

EFFET DE DIFFÉRENTS POLYPHÉNOLS SUR LES MITOCHONDRIES ET LES CHLOROPLASTES ISOLÉS

MICHEL TISSUT, DANIEL CHEVALLIER et ROLAND DOUCE

Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble,
BP 53X, 38041 Grenoble Cedex, France

(Revisé reçu le 6 juillet 1979)

Key Word Index—Polyphenols; flavonoids; hydroxycinnamic acids; hydroxybenzoic acids; mitochondria; chloroplasts; respiration; photosynthesis.

Abstract—We have shown that polyphenols (cinnamic and benzoic acid derivatives and flavonoids) affect photosynthesis in isolated spinach chloroplasts and respiration in isolated potato mitochondria. With all compounds tested, an inhibitory effect of 50% was obtained with concentrations between 20 μ M and 2 mM. Flavonoids are two to four times more active than cinnamoyl and benzoyl derivatives. CO_2 -dependent O_2 evolution by isolated spinach chloroplasts is 3 to 8 times more sensitive than is respiration of isolated mitochondria. The number and position of the different hydroxyl groups on the polyphenol nucleus modify the inhibitory effect as do glycosylation and acylation.

INTRODUCTION

Un nombre important de travaux tend à cerner le problème de la signification physiologique des polyphénols dans le matériel végétal [1]. Les résultats obtenus montrent que les polyphénols peuvent intervenir à trois niveaux différents: (a). Un certain nombre de composés, parmi lesquels les flavonoïdes, joueraient un rôle de protection superficielle du végétal, notamment en interceptant certaines longueurs d'onde courtes du rayonnement solaire incident [2, 3]. (b) La structure des polyphénols, leurs sites d'accumulation et les quantités accumulées, peuvent varier énormément d'un végétal à l'autre. Cette diversité plaide en faveur de l'implication des polyphénols dans les métabolismes de relation entre les plantes et leurs biotopes [4–6]. Toutefois, certains métabolismes secondaires pourraient, au cours de l'évolution, avoir perdu toute signification et ne figurer qu'à titre 'vestigial' [7]. (c) Enfin, il est possible d'envisager une intervention éventuelle de ces composés au niveau des fonctions essentielles des cellules végétales et notamment en ce qui concerne les phénomènes de croissance [8, 9].

Face à cette hétérogénéité de fonctions physiologiques, il était intéressant de savoir si les polyphénols, ou au moins certains parmi eux, avaient une action sur la photosynthèse et la respiration. Des travaux impor-

tants ont été déjà réalisés dans cette voie [10–15] et le présent travail a pour objet d'étudier les effets de divers types moléculaires polyphénoliques sur le fonctionnement des chloroplastes et des mitochondries isolés.

RÉSULTATS

Influence des polyphénols sur la respiration de mitochondries isolées

Différents tracés oxygraphiques obtenus à partir de préparations convenables, montrent que les mitochondries isolées oxydent très correctement le malate, le succinate et le NADH. Dans la mesure où le milieu renferme de la sérum albumine de boeuf, les indices de contrôle respiratoire ainsi que les rapports ADP/O mesurés au cours de l'oxydation des différents substrats sont en outre très satisfaisants. Dans le cas des mitochondries de tubercule de pomme de terre, qui ne présentent pas de voie insensible au cyanure branchée en dérivation sur le pool des ubiquinones, l'addition de cyanure au milieu d'incubation provoque une inhibition totale et brutale de la consommation d'oxygène (résultat non montré). La Fig. 1 montre que l'addition de kaempférol (0,3 mM) au milieu d'incubation provoque une inhibition de la consommation d' O_2 par les mitochondries qui oxydent le succinate en présence d'ADP (stade III) ou d'un découplant tel que FCCP. L'utilisation de malate ou de NADH comme substrats conduit à des conclusions identiques. L'inhibition observée, qui n'est donc pas levée par addition d'un découplant semble indiquer que le kaempférol est un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons.

Abbreviations: MOPS: morpholinopropane sulfonic acid; EDTA: ethylene diamine tetraacetate; MV: methylviologene; TMPD: tetramethyl *p*-phenylene diamine dihydrochloride; FCCP: carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; BSA: bovine serum albumine; PPO: polyphenoloxidase.

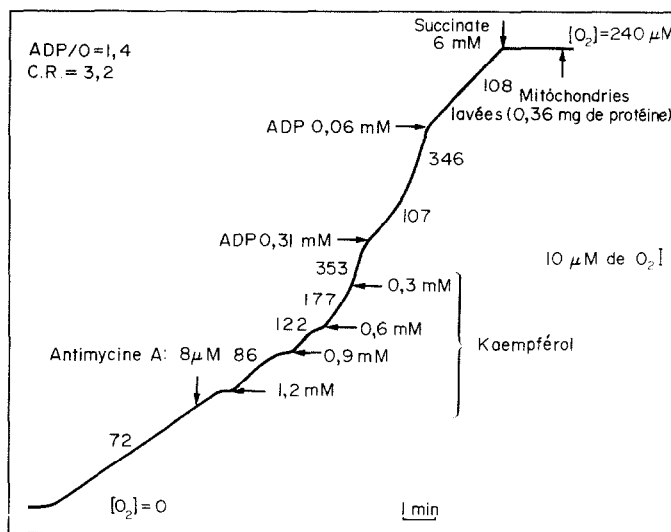


Fig. 1. Effet du kaempférol sur la vitesse d'oxydation, au stade III, du succinate par les mitochondries isolées de pomme de terre. Les concentrations indiquées sont les concentrations finales dans le milieu réactionnel (volume final: 3,2 ml). Les nombres mentionnés le long des traces représentent des nmol d' O_2 consommée par min et par mg de protéine mitochondriale.

Cependant, quelle que soit la concentration en kaempférol utilisée, nous avons constaté que la consommation d' O_2 n'est jamais complètement inhibée. Cette 'respiration' résiduelle, qui n'est inhibée ni par le cyanure ni par l'antimycine A, est en fait imputable à la présence d'une activité polyphénol-oxydasique dans nos préparations de mitochondries obtenues par centrifugation différentielle, le kaempférol constituant un substrat acceptable pour cette enzyme.

Nous avons en effet montré qu'en absence de NADH ou d'un substrat du cycle de Krebs, l'addition de kaempférol à des mitochondries entraîne une consommation d' O_2 insensible au cyanure. Par ailleurs, la purification des mitochondries par centrifugation sur gradient de densité de saccharose, qui permet d'éliminer en grande partie la polyphénoloxydase tout en améliorant les propriétés oxydatives des mitochondries, supprime presque totalement cette consommation d' O_2 insensible au cyanure.

Nous avons montré que la consommation d' O_2 sensible au cyanure, induite par le couple ascorbate-TMPD qui injecte ses électrons directement sur le cytochrome c localisé sur la face externe de la membrane interne [16], n'est pas inhibée après addition de kaempférol au milieu d'incubation. Un tel résultat démontre par conséquent que le site d'inhibition du kaempférol, dans la chaîne de transport des électrons, est localisé en amont du cytochrome c.

Il est bien connu que l'absence de BSA dans le milieu de mesure [17] abaisse nettement la valeur du contrôle respiratoire et, donc, la qualité du fonctionnement des mitochondries isolées. En l'absence de BSA, la sensibilité au kaempférol est beaucoup plus grande: on obtient un début d'inhibition pour des concentrations 10 fois plus faibles, de l'ordre de $30 \mu M$. Cependant, l'addition *a posteriori* de 0.1% BSA rétablit une respiration normale. L'addition d'une petite quantité de poudre de polyamide sur laquelle les aglycones flavoniques sont capables de

s'adsorber, au moins en milieu neutre ou acide, reste sans effet.

Nous avons étudié, en outre, la relation éventuelle entre l'inhibition polyphénolique et la quantité de mitochondries présente dans le milieu. Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition de la consommation d' O_2 par les polyphénols, (ici l'acide cinnamique à 1,5 mM) est très peu influencée par des quantités croissantes de protéines mitochondriales (de 0,1 à 0,4 mg). C'est vraisemblablement pour des apports plus importants de mitochondries qu'une éventuelle relation stoechiométrique pourrait être observée.

Effet inhibiteur de différents types polyphénoliques

Tous les composés polyphénoliques utilisés ont un pouvoir inhibiteur plus ou moins prononcé sur le fonctionnement des mitochondries. Cependant, les polyphénols en C 15 (flavonoïdes), au moins ceux du groupe des flavones (apigénine) et flavonols, sont globalement (galangine, fisétine, kaempférol, quercétol et son dérivé dihydrogène, la taxifoline) plus actifs sur le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons (0,1–1,0 mM pour 50% inhibition) que leurs homologues des séries cinnamique et benzoïque (1–2 mM) (acide cinnamique, coumarique, caféique, ferulique, benzoïques *p*-OH-benzoïque, protocatechnique, gallique et Dicamba v.s.).

Pour un même type de noyau polyphénolique, il n'y a pas de différence systématique d'effet liée à la nature et à la position des substituants. Toutefois, dans la série benzoïque, le Dicamba (acide dichloro 3,6-methoxy-2 benzoïque, un herbicide), porteur de 2 atomes de chlore, est nettement plus inhibiteur que les molécules naturelles de la même série.

De plus, dans la série flavonoïdique, la galangine (sans OH sur le noyau B) et la fisétine, (flavonol ne différant du quercétol que par l'absence de OH en 5) sont les plus actifs des flavonols. Parmi les flavanols,

Tableau 1. Concentrations des composés phénoliques permettant d'obtenir une inhibition de 50% soit du dégagement d'O₂ chez les chloroplastes intacts isolés de feuilles d'épinard, soit de la consommation d'oxygène chez les mitochondries isolées de tubercules de pommes de terre

Composés polyphénoliques	Mitochondries (avec BSA) (μ M pour 50% inhibition)	Chloroplastes (sans BSA)
Fiséatine	240	28
Kaempférol	243	30
Acide benzoïque	1200	320
Acide gallique	1500	600
Acide cinnamique	1720	210
Acide caféique	1480	550

la taxifoline (ou dihydroquercétol) a une activité nettement plus faible que celle du flavonol correspondant, le quercétol. Ce résultat tend à montrer que la structure de l'hétérocycle flavonoïdique joue un rôle non négligeable sur le pouvoir inhibiteur.

Nous avons, en outre, suivi les effets de quelques glycosides ayant le quercétol ou le kaempférol comme aglycones: la rutine, le spiraeoside et le tiliroside. Le spiraeoside a un effet inhibiteur proche de celui de l'aglycone correspondant, le quercétol, alors que la rutine est nettement moins active. En revanche, le tiliroside a une activité 10 fois plus grande que le kaempférol. Les modalités de son action sont actuellement en cours d'étude. Au total, nous pouvons conclure que la glycosylation et la formation de complexes peuvent modifier le pouvoir inhibiteur de l'aglycone. Cette modification est sans doute liée à plusieurs facteurs: la masse moléculaire du dérivé, la position des OH glycosylés, la nature chimique des substituants et la plus ou moins grande liposolubilité du dérivé obtenu.

Influence des polyphénols sur la photosynthèse des chloroplastes isolés

Différents tracés oxygraphiques obtenus à partir de préparations convenables montrent que les chloro-

plastés intacts produisent à la lumière de l'oxygène, dans la mesure où le milieu renferme du bicarbonate et de petites quantités de phosphate. En très bon accord avec les travaux de Walker [18], l'installation du dégagement d'O₂ s'effectue le plus souvent après une phase de latence plus ou moins longue. Toutes les préparations de chloroplastes qui renfermaient moins de 80% de chloroplastes intacts (classe A) et dont la vitesse de dégagement d'O₂ ne dépassait pas 40 μ mol/hr/mg chlorophylle ont été systématiquement éliminées.

Effets d'un flavonoïde sur la vitesse de dégagement d'oxygène de chloroplastes isolés. La Fig. 2 montre l'effet du kaempférol sur la vitesse de dégagement d'O₂ par les chloroplastes intacts (classe A). L'inhibition totale est obtenue pour une concentration en kaempférol égale à 60 μ M. A cette concentration, nous n'avons pas obtenu d'effet notable sur le transport des électrons, en utilisant des thylakoïdes avec le méthylviologène ou le ferricyanure comme accepteurs finaux d'électrons.

La Fig. 3(a) montre, qu'en présence de méthylviologène, l'addition d'une quantité limitante d'ADP aux thylakoïdes provoque une stimulation de la consommation d'O₂. Lorsque tout l'ADP a été phosphorylé en ATP, la vitesse de la consommation

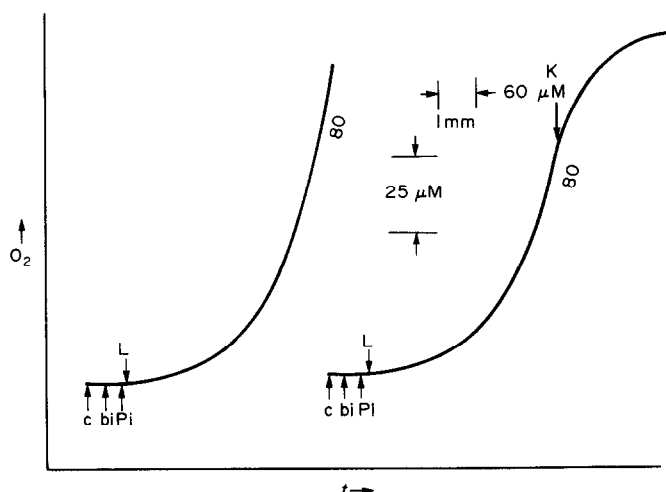


Fig. 2. Action de kaempférol sur le dégagement d'oxygène par des chloroplastes isolés de feuilles d'épinard. Les nombres portés le long des tracés représentent des μ mol d'O₂ dégagé par mg de chlorophylle et par heure. c: Chloroplastes; L: lumière; bi: bicarbonate de Na (10 μ M); Pi: NaH₂PO₄ (0,5 mM); K: kaempférol.

effet sur celui des mitochondries. Dans ce dernier cas, il se pourrait que le kaempférol ne puisse pas traverser la membrane interne et, par conséquent, inhiber le facteur de couplage localisé sur la face interne de la membrane interne. La situation est totalement différente dans le cas des thylakoïdes isolés, le facteur de couplage étant alors tourné vers le milieu extérieur et, par conséquent, directement accessible aux molécules de kaempférol.

Si l'on compare les effets des différents types de polyphénols sur la photosynthèse et la respiration, un parallélisme intéressant se manifeste dans l'importance des effets obtenus par chaque série chimique: Dans chaque cas, les flavonoïdes sont les plus efficaces et, tout spécialement les flavones et les flavonols. Dans le cas des chloroplastes, l'effet inhibiteur est généralement d'autant plus accentué que le nombre de substituants est plus faible (avec l'exception de la flavone). Pour les mitochondries, la situation est moins claire. Les effets observés sur chloroplastes et mitochondries *in vitro* dans nos conditions expérimentales, ont-ils leur équivalent *in vivo*? Il est bien difficile de le dire aujourd'hui, malgré la réputation de phytotoxines faite à la plupart des polyphénols.

Dans le matériel qui les produit, ces molécules paraissent assez bien séparées *in vivo* des mitochondries: rares ont été les résultats expérimentaux montrant leur présence ou celle d'enzymes concernant leur biosynthèse au niveau de ces organites. Par contre, ces substances sont étroitement associées aux plastides. Oettmeier et Heupel [21] mettent en évidence des flavonoïdes dans les chloroplastes d'épinard et des résultats analogues avaient été obtenus chez d'autres végétaux [22–25] ou encore dans des plastides situés dans des organes sécréteurs [26]. De plus, il apparaît maintenant bien établi qu'une partie au moins des enzymes de la voie de biosynthèse de ces composés est localisée dans le plaste [27]. Il nous faut donc maintenant envisager que des polyphénols puissent être au contact des thylakoïdes. Y atteignent-ils des concentrations telles qu'elles puissent entraver le bon fonctionnement de la photosynthèse? Cette question mérite analyse et l'étude de la relation entre le site chloroplastique contribuant à l'élaboration polyphénolique et les grands sites d'accumulation vacuolaire des glycosides constitue sans nul doute une étape actuellement très importante pour la compréhension de ce métabolisme.

D'autres aspects du problème ne doivent cependant pas être négligés, en particulier la signification physiologique profonde de la présence d'une activité PPO à l'intérieur de certains plastides (dont le chloroplaste d'épinard) reste à découvrir.

MATERIEL ET METHODES

Les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Bintje) sont pelés et coupés en petits cubes. Ils sont broyés pendant 30 sec à l'aide d'un broyeur Moulinex dans un milieu d'extraction composé de mannitol 0,3 M; EDTA, 1 mM; tampon MOPS, 10 mM, pH 7,4; cystéine, 4 mM; sérum albumine de boeuf, 1 g/l. Le broyat obtenu est filtré rapidement sur une toile à bluter de 50 μ m de vide de maille. Les mitochondries sont ensuite extraites du filtrat selon les techniques décrites par Bonner [28]. Dans certains

cas, elles sont purifiées selon une méthode décrite antérieurement [29]. Les épinards (*Spinacia oleracea* L.) sont récoltés sur le terrain de culture du laboratoire. Les chloroplastes intacts de classe A [30] sont extraits [31, 32]. Pour chaque extraction, le pourcentage de chloroplastes intacts présents dans la suspension initiale est calculé [33].

Les vitesses de dégagement ou de consommation d'oxygène par les organites sont mesurées à 25° à l'aide d'une électrode à oxygène selon les techniques conventionnelles [34]. Le milieu réactionnel utilisé pour le dégagement d'O₂ par les chloroplastes intacts est décrit par Heber [32] pour l'étude des photophosphorylations, le milieu de l'électrode a la composition suivante: sorbitol 0,3 M; tampon phosphate 10 mM, pH 7,4; MgCl₂ 4 mM; l'accepteur d'électrons étant le méthylviologène. Pour les mitochondries, le milieu réactionnel est le suivant: mannitol 0,3 M; KCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM; BSA 1%; tampon phosphate 10 mM, pH 7,2. Les chlorophylles sont dosées selon la méthode de Arnon [35], les protéines selon la méthode de Lowry *et al.* [36].

Les polyphénols sont injectés sous forme de solutions éthanoliques. La concentration finale en alcool ne dépasse jamais 3%. Nous avons systématiquement vérifié que les quantités d'alcool introduites restent sans effet sur la photosynthèse et la respiration.

Remerciements—Nous remercions M. Michel Matringe pour sa participation à la dernière étape de ce travail ainsi que M. Quemener (Directeur de la Fédération Nationale des Producteurs de plants de Pomme de terre) qui nous a gracieusement fourni les semences de pomme de terre. Ce travail a bénéficié d'une aide du CNRS (ERA No. 847) 'interactions plastides-cytoplasme-mitochondries'.

BIBLIOGRAPHIE

1. McLure, J. W. (1975) in *The Flavonoids*. (Harbone, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H., eds.) 970. Chapman & Hall, London.
2. Tissut, M. (1970) Thèse Doct. es Sci. (état), Université de Grenoble, France.
3. Tronchet, J. (1968) *C.R. Acad. Sci.* **266**, 882.
4. Linskens, H. F. (1964) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **15**, 255.
5. Come, D. (1967) *Ann. Sci. Nat. Bot.* **VIII**, 37.
6. Dorne, A. J. (1977) Thèse Doct. es Sci. (état), Université de Grenoble, France.
7. Luckner, M. (1978). *12th FEBS Meeting*, Dresden. Juillet (1978).
8. Calston, A. W. (1969) *Perspectives in Phytochemistry*, p. 193. Academic Press, London.
9. Margio, G. (1979) Thèse Doct. es Sci. (état), Université de Toulouse, France.
10. Koeppel, D. E. et Miller, R. J. (1974) *Plant Physiol.* **54**, 374.
11. Dedonder, A. et Van Summere, C. F. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* **65**, 176.
12. Arntzen, C. J., Falkenthal, S. V. et Bobick, S. (1974) *Plant Physiol.* **53**, 304.
13. Winget, G. D., Seikichi, I. et Good, N. E. (1969) *Biochemistry* **8**, 2067.
14. Stenlid, G. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2251.
15. Stenlid, G. (1976) *Phytochemistry* **15**, 911.
16. Lee, C. P. (1971) in *Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes* (Chance, B., Lee, C. P., et Blazie, J. K., eds.) p. 417. Academic Press, New York.

17. Ducet, G. et Diano, M. (1978) in *Plant Mitochondria* (Ducet, G. et Lance, C., eds.) p. 51. Elsevier, Amsterdam.
18. Walker, D. A. (1976) in *The Intact Chloroplast* (Barber, J., ed.) p. 235. Elsevier, Amsterdam.
19. Tolbert, N. E. (1973) *Plant Physiol.* **51**, 234.
20. Schneider, V. (1974) *Z. Pflanzenphysiol.* **72**, 36.
21. Oettmeier, W. et Heupel, A. (1972) *Z. Naturforsch. Teil B* **27**, 177.
22. Monties, B. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **15**, 29.
23. Sato, M. (1966) *Phytochemistry* **5**, 385.
24. Weissenbock, G. (1973) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **86**, 351.
25. Saunders, J. A. et McClure J. W. (1976) *Phytochemistry* **15**, 809.
26. Charriere-Ladreix, Y. (1979) Thèse Doct. es Sci. (état), Université de Grenoble, France.
27. Ranjeva, R., Boudet, A. M. et Alibert, G. (1977) *Physiol. Vég.* **15**, 303.
28. Bonner, W. D. (1967) in *Methods in Enzymology*, (Estabrook, R. W. et Pullman, M. E. eds.) Vol. 10, p. 126. Academic Press, New York.
29. Douce, R., Christensen, E. L. et Bonner, W. D. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 148.
30. Hall, D. O. (1972) *Nature* **235**, 125.
31. Jensen, R. G. et Bassham, J. A. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 1095.
32. Heber, U. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 140.
33. Heber, U. et Santarius, K. A. (1970) *Z. Naturforsch. Teil B* **25**, 718.
34. Estabrook, R. W. (1967) in *Methods in Enzymology*, (Estabrook, R. W. et Pullman, M. E., eds.) Vol. 10, p. 41. Academic Press, New York.
35. Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.* **24**, 1.
36. Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.