

INDUCTION D'UN CYTOCHROME DU TYPE P_{450} ET DE PÉROXYDASE DURANT LA SURVIE DU TUBERCULE DE POMME DE TERRE

MICHÈLE GILEWICZ COTTE-MARTINON, VÉRONIQUE YÁHIEL et GASTON DUCET

Laboratoire de Physiologie Cellulaire U.E.R. de Luminy 70, Route Léon Lachamp,
13288 Marseille Cedex 2, France

(Received 14 January 1974)

Key Word Index—*Solanum tuberosum*; Solanaceae; Cytochrome P_{450} ; Cytochrome b_5 ; peroxidase; ageing.

Abstract—During the ageing of potato tubers, a labile cytochrome of the P_{450} type appears, always accompanied by the presence of P_{420} -type pigment. This induction of P_{450} coincides with an increase in peroxidase activity together with an increase in the amount of cytochrome b_5 .

Résumé—Pendant la survie du tubercule de pomme de terre apparaît un pigment de type P_{450} , labile et toujours accompagné d'un pigment P_{420} . Cette induction de P_{450} est accompagnée de l'apparition d'une activité peroxydasique et d'un accroissement de la quantité de cytochrome b_5 .

INTRODUCTION

Nous avons observé pendant la survie (ageing) du tubercule de pomme de terre, dans la fraction microsomale, outre l'augmentation de la concentration en cytochrome b_5 ,¹ l'apparition d'une activité peroxydasique et de pigments du type P_{450} et P_{420} . L'apparition du P_{450} pendant la survie est à relier plus ou moins directement à l'activité de désaturation de l'acide oléique observée par Abdelkader *et al.*² et aux inductions de stérols décrites par Hartmann *et al.*³

RESULTATS ET DISCUSSION

L'observation des microsomes par spectroscopie différentielle montre, au cours de la survie, une augmentation de la teneur en cytochrome b_5 et une apparition de pigments de type P_{450} . Il se développe également une activité peroxydasique. Le P_{450} est toujours accompagné de P_{420} qui semble un produit de dégradation du premier.

Activité peroxydasique

Les microsomes de tubercule avant survie n'ont pas d'activité peroxydasique. Celle-ci apparaît très rapidement puisqu'elle est déjà nette après 2 hr de survie et elle atteint un maximum à la 14e heure de survie (Fig. 1). Les microsomes traités par les solutions salines (KCl 2M) ou par l'EDTA (0,005 M) perdent seulement une partie de l'activité peroxydasique. Ceci peut être dû: soit à l'existence de plusieurs peroxydases liées plus ou moins fortement aux membranes microsomales; soit à la localisation orientée d'une seule peroxydase.

¹ COTTE-MARTINON, M., DIANO, M., MEUNIER, D. et DUCET, G. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.* **15**, 279.

² BEN ABDELKADER, A., CHERIF, A., DEMANDRE, C. et MAZLIAK, P. (1973) *European J. Biochem.* **32**, 155.

³ HARTMANN, M. A. and BENVENISTE, P. (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris* **276**, D, 3143.

Les microsomes de nos préparations se présentent en microscopie électronique sous forme de vésicules closes.¹ Nous pouvons admettre que la vésiculation a pu se faire de telle sorte que certaines vésicules aient la peroxydase à l'extérieur donc extractible par les solutions ioniques, tandis que pour d'autres vésicules, la localisation à l'intérieur la rendrait inaccessible.

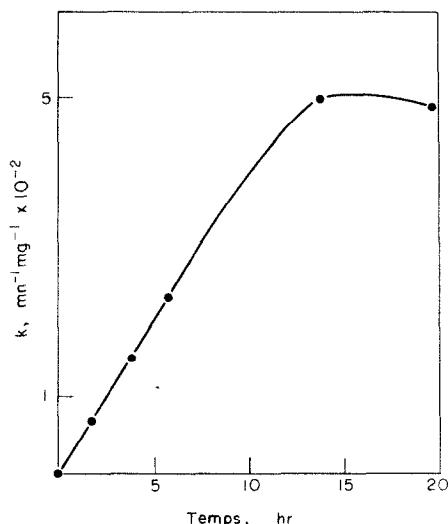


FIG. 1. ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE DANS LES MICROSMES DE POMME DE TERRE.
Variation de la constante de vitesse de peroxydation en fonction du temps de survie. K en $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de protéines⁻¹. Temps de survie en heures.

Augmentation de la concentration en cytochrome b₅

La teneur en cytochrome b₅ augmente pendant la survie comme nous l'avions déjà observé;¹ la Fig. 2 montre les spectres de différence (oxydé-réduit à l'hydrosulfite) de microsmes avant (courbe 1) et après (courbe 2) survie. Ils correspondent à un cytochrome de type b₅ accompagné d'autres pigments absorbant vers 450-455 nm. Le minimum observé entre 465-490 nm correspond à la présence de flavoprotéines, ce qui a été vérifié par mesure de fluorescence. Mais la diffusion de lumière provoque également des déformations de spectres et nous n'avons pas calculé la quantité des flavoprotéines présentes. Nous avons seulement observé qualitativement un accroissement de fluorescence liée aux flavoprotéines durant la survie.

La présence de caroténoïdes, en particulier β lutéine⁴ dans les microsmes peut perturber les spectres d'absorption en déformant la bande de Soret du cytochrome b₅.

Cytochrome de type P₄₅₀

La Fig. 3 montre les spectres de différence (réduit en présence de CO contre réduit) des microsmes avant (courbe 1) et après (courbe 2) survie. Après survie, deux bandes nettes apparaissent centrées à 452 et 420 nm avec un autre maximum vers 575 nm et des variations d'absorption ininterprétables dans le reste du spectre. Avant survie, nous observons également des maxima d'absorption vers 421 et 450 nm mais nettement moins intenses.

⁴ COSTES, C. (Communication personnelle).

Il semble donc que la survie induise l'apparition de deux pigments qui s'apparentent aux P₄₅₀ et P₄₂₀, induits par divers agents dans les microsomes de tissus animaux⁵⁻⁷ et au P₄₅₀ observé dans l'*Arum*.⁸ L'allure générale des spectres rend difficile l'utilisation de points isobestiques et donc l'application des formules d'Omura et Sato pour le calcul des quantités de P₄₅₀ et P₄₂₀ présentes.

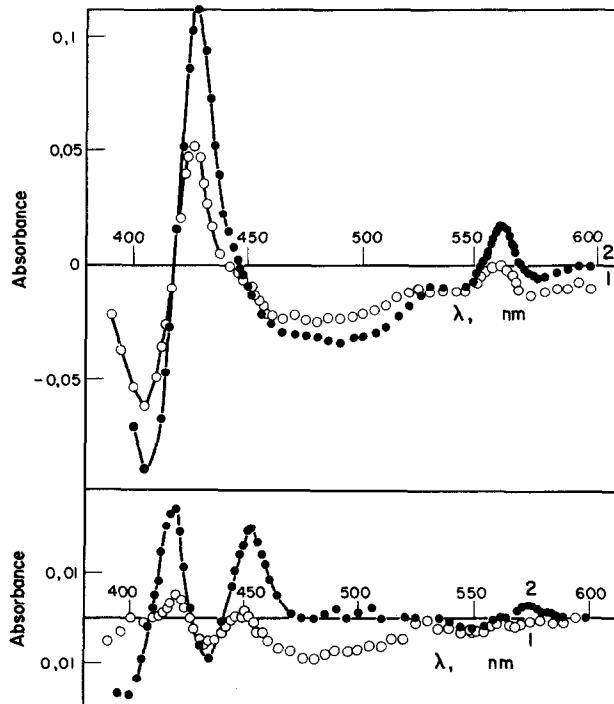


FIG. 2. SPECTRES DIFFÉRENTIELS DU CYTOCHROME b₅ DANS LES MICROSMES DE POMMES DE TERRE, OXYDÉ CONTRE RÉDUIT À L'HYDROSULFITE DE Na.

Trajet optique: 10 mm. Courbe 1 ○—○ microsomes frais (6 mg de protéines par ml); courbe 2 ●—● microsomes après 24 hr de survie (5,5 mg de protéines par ml).

FIG. 3. SPECTRES DIFFÉRENTIELS DES CYTOCHROMES P₄₅₀ ET P₄₂₀ DANS LES MICROSMES DE POMMES DE TERRE.

Trajet optique 10 mm. Courbe 1 ○—○ microsomes frais (6 mg de protéines par ml); courbe 2 ●—● microsomes après 24 hr de survie (5,5 mg de protéines par ml).

L'induction par la survie du P₄₅₀ et du P₄₂₀ n'a pas été toujours nette. Elle semble liée à l'état de conservation du tubercule et dépendrait de conditions physiologiques mal définies. Ce n'est qu'à partir du 6e mois de conservation à environ 10° que l'induction commence à être observée après survie. De plus, dans des préparations obtenues à partir de tubercules ayant 10 mois de conservation à la température ordinaire, nous observons la présence nette de P₄₅₀ et P₄₂₀ dans les microsomes, même sans survie. Quelques essais

⁵ IMAI, Y. and SIEKEVITZ, P. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 143.

⁶ FUJITA, T. and MANNERING, G. J. (1971) *Chem. Biol. Interactions* **3**, 264.

⁷ MCLEAN, A. E. M. and MARSHALL, W. J. (1971) *Biochem. J.* **123**, 28.

⁸ YAHIEL, V., GILEWICZ COTTE-MARTINON, M. and DUCET, G. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1649.

indiquent que le P₄₅₀ apparaît déjà après 6 hr de survie et qu'au-delà de 15 hr de survie les résultats sont peu reproductibles. Ceci est en corrélation avec un brunissement des tranches de tubercules qui se manifeste à partir de la 14e heure de survie.

Lorsque les enregistrements spectrophotométriques sont répétés toutes les 10 mn sur un même échantillon, nous observons un accroissement de la bande d'absorption à 420 et une diminution de celle à 450 nm, ce qui indique une dégradation du P₄₅₀. Dans les mêmes conditions, le P₄₅₀ d'*Arum* est plus stable.⁸

L'absorption observée à 575 nm semble en corrélation avec l'absorption à 420 nm plutôt qu'avec celle à 450. Nous pensons que l'absorption à 420 en présence de CO peut correspondre à un pigment du type P₄₂₀ et également au complexe oxyde de carbone-péroxydase. Une telle bande a été observée par Bonner et Plesnicar⁹ sur la fraction mitochondriale d'hypocotyles de haricot et de spadices de "skunk cabbage" et attribué à la péroxydase présente.

Instabilité du système microsomal de la pomme de terre

Alors que les préparations microsomales d'*Arum* renferment relativement peu de P₄₂₀,⁸ celles de Pomme de terre montrent généralement plus de P₄₂₀ que de P₄₅₀ et la destruction de ce pigment est relativement rapide. Toutes les modifications de milieux de broyage ou de lavage que nous avons testées n'ont pas permis jusqu'à présent d'obtenir des microsomes enrichis en P₄₅₀ ou dans lesquels ce pigment serait plus stable. Nos essais de fractionnement sur gradient de saccharose des microsomes "bruts" ont mis en évidence deux bandes: une de couleur jaune ($1.06 < d < 1.12$), l'autre de couleur beige ($1.12 < d < 1.19$) et un culot beige ($d > 1.19$). L'étude spectrale de ces trois fractions a montré une diminution notable des cytochromes P₄₅₀ et P₄₂₀.

Nous avons pensé que le système microsomal de la Pomme de terre préparé dans nos conditions était instable. Des recherches de Cotte-Martinon¹⁰ ont montré que des phénomènes d'autoxydation se manifestaient dans les microsomes du tubercule de Pomme de terre aboutissant en particulier à la destruction des caroténoïdes et d'acides gras non saturés.

Des essais ont été conduits pour mettre plus directement en évidence cette instabilité: nous avons fait des mélanges de suspensions de microsomes d'*Arum* et de Pomme de terre et suivi les transformations du P₄₅₀ et du P₄₂₀ en fonction du temps. Les résultats sont reportés dans la Fig. 4 et montrent qu'effectivement le P₄₅₀ de l'*Arum* se transforme plus vite en P₄₂₀ que cela n'avait été observé pour les microsomes de l'*Arum* seul.⁸ Les microsomes d'*Arum* utilisés dans cet essai contenaient 94 p-mol de P₄₅₀ et 10 p-mol de P₄₂₀ par mg de protéine, tandis que ceux de Pomme de terre renfermaient respectivement 34 et 33 p-mol par mg de protéine. La contribution spectrale des microsomes de pomme de terre ne peut donc expliquer la formation du P₄₂₀ au cours du temps. Cependant la Fig. 4 B montre qu'après 45 mn une bande à 485 nm apparaît dans le spectre de différence. Par analogie avec les résultats obtenus par l'un de nous¹⁰ cette bande pourrait correspondre à la disparition de caroténoïdes dans l'échantillon simplement réduit, tandis qu'en présence d'oxyde de carbone cette destruction n'aurait pas lieu ou serait moindre. Dans ces conditions deux autres bandes dues aux caroténoïdes doivent exister: l'une vers 460 nm à peu près égale en intensité à celle à 485 nm mais masquée par la bande du P₄₅₀, l'autre vers 430 nm, de faible intensité et donc ne modifiant pas la bande du P₄₂₀. Il en résulte

⁹ PLESNICAR, M., BONNER, W. D. and STORY, B. T. (1967) *Plant Physiol.* **42**, 3.

¹⁰ GILEWICZ COTTE-MARTINON, M. (1974) Thèse de Doctorat de 3ème cycle U. E. R. De Luminy-Marseille,

que l'absorption réelle du P₄₅₀ est plus faible que celle mesurée dans le spectre de différence: la disparition du P₄₅₀ serait plus importante que ne le montre la variation d'absorbance à 450 nm.

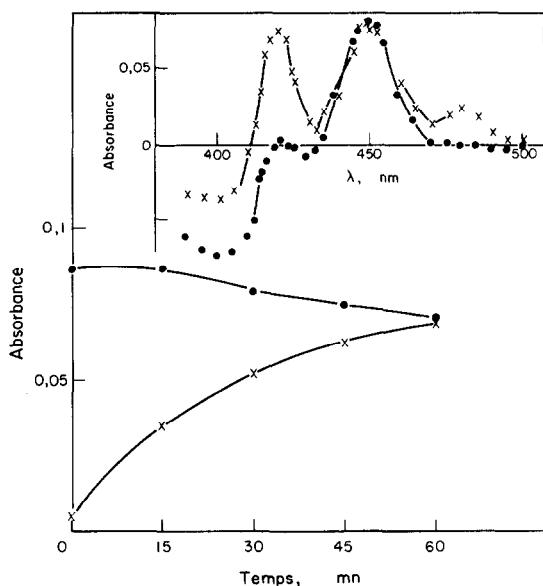


FIG. 4. EVOLUTION SPECTRALE DU MÉLANGE DE MICROSMES D'*Arum* (Ar) ET DE POMME DE TERRE (Pt) EN FONCTION DU TEMPS.

Trajet optique 10 mm; 8,5 mg de protéine Ar et 1,6 mg de protéine Pt. (A) Evolution en fonction du temps: ●—● absorbance à 450 mμ par rapport à la ligne de base; ×—× absorbance à 420 mμ par rapport à la ligne de base. (B) Spectres différentiels (réduit contre réduit + CO), au moment du mélange ●—● et 45 mn après ×—×

Nos résultats permettent donc de penser que la survie induit une synthèse de pigment analogue au P₄₅₀ qui se dégrade partiellement en P₄₂₀ dans nos conditions de préparation des microsmes. Nous pensons avoir ainsi nettement montré que les cytochromes de type P₄₅₀ se trouvent chez les cellules des végétaux supérieurs comme dans les cellules animales. Dans ce dernier cas, ils sont associés à des systèmes de transfert d'électrons et souvent induits par des apports de substances étrangères. Leur apparition est interprétée comme liée à des processus de détoxicification. Nos observations indiquent que la présence du P₄₅₀ est nette dans un organisme à métabolisme très spécial (le spadice d'*Arum* en maturation) et dans les tranches de tubercules en survie. Nous avons également trouvé sa présence dans des tubercules conservés longtemps. Le P₄₅₀ pourrait donc chez les végétaux être considéré comme associé à des étapes particulières du développement ce qui explique les incertitudes passées quant à sa présence. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Abdelkader *et al.*² montrant l'induction, pendant la survie du tubercule de Pomme de terre, d'une désaturase de l'acide oléique, liée aux microsmes et dépendant d'un pyridine nucléotide réduit et d'oxygène pour son fonctionnement. Hartmann et Benveniste³ ont aussi observé une synthèse nette de stérols pendant la survie. Ces deux types de phénomène (désaturation oxydative et hydroxylation) sont des propriétés du système microsomal des cellules animales, dans lesquels le P₄₅₀ est présent. Nous pensons que des systèmes analogues peuvent être présents dans les cellules des végétaux supérieurs.

METHODES EXPERIMENTALES

Matériel. Les tubercules de pommes de terre (*Solanum tuberosum* variété Bintje) ont été entreposés soit en chambre froide (2 à 4°) soit en cave (10°). Pour chaque essai, 2 kg de tubercules pelés sont découpés en tranches de 2 mm d'épaisseur.

Méthodes de préparations. Un lot de 500 g est broyé immédiatement et le fractionnement cellulaire est réalisé par la méthode de Ducet *et al.*¹¹ Le reste des tranches est placé dans un bain d'eau ordinaire, constamment renouvelée, maintenu à 25° et fortement aéré avec de l'air comprimé filtré. Après des séjours de 2 à 24 hr, des échantillons sont prélevés, puis traités comme précédemment. Le poids des échantillons est corrigé pour l'absorption d'eau (25-30% du poids initial après 4 hr) pour faire des comparaisons le plus quantitativement possible. La fraction microsomale brute est obtenue par centrifugation 1 hr à 40000 g après sédimentation de la fraction mitochondriale (20 mn à 10000 g). Des essais de résolution ont été tentés sur un gradient discontinu de saccharose (densité 1,06, 1,12, 1,19). Les microsomes sont remis en suspension dans divers milieux: glycérol 30%, Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 ou KCl 0,15 M ou saccharose 0,3 M avec et sans Sérum Albumine Bovine (1%).

Dosages. Les protéines sont dosées par la méthode du Biuret.¹² Les cytochromes sont appréciés par spectrophotométrie comme précédemment décrit.⁸ L'activité peroxydase est déterminée avec la méthode de Chance et Maehly.¹³

¹¹ DUCET, G. L., COTTE-MARTINON, M., COULOMB, P., DIANO, M. and MEUNIER, D. (1970) *Physiol. Vég.* **8**, 35.

¹² STICKLAND, L. H. (1951) *Microbiol.* **5**, 698.

¹³ CHANCE, B. and MAEHLY, A. C. *Methods in Enzymology* (ESTABROOK, R. W. et PULLMAN, M. E., eds), Vol. 2, p. 764. Academic Press, London.