

## BIOGENESE DES LIPIDES MITOCHONDRIAUX AU COURS DE LA "SURVIE" (AGEING) DE DISQUES DE PARENCHYME DE TUBERCULE DE POMME DE TERRE\*

A. BEN ABDELKADER, P. MAZLIAK et A.-M. CATESSON

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Faculté des Sciences, 1 rue Victor Cousin, Paris (V),  
et Laboratoire de Botanique de l'École Normale Supérieure de Paris, France

(Received 28 December 1968)

**Abstract**—Ageing of potato tuber slices induces an increase in the nitrogen content and in the respiratory activity of the mitochondrial fraction. An increase in lipid phosphorus and in fatty acids is also observed. These results suggest a synthesis of new mitochondrial membranes during ageing. The incorporation of acetate-1-<sup>14</sup>C *in vivo* and *in vitro* into the mitochondrial fraction isolated from fresh and aged tissue was examined: the labelling of lipids and of fatty acids increases strongly after ageing, particularly during *in vivo* incubations; in this case, a rise of the synthesis of di-unsaturated fatty acids is found. These results give also some evidence of an integration of the lipid constituents newly synthesized during ageing into mitochondria.

### INTRODUCTION

DANS des articles précédents,<sup>1,2</sup> nous avons appelé "survie" (ageing), le vieillissement en conditions artificielles de fragments d'organes végétaux maintenus en aérobose par agitation dans de l'eau distillée fréquemment renouvelée. Dans le cas de tranches de tubercules de pomme de terre, cette "survie" s'accompagne d'une exaltation de la synthèse des lipides.<sup>1-5</sup> La question se pose de savoir si cette exaltation des synthèses correspond à un renouvellement plus grand des lipides dans le tissu ou à une accumulation nette des matières grasses. Willemot et Stumpf<sup>4</sup> ont suggéré qu'il se formait de nouvelles membranes plasmiques ou mitochondriales au cours de la "survie", donc que l'exaltation des synthèses lipidiques entraînait un gain net des matières grasses dans les tissus. De même, d'autres observations<sup>6,7</sup> suggèrent que le nombre de mitochondries augmente pendant la "survie" de disques de pomme de terre; ces conclusions découlent de résultats de dosages d'azote protéique dans les culots de mitochondries préparés avant ou après "survie" et d'examens au microscope électronique.

Pour contribuer à l'effort général d'explication des phénomènes accompagnant la "survie" de disques de parenchyme de pomme de terre, il nous a paru intéressant d'étudier la synthèse des lipides et, en particulier, des phospholipides des mitochondries. Nous avons commencé par suivre l'augmentation de la quantité de protéines mitochondriales ainsi que

\* II<sup>ème</sup> partie de la série: La lipogenèse dans le tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A. BEN ABDELKADER, *Physiol. Veg.* **6**, 417 (1968).

<sup>2</sup> A. BEN ABDELKADER et P. MAZLIAK, *C.R. Acad. Sci., Paris* **267**, 609 (1968).

<sup>3</sup> C. WILLEMOT et P. K. STUMPF, *Can. J. Botany* **45**, 579 (1967).

<sup>4</sup> C. WILLEMOT et P. K. STUMPF, *Plant Physiol.* **42**, 391 (1967).

<sup>5</sup> W.-J. TANG et P. A. CASTELFRANCO, *Plant Physiol.* **43**, 1232 (1968).

<sup>6</sup> D. P. HACKETT, D. W. HAAS, S. K. GRIFFITHS et D. J. NIEDERPRUEM, *Plant Physiol.* **35**, 8 (1960).

<sup>7</sup> S. G. LEE et R. M. CHASSON, *Physiol. Plantarum* **19**, 199 (1966).

l'accroissement de l'activité respiratoire des culots mitochondriaux au cours de la "survie". Les membranes plasmiques ou mitochondriales étant riches en phospholipides, nous avons ensuite tenté de relier l'accroissement de la quantité de protéines mitochondriales à une augmentation de la masse des phospholipides ou de la masse des acides gras mitochondriaux.

Dans l'éventualité d'une formation de constituants lipidiques mitochondriaux parallèle à la formation des protéines, l'emploi d'acétate marqué au  $^{14}\text{C}$  devait nous permettre de suivre directement l'intégration dans les mitochondries des lipides néoformés après "survie" des tissus. Enfin, pour mieux connaître la nature des transformations métaboliques qui accompagnent la "survie", nous avons étudié les effets d'un inhibiteur de la synthèse des protéines, l'actidione (cycloheximide).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### *Augmentation de la Quantité de Protéines Mitochondriales au Cours de la "Suvie"*

Le dosage de l'azote protéique selon Thompson et Morrisson<sup>8</sup> ou le dosage des protéines par la méthode du Biuret ont été effectués sur les culots mitochondriaux obtenus à partir de la même quantité de tissu avant ou après 24 hr de "survie". On constate une augmentation de plus de 100% de la quantité des protéines ou de l'azote protéique mitochondrial après "survie". On peut retenir une moyenne de 30  $\mu\text{g}$  d'azote protéique par gramme de tissu avant "survie" et une moyenne de 60  $\mu\text{g}$  après "survie" (Tableau 1).

TABLEAU 1. INFLUENCE DE LA "SURVIE" SUR L'INTENSITÉ RESPIRATOIRE ET LA TENEUR EN PROTÉINES DES CULOTS DE MITOCHONDRIES CORRESPONDANT À 10 g DE TISSU

	Exp. n° 1			Exp. n° 2		
	Témoin avant survie	Après 24 hr survie	% augmen- tation	Témoin avant survie	Après 24 hr survie	% augmen- tation
mg protéines mitochondriales	1,75	3,8	114	2	4	100
$\mu\text{g}$ azote protéique	280	600	114	320	650	103
i.r. $\mu\text{l}$ $\text{O}_2$ /hr/10 g tissu	72	162	125	90	185	105
i.r. $\mu\text{l}$ $\text{O}_2$ /hr/mg protéines	41	42	2	45	46	2
i.r. $\mu\text{l}$ $\text{O}_2$ /hr/mg azote protéique	256	262	2	280	280	0

### *Augmentation de l'Activité Respiratoire des Mitochondries au Cours de la "Suvie"*

L'oxydation du succinate par les mitochondries isolées d'une même quantité de tissu est deux fois plus importante après "survie" qu'avant toute "survie" (Tableau 1). L'intensité respiratoire (i.r.) mesurée est en moyenne de 80  $\mu\text{l}$   $\text{O}_2$  par heure pour les mitochondries extraites de 10 g de tissu frais et de 170  $\mu\text{l}$   $\text{O}_2$  par heure, pour les mitochondries extraites de 10 g de tissu ayant été maintenu 24 hr en "survie". Cependant, les i.r. rapportées à 1 mg de protéine sont sans changement avant et après "survie": environ 40  $\mu\text{l}$   $\text{O}_2$  par heure et par mg de protéines.

Ces résultats corroborent bien ceux obtenus précédemment par Lee et Chasson;<sup>7</sup> ces auteurs expliquaient l'augmentation de l'intensité respiratoire par un accroissement du

<sup>8</sup> J. F. THOMPSON et G. R. MORRISON, *Anal. Chem.* **23**, 1153 (1951).

nombre de mitochondries. En effet il a été observé qu'il n'y a pas de divisions cellulaires dans les disques de parenchyme en "survie" pendant au moins 48 hr. L'augmentation de la quantité de protéines mitochondriales ne peut donc s'expliquer que par la multiplication du nombre des organites dans chaque cellule ou bien par une néoformation abondante de composés protéiniques à l'intérieur des mitochondries primitives. Une augmentation du nombre des mitochondries a pu être mise directement en évidence par comptage des organites sur des micrographies de racines de patate douce<sup>9</sup> et sur des micrographies de tranches de betterave, après "survie".<sup>10</sup>

L'accroissement de l'activité respiratoire de la fraction mitochondriale explique l'accroissement de la respiration des cellules entières (160 % après 24 hr de "survie": l'i.r. des disques de tubercules passe de 36  $\mu$ l à 91  $\mu$ l O<sub>2</sub>/hr/1 g de tissu).

#### *Augmentation de la Masse des Lipides Mitochondriaux au Cours de la "Suvie"*

*Analyse des lipides.* L'extrait lipidique brut de la fraction mitochondriale contient plusieurs classes de lipides: phospholipides, glycolipides, composés stéroliques, lipides neutres et acides gras libres.

Les réactions colorées spécifiques et la comparaison des distances de migration avec celles des témoins purs ont permis d'identifier les phospholipides suivants: phosphatidylcholine (P.C.), phosphatidyléthanolamine (P.E.) (ce sont les deux phospholipides majeurs), phosphatidylinositol (P.I.), phosphatidylglycérol (P.G.), Phosphatidylsérine (P.S.), acide phosphatidique (P.A.), diphosphatidylglycérol (D.P.G.). Le monogalactosyldiglycéride (M.G.D.G.), et le digalactosyldiglycéride (D.G.D.G.) sont les deux glycolipides présents. En outre il existe un stéryl glucoside (S.G.) un stéryl glucoside estérifié (E.S.G.) et des sterols libres.

Cette composition en catégories lipidiques est proche de celle signalée pour la cellule entière de parenchyme de tubercule de pomme de terre,<sup>1,11</sup> en particulier en ce qui concerne l'abondance de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine et la présence des catégories lipidiques. Une analyse de Douce<sup>12</sup> portant sur les phospholipides des mitochondries de tissu de Scorsonère a abouti à une composition phospholipidique similaire.

Les acides gras principaux déterminés par chromatographie en phase gazeuse sont les acides linoléique (plus de 50 % des acides gras totaux), palmitique (20 %) et linolénique (16 %) (Tableau 2). Cette composition en acides gras est très voisine de celle des mitochondries isolées de divers tissus végétaux (pomme,<sup>13</sup> poire,<sup>14</sup> carotte<sup>15</sup>).

*Augmentation de la masse des lipides au cours de la "survie".* La détermination par pesée directe étant impossible à réaliser pour les très faibles quantités présentes, nous avons dosé colorimétriquement le phosphore lipidique d'une part et déterminé la masse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, d'autre part.

On dose le phosphore lipidique des culots de mitochondries préparés à partir des tissus avant et après "survie". Les valeurs, variables selon les expériences, sont constamment plus élevées après "survie", allant jusqu'à doubler (Tableau 3). La quantité de phospholipides rapportée au mg de protéines et non plus à la quantité de tissu ne varie pratiquement pas.

La masse des acides gras totaux des culots mitochondriaux préparés à partir d'une même quantité de tissu est deux fois plus élevée après "survie" que dans le tissu frais. Une

<sup>9</sup> T. ASAH, Y. HONDA et I. URITANI, *Plant Physiol.* **41**, 1179 (1966).

<sup>10</sup> R. F. M. VAN STEVENINCK et M. E. JACKMAN, *Australian J. Biol. Sci.* **20**, 749 (1967).

<sup>11</sup> T. GALLIARD, *Phytochem.* **7**, 1907 (1968).

<sup>12</sup> R. DOUCE, *C.R. Acad. Sci., Paris* **262**, 4067 (1965).

<sup>13</sup> P. MAZLIAK, A. BEN ABDELKADER et A.-M. CATESSON, *Physiol. Veg.* **5**, 237 (1967).

<sup>14</sup> R. J. ROMANI, R. W. BREDENBACH et J. G. VAN KOOT, *Plant Physiol.* **40**, 561 (1965).

<sup>15</sup> L. DALGARNO et L. M. BIRT, *Biochem. J.* **87**, 586 (1963).

TABLEAU 2. VARIATION DES POURCENTAGES RESPECTIFS DES ACIDES GRAS ET AUGMENTATION DE LA MASSE DES ACIDES GRAS AU COURS DE LA "SURVIE"

Principaux acides gras identifiés	% des Acides totaux	
	Témoin avant "survie"	24 hr de "survie"
Palmitique (C <sub>16</sub> )	20	22,5
Stéarique (C <sub>18</sub> )	3,5	5,5
Oléique (C <sub>18:1</sub> )	2	3
Linoléique (C <sub>18:2</sub> )	55	49
Linoléique (C <sub>18:3</sub> )	16	19,5
µg acides gras/10 g tissu	33	64

TABLEAU 3. AUGMENTATION DE LA MASSE DES PHOSPHOLIPIDES MITOCHONDRIAUX AU COURS DE LA "SURVIE"

µg phospholipides	Témoin avant "survie"	Après 24 hr "survie"	% Augmentation
Exp. n° 1			
µg/10 g tissu	275	525	90
µg/mg protéines	150	130	-13
Exp. n° 2			
µg/10 g tissu	350	600	70
µg/mg protéines	150	170	13
Exp. n° 3			
µg/10 g tissu	400	800	100
µg/mg protéines	200	200	0

méthode utilisant un témoin interne d'acide heptadécanoïque<sup>16</sup> permet le dosage des acides. On peut retenir une moyenne de 33 µg d'acides gras pour un culot correspondant à 10 g de tissu avant "survie" et 64 µg pour la même quantité de tissu après "survie" (Tableau 2). En ce qui concerne les proportions relatives des divers acides gras, il n'y a pratiquement aucune variation avant et après "survie".

Cette augmentation de la masse des lipides—phospholipides et acides gras—peut être mise en parallèle avec l'augmentation de la quantité de protéines dans les mitochondries au cours de la "survie". Pour les deux types de constituants biochimiques, les teneurs sont approximativement doublées. Asahi *et al.*<sup>9</sup> ont signalé une semblable élévation de la teneur en phosphore lipidique dans les mitochondries de racine de patate douce.

Pour ce qui concerne les lipides, on peut préciser, à la suite de nos propres expériences, que les synthèses accrues provoquées par la "survie" portent sur toutes les catégories de lipides mitochondriaux et que les produits finaux (acides gras ou phospholipides) sont formés dans les mêmes proportions que dans la cellule avant "survie".

Ces résultats appuient donc considérablement l'hypothèse d'une formation de nouvelles membranes lipoprotéiques mitochondriales au cours de la "survie". Des résultats indiqués plus haut et concernant l'augmentation de l'activité respiratoire au cours de la "survie", on

<sup>16</sup> D. LECHEVALLIER, communication personnelle.

peut présumer que ces membranes néoformées sont actives en ce qui concerne la possibilité d'oxydation de l'acide succinique. On peut encore montrer, à l'aide de précurseurs marqués, que les lipides nouvellement formés après "survie" sont intégrés dans des mitochondries actives.

*Augmentation de l'Incorporation de l'Acétate-1-<sup>14</sup>C dans les Lipides des Mitochondries après "Suvie"*

Nous utilisons l'Acétate-1-<sup>14</sup>C comme précurseur pour suivre le métabolisme des différentes classes de lipides présents dans les organites. L'acétate précurseur est en effet préférentiellement incorporé dans les acides gras des divers lipides.

Si les lipides nouvellement formés au cours de la "survie" ne sont pas englobés dans des enclaves inertes mais au contraire s'ils sont présents dans des structures dynamiques, on doit s'attendre à un marquage important des lipides et des acides gras mitochondriaux après "survie". C'est ce que nous allons essayer d'étudier en suivant l'incorporation du précurseur *in vitro* et *in vivo* dans les mitochondries.

*Incubation des mitochondries in vitro.* L'incubation en présence du précurseur a lieu pour un volume de suspension mitochondriale correspondant à une même quantité de tissu avant et après "survie". Le temps d'incubation en présence d'Acétate marqué a été fixé à 2 hr à 25°. La cinétique d'incorporation du précurseur dans les lipides—en présence du succinate de sodium comme substrat<sup>17</sup>—s'est révélée linéaire jusqu'à deux heures.

On constate (Tableau 4) une augmentation de la radioactivité totale de 170% environ

TABLEAU 4. EXALTATION DE L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1-<sup>14</sup>C DANS LES LIPIDES DES MITOCHONDRIES AU COURS DE LA "SURVIE". L'INCUBATION A LIEU *in vivo* OU *in vitro*.

	<i>In vitro</i>			<i>In vivo</i>		
	Témoin avant survie	Après 24 hr de survie	% Augmen- tation	Témoin avant survie	Après 24 hr de survie	% Augmen- tation
Radioactivité des lipides	1,6	4,6	170	1,2	7,9	550
10 <sup>5</sup> cpm/10 g tissu						
10 <sup>5</sup> cpm/mg protéines	0,8	1,1	37	0,7	2,1	200
mitochondriales						
mμmoles Acétate	5,2	14,8	184	3,8	25,5	560
incorporées/10 g tissu						
mμmoles Acétate/mg protéines	2,6	3,7	42	2,1	6,7	210

Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

après "survie". Cette augmentation est du même ordre de grandeur que l'accroissement de la masse des phospholipides ou des protéines mitochondriales pendant les 24 hr de "survie" précédant l'incubation: la radioactivité incorporée rapportée au mg de protéines mitochondriales varie beaucoup moins.

La répartition de cette radioactivité dans les différentes classes lipidiques subit peu de changements après "survie" (Tableau 5 et Fig. 1): la phosphatidyléthanamine reste le lipide le plus fortement marqué, puis on peut citer par ordre de radioactivité décroissante, les lipides neutres, le phosphatidylglycérol et la phosphatidylcholine. Cette distribution de la radioactivité dans les lipides est très voisine de celle obtenue dans une analyse antérieure portant sur des mitochondries de parenchyme de pomme.<sup>13</sup>

<sup>17</sup> P. MAZLIAK, *C.R. Acad. Sci., Paris* 267, 1720 (1968).

TABLEAU 5. INCORPORATION DE L'ACÉTATE DANS LES DIFFÉRENTES CATÉGORIES LIPIDIQUES DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE

	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
	Témoin avant "survie"		Après 24 hr "survie"		Témoin avant "survie"		Après 24 hr "survie"	
	10 <sup>2</sup> cpm/10 g tissu	% Radio- activité totale	10 <sup>2</sup> cpm/10 g tissu	% Radio- activité totale	10 <sup>2</sup> cpm/10 g tissu	% Radio- activité totale	10 <sup>2</sup> cpm/10 g tissu	% Radio- activité totale
P.I.	37	1,2	57	0,7	18	2,8	160	3,7
P.C.	183	5,9	738	9,0	190	29,0	1114	26,0
P.G.	465	15	926	11,3	97	14,9	268	6,2
P.S.	49	1,6	144	1,8	8	1,2	53	1,2
P.E.	1306	42,1	3222	39,3	24	3,8	370	8,6
P.A.	47	1,5	155	1,9	43	6,6	194	4,5
L.N.	83,4	26,9	2312	28,2	210	32,0	1668	38,8
Autres lipides	266	5,8	639	7,8	81,4	12,3	516	10,6

La séparation des lipides est effectuée par chromatographie sur papier silicé.  
Les abréviations sont indiquées dans le texte.

Le Tableau 6 indique que la radioactivité des acides gras totaux provenant de la même quantité de tissu est plus élevée, après "survie", d'environ 120 %, que celle du témoin avant "survie". Les radioactivités spécifiques rapportées au  $\mu\text{g}$  d'acides gras, par contre, varient peu.

La répartition de la radioactivité dans les acides gras est la même avant et après "survie" (Tableau 7); on peut déceler seulement une légère augmentation du pourcentage de la radioactivité des acides diinsaturés dont on ne saurait affirmer qu'elle soit vraiment significative. Les acides saturés et monoinsaturés restent de loin les plus fortement marqués; dans les acides gras des mitochondries du parenchyme de pomme<sup>13</sup> ou de chou-fleur,<sup>18</sup> c'étaient aussi ces deux catégories qui étaient les plus marquées après des incubations *in vitro* des organites.

Ainsi, lors des incubations *in vitro*, l'augmentation de la capacité de synthèse des lipides mitochondriaux est du même ordre de grandeur que l'élévation du taux de protéines et de lipides pendant la "survie". Nous pouvons en conclure que la "survie" a provoqué l'apparition, dans les organites, des complexes enzymatiques nécessaires à la lipogenèse, habituellement présents dans les mitochondries. Le renouvellement de certaines catégories lipidiques<sup>19</sup> peut ainsi être assuré. Nous constatons également à la suite de ces expériences, que les lipides accumulés dans les organites ont le même taux de renouvellement que les lipides des membranes mitochondriales présents avant "survie" puisque la radioactivité incorporée par mg de protéines mitochondriales reste constante indépendamment de la "survie".

*Incubation des mitochondries in vivo.* Dans cette deuxième série d'expériences, nous incorporons l'Acétate marqué dans les tranches de tissu avant d'isoler les mitochondries.

<sup>18</sup> P. MAZLIAK et A. BEN ABDELKADER, en préparation.

<sup>19</sup> P. MAZLIAK, U. STOLL et A. BEN ABDELKADER, *Biochem. Biophys. Acta* **152**, 414 (1968).

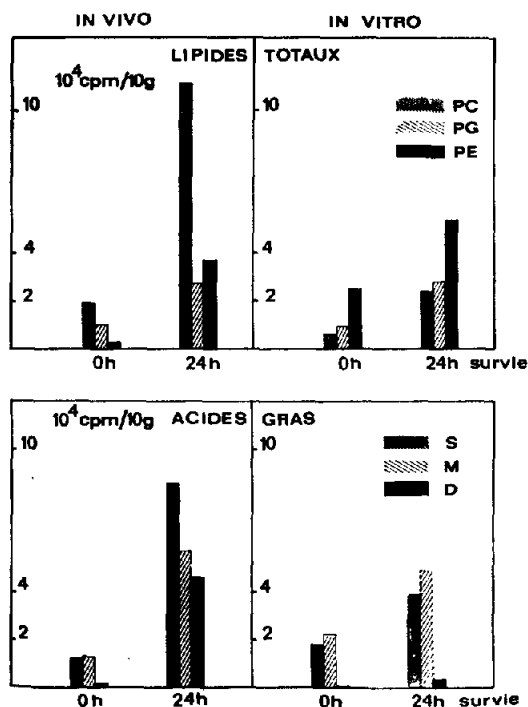


FIG. 1. INFLUENCE DE LA "SURVIE" SUR L'INCORPORATION *in vitro* ET *in vivo* DE L'ACÉTATE-1- $^{14}\text{C}$  DANS LES DIFFÉRENTS LIPIDES TOTAUX ET LES ACIDES GRAS DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE. LES ACTIVITÉS SONT RAPPORTÉES À 10 g DE TISSU FRAIS.

Abréviations: S=acides gras saturés; M=monoinsaturés; D=diinsaturés.

TABLEAU 6. INFLUENCE DE LA "SURVIE" SUR L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE DANS LES ACIDES GRAS DES MITOCHONDRIES

	<i>In vitro</i>			<i>In vivo</i>		
	Témoin avant "survie"	Après 24 hr de "survie"	% augmentation	Témoin avant "survie"	Après 24 hr de "survie"	% augmentation
Radioactivité totale $10^2 \text{ cpm/10 g tissu}$	433	1018	158	640	4840	656
Radioactivité spécifique $10^2 \text{ cpm/10 } \mu\text{g acides gras}$	130	159	22	193	756	290
$m\mu\text{moles Acétate}$ incorporées/10 g tissu	1,4	3,3	135	2,0	15,6	680
$m\mu\text{moles Acétate incorporées/}$ 10 g acides gras	0,4	0,5	25	0,6	2,4	300

L'expérience est effectuée dans le tissu fraîchement coupé ou ayant subi 24 hr de "survie".

L'augmentation de la radioactivité des lipides totaux, rapportée au même poids de tissu frais, est très importante: plus de 660%. Rapportée au mg de protéines, elle reste élevée: plus de 200% (Tableau 4). C'est là une différence importante avec les résultats des expériences d'incubation *in vitro*: la "survie" des cellules entières permet l'incorporation dans les mitochondries anciennes ou néoformées de beaucoup plus de précurseur radioactif que cela

TABLEAU 7. INFLUENCE DE LA "SURVIE" SUR L'INCORPORATION DE L'ACÉTATE DANS LES ACIDES GRAS DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE DE TUBERCULE DE POMME DE TERRE

Classes d'acides gras	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
	Témoin avant "survie"		Après 24 hr de "survie"		Témoin avant "survie"		Après 24 hr de "survie"	
	10 <sup>2</sup> cpm/10 g	% Radio-activité	10 <sup>2</sup> cpm/10 g	% Radio-activité	10 <sup>2</sup> cpm/10 g	% Radio-activité	10 <sup>2</sup> cpm/10 g	% Radio-activité
Sat.†	175	40,3	385	37,8	121	44,9	856	43,8
Mono.	216	50,0	488	46,8	124	46,0	574	30,0
Diinsat.	4	1	32	3,2	12	4,8	458	23,4
Triinsat.	0,7	0,1	7	0,7	3	1,2	23	1,2
Hydro.	3	8,5	105	10,3	8	3,1	31	1,5

Les esters méthyliques sont séparés par chromatographie sur couche mince de silice-nitrate d'argent.

†Sat. = acides gras saturés

Mono. = acides gras monoinsaturés

Diinsat. = acides gras diinsaturés

Triinsat. = acides gras triinsaturés

Hydro. = hydroxyacides.

n'était possible avant "survie". On doit en conclure que non seulement la "survie" a fait apparaître les complexes enzymatiques nécessaires à la lipogénèse mais qu'elle a également permis un fonctionnement plus important des complexes anciens ou nouveaux.

La distribution de la radioactivité dans les catégories lipidiques mitochondriales change peu au cours de la "survie". L'augmentation intéresse surtout la phosphatidylcholine (qui est le phospholipide le plus marqué: plus de 29 % de la radioactivité totale) et la phosphatidyl-éthanolamine (dont la radioactivité devient 25 fois plus forte)—(Tableau 5 et Fig. 1). Dans le cas des mitochondries de parenchyme de pomme, incubées *in vivo*, la phosphatidylcholine était aussi le phospholipide le plus fortement marqué.<sup>19</sup>

La radioactivité des acides gras subit une augmentation aussi élevée que celle des lipides totaux (Tableau 6). La "survie" modifie la distribution de la radioactivité dans les catégories d'acides gras. Elle exalte la synthèse des acides diinsaturés, qui, faiblement synthétisés dans le tissu fraîchement coupé, sont synthétisés abondamment après "survie". Cette augmentation du marquage des acides diinsaturés est accompagnée d'une diminution de la radioactivité des acides monoinsaturés (Tableau 7). Nous avons déjà noté,<sup>1</sup> en accord avec Willemot et Stumpf<sup>3</sup> que la "survie" favorise la synthèse des acides diinsaturés dans le tissu entier. Nous retrouvons ici cet intéressant phénomène, avec l'indication supplémentaire suivante: les acides diinsaturés nouvellement synthétisés viennent s'intégrer aux lipides mitochondriaux. Rappelons qu'au paragraphe précédent nous n'avons constaté, dans les mitochondries isolées, incubées *in vitro* aucune augmentation de la synthèse des acides diinsaturés.

Cet ensemble de résultats entraîne deux conclusions:

- (1) les enzymes nécessaires à l'apparition des acides polyinsaturés sont vraisemblablement extra-mitochondriaux et l'intégration de ces acides dans les mitochondries suggère une coopération entre les mitochondries et le reste de la cellule;<sup>19</sup>
- (2) le phénomène de "survie" active préférentiellement les enzymes extra-mitochondriales qui synthétisent les acides polyinsaturés et ceci entraîne, après "survie", une intégration accélérée de ces acides dans les mitochondries.



*Effet de l'Actidione sur la Biogenèse des Lipides Mitochondriaux au Cours de la "S survie"*

Click et Hackett<sup>20</sup> ont démontré que les transformations métaboliques observées au cours de la "survie" dépendaient de la synthèse de nouvelles protéines. Willemot et Stumpf<sup>3</sup> ont étudié l'effet de plusieurs inhibiteurs de la synthèse des protéines sur l'exaltation de la synthèse des acides gras dans le tissu au cours de la "survie". L'actidione—ou cycloheximide—inhibe complètement cette exaltation, ce qui démontre que l'exaltation des synthèses est due à l'apparition de nouvelles protéines enzymatiques dans les cellules.

Il était intéressant d'examiner l'effet de cet inhibiteur sur les phénomènes que nous venons d'observer au niveau des mitochondries. Nous avons donc effectué les expériences de "survie" en ajoutant dans le milieu l'actidione (4 µg/ml), puis en la retirant du milieu par rinçage abondant une fois la période de "survie" écoulée afin que les incubations se déroulent normalement. Le Tableau 8 résume les effets inhibiteurs de l'actidione sur la biogenèse des

TABLEAU 8. ACTION DE L'ACTIDIONE SUR LES DIFFÉRENTES TRANSFORMATIONS MÉTABOLIQUES OBSERVÉES DANS LA FRACTION MITOCHONDRIALE AU COURS DE LA "SURVIE": PROTÉINES MITOCHONDRIALES, ACTIVITÉ RESPIRATOIRE, POIDS DE PHOSPHOLIPIDES, ET INCORPORATION DE L'ACÉTATE-1-<sup>14</sup>C *in vivo* DANS LES LIPIDES

	Témoin avant "survie"	Après 24 hr de "survie"	% Augmen- tation	Après 24 hr de "survie" + Actidione	% Augmen- tation
µg Azote protéique par culot de 10 g de tissu	270	650	140	168	0
Activité respiratoire µl O <sub>2</sub> /hr/10 g tissu	43	90	100	28	0
Poids de phospholipides en µg/culot de 10 g tissu	340	600	70	295	0
Radioactivité des lipides totaux en 10 <sup>5</sup> cpm/10 g	1,1	8,0	620	1,8	50
Radioactivité des acides gras en 10 <sup>5</sup> cpm/10 g	0,6	5,1	750	1,1	80

lipides mitochondriaux, l'augmentation des protéines mitochondriales, l'activité respiratoire et les incorporations d'Acétate-1-<sup>14</sup>C.

Cette inhibition par l'actidione prouve bien que la série de transformations notées dans les mitochondries au cours de la "survie" dépendent de mécanismes faisant intervenir la synthèse de nouvelles protéines. La "survie", effectuée en présence de cet inhibiteur qui empêche la formation des liaisons peptidiques au niveau des ribosomes, ne permet aucune biogenèse de constituants mitochondriaux.

## CONCLUSIONS

Cette étude de l'influence de la "survie" des rondelles de tubercules de pomme de terre sur le métabolisme lipidique des mitochondries nous a permis de retrouver des résultats déjà signalés et d'acquiescer certains résultats originaux. C'est ainsi que nous avons confirmé l'augmentation de la masse des protéines mitochondriales et celle de l'activité respiratoire des culots mitochondriaux après "survie". Un premier résultat original concerne l'accroissement de la *masse* de phospholipides mitochondriaux et celle de la *masse* des acides gras totaux au cours de la "survie". Ces faits renforcent l'hypothèse d'une édification de nouvelles membranes lipoprotéiques; nos observations complètent ainsi celles des auteurs cités.

<sup>20</sup> R. E. CLICK et D. P. HACKETT, *Proc. Natl Acad. Sci.* **50**, 243 (1963).

D'autres données nouvelles ont pu être fournies par l'étude de la biosynthèse des lipides au moyen de l'Acétate-1- $^{14}\text{C}$ . Nous avons pu constater que les constituants lipidiques nouveaux sont intégrés dans les mitochondries. L'incorporation *in vitro* du précurseur dans les lipides des mitochondries double après "survie"; cette augmentation de la capacité de synthèse des culots mitochondriaux est parallèle à l'augmentation de masse des lipides et des protéines contenus dans ces culots; elle suggère que des membranes mitochondriales sont formées avec une activité biosynthétique égale (tant au point de vue qualitatif que quantitatif) aux membranes anciennes.

L'incorporation du précurseur *in vivo* dans les mitochondries, qui restent alors dans le contexte cellulaire pendant l'incubation, augmente fortement après la "survie". L'augmentation de la radioactivité est supérieure à l'accroissement de masse des lipides ou des protéines pendant la "survie", ce qui montre que les mitochondries dépendent fortement de l'entourage cellulaire pour la biosynthèse ou le renouvellement de leurs constituants. En particulier, l'augmentation de l'activité métabolique des acides diinsaturés des mitochondries est nette, dans ces conditions, après la "survie".

Un autre résultat original est l'inhibition qu'exerce l'actidione (ou cycloheximide) sur cette apparition des constituants mitochondriaux lipidiques ou protéiques. Cet effet de l'actidione—qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines—montre que des modifications notées au cours de la "survie" dépendent de la synthèse de nouvelles protéines. Le mécanisme de dérépression accompagnant la "survie", suggéré par Willemot et Stumpf peut expliquer que l'actidione annule tous les phénomènes habituels accompagnant la "survie". Notons que les phénomènes de dérépression et la synthèse de nouvelles protéines sont invoqués pour expliquer le levée de dormance du tubercule de pomme de terre.<sup>21,22</sup>

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel Végétal*

Les tubercules "Bintje" sont fournis par la Station Expérimentale de Saint-Germain en Laye. Les tubercules, lavés, séchés, calibrés (poids moyen de 40 g) sont conservés à +5 à +6° en atmosphère renouvelée.

### *Conditions de la "S survie"*

Un emporte-pièce permet de prélever des cylindres de parenchyme central, plongés aussitôt dans l'eau glacée; on découpe ces cylindres en rondelles de 0,9 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur; 30 g de tissu frais correspondent à environ 6 tubercules. Ces rondelles sont immédiatement rincées avec de l'eau glacée (environ 6 l.). Elles sont soit immédiatement utilisées: il s'agit de *rondelles témoins sans "survie"*, soit gardées en milieu aérobie pendant 24 hr: il s'agit alors de *rondelles après "survie"*.

Pour cela elles sont placées sur un tamis en matière plastique de façon à ce qu'elles baignent à moitié dans la solution de "survie": 10 mM  $\text{CaSO}_4$  et 50  $\mu\text{g/ml}$  de chloramphénicol dans de l'eau désionisée. La solution étant agitée par un barreau magnétique en téflon, les rondelles sont constamment rincées par la solution tout en restant en milieu aérobie. L'expérience se déroule pendant 24 hr à la température ambiante (environ 25°); la solution est renouvelée plusieurs fois.

Dans le cas de "survie" avec actidione, on ajoute à la solution de "survie" 4  $\mu\text{g/ml}$  d'actidione. On prend soin de rincer abondamment à la fin des 24 hr d'agitation.

<sup>21</sup> D. Y. H. TUAN et J. BONNER, *Plant Physiol.* **39**, 768 (1967).

<sup>22</sup> M. MADISON et L. RAPPAPORT, *Plant Cell Physiol.* **9**, 147 (1968).

Il est à noter que dans des expériences précédentes,<sup>2</sup> on a procédé à une agitation directe des rondelles dans de l'eau désionisée. Des résultats similaires sont obtenus avec les deux méthodes, celle du tamis paraissant toutefois donner de meilleures conditions d'aérobiose.

#### *Préparation des Mitochondries*

La méthode de préparation des mitochondries est basée sur la méthode II de Verleur<sup>23</sup> à laquelle nous avons apporté plusieurs modifications: pH plus élevé du milieu de broyage (7,0 au lieu de 6,5), broyage à l'aide du moulin de Hulme,<sup>24</sup> suppression de la première centrifugation à faible vitesse remplacée par une filtration du broyat sur verre fritté n° 3, selon les recommandations de Ducet.<sup>25</sup>

Les différentes opérations ont lieu en chambre froide, dans la glace, à +1° maximum. Les rondelles sont placées pendant au moins une heure dans la solution de broyage refroidie à +1° avant d'être broyées. On broie successivement les rondelles de tissu témoins (30 à 50 g) et la même quantité de rondelles après "survie". Après le broyage, les centrifugations et tous les traitements ultérieurs ont lieu exactement en même temps, afin de garantir une meilleure comparaison.

Les culots mitochondriaux sont repris dans la solution 0,7 M mannitol, 0,1 % sérum albumine de boeuf dans du tampon phosphate 0,05 M à pH 7,0, un ml de suspension finale correspondant toujours à 10 g de tissu (poids frais).

#### *Contrôle par Microscopie Electronique*

La photographie par microscopie électronique montre que les mitochondries isolées conservent leur intégrité morphologique et présentent une double membrane intacte avec des crêtes bien conservées mais peu nombreuses. Ces micrographies de mitochondries proviennent de tubercules entreposés depuis deux mois. Lee et Chasson<sup>7</sup> ont indiqué que l'entreposage modifie quelque peu la morphologie habituelle des mitochondries: il provoque une disparition ou une dégradation des crêtes; ce fait pourrait expliquer le petit nombre des crêtes mitochondriales observées sur nos micrographies. Les impuretés semblent être surtout constituées de vésicules claires pouvant appartenir à la classe des "microsomes".

#### *Dosage des Constituants Protéiques*

La méthode du Biuret permet de doser la quantité de protéines mitochondriales après les avoir précipitées avec l'acide trichloracétique à la conc. finale de 5%. La gamme étalon est effectuée avec la sérum albumine de bœuf.

L'azote protéique est dosé par la méthode de Thompson et Morrisson.<sup>8</sup>

#### *Activité Respiratoire*

Elle est déterminée manométriquement à 25° à l'aide de l'appareil de Warburg. A 1 ml de suspension mitochondriale, on ajoute 1 ml de milieu de respiration (0,7 M mannitol, 0,01 M tampon phosphate pH 7, 0,01 M tris, 0,5 mM EDTA, 0,1 % sérum albumine de bœuf, 100 µg/ml chloramphénicol, 100 mM succinate de sodium). Le puits central contient 0,3 ml d'une solution de potasse à 20 % imprégnant un peu de papier filtre. Cette activité respiratoire est aussi déterminée directement dans les fioles d'incubation en présence du précurseur radioactif.

#### *Incubation in vitro des Mitochondries*

Dans une fiole de Warburg, à 1 ml de suspension mitochondriale correspondant à 10 g de tissu frais, on ajoute 0,25 ml de chloramphénicol à 4 mg/ml, 0,25 ml de coenzyme A à 160

<sup>23</sup> J. D. VERLEUR, *Plant Physiol.* **40**, 1003 (1965).

<sup>24</sup> J. D. JONES et A. C. HULME, *Nature* **191**, 370 (1961).

<sup>25</sup> G. DUCET, communication personnelle.

$\mu\text{g/ml}$ , 0,5 ml de succinate de sodium à 0,8 mM/ml, et 2 ml d'une solution radioactive (Acétate de sodium  $1\text{-}^{14}\text{C}$  à 40  $\mu\text{Ci/ml}$ , ATP, sel disodique 6  $\mu\text{M/ml}$ , serum albumine de bœuf (0,1 %), EDTA 0,1 %,  $\text{SO}_4\text{Mn}$  et  $\text{SO}_4\text{Mg}$  (0,05 %), mannitol 0,7 M), le volume total est de 4 ml et le pH fixé aux environs de 7.

L'incubation a lieu pendant 2 hr à 25° en constante agitation. On peut suivre l'Activité respiratoire pendant l'incubation en plaçant de la potasse dans le puits central de la fiole, comme il vient d'être décrit.

#### *Incubation in vivo des Mitochondries*

Le précurseur est incorporé dans les rondelles de tissu pendant 2 hr dans les conditions décrites précédemment:<sup>1</sup> 15 g de tissu sont placés dans une fiole de 150 ml contenant 20 ml d'une solution de tampon phosphate à pH 5,5 comprenant 50  $\mu\text{g/ml}$  de chloramphénicol et 4  $\mu\text{Ci}$  d'Acétate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ /ml; l'ensemble est agité pendant 2 hr à 25°. A la fin de l'incubation, les rondelles sont rincées abondamment à l'eau glacée et les mitochondries sont préparées immédiatement.

#### *Extraction des Lipides Totaux et des Acides Gras*

Pour fixer la suspension mitochondriale, on la plonge dans 10 ml de méthanol bouillant; après avoir refroidi l'ensemble, on extrait les lipides à l'aide de la méthode de Bligh et Dyer,<sup>26</sup> à + 1° dans un homogénéiseur de Potter, en facilitant la démixion avec une solution de  $\text{CINa}$  0,1 M. Après centrifugation, la phase  $\text{CHCl}_3$  est récupérée, le  $\text{CHCl}_3$  évaporé, les lipides sont repris dans un volume connu (10 ml) d'un mélange de benzène/éthanol (4/1) et gardés à -26° sous atmosphère d'azote. Dans ces conditions, les lipides restent stables pendant au moins deux mois.

Pour les acides gras, on procède de deux façons: soit on saponifie directement la suspension mitochondriale en la mettant dans 10 ml de  $\text{KOH}$  alcoolique N, en faisant l'extraction des acides gras après 1 hr d'ébullition et en préparant les esters méthyliques de ces acides gras comme il a déjà été décrit,<sup>13</sup> soit on saponifie une partie aliquote de la solution de lipides totaux (en général 5 ml) dans les mêmes conditions. Les esters méthyliques, repris dans un volume connu de pentane ou de méthanol sont stockés à -26°. La radioactivité totale des lipides—dans le cas des expériences avec le précurseur—est déterminée par comptage direct en scintillation liquide d'une partie aliquote (mélange scintillant: PPO 0,5%; diméthyl POPOP 0,03% dans du toluène).

#### *Dosage du Phosphore Lipidique*

Le phosphore lipidique contenu dans une partie aliquote des lipides totaux est déterminé par la méthode de Ducet et Vandewalle.<sup>27</sup>

#### *Dosage des Acides Gras*

Le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques. Nous avons, pour les dosages des quantités absolues d'acides, utilisé une méthode de Lechevalier<sup>16</sup> consistant à ajouter une quantité connue d'un témoin interne, l'ester méthylique de l'acide heptadécanoïque, à une partie aliquote des esters méthyliques des mitochondries.

<sup>26</sup> E. G. BLIGH et W. J. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).

<sup>27</sup> G. DUCET et G. VANDEWALLE, *Ann. Physiol. Veg.* **11**, 199 (1959).

### *Analyse des Lipides Totaux*

L'extrait lipidique brut est analysé par chromatographie sur papier silicé selon Marinetti<sup>28</sup> (solvant de développement: Diisobutylcétone, acide acétique, eau (160/100/14, V/V/V), par chromatographie sur couche mince uni—et bidimensionnelle selon Nichols et James<sup>29</sup> et Gardner.<sup>30</sup> Les réactions colorées spécifiques sont utilisés: A=vapeurs d'Iode;<sup>28</sup> B=aspersion de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;<sup>31</sup> C=Rhodamine 6 G;<sup>28</sup> D=Dragendorff;<sup>28</sup> E=Ninhydrine;<sup>28</sup> F=aspersion de ClO<sub>4</sub>H;<sup>31</sup> G=réaction à l' $\alpha$  naphthol.<sup>32</sup>

Le phosphore de chaque phospholipide est déterminé par la méthode de Ducet et Vandewalle,<sup>27</sup> après élution des spots par le CHCl<sub>3</sub>/méthanol/H<sub>2</sub>O/acide formique (97/97/4/2).<sup>11</sup>

### *Analyse des Acides Gras*

Elle est effectuée par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques; la colonne est en laiton, de 3 mètres de longueur, de diamètre intérieur  $\frac{1}{4}$  pouce; la phase stationnaire, Butane-Diol-Succinate est adsorbée sur chromosorb<sup>™</sup> silanisé (20% d'imprégnation). Le débit du gaz vecteur (azote) est fixé à 31/hr. La détection est à ionisation de flamme. Les chromatographies sont effectuées à 200°.

Les esters méthyliques sont aussi séparés par chromatographie sur couche mince de silice imprégnée de NO<sub>3</sub>Ag;<sup>31</sup> à cet effet, une adaptation originale de la méthode a été utilisée: on asperge une plaque commerciale de gel de silice Merck sur une quinzaine de cm avec 25 ml d'une solution alcoolique de NO<sub>3</sub>Ag à 10%. les esters méthyliques sont déposés dans la zone sans NO<sub>3</sub>Ag. Au début de la migration, sur 5 cm de silice, les esters méthyliques possédant un R<sub>f</sub> très élevé dans la silice pure se séparent des produits d'oxydation éventuels qui migrent peu. Les esters méthyliques, purifiés, sont ensuite séparés selon leur degré d'insaturation dans la zone contenant le NO<sub>3</sub>Ag.

### *Distribution de la Radioactivité dans les Catégories Lipidiques et les Acides Gras*

On sépare, selon les cas, les constituants lipidiques par chromatographie sur papier imprégné de silice ou sur couche mince; et les acides gras par chromatographie sur couche mince de silice imprégnée de NO<sub>3</sub>Ag. Une autoradiographie sur film Kodirex suivie de la révélation du chromatogramme à la Rhodamine 6 G—pour les catégories lipidiques—ou à la 2-7 dichlorofluorescéine—pour les acides gras—indique les produits les plus marqués.

On découpe ensuite—ou on gratte—les spots et on plonge les morceaux de papier—ou les zones de silice—dans le mélange scintillant.

*Remerciements*—Nous remercions Messieurs Michiels (chef du Laboratoire de Biochimie de l'ENSIAA), Quemener (directeur de la Station de St Germain de la F.N.P.P.T.), et Monot (directeur de l'Institut Technique de la Pomme de terre) pour la fourniture et la conservation des lots de tubercules.

Nous remercions également Monsieur le Professeur Ducet (Faculté des Sciences de Marseille) pour ses conseils concernant la préparation des mitochondries.

<sup>28</sup> G. V. MARINETTI, *J. Lipid Res.* **6**, 315 (1965).

<sup>29</sup> B. W. NICHOLS et A. T. JAMES, *Fette Seifen Anstrichmittel* **66**, 1003 (1964).

<sup>30</sup> H. W. GARDNER, *J. Lipid. Res.* **9**, 139 (1968).

<sup>31</sup> H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.* **38**, 708 (1961).

<sup>32</sup> A. SIAKOTOS et G. ROUSER, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.* **42**, 913 (1965).