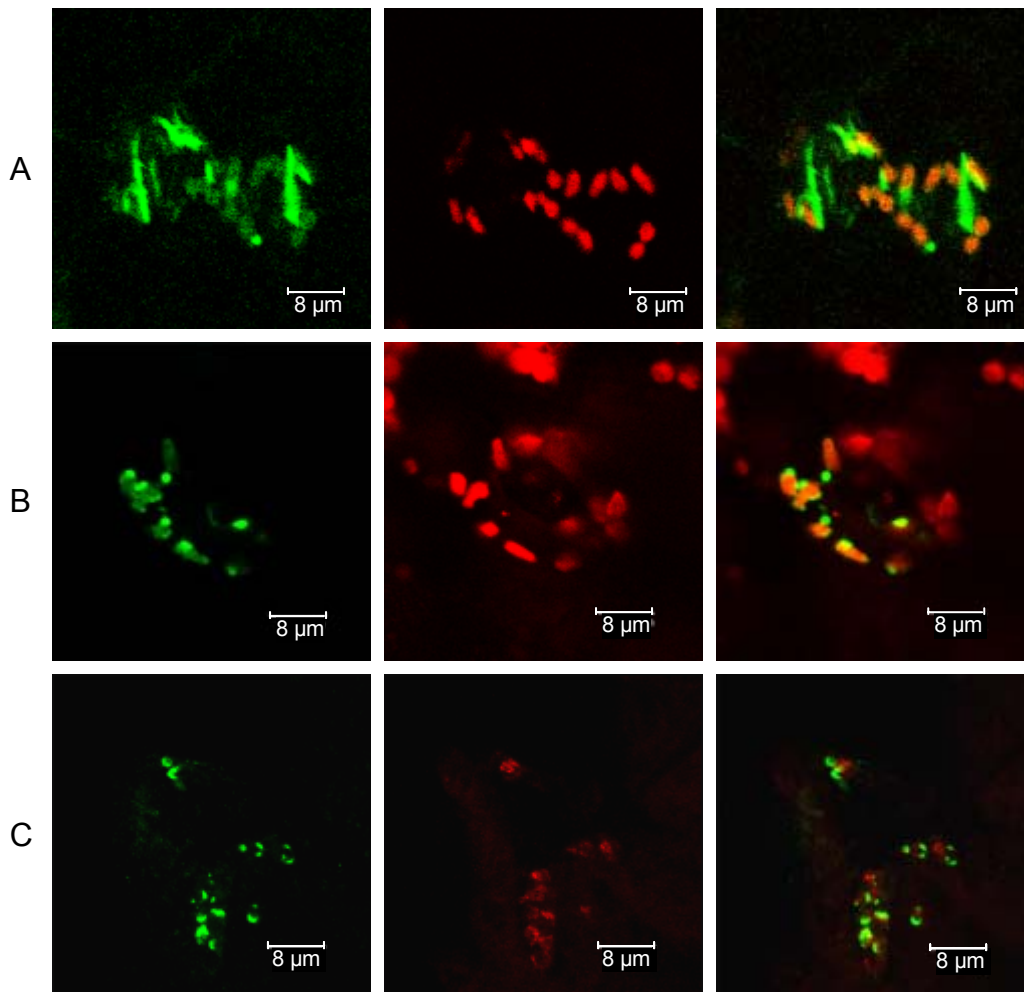


Figure 39 : Visualisation des domaines de l'enveloppe contenant OEP21. A- Observation d'*Arabidopsis* transgéniques surexprimant OEP21-GFP. B- Observation de l'expression transitoire d'OEP21-GFP dans des feuilles de pois. Pour A et B, la fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. C- Observation de cellules d'*Arabidopsis* par marquage immunofluorescent indirect avec anti-OEP21 reconnu par un anticorps secondaire couplé au BODIPY et anti-BCCP1, pour la détection des chloroplastes, reconnu par un anticorps secondaire couplé à Alexa 594. L'ensemble des observations est réalisé au microscope confocal.

Nous avons ensuite étudié l'incidence possible de la carence de phosphate sur le chloroplaste et ses domaines membranaires potentiels. Pour cela, nous avons analysé la localisation de protéines fusionnées à la GFP sur deux plantes transgéniques exprimant respectivement le transit-peptide de la rubisco fusionné à la GFP (TP-GFP) et OEP7 fusionné à la GFP (OEP7-GFP) (Lee *et al.*, 2001) (Figure 40).

Dans des conditions standards de croissance, la construction TP-GFP est localisée dans le stroma et la fluorescence de la GFP couvre étroitement celle de la chlorophylle alors que pour OEP7-GFP, la fluorescence de la GFP est majoritairement localisée autour de la chlorophylle avec des régions intenses et des zones d'extension ne se superposant pas à la chlorophylle. Les domaines membranaires ne sont donc visibles qu'avec des constructions contenant une protéine membranaire. De plus, la localisation d'OEP7-GFP est légèrement

différente de celle d'OEP21-GFP (Figure 39A), indiquant que ces deux protéines appartiennent vraisemblablement à des domaines distincts.

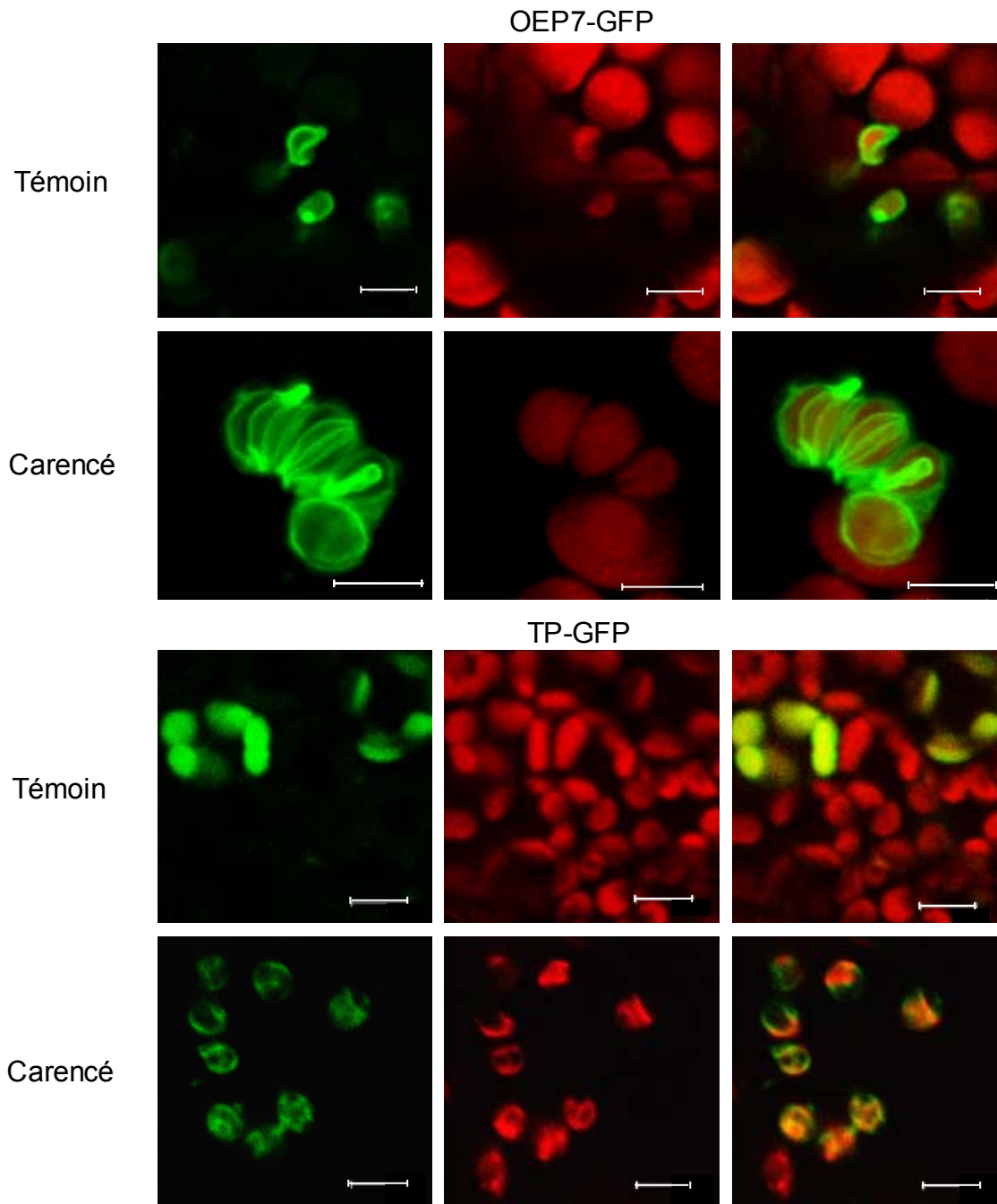


Figure 40 : Localisation de protéines fusionnées à la GFP dans des feuilles de plants transgéniques d'Arabidopsis cultivés en présence ou non de phosphate. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. Les observations sont réalisées au microscope confocal. TP-GFP : transit-peptide de la rubisco fusionné à la GFP, OEP7-GFP (Lee *et al.*, 2001): protéine de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes fusionnée à la GFP. Barre : 6 μ m.

En carence de phosphate, la fluorescence de la chlorophylle couvre des plages de contours moins lisses que dans les plantes cultivées dans des conditions standard. Il semble donc que les thylacoïdes soient affectés. Cette observation est cohérente avec les images de

microscopie électronique obtenues sur les cellules d'Arabidopsis carencées depuis trois jours, où les thylacoïdes sont moins denses et moins serrés que dans les cellules témoins (Figure 38).

Par ailleurs, la carence de phosphate induit une modification des images de fluorescence pour les deux constructions, TP-GFP et OEP7-GFP. Ces modifications sont spectaculaires dans la plante OEP7-GFP, où nous pouvons voir apparaître des domaines très fins enrichis en fluorescence. Après analyse de plusieurs images, nous avons remarqué que les régions de fluorescence intense et les zones d'extensions sont plus nombreuses en carence de phosphate. De plus, les zones d'extension sont aussi visibles dans la plante TP-GFP, ce qui indique que ces zones contiennent probablement du stroma. La carence de phosphate stimule donc des déformations de l'enveloppe et du plaste, que nous observons aussi en microscopie électronique (Figure 38).

Il semble donc qu'en carence de phosphate, les plastes se déforment et que l'enveloppe développe des domaines enrichis en certaines protéines. Nous avons cherché à déterminer si MGD2 et MGD3 étaient présents dans des domaines similaires et si c'était le cas, si ces domaines étaient impliqués dans le contact avec le réticulum pour un couplage de la synthèse du DGDG avec l'approvisionnement en DAG des plastes ou s'ils intervenaient dans les contacts chloroplastes-mitochondries, permettant ainsi un lien entre le transfert du DGDG et sa synthèse. A ces fins, des expériences sont en cours pour l'obtention de transformants MGD2-GFP et MGD3-GFP. Des études de localisation des DGDG synthèses seraient aussi intéressantes à prospecter.

En considérant que les contacts chloroplastes mitochondries était stimulés dans les temps courts de la carence dans les cultures de cellules et que la teneur en DGDG des cellules augmentait entre six heures et dix-huit heures de carence de phosphate (Figure 27), nous avons étudié le transfert de galactolipides entre les mitochondries et les chloroplastes douze heures après transfert des cellules dans un milieu dépourvu de phosphate.

C- Transfert in vitro du DGDG de l'enveloppe des plastes vers les mitochondries

In vitro, nous n'avons pas pu mettre en évidence de transfert de galactolipides à partir de chloroplastes isolés ou d'enveloppe vers des mitochondries brutes ou purifiées. En effet, nous avons incubé pendant une heure des mitochondries avec des chloroplastes ou de l'enveloppe contenant des galactolipides radioactifs. Après séparation, les mitochondries ne

contenaient aucune trace significative de galactolipides marqués ($0,3 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de protéines, soit 1,6 % du marquage initial). De plus, les proportions relatives de galactolipides étaient les mêmes que dans les fractions initiales de chloroplastes ou d'enveloppe. Aucun enrichissement en DGDG n'a donc pu être observé dans ces conditions.

Un transfert à partir de l'enveloppe contaminante présente dans les fractions mitochondriales issues de cellules carencées depuis douze heures a ensuite été mesuré (Tableau 11). Grâce à la présence d'enveloppe contaminante, les galactolipides des fractions mitochondriales sont marqués par pré-incubation avec de l'UDP-gal radioactif. Nous constatons que pour une même teneur en enveloppe, la synthèse de galactolipides est beaucoup plus importante en carence de phosphate, ce qui est cohérent avec une surexpression des enzymes de synthèses des galactolipides. Ces expériences confirment par ailleurs les données précédemment obtenues en carence de phosphate : le niveau de synthèse des galactolipides est dépendant du niveau de contamination en enveloppe et la proportion de lipides synthétisés est relativement stable dans les deux fractions carencées.

	MGDG nmol.mg^{-1} protein	DGDG nmol.mg^{-1} protein	TriGDG nmol.mg^{-1} protein	DGDG /MGDG	DGDG /TriGDG	MGDG /TriGDG	OEP21 unités relatives	IEP37 unités relatives
Témoin								
Mitochondries brutes	1.10	1.74	0.76	1.6	2.3	1.4	62	60
Mitochondries purifiées	0.30	0.53	0.28	1.7	1.9	1.1	20	18
Carencé 1								
Mitochondries brutes	4.08	11.26	1.09	2.8	10.3	3.7	64	67
Mitochondries purifiées	1.23	6.17	0.39	5.0	15.8	3.2	29	31
Carencé 2								
Mitochondries purifiées	0.83	1.85	0.17	2.2	10.8	4.9	14.4	13.4
Mitochondries purifiées deux fois	0.37	1.32	0.10	3.6	13.2	3.7	7.1	6.7

Tableau 11 : Enrichissement relatif en DGDG de plusieurs fractions mitochondriales à différentes étapes de purification obtenues à partir de cellules cultivées dans du milieu contenant ou non du phosphate. Les galactolipides sont synthétisés dans les fractions brutes ou purifiées pendant une heure par addition d'UDP-gal radioactif. Une partie de la fraction est utilisée pour doser les lipides immédiatement après la synthèse, l'autre partie est déposée sur un gradient de Percoll continu de 28 % et purifiée comme le décrit la deuxième étape de purification des mitochondries du matériel et méthodes. La teneur en enveloppe est déterminée pour chaque fraction comme dans le Tableau 9.

Après l'étape de radiomarquage de galactolipides, les mitochondries sont purifiées sur un gradient continu de Percoll pour diminuer les contaminations en enveloppe et éliminer le substrat radioactif. Le marquage des galactolipides dans les fractions mitochondriales purifiées sur ce gradient est ensuite comparé à celui des fractions avant purification (Tableau 11).

Le marquage de chaque espèce de galactolipides dans les fractions mitochondriales diminue lorsque les mitochondries sont purifiées, ce qui est cohérent avec la réduction de la proportion de chaque membrane de l'enveloppe, mise en évidence par la diminution de

OEP21 et IEP37. Dans les mitochondries témoin, la diminution du niveau de chaque galactolipide est similaire pour toutes les espèces et est proportionnelle à celles d'OEP21 et de IEP37. En revanche, dans les fractions carencées, la diminution n'est pas la même pour chaque espèce de lipide. En effet, la baisse du DGDG est beaucoup plus faible que celle du MGDG ou du TriGDG. La proportion du DGDG par rapport au MGDG ou au TriGDG augmente après l'étape de purification alors que le rapport MGDG/TriGDG reste stable, indiquant ainsi qu'une partie du DGDG n'a pas accompagné l'enveloppe et est passée dans les mitochondries. La teneur en DGDG mesurée dans les mitochondries après purification provient donc pour une part de l'enveloppe contaminante, pour l'autre part du DGDG transféré dans les mitochondries.

L'augmentation relative de DGDG dans les mitochondries carencées après purification et la diminution de la teneur en enveloppe de ces mêmes fractions indiquent qu'un pool de DGDG a été transféré des membranes de l'enveloppe des plastes vers les mitochondries et que ce transfert est sélectif, ne concernant pas le MGDG. Du fait qu'en microscopie électronique nous n'avons pas trouvé de formation de vésicules, et qu'au contraire, de nombreux rapprochements entre les chloroplastes et les mitochondries ont été observés pendant les temps courts de la carence de phosphate, nous supposons que le transfert de DGDG peut s'effectuer par l'intermédiaire de contacts directs entre les mitochondries et les chloroplastes. De plus, nous avons remarqué que les mitochondries étaient plus difficiles à séparer de l'enveloppe après douze heures qu'après trois jours de carence. L'enveloppe des chloroplastes est donc reliée aux mitochondries par un contact physique mais sans fusion des membranes, puisque ce phénomène n'a pas été observé en microscopie électronique.

Nous avons donc mis en évidence qu'en carence de phosphate, l'enveloppe des chloroplastes était en contact avec les mitochondries, que vraisemblablement ces contacts impliquaient des domaines particuliers de l'enveloppe et qu'ils permettaient le transfert du DGDG vers les mitochondries. L'ensemble de ces données nous permet de compléter le schéma précédemment écrit.

IV- Discussion

MGDG et DGDG sont des lipides de plantes localisés quasiment exclusivement dans les membranes plastidiales en conditions normales de croissance. Nos données ainsi que des travaux précédents ont montré que le niveau de DGDG augmente fortement dans les cellules végétales en carence de phosphate (voir chapitre I ; Härtel *et al.*, 1998). Deux études ont

montré qu'en carence de phosphate, le DGDG est présent dans la membrane plasmique et dans le tonoplaste (Andersson *et al.*, 2003 ; Andersson *et al.*, 2005), des compartiments membranaires déconnectés des membranes plastidiales mais reliés au système endomembranaire, où la majorité des synthèses des phospholipides se réalise. Cependant, pour la membrane plasmique et le tonoplaste, du DGDG a déjà été trouvé dans d'autres études ne concernant pas la carence en phosphate (Mongrand *et al.*, 2004 ; Haschke *et al.*, 1990). Jusque là cette présence était considérée comme une contamination, mais peut-être qu'elle est réelle. En effet, la composition en acide gras du DGDG de la membrane plasmique (C16 :0 > 30 %) est différente de celle du DGDG des plastes (C16 :0 < 15 %), que ce soit en carence de phosphate ou non. Il existe donc soit un mode d'approvisionnement sélectif de la membrane plasmique vis à vis du DGDG des plastes, soit une voie de synthèse du DGDG différente de celle des plastes.

Dans ce travail, nous avons montré par immuno-marquage en épifluorescence, par analyse de lipide et par immunoagglutination qu'en carence de phosphate, du DGDG est aussi présent dans les membranes mitochondriales *in vivo* et *in vitro*. De plus, vu la forte teneur en DGDG des mitochondries, le DGDG est vraisemblablement localisé à la fois dans la membrane interne et dans la membrane externe des mitochondries.

De manière surprenante, toutes les espèces de phospholipides, excepté le DPG, semblent remplacées par le DGDG dans les mitochondries en carence de phosphate. Nos données montrent que cet échange n'est pas restreint à la PC mais concerne aussi la PE et le PG. Or, le DGDG et la PC ont les mêmes propriétés structurales ; ils sont tous les deux neutres et forment des bicouches alors que la PE est un lipide neutre qui forme des phases hexagonales II et que le PG est anionique. Les modifications lipidiques induites par la carence de phosphate dans les mitochondries entraînent donc un changement important de la structure et de la charge de la bicouche lipidique, affectant inévitablement l'environnement des protéines membranaires. Il est important de comprendre quel pourrait être le rôle du DGDG dans les membranes mitochondriales. Dans les thylacoïdes, le DGDG intervient dans la structure et la stabilité du LHCII *in vitro* (Reinsberg *et al.*, 2000). Peut-être intervient-il alors comme protecteur de la chaîne de transport d'électrons des mitochondries en remplaçant les phospholipides au cours de la carence de phosphate. En effet, la respiration des mitochondries isolées est préservée (nos résultats et Rebeillé *et al.*, 1984). Cependant, nous ne savons pas si le DGDG peut remplacer les phospholipides présents dans la structure fine des complexes de la chaîne respiratoire.

L'absence de diminution du niveau de DPG au cours de la carence est étonnante. En effet, celui-ci contient deux atomes de phosphore au contraire des autres phospholipides qui n'en possèdent qu'un. Une explication possible est que le DPG remplit une fonction vitale qui est maintenue ou même activée pendant la carence de phosphate, et qu'ainsi, il est protégé. Soutenant cette hypothèse, des travaux ont montré que le DPG était nécessaire à la structure et à la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire dans les cellules animales (Zhang *et al.*, 2002 ; Pfeiffer *et al.*, 2003).

Une seconde question importante posée par la présence de DGDG dans les mitochondries concerne son origine. En effet, jusque là, les DGDG synthèses, DGD1, DGD2 et l'enzyme de Wintermans, ont été localisées uniquement dans l'enveloppe des plastes (Froehlich *et al.*, 2001 ; Kelly *et al.*, 2003 ; Dorne *et al.*, 1982). Nous avons mesuré qu'en carence de phosphate, la synthèse des galactolipides était proportionnelle à la teneur en enveloppe. Ainsi, nous pouvons confirmer que même en carence de phosphate, la synthèse des galactolipides est toujours localisée dans l'enveloppe des chloroplastes. De plus, nos analyses RMN indiquent que la structure du DGDG mitochondrial est de type $\alpha_1\text{-}\beta_2$, ce qui est cohérent avec une synthèse à partir des enzymes de type DGD et non pas à partir d'une galactolipide-galactolipide galactosyltransférase. Il est établi que DGD1 et DGD2 contribuent toutes les deux à la synthèse du DGDG en carence de phosphate (voir chapitre I, III- A-). La composition en acide gras du DGDG mitochondrial, similaire à celle du DGDG des cellules témoin et carencées au contraire du DGDG de la membrane plasmique, semble indiquer que les deux enzymes participent aussi à cette synthèse.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le transfert de lipides entre différents organites. En particulier, les mouvements de lipides peuvent s'effectuer dans des zones spécialisées d'accolement de membranes. Par exemple, dans les levures et les cellules de mammifères, un transfert de PS du réticulum vers la membrane interne des mitochondries s'effectue à partir de régions spécialisées du réticulum associées aux mitochondries appelées MAM (Données bibliographiques, II-). Dans nos investigations sur le mécanisme possible de transfert de DGDG de l'enveloppe des plastes aux mitochondries, nous avons observé des modifications de la structure cellulaire aux cours de la carence de phosphate. Nous avons constaté que, dans les temps courts de la carence, les membranes des mitochondries et des chloroplastes étaient très proches, favorisant ainsi un transfert possible du DGDG par contact. Comme pour les MAM, en carence de phosphate, il est difficile de séparer les deux organites. Parce qu'aucune vésicule entre les mitochondries et les plastes n'a pu être visualisée, nous pensons que ce transfert n'implique pas le système endomembranaire mais plutôt un contact

physique entre les mitochondries et les chloroplastes, vraisemblablement réalisé par des protéines.

Nous avons observé que l'enveloppe des chloroplastes semble être organisée en domaines de compositions protéiques particulières et que le nombre de ces domaines semble augmenter en carence de phosphate. Peut-être que, comme pour les MAM, les domaines de l'enveloppe impliqués dans les transferts de lipides ont une composition protéique et/ou lipidique différente du reste de l'enveloppe. De plus, le transfert de lipide est spécifique du DGDG, il ne concerne pas le MGDG et le TriGDG. Ce transfert implique donc certainement des protéines permettant la sélection des espèces lipidiques, au niveau du transfert lui-même ou au niveau de la composition en lipides de la région de l'enveloppe associée aux mitochondries. Nous pouvons aussi supposer que cette région est enrichie en MGDG synthases et DGDG synthases permettant un couplage entre la synthèse du DGDG et son transfert. Il est aussi possible que ce couplage de synthèse de DGDG ne s'effectue pas avec le transfert de DGDG vers les mitochondries mais avec celui du DAG en provenance du réticulum.

L'ensemble des données, obtenues dans les travaux présentés dans ce chapitre, nous permet d'enrichir le schéma du métabolisme des lipides en carence de phosphate (Figure 41). Nous avons établi, dans le chapitre I, que l'hydrolyse de PC conduisait à l'approvisionnement en DAG des plastes pour la synthèse de DGDG. Dans ce chapitre, nous avons démontré que le DGDG est ensuite redirigé vers des membranes extraplastidiales telles que les mitochondries, et peut-être la membrane plasmique et le tonoplaste (ce travail ; Andersson *et al.*, 2003 ; Andersson *et al.*, 2005).

Aucune donnée n'est connue sur le transfert vers la membrane plasmique et le tonoplaste. Pour le transfert vers les mitochondries, nous avons montré qu'il faisait intervenir des contacts entre les mitochondries et les chloroplastes. Il est possible que ces contacts se forment dans des régions spécifiques de l'enveloppe enrichies en certaines protéines. Nous avons donc cherché à identifier les protéines qui pouvaient intervenir dans ce schéma. Pour cela, nous avons collaboré avec l'équipe de Marie Christine Thibaud à Cadarache dans une étude transcriptomique de plants d'*Arabidopsis* soumis à différents temps de carence de phosphate. Cette étude réalisée sur le génome complet d'*Arabidopsis* nous a permis d'identifier des candidats potentiels de phospholipases D et C intervenant dans la première partie du schéma et de protéines potentiellement adressées aux mitochondries qui pourraient

intervenir dans le transfert du DGDG. La recherche de gènes-candidats par cette approche globale est présentée dans le chapitre III.

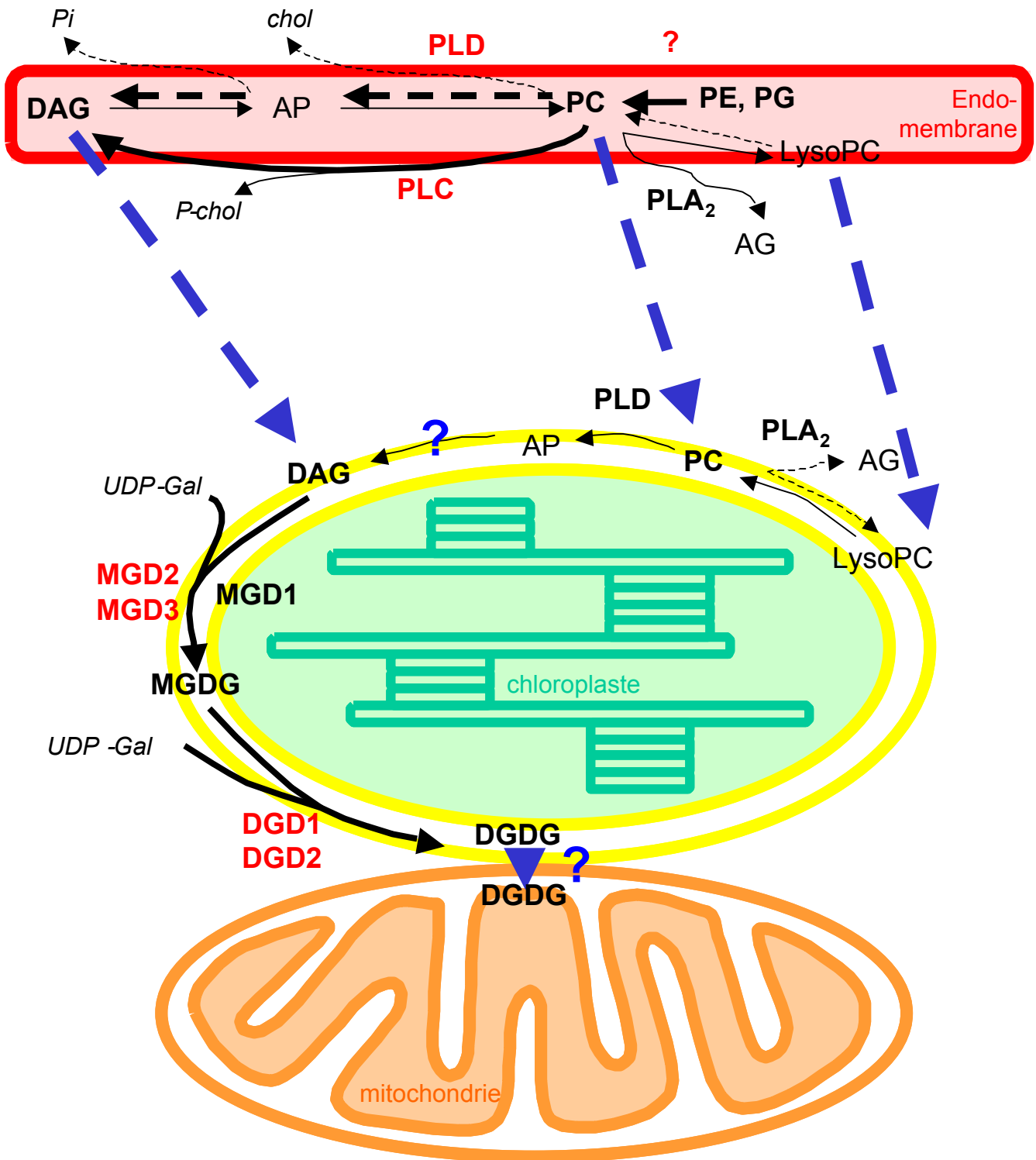


Figure 41 : Schéma bilan du remaniement lipidique en carence de phosphate. Les flèches en gras correspondent aux voies activées en carence de phosphate avec leurs enzymes correspondantes en rouge. L'ensemble des hypothèses de transfert de lipides du réticulum vers les plastes est présenté ici et détaillé dans le texte. Les PLD ou PLC indiquées en rouge ne sont pas encore clairement identifiées et feront l'objet d'une partie du chapitre III. AG : acide gras, AP : acide phosphatidique, chol : choline, P-chol : phosphocholine, Pi : phosphate, UDP-Gal : UDP-galactose.

Chapitre III :
Identification de gènes
impliqués dans le
métabolisme des lipides en
carence de phosphate

Identification de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en carence de phosphate

Les résultats présentés dans les chapitres I et II détaillent les bouleversements lipidiques dans les cellules végétales mises en carence de phosphate, aux niveaux du métabolisme et de la compartimentation. Le changement de la composition en lipide des cellules est dû à des remaniements membranaires impliquant l'activation de voies de synthèse et de systèmes de transfert. Ces remaniements doivent s'articuler avec l'ensemble des mécanismes mis en œuvre par la plante carencée. Très peu de données génétiques, concernant cette réponse ou la compréhension globale des changements d'expression des gènes lors de la carence de phosphate, sont disponibles. Nous avons collaboré à une analyse plus globale de la carence de phosphate en participant à l'analyse transcriptomique réalisée par l'équipe de Marie-Christine Thibaud à Cadarache. Ces chercheurs ont utilisé une puce Affymetrix correspondant au génome entier d'*Arabidopsis* pour étudier l'évolution de l'expression des gènes au cours de la carence de phosphate. Les données obtenues par cette analyse nous ont ensuite permis d'identifier des protéines candidates pouvant être impliquées dans les changements lipidiques de la cellule végétale (voies métaboliques et transfert) au cours de la carence.

I. Analyse transcriptomique de plantes d'*Arabidopsis thaliana* au cours de la carence de phosphate

L'analyse transcriptomique, proprement dite, a été effectuée par l'équipe de Marie-Christine Thibaud (Cadarache). Notre contribution a porté sur la caractérisation des modifications lipidiques intervenant dans leur matériel d'étude puis, à partir des réponses de chaque gène, sur la sélection d'une liste des gènes candidats impliqués dans le métabolisme des lipides susceptible d'intervenir dans les remaniements membranaires. Le développement de la puce ATH1 d'Affymetrix, contenant 22810 jeux de sondes, permet d'analyser dans sa quasi-totalité l'expression du génome d'*Arabidopsis*. L'étude a été réalisée sur plante entière à la différence de nos expériences précédentes. Nous avons donc déterminé *in planta* que la nature et la séquence des changements lipidiques observés au niveau des cellules se retrouvaient à l'échelle de l'organisme entier. Ensuite, nous avons étudié les résultats de

l'analyse transcriptomique en extrayant tout d'abord les données confirmant ce qui était préalablement connu pour l'expression de certains gènes, en particulier ceux intervenant dans la synthèse des galactolipides, et en recherchant des candidats potentiels intervenant dans le métabolisme et le transport des lipides.

A- Validité des conditions et du matériel d'étude

Les analyses de réponses transcriptomiques par hybridation sur puces sont effectuées trois fois à partir de trois temps de carence de phosphate et de deux conditions de culture. Les plantes témoins ont été cultivées dans un milieu contenant 500 μM de phosphate et les carencées 5 μM . Pour les temps courts (échantillons 3, 6 et 12 heures rassemblés) et les temps moyens (échantillons 1 et 2 jours rassemblés), les plantes ont été mises en germination sur milieu solide, cultivées pendant un mois et transférées pour les temps indiqués dans un milieu liquide carencé ou non. Pour les temps longs (10 jours), les graines ont été mises à germer sur du milieu solide contenant 5 ou 500 μM de phosphate, les plantules ont été cultivées 10 jours et au moment de l'analyse, les feuilles et les racines ont été collectées séparément. La composition lipidique de ces échantillons a ensuite été analysée (Figure 42).

Les changements de composition lipidique des plantes dus à la carence de phosphate ne sont pas visibles aux temps courts et apparaissent dès les temps moyens, où nous pouvons observer une diminution du PG et de la PC, compensée par une augmentation du SQDG et du DGDG. Dans les feuilles carencées depuis dix jours, nous observons une diminution franche de la teneur en phospholipides, excepté pour le DPG, alors que dans les racines, il y a une légère baisse de la PE et du PI, une augmentation du DGDG, et la PC reste en proportion constante. Ces résultats indiquent que la composition en lipides est plus sensible à la carence de phosphate dans les feuilles que dans les racines et que, dans les racines, la quantité de DGDG n'atteint pas des proportions aussi fortes que dans les feuilles.

Ces analyses montrent d'une part que les résultats établis sur le modèle cellulaire sont applicables à la plante entière, d'autre part, que le modèle cellulaire tient compte des différences existant entre les tissus. En effet, les différences racines-feuilles semblent compatibles avec les différences de sensibilité à la carence de phosphate observées entre les cellules d'érable, proches d'un tissu racinaire, et les cellules d'*Arabidopsis*, proches d'un tissu foliaire. De plus, dans les temps courts, aucune modification lipidique n'est observée ; les gènes dont l'expression est affectée dans cette condition sont donc importants à étudier pour la mise en place de la carence. Dans les temps moyens, des changements sont en cours ; les

gènes impliqués dans le remaniement des lipides doivent être activés. Enfin dans les racines et les feuilles, la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse à la carence de phosphate doit être différente car les deux tissus ne répondent pas de la même manière.

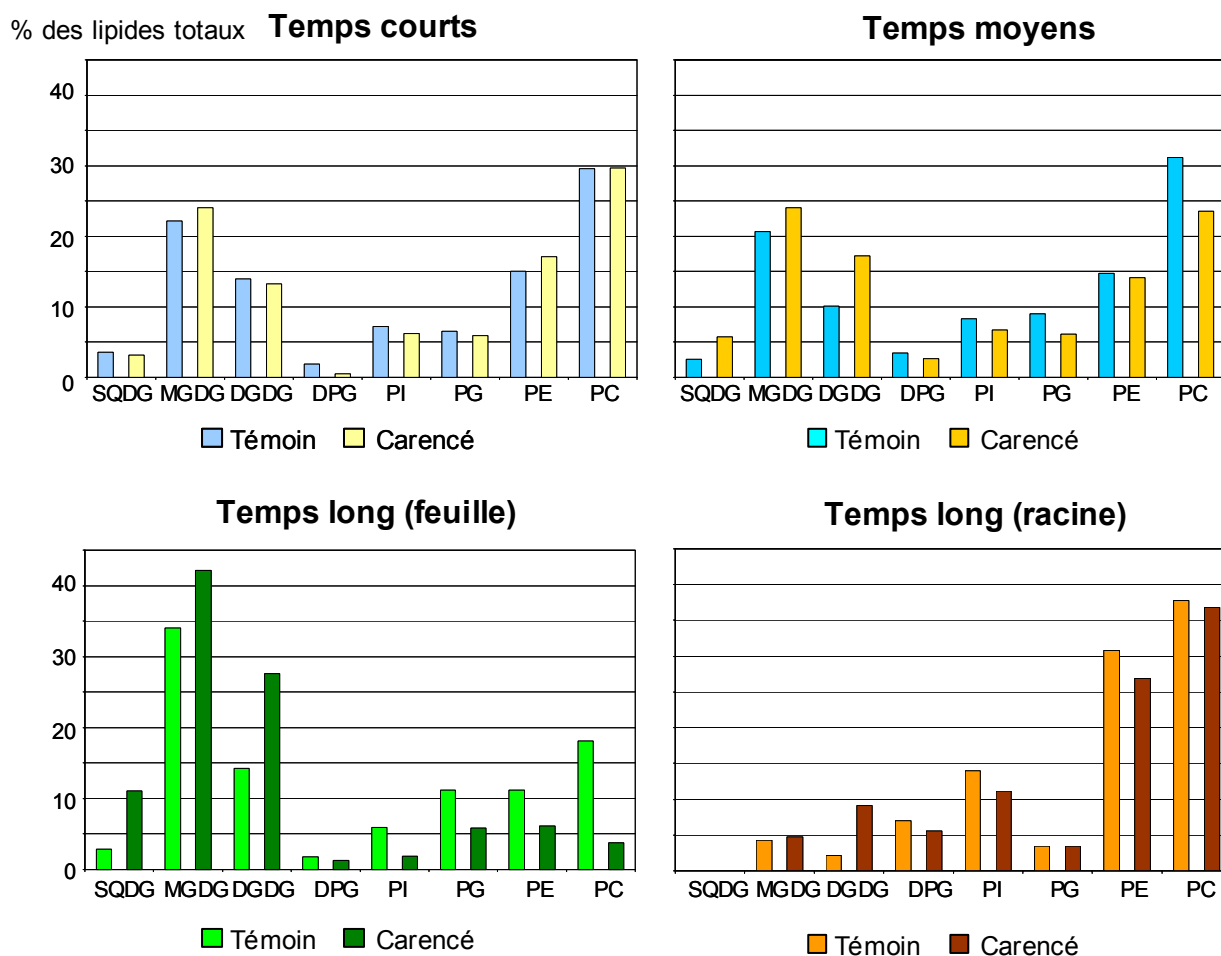


Figure 42 : Analyse de la composition en lipide des différents échantillons utilisés pour l'analyse transcriptomique. Les compositions en lipides sont exprimées en pourcentage des lipides totaux. Les temps d'analyse correspondent à ceux décrits dans le texte.

A partir des ARN messagers issus des plantes cultivées à ces trois temps de carence, nous avons analysé la modification de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques affectées par la carence de phosphate et étudié plus précisément ceux qui étaient impliqués dans le métabolisme des lipides.

B- Résultats des analyses transcriptomiques du génome d'Arabidopsis thaliana

1. Analyse globale des expressions des gènes en carence de phosphate

Les analyses transcriptomiques sont utilisées pour déterminer la variation de l'expression des gènes au cours du développement de la carence de phosphate. Le protocole

d'analyse transcriptomique utilisant les puces a été validé par Julie Misson (Cadarache) de trois méthodes différentes : par RT-PCR quantitative, Northern blot et par des fusions de promoteurs induits par la carence de phosphate avec des gènes rapporteurs. Pour résumer, les résultats de RT-PCR ont confirmé les données des puces bien que quelques différences entre les rapports d'expression carencés/témoin obtenus par les puces et les RT-PCR aient été parfois observées. Ces différences affectent surtout les gènes qui ne sont pas exprimés dans une des deux conditions, carencée ou témoin. Les rapports d'expression n'ont dans ce cas pas de signification physiologique et dépendent uniquement de la sensibilité de la méthode utilisée. La comparaison de ces trois méthodes montre que les puces sont beaucoup plus sensibles et permettent de détecter des gènes transcrits seulement dans des tissus particuliers comme At3g08720 qui n'est exprimé qu'en carence de phosphate dans le cylindre central des racines et dans les racines latérales émergentes.

Les données de l'analyse transcriptomique ont été analysées et pour chaque gène, dans chaque condition de carence, le résultat a été exprimé comme le rapport du niveau d'expression du gène en condition carencée sur le niveau en condition témoin. Par convention, si ce rapport est supérieur à 2, l'expression du gène est considérée comme activée par la carence de phosphate, et s'il est inférieur à 0,5, elle est réprimée. Au total sur les 22810 gènes étudiés, 612 gènes sont induits et 254 sont réprimés par la carence de phosphate (Figure 43).

Au temps court de la carence, 72 gènes sont induits alors que seulement quatre sont réprimés. Ce nombre augmente significativement au temps moyen (291 gènes induits et 34 réprimés), et 59 gènes qui étaient induits au temps court restent induits au temps moyen. De plus, l'induction de 91 gènes et la répression de 22 gènes, induits au temps moyen, sont transitoires. Nous retenons que la carence de phosphate induit des changements d'expression dès les temps très courts et que certaines des modifications peuvent être transitoires.

La carence de phosphate à long terme modifie l'expression de 732 gènes dont 501 sont activés (228 dans les racines et 404 dans les feuilles) et 231 sont réprimés (74 dans les racines et 169 dans les feuilles). Seulement, 131 gènes activés et 11 réprimés sont communs aux racines et aux feuilles. La majorité des gènes affectés par la carence est donc spécifique des racines ou des feuilles, montrant ainsi que les tissus de la plante répondent différemment à la carence en activant différents pools de gènes. De plus, nous avons constaté que presque 50 % des gènes, dont l'expression est affectée par la carence de phosphate, voient leur expression modifiée uniquement dans les feuilles aux temps longs. Ce résultat est cohérent avec les

analyses de lipides où nous avons observé que les lipides des feuilles au temps long étaient les plus affectés par la carence de phosphate.

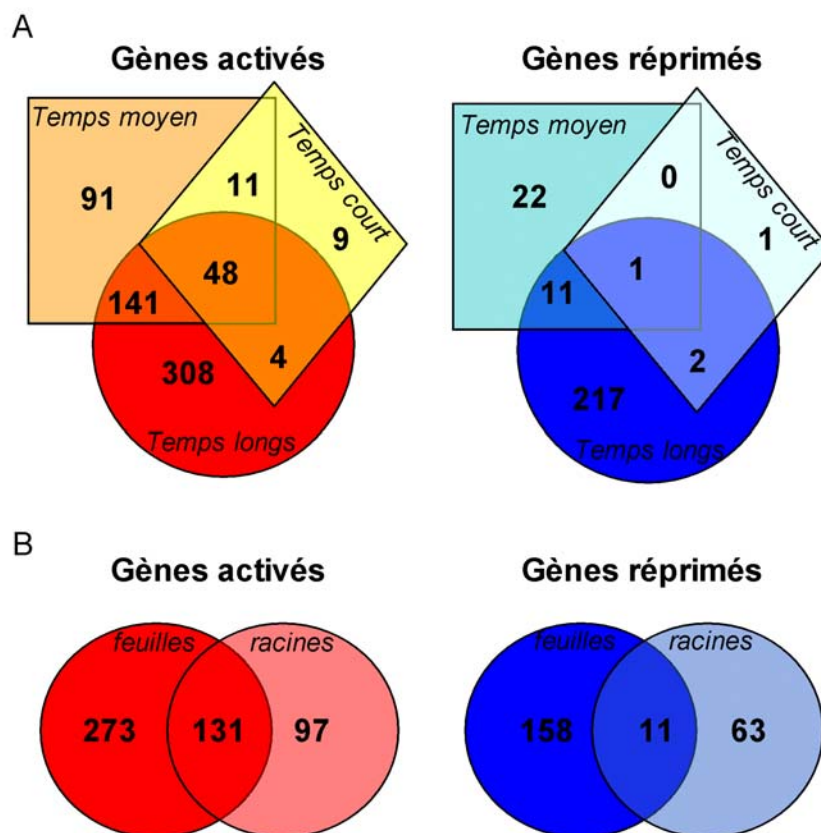


Figure 43 : Nombre de gènes induits ou réprimés par la carence de phosphate. A- Analyse du nombre de gènes induits et réprimés aux trois temps de carence de phosphate. Les analyses aux temps court (3,6 et 12 heures) et moyen (1 et 2 jours) de carence ont été faites sur plantes entières et celles aux temps longs (10 jours) ont été faites séparément sur les feuilles et les racines puis les résultats ont été regroupés en tant que temps longs de carence. B- Analyse des gènes induits et réprimés au temps long de la carence dans les deux tissus étudiés, feuilles et racines.

Nous avons noté qu'environ 84 % et 75 % des gènes respectivement induits et réprimés ont des fonctions connues ou potentielles. Pour essayer de mieux percevoir les phénomènes induits par la carence de phosphate, nous avons classé en groupes fonctionnels les gènes, dont l'expression était modifiée au cours de la carence de phosphate (Tableau 12).

Globalement, les catégories comprenant le plus de gènes affectés par la carence de phosphate correspondent au métabolisme et aux réponses aux stress. Les gènes connus pour être impliqués dans les réponses aux stress sont par ailleurs essentiellement affectés au temps moyen, indiquant un rôle plutôt transitoire pour ces gènes. Les gènes appartenant aux catégories du métabolisme, y compris métabolisme des lipides, des phosphatases et des transporteurs sont activés en grand nombre dès les temps courts. De plus, après vérification des résultats bruts de l'analyse transcriptomique, la majorité des gènes qui sont activés dans les racines aux temps longs, qui n'appartiennent pas aux catégories des transporteurs de

phosphates, des phosphatases et au métabolisme des lipides, ne sont pas activés dans les feuilles aux temps longs. Ces résultats confirment une induction différente des gènes dépendant du tissu, feuille ou racine.

Gènes affectés par la carence de phosphate	Plantes entières 3, 6, 12 heures	Plantes entières 1, 2 jours	Feuilles 10 jours	Racines 10 jours
Dégradation des protéines	1-0	3-1	5-2	7-4
Développement	1-0	8-0	13-5	8-4
Métabolisme	11-0	58-4	72-26	31-18
Métabolisme des lipides	6-1	23-1	33-3	18-1
Phosphatases	11-0	18-1	25-3	16-3
Signalisation	3-0	10-2	21-9	14-1
Stress	5-1	42-2	35-8	30-4
Synthèse des protéines	0-0	0-2	1-19	0-0
Transcription	5-0	10-6	33-22	19-6
Transporteurs	8-1	21-1	34-3	18-9
Transporteurs d'électron	5-0	19-2	17-5	6-8
Transporteurs de phosphate	1-0	6-0	8-0	9-0
Autres	3-0	24-1	32-17	14-3
Inconnues	12-1	49-11	75-47	38-13
Total	72-4	291-34	404-169	228-74

Tableau 12 : Répartition fonctionnelle des gènes affectés par la carence de phosphate aux différents temps expérimentaux. Le nombre de gènes surexprimés est indiqué en rouge et le nombre des réprimés en bleu.

Cependant, ce tableau ne permet pas de percevoir aisément de liens entre les catégories fonctionnelles et l'induction en carence de phosphate. Pour déterminer des liens éventuels entre les fonctions de ces gènes et leur induction ou répression par la carence de phosphate, nous avons réalisé une analyse statistique des correspondances (Lebart *et al.*, 2000) permettant de visualiser ces relations.

Le graphique (Figure 44) permet de regrouper les ensembles de gènes qui se ressemblent pour différents critères (catégorie fonctionnelle, réponse à la carence de phosphate) sous forme de clusters (Tableau 13).

Catégorie (ou variable)	Critère (ou modalité)
Catégorie fonctionnelle	Développement, Métabolisme, Métabolisme des lipides, Phosphatases, Transporteurs de phosphate, Transporteurs d'électron, Autres transporteurs, Transcription, Synthèse des protéines, Dégradation des protéines, Signalisation, Stress, Autres ou Inconnues
Temps court	+1 (pour un gène activé), 0 (pour un gène stable) ou -1 (pour un gène réprimé)
Temps moyen	+1 (pour un gène activé), 0 (pour un gène stable) ou -1 (pour un gène réprimé)
Temps long (Feuille)	+1 (pour un gène activé), 0 (pour un gène stable) ou -1 (pour un gène réprimé)
Temps long (Racine)	+1 (pour un gène activé), 0 (pour un gène stable) ou -1 (pour un gène réprimé)

Tableau 13 : Catégories dans lesquelles sont répartis tous les gènes affectés par la carence de phosphate en fonction de différents critères. Ces critères sont représentés par l'analyse fonctionnelle des correspondances (Figure 44).

Les ensembles des gènes des fonctions *Transports de phosphate*, *Phosphatases* et *Métabolisme des lipides* sont rassemblés avec les gènes *Activés dans les temps courts, moyens et longs* (Figure 44, rectangle rouge). Nous pouvons donc déduire de ces clusters qu'une

grande partie des gènes classés selon ces trois fonctions est induite à tous les temps de la carence de phosphate. Ce résultat était attendu car ce sont effectivement les fonctions affectées par la carence de phosphate les plus visibles et donc les plus étudiées.

L'ensemble des gènes *Surexprimé dans les racines aux temps longs* (Long+1 (Racine)) est séparé de l'ensemble des gènes *Surexprimé dans les feuilles aux temps longs* (Long+1 (Feuille)). Nous déduisons de cette analyse que les gènes activés dans les racines ne le sont pas dans les feuilles. En effet, après vérification dans les données brutes de l'analyse transcriptomique, la majorité des gènes qui sont activés dans les racines aux temps longs, n'appartenant pas aux catégories *Transports de phosphates*, *Phosphatases* et *Métabolisme des lipides*, ne le sont pas dans les feuilles aux temps longs.

De même, les ensembles de gènes présents dans la partie centrale du graphe (Figure 44, rectangle noir) ne sont globalement pas corrélés avec la carence de phosphate. Dans cette région, tous les ensembles de gènes ne variant pas en carence de phosphate (Courts 0, Moyen 0, Long 0 (Feuille et Racine)) sont présents. Après vérification des données brutes, nous pouvons conclure que les fonctions présentes dans ce contour ne sont pas des facteurs déterminants pour induire une activation ou une répression des gènes lors de la carence de phosphate.

L'ensemble des gènes de fonction *Synthèse des protéines* est très proche de celui des gènes *Réprimé dans les feuilles aux temps longs* (Long-1 (Feuille)) (Figure 44, rectangle vert). Nous pouvons effectivement vérifier dans le Tableau 12 que 90 % des gènes impliqués dans la synthèse des protéines sont réprimés uniquement dans les feuilles aux temps longs et ne sont pas modifiés dans les autres conditions. Enfin, la majorité des gènes *Réprimés aux temps court, moyen ou long dans les racines* (Court-1, Moyen-1, Long-1 (Racine)) (Figure 44, rectangle bleu) ne correspond pas à une catégorie fonctionnelle particulière puisqu'aucune catégorie n'apparaît proche de ces trois ensembles de gènes. De plus, comme ces ensembles de gènes sont situés dans la partie supérieure du graphique, les gènes réprimés aux temps court, moyen ou long dans les racines ne sont en général pas affectés par la carence dans les feuilles aux temps longs.

Figure 44 : Représentation graphique de l'analyse des correspondances entre les différents temps de carence en phosphate et les catégories fonctionnelles des gènes. La technique factorielle utilisée, nommée "Analyse des Correspondances" (Lebart et al., 2000), est adaptée à l'étude des grands tableaux de données dont les cellules contiennent des valeurs discrètes. Elle permet de récapituler d'une façon organisée l'information significative contenue dans les cellules d'un tableau de données, où des individus sont répartis en modalités dans différentes variables, et permet la représentation graphique des corrélations entre les modalités de ces variables.

Dans notre cas, les variables correspondent aux temps de carence de phosphate (court, moyen, long dans les racines et long dans les feuilles) et à la catégorie fonctionnelle du gène. A chaque individu, ici chaque gène dont l'expression est modifiée par la carence de phosphate, est affectée une modalité et une seule par variable. Pour la variable "catégorie fonctionnelle", la modalité correspond à la fonction (Développement, Métabolisme, Métabolisme des lipides, Phosphatases, Transporteurs de phosphate, Transporteurs d'électron, Autres transporteurs, Transcription, Synthèse des protéines, Dégradation des protéines, Signalisation, Stress, Autres ou Inconnues) et pour les variables "temps de carence", la modalité correspond à un indice d'activation ou de répression par la carence de phosphate (+1 pour un gène activé, 0 pour un gène stable et -1 pour un gène réprimé). On obtient par exemple : At3g05630, catégorie fonctionnelle "Lipides", temps de carence court "+1", temps de carence moyen "+1", temps de carence racine long "+1", temps de carence long feuilles "+1".

Chaque individu ou gène est alors positionné dans un espace multidimensionnel en fonction des valeurs de chaque variable. Les gènes sont représentés une seule fois dans cet espace multidimensionnel. L'organisation globale permet de rassembler dans un espace chaque ensemble de gènes correspondant à une modalité particulière. L'analyse effectue une projection sur un plan et recherche le plan qui permet d'obtenir la séparation la plus grande des ensembles de gènes de mêmes modalités. Les résultats de l'analyse sont donc traduits dans un graphique bidimensionnel qui permet d'évaluer des rapports de similitude/différence entre différentes modalités des variables. Les critères de séparation des différentes modalités ne sont pas définis par l'expérimentateur et la définition des 2 axes est déterminée par l'expérience. La répartition des différents ensembles de gènes dans le graphique bidimensionnel nous permet d'identifier la nature des deux axes : l'axe gauche/droite sépare les ensembles de gènes en fonction de leur activation/répression par la carence de phosphate et l'axe haut/bas en fonction de leur variabilité d'expression dans les feuilles aux temps longs.

La discrimination entre la gauche et la droite correspond à un ensemble de gènes respectivement plutôt activés ou plutôt réprimés par la carence en phosphate, la séparation entre le haut et le bas respectivement aux ensembles de gènes stables dans les feuilles aux temps longs de la carence et aux ensembles de gènes modifiés par la carence dans les feuilles aux temps longs. La position de la modalité dans le graphique correspond à la première lettre du nom des modalités. Les rectangles regroupent des variables de fortes similitudes.

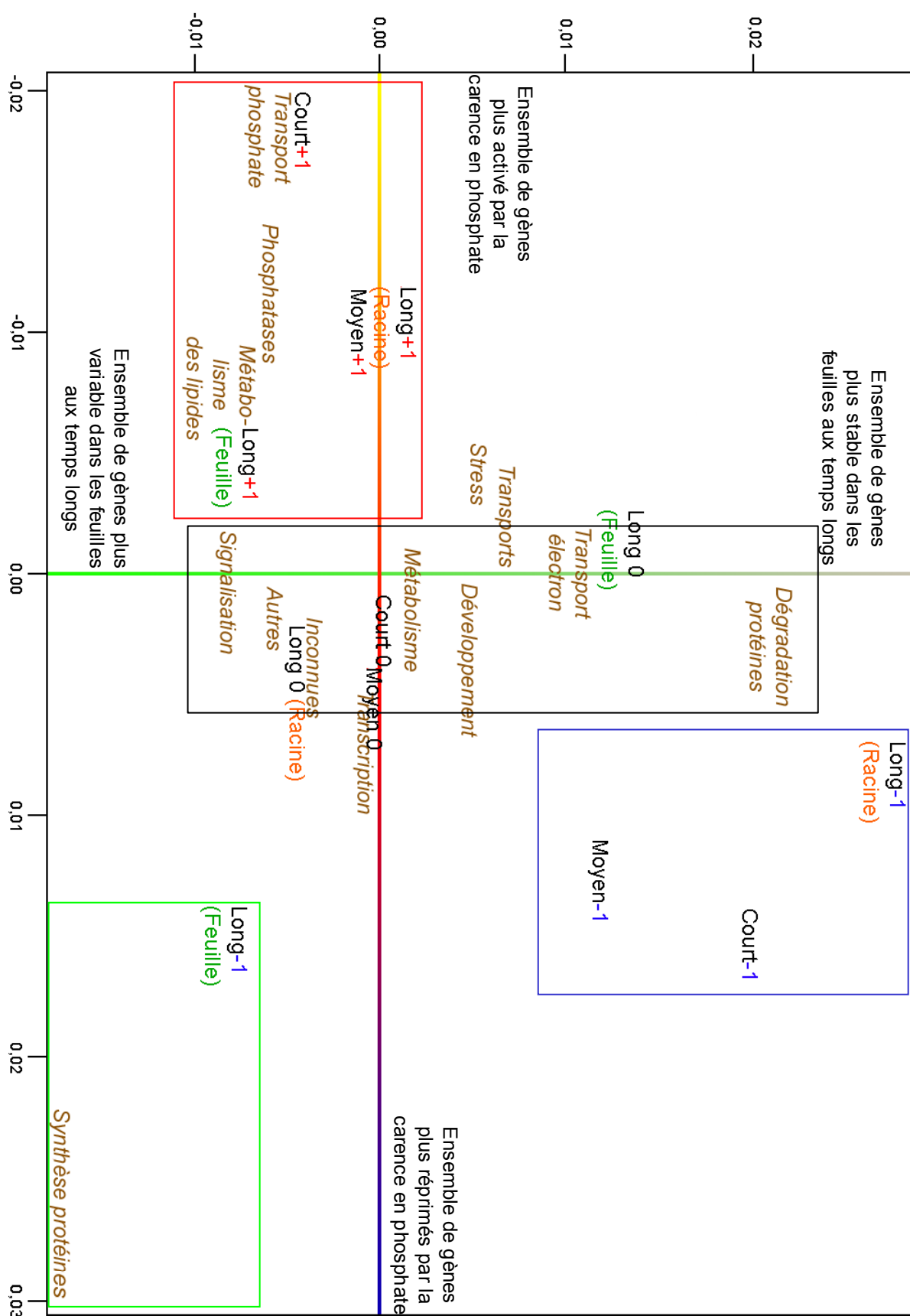


Figure 44

En résumé, cette analyse nous a permis de montrer que la carence de phosphate active à tous les temps les gènes impliqués dans l'acquisition du phosphate et le métabolisme des lipides. Toutefois, la plus grande partie des catégories fonctionnelles n'est pas déterminante pour déduire l'activation ou la répression en carence de phosphate. Le mécanisme de réponse à la carence de phosphate de la plante est par conséquent complexe, impliquant des réponses de certaines voies métaboliques en entier et de portions d'autres voies. Une étude globale comprenant tous les gènes présents sur la puce Affymetrix, et pas uniquement ceux affectés par la carence, est donc requise pour une première recherche des équilibres métaboliques maintenus ou réorientés et des équilibres rompus au cours de la carence de phosphate. Il apparaît indispensable de vérifier au cas par cas l'induction transcriptionnelle des gènes impliqués dans les principales réponses de la plante à la carence de phosphate avant d'analyser plus précisément les gènes du métabolisme des lipides.

2. Modification transcriptionnelle des gènes impliqués dans les réponses élémentaires de la plantes en carence de phosphate

a) Analyse des gènes intervenant dans l'acquisition du phosphate

En réponse à la carence, la plante sécrète des phosphatases et des ribonucléases permettant la récupération du phosphate dans le sol. Elle induit aussi d'autres phosphatases capables d'utiliser des pools intracellulaires de phosphate et enfin de nombreux transporteurs de phosphate afin de redistribuer le phosphate au sein de la plante. L'ensemble des gènes identifiés après analyse de la réponse transcriptomique par hybridation sur puce correspondant à ces fonctions est présenté dans le Tableau 14.

Certaines phosphatases et transporteurs de phosphate, dont Pht1;4, sont induits dès les temps courts de la carence de phosphate, indiquant ainsi que la carence est effective dès 12 h de croissance à 5 μ M de phosphate. Ces résultats confirment les données biochimiques déjà connues en carence de phosphate et permettent d'identifier une première liste, validée à l'échelle moléculaire, de gènes répondant à la carence chez *Arabidopsis*. Nous avons proposé de compléter cette base moléculaire en retrouvant les gènes induits qui participent à l'adaptation du métabolisme intracellulaire décrit précédemment (Données Bibliographique, III-C-2-.b).

Locus Arabidopsis	Protéine	Fonction potentielle	Rapport d'expression carencé/témoin				TM	Localisation
			Temps court	Temps moyen	Feuilles 10 jours	Racines 10 jours		
Phosphatases								
At2g02990	PAP1	Ribonucléase 1	2,7	11,1	38,2	3,9	1	S
At1g13750	PAP5	Phosphatase acide pourpre	3,2	5,3	17,2	4,4	0	S
At1g52940	PAP7	Phosphatase acide pourpre			146,5		0	-
At2g01880	PAP10	Phosphatase acide pourpre				5,0	1	S
At2g16430	PAP12	Phosphatase acide pourpre			3,6		0	M
At2g27190	PAP14	Phosphatase acide pourpre	2,5	3,6	6,2	4,6	1	S
At2g46880	PAP17	Phosphatase acide pourpre	7,6	44,0	43,1		1	S
At3g17790	PAP22	Phosphatase acide pourpre	5,5	5,6	8,3	13,6	1	S
At3g52820	PAP23	Phosphatase acide pourpre			27,7	12,0	0	S
At4g13700	PAP24	Phosphatase acide pourpre		7,4	16,5	9,8	0	S
At4g24890	PAP25	Phosphatase acide pourpre	3,4	9,2	31,0	2,4	0	S
At4g36350		Phosphatase acide pourpre		4,2	48,3		1	S
At2g46860		Pyrophosphatase			12,1		0	-
At3g53620		Pyrophosphatase	2,4	4,2	8,1	2,6	0	-
At4g01480		Pyrophosphatase		3,3	5,9		0	-
At4g29690		Nucléotide pyrophosphatase		3,2			1	S
At3g02870		Inositol phosphatase	2,6	2,5	5,7	5,0	0	-
At5g64000		Inositol phosphatase	4,1	6,9	24,5	4,0	0	-
At1g35910		Tréhalose phosphatase				3,7	0	P
At1g05000		Protéine phosphatase		3,4	5,0	3,3	0	-
At3g62260		Protéine phosphatase			3,3		0	P
At4g03960		Protéine phosphatase	2,7	3,6	7,7	7,3	0	-
At4g11800		Protéine phosphatase			6,1	2,6	9	-
At4g23000		Protéine phosphatase		3,2	4,1	3,4	10	-
At4g26080		Protéine phosphatase			2,8		0	-
At5g10740		Protéine phosphatase			2,9		0	-
Transporteurs de phosphate								
At5g43370	Pht1;2	Transporteur de phosphate		2,4	4,8	3,4	11	S (MP)
At5g43360	Pht1;3	Transporteur de phosphate				5,8	11	- (MP)
At2g38940	Pht1;4	Transporteur de phosphate	2,5	10,5	34,0	21,7	11	- (MP)
At2g32830	Pht1;5	Transporteur de phosphate		9,7	25,9	15,7	10	- (MP)
At1g20860	Pht1;8	Transporteur de phosphate			6,1	8,4	12	- (MP)
At1g76430	Pht1;9	Transporteur de phosphate		4,3	15,5	5,4	4	- (MP)
At3g48850	Pht3;2	Transporteur de phosphate mitochondrial		4,1	17,2	3,5	2	M (M)
At5g54800	GPT1	Antiport glucose-6-P/phosphate			2,8		8	P (P)
At1g61800	GPT2	Antiport glucose-6-P/phosphate			46,4	2,8	7	P (P)

Tableau 14 : Gènes des phosphatases et transporteurs de phosphate activés en carence de phosphate. Les gènes du tableau correspondent aux gènes induits qui participent à l'adaptation du métabolisme intracellulaire décrit précédemment (Données Bibliographique, III-C-2-.b). Les rapports d'expression correspondent aux rapports des niveaux d'expression des gènes de trois manipulations indépendantes pour chaque temps et chaque condition. Les temps courts correspondent aux temps 3, 6 et 12 h de carence rassemblés et les temps moyens à 1 et 2 j rassemblés. La localisation des protéines déterminée par Target P (Emanuelson *et al.*, 2000) est indiquée par la lettre P pour les plastes, S pour un transit peptide et M pour les mitochondries. Le détail des localisations obtenues à partir de données biochimiques est reporté dans le tableau entre parenthèse avec les mêmes abréviations et MP pour membrane plasmique. TM : nombre de domaines transmembranaires.

b) Identification de gènes intervenant dans le métabolisme intracellulaire

Nous avons observé que la carence de phosphate modifiait la glycolyse, permettant entre autre d'utiliser préférentiellement le pyrophosphate plutôt que le phosphate, l'ADP et l'ATP (Données Bibliographiques, III-,C-,2.,b, p53, Figure 21). Nous avons par conséquent

complété le schéma de Hammond *et al.* (2004) (Tableau 15) et identifié certaines protéines induites par la carence de phosphate dans cette voie métabolique.

Locus Arabidopsis	Enzymes	Réaction du schéma	Rapport d'expression carencé/témoin			
			Temps courts	Temps moyens	Feuilles 10 jours	Racines 10 jours
At5g56630	PPi-PFK	Réaction 10 ?			6,1	
At4g34200	G3PDH (NADP dépendante ?)	Réaction 13 ?			3,5	
At1g09780	Phosphoglycérate mutase	3-PGA → 2-PGA (→PEP)			2,2	
At5g63680	Pyruvate kinase	Réaction 14		2,7	4,0	3,0
At1g53310	PEP carboxylase	Réaction 16		2,1		
At2g42600	PEP carboxylase	Réaction 16			2,8	3,0
At3g14940	PEP carboxylase	Réaction 16		2,3	3,1	
At1g08650	PEP carboxylase kinase 1	Active la réaction 16	2,7	6,8	24,5	5,8
At3g04530	PEP carboxylase kinase 2	Active la réaction 16		3,9	10,6	2,4
At1g22410	DAHP synthase	Réaction 19			3,0	
At4g05020	NADH déshydrogénase	Réaction 25			2,9	

Tableau 15 : Gènes activés par la carence de phosphate impliqués dans les voies métaboliques alternatives de la glycolyse décrites dans Hammond *et al.* (2004). Les numéros des réactions correspondent à ceux des réactions de la Données Bibliographiques, III-C-2.,b, p53, Figure 21. Les rapports d'expression correspondent aux rapports des niveaux d'expression des gènes de trois manipulations indépendantes pour chaque temps et chaque condition. Les temps courts correspondent aux temps 3, 6 et 12 h de carence rassemblés et les temps moyens à 1 et 2 j rassemblés. PPi-PFK : phosphofruktokinase (pyrophosphate dépendante), G3PDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

La glycolyse est altérée majoritairement à partir des temps moyens, excepté pour la réaction 16 (Figure 21) qui est touchée dès les temps courts, et modifiée aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Ces résultats confirment les données déjà décrites (Misson, 2004) et surtout permettent l'identification de gènes impliqués dans ces réactions chez *Arabidopsis*. Par exemple, la phosphofruktokinase pyrophosphate dépendante, At5g56630, n'avait jamais été décrite auparavant dans cette plante.

Une autre voie métabolique fortement activée en carence de phosphate est celle de la synthèse des anthocyanes. Nous avons identifié les gènes appartenant à cette voie dans les données de l'analyse transcriptomique et observé qu'ils étaient activés uniquement dans les feuilles aux temps longs. Bien qu'il existe plusieurs isoformes pour chaque étape de la voie de biosynthèse, un seul gène est surexprimé, d'un facteur 3 à 6. Nous pouvons ainsi reconstituer la voie de synthèse des anthocyanes activée en carence de phosphate chez *Arabidopsis* (Figure 45). Dans le schéma de la Figure 45, la réaction 19 de la Figure 21, permettant la synthèse du chorismate, n'est pas indiquée mais son gène est aussi surexprimé dans les feuilles à 10 jours de carence.

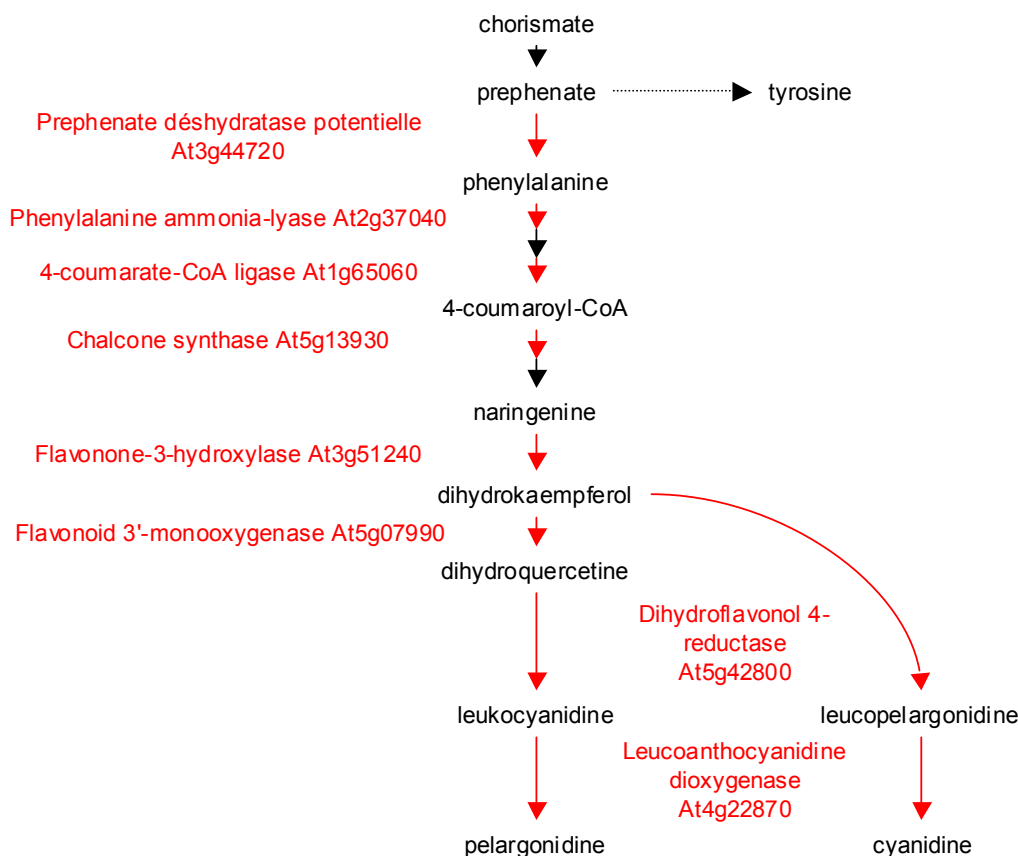


Figure 45 : Voie de biosynthèse des anthocyanes. Les enzymes et les flèches en rouge correspondent aux gènes surexprimés uniquement dans des feuilles carencées depuis 10 jours.

Les résultats de l'analyse transcriptomique nous ont ainsi permis de confirmer et de compléter les données pré-existantes sur le métabolisme des plantes en carence de phosphate. De nombreuses voies métaboliques différentes de la glycolyse et de la synthèse des anthocyanes sont affectées par la carence. En effet, les gènes des protéines impliquées dans les transports de nitrate, sulfate, potassium et sodium, sont affectés par les carences en phosphate à moyen et long termes et l'expression des gènes des des protéines intervenant dans la synthèse de la paroi pectocellulosique est activée, indiquant un remodelage possible de la paroi.

L'analyse transcriptomique résumée dans ce mémoire donne une vision globale des cibles de la carence de phosphate chez *Arabidopsis* et montre que la réponse de la plante est complexe, car elle implique de nombreuses voies métaboliques, telles que la glycolyse, la synthèse des anthocyanes et le métabolisme des lipides. A partir des données de l'analyse transcriptomique, nous nous sommes concentrés plus précisément sur le métabolisme des lipides afin d'identifier des gènes candidats permettant de compléter le schéma métabolique décrit dans les chapitres précédents.

C- Sélection des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des lipides

Nous avons recherché parmi les gènes activés en carence de phosphate ceux qui interviennent dans la synthèse des galactolipides et dans le métabolisme des phospholipides puis tous les gènes pouvant éventuellement intervenir dans un transfert de lipides (Tableau 16).

Les gènes correspondant à des enzymes impliquées dans l'utilisation du DAG pour synthétiser des glycolipides sont activés fortement dès le temps court de la carence. Le niveau de SQDG dans les feuilles augmente d'un facteur 4 (Figure 42) ce qui est cohérent avec une activation précoce et importante de SQD1 et SQD2. Les gènes codant pour les MGDG synthèses de type B sont induits d'un facteur 4 à 10 dès le temps court alors que l'expression de *dgd1* et *dgd2* n'est stimulée qu'aux temps longs dans les feuilles et dans les racines. De plus, au temps moyen, une UDP-galactose épimérase (*At4g10960*), qui convertit l'UDP-glucose en UDP-galactose, est induite. Cette activation facilite certainement la production en amont de galactose nécessaire à la synthèse du MGDG et du DGDG.

Pour le métabolisme des phospholipides, la réponse est plus complexe (Tableau 16). Deux gènes, *nmt3* et *plc5*, sont réprimés, et huit sont activés. Les gènes activés semblent impliqués dans le remaniement des têtes polaires. Ce résultat soutient le rôle d'intermédiaire de la PC que nous avons décrit : la phosphoéthanolamine N-méthyltransférase et la CTP:phosphocholine cytidylyltransférase interviennent dans la synthèse de la PC, les phospholipases interviennent dans la production de DAG et les glycérophosphocholine phosphodiesterases dans la dégradation de la phosphocholine. Ces deux dernières enzymes ont été précédemment étudiées dans le laboratoire et localisées l'une dans la paroi, l'autre dans la vacuole (van der Rest, 2002). De plus, la répression et l'activation simultanée de deux phosphoéthanolamine N-méthyltransférases semblent indiquer que des voies et peut-être des localisations particulières de synthèses sont affectées différemment par la carence de phosphate. L'activation au temps court caractérise les voies métaboliques très sensibles à la carence de phosphate. Or, nous avons remarqué que, parmi les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, seulement cinq étaient activés dans les temps courts. Quatre sont bien connus pour cette réponse puisqu'il s'agit de *sqd1*, *sqd2*, *mgd2* et *mgd3*. Le cinquième correspond à une phospholipase D qui n'a pas été étudiée à notre connaissance, bien que son homologue la plus proche PLD ζ 1 l'ait été (Qin et Wang, 2002 ; Ohashi *et al.*, 2003). Nous avons orienté la suite de notre étude sur cette protéine.

Locus Arabidopsis	Protéine	Fonction potentielle	Rapport d'expression carencé/témoin				TM	Localisation
			Temps court	Temps moyen	Feuilles 10 jours	Racines 10 jours		
Synthèse glycolipides								
At4g33030	SQD1	UDP-sulfoquinovose synthase	2,6	3,0	4,4	8,0	0	(P)
At5g01220	SQD2	sulfolipide synthase	5,0	15,8	14,6	13,0	0	(P)
At5g20410	MGD2	MGDG synthase	10,3	14,3	24,8	8,3	0	(P)
At2g11810	MGD3	MGDG synthase	7,0	26,0	55,7	49,9	0	(P)
At3g11670	DGD1	DGDG synthase			3,6		0	(P)
At4g00550	DGD2	DGDG synthase				3,6	0	(P)
Métabolisme des phospholipides								
At3g18000	NMT1	Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase		2,2	3,7		0	-
At1g73600	NMT3	Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase		0,26	0,089	0,17	0	-
At2g32260		CTP:phosphocholine cytidyltransférase			2,7		0	-
At4g38690	PLC5	Phospholipase C PI-spécifique			0,413		0	-
At3g08510	PLC2	Phospholipase C PI-spécifique		2,5	2,8	2,8	0	M
At3g47220		Phospholipase C PI-spécifique				2,5	0	M
At3g03540	NPC5	Phospholipase C non spécifique		10,3	241,6	18,0	0	-
At3g05630	PLD ζ 2	Phospholipase D ζ	9,7	21,6	54,1	20,7	0	-
At5g08030		Glycérophosphocholine phosphodiesterase		12,4	156,1		0	(paroi)
At1g74210		Glycérophosphocholine phosphodiesterase		2,8	6,7		0	(vac)
Intervention potentielle dans le transport des lipides								
At3g49350		Rab GTPase			3,7		0	P
At4g35750		Facteur activateur de Rho GTPase	2,3	2,7	2,4		0	-
At5g09470		Transporteur de la membrane interne mitochondriale	5,9	6,7	8,6		3	-
At5g06530		Transporteur ABC			3,9		5	-
At3g59140		Transporteur ABC			5,6		12	-
At3g53480		Transporteur ABC			3,4		11	-
At3g52310		Transporteur ABC			4,0		5	P
At3g13100		Transporteur ABC		3,3	3,8		15	S
At2g47000		Transporteur ABC			3,9		9	-
At5g59310	LTP4	Protéine de transfert de lipides type 1				17,4	1	S
At5g01870	LTP10	Protéine de transfert de lipides type 1			3,1		0	S
At4g33550		Protéine de transfert de lipides type 3			5,4		0	S
At3g53980		Protéine de transfert de lipides type 4			4,3		0	S
At3g22570		Protéine de transfert de lipides type 5		2,2			0	S
At3g22600		Protéine de transfert de lipides type 5			7,0		0	S
At3g58550		Protéine de transfert de lipides type 7			3,2		0	S
At3g25610		ATPase, transporteur potentiel de phospholipides		2,4			8	M
At5g44240		ATPase, transporteur potentiel de phospholipides			4,2		8	-

Tableau 16 : Gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et activés en carence de phosphate. Les rapports d'expression correspondent aux rapports des niveaux d'expression des gènes de trois manipulations indépendantes pour chaque temps et chaque condition. Les temps courts correspondent aux temps 3, 6 et 12 h de carence rassemblés et les temps moyens à 1 et 2 j rassemblés. La localisation des protéines déterminée par Target P (Emanuelson *et al.*, 2000) est indiquée par la lettre P pour les plastes, S pour un transit peptide et M pour les mitochondries. Les détails des localisations obtenues à partir de données biochimiques sont reportées dans le tableau entre parenthèse avec les mêmes abréviations et vac pour la vacuole. TM : nombre de domaines transmembranaires.

Le remaniement lipidique implique plusieurs étapes de transfert dont les gènes restent à identifier. Nous avons sélectionné plusieurs gènes, activés en carence de phosphate, qui pourraient éventuellement intervenir dans le transfert de lipides (Tableau 16). Les deux premiers gènes de cette catégorie du Tableau 16 ont un lien avec les petites GTPases ; peut-être favorisent-ils un transfert vésiculaire de lipides (voir Données bibliographiques, II-C-). Le gène At5g09470 est un homologue d'un transporteur mitochondrial sans fonctionnalité vraiment déterminée, induit dès le temps court de la carence. Il représente donc un candidat important à analyser dans l'avenir. La classe des transporteurs ABC possède des membres impliqués dans des transferts de lipides. Six transporteurs ABC sont activés en carence de phosphate dont un localisé *in silico* dans les plastes. Dans des travaux futurs, il sera donc important d'étudier ces protéines et d'établir leur rôle possible dans les trafics lipidiques.

Pour ce qui est des protéines de transfert de lipides (famille LTP), toutes celles qui sont activées en carence de phosphate possèdent un peptide de sécrétion. Leur induction est donc vraisemblablement liée au remaniement de la paroi que nous avons déjà évoqué. Les deux dernières protéines du Tableau 16 sont des ATPases homologues à des transporteurs de phospholipides et sont à ce titre très intéressantes. De plus, le gène At3g25610 est induit à partir du temps moyen et la protéine correspondante est localisée *in silico* dans les mitochondries. Nous avons débuté une étude d'un mutant knock-out de ce gène. A ce jour, nous n'avons pas réussi à obtenir de mutant homozygote déficient pour ce gène. Il est possible qu'une mutation nulle soit létale. De nouvelles approches, en particulier d'ARN interférence, seront donc à tenter dans le futur.

L'analyse des données moléculaires nous permet d'avoir une première vision globale des cibles transcriptionnelles de la carence de phosphate dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Toutes ces données sont précieuses pour aider aux recherches futures, selon des stratégies de type "gène-candidat" et de génétique inverse. Le groupement des gènes par fonction a permis d'étudier quelques stratégies de la plante pour se développer au mieux dans un milieu limitant. Il en ressort des mécanismes étroitement liés au métabolisme et au transport du phosphate, pour remobiliser le phosphate, et à la modulation de voies métaboliques complexes, pour réduire la consommation de phosphate. Dans le contexte de la remobilisation du phosphate, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Nous avons sélectionné les gènes qui nous paraissaient les plus intéressants pour compléter notre schéma bilan présenté au chapitre II. Finalement, nous avons choisi d'étudier une PLD fortement exprimée dans toutes les

conditions de carence, notamment au temps court. Cette étude débute par l'analyse d'un mutant knock-out pour la PLD ζ 2.

II. Etude d'un mutant nul du gène *pld ζ 2*

La PLD ζ 2 est localisée sur le chromosome 3 au locus At3g05630. Nous avons identifié un mutant homozygote knock-out de la collection du Salk Institute (USA) puis nous avons analysé sa teneur en phosphate et sa composition en lipides en fonction de la teneur en phosphate du milieu de croissance. Tous les résultats décrits dans cette partie sont préliminaires et nécessitent des analyses supplémentaires.

A- Caractérisation de la PLD ζ 2 et identification d'un mutant knock-out

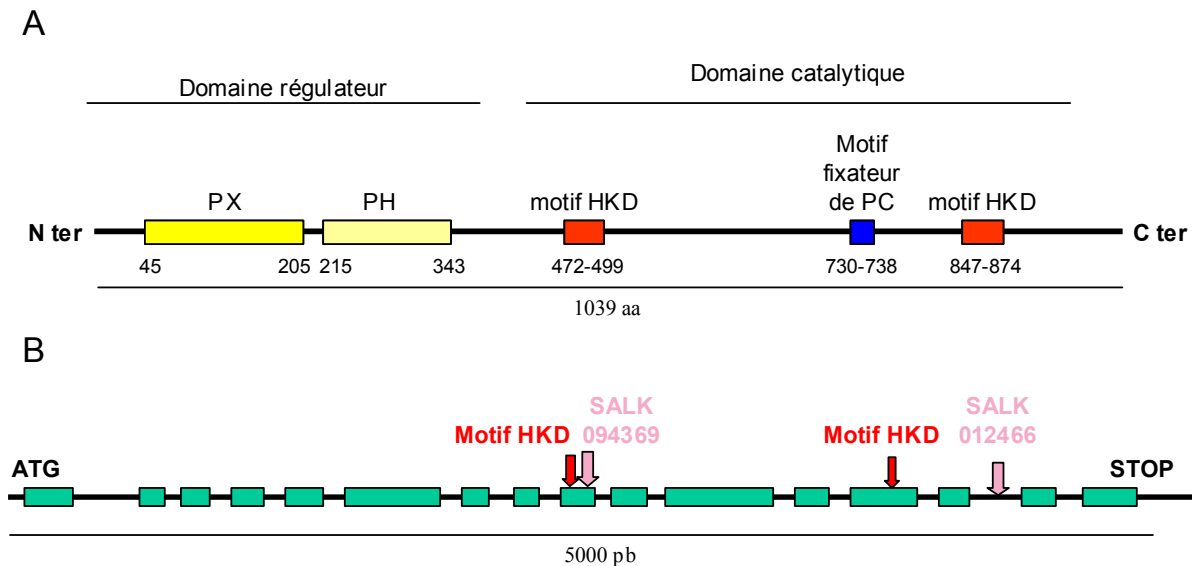


Figure 46 : Protéine et ADN génomique de *pld ζ 2*. A- Répartition des motifs dans la séquence protéique de PLD ζ 2. B- ADN génomique du locus At3g05630. Les introns sont représentés par un trait noir et les exons par des rectangles verts. La position des motifs HKD est indiquée par des flèches rouges ainsi que celle des deux insertions d'ADN-T disponible dans la collection du Salk Institute. Nous avons étudié préférentiellement le mutant 094369 car l'insertion est présente entre les deux motifs HKD. aa : acides aminés ; pb : paires de bases.

La séquence codant pour la PLD ζ 2 n'a été identifiée pour l'instant que par homologie avec PLD ζ 1. La famille des PLD ζ , contenant PLD ζ 1 et PLD ζ 2, est caractérisée par deux domaines catalytiques HKD, caractéristiques des phospholipases D, et par la présence des domaines PX et PH et l'absence du domaine C2, caractéristiques de la famille ζ (Qin et Wang, 2002) (Figure 46). PLD ζ 2 est une protéine de 1039 acides aminés (soit 117 kDa), ne possédant pas de domaines transmembranaires prédits ni d'adressage connu. Cependant, une analyse protéomique a permis de détecter cette protéine dans le tonoplaste (Szponarski *et al.*,

2004) bien qu'au laboratoire, elle n'ait pas été trouvée dans le protéome de la vacuole (Bourguignon, communication personnelle).

Deux positions d'insertion de l'ADN-T existent dans la collection du Salk Institute (les mutants référencés 012466 et 094369). Etant donné la position des insertions dans les deux mutants, nous avons choisi de travailler d'abord sur le mutant 094369. En effet, cette insertion est située entre les deux motifs catalytiques de la PLD et supprime probablement son activité. Nous avons mis en culture les graines de ce mutant, criblé par PCR sur ADN génomique extrait de fragments de plantules, et isolé une lignée (lignée n°1) homozygotes pour *pldζ2*, présentant l'insertion (Figure 47). Pour l'ensemble des analyses suivantes, nous avons utilisé cette lignée n°1. Par convention, nous désignons ces plantes *pldζ2*, par opposition aux plantes sauvages.

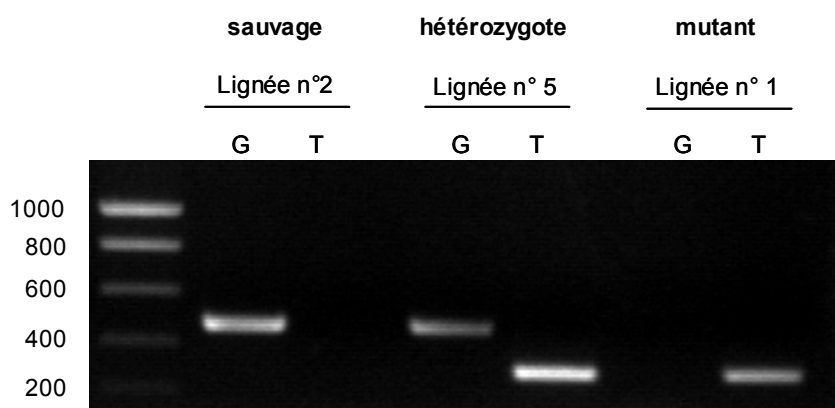


Figure 47 : Analyse par PCR de lignées issues d'une mutagenèse par insertion au niveau du gène *pldζ2* (Salk Institute). L'amplification G correspond à la présence du gène sauvage intact et l'amplification T à la présence de l'ADN-T dans le gène *pldζ2*. Dans cette analyse, la lignée 2 est sauvage (présence uniquement du gène sauvage), la lignée 5 est hétérozygote (présence du gène sauvage et de l'ADN-T) et lignée 1 est homozygote pour *pldζ2* (absence du gène sauvage et présence de l'ADN-T).

Le mutant homozygote isolé a ensuite été soumis à une série d'expérimentations afin de déterminer le rôle éventuel de la phospholipase D $\zeta 2$ en carence de phosphate. Nous avons analysé le phénotype général, la teneur en phosphate de la plante, et la composition en lipides de ces mutants à différentes concentrations de phosphate

B- Etude du rôle possible de la PLD $\zeta 2$

1. Analyse du phénotype et de la teneur en phosphate de *pldζ2*

La lignée homozygote a été facile à identifier car lors du premier semis sur terreau des graines fournies par le Salk Institute, elle présentait un phénotype de plante carencée en

phosphate. (Figure 48). Ce phénotype a été supprimé par addition d'engrais dans l'eau d'arrosage.

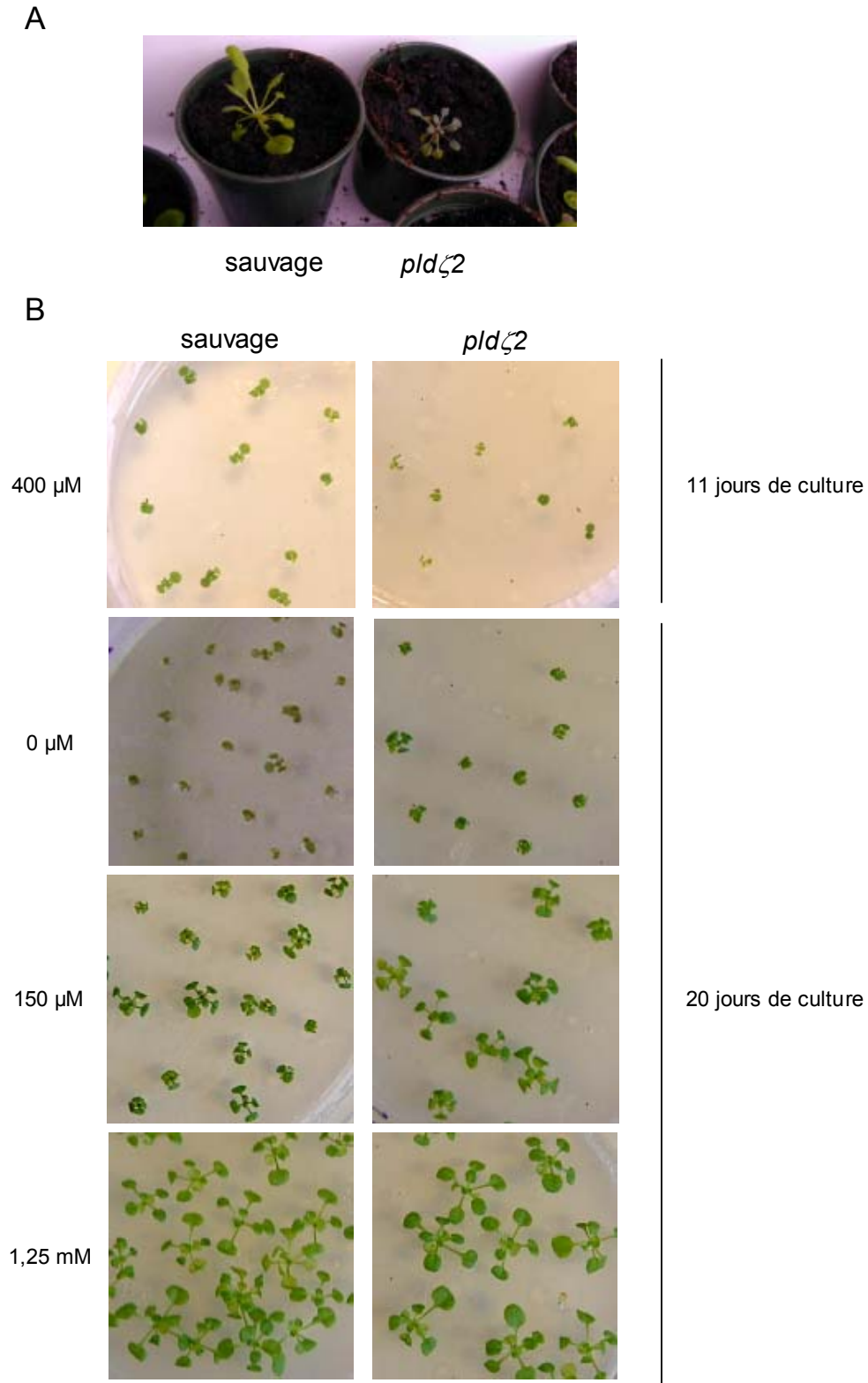


Figure 48 : Phénotype du mutant *pld ζ 2* sur terreau et sur MS, complétementé avec du saccharose, avec différentes concentrations de phosphate. A- Culture sur terreau de plants âgés d'un mois. B- Culture sur milieu MS complétementé en saccharose. Pour les concentrations 1,25 mM, 150 μ M et 0 μ M, les plantes sont âgées de 20 jours ; pour 400 μ M de 11 jours.

Cependant, sur des milieux de culture contenant différentes concentrations de phosphate, nous avons pu observer à nouveau ce phénotype distinct des lignées sauvages uniquement en présence de concentrations moyennes en phosphate (400 μM) et pour une durée de croissance moyenne. En effet, à 18 jours, la différence entre les plants sauvages et mutés, observée sur des cultures de 11 jours n'est plus visible. Pour évaluer si les plantes pouvaient être néanmoins limitées dans leur disponibilité en phosphate, nous avons dosé la concentration de phosphate intracellulaire (Figure 49).

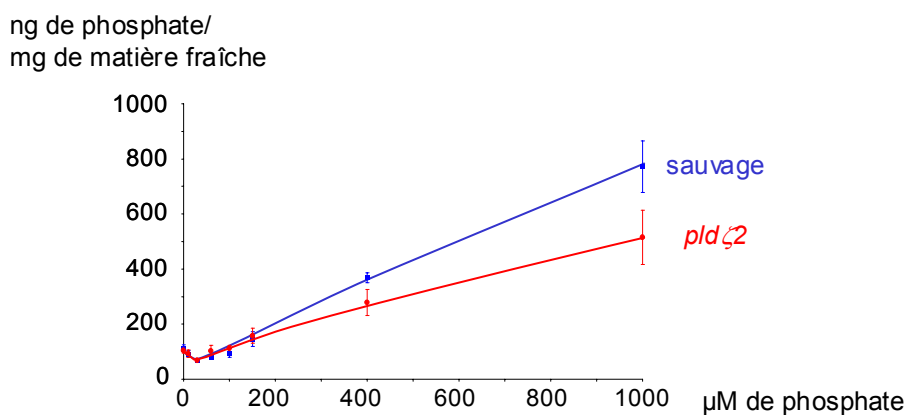


Figure 49 : Teneur en phosphate intracellulaire des feuilles de plantes sauvages et *pld ζ 2* cultivées pendant 25 jours sur boîtes de Pétri à différentes concentrations de phosphate. Pour chaque concentration de phosphate, au moins 16 valeurs expérimentales ont été obtenues pour des feuilles prélevées sur des plantes sauvages et *pld ζ 2*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types obtenus à partir des différentes expériences.

Les analyses ont été effectuées à partir des feuilles car nous pensons que la quantité de phosphate inorganique présent dans les cellules varie suivant l'organe observé. Or, la carence de phosphate affecte la proportion racine/feuille de la plante, puisque la croissance racinaire est stimulée et le développement foliaire inhibé. Pour limiter les variations de teneur en phosphate dues aux variations morphologiques de la plante, les analyses ont été effectuées uniquement sur les parties aériennes.

Nous constatons qu'aux concentrations inférieures à 200 μM de phosphate dans le milieu de croissance, aucune différence n'est visible entre les deux types de plantes. Le phosphate est trop limitant, la teneur intracellulaire est très faible et les plantes ont un phénotype carencé. En revanche, au-delà de 200 μM de phosphate, la teneur en phosphate est plus faible chez les mutants que chez les sauvages. Cette diminution de la teneur en phosphate intracellulaire limite la disponibilité en phosphate de la plante et maintient, à des concentrations en phosphate intermédiaires, le phénotype carencé des plants mutants par rapport aux plants sauvages.

Ces expériences indiquent que PLD ζ 2 joue un rôle dans le maintien de la teneur en phosphate des cellules. En intervenant dans la dégradation des têtes polaires des phospholipides, l'enzyme pourrait libérer du phosphate dans la cellule et intervenir dans le contrôle du pool de phosphate inorganique intracellulaire. Son absence serait donc une cause de diminution de la teneur intracellulaire en phosphate.

Ce résultat est surprenant car dans l'analyse transcriptomique, l'ARN messenger de *pld ζ 2* n'est pas détectable dans les plantes cultivées avec des quantités suffisantes en phosphate. Au vu des résultats, nous pouvons conclure que PLD ζ 2 est présente même dans des plantes non carencées en phosphate et que cette protéine doit avoir un taux de renouvellement faible. Il sera important dans l'avenir de quantifier le taux d'ARN messenger cellulaire présent dans ces conditions.

De plus, il sera important de déterminer la quantité et la localisation de la protéine dans ces mêmes conditions. En condition standard de culture, la vacuole contient entre 85 et 95 % du phosphate inorganique intracellulaire (Rausch et Bucher, 2002). Si la PLD ζ 2 est bien localisée dans le tonoplaste (Szponarski *et al.*, 2004), elle régule peut-être le stockage du phosphate dans la vacuole, par exemple en activant un transporteur de phosphate du tonoplaste par la formation d'AP. D'autre part, la PLD ζ 2 comporte des domaines de reconnaissance du PIP2 et le PIP2 est potentiellement important pour l'ancrage de la protéine à la membrane et pour les mécanismes de transferts vésiculaires à la membrane plasmique. La présence de ces domaines peut suggérer que PLD ζ 2 est localisée dans la membrane plasmique. Dans ce cas, PLD ζ 2 pourrait réguler directement l'import de phosphate dans la cellule.

De manière inattendue, un rôle de régulateur de la teneur en phosphate inorganique intracellulaire pour PLD ζ 2 en condition standard de culture est proposé. Nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait jouer PLD ζ 2 en carence de phosphate en comparant les compositions en lipides de plantes sauvages et mutées à différentes concentrations en phosphate.

2. Analyse de lipides du mutant *pld ζ 2*

Comme pour les analyses de la teneur en phosphate, nous avons réalisé nos mesures uniquement sur les parties aériennes de plantes âgées de 25 jours. En effet, les racines n'ont pas la même composition lipidique que les feuilles. Pour s'affranchir de l'enrichissement des plantes en racines par rapport aux feuilles lors de la carence, nous avons restreint notre étude

aux feuilles. Trois concentrations de phosphate ont été analysées correspondant à une condition standard (1 mM), une condition carencée (10 μ M) et une condition intermédiaire (100 μ M) (Figure 50).

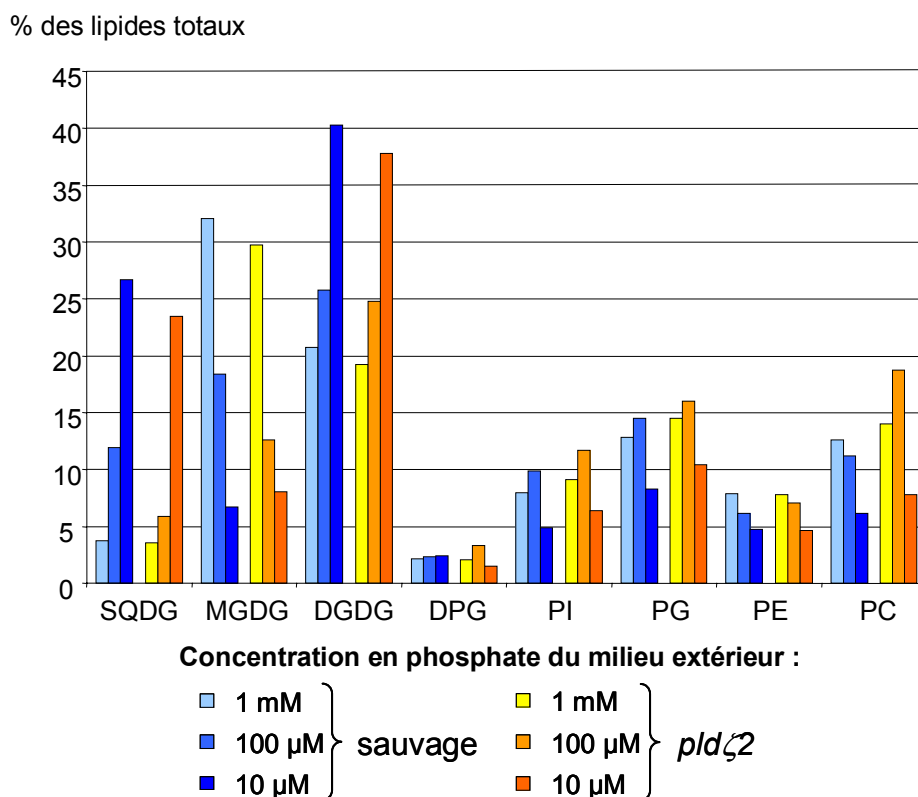


Figure 50 : Analyse de lipides de feuilles issues de plantes sauvages et *pld* ζ 2 à différentes concentrations en phosphate. La composition en lipide est exprimée en fonction du pourcentage de lipides totaux.

Si nous comparons les plants mutés et sauvages en condition de culture standard, nous constatons qu'il y a peu de différence dans la composition en lipides exceptée une teneur un peu plus faible en MGDG et DGDG chez *pld* ζ 2 accompagnée d'une teneur en PI, PG et PC légèrement plus importante. De même, en carence de phosphate, la teneur en PI, PG et PC diminue moins que dans le témoin et l'augmentation du DGDG et du SQDG est plus faible. Il semble donc que la suppression de PLD ζ 2 induirait une légère augmentation de la teneur en phospholipides, compensée par une plus faible teneur en glycolipides.

En revanche, pour une concentration intermédiaire en phosphate, la teneur en PC est plus forte dans le mutant. Elle est de 19 % dans les feuilles de plants mutés contre une valeur de 11 % dans les feuilles des plants sauvages. De plus, la teneur en SQDG est beaucoup plus faible que dans les témoins (6 % au lieu de 12 %). La teneur en DGDG est similaire chez le sauvage et *pld* ζ 2 (environ 25 %), ce qui confirme que l'augmentation en DGDG ne sert pas uniquement au remplacement de la PC. L'augmentation de la quantité de DGDG est accompagnée d'une diminution du MGDG (13 % au lieu de 18 %) dans le mutant. Cette

baisse confirme le rôle central du MGDG et l'importance fondamentale des MGDG synthèses. En effet, les DGDG synthèses sont constamment présentes dans la plante et leur expression est faiblement induite en carence de phosphate en comparaison de l'expression de *mgd2* et *mgd3*. Elles ne sont donc pas limitantes pour la synthèse du DGDG. De même, la synthèse de l'UDP-gal est activée ; la synthèse du DGDG dépend donc essentiellement de la quantité de MGDG. Or, comme la dégradation des phospholipides est limitée dans le mutant *pldζ2*, la production de DAG est plus faible et la synthèse du MGDG est diminuée.

Par homologie avec PLDζ1, nous supposons que PLDζ2 a pour substrat la PC. Ainsi, PLDζ2 serait un maillon manquant qui servirait à dégrader la PC pour approvisionner les MGDG synthèses en DAG eucaryote. Cependant, elle n'est pas le seul facteur à intervenir à cette étape. En effet, la composition en acide gras des différents lipides des plants mutés n'est pas différente de celle des témoins, quelle que soit la concentration en phosphate du milieu extérieur. Si l'approvisionnement en DAG eucaryote des galactolipides ne dépendait que de PLDζ2, le MGDG du mutant serait alors fortement enrichi en C16:3 ; ce qui n'est pas le cas. Il existe donc vraisemblablement d'autres protéines impliquées dans ce remaniement.

L'analyse du mutant *pldζ2* nous livre des informations précieuses sur le rôle de PLDζ2 dans la plante. La PLDζ2 est impliquée dans le stockage du phosphate inorganique et dans la dégradation de la PC nécessaire à la synthèse de DGDG. Son absence réduit la teneur en phosphate intracellulaire, visible sous certaines conditions à l'échelle du développement de la plante. De plus, l'absence de PLDζ2 limite la mise en place des remaniements lipidiques observés en carence de phosphate.

Il est maintenant important de confirmer les données que nous avons obtenues dans ce travail préliminaire soit par l'étude du deuxième mutant du Salk Institute (012466), soit par utilisation du mutant complémenté avec le gène *pldζ2*.

III. Discussion

L'analyse transcriptomique de la réponse à la carence de phosphate d'*Arabidopsis thaliana* a montré que le métabolisme des lipides, les transports de phosphate et les phosphatases étaient activés fortement et dès les temps courts de la carence. Nous avons repéré des gènes intervenant dans les trois parties du schéma du métabolisme des lipides (Figure 51). Les gènes intervenant dans la synthèse des glycolipides sont déjà connus et leur induction en carence de phosphate est confirmée par l'analyse transcriptomique.

Seulement cinq gènes du métabolisme des lipides sont activés dans les temps courts. Il s'agit de *sqd1*, *sqd2*, *mgd2*, *mgd3* et *pldζ2*. Nous nous sommes donc intéressés à *pldζ2* qui est le seul gène inconnu de cette liste. PLDζ2 est homologue à PLDζ1, une phospholipase D spécifique de la PC impliquée dans l'élongation des poils racinaires (Ohashi *et al.*, 2003). Quand nous avons étudié le mutant *pldζ2*, nous n'avons pas vu de différence de structure racinaire avec la plante sauvage (Thibaud, communication personnelle), indiquant ainsi que *pldζ2* joue un rôle différent de *pldζ1*. De manière surprenante, bien que l'expression de *pldζ2* soit très faible en condition standard de culture, l'absence de PLDζ2 induit une diminution de la teneur intracellulaire de phosphate inorganique conduisant la plante à une hypersensibilité au manque de phosphate.

La PLDζ2 joue un double rôle. En présence de phosphate dans le milieu, la PLDζ2, vraisemblablement peu abondante, pourrait être localisée dans le tonoplaste (Szponarski *et al.*, 2004) ou dans la membrane plasmique du fait de la présence d'un domaine de reconnaissance du PIP2. Dans ces membranes, l'AP produit par PLDζ2 pourrait activer le stockage ou l'import du phosphate. En carence de phosphate, la PLDζ2 est surexprimée, la production d'AP est plus importante mais l'AP ne joue sans doute plus un rôle dans le stockage ou l'import de phosphate puisque le phosphate est limitant. Dans ce cas, l'AP serait essentiellement utilisé pour fournir du DAG pour la synthèse du DGDG et régénérer un peu de phosphate à partir des phospholipides. Dans le mutant *pldζ2*, l'approvisionnement en DAG est plus faible. Le DGDG est quand même formé mais la teneur en MGDG diminue par rapport à la plante sauvage, lorsque la carence de phosphate est modérée. La PLDζ2 serait vraisemblablement l'enzyme impliquée dans la réponse précoce à la carence de phosphate, à la fois pour les temps courts et pour une carence légère. La question se pose de savoir si, en carence de phosphate, la PLDζ2 est délocalisée à l'enveloppe des plastes. Dans ce sens, les travaux d'Andersson *et al.* (2004) suggèrent qu'une PLD est effectivement à l'origine du DAG eucaryote nécessaire à la synthèse des galactolipides. Cependant, vu que l'approvisionnement des plastes en DAG de structure eucaryote a lieu aussi en présence de phosphate et que le MGDG et le DGDG ne changent pas de composition en acides gras dans le mutant *pldζ2*, l'activité de la PLDζ2 n'est vraisemblablement pas la source majeure d'approvisionnement en DAG en présence de phosphate.

En carence de phosphate, la PLDζ2 est sans doute plus importante dans cet approvisionnement mais là encore, elle n'est sans doute pas la seule protéine impliquée. NPC4, une phospholipase C PC spécifique, est activée en carence de phosphate et a été

caractérisée dans la membrane plasmique (Nakamura *et al.*, 2004). Nous ne l'avons pas analysée dans les analyses transcriptomiques car l'oligomère correspondant à ce gène était absent de la puce Affymetrix. Le mutant *npc4* ne possède pas de phénotype et sa composition en lipide est la même que celle d'une plante sauvage. NPC4 a donc moins d'influence sur la dégradation de la PC que PLD ζ 2.

L'analyse transcriptomique présentée dans ce chapitre montre qu'une autre phospholipase apparaît fortement activée par la carence de phosphate ; il s'agit de NPC5, qui serait spécifique de la PE. Le mutant *npc5* possède, comme *pld ζ 2*, un phénotype carencé en phosphate et sa composition lipidique est affectée (Ohta, communication personnelle). Nous pouvons supposer que NPC5 dégrade la PE et produit du DAG et de la phosphoéthanolamine, qui va être transformée en phosphocholine par une phosphoéthanolamine N-méthyltransférase, comme NMT1. Le DAG et la phosphocholine peuvent redonner de la PC avec la participation d'une CTP:phosphocholine cytidylyltransférase, telle que At2g32260. L'activation de l'ensemble de ces enzymes pourrait expliquer l'accumulation temporaire de PC. A partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons donc compléter la première partie de notre schéma concernant la production de DAG à partir de la PC (Figure 51).

Pour le transfert du DGDG vers les mitochondries, l'analyse transcriptomique couplée à notre étude bibliographique nous a permis de sélectionner des protéines qui pourraient potentiellement intervenir dans ce mécanisme. Nous n'avons cependant pas encore identifié de protéines candidates clairement impliquées dans cette troisième partie du schéma. Une piste possible d'investigation serait d'analyser par génétique inverse certains des transporteurs ABC et des ATPases homologues à des transporteurs de phospholipides.

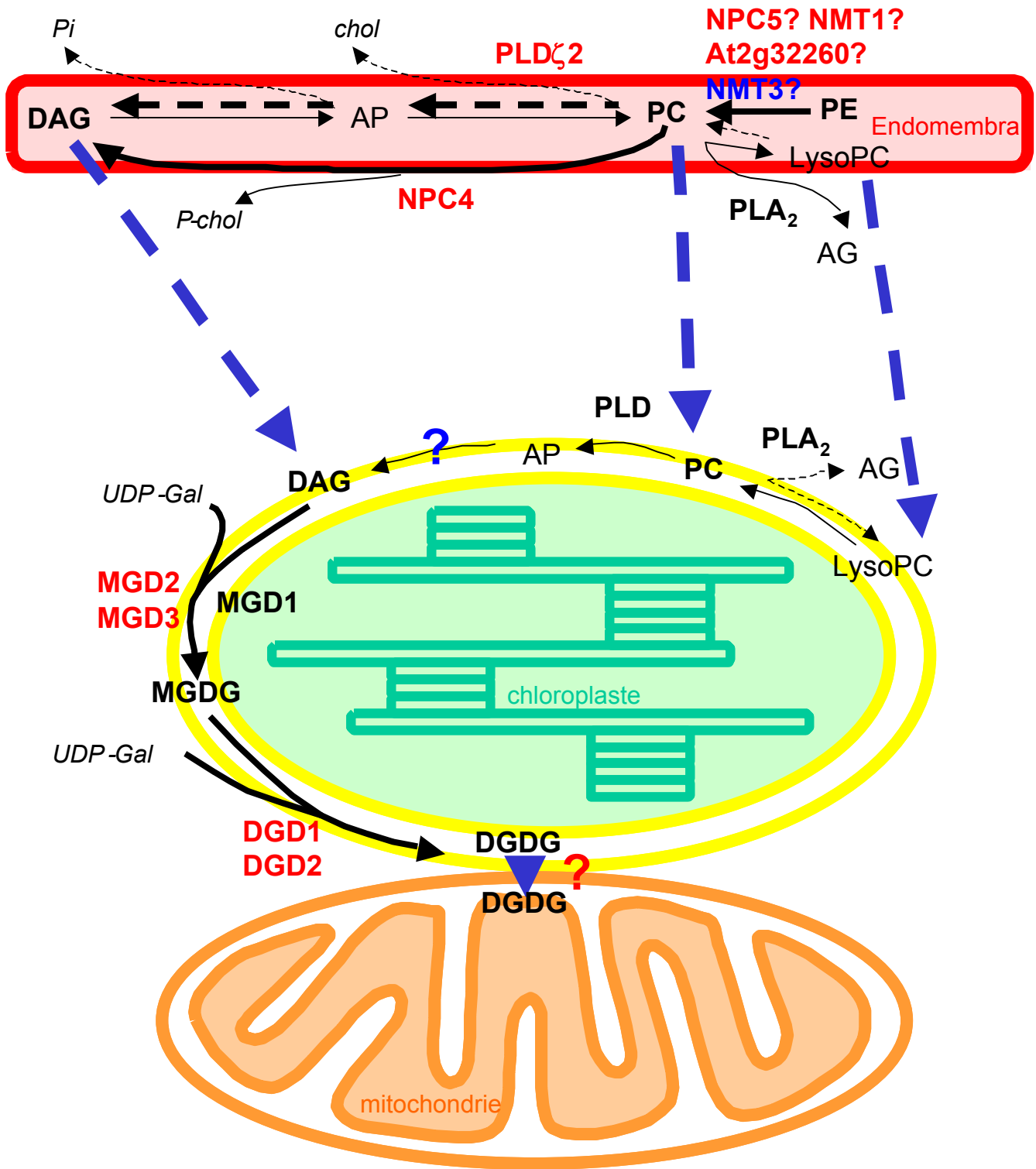


Figure 51 : Schéma bilan des transferts lipidiques de la cellule végétale en carence de phosphate. Les flèches en gras correspondent aux voies activées en carence de phosphate avec leurs enzymes correspondantes en rouge. Les protéines en bleus sont réprimées en carence de phosphate. Le rôle des différentes enzymes est explicité dans le texte. AG : acide gras, AP : acide phosphatidique, chol : choline, P-chol : phosphocholine, Pi : phosphate, UDP-Gal : UDP-galactose.

Conclusion

Conclusion

Chez les plantes, les galactolipides sont les lipides principaux des membranes photosynthétiques et avaient été détectés, jusqu'à présent, uniquement dans des membranes plastidiales, contrairement aux phospholipides qui sont les constituants majeurs des membranes extraplastidiales. En carence de phosphate, condition à laquelle la plante est très souvent exposée, la teneur globale en phospholipides des cellules diminue, permettant une mobilisation de la réserve de phosphate contenue dans ces molécules. Cette baisse est corrélée avec une augmentation de la teneur en DGDG et un transfert du DGDG vers les membranes extraplastidiales. La synthèse du DGDG s'effectue exclusivement dans les plastes. En carence de phosphate, elle s'effectue préférentiellement à partir de squelette DAG provenant de la PC du réticulum endoplasmique. L'objectif de ma thèse était de comprendre où le DGDG était localisé en carence de phosphate et par quelle voie il était synthétisé et transporté.

Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord entrepris d'analyser un modèle simple de suspensions cellulaires. En effet, les paramètres extérieurs, tels que la concentration en phosphate et le temps de carence, peuvent être contrôlés précisément et dynamiquement. Nous avons choisi de travailler sur deux types de plantes, l'érable (*Acer pseudoplatanus*) et l'arabette (*Arabidopsis thaliana*). L'utilisation d'*Arabidopsis* comme matériel d'étude nous a permis d'exploiter de nombreux outils génomiques et protéomiques qui sont disponibles pour cette plante. Cependant, *Arabidopsis* est une plante en C16:3, c'est à dire que ses galactolipides sont générés à partir de DAG provenant de deux voies de biosynthèse, de type procaryote et eucaryote. Pour simplifier notre étude, nous avons donc commencé notre travail sur une plante en C18:3, l'érable, qui ne possède que la voie eucaryote de synthèse de galactolipides.

Nous avons étudié l'évolution de chaque espèce de lipide et leur composition relative en acide gras, après transfert des cellules végétales dans un milieu dépourvu de phosphate. Nous avons observé qu'au début de la carence, la PC augmentait transitoirement, après une diminution très précoce des autres phospholipides, notamment le PG et la PE. De plus, nous avons mesuré pour la première fois qu'un pool significatif de DAG, qui possède la même composition en acide gras que la PC, était présent dans les cellules et que sa quantité augmentait en réponse à la carence de phosphate. Le DAG est donc en équilibre avec la PC sans sélection du squelette hydrophobe. Nous avons montré que la carence de phosphate

bloquait la néosynthèse des acides gras, selon un processus non spécifique lié simplement à l'arrêt de la croissance cellulaire. Dans ce contexte, la PC fournit le DAG nécessaire à la synthèse du DGDG, après sélection de ces espèces moléculaires déterminée par la distribution des acides gras de sa partie hydrophobe. Cette sélection est contrôlée finement par les enzymes de synthèses des galactolipides. En outre, ce travail soutient une nouvelle hypothèse concernant le transfert du squelette hydrophobe des glycolipides à partir du réticulum vers les plastes, puisque mes résultats suggèrent un transfert direct de DAG (Figure 51).

Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons démontré que les cellules d'*Arabidopsis* cultivées en absence de phosphate contenaient une forte proportion de DGDG à l'extérieur des plastes, notamment dans les mitochondries. Ce résultat a été montré de trois manières différentes : par visualisation en microscopie à épifluorescence indirecte sur des cellules en utilisant un anticorps contre le DGDG, par immunoagglutination avec le même anticorps et par analyse de lipides de mitochondries isolées et purifiées. Nous avons observé que la synthèse du DGDG mitochondrial était dépendante de la présence d'enveloppe de chloroplaste et que sa structure, analysée par RMN du proton, est caractéristique de l'activité des enzymes DGD1 et DGD2. Le DGDG des mitochondries est donc synthétisé dans l'enveloppe des plastes et nous nous sommes concentrés sur le transfert des galactolipides des plastes vers les mitochondries. Le transfert a été détecté entre des membranes de l'enveloppe associées aux mitochondries et les mitochondries. Ces expérimentations sont le premier exemple d'une mesure d'un transfert de galactolipides entre des organites. Nos données indiquent que ce transfert n'implique pas de vésicules mais qu'il est vraisemblablement dépendant de contacts entre l'enveloppe des plastes et les mitochondries.

Nos connaissances sur les transferts de lipides sont faibles. Pour identifier des protéines pouvant être impliquées dans les remaniements lipidiques provoqués par la carence de phosphate, nous avons participé à une analyse du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* effectué par l'équipe de Marie-Christine Thibaud au CEA Cadarache, à l'échelle de 22810 gènes. Nous avons établi que 7 % des gènes qui répondent à la carence de phosphate sont des gènes du métabolisme des lipides. Les gènes induits représentent des gènes codant des protéines de transfert des lipides, des enzymes du métabolisme des phospholipides et de la synthèse des glycolipides. Nous avons noté, en particulier, que *sqd1*, *sqd2*, *mgd2* et *mgd3* font partie des cinq gènes induits dès les temps courts de la carence de phosphate alors que l'expression de *dgd1* et *dgd2* est stimulée, mais plus tardivement (temps moyen et long). L'expression de *mgd1* n'est pas affectée par la carence. De manière intéressante, seulement un petit nombre de gènes de phospholipases C et D est induit parmi lesquels un gène de

phospholipase D, *pldζ2*, dont l'expression est absente en présence de phosphate mais activée fortement à partir de temps court, comme *mgd2* et *mgd3*. Nous avons étudié le mutant d'*Arabidopsis* invalidé pour ce gène et nous avons constaté qu'il était plus sensible à la carence de phosphate que la plante sauvage. Après comparaison de la teneur en phosphate et de la composition lipidique des plantes mutées et sauvages, cultivées à différentes concentrations de phosphate, nous avons observé que *PLDζ2* était impliquée dans le contrôle de la quantité de phosphate de la cellule végétale et dans l'hydrolyse des phospholipides permettant l'approvisionnement en DAG des enzymes de synthèse des galactolipides. Cette protéine constitue vraisemblablement un des liens entre le métabolisme du phosphate intracellulaire et le métabolisme des lipides.

Nos travaux ainsi que l'étude des données bibliographiques nous ont permis de proposer un modèle qui décrit le cheminement des lipides en carence de phosphate dans la cellule végétale ainsi que les protéines potentiellement impliquées dans ces remaniements (Figure 51). Beaucoup de facteurs restent inconnus dans ce schéma. Il est donc important dans un premier temps de terminer la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de la *PLDζ2* afin de préciser son rôle dans le métabolisme des lipides et du phosphate.

Par la suite, il sera essentiel, d'un côté, d'identifier les protéines qui sont engagées dans le transport du DAG ou du DGDG, au sens strict du terme, et d'un autre côté, de caractériser les zones de contacts impliquées dans ces transferts de lipides. Les gènes sélectionnés par notre analyse transcriptomique serviront de point de départ dans l'étude du transport de lipides. Plusieurs protéines apparaissent comme des candidats possibles pour catalyser les transports de lipides dans la mitochondrie. L'examen de mutants knock-out et l'expression de protéines *in vitro* devraient permettre de progresser dans la caractérisation de ces protéines. L'utilisation de lipides fluorescents ou d'inhibiteurs des enzymes de synthèse des galactolipides devraient nous aider dans la visualisation du cheminement des lipides dans la cellule et dans la compréhension des modalités de transfert lipidique. Enfin, l'analyse de domaines de l'enveloppe des plastes, mis en évidence par épifluorescence et par visualisation de protéines fusionnées avec la GFP, est une voie très importante à développer, connaissant l'importance de ce genre de domaine, tels que les MAM ou les rafts, dans le métabolisme des lipides et la signalisation cellulaire.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Alban, C., J. Joyard, and R. Douce.** 1989. Comparison of glycerolipid biosynthesis in non-green plastids from sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cells and cauliflower (*Brassica oleracea*) buds. *Biochem J.* 259: 775-83.
- Alban, C., P. Baldet, and R. Douce.** 1994. Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem J.* 300: 557-65.
- Andersson, M.X., M.H. Stridh, K.E. Larsson, C. Liljenberg, and A.S. Sandelius.** 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537: 128-32.
- Andersson, M.X., J.M. Kjellberg, and A.S. Sandelius.** 2004. The involvement of cytosolic lipases in converting phosphatidylcholine to substrate for galactolipid synthesis in the chloroplast envelope. *Biochim Biophys Acta* 1684: 46-53.
- Andersson, M.X., and A.S. Sandelius.** 2004. A chloroplast-localized vesicular transport system: a bioinformatics approach. *BMC Genomics* 5: 40.
- Andersson, M.X., K.E. Larsson, H. Tjellstrom, C. Liljenberg, and A.S. Sandelius.** 2005. Phosphate-limited Oat: the plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipids-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 27578-86.
- Andrews, J., J.B. Ohlrogge, and K. Keegstra.** 1985. Final step of phosphatidic acid synthesis in pea chloroplasts occurs in the inner envelope membrane. *Plant Physiol* 78: 459-65.
- Awai, K., E. Maréchal, M.A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, H. Ohta, and J. Joyard.** 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10960-5.
- Axelos, M., C. Curie, L. Mazzolini, C. Bardet, and B. Lescure.** 1992. A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* 30: 123-8.

B

- Babiychuk, E., F. Muller, H. Eubel, H.P. Braun, M. Frentzen, and S. Kushnir.** 2003. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J* 33: 899-909.
- Beisson, F., A.J. Koo, S. Ruuska, J. Schwender, M. Pollard, J.J. Thelen, T. Paddock, J.J. Salas, L. Savage, A. Milcamps, V.B. Mhaske, Y. Cho, and J.B. Ohlrogge.** 2003. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol* 132: 681-97.
- Bell, R.M., L.M. Ballas, and R.A. Coleman.** 1981. Lipid topogenesis. *J. Lipid Res.* 22: 391-403.
- Benning, C., and H. Ohta.** 2005. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* 280: 2397-400.
- Bertho, P., P. Moreau, D.J. Morre, and C. Cassagne.** 1991. Monensin blocks the transfer of very long chain fatty acid containing lipids to the plasma membrane of leek seedlings. Evidence for lipid sorting based on fatty acyl chain length. *Biochim Biophys Acta* 1070: 127-34.
- Bessoule, J.J., E. Testet, and C. Cassagne.** 1995. Synthesis of phosphatidylcholine in the chloroplast envelope after import of lysophosphatidylcholine from endoplasmic reticulum membranes. *Eur J Biochem* 228: 490-7.
- Billecoq, A.** 1974. Structures of biological membranes: localization of galactosyldiglycerides in chloroplasts by means of specific antibodies. II. Treatment with peroxidase: electron microscope study. *Biochim Biophys Acta* 352: 245-51.

- Blée, E.** 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* 7: 315-22.
- Blein, J.P., P. Coutos-Thevenot, D. Marion, and M. Ponchet.** 2002. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* 7: 293-6.
- Bligny, R.** 1977. Growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* L. cells in automatic units of large volume. *Plant Physiol.* 59: 502-5.
- Block, M.A., A.J. Dorne, J. Joyard, and R. Douce.** 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem* 258: 13281-6.
- Bolognese, C.P., and P. McGraw.** 2000. The isolation and characterization in yeast of a gene for Arabidopsis S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. *Plant Physiol* 124: 1800-13.
- Bolter, B., J. Soll, K. Hill, R. Hemmler, and R. Wagner.** 1999. A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Embo J* 18: 5505-16.
- Borst, P., N. Zelcer, and A. van Helvoort.** 2000. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 1486: 128-44.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P.** 2005. Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137: 104-16.
- Bourgis, F., J.C. Kader, P. Barret, M. Renard, D. Robinson, C. Robinson, M. Delseny, and T.J. Roscoe.** 1999. A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape. *Plant Physiol* 120: 913-22.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brandizzi, F., E.L. Snapp, A.G. Roberts, J. Lippincott-Schwartz, and C. Hawes.** 2002. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* 14: 1293-309.
- Breiteneder, H., and C. Mills.** 2005. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5: 275-9.
- Brodersen, P., M. Petersen, H.M. Pike, B. Olszak, S. Skov, N. Odum, L.B. Jorgensen, R.E. Brown, and J. Mundy.** 2002. Knockout of Arabidopsis accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 16: 490-502.
- Burger, K.N.J.** 2000. Greasing Membrane Fusion and Fission Machineryes. *Traffic* 1:605-13.

C

- Carde, J.P., J. Joyard, and R. Douce.** 1982. Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids. *Biol Cell* 44: 315-24.
- Carter, H.E., McCluer, R.H., and Slifer, E.D.** 1956. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. *J Am Chem Soc* 78: 3735-8.
- Chen, L.J., and H.M. Li.** 1998. A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant J* 16: 33-9.
- Choi, Y.H., J.K. Lee, C.H. Lee, and S.H. Cho.** 2000. cDNA cloning and expression of an aminoalcoholphosphotransferase isoform in Chinese cabbage. *Plant Cell Physiol* 41: 1080-4.

D

- Delhaize, E., and P.J. Randall.** 1995. Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 107: 207-13.
- Delhaize, E., D.M. Hebb, K.D. Richards, J.M. Lin, P.R. Ryan, and R.C. Gardner.** 1999. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J Biol Chem* 274: 7082-8.
- Dewey, R.E., R.F. Wilson, W.P. Novitzky, and J.H. Goode.** 1994. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. *Plant Cell* 6: 1495-507.

- Dörmann, P., S. Hoffmann-Benning, I. Balbo, and C. Benning.** 1995. Isolation and Characterization of an *Arabidopsis* Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *Plant Cell* 7: 1801-10.
- Dörmann, P., I. Balbo, and C. Benning.** 1999. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284: 2181-4.
- Dorne, A.J., Block, M.A., Joyard, J., and Douce, R.** 1982. The galactolipid: galactolipid galactosyltransferase is located on the outer surface of the outer chloroplast envelope. *FEBS Lett* 145: 30-4.
- Dorne, A.J., J. Joyard, M.A. Block, and R. Douce.** 1985. Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J Cell Biol* 100: 1690-7.
- Douce, R.** 1974. Site of galactolipid synthesis in spinach chloroplasts. *Science* 183: 852-3.
- Douce, R.** 1985. Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis. Academic Press Inc., New York. 322 pp.
- Douce, R., and J. Joyard.** 1990. Biochemistry and Function of the Plastid Envelope. *Annu Rev Cell Biol* 6: 173-216.
- Douce, R., J. Joyard, M.A. Block, and A.-J. Dorne.** 1990. Glycolipid analyses and synthesis in plastids. *Methods in plant biochemistry* Vol 4 ISBN 0-12-461014-5.

E

- Edqvist, J., E. Ronnberg, S. Rosenquist, K. Blomqvist, L. Viitanen, T.A. Salminen, M. Nylund, J. Tuuf, and P. Mattjus.** 2004. Plants express a lipid transfer protein with high similarity to mammalian sterol carrier protein-2. *J Biol Chem* 279: 53544-53.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak, and G. von Heijne.** 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-16.
- Essigmann, B., S. Güler, R.A. Narang, D. Linke, and C. Benning.** 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1950-5.
- Essigmann, B., B.M. Hespeneide, L.A. Kuhn, and C. Benning.** 1999. Prediction of the active-site structure and NAD(+) binding in SQD1, a protein essential for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Arch Biochem Biophys* 369: 30-41.

F

- Ferro, M., D. Salvi, H. Riviere-Rolland, T. Vermat, D. Seigneurin-Berny, D. Grunwald, J. Garin, J. Joyard, and N. Rolland.** 2002. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11487-92.
- Ferro, M., D. Salvi, S. Brugiere, S. Miras, S. Kowalski, M. Louwagie, J. Garin, J. Joyard, and N. Rolland.** 2003. Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* 2: 325-45.
- Frentzen, M., E. Heinz, T.A. McKeon, and P.K. Stumpf.** 1983. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* 129: 629-36.
- Frentzen, M.** 1990. Comparison of certain properties of membrane bound and solubilized acyltransferase activities of plant microsomes. *Plant Science* 69: 39-48
- Frentzen, M., M. Neuburger, J. Joyard, and R. Douce.** 1990. Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA: sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase and acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase from potato tubers and pea leaves. *Eur J Biochem* 187: 395-402.
- Frentzen M., and R. Griebau.** 1994. Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* 106: 1527-32
- Frentzen, M.** 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol* 7: 270-6.
- Froehlich, J.E., C. Benning, and P. Doörmann.** 2001. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general

import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J Biol Chem* 276: 31806-12.

Fulda M, J. Shockey, M. Werber, F.P. Wolter, and E. Heinz. 2002. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant J* 32: 93-103

G

Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151.

Gautheret, R.J. 1934. Nouvelles recherches sur la culture du tissu cambial. *CR Acad Sci Paris* 198 : 2195-6.

Gomès, E., M.K. Jakobsen, K.B. Axelsen, M. Geisler, and M.G. Palmgren. 2000. Chilling tolerance in *Arabidopsis* involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* 12: 2441-54.

Griebau, R., and M. Frentzen. 1994. Biosynthesis of phosphatidylglycerol in isolated mitochondria of etiolated mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Plant Physiol* 105: 1269-74

H

Hamburger, D., E. Rezzonico, J. MacDonald-Comber Petetot, C. Somerville, and Y. Poirier. 2002. Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14: 889-902.

Hammond, J.P., M.R. Broadley, and P.J. White. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann Bot (Lond)*. 94: 323-32.

Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, and M. Nishijima. 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803-9.

Hanton, S.L., L.E. Bortolotti, L. Renna, G. Stefano, and F. Brandizzi. 2005. Crossing the divide--transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* 6: 267-77.

Harris, G.C., J.K. Cheesbrough, and D.A. Walker. 1983. Effects of mannose on photosynthetic gas exchange in spinach leaf discs. *Plant Physiol* 71: 108-11.

Härtel, H., H. Lokstein, P. Doörmann, B. Grimm, and C. Benning. 1997. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 115: 1175-1184.

Härtel, H., B. Essigmann, H. Lokstein, S. Hoffmann-Benning, M. Peters-Kottig, and C. Benning. 1998. The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta* 1415: 205-18.

Härtel, H., and C. Benning. 2000. Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of *Arabidopsis*? *Biochem Soc Trans* 28: 729-32.

Härtel, H., P. Doörmann, and C. Benning. 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10649-54.

Hartmann, M.A., and P. Benveniste. 1987. Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis. *Methods Enzymol* 148: 632-50.

Harwood, J. 1987. Phosphoglycerides of mitochondrial membranes. In *Methods in Enzymology*. Vol. 148. L. Packer and R. Douce, editors. Academic Press, Inc., London. 475-85.

Haschke, H., G. Kaiser, E. Martinoia, U. Hammer, T. Teucher, A. Dorne, and E. Heinz. 1990. Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO₂-fixation mechanisms. *Botanica Acta* 103: 32-8.

Hawes, C. 2005. Cell biology of the plant Golgi apparatus. *New Phytol* 165: 29-44.

Heazlewood, J.L., J.S. Tonti-Filippini, A.M. Gout, D.A. Day, J. Whelan, and A.H. Millar. 2004. Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16: 241-56.

Heinz, E. 1977. Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In *Tevini M and Lichtenthaler HK (eds) Lipids and Lipid Polymers*, pp. 102-20. Springer Verlag, Berlin.

- Helenius, J., D.T. Ng, C.L. Marolda, P. Walter, M.A. Valvano, and M. Aebi.** 2002. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415: 447-50.
- Higgins, C.F., and K.J. Linton.** 2001. Structural biology. The xyz of ABC transporters. *Science* 293: 1782-4.
- Holthuis, J.C.M, and T.P. Levine.** 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 209-20
- Holstein, S.** 2002. Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* 3: 614-20.
- Hubert, H.** 2001. Coupe transversale d'une racine d'hellébore. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/anatomie/racine/hellebore/pshelle.html>
- Hugueney, P., F. Bouvier, A. Badillo, A. d'Harlingue, M. Kuntz, and B. Camara.** 1995. Identification of a plastid protein involved in vesicle fusion and/or membrane protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5630-4.
- Hurry, V., A. Strand, R. Furbank, and M. Stitt.** 2000. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 24: 383-96.

I

- Ikonen, E.** 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13: 470-7.
- Inatsugi, R., M. Nakamura, and I. Nishida.** 2002. Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 1342-50.

J

- Jarvis, P., P. Dörmann, C.A. Peto, J. Lutes, C. Benning, and J. Chory.** 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8175-9.
- Jouannic, N., M. Lepetit, C. Vergnolle, C. Cantrel, A.M. Gardies, J.C. Kader, and V. Arondel.** 1998. Isolation of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* that complements the sec14 mutant of yeast. *Eur J Biochem* 258: 402-10.
- Joyard, J., and R. Douce.** 1977. Site of synthesis of phosphatidic acid and DAG in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 486: 273-85.
- Joyard, J., and R. Douce.** 1979. Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. *FEBS Lett* 102: 147-50.
- Joyard, J., and P.K. Stumpf.** 1980. Characterisation of an acyl-coenzyme A thioestérase associated with the envelope of spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 65: 1039-43.
- Joyard, J., E. Blée, and R. Douce.** 1986. Sulfolipid synthesis from $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ and $[1-^{14}\text{C}]$ -acetate in isolated intact spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 879: 78-87.
- Jürgens, G.** 2004. Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 481-504.

K

- Kader, J.C.** 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 627-54.
- Katayama K, I. Sakurai, and H. Wada.** 2004. Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Lett* 577: 193-8
- Keenan, T.W., and D.J. Morre.** 1970. Phospholipid class and fatty acid composition of Golgi apparatus isolated from rat liver and comparison with other cell fractions. *Biochemistry* 9: 19-25.
- Kelly, A.A., and P. Dörmann.** 2002. DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* 277: 1166-73.

- Kelly, A.A., J.E. Froehlich, and P. Dörmann.** 2003. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell* 15: 2694-706.
- Kim, D.H., Y.J. Eu, C.M. Yoo, Y.W. Kim, K.T. Pih, J.B. Jin, S.J. Kim, H. Stenmark, and I. Hwang.** 2001. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell* 13: 287-301.
- Kinney, A.J.** 1993. Phospholipid head groups. In *Lipid metabolism in plants*. Ed. T.S. Moore, pp 259-84. Boca Raton. *CRC Press*.
- Klaus, D., H. Härtel, L.M. Fitzpatrick, J.E. Froehlich, J. Hubert, C. Benning, and P. Dörmann.** 2002. Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the *Arabidopsis dgd1* mutant. *Plant Physiol* 128: 885-95.
- Kobayashi, K., K. Awai, K. Takamiya, and H. Ohta.** 2004. *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* 134: 640-8.
- Köck, M., K. Theirl, I. Stenzel, and K. Glund.** 1998. Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* 204: 404-7.
- Kojima, M., K. Seki, M. Ohnishi, S. Ito, and Y. Fujino.** 1989. Structure of novel glycerolipids in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Biochem Cell Biol* 68: 59-64.
- Koo, A.J.K., J.B. Ohlrogge, and M. Pollard.** 2004. On the export of fatty acids from the chloroplast. *J Biol Chem* 279: 16101-10
- Kopka, J., M. Ludewig, and B. Müller-Röber.** 1997. Complementary DNAs encoding eukaryotic-type cytidine-5'-diphosphate-diacylglycerol synthases of two plant species. *Plant Physiol* 113: 997-1002
- Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U.C. Vothknecht, J. Soll, and P. Westhoff.** 2001. VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4238-42.
- Kunst, L., and A.L. Samuels.** 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res* 42: 51-80.
- Kwok, E.Y., and M.R. Hanson.** 2004a. Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Rep* 23: 188-95.
- Kwok, E.Y., and M.R. Hanson.** 2004b. In vivo analysis of interactions between GFP-labeled microfilaments and plastid stromules. *BMC Plant Biol* 4: 2.
- L**
- Lamattina, L., D. Gonzalez, J. Gualberto, and J.M. Grienenberger.** 1993. Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur J Biochem* 217: 831-8.
- Lampport, D.T.A.** 1964. Cell suspension cultures of higher plants: isolation and growth energetics. *Exp Cel. Res* 33: 195-206.
- Lebart, L., A. Morineau, and M. Piron.** 2000. Statistique exploratoire multidimensionnelle. 3^{ème} édition. Paris, Dunod. ISBN 2 10 005351 5.
- Lee, Y.J., D.H. Kim, Y.W. Kim, and I. Hwang.** 2001. Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane system in vivo. *Plant Cell* 13: 2175-90.
- Lee, S.H., J.B. Jin, J. Song, M.K. Min, D.S. Park, Y.W. Kim, and I. Hwang.** 2002. The intermolecular interaction between the PH domain and the C-terminal domain of Arabidopsis dynamin-like 6 determines lipid binding specificity. *J Biol Chem* 277: 31842-9.
- Leegood, R.C., D.A. Walker, and C.H. Foyer.** 1985. Regulation of the Benson Calvin cycle. In: Barber J and Barber NR (eds), Photosynthetic mechanism and the environment, pp 190- 258 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Lefebvre, B., H. Batoko, G. Duby, and M. Boutry.** 2004. Targeting of a *Nicotiana glauca* H⁺ -ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. *Plant Cell* 16: 1772-89.
- Levine, T.** 2004. Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol* 14: 483-90.

Lowry, H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.

M

Macher, B.A., and J.B. Mudd. 1976. Partial purification and properties of ethanolamine kinase from spinach leaf. *Arch Biochem Biophys* 177: 24-30.

Malherbe, A., M.A. Block, J. Joyard, and R. Douce. 1992. Feedback inhibition of phosphatidate phosphatase from spinach chloroplast envelope membranes by diacylglycerol. *J Biol Chem* 267: 23546-53.

Marcel, G.C., A. Matos, A. d'arcy-Lameta, J.C. Kader, Y. Zuily-Fodil, and A. Pham-Thi. 2000. Two novel plant cDNAs homologous to animal type-2 phosphatidate phosphatase are expressed in cowpea leaves and are differently regulated by water deficits. *Biochem Soc Trans* 28: 915-17.

Maréchal, E., M.A. Block, J. Joyard, and R. Douce. 1994a. Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J Biol Chem* 269: 5788-98.

Maréchal, E., M.A. Block, J. Joyard, and R. Douce. 1994b. Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. *FEBS Lett* 352: 307-10.

Maréchal, E., N. Azzouz, C.S. de Macedo, M.A. Block, J.E. Feagin, R.T. Schwarz, and J. Joyard. 2002. Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell* 1: 653-6.

Marshall M. O., and M. Kates. 1972. Biosynthesis of phosphatidylglycerol by cell-free preparations from spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* 260: 558-70

Martinoia, E., M. Klein, M. Geisler, L. Bovet, C. Forestier, U. Kolukisaoglu, B. Muller-Rober, and B. Schulz. 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. *Planta* 214: 345-55.

Matsuoka, K., D.C. Bassham, N.V. Raikhel, and K. Nakamura. 1995. Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol*;130: 1307-18.

Matsuoka, K., and S.Y. Bednarek. 1998. Protein transport within the plant cell endomembrane system: an update. *Curr Opin Plant Biol* 1: 463-9

Meijer H.J., and T. Munnik. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 265-306

Miège, C., E. Maréchal, M. Shimojima, K. Awai, M.A. Block, H. Ohta, K. Takamiya, R. Douce, and J. Joyard. 1999. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem* 265: 990-1001.

Mimura, T., K. Dietz, W. Kaiser, M. Schramm, G. Kaiser, and U. Heber. 1990. Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180: 139-46.

Misson, J. 2004. Le signal phosphate chez *Arabidopsis thaliana*: analyse génétique et moléculaire. In PhD Thesis. Université d'Aix-Marseille I.

Mongrand, S., J.J. Bessoule, F. Cabantous, and C. Cassagne. 1998. The C16:3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochem* 49: 1049-64

Mongrand, S., C. Cassagne, and J.J. Bessoule. 2000. Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol* 122: 845-52.

Mongrand, S., J. Morel, J. Laroche, S. Claverol, J.P. Carde, M.A. Hartmann, M. Bonneau, F. Simon-Plas, R. Lessire, and J.J. Bessoule. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 36277-86.

Monks, D.E., J.H. Goode, and R.E. Dewey. 1996. Characterization of soybean choline kinase cDNAs and their expression in yeast and Escherichia coli. *Plant Physiol* 110: 1197-205.

Moore, T.S. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 33: 325-59

Moreau, P., J.-J. Bessoule, S. Mongrand, E. Testet, P. Vincent, and C. Cassagne. 1998. Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* 37: 371-91.

Morré, D.J., G. Seldén, S. Sundqvist, A.S. Sandelius. 1991a. Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the envelope. *Plant Physiol* 97: 1558-64.

Morré, D.J., J.T. Morre, S.R. Morre, C. Sundqvist, and A.S. Sandelius. 1991b. Chloroplast biogenesis. Cell-free transfer of envelope monogalactosylglycerides to thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1070: 437-45.

- Mouillon, J.M., S. Ravanel, R. Douce, and F. Rebeillé.** 2002. Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *Biochem J* 363: 313-9.
- Mudd, S.H., and A.H. Datko.** 1989. Synthesis of ethanolamine and its regulation in *Lemna paucicostata*. *Plant Physiol* 91: 587-97.
- Mueller-Roeber, B., and C. Pical.** 2002. Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol* 130: 22-46.
- Mulichak, A.M., M.J. Theisen, B. Essigmann, C. Benning, and R.M. Garavito.** 1999. Crystal structure of SQD1, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant sulfolipid headgroup donor UDP-sulfoquinovose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13097-102.
- Müller, F., and M. Frentzen.** 2001. Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 509: 298-302.
- Munnik, T.** 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* 6: 227-33.
- Murphy, A.S., A. Bandyopadhyay, S.E. Holstein, and W.A. Peer.** 2005. Endocytotic cycling of PM proteins. *Annu Rev Plant Biol* 56: 221-51.
- Murashige, T., and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-97
- Murata, N., and Y. Tasaka.** 1997. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim Biophys Acta* 1348: 10-6.

N

- Nakamura, Y., K. Awai, T. Masuda, Y. Yoshioka, K. Takamiya, and H. Ohta.** 2005. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280: 7469-76.
- Natesan, S.K., J.A. Sullivan, and J.C. Gray.** 2005. Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology. *J Exp Bot* 56: 787-97.
- Neuburger, M., E.P. Journet, R. Bligny, J.P. Carde, and R. Douce.** 1982. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch Biochem Biophys* 217: 312-23.
- Nishida I, M. Frentzen, O. Ishizaki and N. Murata.** 1987. Purification of isomeric forms of acyl-(acyl-carrier-protein): glycerol-3-phosphate acyltransferase from greening squash cotyledons. *Plant Cell Physiol* 28: 1071-9.
- Nishida, I., M. Sugiura, A. Enju, and M. Nakamura.** 2000. A second gene for acyl-(acyl-carrier-protein): glycerol-3-phosphate acyltransferase in squash, *Cucurbita moschata* cv. Shirogikuza(*), codes for an oleate-selective isozyme: molecular cloning and protein purification studies. *Plant Cell Physiol* 41: 1381-91.
- Nowicki M., F. Müller, and M. Frentzen.** 2005. Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579: 2161-5
- Nuccio, M.L., M.J. Ziemak, S.A. Henry, E.A. Weretilnyk, and A.D. Hanson.** 2000. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 275: 14095-101.

O

- O'Brien, I.E.W., C.P.M. Reutelingsperger, and K.M. Holdaway.** 1997. Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29: 28-33.
- Ohashi, Y., A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli, and T. Aoyama.** 2003. Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science* 300: 1427-30.
- Okuley, J., J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark, and J. Browse.** 1994. *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6: 147-58.

P

- Pan, X., P. Roberts, Y. Chen, E. Kvam, N. Shulga, K. Huang, S. Lemmon, and D.S. Goldfarb.** 2000. Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell* 11: 2445-57.
- Park, J.M., J.H. Cho, S.G. Kang, H.J. Jang, K.T. Pih, H.L. Piao, M.J. Cho, and I. Hwang.** 1998. A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes. *Embo J* 17: 859-67.
- Pfeiffer, K., V. Gohil, R.A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M.L. Greenberg, and H. Schagger.** 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278: 52873-80.
- Pierrugues, O., C. Brutesco, J. Oshiro, M. Gouy, Y. Deveaux, G.M. Carman, P. Thuriaux, and M. Kazmaier.** 2001. Lipid phosphate phosphatases in *Arabidopsis*. Regulation of the AtLPP1 gene in response to stress. *J Biol Chem* 276: 20300-8.
- Poirier, Y., S. Thoma, C. Somerville, and J. Schiefelbein.** 1991. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol* 97: 1087-93.
- Poirier, Y., and M. Bucher.** 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In Somerville CR and Meyercowitz EM (eds) *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0024. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Pollard, M. and J. Ohlrogge.** 1999. Testing models of fatty acid transfer and lipid synthesis in spinach leaf using *in vivo* oxygen-18 labeling. *Plant Physiol* 121: 1217-26
- Pomorski, T., J.C. Holthuis, A. Herrmann, and G. van Meer.** 2004. Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci* 117: 805-13.

Q

- Qin, C., and X. Wang.** 2002. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol* 128: 1057-68.

R

- Ragothama, K.G.** 1999. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-93.
- Ragothama, K.G.** 2000. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3: 182-7.
- Raggers, R.J., T. Pomorski, J.C. Holthuis, N. Kalin, and G. van Meer.** 2000. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* 1: 226-34.
- Räntfors, M, I. Everstsson, J.M. Kjellberg, and A.S. Sandelius.** 2000. Intraplastidial lipid trafficking: Regulation of galactolipid release from isolated chloroplast envelope. *Physiol Plant* 110: 262-70.
- Rausch, C., and M. Bucher.** 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37.
- Rawsthorne, S.** 2002. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Prog Lipid Res* 41: 182-96.
- Rawlyer, A., M. Meylan-Bettex, and P.A. Siegenthaler.** 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. *Biochim Biophys Acta* 1233: 123-33.
- Rebeillé, F.** 1983. Quelques observations sur le métabolisme du phosphate chez les cellules d'érable sycomore. In PhD thesis. Université J. Fourier, Grenoble.
- Rebeillé, F., R. Bligny, and R. Douce.** 1984. Is the cytosolic Pi concentration a limiting factor for plant cell respiration? *Plant Physiol.* 74: 355-9.
- Reichert, A.S., and W. Neupert.** 2002. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria – role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592: 41-9.

- Reinsberg, D., P.J. Booth, C. Jegerschold, B.J. Khoo, and H. Paulsen.** 2000. Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry* 39: 14305-13.
- Rontein, D., I. Nishida, G. Tashiro, K. Yoshioka, W.I. Wu, D.R. Voelker, G. Basset, and A.D. Hanson.** 2001. Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. *J Biol Chem* 276: 35523-9.
- Rontein, D., D. Rhodes, and A.D. Hanson.** 2003a. Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants. *Plant Cell Physiol* 44: 1185-91.
- Rontein, D., W.I. Wu, D.R. Voelker, and A.D. Hanson.** 2003b. Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 132: 1678-87.
- Rubio, V., F. Linhares, R. Solano, A.C. Martin, J. Iglesias, A. Leyva, and J. Paz-Ares.** 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* 15: 2122-33.

S

- Sakaki, T., N. Kondo, and M. Yamada.** 1990. Pathway for the synthesis of triacylglycerol from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiol* 94: 773-80
- Samaj, J., F. Baluska, B. Voigt, M. Schlicht, D. Volkmann, and D. Menzel.** 2004. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135: 1150-61.
- Sanda, S., T. Leustek, M.J. Theisen, R.M. Garavito, and C. Benning.** 2001. Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose *in vitro*. *J Biol Chem* 276: 3941-6.
- Sandelius, A.S., and M.X. Andersson.** 2003. Isolation and characterization of an endoplasmic reticulum fraction associated with chloroplasts isolated from garden pea (*Pisum sativum*). 1st European Symposium on Plant Lipids Aachen abstract booklet.
- Sano, T., Y. Kuraya, S. Amino, and T. Nagata.** 1999. Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 40: 1-8.
- Schnurr J.A., J.M. Shockey, G.-J. de Boer, and J.A. Browse.** 2002. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-Coenzyme A synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 1700-9
- Schnurr J.A., J.M. Shockey, and J.A. Browse.** 2004. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 629-42
- Schrick, K., D. Nguyen, W.M. Karlowski, and K.F. Mayer.** 2004. START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol* 5: R41.
- Seifert, U., and E. Heinz.** 1992. Enzymatic characteristics of UDP-sulfoquinovose: DAG sulfoquinovosyltransferase from chloroplast envelopes. *Botanica Acta* 105: 197-205.
- Shimajima M, Ohta H, Iwamatsu A, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K.** 1997. Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 333-7.
- Shockey, J.M., M.S. Fulda, and J.A. Browse.** 2002. Arabidopsis contains nine long-chain acyl-Coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* 129: 1710-22
- Slack, C.R., P.G. Roughan, and N. Balasingham.** 1977. Labelling studies *in vivo* on the metabolism of the acyl and glycerol moieties of the glycerolipids in the developing maize leaf. *Biochem J* 162: 289-96.
- Smith, F.W.** 2002. The phosphate uptake mechanism. *Plant and soil* 245: 105-14.
- Smith, J.D., C. Waelde, A. Horwitz, and P. Zheng.** 2002. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem* 277: 17797-803.
- Szponarski, W., N. Sommerer, J.C. Boyer, M. Rossignol, and R. Gibrat.** 2004. Large-scale characterization of integral proteins from Arabidopsis vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* 4: 397-406.
- Staehelin, L.A.** 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11: 1151-65.

Stymne, S., and A.K. Stobart. 1984. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius L.*) cotyledons and rat liver. *Biochem J* 223: 305-14.

T

Tang, X., M.S. Halleck, R.A. Schlegel, P. Williamson. 1996. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272: 1495-7

Tasseva, G., L. Richard and A. Zachowski. 2004. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt-stress involves choline kinase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS lett* 566: 115-20.

Tavernier, E., D. Lê Quôc, and K. Lê Quôc. 1993. Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 1167: 242-7.

Tavernier, E., and A. Pugin. 1995. Transbilayer distribution of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cells. *Biochimie* 77: 174-81.

Teysier, E., M.A. Block, R. Douce, and J. Joyard. 1996. Is IEP37, a major polypeptide of the inner membrane from plastid envelope, an S-adenosyl methionine-dependent methyltransferase? *Plant J* 10: 903-12.

Thelen, J.J., and J.B. Ohlrogge. 2002. The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyltransferase subunits. *Arch Biochem Biophys* 400: 245-57.

Ticconi, C.A., C.A. Delatorre, and S. Abel. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 963-72.

Ticconi, C.A., and S. Abel. 2004. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci* 9: 548-55.

Tietje, C., and E. Heinz. 1998. Uridine-diphospho-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelopes. *Planta* 206: 72-8.

V

Vallon, O., F.-A. Wollman, and J. Olive. 1986. Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas reinhardtii* and in spinach: an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and a PSII enriched membrane. *Photobiochem Photobiophys* 12: 203-20.

van Besouw, A., and J.F. Wintermans. 1978. Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochim Biophys Acta* 529: 44-53.

Van der Rest, B. 2001. Le métabolisme de la glycérophosphocholine chez les végétaux : caractérisation d'une glycérophosphodiester phosphodiesterase. In PhD thesis. Université J. Fourier, Grenoble.

Vaughn, K.C., and S.O. Duke. 1981. Evaginations from the plastid envelope: a method for transfer of substances from plastid to vacuole. *Cytobios* 32: 89-95.

Vincent, P., L. Maneta-Peyret, B. Sturbois-Balcerzak, M. Duvert, C. Cassagne, and P. Moreau. 1999. One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. *FEBS Lett* 464: 80-4.

Vincent, P., M. Chua, F. Nogue, A. Fairbrother, H. Mekeel, Y. Xu, N. Allen, T.N. Bibikova, S. Gilroy, and V.A. Bankaitis. 2005. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *J Cell Biol* 168: 801-12.

Voelker, D.R. 2003. New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res* 44: 441-9.

W

Wang, X.M., and T.S. Moore. 1990. Phosphatidylcholine biosynthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol* 93: 250-5.

Wang, X.M., and T.S. Moore. 1991. Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm. Intracellular distribution and characteristics of CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase. *J Biol Chem* 266: 19981-7.

Wang, X. 2004. Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7:3 29-36.

Werhahn, W., A. Niemeyer, L. Jansch, V. Krufft, U.K. Schmitz, and H. Braun. 2001. Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from Arabidopsis. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol* 125: 943-54.

Wharfe J., and J.L. Harwood. 1979. Lipid metabolism in germinating seeds. Purification of ethanolamine kinase from soya bean. *Biochim Biophys Acta* 575: 102-11.

Williams, J.P., V. Imperial, M. U. Khan, and J. N. Hodson. 2000. The role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in *Brassica napus* L. leaves. *Biochem J* 349: 127-33

X

Xu, C., H. Härtel, H. Wada, M. Hagio, B. Yu, C. Eakin, and C. Benning. 2002. The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. *Plant Physiol* 129: 594-604.

Xu, C.C., J.L. Fan, W. Riekhof, J.E. Froehlich, and C. Benning. 2003. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. *Embo J* 22: 2370-9.

Xu, C., J. Fan, J.E. Froehlich, K. Awai, and C. Benning. 2005. Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* In press.

Xue H.W., K. Hosaka, G. Plesch, and B. Mueller-Roeber. 2000. Cloning of *Arabidopsis thaliana* phosphatidylinositol synthase and functional expression in the yeast *pis* mutant. *Plant Mol Biol* 42: 757-64.

Y

Yamaryo, Y., D. Kanai, K. Awai, M. Shimojima, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, and H. Ohta. 2003. Light and Cytokinin Play a Co-operative Role in MGDG Synthesis in Greening Cucumber Cotyledons. *Plant Cell Physiol* 44: 844-55.

Yang, W., S. Liu, F.Y. Feng, H.T. Hou, G.Z. Jiang, Y.N. Xu, and T.Y. Kuang. 2004. Effects of phosphate deficiency on the lipid composition in cucumber thylakoid membranes and PSII particles. *Plant Sci* 166: 1575-9.

Yokoi, S., S.-I. Higashi, S. Kishitani, N. Murata, and K. Toriyama. 1998. Introduction of the cDNA for shape *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Mol Breeding* 4: 269-75.

Yu, B., C. Xu, and C. Benning. 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5732-7.

Yu, B., and C. Benning. 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J* 36: 762-70.

Yu, B., S. Wakao, J. Fan, and C. Benning. 2004. Loss of Plastidic Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Causes Embryo-Lethality in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45: 503-10.

Z

Zhang, M., E. Mileykovskaya, and W. Dowhan. 2002. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277: 43553-6.

Zhou, Q., J. Zhao, J.G. Stout, R.A. Luhm, T. Wiedmer, and P.J. Sims. 1997. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 272: 18240-4.

Annexe

Annexe

Publications

- Jouhet, J., E. Maréchal, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* 544 : 63-8
- Jouhet, J., E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167 : 863-74
- Misson, J., K.G. Raghothama, A. Jain, J. Jouhet, M.A. Block, R. Bligny, P. Ortet, A. Creff, S. Somerville, N. Rolland, P. Dumas, P. Nacry, L. Herrera-Estrella, L. Nussaume, and M.-C. Thibaud.** 2005. A wide transcriptional using the *Arabidopsis thaliana* whole genome Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11934-9.
- Bisanz, C., O. Bastien, D. Grando, J. Jouhet, E. Maréchal, and M-F Cesbron-Delauw.** 2005. *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J* In press
- Block, M.A., J. Jouhet, E. Maréchal, O. Bastien, and J. Joyard.** 2005. Role of the envelope membranes in chloroplast glycerolipid biosynthesis. In *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, J. Eaton-Rye and B. Tripathy, eds. *In press*

Communications

- Jouhet, J., E. Maréchal, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. Communication in *FEBS Advanced course "Lipid Signalling and Membrane Traffic"*, June 20-25, 2003, Santa Maria Imbaro.
- Jouhet, J., E. Maréchal, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. Poster in "*1st European Symposium on Plant Lipids*", September 10-13, 2003, Aachen.
- Thibaud, M.-C., J. Misson, J. Jouhet, M.A. Block, K. Raghothama, and L.Nussaume.** 2004. Characterization of the phosphate signal transduction pathway in *Arabidopsis thaliana*. Poster in "*15th International Conference on Arabidopsis Research*", July 11-14, 2004, Berlin
- Jouhet, J., E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast envelope to mitochondria. Poster in "*2nd lipidomics meeting*", September 14-17, 2004, Paris.
- Bisanz, C., J. Jouhet, E. Maréchal, and M.-F. Cesbron-Delauw.** 2005. *Toxoplasma gondii* glycerol and sphingo-lipids: de novo synthesis from apicoplast generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. Poster in "*8th International Congress on Toxoplasmosis*", May 27-31, 2005, Porticcio.
- Jouhet, J., E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2005. Synthèse des galactolipides dans l'enveloppe du chloroplaste. Contribution au développement membranaire de la cellule végétale. Communication in "*journées de la photosynthèse*", June 6-7, 2005, Paris.
- Jouhet, J., E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, and M.A. Block.** 2005. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. Communication in "*2nd European Symposium on Plant Lipids*", August 17-20, 2005, Copenhagen.

ETUDE DES REMANIEMENTS LIPIDIQUES DES CELLULES VEGETALES EN CARENCE DE PHOSPHATE

Dans de nombreux sols, le phosphate est un élément limitant pour la croissance des plantes. En réponse à une carence, les plantes ont développé des processus qui diminuent leur consommation en phosphate et mobilisent leurs réserves de phosphate. Au niveau cellulaire, la carence de phosphate induit une diminution de la teneur en phospholipides, permettant la mobilisation du phosphate contenu dans ces molécules. Cette baisse est compensée par une augmentation de la teneur en lipides non phosphorés tels que le digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Le schéma métabolique, relatif aux échanges de squelettes hydrophobes entre les phospholipides et les glycolipides, est mal connu. Pour comprendre ces remaniements, nous avons donc étudié l'évolution de chaque classe de lipides et leur teneur relative en acides gras, après transfert de cultures cellulaires d'*Acer pseudoplatanus* ou d'*Arabidopsis thaliana*, en milieu dépourvu de phosphate.

Nous avons observé qu'au temps court de la carence de phosphate, la phosphatidylcholine (PC) augmente transitoirement. De plus, un pool de diacylglycérol (DAG), avec la même composition en acide gras que la PC, s'accumule en réponse à la carence de phosphate. Le DAG est donc vraisemblablement en équilibre avec la PC, sans ségrégation pour ses acides gras ; il s'accumule grâce à l'hydrolyse de la PC, puis nourrit la synthèse du DGDG, qui sélectionne les acides gras du DAG par l'intermédiaire des enzymes de synthèse des galactolipides. Nos résultats suggèrent un transfert direct du DAG à partir des membranes non plastidiales vers l'enveloppe des plastes, où celui-ci est rapidement transformé en galactolipides.

Dans les cellules végétales, les galactolipides sont les lipides principaux des membranes plastidiales et jusqu'à présent, ils n'ont jamais été détectés dans des membranes non plastidiales, en conditions standard de culture. En carence de phosphate, la diminution de la teneur en phospholipides, compensée par une augmentation de la teneur en DGDG, nécessite un transfert du DGDG vers des membranes non plastidiales. Nous avons montré que, dans les cellules d'*Arabidopsis*, cultivées en absence de phosphate, une forte proportion de DGDG est présente dans les mitochondries. Nous avons préparé des fractions mitochondriales, dont la pureté a été contrôlée, afin de localiser le DGDG et sa synthèse. En effet, la synthèse du DGDG, à partir du DAG fourni par les phospholipides, est attendue dans la membrane externe de l'enveloppe des plastes. Nous avons vu que la synthèse du DGDG mitochondrial était dépendante de la présence d'enveloppe de plastes et que sa structure était caractéristique de l'activité des DGDG synthases plastidiales. Le transfert du DGDG des plastes vers les mitochondries a été étudié et détecté entre des membranes de l'enveloppe plastidiale associées aux mitochondries et des mitochondries. Ce transfert ne semble pas impliquer le système endomembranaire mais est vraisemblablement dépendant de contacts entre des domaines spécialisés de l'enveloppe des plastes et des mitochondries. Ces contacts sont favorisés au début de la carence de phosphate, lorsque la teneur en DGDG commence seulement à augmenter.

Nos connaissances sur le transfert de lipides entre organites sont faibles. Pour identifier des protéines impliquées dans le schéma métabolique de remaniement des lipides, nous avons collaboré à une analyse transcriptomique du génome d'*Arabidopsis thaliana* en carence de phosphate. Nous avons sélectionné différents candidats engagés dans les modifications des lipides, notamment une phospholipase D, PLD ζ 2, activée dès les temps courts de la carence. La PLD ζ 2 semble impliquée dans le contrôle de la teneur intracellulaire en phosphate inorganique et dans l'hydrolyse de la PC pour l'approvisionnement en DAG de la synthèse des galactolipides.

MOTS CLES : *lipide, DGDG, enveloppe des plastes, mitochondrie, remaniement membranaire, trafic*
