

LES α -GALACTOSIDES DU SACCHAROSE AU COURS DE LA GERMINATION DES GRAINES DE BETTERAVES SUCRIÈRES ET FOURRAGÈRES

MICHEL GENDRAUD et DOMINIQUE CLOUX

Laboratoire de Phytomorphogenèse, C.N.R.S., 4, rue Ledru, 63000 Clermont-Ferrand, France;
I.U.T., Complexe Universitaire des Cézeaux, B.P. 29, 63170 Aubière, France

(Reçu le 8 janvier 1979)

Key Word Index—*Beta vulgaris*; Chenopodiaceae; sugar beet; forage beet; differential metabolism; sucrose; sucrose α -galactosides; UDPGal.

Abstract—During the first three hours of beet seed germination, sucrose α -galactosides briefly appear while sucrose and UDPGal contents decrease. The ^{14}C -sucrose penetration into 12-hour-old embryos is followed by a partial eclipse of this compound and its replacement by sucrose α -galactosides. These two processes are more important in sugar than in forage beet. The significance of these results in sugar metabolism is discussed.

INTRODUCTION

Les α -galactosides du saccharose (raffinose, stachyose, verbascose) sont souvent considérés comme des glucides de réserve dans les graines, sèches ou en développement [1-3]. On retrouve le premier terme de la série, le raffinose, parmi les translocats, au niveau des tubes criblés, où il accompagne le saccharose [4]; il provient de la réaction du disaccharide avec l'uridine diphosphogalactose (UDPGal) [5]. Chez la Betterave, il constitue une part non négligeable des sucres solubles du tubercule au moment de la récolte [6]. Dans le cadre d'une étude comparée du métabolisme des embryons et des jeunes plantes de Betteraves fourragères et sucrières, nous avons constaté que, dès les premiers stades du développement, ces glucides sont susceptibles de présenter une importance particulière.

Nous rapportons ici des résultats préliminaires concernant les teneurs en saccharose, en α -galactosides du saccharose et en UDPGal des graines pendant l'imbibition et des jeunes embryons de 12 hr. Un aspect dynamique est apporté par l'étude de la radioactivité des glucides concernés à la suite de l'administration de ^{14}C -saccharose aux embryons et par la mesure de l'activité α -galactosidase des graines au cours de l'imbibition.

RÉSULTATS

Evolution des 'pools' de saccharose, d' α -galactosides du saccharose, d'UDPGal et de l'activité α -galactosidase des graines de Betteraves au cours des premières heures de la germination

Les résultats sont regroupés dans la Fig. 1. Dans la graine sèche, parmi les métabolites dosés, seuls le saccharose et l'UDPGal sont détectables. Dans la graine de type sucrier, pendant l'imbibition, les teneurs de ces deux composés diminuent alors qu'apparaissent les α -galactosides du saccharose. Au delà de 45 min, le 'pool' des oligosaccharides s'amenuise alors que l'activité de l' α -galactosidase tend vers une valeur maximale. Les premiers instants de la germination correspondent donc

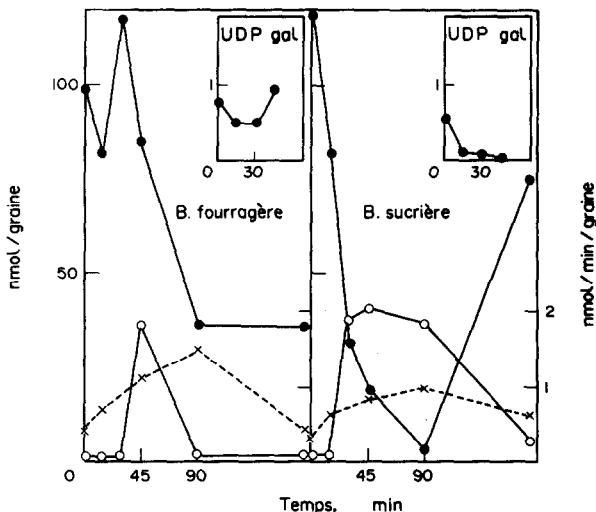


Fig. 1. Evolution des teneurs en saccharose (●), en α -galactosides du saccharose (○), en UDPGal (●, dans l'encadré) et de l'activité α -galactosidase (×) des graines de Betteraves fourragères et sucrières au cours de la germination. Les teneurs sont exprimées en nmol par graine. L'activité enzymatique est exprimée en nmol de nitrophényl- α -D-galactopyranoside hydrolysées par min et par graine.

à la mise en place d'un 'pool' d' α -galactosides du saccharose. Les substrats nécessaires sont présents dans la graine sèche, et le contact avec l'eau permettrait la réaction de synthèse ainsi que l'établissement d'un système de régulation de la taille de ce 'pool' par l'augmentation de l'activité de l'hydrolase correspondante.

Dans la graine de type fourrager, l'évolution des teneurs en métabolites est moins marquée. Cependant, on observe une légère diminution de la quantité d'UDPGal qui se manifeste avant l'apparition des α -galactosides du saccharose. Cette dernière, plus tardive et plus brève que dans le cultivar sucrier coïncide avec le début de la diminution du 'pool' de saccharose. L'activité α -galactosidase passe par un maximum à 90 min,

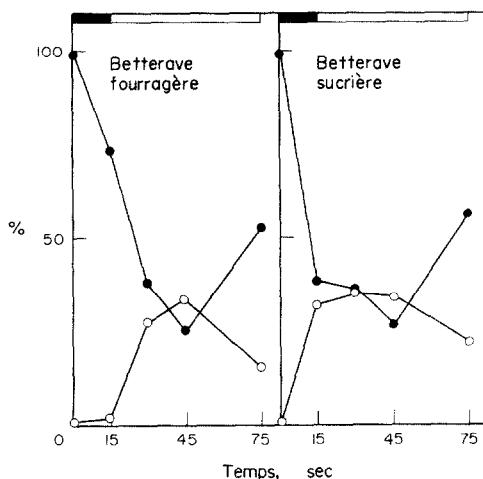


Fig. 2. Répartition de la radioactivité hydro-alcoololo-soluble incorporée dans les embryons de Betteraves fourragères et sucrières à la suite d'une incubation de 15 sec au contact d'une solution de ^{14}C -saccharose $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (■) suivie d'un transfert sur une solution de saccharose 2×10^{-4} non radioactif (□). Les radioactivités du saccharose (●) et des α -galactosides du saccharose (○) de l'extrait sont seules représentées. Elles sont exprimées en pourcentage de la radioactivité hydro-alcoololo-soluble totale.

comme pour la graine de type sucrier, mais ici, elle est plus importante, et il est possible que cette abondance explique le peu de temps pendant lequel le 'pool' des oligosaccharides est décelé dans la variété fourragère.

Répartition métabolique de la radioactivité incorporée dans les glucides d'embryons marqués par le ^{14}C -saccharose

Le contact très bref (15 sec) d'embryons avec une solution de ^{14}C -saccharose $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ suivi d'une incubation plus ou moins longue du matériel végétal dans une solution de saccharose $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ non radioactif permet d'appréhender le devenir métabolique précoce du disaccharide. La Fig. 2 montre que le saccharose subit une sorte d'éclipse partielle dans les dizaines de sec qui suivent le début du marquage. Au même moment, la radioactivité des α -galactosides du saccharose, dont la nature a été vérifiée par une incubation en présence d'une α -galactosidase du commerce suivie d'une chromatographie, passe par un maximum. Quelques dizaines de sec plus tard, la radioactivité du saccharose augmente à nouveau alors que celle des α -galactosides diminue. Cette évolution très rapide se retrouve dans les deux cultivars, mais selon des modalités différentes. En effet, l'apparition d'oligosaccharides est plus précoce et plus intense dans l'embryon sucrier que dans l'embryon fourrager.

Il est toujours délicat d'exclure complètement l'hypothèse de la contribution d'un métabolisme microbien lors d'expériences de marquage d'une durée aussi brève. Cependant toutes les graines sont stérilisées et les traitements sont effectués dans des conditions axéniques [7]. Les embryons isolés avec les mêmes précautions peuvent être placés sur des milieux de culture appropriés; ils poursuivent leur développement sans que se révèlent des contaminations bactériennes ou fongiques. De plus, le profil d'évolution de la radioactivité à la suite du marquage est reproductible et caractéristique du cultivar étudié. Il est donc vraisemblable que ces résultats

réfèrent un métabolisme propre à l'embryon de Betterave et il se trouve que, sans préjuger de la signification physiologique de ces données, dans ce matériel, le saccharose exogène radioactif subit un destin assez semblable à celui du saccharose endogène disponible dans la graine sèche avant imbibition.

DISCUSSION

Dès la reprise du développement, dans la graine de Betterave, un métabolisme des α -galactosides du saccharose est en place. Ces molécules semblent avoir une durée de vie limitée et l'on peut se demander si l'existence d'un 'pool' d'oligosaccharides est encore décelable après 3 hr d'imbibition. Quelques essais préliminaires ont montré que, au-delà de cette période, on note une réapparition de ces glucides. D'autre part, les α -galactosides du saccharose constituent un 'pool' de taille mesurable dans l'embryon de 12 hr où l'UDPGal est également présent (Tableau 1). La synthèse de ces molécules n'est certainement pas la seule voie métabolique possible pour le saccharose et il ne faut pas ignorer

Tableau 1. Teneurs des embryons de 12 hr en saccharose, en α -galactosides du saccharose et en UDPGal

	Saccharose -(nmol/embryon)	α -Galactosides (nmol/embryon)	UDPGal (nmol/embryon)
Betterave fourragère	50 ± 3	10 ± 1	0.10 ± 0.01
Betterave sucrière	70 ± 5	12 ± 1	0.11 ± 0.01

l'existence éventuelle d'activités invertase et saccharose-synthétase susceptibles de réguler la taille du 'pool' du disaccharide. Cependant, les résultats obtenus à la suite de marquages brefs des glucides de l'embryon de 12 hr montrent que, à ce stade, et durant les premiers instant de la pénétration du saccharose exogène, la synthèse d' α -galactosides à turn-over rapide est une voie privilégiée de ce métabolisme. La signification physiologique de l'éclipse partielle du saccharose qui en résulte est posée.

Il semble que la formation d' α -galactosides du saccharose, soit pour le matériel végétal étudié, liée aux mouvements de saccharose. Très rapidement marqués dans l'embryon qui absorbe le disaccharide, ces oligosaccharides apparaissent dans la graine en cours d'imbition à un moment où doit se mettre en place la migration des glucides vers les parties métaboliquement actives. Cette hypothèse demande à être soumise à de nouvelles expérimentations. On sait [8] que, dans le tubercule adulte de Betterave sucrière, une partie du saccharose entrant dans la cellule peut rejoindre la vacuole sans subir d'hydrolyse. On peut imaginer que les α -galactosides du saccharose, en particulier le raffinose, puissent représenter une forme protégée du disaccharide, le mettant à l'abri d'une scission enzymatique qui l'engagerait dans le métabolisme général. Le fait que, dans le cultivar fourrager, moins apte à stocker le saccharose, ces oligosaccharides aient une durée de vie plus courte est en faveur de cette hypothèse. La localisation intracellularaire des systèmes de synthèse et d'hydrolyse de ces molécules, en relation avec l'étude approfondie des relations entre les métabolismes glucidiques et nucléotidiques, actuellement en cours permettra d'apporter de nouvelles précisions.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel végétal. Les graines (Betterave fourragère: Cérès, Monoval; Betterave sucrière: Cérès, lot B-131-32) sont extraites de leurs glomérules, stérilisées par l'hypochlorite de Ca [7] et mises à germer en boîtes de Pétri stériles sur papier filtre imbibé d'eau distillée, à 23° et à l'obscurité. Les embryons sont extraits des graines 12 hr après le début de la germination et placés, dans des conditions axéniques, au contact d'une solution de ^{14}C -saccharose $2 \times 10^{-6} \text{ M}$, puis transférés après 15 sec sur une solution de saccharose $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ non radioactif stérile.

Extraction. Les glucides (α -galactosides du saccharose et saccharose) et l'UDPGal sont extraits des graines par la méthode de Keppler *et al.* [9]. Les métabolites radioactifs hydro-alcoolosolubles sont extraits des embryons selon le protocole décrit par Jefford et Edelman [10]. La préparation de l' α -galactosidase est réalisée par broyage à 2° des graines dans un tampon phosphate de Na 0.1 M, pH 6.5 (1 graine pour 25 µl de tampon) suivi d'une centrifugation à 20000 g pendant 10 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique utilisé pour la mesure de l'activité α -galactosidase.

Dosage des métabolites. Les dosages du saccharose, des α -galactosides du saccharose et de l'UDPGal ont été décrits précédemment [11, 12]. Ils sont tous basés sur la mesure de la quantité d'ATP, consommée ou produite lors de la phosphorylation ou de la déphosphorylation enzymatique d'un produit dérivé du métabolite concerné à la suite d'une ou de plusieurs réactions enzymatiques spécifiques.

Fractionnement de l'extrait hydro-alcoolosoluble radioactif. Le protocole expérimental suivi comprend une chromatographie par échange d'ions suivie d'une chromatographie sur couche mince [12].

Mesure de l'activité α -galactosidase. A 5 µl de l'extrait enzymatique sont ajoutés 360 µl de tampon phosphate de Na 0.1 M, pH 6.5 et 40 µl d'une solution de *p*-nitrophényl- α -D-

galactopyranoside (1 mg/ml). Le mélange est placé pendant des temps croissants à 25°, la réaction est stoppée par l'addition de 300 µl de NaOH 0.5 N. La densité optique de chaque milieu réactionnel est mesurée à 405 nm. L'activité α -galactosidase est exprimée en nanomoles de substrat hydrolysé par min et par graine.

Reproductibilité. Chaque expérimentation est répétée au moins quatre fois et les écarts observés par rapport à une valeur moyenne ne dépassent pas 10% dans le cas le plus défavorable.

Remerciements—Nous remercions les établissements Cérès (Méreville) qui nous ont fourni les semences et Jacqueline Lafleuriel pour l'efficacité de sa collaboration technique.

RÉFÉRENCES

- Nigam, V. N. et Giri, K. V. (1961) *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1847.
- Pridham, J. B. (1968) *Nature* **182**, 1687.
- Amuti, K. S. et Pollard, C. J. (1977) *Phytochemistry* **16**, 529.
- Kursanov, A. L. (1966) *Agrochimica* **11**, 1.
- Bonnemain, J. L. (1975) dans *Photosynthèse et Production Végétale*, p. 155. Gauthier-Villars.
- Polonovski, M. et Espagnol, A. (1941) dans *Chimie Organique Biologique*, p. 114. Masson et Cie, Paris.
- Hossain, S. N. (1978) Dipl. Et. App., Univ. Clermont II, France.
- Signor, Y. (1978) Thèse 3e cycle, Univ. Paris VI, France.
- Keppler, D., Rudiger, J. et Decker, K. (1970) *Analyt. Biochem.* **38**, 105.
- Jefford, T. G. et Edelman, J. (1961) *J. Exp. Botany* **12**, 177.
- Gendraud, M. et Lafleuriel, J. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1289.
- Gendraud, M. et Lafleuriel, J. (1978) *Physiol. Vég.* **16**, 679.