

## Étude autoradiographique de l'incorporation du palmitate $^3\text{H}$ dans les inclusions lipidiques des chloroplastes de *Clivia miniata*

M. J. OLSZEWSKA et E. MIKULSKA

D'après les opinions classiques, la présence des inclusions lipidiques dans les chloroplastes est liée à la dégénération des plastes.

Les recherches cytochimiques sur les chloroplastes de plusieurs plantes supérieures ont montré que les globules lipidiques apparaissent déjà dans les proplastides et subsistent pendant toutes les étapes du développement des chloroplastes. Pour autant les chloroplastes entièrement évolués sont plus riches en inclusions lipidiques que les plastes moins différenciés (Mikulska 1960).

Chez *Clivia miniata* les proplastides et les chloroplastes en voie du développement contiennent des grains d'amidon auprès des minuscules granulations lipidiques, tandis que les chloroplastes mûrs ne renferment que des inclusions lipidiques. Les testes cytochimiques y ont mis en évidence des lipides neutres, des phospholipides et des acides gras (Mikulska 1960).

Récemment, Przełęcka et Dutkowski (1966) ont montré sur le matériel animal que le palmitate radioactif peut être employé pour la détection de la biosynthèse des lipides.

Dans le but de résoudre la question de l'origine des inclusions lipidiques en question, nous nous sommes proposés d'étudier l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$  dans les chloroplastes de *Clivia*. Afin de comparer la radioactivité due à l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$ , nous avons choisi une autre plante — *Billbergia* sp. — dont les chloroplastes au cours de nos expériences étaient doués de grains d'amidon et privés d'inclusions lipidiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

La présence des inclusions lipidiques était vérifiée par la coloration au Soudan noir B ou au mélange de Soudan III et IV.

Nos essais ont porté sur trois fragments des feuilles de *Clivia miniata*, provenant des plantes qui n'étaient pas en période de floraison. D'après les recherches au microscope électronique, le fragment le plus basal contient des proplastides doués de corps prolamellaire; dans le fragment suivant survient la différenciation du système membranaire des granas et du stroma; le troisième fragment renferme des chloroplastes entièrement développés (Mikulska 1964; les schémas — v. Olszewska et Mikulska 1965).

Par égard aux résultats préliminaires obtenus sur *Clivia miniata*, nous n'avons pris en considération chez *Billbergia* sp. que des chloroplastes entièrement différenciés. L'absence d'inclusions lipidiques dans les chloroplastes du mésophylle chez *Billbergia* a été constatée par les méthodes mentionnées ci-dessus; les chloroplastes étaient remplis de nombreux et volumineux grains d'amidon.

Les fragments des feuilles ont été placés verticalement dans de l'eau de robinet additionnée de palmitate de Na tritié ( $10\mu$  C et  $0,03 \mu\text{M/ml}$ ). Nous avons constaté antérieurement que dans ces conditions les cellules restent en état vivant (Olszewska et Mikulska 1964). La durée d'incubation pour *Clivia miniata* a été de 15 min. ou d'une heure, pour *Billbergia* — 1 heure.

Le matériel a été fixé pendant 20 heures dans le formol — calcium de Baker; ce fixateur conserve bien les lipides et peut être employé dans l'autoradiographie (Olszewska et Szpilka, non publ.). Le matériel témoin a été fixé dans un mélange d'alcool absolu et d'acide acétique glacial (3 : 1) et ensuite soumis à l'extraction des lipides. L'extraction a été effectuée par l'action de la pyridine (30 min. à la température du laboratoire et 24 heures à  $60^\circ\text{C}$ ), ou par le procédé suivant: 1° — éthanol à 96%, 30 min. à  $4^\circ\text{C}$ , 2° — éthanol à 90%, 15 min. à la température de l'ébullition, 3° — mélange éthanol-chloroforme (1 : 1), 12 heures à la température du laboratoire.

Les fragments des feuilles, soigneusement lavés dans de l'eau de robinet, ont été inclus dans la paraffine. Les coupes, d'une épaisseur de  $5\mu$ , parallèles à la surface des feuilles, ont été immergées durant 1 heure dans une solution aqueuse de palmitate de Na non radioactif, afin d'éliminer le palmitate  $^3\text{H}$  libre, non incorporé dans les cellules. Après ce traitement, les préparations ont été lavées pendant 24 heures dans de l'eau courante, passées par l'eau distillée et recouvertes d'émulsion Ilford K5 „in gel form”.

Le temps d'exposition a été de 5 semaines. Certaines préparations, après la dénaturation de l'émulsion par l'alcool, ont été colorées par le mélange d'Unna.

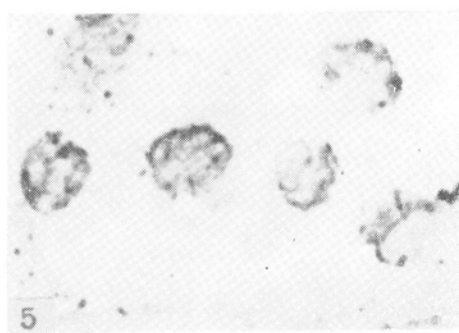
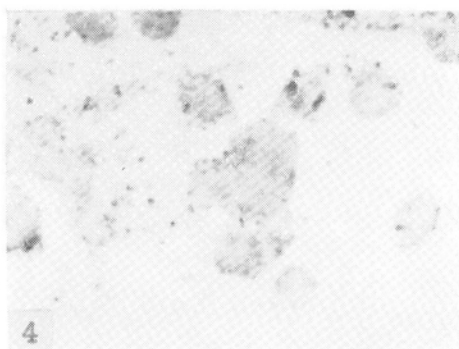
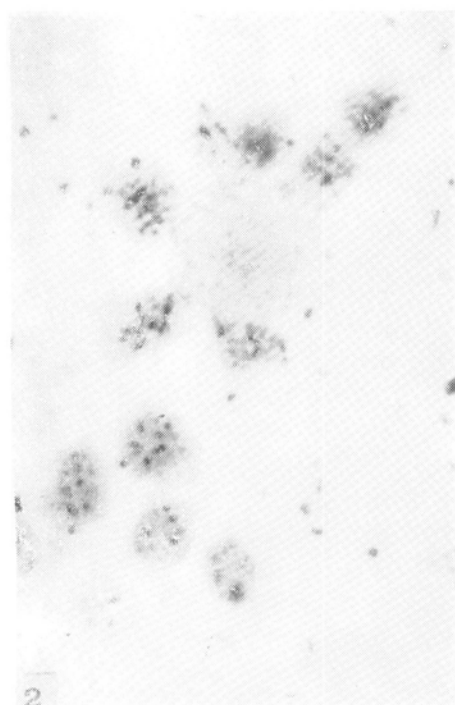
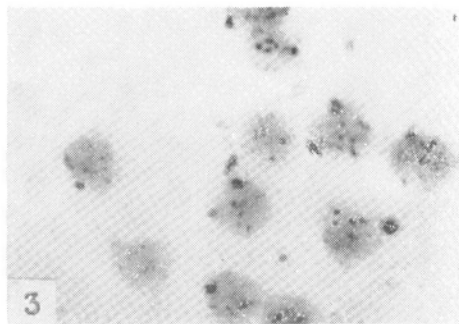
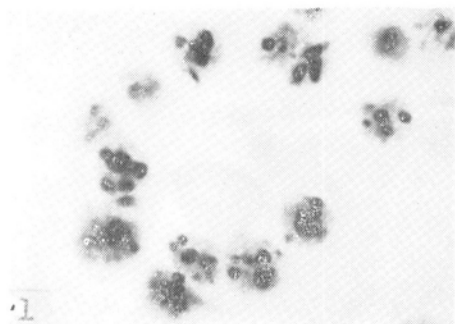
## RÉSULTATS

### *Clivia miniata*

Quel que soit le temps d'incubation, les proplastides ne montrent pas de marquage. Celui-ci apparaît dans les chloroplastes au cours de différenciation (pl. I, fig. 3) et devient considérable dans les chloroplastes mûrs (pl. I, fig. 2). Dans le cytoplasme de tous les fragments étudiés aussi bien après 15 min. d'incubation qu'après 1 heure, il n'y a pas de radioactivité décelable.

Les chloroplastes entièrement développés renferment d'abondantes inclusions lipidiques (pl. I, fig. 1). Leur forme et leur dimension varient des petites et nombreuses granulations qui se trouvent à l'intérieur des chloroplastes jusqu'aux gouttelettes relativement grosses qui alors remplissent presque tout le chloroplaste. Il arrive que les lipides débordent les chloroplastes.

# Planche I



- fig. 1. *Clivia miniata*, les chloroplastes entièrement différenciés; les inclusions lipidiques colorées par le mélange de Soudan III et IV.
- fig. 2. *Clivia miniata*, les chloroplastes entièrement différenciés; l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$  après 1 heure d'incubation.
- fig. 3. *Clivia miniata*, les chloroplastes au cours du différenciation; l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$  après 1 heure d'incubation.
- fig. 4. *Clivia miniata*, les chloroplastes entièrement différenciés; l'incubation avec le palmitate  $^3\text{H}$  pendant 1 heure, l'extraction des lipides par la pyridine.
- fig. 5. *Billbergia* sp., les chloroplastes entièrement différenciés; l'incubation avec le palmitate  $^3\text{H}$  pendant 1 heure.

Dans les autoradiogrammes du matériel fixé par le formol-calcium, les inclusions lipidiques sont bien visibles grâce à leur réfringence considérable. Dans la plupart des chloroplastes les grains noircis de l'émulsion sont localisés au-dessus des gouttelettes lipidiques. La répartition des grains noircis ressemble à celle des inclusions lipidiques. Les grains noircis peuvent être: 1° — dispersés uniformément au-dessus des chloroplastes, 2° — agglomérés au-dessus des chloroplastes, 3° — situés en dehors, où ils adhèrent à leurs bords, ce qui correspondrait à une coupe optique du chloroplaste. Dans les chloroplastes moins différenciés, contenant moins de lipides (Mikulska 1960), les grains noircis sont le plus souvent dispersés (pl. I, fig. 3).

Dans le matériel privé de lipides à la suite du traitement à la pyridine ou à l'éthanol-chloroforme, la quantité considérable de la radioactivité disparaît (pl. I, fig. 4). Il faut noter que dans ce cas on constate l'augmentation du marquage du fond, ce qu'il est dû probablement à l'adsorption partielle du matériel radioactif au cours de l'extraction.

#### *Billbergia* sp.

La radioactivité des préparations a été presque nulle (pl. I, fig. 5). L'intérieur des chloroplastes occupé par des grains d'amidon est clair, seulement leur périphérie se colore par les colorants basiques employés (pl. I, fig. 5).

### DISCUSSION

Nos résultats montrent une corrélation entre la présence et la quantité d'inclusions lipidiques dans les chloroplastes et l'intensité de l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$ .

Le palmitate peut être incorporé aussi bien dans les lipides constitutifs que dans les lipides de réserve. Dans nos expériences la première possibilité paraît peu probable en raison de l'incorporation relativement faible dans les chloroplastes au cours du développement. S'il s'agissait de l'incorporation du palmitate dans les lipides constitutifs, on pourrait s'attendre à une radioactivité considérable dans les chloroplastes qui sont en voie de formation de leur système membranaire lipoprotéique.

Les chloroplastes de *Billbergia* qui possèdent un système membranaire lipoprotéique définitivement différencié, mais qui sont privés d'inclusions lipidiques, ne montrent pas, dans nos conditions expérimentales, d'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$ . Par contre, les chloroplastes mûrs de *Clivia miniata*, dont l'ultrastructure membranaire est analogue à celle des chloroplastes étudiés chez *Billbergia*, mais qui sont pourvus d'inclusions lipidiques, incorporent intensément le palmitate  $^3\text{H}$ .

L'analyse cytochimique des inclusions lipidiques dans les chloroplastes de *Clivia miniata* a montré qu'elles contiennent des acides gras, des lipides neutres et des phospholipides (Mikulska 1960). D'après les recherches de Przełęcka et Dutkowski (1966), ces composés dans les ovarioles de *Galleria mellonella* deviennent radioactifs après 30 min. d'incubation avec le palmitate  $^{14}\text{C}$ ; la radioactivité a été

trouvée surtout dans les acides gras et dans les lipides neutres, les phospholipides présentaient aussi une certaine activité.

Le marquage presque nul du cytoplasme des feuilles permet de considérer les chloroplastes de *Clivia miniata* comme premier lieu de l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$ .

En conclusion, nos résultats concernant l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$  dans les chloroplastes apportent un argument en faveur de l'idée que dans le matériel étudié les inclusions lipidiques sont élaborées in situ par les chloroplastes.

## RÉSUMÉ

On a étudié par autoradiographie l'incorporation du palmitate  $^3\text{H}$  dans les chloroplastes de *Clivia miniata* pourvus d'inclusions lipidiques et dans les chloroplastes de *Billbergia* sp. qui en sont privés. On a constaté une certaine corrélation entre la présence et l'abondance d'inclusions lipidiques et l'intensité du marquage des chloroplastes. Les chloroplastes de *Billbergia* sp. n'incorporent pas le palmitate  $^3\text{H}$ .

Laboratoire de Cytochimie  
Université de Łódź  
Łódź, Nowotki 18, Pologne

## BIBLIOGRAPHIE

- Mikulska E., 1960, Inkluzje tłuszczowe w chloroplastach, Acta Soc. Bot. Pol. 29:431—455.  
Mikulska E., 1964, Badania nad ultrastrukturą komórek liści *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp. ze szczególnym uwzględnieniem chloroplastów, wyd. Uniwersytet Łódzki.  
Olszewska M. J., Mikulska E., 1964, Étude autoradiographique de l'incorporation de la thymidine  $^3\text{H}$ , de l'uridine  $^3\text{H}$  et de la phénylalanine  $^3\text{H}$  dans les chloroplastes de *Clivia miniata* et *Bilbergia* sp., Experientia 20:267.  
Olszewska M. J., Mikulska E., 1965, Badania autoradiograficzne nad wpływem światła na włączanie tymidyny  $^3\text{H}$  do chloroplastów w różnych stadiach rozwojowych, Acta Soc. Bot. Pol. 34:225—234.  
Przełęcka A., Dutkowski A., 1965, Autoradiographic investigation of incorporation of fatty acids into the lipids of insect ovarioles, Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II, série biol. 13:573—575.

*Badania autoradiograficzne nad włączaniem palmitynianu  $^3\text{H}$  do inkluzji lipidowych w chloroplastach Clivia miniata*

## Streszczenie

Badano metodą autoradiograficzną włączanie palmitynianu  $^3\text{H}$  do chloroplastów *Clivia miniata* zawierających inkluzje lipidowe oraz do chloroplastów *Billbergia* sp., które ich nie posiadają. Stwierdzono zależność między występowaniem inkluzji lipidowych a intensywnością znakowania się chloroplastów. Chloroplasty *Billbergia* sp. nie włączają palmitynianu  $^3\text{H}$ .