

## ETUDE DES MECANISMES DE SYNTHÈSE ET DE TRANSFORMATION DE L'ACIDE MALIQUE, DE L'ACIDE TARTRIQUE ET DE L'ACIDE CITRIQUE CHEZ *VITIS VINIFERA* L.

G. RIBÉREAU-GAYON\*

Laboratoire d'Oenologie et Chimie agricole, Faculté des Sciences, 33—Talence, France

(Received 15 September 1967)

**Résumé**—Cette étude a été envisagée, d'une part au niveau moléculaire afin d'interpréter les mécanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique, d'autre part au niveau de la plante entière afin de mieux connaître l'intervention de chaque organe dans son fonctionnement général. L'acide malique est formé principalement par une fixation directe de CO<sub>2</sub> sur l'acide phospho-énol-pyruvique. Ce mécanisme est particulièrement intense dans les raisins verts dont les ressources en acide phospho-énol-pyruvique proviennent de la dégradation des glucides transportés des feuilles vers les raisins. L'acide malique est également synthétisé à partir de l'acide citrique formé dans les racines, transporté vers les organes aériens et progressivement oxydé au cours de sa migration en acide malique. La diminution du taux d'acide malique des raisins au cours de la maturation provient, non seulement d'une dégradation totale de cette molécule, mais également d'une transformation en glucose. Seuls les organes jeunes, en voie de croissance, feuilles et raisins, synthétisent l'acide tartrique. Cet acide est formé à partir du glucose suivant un mécanisme de dégradation particulier faisant intervenir une coupure entre les atomes de carbone 4 et 5 de la molécule de glucose.

### INTRODUCTION

PARMI les constituants chimiques des organes végétaux, les glucides, les acides organiques et les composés azotés ont été les plus étudiés, aussi bien du point de vue de leur structure que de leur métabolisme; cependant peu de travaux ont été réalisés sur la biochimie de la vigne, plante qui, indépendamment de son intérêt économique, présente certaines particularités méritant d'être mieux connues. Cette étude est délicate, car il s'agit d'une plante pérenne, ne donnant des fruits qu'après plusieurs années et dont les cepes possèdent chacun une individualité propre, entraînant des différences de composition des divers organes; d'autre part, comme nous l'avons vérifié nous-mêmes, ces différences ne se reproduisent pas de façon identique d'une année à l'autre, rendant difficile des comparaisons et, par voie de conséquence, toute étude expérimentale de la biochimie de la vigne.

Nous avons regroupé dans cet article, à partir d'une étude d'ensemble du métabolisme dans la vigne,<sup>1</sup> les résultats les plus originaux concernant les trois acides organiques principaux de cette plante, l'acide L-malique, l'acide citrique et l'acide L-tartrique.

Au cours de nos recherches nous avons introduit, dans diverses conditions et dans différents organes de la vigne, feuilles, raisins verts, raisins mûrs, racines, des molécules marquées (carbone 14)† en relation avec le métabolisme des acides organiques. Nous avons ensuite recherché la radioactivité dans les glucides, les acides organiques et les acides aminés; dans

\* adresse actuelle: Department of Botanical Sciences, Los Angeles, Calif. 90024, USA. à partir du 1-10-68: Department of Biochemistry & Biophysics, Davis, Calif. 95616, USA.

† Nous nous sommes reportés pour effectuer des notations de molécules marquées à une publication de G. Kersaint (*Bull. Soc. Chim.* 53-54, 1957).

<sup>1</sup> G. RIBÉREAU-GAYON, Thèses Sci. phys., Paris (1966).

le cas de l'acide malique et de l'acide tartrique, nous avons également déterminé la radioactivité dans les différents atomes de carbone de ces molécules.

Chaque fois que cela était possible les introductions de molécules marquées ont été réalisées sur la vigne en place afin de modifier au minimum le métabolisme dans les organes.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### *Assimilation du CO<sub>2</sub>—Photosynthèse et Carboxylation du PEP\**

En exposant à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> pendant 10 secondes des feuilles et des raisins verts, avec la technique préconisée par Galmiche,<sup>2</sup> on observe, comme dans tout organe végétal vert, une radioactivité élevée dans l'acide phospho-glycérique et dans les sucres phosphorylés (Tableau 1). La photosynthèse est donc active dans ces organes; cependant, à côté de cette réaction principale, une réaction secondaire conduit à une formation importante d'acide malique dans les raisins.

TABLEAU 1. FIXATION DE <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> PAR DES FEUILLES ET DES RAISINS VERTS PENDANT 10 SEC A LA LUMIERE\*

	Feuilles (Pour cent de la radioactivité des constituants extraits)	Raisins (Pour cent de la radioactivité des constituants extraits)
Saccharose-phosphate et acide glutamique	0,8	0
Oses-monophosphates (Sédoheptulose, glucose et fructose)	41	21,2
Acide aspartique†	2,4	9,7
Acide citrique†	2	—
Trioses-phosphates et acide glycérique	1,4	3,7
Sédoheptulose-diphosphate	2,0	—
Fructose-diphosphate	5	—
Acide malique†	6,5	30
Acide phospho-glycérique (PGA)	37	25
Acide phospho-énol-pyruvique (PEP)	0,3	0,2

\* — Radioactivité du CO<sub>2</sub> introduit: 120 μCi dans chacune des deux expériences.

— Radioactivité totale des constituants extraits en milliers d'impulsions par minute et par gramme de substance fraîche: feuilles 3400, raisins 11.

— Séparation effectuée par électrophorèse sous haute tension.

† Identification effectuée par chromatographie de l'éluat de la bande et radioautographie.

La radioactivité élevée de l'acide aspartique des raisins indique que l'acide oxaloacétique son dérivé direct, doit être un intermédiaire dans cette formation d'acide malique. Dans ce cas, la carboxylation s'effectue sur le PEP donnant l'acide oxaloacétique qui est ensuite rapidement réduit en acide malique.<sup>3</sup>

Dans les feuilles, le phénomène de la β-carboxylation du PEP se produit également et nous l'avons mis en évidence en exposant une feuille de vigne à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> à l'obscurité: seul l'acide malique est marqué. Mais la photosynthèse conduit dans ces organes à une fixation de CO<sub>2</sub> beaucoup plus intense que le deuxième processus.

\* Abréviations utilisées: NADPH: nicotinamide-adénine dinucléotide-phosphate réduit. PEP: phospho-énol-pyruvate. PGA: phospho-3 glycérate.

<sup>2</sup> J. GALMICHE, Coll. intern. CNRS, La photosynthèse, 119, 589, 597 (1959).

<sup>3</sup> D. D. DAVIES, J. GIOVANELLI et T. REES, *Plant Biochemistry*, Blackwell, Oxford (1964).

Les deux graphiques de la Fig. 1 montrent la variation de la radioactivité des glucides, des acides organiques et des acides aminés des feuilles et des raisins verts pour différentes durées d'exposition. Ils font ressortir la particularité des raisins verts d'utiliser le  $\text{CO}_2$  pour la synthèse des acides organiques avec une grande rapidité.

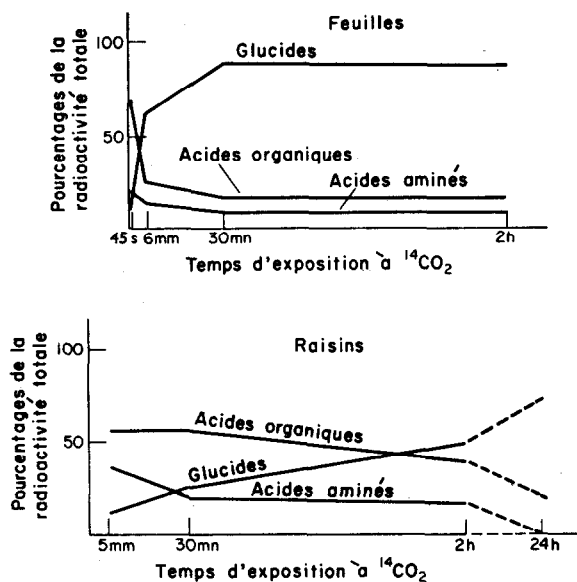


FIG. 1. VARIATION DE LA RADIOACTIVITE DES GLUCIDES, DES ACIDES ORGANIQUES ET DES ACIDES AMINES FORMES DANS LES FEUILLES DE VIGNE ET LES RAISINS VERTS, EN FONCTION DU TEMPS D'EXPOSITION A  $^{14}\text{CO}_2$ .

Les fixations de 45 s à 2 h ont été réalisées à la lumière extérieure; seule, celle de 24 h a été effectuée en partie à l'obscurité, pendant la nuit.

#### *Interconversion entre les Glucides et l'Acide Malique*

Le métabolisme du raisin vert est très actif et on pouvait s'attendre à observer une formation d'acide malique à partir des glucides. Cette formation a été vérifiée en introduisant du glucose marqué sur différents atomes de carbone et en comparant les répartitions théoriques et expérimentales de la radioactivité dans les atomes de carbone de l'acide malique isolé (Tableau 2). Ces valeurs sont voisines, sauf pour le glucose ( $^{14}\text{C}$ )-1; dans ce cas les radioactivités dans les carboxyles de l'acide malique sont en relation avec le fonctionnement du cycle des pentoses: le carbone 1 du glucose est dégagé rapidement sous forme de  $\text{CO}_2$ , puis refixé par carboxylation du PEP. Dans chaque cas les radioactivités des carboxyles de l'acide malique sont similaires et ce phénomène est lié à l'équilibre existant entre l'acide malique et l'acide fumarique dont les carbones 1 et 4 sont symétriques.

Le mécanisme inverse, permettant la formation de glucides à partir de l'acide malique, démontré expérimentalement dans plusieurs cas,<sup>4, 5</sup> reste controversé dans certaines plantes.<sup>6</sup> Nous avons montré que dans le raisin cette réaction est importante pendant toute la période de la maturation. On pourrait éventuellement prévoir une telle transformation dans les

<sup>4</sup> S. Z. A. HAIDRI, *Plant Physiol.* 30, supp IV (1955).

<sup>5</sup> H. L. KORNBERG et H. A. KREBS, *Nature* 179, 988-991 (1958).

<sup>6</sup> A. MOYSE, *Travaux dédiés à Lucien Plantefol*, 21-44. Masson, Paris (1965).

raisins verts, mais dans les raisins mûrs les réactions chimiques sont lentes et cette transformation est plus surprenante. Les résultats rapportés sur le Tableau 3 montrent que dans les raisins mûrs, l'acide malique est transformé en glucose tandis que le glucose n'est plus métabolisé.

Cette réaction permet d'interpréter, par un mécanisme qui n'avait jamais été signalé dans le cas de la vigne, la diminution d'acidité du raisin au cours de la maturation et l'accumulation de glucides. Toutefois, en ce qui concerne l'accumulation des glucides des raisins en fin de maturation elle ne doit pas jouer un rôle important puisque ceux-ci contiennent en moyenne de 2 à 5 g d'acide malique par litre de jus et de 150 à 250 g de glucides.

TABLEAU 2. COMPARAISON DES REPARTITIONS THEORIQUES ET EXPERIMENTALES DE LA RADIOACTIVITE DANS LES ATOMES DE CARBONE DE L'ACIDE MALIQUE FORME A PARTIR DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}_6$ ), DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )- $^1$  ET DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )- $^6$

	$\begin{array}{cccccc} \text{COOH} & \text{---} & \text{CHOH} & \text{---} & \text{CH}_2 & \text{---} & \text{COOH} \\ & & 2 & + & 3 & & 4 \\ & \underbrace{\hspace{1.5cm}} & & & \underbrace{\hspace{1.5cm}} & & \underbrace{\hspace{1.5cm}} \\ & a & & & a & b & a & b \end{array}$ (Pour cent de la radioactivité de l'acide malique)					
Glucose ( $^{14}\text{C}_6$ )	16,7	19	66,6	62	16,7	17
Glucose ( $^{14}\text{C}$ )- $^1$	0	12	100	76	0	12
Glucose ( $^{14}\text{C}$ )- $^6$	0	7	100	86	0	7

a. Valeurs théoriques obtenues en supposant le glucose dégradé uniquement par la voie de la glycolyse et du cycle de Krebs.

b. Valeurs expérimentales.

TABLEAU 3. TRANSFORMATION DU GLUCOSE ET DE L'ACIDE MALIQUE RADIOACTIFS INTRODUITS DANS DES RAISINS A MATURETE PENDANT 6 JOURS

	Introduction de glucose ( $^{14}\text{C}_6$ )	Introduction d'acide malique ( $^{14}\text{C}_4$ )
	(Pour cent de la radioactivité des constituants extraits)	
Glucides	97	84
Acides organiques	1	11
Acides aminés	2	5

C'est par une réaction similaire que Peynaud et Guimberteau<sup>7</sup> ont interprété la formation d'alcool éthylique à partir de l'acide malique dans les raisins mûrs conservés en anaérobiose.

Dans cette transformation (Tableau 3) PGA est un intermédiaire; il doit être réduit et cette réduction nécessite la présence de NADPH. Dans les raisins verts NADPH est continuellement formé par la photosynthèse ou par le fonctionnement du cycle des pentoses. Les raisins mûrs ne photosynthétisent plus, mais, comme ils contiennent des quantités considérables de glucides, il suffit qu'une faible part seulement soit dégradée suivant le cycle des pentoses pour que les réserves de NADPH soient suffisantes et permettent la réduction du PGA. A l'appui de cette hypothèse, on remarque que les anthocyanes du raisin, dont la synthèse

<sup>7</sup> E. PEYNAUD et G. GUIMBERTEAU, *Ann. Physiol. Végétale* **4**, 161-167 (1963).

continue pendant toute la période finale de la maturation, sont formées à partir d'intermédiaires du cycle des pentoses (érythrose-phosphate et sédoheptulose-phosphate).

### Métabolisme de l'Acide Tartrique

La présence de l'acide tartrique en quantité abondante est une particularité de la vigne. Le raisin est le seul fruit européen qui contienne de l'acide tartrique. De plus l'acide tartrique joue un rôle important dans la qualité des vins; c'est un acide relativement fort qui donne au vin un pH de l'ordre de 3 permettant sa conservation. D'autre part, avec les autres acides, il contribue à compenser le goût propre de l'alcool; le vin est de toutes les boissons fermentées celle qui est la plus riche en alcool et aussi celle qui est la plus acide.

TABLEAU 4. RADIOACTIVITE DES CARBOXYLES DE L'ACIDE MALIQUE ET DE L'ACIDE TARTRIQUE FORMES DANS LES RAISINS VERTS A PARTIR DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}_6$ ), DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )<sup>-1</sup> ET DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )<sup>-6</sup>\*

Durée de l'introduction	—COOH de l'acide malique		—COOH de l'acide tartrique	
	3 h (Pour cent de la radioactivité de l'acide malique)	24 h	3 h (Pour cent de la radioactivité de l'acide tartrique)	24 h
Glucose ( $^{14}\text{C}_6$ )	36	40	47	53
Glucose ( $^{14}\text{C}$ ) <sup>-1</sup>	24	29	88	87
Glucose ( $^{14}\text{C}$ ) <sup>-6</sup>	14	27	60	60

\* Les valeurs des radioactivités des carboxyles 1 et 4 de l'acide malique sont dans chaque expérience voisines; elles n'ont pas pu être différenciées dans le cas de l'acide tartrique.

TABLEAU 5. FORMATION D'ACIDE TARTRIQUE RADIOACTIF A PARTIR DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}_6$ ), DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )<sup>-1</sup> ET DU GLUCOSE ( $^{14}\text{C}$ )<sup>-6</sup>

Durée de l'introduction	3 h (Pour cent de la radioactivité des acides organiques)	24 h
Glucose ( $^{14}\text{C}_6$ )	15	12
Glucose ( $^{14}\text{C}$ ) <sup>-1</sup>	25	20
Glucose ( $^{14}\text{C}$ ) <sup>-6</sup>	12	8

L'acide tartrique ne peut pas provenir de l'acide malique étant donné les différences de répartition de la radioactivité dans les atomes de carbone des molécules de ces deux acides lorsqu'ils sont formés à partir d'un même précurseur (Tableau 4).

On avait déjà montré que la synthèse de l'acide tartrique n'est pas en relation avec le métabolisme de l'acide malique, mais qu'il est formé à partir du glucose.<sup>8,9</sup>

Nous avons également observé que l'acide tartrique isolé après des introductions de glucose contient une quantité appréciable de la radioactivité des acides organiques.

Pour essayer de préciser le mécanisme du passage du glucose à l'acide tartrique, il est intéressant de comparer sur le Tableau 5 les pourcentages de radioactivité contenus dans

<sup>8</sup> H. A. STAFFORD et F. A. LOEWUS, *Plant Physiol.* 33, 194-199 (1958).

<sup>9</sup> J. GYR, Thèses Sci. nat., Paris (1961).

l'acide tartrique formé dans les raisins à partir du glucose ( $^{14}\text{C}_6$ ), du glucose ( $^{14}\text{C}$ )-1 et du glucose ( $^{14}\text{C}$ )-6. On observe que le carbone 1 du glucose est incorporé dans l'acide tartrique plus rapidement que le carbone 6.

D'autre part le glucose ( $^{14}\text{C}$ )-1 conduit à l'acide tartrique marqué principalement dans les carboxyles (Tableau 4). Par conséquent, le carbone 1 de la molécule de glucose est en relation directe avec les carboxyles de l'acide tartrique.

On peut alors interpréter la synthèse de l'acide tartrique par une coupure de la molécule de glucose entre les carbones 4 et 5, les carbones 5 et 6 étant éliminés (Fig. 2). Le glucose serait au préalable transformé en acide céto-5 gluconique,<sup>10</sup> mais ce composé intermédiaire n'a pas pu être mis en évidence.

Une autre expérience, réalisée à l'obscurité, confirme le schéma de la Fig. 2; l'acide tartrique des raisins verts est très radioactif après une introduction pendant 8 heures de glucose ( $^{14}\text{C}$ )-1 et de glucose ( $^{14}\text{C}$ )-2, mais non de glucose ( $^{14}\text{C}$ )-6.

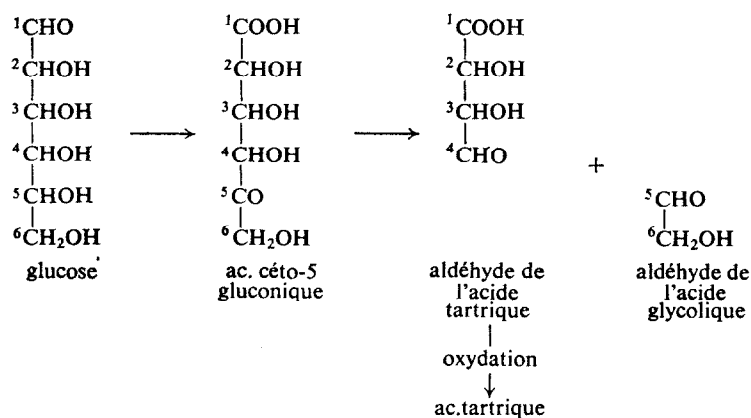


FIG. 2. MECANISME DE SYNTHÈSE DE L'ACIDE TARTRIQUE A PARTIR DU GLUCOSE.

Ce schéma de la formation de l'acide tartrique des plantes supérieures à partir du glucose a déjà été proposé,<sup>11</sup> mais, pour ses auteurs, il reposerait essentiellement sur le fait que les atomes de carbone 2 et 3 du glucose ont la même configuration stérique que les carbones internes de l'acide D (+) tartrique. Notre travail apporte les premiers résultats expérimentaux en faveur de cette hypothèse.

Dans les feuilles de *Pelargonium*, Maroc<sup>12</sup> a proposé un mécanisme différent de synthèse de l'acide tartrique, mais qui semble être en relation avec la présence d'acide L (+) tartrique dans cette plante.

L'acide tartrique est formé uniquement dans les organes jeunes en voie de croissance. Nous n'avons pas pu déterminer la cause de l'activité et de l'arrêt de la synthèse de l'acide tartrique. Dans les raisins l'arrêt de cette synthèse se produit brusquement à un stade mal défini, mais avant le début de la véraison. Egalement, des feuilles ayant atteint leur taille définitive ne forment plus d'acide tartrique.

<sup>10</sup> S. KHESGHI, H. R. ROBERTS et W. BUCEK, *Appl. Microbiol.* **2**, 183-190 (1954).

<sup>11</sup> H. B. VICKERY et J. K. PALMER, *J. Biol. Chem.* **207**, 275-285 (1954).

<sup>12</sup> J. MAROC, *Physiol. Végétale* **5**, 37-55 (1967).

Il semble, cependant, que ces processus soient en liaison avec le fonctionnement du cycle des pentoses qui est particulièrement actif dans les organes jeunes. D'autre part, l'acide gluconique, premier produit formé à partir du glucose suivant ce mécanisme, doit également être un intermédiaire dans la formation d'acide tartrique à partir du glucose suivant le schéma de la Fig. 2; en effet, il est le précurseur le plus probable de l'acide céto-5 gluconique.<sup>13</sup>

L'acide tartrique une fois formé dans la plante semble être accumulé sans transformation importante; en effet, son métabolisme devient très lent par rapport à celui de l'acide malique. Par des introductions d'acide tartrique marqué dans des feuilles, des raisins verts ou des raisins mûrs, nous n'avons jamais pu mettre en évidence d'autre produit radioactif que l'acide tartrique lui-même.

Des expériences récentes<sup>14</sup> indiquent cependant que l'acide tartrique doit être dégradé lentement dans la plante et on peut penser alors que les produits intermédiaires sont des composés instables. Ces résultats ne confirment pas les expériences de Drawert et Steffan<sup>15</sup> dans lesquelles la dégradation de l'acide tartrique serait de même importance que celle du glucose.

Nous n'avons jamais observé une synthèse d'acide tartrique dans les racines, en expérimentant sur de jeunes plants de vigne, mais, dans le cas d'une exposition de feuilles d'un jeune plant à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, l'acide tartrique des racines est légèrement radioactif. Il faut donc admettre que l'acide tartrique formé dans les parties aériennes peut être transporté vers les racines. De même, l'acide tartrique marqué, introduit dans des racines d'un jeune plant, est retrouvé, huit jours après, en quantité abondante dans les feuilles sans avoir subi de transformation appréciable au cours de cette migration. Ceci confirme la lenteur du métabolisme de l'acide tartrique.

#### *Importance des Migrations Depuis les Feuilles vers les Raisins dans l'Accumulation de l'Acide Malique et de l'Acide Tartrique des Raisins*

On a vu dans les paragraphes précédents que le raisin synthétise lui-même ses constituants propres, mais il convient de rechercher si ceux-ci ne sont pas également formés dans les feuilles, puis transportés vers les raisins.

Pour connaître l'importance des migrations des feuilles vers les raisins, les feuilles d'un rameau ont été exposées à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> et les raisins du même rameau ont été analysés à différents moments comme l'indique le Tableau 6. Les valeurs rapportées sur ce tableau montrent que les glucides photosynthétisés dans les feuilles sont, pour une part importante, transportés dans les raisins où ils s'accumulent, principalement sous forme de glucose et de fructose. L'acide malique et l'acide tartrique sont aussi nettement radioactifs, mais après une durée plus longue que dans le cas des glucides; ils doivent provenir principalement d'une transformation des glucides marqués accumulés dans le raisin.

D'autres expériences, comportant des introductions de glucose, d'acide malique et d'acide tartrique marqués pendant cinq jours dans les feuilles d'un rameau, mettent en évidence une migration des acides organiques réelle, quoique faible, par rapport à celle des glucides. En effet, on a retrouvé dans des raisins du même rameau 20 % de la radioactivité introduite dans les feuilles sous forme de glucose, 3 % dans le cas de l'acide malique et 1 % dans celui de l'acide tartrique. Les raisins fabriquent donc eux-mêmes, à partir des glucides transportés depuis les feuilles, leurs constituants chimiques principaux, en particulier l'acide

<sup>13</sup> K. OKAMOTO, *J. Biochem.* **53**, 348-353 (1963).

<sup>14</sup> G. RIBÉREAU-GAYON et A. LEFEBVRE, *Compt. Rend.* **264**, 1112-1115 (1967).

<sup>15</sup> P. DRAWERT et H. STEFFAN, *Vitis* **5**, 27-44 (1965).

malique et l'acide tartrique. Nous avons vérifié que les glucides sont transportés principalement sous forme de saccharose.<sup>16</sup>

TABLEAU 6. MIGRATIONS VERS LES RAISINS DES SUBSTANCES CHIMIQUES FORMÉES DANS LES FEUILLES

	Feuilles		Raisins verts	
Durée de la fixation de $^{14}\text{CO}_2$	4 h	situés en dessous des feuilles et sans $^{14}\text{CO}_2$		
Durée entre le début de la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ et le prélèvement	48 h	6 h	24 h	48 h
Poids de substance fraîche (g)	15,3	6,0	4,1	12,5
		Radioactivité*		
Substances neutres (glucides)	265	10	50	130
Acides organiques	113	1	8	60
Acides aminés	12	0	1	17
Fructose	50	traces	17	19
Glucose	154	traces	14	61
Saccharose	53	traces	17	38
Acide malique	104	0	6	41
Acide tartrique	1	0	1	14
Acide citrique	2	0	traces	1

\* Milliers d'impulsions par minute et par gramme de substance fraîche — Radioactivité du  $\text{CO}_2$  introduit: 100  $\mu\text{Ci}$ .

*Formation d'Acide Citrique dans les Racines. Son Oxydation en Acide Malique au Cours de son Transport vers les Parties Aériennes*

Afin d'avoir une image aussi précise que possible du métabolisme dans l'ensemble de la plante, nous avons été conduits à expérimenter sur de jeunes plants de vigne cultivés en pots. Il devient, en effet, possible d'introduire une substance marquée, soit dans les feuilles, soit dans les racines et de suivre ses transformations et ses migrations dans les autres organes de la plante.

TABLEAU 7. SYNTHÈSE DE L'ACIDE CITRIQUE DANS LES RACINES DE LA VIGNE (1)

Molécules marquées introduites Organe prélevé	Bicarbonate de sodium ( $^{14}\text{C}$ ) dans les racines (a)		$^{14}\text{CO}_2$ dans les feuilles (b)	
	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles
	(Pour cent de la radioactivité des acides organiques)			
Acide malique	54	97	52	53
Acide tartrique	0	0	2	7
Acide citrique	45	3	35	2

(1) Expérimentation réalisée sur des plants de vigne cultivés en pots.

(a) Absorption par les racines de 150  $\mu\text{Ci}$  de bicarbonate de sodium ( $^{14}\text{C}$ ) pendant 8 jours et migration des composés formés vers les feuilles.

(b) Exposition des feuilles à 150  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_2$  pendant 48 hr et migration pendant 8 jours des composés formés vers les racines.

<sup>16</sup> L. GENEVOIS, *Bull. Physiol. Végétale* 4, 37-38 (1958).



Le processus principal mis en évidence par cette technique est l'accumulation importante d'acide citrique dans les racines et sa transformation en acide malique au cours de sa migration vers les organes aériens. Les racines de la vigne sont caractérisées, par rapport aux organes aériens, par une teneur élevée en acide citrique.<sup>17,18</sup> Les résultats donnés sur le Tableau 7 montrent que, par des introductions de bicarbonate de sodium (<sup>14</sup>C) dans les racines de jeunes plants de vigne et par des expositions de feuilles à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, l'acide citrique est, par rapport aux autres acides organiques, nettement plus radioactif dans les racines que dans les feuilles.

L'acide citrique des racines peut être formé par deux mécanismes, d'ailleurs complémentaires:<sup>19</sup>

- (1) fixation de CO<sub>2</sub> provenant du sol (principalement par l'intermédiaire des carbonates) sur l'acide phospho-énol-pyruvique, selon le mécanisme précédemment décrit, avec formation d'acide malique, ensuite oxydé en acide citrique suivant les réactions du cycle de Krebs;
- (2) migration des glucides des feuilles vers les racines et oxydation du glucose en acide citrique selon les réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs; cette migration des glucides vers les racines est en accord avec les résultats obtenus par Bouard.<sup>20</sup>

Nous avons mongré également que l'acide citrique formé et accumulé dans les racines est exporté vers les parties aériennes dans les quelles il est oxydé en acide malique. En effet, pour diverses introductions de molécules marquées (Tableau 8) le rapport radioactivité de l'acide malique/radioactivité de l'acide citrique augmente continuellement des racines jusqu'aux feuilles.

TABLEAU 8. MIGRATION DE L'ACIDE CITRIQUE FORME DANS LES RACINES VERS LES ORGANES AERIENS ET OXYDATION PROGRESSIVE EN ACIDE MALIQUE

	Bicarbonate de sodium ( <sup>14</sup> C) (a)	Acide citrique ( <sup>14</sup> COOH)-1,5 (a)	Acide acétique ( <sup>14</sup> COOH) (a)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (b)
	Rapport radioactivité de l'acide malique/radioactivité de l'acide citrique			
Feuilles	36	4	40	23
Tiges vertes	7,2	1,8	2,7	6,6
Bois de 1 an	2,5	—	2,3	6,7
Racines	1,2	0,3	0,5	1,5

(a) Absorption par les racines d'un jeune plant de vigne des composés radioactifs indiqués (150 μCi), pendant 8 jours et migration des substances formées vers les feuilles.

(b) Exposition des feuilles d'un jeune plant de vigne à <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (500 μCi) pendant 48 hr et migration des substances formées vers les racines pendant 6 jours après la fin de la fixation.

Ces phénomènes qui n'étaient pas connus, doivent jouer un rôle dans le métabolisme des constituants chimiques de la vigne en place. On sait que les glucides s'accumulent dans les racines et dans les bois pendant la période végétative dite "aoûtement" et constituent ensuite les principales substances de réserve. Au départ de la végétation suivante, une partie de ces

<sup>17</sup> G. RIBÉREAU-GAYON, *Compt. Rend.* **25**, 3606-3608 (1959).

<sup>18</sup> A. ALQUIER-BOUFFARD et J. CARLES, *Compt. Rend.* **256**, 3742-3744 (1963).

<sup>19</sup> A. L. KURSANOV, *Proc. UNESCO*, Paris, Los Angeles, **6**, 496-509 (1957).

<sup>20</sup> J. BOUARD, Thèses Sci. nat., Bordeaux (1966).

glucides serait transformée en acide citrique qui, après migration et oxydation, contribuerait à l'accumulation d'acide malique dans les feuilles et dans les raisins.

Bouard<sup>20</sup> ne pense pas que les réserves accumulées durant un cycle végétatif dans les racines puissent être réutilisées au cours du cycle suivant pour l'alimentation des organes aériens. En effet, il est nécessaire pour que ces migrations puissent se produire que les glucides descendus vers les racines par les vaisseaux du liber soient réutilisés par ceux du bois. Cette migration transversale, encore mal connue,<sup>21</sup> est supposée trop faible pour expliquer de tels transferts. Cependant, l'activité des jeunes racines, en voie de croissance, n'a jamais été étudiée dans le cas de la vigne; il semble probable, les structures étant alors peu différenciées, que l'acide citrique formé à partir des glucides de réserve puisse être transporté par les vaisseaux du bois jusqu'aux organes aériens. De nouvelles expériences sur cette question sont nécessaires.

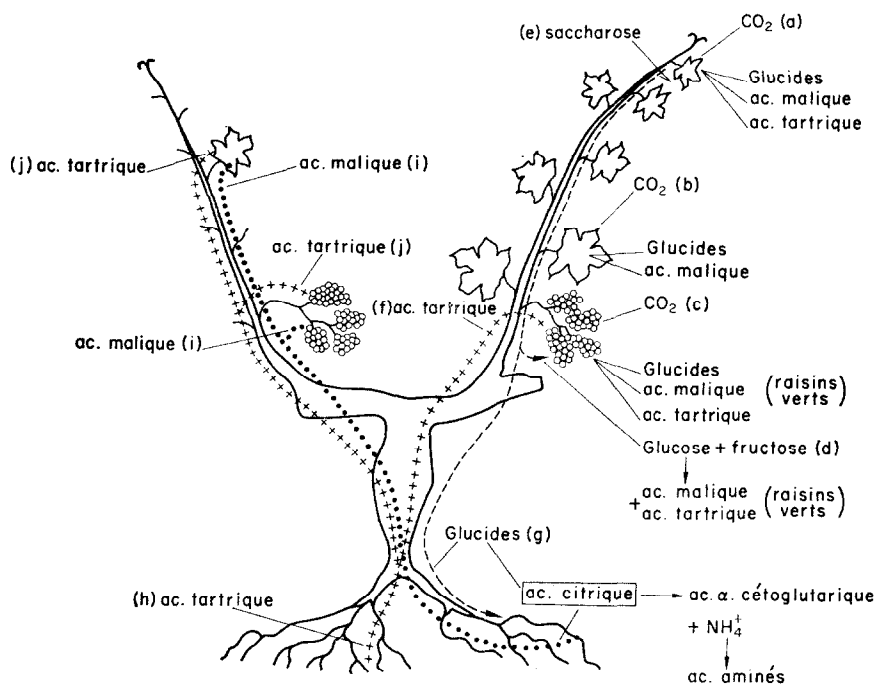


FIG. 3. CARACTERISTIQUES DU METABOLISME DANS LES DIFFERENTS ORGANES DE LA VIGNE.

(a) Le  $\text{CO}_2$  fixé par les jeunes feuilles conduit à la formation de glucides, d'acide malique et d'acide tartrique. (b) Le  $\text{CO}_2$  fixé par les feuilles adultes ne conduit pas à la formation d'acide tartrique. (c) Les raisins fixent  $\text{CO}_2$  par  $\beta$ -carboxylation du phospho-énol-pyruvate, et forment ainsi l'acide malique; la réaction est plus importante que dans les feuilles. L'acide tartrique est également synthétisé. (d) Le glucose est le précurseur de l'acide malique et de l'acide tartrique, mais les mécanismes de formation de ces deux acides sont différents. L'acide tartrique est formé par une coupure de la molécule de glucose entre les atomes de carbone 4 et 5. (e) Le saccharose formé dans les feuilles est transporté vers les raisins et les racines. (f) L'acide tartrique formé dans les raisins est transporté vers les racines. (g) Dans les racines, les glucides sont oxydés partiellement, en acide citrique qui est accumulé. L'acide citrique est le précurseur de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique qui donne naissance aux acides aminés par fixation d'ammoniaque. (h) L'acide tartrique est accumulé dans les racines sans transformation. (i) L'acide citrique est transporté des racines vers les organes verts. Il est oxydé au cours de sa migration en acide malique qui s'accumule. (j) L'acide tartrique est également transporté des racines vers les organes verts, mais cette fois sans transformation.

<sup>21</sup> S. V. DOURMISCHIDZE, *V<sup>e</sup> Cong. intern. Biochem., Moscou (1961)*.

### Schéma du Métabolisme dans l'Ensemble de la Plante

Nous avons cherché à schématiser l'ensemble de nos résultats expérimentaux sur la Fig. 3; celle-ci traduit seulement les phénomènes globaux et non les mécanismes intermédiaires que nous avons cherché à décrire dans les paragraphes précédents. Cependant, il est intéressant de rapprocher les processus se déroulant, d'une part au niveau moléculaire, et, d'autre part, au niveau de la plante entière.<sup>22</sup>

## PARTIE EXPERIMENTALE

Nous avons par ailleurs<sup>1</sup> décrit en détail les techniques expérimentales mises en oeuvre pour la réalisation de ce travail.

### Introduction des Substances Marquées par le Carbone 14 dans les Organes de la Vigne

Deux techniques sont nécessaires pour introduire, soit  $^{14}\text{CO}_2$  à l'état gazeux, soit différentes molécules marquées en solution dans l'eau. Pour exposer des organes à  $^{14}\text{CO}_2$  nous avons utilisé la technique classique consistant à enfermer les organes dans une enceinte, soit en verre, soit en polyéthylène et à introduire dans cette enceinte de l'air contenant du  $^{14}\text{CO}_2$  au lieu du  $\text{CO}_2$  normal.

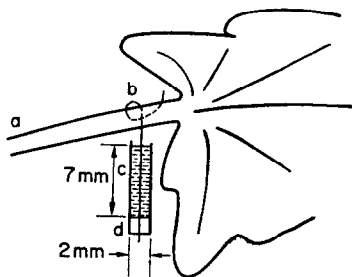


FIG. 4. DISPOSITIF PERMETTANT LE PENETRATION D'UN CORPS RADIOACTIF, EN SOLUTION DANS L'EAU, DANS LE PETIOLE ET LE LIMBE D'UNE FEUILLE DE VIGNE.

Un corps marqué, en solution dans l'eau, est introduit dans un organe, feuille ou raisin, par capillarité à travers un fil de coton. On utilise le dispositif représenté sur la Fig. 4 comprenant un tube de verre (0,03 cm<sup>3</sup>) obturé à une extrémité par de la paraffine qui fixe également le fil de coton. Celui-ci traverse diamétralement deux fois le pétiole; il s'imbibe de liquide qui pénètre ensuite dans le courant de sève. Suivant l'évaporation, conditionnée par l'intensité solaire, la durée de pénétration du liquide d'un tube varie entre 10 et 30 minutes.

### Fixation des Organes en Experience—Extraction des Constituants Chimiques

Lorsque l'introduction d'un précurseur radioactif est terminée, l'organe expérimenté est fixé dans l'azote liquide et desséché par lyophilisation. Il est ensuite conservé à  $-20^\circ$  jusqu'au moment des analyses.

Les échantillons sont alors broyés dans l'eau froide ( $0^\circ$ ); ils sont extraits d'abord par l'eau, puis par une résine cationique (Dowex 50) qui permet de libérer les acides de leurs sels insolubles (oxalate de calcium et bitartrate de potassium).

### Séparation et Identification des Constituants Chimiques

La séparation des constituants chimiques est effectuée à l'aide de résines cationique (Dowex 50) et anionique (Dowex 1). Dans le cas des acides cétoniques nous avons effectué une extraction particulière à partir d'un mélange de métaphosphate de sodium à 15% (2 volumes) et de méthanol (1 volume) maintenu à  $-70^\circ$ .<sup>23</sup> Les divers constituants chimiques sont ensuite séparés par chromatographie, soit sur colonne<sup>24</sup> soit sur papier. L'identification est réalisée par des révélations spécifiques ou par co-chromatographie avec des témoins.

<sup>22</sup> J. BONNER, *Genes to Genus*, IMC, skokie, 13-22 (1965).

<sup>23</sup> H. G. WAGER, *J. Exp. Botany* **12**, 34-46 (1960).

<sup>24</sup> F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* **40**, 688-694 (1946).

*Détermination de la Radioactivité des Constituants Chimiques*

Cette détermination est effectuée à l'aide d'un compteur de Geiger-Müller à courant gazeux (rendement 35%). Les échantillons liquides, une fois séchés sur une coupelle, sont considérés infiniment minces, et on a établi une courbe de correction d'auto-absorption pour les échantillons de  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ .

Dans le cas des chromatogrammes, la position des substances radioactives séparées est déterminée à l'aide d'un film radiographique. Les zones radioactives sont ensuite découpées du chromatogramme et introduites sous le compteur.

*Détermination de la Radioactivité des Différents Atomes de Carbone de l'Acide Malique et de l'Acide Tartrique*

Cette détermination est effectuée en dégradant ces molécules de façon à recueillir des fractions bien déterminées contenant un ou plusieurs atomes de carbone qui sont ensuite transformées en  $\text{CO}_2$ , puis en carbonate de baryum dont on détermine la radioactivité des précipités.

Les dégradations totales sont effectuées par le persulfate de potassium. Le carboxyle 1 de l'acide malique est transformé en oxyde de carbone par l'acide sulfurique concentré, puis en gaz carbonique par l'oxyde de cuivre chauffé à  $400^\circ$ . Le carboxyle 4 de l'acide malique est transformé en gaz carbonique par *Lactobacillus arabinosus*. Les carboxyles 1 et 4 de l'acide tartrique sont transformés en  $\text{CO}_2$  par l'acide periodique.