

RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DES GLYCÉRIDES ET DES PHOSPHOLIPIDES DANS LE PARENCHYME DE POMME—II.

INCORPORATION DANS LES LIPIDES DE DIVERS PRÉCURSEURS RADIOACTIFS

P. MAZLIAK

Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences de Reims, Marne, France

(Received 3 December 1966)

Abstract—Experiments with acetate-1-¹⁴C, glycerol-1,3-¹⁴C and Na₂H³²PO₄ have shown that the glycerides and phospholipids of apple parenchyme are actively synthesized in green and mature fruits. The rate of synthesis of phospholipids is the same in mature or green fruits. The rate of synthesis of the glycerides is much greater in mature fruits and is three times higher than that of phospholipids. Phosphatidic acid incorporates the greater part of the furnished radioactivity during short incubation times. After longer incubation times the more radioactive lipids are the triglycerides, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. The other phospholipids of the tissue incorporate less radioactivity but the specific activities of these lipids show that their turn-over rates are as high as the turn-over rates of the major phospholipids. Comparison of the results obtained with the three different labelled precursors suggests that in phospholipids, the diglyceride moieties have a metabolism partly independent of that of the phosphorylated moieties.

DANS ce deuxième article nous abordons l'étude du métabolisme des glycérides et phospholipides précédemment identifiés dans le parenchyme de pomme.¹ Les techniques chromatographiques décrites dans le précédent article ont été employées de façon routinière au cours des expériences et la biosynthèse des composés étudiés a été suivie à l'aide des trois traceurs radioactifs suivants: l'acétate -1-¹⁴C, le glycérol -1-3-¹⁴C et le ³²P-phosphate de sodium monoacide. On a supposé que les biosynthèses observées correspondent essentiellement à un *renouvellement* des lipides dans le parenchyme plutôt qu'à une accumulation de ces lipides dans le tissu. Dans le fruit adulte en effet, l'acumulation des lipides est faible et extrêmement lente, s'étageant sur plusieurs semaines, alors que nos expériences s'effectuent en quelques heures au cours desquelles le gain net en lipides peut-être considéré comme nul. En toute rigueur cependant, nos expériences ne permettent pas de distinguer entre les biosynthèses correspondant à un *renouvellement* et celles correspondant à une *accumulation* vraie des lipides dans les cellules.

Le choix des trois précurseurs s'explique par le fait que chacun d'entre eux risque de se trouver incorporé dans une partie différente des molécules lipidiques étudiées. L'acétate est un précurseur des chaînes d'acides gras qui estérifient les fonctions alcool du glycérol aussi bien dans les glycérides que dans les glycerophospholipides. On ne peut savoir *a priori* si l'incorporation des acides gras dans les phospholipides du tissu s'effectue au même rythme que dans les triglycérides: en fait on ne dispose d'aucune donnée sur ce métabolisme dans le tissu étudié et les recherches concernant ce point sont très rares, sur les végétaux en général.

¹ P. MAZLIAK, *Phytochem.* 6, 687 (1967).

Le *glycérol* forme la partie centrale du squelette moléculaire des glycérides et des phospholipides. L'emploi de ce précurseur est susceptible d'apporter deux sortes d'information concernant le métabolisme de ces deux catégories de lipides.

(1) À chaque fois qu'une molécule de glycérol est incorporée dans une molécule lipidique cela signifie que cette molécule a été synthétisée complètement à partir de ses divers éléments constitutifs alors que l'introduction d'une nouvelle chaîne d'acide gras dans un lipide peut simplement être le résultat d'un échange avec une chaîne préexistante, sans destruction totale du squelette moléculaire. La comparaison des résultats obtenus en fournissant de l'acétate marqué aux fragments de pomme avec ceux obtenus en fournissant du glycérol marqué doit donc permettre de savoir si les molécules des lipides sont synthétisées partiellement ou totalement.

(2) Comme pour les acides gras, rien *a priori* n'indique que la synthèse des phospholipides entiers s'effectue au même rythme que la synthèse des glycérides entiers dans le tissu étudié: là encore les expériences entreprises doivent apporter les premières données concernant ce problème.

Enfin le marquage à partir du *phosphate inorganique* ^{32}P doit permettre de suivre sélectivement la vitesse de renouvellement de chaque phospholipide. Il n'est pas sûr que l'incorporation d'un atome de ^{32}P dans une molécule de phospholipide signifie—comme pour le glycérol—que cette molécule ait été synthétisée totalement par le tissu. Le sort de l'atome de phosphore est lié à celui de la tête polaire (phosphorylcholine, phosphoryléthanolamine, phosphorylinositol etc....) au cours des biosynthèses.² L'étude du renouvellement du phosphore lipidique permet donc de suivre plus précisément la synthèse et le renouvellement des parties polaires des molécules de phospholipides.

La comparaison des résultats obtenus après marquage au ^{32}P d'une part avec ceux recueillis après le marquage au ^{14}C d'autre part, doit donc permettre de savoir si les deux parties des molécules de phospholipides (partie apolaire (reste diglycéride) et tête polaire) sont synthétisées au même rythme ou indépendamment.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Incorporation de l'Acétate-1- ^{14}C dans les Lipides du Parenchyme

Deux séries d'expérience ont d'abord été conduites avec l'acétate-1- ^{14}C comme précurseur: l'une a été réalisée avec des parenchymes de fruits franchement mûrs, jaunes d'or; l'autre avec des parenchymes de fruits verts entreposés à 0° au moment de la cueillette et restés dans un état physiologique très éloigné du stade de maturité.

Parenchyme de pomme mûre. L'incorporation de l'acétate radioactif dans les lipides totaux du parenchyme est progressive, continue et croissante, pour les temps d'incubation variant de 0 à 16 hr. La Fig. 1 donne l'allure de cette incorporation, suivie dans deux séries d'expériences. Les résultats des deux séries sont très comparables. Nous n'avons pas poussé les durées d'incubation au delà de 16 hr. parce que nous craignions, au delà de ce temps, l'invasion du milieu réactionnel par des bactéries. Par ailleurs les intensités de marquage mesurées nous ont paru assez élevées pour suivre aisément les synthèses des composés étudiés, y compris ceux présentant un métabolisme très lent.

Les courbes d'incorporation de l'acétate radioactif dans les acides gras des *diverses catégories de lipides* sont présentées à la Fig. 2. On suit sur ces courbes les quantités d'acétate

² R. M. C. DAWSON, Dans *Essays in Biochemistry* (Edited by P. N. CAMPBELL and G. D. GREVILLE), Vol. 2, p. 69. Academic Press, New York (1966).

incorporées après des temps d'incubation s'étageant entre 0 et 16 hr. Quatre conclusions peuvent être tirées de l'examen de ces courbes.

(1) Les quantités les plus importantes d'acétate radioactif sont retrouvées au niveau des acides gras des *Phospholipides*. Après 16 hr d'expérience on trouve dans ces phospholipides un peu plus de 50 % de l'acétate radioactif incorporé dans les lipides totaux et ce pourcentage élevé est atteint dès 3 ou 4 hr d'incubation.

(2) L'incorporation de l'acétate dans les acides gras des *triglycérides* est légèrement plus faible mais *presque aussi importante* que l'incorporation dans les phospholipides. Après 6 ou 8 hr d'incubation, on retrouve presque la moitié de la radioactivité totale des lipides dans

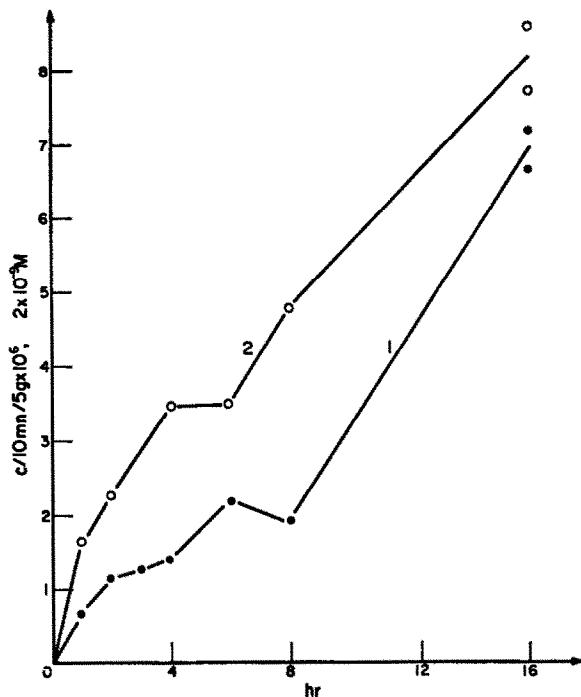


FIG. 1. INCORPORATION DE L'ACÉTATE- ^{14}C DANS LES LIPIDES TOTAUX DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME MÛRE.

(Conditions d'expérience données dans le texte) 1 et 2: courbes attenant à deux séries d'expériences différentes. En ordonnée: Radioactivité ou nombre de Moles d'acétate incorporées.

les *triglycérides*. Après 16 hr d'incubation, les fragments de parenchyme renferment encore au niveau des acides gras des triglycérides 35 % de la radioactivité totale des lipides.

La quantité d'acétate incorporée dans les *acides gras* des triglycérides du parenchyme est donc sensiblement égale, pendant les premières heures expériences, à la quantité incorporée dans les acides gras des phospholipides. Les courbes donnant la quantité d'acétate incorporée dans l'une ou l'autre catégorie entre 0 et 8 hr ne se distinguent pratiquement pas. On constate seulement un léger fléchissement de l'incorporation dans les triglycérides après 8 hr. Comme par ailleurs l'analyse nous a montré¹ que le parenchyme de pomme mûres contenait, en masse, environ trois fois plus de phospholipides que de glycérides, on peut en conclure que les *acides gras des triglycérides sont synthétisés et renouvelés trois fois plus vite que les acides gras des phospholipides*, pendant les premières heures d'expérience.

(3) La quantité d'acétate incorporée dans les acides gras des Diglycérides n'est pas négligeable mais la quantité d'acétate radioactif qui demeure dans cette classe de lipides après quelques heures apparaît nettement inférieure à celle que l'on retrouve dans les triglycérides ou les phospholipides. Après 4 hr d'incubation, l'incorporation de l'acétate dans les acides gras des diglycérides présente cependant un maximum qui approche 20% de la radioactivité totale des lipides des tissus.

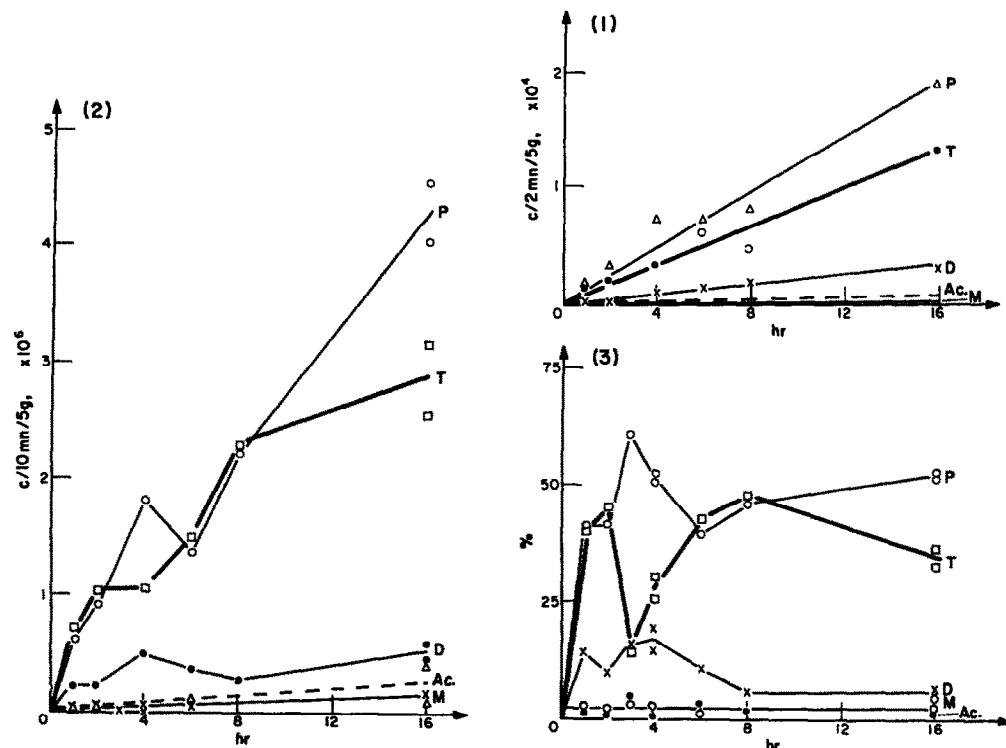


FIG. 2. INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1-¹⁴C DANS LES DIVERSES CATÉGORIES DE LIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME MÛRE.

Abréviations utilisées: P: phospholipides; T: triglycérides; D: diglycérides; Ac: acides gras libres; M: monoglycérides.

(1) Mesure des activités au compteur Geiger, après localisation des spots actifs par autoradiographie. (Voir la partie expérimentale); (2) Mesure des activités par scintillation liquide, après découpe des chromatogrammes en fragments de 1 x 2 cm (Voir la partie expérimentale); (3) Pourcentages de la radioactivité totale des lipides retrouvés dans chaque catégorie.

(4) La quantité d'acétate radioactif incorporée dans les catégories mineures (acides gras libres, monoglycérides, paraffines, stéroïdes ...) est très faible et forme environ 2,5% de la radioactivité totale des lipides.

Les courbes d'incorporation de l'acétate radioactif dans les divers *phospholipides* du parenchyme de pomme mûre sont présentées à la Fig. 3. On suit sur ces courbes les quantités d'acétate incorporées dans les divers phospholipides après des temps d'incubation compris entre 0 et 16 hr. Les comptages ont été faits sur les spots de phospholipides séparés par chromatographie sur papier silicé.

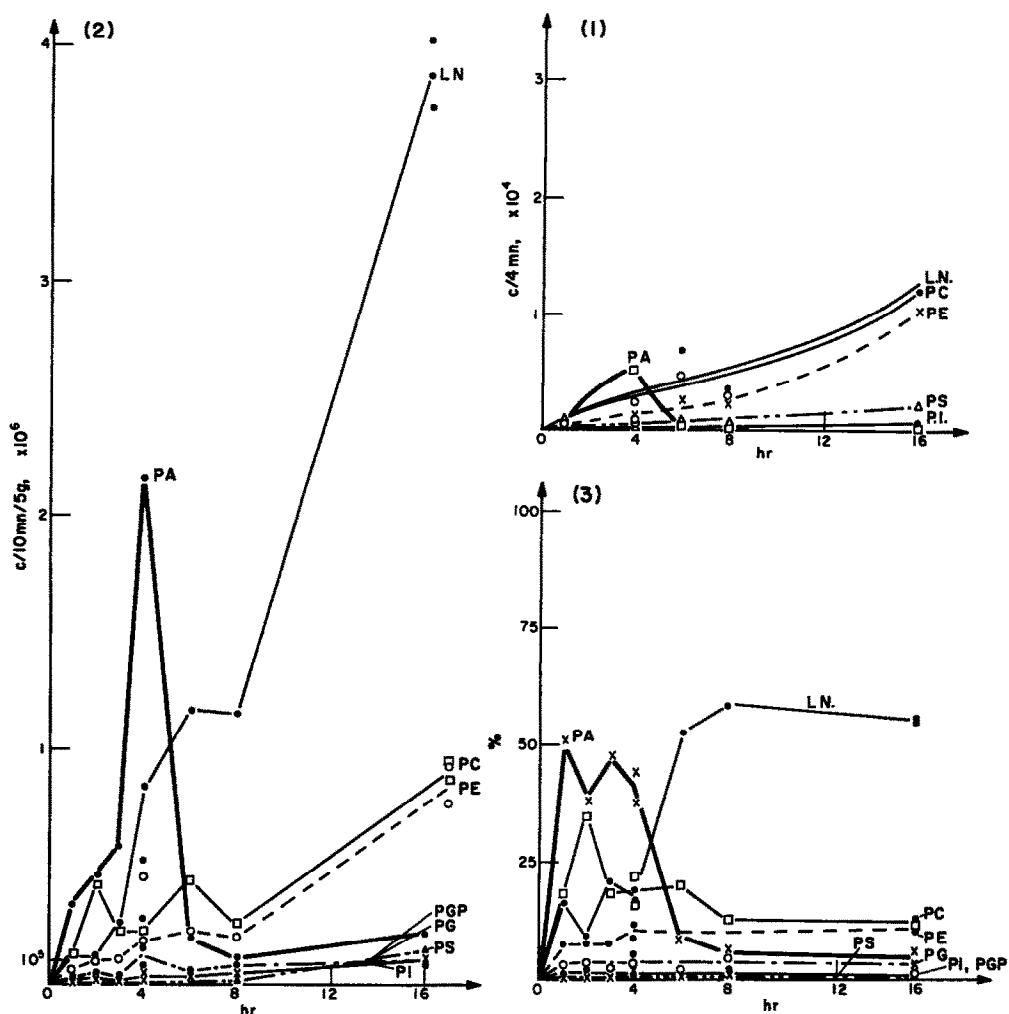


FIG. 3. INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- ^{14}C DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME MÛRE.

(Séparation des phospholipides sur papier silicé). Abréviations utilisées: L.N.: lipides neutres; P.A.: acide phosphatidique; P.C.: phosphatidylcholine; P.E: phosphatidyléthanolamine; P.G: phosphatidylglycérol; P.I: phosphatidylinositol; P.G.P: diphosphatidylglycérol; P.S: phosphatidylsérine.

(1) Mesure des activités au compteur Geiger, après localisation des spots radioactifs par autoradiographie; (2) Mesure des activités par scintillation liquide, après découpe des chromatogrammes en fragments de 1×2 cm; (3) Pourcentages de la radioactivité totale des lipides retrouvés dans chaque catégorie.

Les conclusions suivantes se dégagent de l'examen des résultats:

(1) Au cours des premières heures d'incubation (de 0 à 4 hr), les quantités d'acétate radioactif les plus élevées se retrouvent dans l'*acide phosphatidique*. Puis l'activité totale de ce phospholipide particulier diminue beaucoup après 4 hr tandis que s'élèvent les activités des lipides neutres totaux et celles des autres phospholipides. Les courbes de variation des activités totales respectives de l'*acide phosphatidique* et des *lipides neutres totaux* suggèrent une

relation de précurseur à produit entre ces deux classes (Fig. 3,2). On tire la même conclusion de l'examen des variations au cours du temps des pourcentages de la radioactivité totale des lipides retrouvés dans l'*acide phosphatidique* et dans les *lipides neutres totaux* (Fig. 3,3) Durant les 4 premières heures d'incubation, l'activité totale de l'acide phosphatidique est beaucoup plus élevée que celle des lipides neutres totaux; on retrouve, de 0 à 4 hr, près de 50% de la radioactivité totale des lipides dans cet acide phosphatidique. Après ce temps, la répartition des activités s'inverse nettement. Dès 6 hr d'incubation, 50% environ de la radioactivité se retrouve dans les *lipides neutres totaux*; moins de 10% demeure dans l'*acide phosphatidique* qui passe à un niveau d'activité inférieur à celui des autres phospholipides.

(2) Parmi les autres phospholipides du parenchyme, la *phosphatidylcholine* incorpore le plus intensément l'acétate radioactif. Cette incorporation est progressive de 0 à 16 hr et finalement 15% de la radioactivité totale des lipides se retrouve dans ce phospholipide.

(3) La *phosphatidyl éthanolamine* incorpore également l'acétate radioactif dans ses acides gras constitutifs. L'incorporation est à peu près aussi importante que pour la phosphatidylcholine après 8 hr d'incubation. Dans les premières heures cependant (de 0 à 6 hr), les courbes montrent que les acides gras de la phosphatidylcholine incorporent une plus grande quantité d'acétate radioactif que ceux de la phosphatidyléthanolamine. Comme dans les tissus étudiés, l'analyse révèle¹ qu'il y légèrement plus de *phosphatidyléthanolamine* que de *phosphatidylcholine* (40% contre 35% environ) cela signifie que le renouvellement des acides gras de ce dernier phospholipide est un peu plus intense que celui des acides de la phosphatidyléthanolamine, surtout dans les premières heures d'expérience. L'activité spécifique absolue de la phosphatidylcholine dépasse toujours un peu celle de la phosphatidyléthanolamine (Tableau 1).

TABLEAU 1. ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME MÛRE APRÈS 16 HR D'INCUBATION DES FRAGMENTS EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS PRÉCURSEURS

Principaux Phospholipides du parenchyme	%	μg de phosphore pour 5 g de parenchyme (valeur moyenne)	Activités spécifiques (c/mn/ μg de P. Lipidique)		
			acétate-1- ^{14}C	glycérol-1-3- ^{14}C	^{32}P -phosphate monoacide de sodium
Phosphatidylinositol	3,2	1,6	6 500	108	940
Phosphatidylcholine }	35,2	15,6	6 300	145	2 000
Phosphatidylglycérol }	Traces	Traces	—	—	—
Phosphatidylsérine	41,6	20,8	4 250	80	1 800
Phosphatidyléthanolamine	3,2	1,6	5 500	360	2 000
Diphosphatidylglycérol	16,8	8,4	2 450	77	1 850
Acide phosphatidique					

(4) Les autres phospholipides du tissu (*phosphatidylsérine*, *phosphatidylinositol*, *mono ou di phosphatidylglycérol*) incorporent relativement très peu d'acétate radioactif. L'incorporation dans ces phospholipides est progressive de 0 à 16 hr. Ce faible niveau d'incorporation ne signifie cependant pas que le taux de renouvellement des acides de ces catégories est très faible. Si l'on ramène les activités mesurées au μg de phosphore présent dans chaque catégorie lipidique, on trouve, par exemple après 16 hr, les activités spécifiques notées au Tableau 1. On remarque que les catégories faiblement représentées dans les tissus (phosphatidylinositol, diphosphatidylglycérol par exemple...), bien que n'incorporant qu'un faible pourcentage de la radioactivité totale, présentent néanmoins des activités spécifiques absolues

aussi élevées que les autres classes. Le renouvellement de ces catégories mineures, dans le tissu, est donc aussi rapide que le renouvellement des catégories phospholipidiques majeures.

Sur ce même Tableau 1, on peut constater que les activités spécifiques absolues des différents phospholipides sont toutes du même ordre de grandeur après 16 hr d'incubation, à l'exception de celle de l'*acide phosphatidique*, nettement inférieure aux autres. Après trois heures d'incubation au contraire l'activité spécifique de l'acide phosphatidique est maximum; elle atteint 7100c/mn/µg de phosphore et dépasse de beaucoup les activités spécifiques de autres phospholipides. La baisse d'activité spécifique absolue que l'on observe pour l'acide phosphatidique dans les heures suivantes s'accorde bien avec l'interprétation selon laquelle l'*acide phosphatidique* serait une molécule précurseur dans le parenchyme de pomme, se transformant, dans le métabolisme normal, soit en lipide neutre (di ou triglycéride), soit en phospholipide plus complexe. Ces réactions de transformation sont connues dans d'autres tissus et ont été décrites notamment par Kennedy.²

Parenchyme de pomme verte, non mûre. Les expériences conduites avec des fragments de parenchyme de fruits verts, non mûrs, ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec des fragments de fruits mûrs (Fig. 4 et Fig. 5), *sauf en ce qui concerne l'incorporation de l'acétate dans les triglycérides.* Il ressort clairement des Figs. 4 et 5 que le rythme et l'intensité de l'incorporation de l'acétate radioactif dans les acides gras des *phospholipides* sont les mêmes pour les fruits verts ou les fruits mûrs. *Par contre les triglycérides incorporent environ deux fois plus d'acétate dans le fruit mûr que dans le fruit vert.* Le pourcentage de la radioactivité totale des lipides retrouvé dans les *triglycérides* ne dépasse pas 20-30% dans les fruits verts; il va jusqu'à 40 ou 50% dans les fruits mûrs.

On peut en conclure que la synthèse ou le renouvellement des acides gras des triglycérides est moins actif dans le fruit vert que dans le fruit mûr. En cours de maturation les renouvellements ou synthèses d'acides gras surtout insaturés³ doivent donc s'accélérer au niveau des triglycérides et au contraire rester constants au niveau des phospholipides.

En ce qui concerne la distribution de la radioactivité entre les différents phospholipides à partir de l'acétate-1-¹⁴C précurseur, les graphiques des Figs. 6 et 7 permettent de retrouver les principaux résultats obtenus précédemment avec les fragments de pommes mûres. Une grande différence cependant concerne, le marquage de l'*acide phosphatidique*: même pour des temps d'incubation extrêmement courts (5, 10, 15 mn) on ne retrouve jamais plus de 9% de la radioactivité totale des lipides au niveau de ce phospholipide particulier. Dans le cas des pommes mûres on pouvait, en ne faisant durer que de 1 à 4 hr les expériences d'incubation, retrouver jusqu'à 50% de la radioactivité totale au niveau de l'*acide phosphatidique*.

Cette différence de marquage entre les deux stades physiologiques comparés pourrait s'expliquer par une rythme de transformation extrêmement rapide de l'acide phosphatidique dans le tissu jeune. On constate que dès 5 mn d'incubation, la *phosphatidylcholine* et les *lipides neutres* renferment déjà respectivement 35 et 30% de la radioactivité totale. Si l'acide phosphatidique sert de précurseur à l'une de ces deux catégories ou au deux à la fois on comprend aisément que la radioactivité que cet intermédiaire a pu emmagasiner au niveau de ses acides gras se retrouve, immédiatement après transformation soit dans les autres phospholipides (*phosphatidylcholine* notamment) soit dans les *triglycérides*. Dans le tissu jeune les synthèses vont très vite jusqu'à leur terme et les expériences précédentes ne permettent pas de saisir une grande quantité d'intermédiaire marqué. Dans les tissus senescents au contraire les synthèses se ralentissent sans doute et le précurseur peut s'accumuler transitoirement.

³ P. MAZIAK et J. POMMIER-MIARD, *Fruits* 18, 177 (1963).

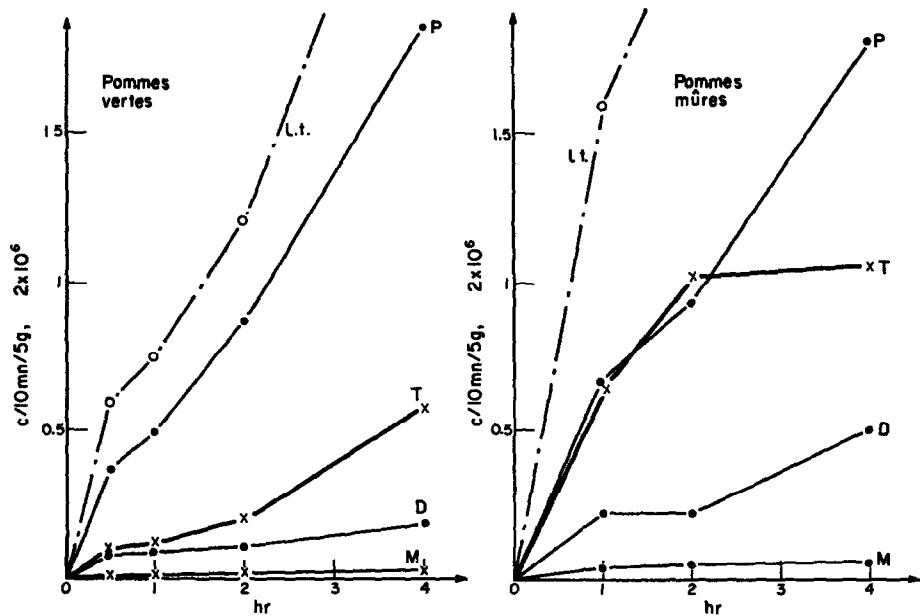


FIG. 4. INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- ^{14}C DANS LES DIVERSES CATÉGORIES DE LIPIDES DU PARENCHYME DE POMME VERTE ET DANS LE PARENCHYME DE POMME MÛRE. MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 2.
L.t.: LIPIDES TOTAUX.

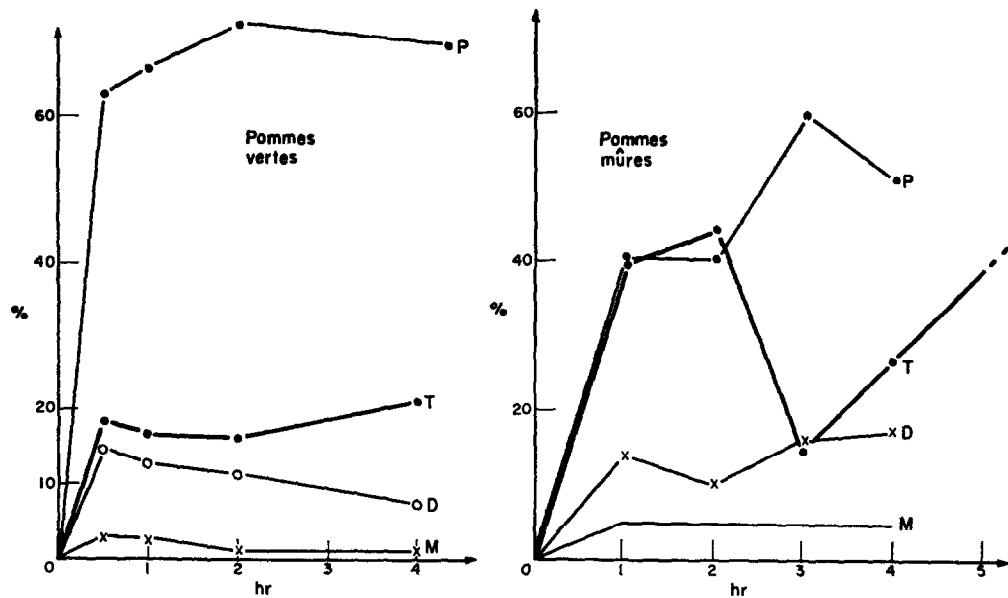


FIG. 5. POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DES LIPIDES RETROUVÉS DANS LES DIVERSES CATÉGORIES DE LIPIDES DU PARENCHYME DE POMME VERTE OU DE POMME MÛRE.

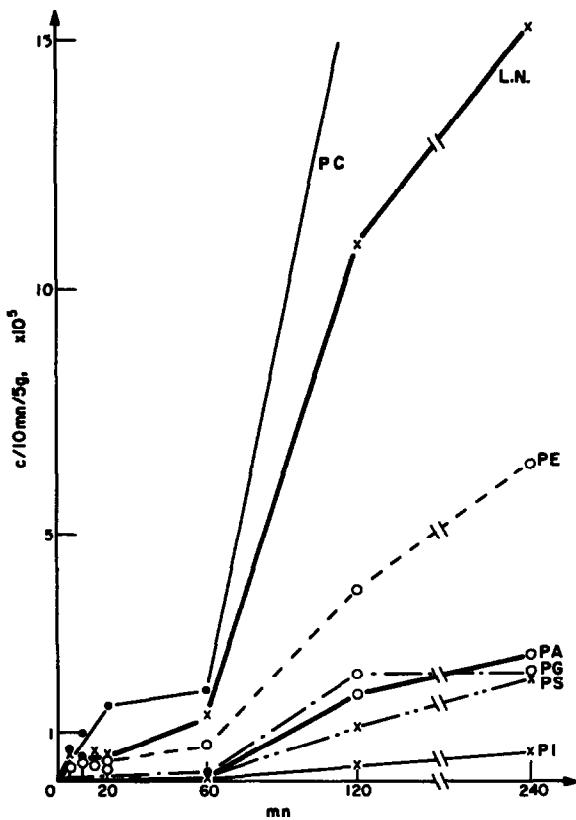


FIG. 6. INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1- ^{14}C DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME VERTE. MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 3.

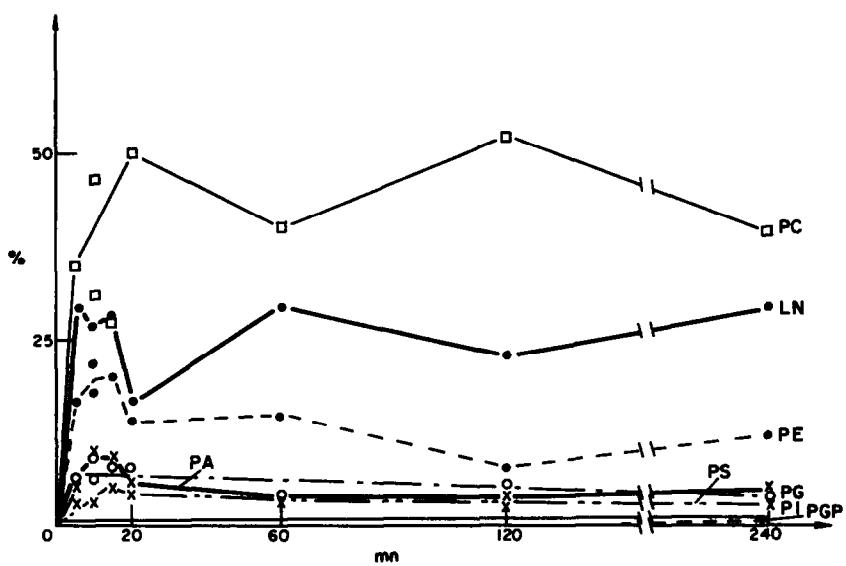


FIG. 7. POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE DANS LES LIPIDES RETROUVÉS AU NIVEAU DES DIFFÉRENTS PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME VERTE. MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 3.

Ce point mis à part, les deux phospholipides incorporant le plus de carbone radioactif sont, comme dans le cas des pommes mûres, la *phosphatidylcholine* puis la *phosphatidylethanolamine*. Dans le cas des pommes vertes, la *phosphatidylserine* semble avoir un métabolisme légèrement plus actif que dans le cas des pommes mûres. Cependant cette classe appartient avec le *phosphatidylinositol*, les *mono-* et *di-phosphatidylglycérol* au groupe de phospholipides n'incorporant qu'une faible part de la radioactivité totale.

Incorporation du Glycérol-1-3-¹⁴C dans les Lipides du Parenchyme

Les expériences conduites avec l'acétate-1-¹⁴C sur des fragments de parenchyme de pommes mûres ont été répétées avec ce nouveau précurseur. Comme le montre la Fig. 8

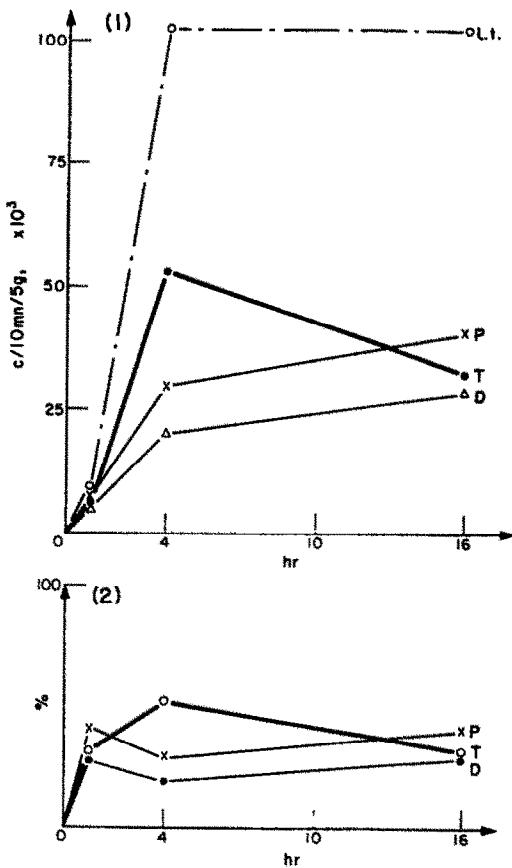


FIG. 8. INCORPORATION DU GLYCÉROL-1-3-¹⁴C DANS LE PARENCHYME DE POMME MÛRE. (1) ACTIVITÉS MESURÉES DANS LES DIVERSES CATÉGORIES DE LIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME (MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 8) (2) POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DES LIPIDES RETROUVÉS DANS CHAQUE CATÉGORIE.

le glycérol radioactif est incorporé dans les molécules de Glycérides et dans celles de phospholipides. Il y a donc des molécules synthétisées entièrement dans ces deux catégories de lipides. Comme avec l'acétate, l'intensité d'incorporation dans les phospholipides équivaut à peu près à l'intensité d'incorporation dans les triglycérides. Après 16 hr d'incubation on trouve environ 40% de la radioactivité totale des lipides dans chaque classe. Ceci signifie donc que

les molécules de phospholipides, dans le parenchyme de pomme mûres, sont synthétisées, environ trois fois moins vite que les molécules de triglycérides. Ce résultat avait déjà été acquis, dans les expériences précédentes avec l'acétate marqué. Mais on peut maintenant affirmer que *les synthèses n'intéressent pas seulement les chaînes d'acides gras mais les molécules tout entières*.

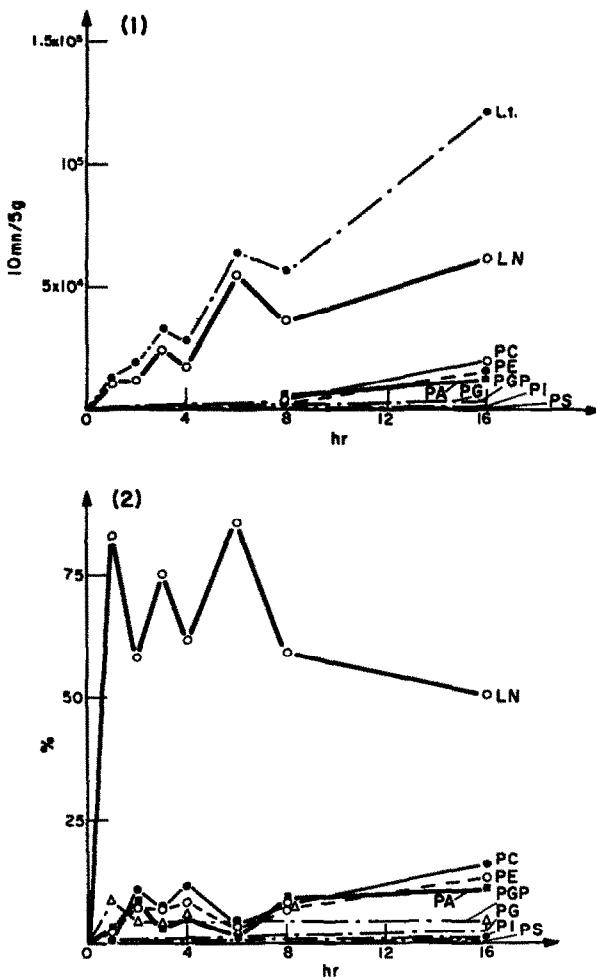


FIG. 9. INCORPORATION DU GLYCÉROL-1-3-¹⁴C DANS LES PHOSPHOLIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME. 1: ACTIVITÉS MESURÉES DANS LES DIFFÉRENTS PHOSPHOLIPIDES; 2: POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DES LIPIDES RETROUVEÉS DANS CHAQUE CATÉGORIE (MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 3).

On note encore sur les graphiques que les diglycérides gardent tout au long de l'expérience un niveau d'activité relativement élevé (20% de la radioactivité des lipides totaux se retrouve dans cette classe). Avec l'acétate-1-¹⁴C, comme précurseur, on retrouvait bien 20% de la radioactivité totale en début d'expérience mais ensuite le pourcentage tombait à 5%. Pour cette classe des diglycérides du parenchyme, il pourrait donc y avoir une certaine indépendance entre les synthèses et le renouvellement des acides gras et le renouvellement des molécules

entières ; on pourrait considérer les diglycérides du parenchyme comme des intermédiaires du métabolisme lipidique fournissant parfois des restes d'acides gras aux autres molécules.

En ce qui concerne la distribution de la radioactivité entre les différents phospholipides, les expériences conduites avec le glycérol marqué donnent à peu près les mêmes résultats que ceux obtenus avec l'acétate marqué. (Fig. 9). On note que l'incorporation du glycérol marqué est très importante dès la première heure d'expérience, dans *les lipides neutres*. L'incorporation du précurseur dans les différents phospholipides est nettement plus lente, y compris dans *l'acide phosphatidique*. Cet acide ne renferme jamais, après des temps d'incubation variant de 0 à 16 hr, plus de 10% de la radioactivité totale.

On note donc encore ici qu'une faible activité de l'acide phosphatidique est toujours observée quand une forte activité s'observe pour les autres glycérolipides

Les intensités d'incorporation du glycérol 1- ^{14}C dans les différents phospholipides du parenchyme se rangent dans le même ordre que les intensités trouvées avec l'acétate -1- ^{14}C : la *phosphatidylcholine* est légèrement plus marquée que la *phosphatidyléthanolamine*, ce qui correspond à une vitesse de renouvellement légèrement supérieure pour le premier phospholipide. Les autres classes de phospholipides du tissu incorporent chacune, moins de 5% de la radioactivité totale des lipides. Cependant les activités spécifiques absolues de chaque classe (rapportées au μg de phosphore lipidique) montrent qu'après 16 hr d'incubation chaque phospholipide présente une activité spécifique absolue voisine de 100 $\text{c}/\text{mn}/\mu\text{g}$ de P (Tableau 1). Donc les taux de renouvellement des différents phospholipides du tissu sont voisins. Nous avions déjà trouvé ce résultat avec l'acétate marqué. On observe ici cependant un renouvellement particulièrement important du *diphosphatidylglycérol*.

Incorporation du ^{32}P -Phosphate Monoacide du Sodium dans les Lipides du Parenchyme

Les activités mesurées après divers temps d'incubation de fragments de parenchyme de pommes mûres avec ce troisième précurseur sont groupés dans les Figs. 10 et 11.

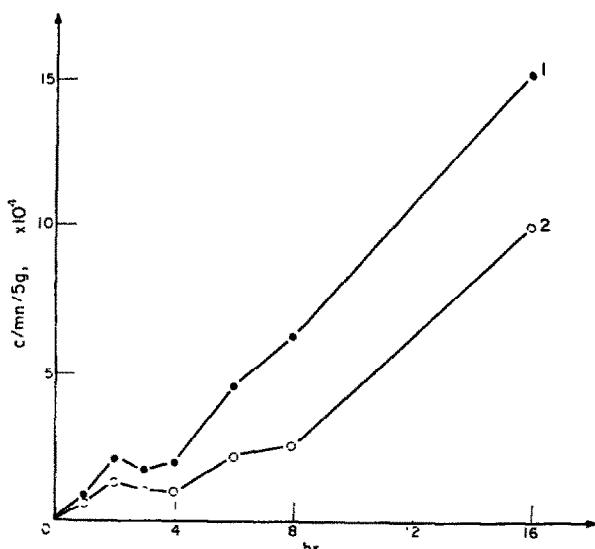


FIG. 10. INCORPORATION DU PHOSPHORE (À PARTIR DE $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$) DANS LES LIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME MÛRE. RÉSULTATS GROUPÉS DE DEUX SÉRIES D'EXPÉRIENCES 1 ET 2. (MESURE DES ACTIVITÉS AU COMPTEUR GEIGER.)

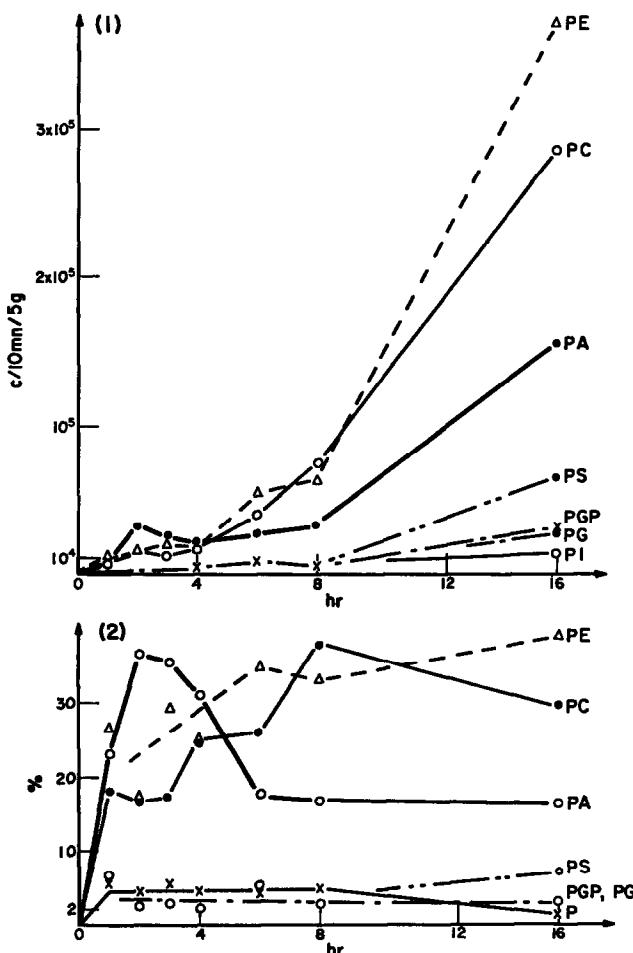


FIG. 11. INCORPORATION DU ^{32}P DANS LES DIVERS TYPES DE PHOSPHOLIPIDES DE 5 G DE PARENCHYME DE POMME MûRE. (MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 3); 1: ACTIVITÉS MESURÉES PAR SCINTILLATION APRÈS DÉCOUPE DES CHROMATOGRAMMES EN FRAGMENTS DE $1 \times 2 \text{ cm}$; 2: POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DES LIPIDES RETROUVÉS DANS CHAQUE CLASSE.

On note (Fig. 10) que l'incorporation du précurseur est progressive de 0 à 16 hr d'incubation. L'allure des courbes traduisant la quantité de précurseur radioactif incorporé en fonction du temps est assez voisine de celles trouvées précédemment avec l'acétate marqué.

La Fig. 11 permet de suivre la variation au cours du temps de l'activité de chaque classe de phospholipide. Cette figure permet de retrouver les résultats déjà obtenus avec l'acétate marqué.

(1) Pour des temps d'incubation relativement courts (0-4 hr) l'incorporation maximum de ^{32}P est observée dans l'*acide phosphatidique*. Ensuite l'activité de ce phospholipide diminue et devient inférieure à celle des autres phospholipides majeurs du tissu. Le rôle d'intermédiaire proposé pour l'*acide phosphatidique* se trouve ainsi à nouveau confirmé par cette nouvelle expérience.

(2) *Phosphatidylcholine* et *phosphatidylethanolamine* sont les deux classes de phospholipides présentant, pour des temps d'incubation longs, les plus fortes incorporations (on

retrouve dans chacune de ces classes 30-40 % de la radioactivité totale des lipides). Avec le ^{32}P cependant, on note que c'est la *phosphatidyléthanolamine* qui présente à peu près constamment une activité totale légèrement plus importante que la *phosphatidylcholine* contrairement à ce que nous avions observé avec l'acétate et le glycérol marqués. Ce résultat suggère que le renouvellement de la partie polaire (*phosphorylcholine* ou *phosphoryléthanolamine*) de ces molécules peut se faire sur un rythme indépendant du renouvellement de la partie *diacyl-glycérol*.

(3) *Phosphatidylinositol*, *phosphatidylsérine*, *mono* et *diphosphatidylglycérol* sont des phospholipides moins importants dans le tissu, ne renfermant chacun jamais plus de 5 % de la radioactivité totale des lipides. Cependant les activités spécifiques absolues mesurées pour ces catégories mineures (Tableau 1) montrent qu'elles présentent un taux de renouvellement aussi important que celui des catégories majeures (il est vrai cependant que l'activité spécifique absolue mesurée pour le *phosphatidylinositol* est inférieure à celles des autres phospholipides).

CONCLUSIONS GENERALES

Cette étude du métabolisme des lipides au sein du parenchyme de pomme montre d'abord que toutes les catégories de graisses du tissu présentent un métabolisme actif correspondant vraisemblablement à un certain *renouvellement*; ce métabolisme s'observe dans les cellules de fruits verts conservés à 0° depuis l'époque de la cueillette, aussi bien que dans des cellules de fruits franchement mûrs, jaune d'or, entrant en sénescence.

Le métabolisme le plus actif est observé dans le parenchyme de fruit mûr pour la classe des *triglycérides*. Les résultats des expériences conduites soit avec l'acétate radioactif, soit avec le glycérol radioactif sont concordants et indiquent que dans le fruit mûr *les molécules de triglycérides sont synthétisées environ trois fois plus activement que les molécules de phospholipides*. Les expériences menées avec le glycérol-1- ^{14}C montre qu'il y a des synthèses totales de molécules de triglycérides, synthèses intéressant au même degré le glycérol et les restes d'acides gras. Dans les cellules du parenchyme de fruit vert les synthèses de triglycérides sont moins importantes que dans le fruit mûr. Le renouvellement des phospholipides a la même intensité dans le fruit mûr et dans le fruit vert.

Nous avons précédemment³ signalé une accumulation d'acides insaturés (notamment *d'acide linoléique*) dans le parenchyme des pommes au cours de la maturation. Les résultats présentés ci-dessus permettent de conclure que le parenchyme incorpore ces acides gras insaturés, synthétisés en cours de maturation, essentiellement dans des molécules de triglycérides.

Deux types de molécules peuvent être considérées comme des intermédiaires sur la voie de biosynthèse de ces triglycérides: il s'agit de l'*acide phosphatidique* et des *diglycérides*. Les expériences conduites aussi bien avec l'acétate-1- ^{14}C qu'avec le phosphore ^{32}P montrent que dans le parenchyme de fruit mûr, pendant les temps d'incubation courts, une grande partie des atomes radioactifs sont incorporés dans l'*acide phosphatidique*. Après des temps dépassant 4 hr, le pourcentage de la radioactivité totale retenue par ce phospholipide diminue tandis qu'augmentent la radioactivité des triglycérides ou des autres phospholipides. Les diglycérides de même montrent, avec l'acétate-1- ^{14}C employé comme précurseur, une radioactivité relative élevée pendant les premières heures d'expériences, diminuant par la suite. Dans les expériences ci-dessus décrites, cependant, aucune relation de précurseur à produit n'a pu être clairement mise en évidence entre l'*acide phosphatidique* et les diglycérides. Selon les schémas les plus couramment proposés pour le métabolisme des lipides,² on

pourrait donc résumer le rôle d'intermédiaire de l'acide phosphatidique et des diglycérides dans le parenchyme de pomme de la manière suivante: (Schéma 1).

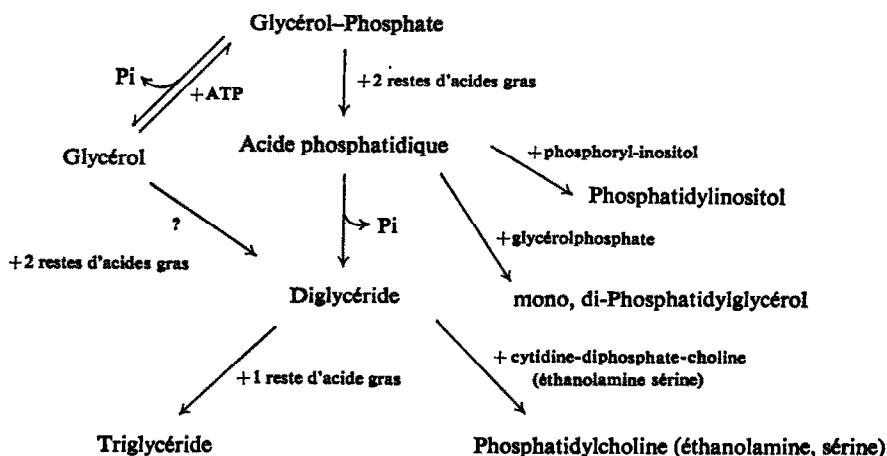


SCHÉMA 1.

Enfin, en ce qui concerne le renouvellement des différents phospholipides, nos expériences montrent que les *taux de renouvellement* de tous les phospholipides du tissu (mis à part l'*acide phosphatidique*) sont assez *voisins* les uns des autres (on observe à un instant donné des activités spécifiques (par μg de Phosphore lipidique) du même ordre de grandeur pour les divers phospholipides, que le marqueur soit l'acétate, le glycérol ou le phosphore). Le glycérol et les deux restes d'acides gras (formant globalement un "reste diglycéride") se renouvellent au même rythme dans les divers phospholipides, comme le montre la comparaison des résultats obtenus avec l'acétate marqué ou avec le glycérol marqué. Avec ces deux précurseurs les synthèses les plus nombreuses intéressent d'abord la *phosphatidylcholine*, puis la *phosphatidyléthanolamine* (qui sont les deux phospholipides majeurs du parenchyme) puis, à un degré bien moindre les phospholipides mineurs du tissu.

Quand les marquages sont faits avec du ^{32}P , c'est pour la *phosphatidyléthanolamine* que l'on observe les activités biosynthétiques les plus importantes, légèrement supérieures à celles mesurées pour la *phosphatidylcholine*. Ce léger renversement de situation suggère une certaine indépendance, dans le métabolisme des phospholipides, entre la partie diacylglycérol et la partie phosphorylée de ces molécules, ce qui est bien souligné par le schéma ci-dessus. On retrouve bien avec le ^{32}P , les courbes donnant à penser que l'*acide phosphatidique* est un précurseur des autres molécules lipidiques dans le métabolisme.

PARTIE EXPERIMENTALE

Toutes les extractions, séparations et analyses chromatographiques sont conduites comme il est exposé dans le précédent article.¹

Incubation des Fragments de Parenchyme

Les fragments sont prélevés dans la pulpe d'un fruit, à égale distance environ de la zone carpellaire et de la zone verte épidermique. Les fragments de tissus sont coupés en petits cubes de 3-4 mm d'arête environ et répartis en lots de 5 g.

Chaque lot est mis à incuber, pendant la durée d'expérience désirée, dans 5 ml d'une solution ayant la

composition suivante: solution minérale d'Heller⁴ employée pour la culture des tissus végétaux; glucose: 0,33 Mole; sel de sodium de l'adenosine triphosphate: 0,1 mMole; acétate de manganèse: 0,1 mMole; chlorure de magnésium: 0,1 mMole; précurseur radioactif: 50 μ Curies pour l'acétate-1-¹⁴C, une quantité équivalent à 50 μ Curies au moment du comptage pour le $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$ et 5 μ Curies pour le glycérol 1,3-¹⁴C.

Les incubations se font à la température du laboratoire (environ 20° C).

Comptages de la Radioactivité des Spots

Un premier comptage, grossier, est fait au compteur de Geiger Muller, après localisation des spots radioactifs par autoradiographie (les techniques de révélation ont été décrites dans l'article précédent¹).

Les comptages précis, par scintillation, sont faits de la manière suivante. Les chromatogrammes sont découpé en bandes de deux centimètres de large (chaque bande correspondant à la migration des lipides d'un lot de fragments de parenchyme). Ces bandes sont ensuite découpés cm par cm et les morceaux de chromatogramme sont introduits dans des flacons de scintillateur Tri-Carb Packard contenant chacun 15 ml de la solution suivante: toluène, 2-5 diphenyl Oxazole PPO (5 g/l), dimethyl-1,4 bis-2-(5-Phenylloxazolyl) benzène ou dimethyl POPOP (0,3 g/l). Les comptages sont faits—et si nécessaires répétés—pendant des temps de 10 mn, dans des conditions de sensibilité nous assurant un rendement de comptage de 90% environ (contrôlé avec une source de toluène marqué).

Un histogramme tel celui représenté à la Fig. 12 peut alors être composé: ce graphique représente la quantité de radioactivité mesurée par cm de chromatogramme. En se reportant de nouveau à l'autoradiographie, on peut grouper les activités correspondant à un même spot pour déterminer l'activité totale de ce spot (en coups/10 mn/type de lipides contenus dans 5 g de parenchyme).

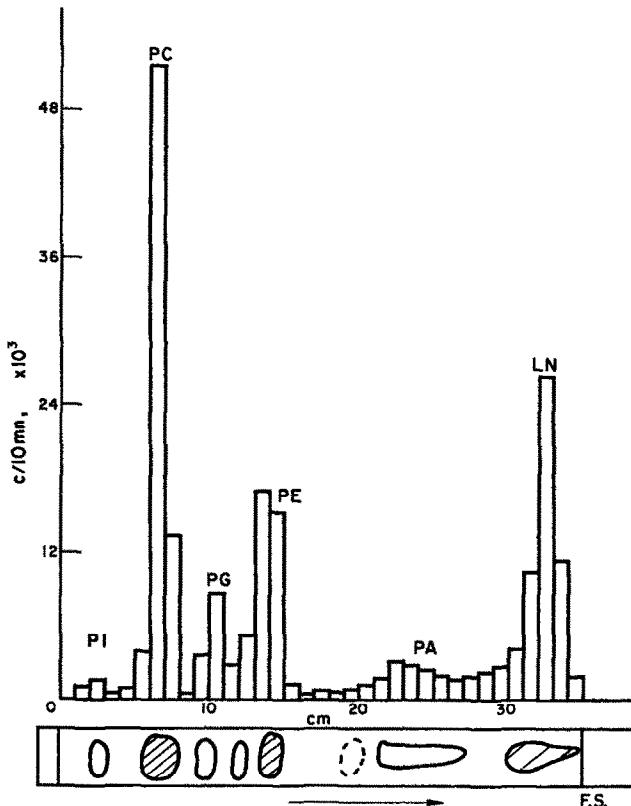


FIG. 12. RADIOCHROMATOGRAMME DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME, MARQUÉS AU ¹⁴C ET SÉPARÉS SUR PAPIER SILICÉ. EN ORDONNÉE FIGURENT LES ACTIVITÉS MESURÉES. EN ABSISSE FIGURENT LES LONGUEURS CORRESPONDANT AUX BANDES DÉCOUPÉES SUR LE CHROMATOGRAMME PRÉSENTÉ SOUS LE GRAPHIQUE.

⁴ R. HELLER, *Recherches sur la Nutrition Minérale des Tissus Végétaux Cultivés in vitro*. Masson et Cie, Paris (1953).