

Contribution à l'étude de l'absorption du saccharose par des tissus de tubercule de pomme de terre adulte (*Solanum tuberosum* L.)

Modalités et influence des phytohormones

M. PENOT, A. HOURMANT et A. REDDAHI

Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale, 29275 Brest Cédex, France

Abstract

Absorption of sucrose by tissues of adult tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.).

Modalities and influence of phytohormones

Sugar uptake by potato tuber discs was studied. Discs were used "fresh" or after a 24-h ageing period. It was shown that ageing increases (by 3 to 4 times) the rate of glucose and sucrose uptake. Sucrose uptake by fresh tissues was insensitive to the presence of glucose or fructose while a competitive effect was observed after ageing. This indicates the development of an invertase activity, which was inhibited by tris-buffer. Sucrose and glucose uptake by aged discs was dependent on cellular metabolism as shown by the sensitivity to low temperature and metabolic inhibitors (NaCN, DNP, CCCP). Involvement of thiol groups was demonstrated by the inhibition with NEM and PCMBs. Orthovanadate, which decreases phosphate uptake by 85 % (Poder *et al.* 1986) did not produce any effect on glucose and sucrose uptake by aged tissues. Fusicoccin produced only a slight stimulation (15 %). These results argue in favour of the involvement of specific ATPases in ion and sugar uptake. No involvement of a redox system was observed. ABA and BAP inhibited the uptake induced by ageing but had no effect on the endogenous sugar content. BAP would act by its effect on the amount of ATP while ABA would act at the membrane level. The results are discussed in relation to the mechanisms of transfer of glucosyl groups and to the transport of sucrose by the symplasmic pathway.

Introduction

L'accumulation de glucides dans tout organe de stockage (l'amidon dans le cas du tubercule de la pomme de terre) implique deux processus complémentaires: d'une

Reçu le 20 Mai 1991, accepté le 14 Novembre 1992.

Abréviations: ABA, acide abscissique; BAP, benzylaminopurine; CCCP, cyanure de carbonyl-*m*-chlorophénylhydrazone; CHM, cycloheximide; DCCD, *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide; DES, diéthylstilbestrol; DNP, 2,4-dinitrophénol; FC, fusicoccine; GA, acide gibbérellique; IAA, acide β -indolylacétique; MES, acide 2(-*N*-morpholino)éthane-sulphonique; NEM, *N*-éthylmaleimide; PCMBs, acide *p*-chloromercuribenzènesulphonique; Tris, tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

part un processus de sortie du phloème (= unloading) et d'autre part un processus d'accumulation dans les cellules de stockage. Il n'est pas toujours facile de dissocier expérimentalement ces deux processus. On a pu le faire récemment par la technique de la gousse vide (v. Wolswinkel 1987); ainsi est-il apparu que le "unloading" *sensu stricto* pouvait être considéré comme un processus passif (Minchin et Mac Naughton 1986) tandis que l'accumulation dans le compartiment de stockage représentait une étape active.

De plus se pose la question de la voie empruntée par les glucides depuis le tube criblé vers le compartiment de stockage: voie symplasmique ou voie apoplastique (v. Fig. 1). Ces deux voies sont en principe exclusives l'une de l'autre quant aux mécanismes mis en jeu. Au niveau du tubercule de pomme de terre, Oparka (1986) a suggéré l'existence des deux voies, la voie symplasmique attestée par la présence de nombreux plasmodesmes et la voie apoplastique appuyée par la présence d'ATPases plasmalemmiennes révélées par voie cytochimique. Le but du présent travail est multiple:

- Il vise d'une part à étudier comparativement les caractéristiques de l'absorption du saccharose et des hexoses (glucose et fructose) dans un tubercule adulte. Il vise en particulier à situer les résultats obtenus dans un contexte enzymatique où le transfert de saccharose procède de la saccharo-synthétase (ap Rees et Morrell 1990) ou de l'invertase comme dans le cas de la canne à sucre (Glasziou et Gayler 1972), ce qui implique une hydrolyse soit pariétale, soit cytosolique du saccharose avant absorption du glucose et du fructose (Ho 1988). La figure 1 essaie d'intégrer les principales modalités et les voies qui participent au transfert du saccharose depuis le tube criblé (le saccharose étant chez la pomme de terre, la forme circulante des sucres: Mares *et al.* 1985) jusqu'à l'étape de condensation, concrétisée ici par l'accumulation d'amidon au niveau de l'amyloplaste (pl).

- Il a aussi pour but de comparer l'absorption entre tissus 'frais' et tissus 'âgés', c'est-à-dire après mise en survie (ageing); ce processus permet de révéler les potentialités quant aux mécanismes susceptibles de s'exprimer à différentes étapes de la vie du tubercule (par exemple lors de la 'germination' du tubercule) et entraîne de nombreuses modifications physiologiques et biochimiques (Van Steveninck 1975), en particulier ici le développement d'une activité invertasique (Vaughan et Mac Donald 1967) laquelle peut contrôler les flux de glucides solubles.

- Sur le plan des mécanismes, le travail a pour but d'étudier les processus susceptibles de générer un gradient de H^+ : ATPases ou système d'oxydo-réduction? (Dahse *et al.* 1989, Serrano 1990). La participation de tels systèmes générateurs de gradients de H^+ a été mise en évidence, tant au niveau de cellules animales que végétales (Lin 1982a). Ces systèmes mettent en jeu une NADH-oxydase possédant des groupements thiol (Lin 1982b, Dahse *et al.* 1989). Toujours sur le plan des mécanismes il vise à préciser le rôle de certains ions associés au fonctionnement des ATPases (v. Walker et Leigh 1981).

- Enfin, un autre point important est celui de la régulation hormonale de ces flux. Divers travaux montrent, en effet, que les hormones contrôlent d'une manière générale l'orientation des flux (Hayes et Patrick 1985, Penot et Beraud 1983). Chez la pomme de terre, c'est le rapport ABA/GA qui régule la tubérisation et par voie de

conséquence l'arrivée des nutriments (Poder *et al.* 1988 et références). Depuis peu, un rôle particulier est accordé à l'ABA dans le contrôle des flux de glucides. Nous mêmes, avons montré, chez la pomme de terre, la dépendance des flux ioniques vis-à-vis de l'ABA: un traitement hormonal au niveau foliaire accroît le transfert vers une zone traitée (Suleiman *et al.* 1990) ou vers le jeune tubercule en croissance (Poder *et al.* 1988).

Aucune interprétation simple ne peut être donnée quant au mécanisme d'action des hormones dont on sait que l'une des manifestations essentielles peut se situer au niveau du fonctionnement des enzymes: ATPases (Suleiman *et al.* 1991), invertase (Morris et Arthur 1985) ou UDPG-pyrophosphorylase (Mares *et al.* 1985) ou saccharo-synthétase (Sowokinos et Varns 1992) dans le cas de la pomme de terre. Une étude comparée de l'action des principales hormones, ABA, CK et GA, est donc entreprise dans ce travail.

Matériels et méthodes

Matériel végétal: Des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. cv. Sirtema) fournis par la station INRA de Ploudaniel (Finistère, France) sont utilisés. Ils sont conservés à 4 °C et à l'obscurité sans agent de conservation.

Des disques de 10 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur découpés dans le parenchyme central sont utilisés pour les expériences d'absorption soit immédiatement après découpe (= tissus frais) soit après une mise en survie (= ageing) de 24 h à 22 °C, en milieu liquide à raison de 100 disques/l. Les solutions sont aérées et du chloramphénicol est ajouté au milieu (50 mg l⁻¹) pour éviter toute prolifération bactérienne (Hourmant et Penot 1978, Hourmant *et al.* 1979). Le pH du milieu de survie est ajusté à 6.

Absorption des glucides: Les disques sont préincubés pendant 90 min sur le milieu suivant: mannitol 100 mM, tampon Na phosphate 5 mM, pH 6, CaSO₄ 0,5 mM. Les disques sont ensuite séchés, pesés, puis placés sur des solutions renfermant le même milieu auquel est ajouté soit du saccharose (1 mM, sauf mentionné ailleurs) enrichi en saccharose-U-¹⁴C (20,5 GBq mmol⁻¹, Amersham) soit du glucose (1 mM) marqué au ¹⁴C (glucose D-¹⁴C, 11,1 GBq mmol⁻¹, CEA, France). Pour tous les sucres testés, la radioactivité du milieu est de 3,3 kBq cm⁻³. La concentration en mannitol a été ajustée pour maintenir une osmolarité constante. Après incubation dans les solutions radioactives, les disques sont placés 3 × 10 min sur mannitol (100 mM) de façon à laver les sucres de l'espace libre. Les disques sont ensuite portés à ébullition dans 10 cm³ d'éthanol à 80 %. Les résidus tissulaires sont repris par 500 µl d'eau distillée et 5 cm³ de liquide scintillant (ACS II, Amersham) selon le protocole de Saftner et Wyse (1984). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard 300 C.

Dosage des glucides solubles: Le glucose (G) et le saccharose (S) ont été dosés par voie enzymatique selon les techniques de Berghmeyer *et al.* (1974a, b).

Mesure de la teneur en ATP: La technique utilisée a été mise au point par Hourmant *et al.* (1979). Les échantillons sont fixés par l'azote liquide et broyés au froid. Les protéines sont précipitées par le mélange TCA-éther, à froid. Après élimination du TCA, l'extrait obtenu est neutralisé et l'ATP est dosé par la technique de la luciférine-luciférase à l'aide d'un nucléotimètre (C107 CLV, Interbio).

Phytohormones et inhibiteurs: Les phytohormones et les inhibiteurs sont des produits *Sigma* ou *Aldrich*. La solution d'orthovanadate est préparée selon le protocole suivant: après ajustage du pH à 6,5 avec HCl, la décoloration est obtenue en chauffant au bain-marie; la solution est alors incolore. Les inhibiteurs classiques du transport des sucres et des ATPases ont été utilisés (Hager *et al.* 1986, Dahse *et al.* 1989, Sze 1985, Serrano 1990). Par ailleurs, la fusicoccine (FC) qui est connue pour être un puissant stimulateur des échanges H^+/K^+ a été utilisée en complémentarité des inhibiteurs afin de rendre compte de l'implication d'une ATPase dans les entrées de glucides.

Résultats

Absorption des glucides par des 'tissus frais'

Analyse cinétique: Une analyse cinétique a été faite pour le saccharose et pour le glucose à la concentration externe de 1 mM. La figure 2 montre:

- que l'absorption du glucose et du saccharose s'effectue d'une façon linéaire dès l'origine;
- que l'absorption du glucose est plus importante que celle du saccharose, les vitesses d'absorption étant respectivement de 29 nmol et 11 nmol $g^{-1}(m.f.) h^{-1}$ (v. Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison des vitesses d'absorption [nmol $h^{-1} g^{-1}(f.m.)$] du saccharose et du glucose (1 mM) par les tissus 'frais' et ayant subi 24 h de survie.

Survie	0 h	24 h
Saccharose (1 mM)	11	45,0
Glucose (1 mM)	29	75,0

Compétition entre glucides: L'absorption du saccharose a été mesurée à 3 concentrations différentes, 0,05, 1 et 10 mM, en présence soit de glucose soit de fructose à des concentrations de 9 fois celle du saccharose. Les résultats (Tableau 2) montrent qu'en aucun cas les hexoses n'exercent une action inhibitrice vis-à-vis de l'entrée du saccharose au niveau des tissus "frais". Cette absence de compétition entre les sucres solubles indique en première approximation qu'il ne doit pas y avoir d'activité invertasique à ce stade.

L'absorption du saccharose est-elle dépendante du métabolisme? Les données du tableau 3 montrent que le CCCP (20 μ M) et NaCN (1 mM) inhibiteurs spécifiques du métabolisme respiratoire diminuent à la fois la teneur en ATP et l'absorption du saccharose; ceci indique donc que l'absorption est dépendante du métabolisme.

Tableau 2. Action du glucose et du fructose sur l'absorption du saccharose à 3 concentrations différentes, les concentrations en hexoses étant dans chaque cas 9 fois supérieures à celles du saccharose. Vitesses exprimées en $\text{nmol h}^{-1} \text{g}^{-1}(\text{f.m.})$ et en pourcentage par rapport aux témoins.

Concentration en saccharose [mM]	Témoin	Glucose	Fructose
0,05	0,52 (100 %)	0,49 (94 %)	0,51 (98 %)
1	9,11 (100 %)	8,05 (88 %)	8,65 (95 %)
10	64,36 (100 %)	62,75 (98 %)	65,00 (101 %)

Tableau 3. Étude comparée de l'action de différents inhibiteurs des ATPases ou du métabolisme respiratoire sur l'absorption de saccharose (1 mM) par des tissus frais, ou ayant subi une survie de 24 h. Résultats exprimés en $\text{nmol g}^{-1}(\text{m.f.}) (3 \text{ h})^{-1}$ pour le saccharose, en $\text{nmol g}^{-1}(\text{m.f.})$ pour l'ATP et en pourcentage par rapport aux témoins. Les actions de l'oligomycine et de la fusicoccine sont également données.

Effecteur	Tissus frais		ATP		Tissus après survie	
	Saccharose [nmol]	[%]	[nmol]	[%]	Saccharose [nmol]	[%]
Témoin	38,1	100	30	100	114,1	100
CCCP (20 mM)	15,2	40	1,8	6	43,4	38
DNP (0,5 mM)	-	-	-	-	44,5	39
NaCN (1 mM)	15,6	41	7,8	26	67,3	59
DES (50 μ M)	31,2	82	-	-	91,2	80
DES (100 μ M)	24,8	65	-	-	87,8	77
DCCD (50 μ M)	27,8	73	16,6	55	91,2	80
DCCD (100 μ M)	25,1	66	-	-	75,2	66
Orthovanadate (0,5 mM)	36,9	97	-	-	116,3	102
Oligomycine (5 mg l^{-1})	-	-	-	-	76,4	67
Fusicoccine (20 μ M)	44,2	116	-	-	132,2	116

Rôle des ATPases: influence des inhibiteurs et de la FC On note que l'orthovanadate, n'a pas d'effet, que le DES ainsi que le DCCD ne développent qu'une action inhibitrice faible (Tableau 3). De même la FC, présente dans le milieu (20 μ M) ne produit pas d'effet significatif sur l'absorption du saccharose (+16 %, Tableau 3).

On peut donc en conclure que, chez les tissus frais l'absorption du saccharose ne réclame pas la participation d'une ATPase plasmalemmique. Il est à noter que des dosages d'ATP ont montré que la présence de DCCD à 50 M entraîne une baisse de 45 % de la teneur en ATP (Tableau 3), ce qui exclut toute interprétation arguant d'une absence de pénétration des inhibiteurs.

Importance des roulements thiols: Un pré-traitement de 30 min au PCMBS, connu pour être peu pénétrant, inhibe fortement l'absorption du saccharose (Fig. 3A). Cette inhibition, maximale dès 0,5 mM en PCMBS, ainsi que celle mesurée après prétraitement avec la NEM (Fig. 3B) suggèrent une implication des groupements thiols du plasmalemme dans le transport du saccharose.

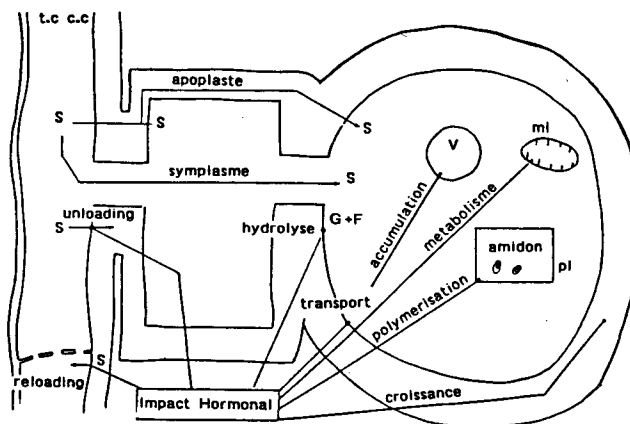


Fig. 1. Schéma illustrant les voies de transport du saccharose (S) dans le tubercule de pomme de terre et les réactions d'hydrolyse (invertase) qui peuvent y être associées. Les différents sites d'action de l'impact hormonal y figurent également.

G = glucose, F = fructose, mi = mitochondrie, pl = plaste (amyloplaste), S = saccharose (=sucrose), tc-cc = complexe tube criblé - cellule compagne, V = vacuole

Tableau 4. Influence d'une basse température (2 °C) sur l'absorption du saccharose et du glucose mesurée après 24 h de survie à 22 °C. Résultats exprimés en nmol g⁻¹(m.f.) (3 h)⁻¹ et en pourcentage par rapport aux témoins.

	Témoin (22 °C)	%	2 °C	%
Saccharose (1 mM)	84,5	100	13,1	15
Glucose (1 mM)	149,9	100	25,4	17

Intervention d'un système d'oxydo-réduction: Aucun résultat significatif n'a été obtenu, même en présence de NADH à 1,5 mM, ce qui suggère qu'aucun système d'oxydo-réduction ne semble impliqué, sur ce matériel, pour rendre compte de l'absorption du saccharose.

Absorption des glucides, après mise en survie

Analyse cinétique: La figure 2B montre que:

- l'absorption du saccharose et du glucose évolue linéairement, en fonction du temps d'absorption;
- les vitesses sont respectivement (Tableau 1) de 45 nmol g⁻¹(m.f.) h⁻¹ pour le

saccharose et de $75 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour le glucose, ce qui signifie que les vitesses se sont accrues par rapport aux tissus frais, et que l'absorption du glucose reste toujours supérieure à celle du saccharose mais que la survie contribue à atténuer cette différence.

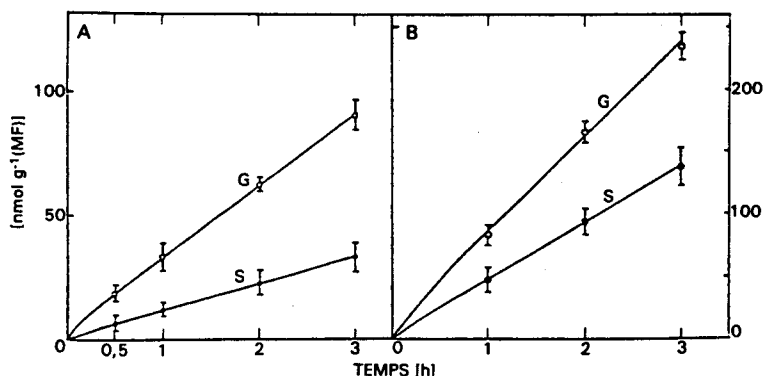


Fig. 2. Etude comparée de l'absorption du saccharose (S, 1 mM) et du glucose (G, 1 mM) en fonction du temps par des disques "frais" (A) ou ayant subi une survie préalable de 24 h (B). Résultats exprimés en $\text{nmol g}^{-1}(\text{m.f.}) \pm \text{erreur-standard}$.

Tableau 5. Action du tris (25 mM) au cours de l'absorption du glucose ou du saccharose (1 mM) par des tissus frais ou ayant subi 24 h de survie préalable. Absorption mesurée à pH 4,8 (tampon citrate-acide citrique) et à pH 8 (tampon MES). Résultats exprimés en $\text{nmol (3 h)}^{-1} \text{ g}^{-1}(\text{m.f.})$ et en pourcentage par rapport aux témoins.

Absorption (Glucide 1 mM)	pH 4,8			pH 8			Frais		
	Survie 0	+Tris		Survie 0	+Tris		0	+Tris	
Glucose	292	293	(100 %)	208	158	(76 %)	80	72	(90 %)
Saccharose	210	216	(103 %)	140	83	(59 %)	29	29	(100 %)

Relation avec le métabolisme: Quand l'absorption du glucose et du saccharose est réalisée à basse température, on observe une forte inhibition de l'absorption qui est de 83 à 85 % (Tableau 4). Les inhibiteurs métaboliques NaCN (1 mM) et CCCP (20 μM) inhibent respectivement l'absorption du saccharose de 41 et 62 % (Tableau 3).

Rôle des ATPases: Comme chez les tissus frais, les inhibiteurs spécifiques des ATPases: DCCD (100 μM) et DES (100 μM) produisent des inhibitions relativement faibles de l'absorption du saccharose qui sont respectivement de 34 et 23 % (Tableau 3). Ceci suggère une participation modeste des ATPases du plasmalemm dans le transport de ce sucre.

Effet des cations monovalents: Divers ions peuvent être associés aux flux de glucides et agir plus ou moins directement sur les ATPases (voir introduction). A cet effet,

KCl, NaCl et KNO₃ ont été testés à la concentration de 50 mM. Aucun effet n'est observé. Ceci semble donc exclure une participation de l'ATPase du tonoplaste au mécanisme de transport du saccharose. On sait en effet que cette ATPase est stimulée par les ions Cl et inhibée par NO₃ (Sze 1985).

Intervention des groupements thiols: Après un prétraitement de 5 min, que la NEM soit utilisée à 0,25 ou 0,5 mM, l'inhibition de l'absorption du saccharose est sensiblement la même, de 35 %, indiquant que son action reste de nature superficielle (Fig. 4A). Le PCMBs réduit, dès 0,5 mM l'absorption de 50 % (Fig. 4B). Ces résultats montrent que les groupes thiol du plasmalemmes sont impliqués dans le transport du saccharose.

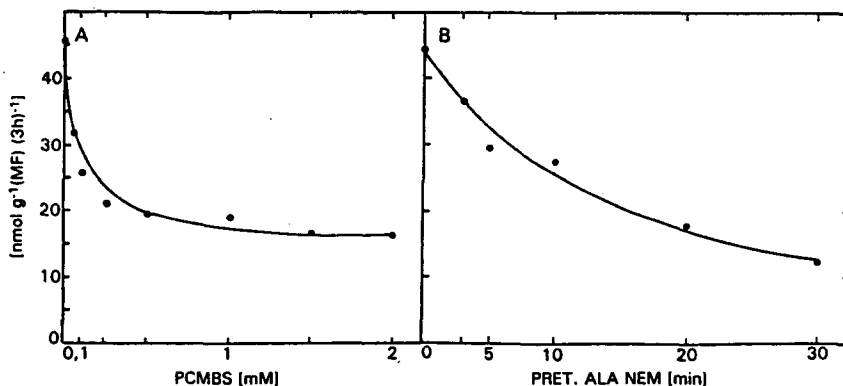


Fig. 3. Influence des inhibiteurs des groupements thiols sur l'absorption du saccharose (1 mM) par des tissus "frais". A. PCMBs, prétraitement de 30 min: influence de la concentration. B. NEM ($2 \cdot 10^{-4}$ M) - Influence de la durée du prétraitement.

Compétition entre glucides: Nous avons testé l'influence du glucose, du fructose et du 3-O-méthylglucose sur l'absorption du saccharose et mené aussi les expériences de compétition réciproque. L'effet de concentrations croissantes en hexoses sur l'absorption du saccharose à 1 mM est donné dans la figure 5A. Les résultats montrent que, contrairement aux résultats précédents (Tableau 2), l'absorption du saccharose, par des tissus ayant subi 24 h de survie, est inhibée de manière significative par la présence d'hexoses. Les inhibitions liées au glucose sont respectivement de 40 % à 5 mM et de 65 % à 25 mM. Le fructose exerce un effet inhibiteur moindre (l'inhibition maximale mesurée est de 40 %). Le 3-O-méthylglucose (Fig. 6) dont on sait qu'il n'est pas métabolisé, développe le même effet inhibiteur, ce qui signifie que l'action s'exerce sur le(s) mécanisme(s) d'absorption et non sur le métabolisme cellulaire.

Réciproquement, l'absorption du glucose (1 mM) réalisée en présence de concentrations croissantes en saccharose, se traduit par une inhibition maximale de 48 % (Fig. 5B).

Rôle de(s) invertase(s): Les résultats précédents liés à la compétition entre glucides

laissent supposer la participation d'une invertase active dans les tissus mis en survie. Le Tris est connu pour être un puissant inhibiteur des invertases (v. Matériel et méthodes). Les expériences d'absorption ont donc été conduites aux pH 4,8 (invertase acide) et 8 (invertase alcaline). A pH 4,8, ni l'absorption du saccharose, ni celle du glucose n'est réduite en présence de Tris. Par contre, à pH 8 l'absorption du glucose et du saccharose est réduite significativement (on passe en effet de 208 à 158 dans le cas du glucose, et de 140 à 83 $\text{nmol (3 h)}^{-1} \text{ g}^{-1}(\text{m.f.})$ dans le cas du saccharose; l'inhibition liée au Tris est donc respectivement de 24 % et de 41 % (Tableau 5).

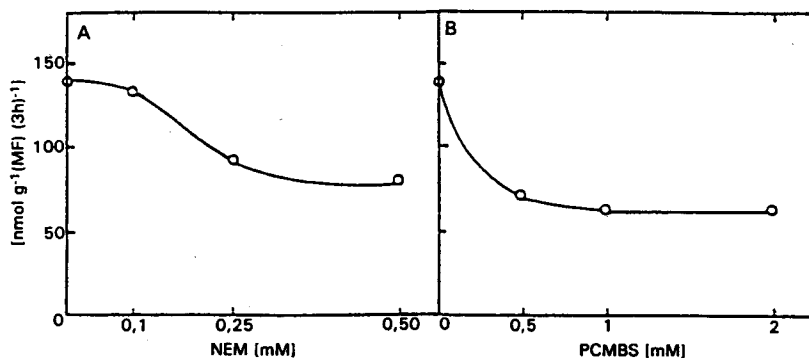


Fig. 4. Influence des inhibiteurs des groupements thiols (NEM et PCMBs) sur l'absorption du saccharose (1 mM) par des disques ayant subi une survie de 24 h. Prétraitement de 5 min: étude en fonction de la concentration en inhibiteur. A. NEM, B. PCMBs

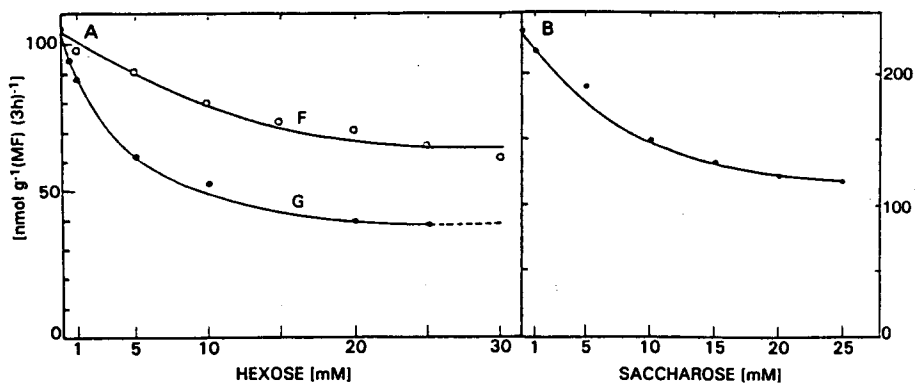


Fig. 5. Actions des concentrations croissantes en hexoses (glucose: G, fructose: F) sur l'absorption du saccharose, 1 mM (A) ou en saccharose sur l'absorption du glucose, 1 mM (B), par des disques ayant subi 24 h de survie.

L'action du Tris qui est nulle dans le cas des tissus frais devient inhibitrice après

une période de survie ce qui signifie qu'une activité invertasique se développe au cours de la survie.

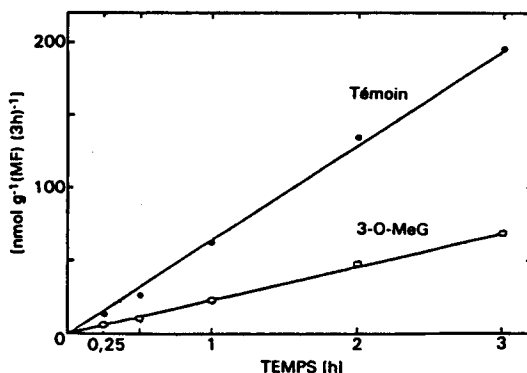


Fig. 6. Action du 3-O-méthylglucose (3-O-MeG, 20 mM) sur l'absorption du saccharose (1 mM) par des disques ayant subi 24 h de survie.

On retiendra donc à l'issue de cet ensemble d'expériences que l'absorption du saccharose (et du glucose) par des tissus de tubercule ayant subi le processus de survie, est fortement dépendante de l'énergie métabolique, que la participation des ATPases aux mécanismes de transport n'apparaît pas de façon évidente; que la participation éventuelle d'un système d'oxydo-réduction n'apparaît pas davantage que pour les tissus frais; que la participation de 2 transporteurs plus ou moins spécifiques du saccharose et du glucose avec intervention d'un invertase semble être l'hypothèse la plus vraisemblable. Toutefois avant de discuter ces différents points, il nous est apparu intéressant de tester l'action des hormones dont il dont l'importance sur l'absorption et sur le transport de nutriments a été rappelée dans l'introduction.

Contrôle hormonal de l'absorption

Conformément à ce qui a été dit au point de vue du contrôle hormonal des flux de nutriments (v. Introduction) nous avons testé l'action des diverses phytohormones (ABA, BAP, IAA, GA₃) à différentes concentrations (entre 10 et 100 μ M) vis-à-vis de l'absorption du saccharose à 1 mM.

1. *Tissu frais*: aucun effet n'a été mesuré sur les tissus "frais".
2. *Tissus "en survie"*: seules la BAP (44 μ M) et l'ABA (20 μ M) présentes au cours de la phase de survie conduisent à une diminution de la vitesse d'entrée du saccharose (inhibition de 60 % et de 40 % respectivement - Fig. 7A et 7B).

Conclusion et discussion

En conclusion, ce travail apporte un certain nombre d'informations complémentaires sur ce qui était déjà plus ou moins connu sur les flux de glucides au niveau du

tubercule de pomme de terre tel qu'il a été présenté dans la figure 1. Les mécanismes d'absorption sont difficilement abordables *in situ* chez un tubercule en voie de croissance où les processus de sortie de phloème (unloading) et d'accumulation dans le compartiment de stockage sont difficilement dissociables. C'est donc la raison pour laquelle nous avons eu recours à la technique des disques incubés où seuls les mécanismes liés à l'absorption des glucides solubles sont abordés.

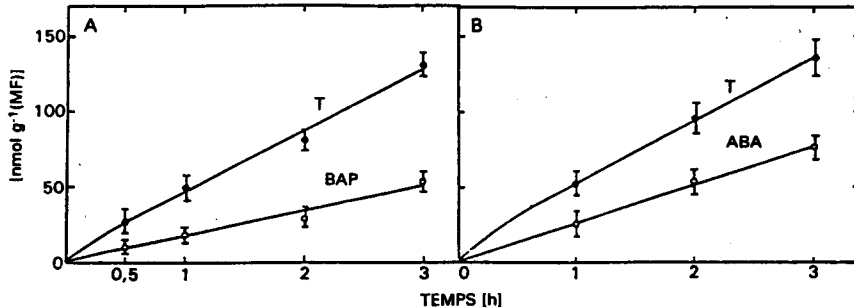


Fig. 7. Etude comparée de l'action de quelques phytohormones, présentes dans le milieu de survie, sur l'absorption du saccharose (1 mM), mesurée après 24 h de traitement. Résultats exprimés en $\text{nmol g}^{-1}(\text{m.f.}) \pm \text{erreur-standard}$. A. BAP, B. ABA

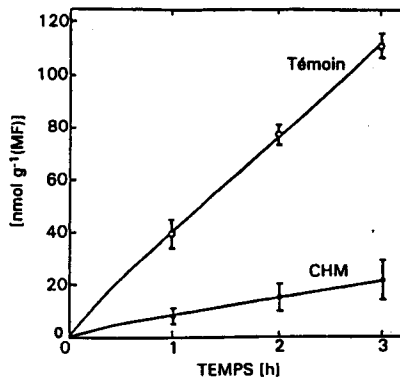


Fig. 8. Action de la cycloheximide (CHM: 1 mg l^{-1}) présente dans le milieu de survie, sur l'absorption du saccharose (1 mM) par les disques ayant subi 24 h de survie préalable. Résultats exprimés en $\text{nmol g}^{-1}(\text{m.f.}) \pm \text{erreur-standard}$.

Ce travail distingue aussi obligatoirement l'étude sur tissus 'frais' (pris immédiatement après le découpage) et celle sur tissus 'âgés' (mis en survie); la mise en survie étant un état découlant directement des conditions expérimentales (milieu d'absorption). Chez les tissus frais, le glucose et le saccharose sont tous deux rapidement absorbés (Fig. 2). L'absorption du glucose est nettement supérieure à

celle du saccharose pour une même concentration, 1 mM. Une telle absorption préférentielle du glucose a été rapportée pour d'autres matériels: protoplastes de racines de maïs (Giaquinta *et al.* 1983), suspensions cellulaires de canne à sucre (Komor *et al.* 1981) où une hydrolyse préalable du saccharose par une invertase de paroi est nécessaire à l'absorption. La question de la participation d'une invertase se pose donc également ici. Toutefois pour une concentration en saccharose de 1 mM, l'addition de glucose (ou de fructose) ne produit qu'un faible ralentissement de la vitesse d'absorption du saccharose. Ceci, ajouté au fait qu'aucune activité invertasique importante n'a été trouvée à ce stade (Vaughan et McDonald 1967) semble exclure l'idée d'une hydrolyse préalable du saccharose chez la pomme de terre. Ceci irait d'ailleurs dans le sens des conclusions de ap Rees et Morrell (1990) qui attribuent une importance toute particulière à la saccharo-synthétase dans le transfert de glucosyl.

Ceci indique aussi que glucose et saccharose sont vraisemblablement transportés de façon indépendante. Sur le plan des mécanismes, l'absorption du saccharose procède habituellement de la formation d'un gradient de H^+ indiquant la participation d'une ATPase du plasmalemm (Delrot et Bonnemain 1985) stimulée d'une manière spécifique par la FC (Marré 1979). Or on a vu que la participation d'une ATPase ne paraît pas évidente compte-tenu du fait que l'orthovanadate, puissant inhibiteur des ATPases du plasmalemm, n'affecte pas le transport du saccharose (Tableau 3); dans le même sens parle le peu d'effet de la FC. Seuls le DES qui agit à la fois sur les ATPases du plasmalemm et du tonoplaste (Lorenc-Plucińska et Ziegler 1988) et le DCCD (inhibiteur des ATPases mitochondriales) entraînent un effet inhibiteur (35 %, Tableau 3), mais parallèlement on constate que le pool d'ATP est diminué de 45 % ce qui suggère plutôt une relation indirecte entre absorption des glucides et niveau énergétique de la cellule. Là encore cette interprétation irait dans le sens des conclusions de ap Rees et Morrell (1990) indiquant que la saccharo-synthétase est l'enzyme impliquée dans l'hydrolyse du saccharose et qu'elle met en jeu un pool important de nucléotides.

Avec la mise des tissus découpés sur un milieu d'absorption débute le processus de mise en survie (ageing). On sait que cela conduit à de nombreuses modifications métaboliques (Kahl 1974) liées à l'effet de blessure; l'accroissement des vitesses d'absorption des solutés organiques ou inorganiques représente l'un de ces changements (Van Steveninck 1975, Hourmant et Penot 1978). Néanmoins, même si cette technique a ses limites, elle reste révélatrice des potentialités cellulaires qui peuvent apparaître à d'autres étapes naturelles d'un organe, par exemple au moment de la 'germination' du tubercule impliquant l'hydrolyse de l'amidon. En ce qui concerne les glucides on constate, une nouvelle fois, que l'absorption du saccharose et du glucose est fortement accrue (de 4 et de 2,6 fois respectivement, Tableau 1) en même temps que la survie diminue l'absorption préférentielle de glucose (l'atténuation étant de 40 % environ). Cet accroissement n'est pas lié à une diminution de la teneur des sucres solubles endogènes (résultats non fournis), mais apparaît plutôt comme la conséquence de la synthèse de nouveaux transporteurs protéiques, car seul ce processus est inhibé par la CHM (Fig. 8) tandis que la teneur en glucides n'est pas affectée par la CHM (résultats non fournis).

Comme chez les tissus frais, l'absorption se fait contre le gradient de

concentration; elle est pratiquement linéaire en ce qui concerne les deux glucides (Fig. 2B); elle est dépendante du métabolisme énergétique de la cellule (Tableau 3), elle est sensible aux inhibiteurs des groupements thiols (PCMBS et NEM, Fig. 4). On note l'absence d'effet de l'orthovanadate, ce qui, une nouvelle fois laisse supposer qu'une ATPase plasmalemmienne n'est pas directement impliquée dans la pénétration du saccharose dans la cellule. Il est exclu que l'orthovanadate soit inefficace du fait par exemple de la taille de la molécule; nous avons montré en effet, sur le même matériel, que cet inhibiteur diminuait de 58 % l'entrée de P_i dans la cellule (Poder et Penot 1992). Il semblerait donc que les ATPases qui ont été visualisées par cytochimie (Oparka 1986) empêchent la fuite du saccharose ou soient davantage impliquées dans l'absorption des ions inorganiques (P , K^+ - Poder et Penot 1986).

En ce qui concerne la participation d'une invertase, on sait que la mise en survie favorise le développement d'une activité invertasique (Vaughan et McDonald 1967). Le Tris qui est connu pour être un puissant inhibiteur de l'invertase de paroi (Kato et Kubota 1978) n'est actif que sur des tissus ayant subi la survie (Tableau 5). Cela laisse donc supposer qu'une invertase participe pour partie à ce stade, à l'absorption du saccharose (activité évaluée à 30 % de l'absorption totale du saccharose - (Morrell et ap Rees 1986). C'est dans le même sens que parlent les expériences d'inhibition compétitive entre glucose et saccharose (Figures 5 et 6). On a vu en effet qu'une concentration de 25 fois celle du glucide étudié ne conduisait qu'à une faible inhibition de l'absorption de l'autre glucide; ceci est incompatible avec une inhibition qui se situerait au niveau d'un seul et même transporteur. Ceci laisse donc supposer, comme cela a été dit précédemment, la participation de deux transporteurs spécifiques, l'un pour le glucose, l'autre pour le saccharose, chacun étant sensible aux inhibiteurs des groupements thiols (Martinoia *et al.* 1987, Xia et Saglio 1988). Du fait du caractère non perméant du PCMBS, les résultats obtenus (Fig. 3 et 4) suggèrent que ces transporteurs sont situés au niveau du plasmalemm.

Reste la question des hormones dont on sait qu'elles interviennent à un stade ou à un autre dans le développement du tubercule (Ewing 1987) et dont on a montré qu'elles agissent au niveau des boutures sur le transport à longue distance (Poder *et al.* 1988). L'absence d'effet positif peut s'expliquer par le fait que les tubercules au stade adulte, ont perdu toute sensibilité aux hormones; cette interprétation peut s'appliquer aux tissus frais. La mise en survie entraîne une modification des teneurs endogènes en hormones, ne serait-ce que par l'effet de blessure. Les seuls effets que nous ayons mesurés, à ce stade, conduisent à des inhibitions (cas de l'ABA et de la BAP, Fig. 7). En ce qui concerne la BAP on sait que cette hormone diminue le pool d'ATP (Hourmant *et al.* 1979), ce qui peut expliquer la diminution de l'absorption du saccharose. Quant à l'ABA, elle n'agit ni sur la synthèse d'ATP, ni sur la synthèse protéique, ni sur le métabolisme des phospholipides (Hourmant 1979); ceci nous conduit à penser que cette hormone agit préférentiellement au niveau de la membrane, par exemple par dépolarisation lente (Shaner *et al.* 1975). Cet argument est d'ailleurs conforté par le fait que l'ABA ne modifie pas le pool de saccharose endogène (résultats non fournis) ce qui veut dire que l'ABA agit plus au niveau membranaire qu'au niveau du contrôle de l'activité de la saccharo-synthétase.

Sur le plan des voies suivies, la présence d'une ATPase située au niveau du

plasmalemmes plaide *à priori* pour une étape apoplastique. Néanmoins on a vu (Tableau 3) que le vanadate n'avait pas d'action sur les flux de saccharose; on a vu aussi que l'activité invertasique était pratiquement inexistante au stade des tissus frais. Ceci plaide donc plus en faveur d'un cheminement du saccharose par la voie symplastique, hypothèse appuyée également par les observations d'Oparka (1986) qui soulignent la présence de plasmodesmes nombreux reliant le tube criblé et les cellules du parenchyme. L'effet des inhibiteurs des ATPases tel le DCCD qui agit plus particulièrement sur les ATPases mitochondriales ou le DES lequel agit sur les ATPases et devrait préférentiellement se situer au niveau des mécanismes impliqués directement ou indirectement dans le transfert des groupements glucosyl vers l'amidon (Fig.1) et non, comme nous l'avons déjà dit, au niveau d'une ATPase du plasmalemme.

Pour terminer, rappelons que ce travail se situe dans une étude suivie de l'évolution des processus d'absorption (ou d'exsorption) du saccharose au cours des différentes étapes du développement du tubercule (croissance, maturité, germination), même si peu de changements ont été notés jusqu'à présent (Davies et Ross 1987).

Références

- ap Rees, T., Morrell, S.: Carbohydrate metabolism in developing potatoes. - *Amer. Potato J.* 67: 835-884, 1990.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E.: Sucrose. - In: Bergmeyer, H.U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3. Pp. 1176-1179. Academic Press, New York - London 1974.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., Stork, H.: Glucose. - In: Bergmeyer, H.U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3. Pp. 1196-1201. Academic Press, New York - London 1974.
- Dahse, I., Bernstein, M., Müller, E., Petzold, U.: On possible functions of electron transport in the plasmalemma of plant cells. - *Biochem. Physiol. Pflanzen* 185: 145-180, 1989.
- Davies, H.V., Ross, H.A.: Hydrolytic and phosphorolytic enzyme activity and reserve mobilisation in sprouting tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). - *Plant Physiol.* 186: 387-396, 1987.
- Delrot, S., Bonnemain, J.L.: Mechanism and control of phloem transport. - *Physiol. vég.* 29: 199-220, 1985.
- Ewing, E.E.: The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. - In: Davies, P.J. (ed.): *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Pp. 515-538. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht 1987.
- Felle, H., Bentrup, F.W.: A study of the primary effect of the uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone on membrane potential and conductance in *Riccia fluitans*. - *Biochim. biophys. Acta* 464: 179-187, 1977.
- Giaquinta, R.T., Lin, W., Sadler, N.L., Franceschi, V.R.: Pathway of phloem unloading of sucrose in corn roots. - *Plant Physiol.* 72: 362-367, 1983.
- Glasziou, K.T., Gayler, K.R.: Storage of sugars in stalks of sugar cane. - *Bot. Rev.* 38: 471-490, 1972.
- Hager, A., Berthold, W., Biber, W., Edel, H.G., Lanz, C., Schiebel, G.: Primary and secondary energized ion-translocating systems on membranes of plant cells. - *Ber. deut. bot. Ges.* 99: 281-295, 1986.
- Hayes, P.M., Patrick, J.W.: Photosynthate transport in stems of *Phaseolus vulgaris* L. treated with gibberellic acid, indol-3-acetic acid or kinetin. - *Planta* 166: 371-379, 1985.
- Ho, L.C.: Sink strength and sugar metabolism. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39: 355-378, 1988.
- Hourmant, A.: Influence de quelques phytohormones sur l'absorption et sur le métabolisme du

- phosphore au niveau des tissus de tubercules de pomme de terre. - Thèse Doctorat d'Etat. Brest 1979.
- Hourmant, A., Penot, M.: Action de quelques phytohormones sur la respiration et l'absorption du phosphate par des disques de tubercules de pomme de terre en survie. - *Physiol. Plant.* **44**: 278-282, 1978.
- Hourmant, A., Pradet, A., Penot, M.: Action de la benzylaminopurine sur le métabolisme des composés phosphorylés des disques de tubercule de pomme de terre en survie. Effect sur la respiration et la teneur en nucléotides adényliques. - *Physiol. vég.* **17**: 483-499, 1979.
- Kahl, G.: Metabolism in plant storage tissue slices. - *Bot. Rev.* **40**: 263-314, 1974.
- Kato, T., Kubota, S.: Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. - *Physiol. Plant* **42**: 67-72, 1978.
- Komor, E., Thom, M., Maretzki, A.: The mechanism of sugar uptake by sugar cane suspension cells. - *Planta* **153**: 181-192, 1981.
- Lin, W.: Isolation of NADH oxidation system from the plasmalemma of corn root protoplasts. - *Plant Physiol.* **70**: 326-328, 1982a.
- Lin, W.: Response of corn root protoplasts to exogenous NADH: oxygen consumption, ion uptake, and membrane potential. - *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **79**: 3773-3776, 1982b.
- Lin, W.: Further characterization on the transport property of plasmalemma NADH oxidation system in isolated corn root protoplasts. - *Plant Physiol.* **74**: 219-222, 1984.
- Lorenc-Plucińska, G., Ziegler, H.: Interaction of membrane effectors and sulfite in sucrose uptake of *Ricinus communis* cotyledons. - *J. Plant Physiol.* **133**: 96-102, 1988.
- Mares, J.J.: Sowokinos, J.R., Hawker, J.S.: Carbohydrate metabolism in developing potato tubers. - In: Li, P.H. (ed.): *Potato Physiology*. Pp. 279-327. Academic Press, London 1985.
- Marré, E.: Fusicoccin: A tool in plant physiology. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**: 273-288, 1979.
- Martinola, E., Kaiser, G., Schramm, M.J., Heber, U.: Sugar transport across the plasmalemma and the tonoplast of barley mesophyll protoplasts. Evidence for different transport systems. - *Plant Physiol.* **131**: 467-478, 1987.
- Minchin, P.E.H., Mc Naughton, G.S.: Phloem loading within the seed coats of *Pisum sativum* observed using surgically modified seeds. - *J. exp. Bot.* **37**: 1151-1163, 1986.
- Morris, D.A., Arthur, E.D.: Effects of gibberellic acid on patterns of carbohydrate distribution and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris*. - *Physiol. Plant.* **65**: 257-262, 1985.
- Oparka, K.J.: Phloem unloading in the potato tuber. Pathways and sites of ATPase. - *Protoplasma* **131**: 201-210.
- Penot, M., Beraud, J.: Hormone-directed transport in isolated leaves of *Pelargonium zonale* - Relation with other processes. - *Plant Growth Regulators (Sofia)* **3**: 302-309, 1983.
- Poder, D., Penot, M.: Propriétés du système de transport du phosphate des tissus de tubercules de pomme de terre en survie: effet du pH et de divers inhibiteurs métaboliques. - *Physiol. vég.* **24**: 551-557, 1986.
- Poder, D., Penot, M.: The effect of vanadate on phosphate transport in aged potato tissue (*Solanum tuberosum*). - *J. exp. Bot.* **43**: 189-193, 1992.
- Poder, D., Suleiman, S., Penot, M.: Phosphate transport in potato cuttings. Effect of GA and ABA. - *Physiol. Plant.* **72**: 385-388, 1988.
- Porter, G.A., Knievel, D.P., Shannon, J.C.: Sugar efflux from maize pedicel tissue. - *Plant Physiol.* **77**: 524-531, 1985.
- Saftner, R.A., Wyse, R.E.: Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue discs. - *Plant Physiol* **74**: 951-955, 1984.
- Serrano, R.: Plasma membrane ATPase. - In: Larsson, C., Møller, I.M. (ed.): *The Plant Plasma Membrane*. Pp. 127-153. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg 1990.
- Shaner, D.L., Mertz, S.M., Arntzen, C.J.: Inhibition of ion accumulation in maize roots by abscisic acid. - *Planta* **122**: 79-90, 1975.
- Sowokinos, J.R., Varns, J.L.: Induction of sucrose synthase in potato tissue culture: effect of carbon source and metabolic regulators on sink strength. - *Plant Physiol.* **139**: 672-679, 1992.

- Sulciman, S., Hourmant, A., Penot, M.: Influence de l'acide abscissique sur le transport d'ions inorganiques chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Etude comparée avec quelques autres phytohormones. - Biol. Plant. **32**: 128-137, 1990.
- Sulciman, S., Hourmant, A., Penot, M.: Influence of abscisic on K⁺ absorption by leaf discs of *Solanum tuberosum*. - Biol. Plant. **33**: 49-57, 1991.
- Sze, H.: H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. -Annu. Rev. Plant Physiol. **36**: 175-208, 1985.
- Van Steveninck, F.M.: The "washing" or "aging" phenomenon in plant tissues. - Annu Rev. Plant Physiol. **26**: 237 - 258, 1975.
- Vaughan, D., Mac Donald, J.R.: Development of soluble and insoluble invertase activity in washed storage tissue slices. - Plant Physiol. **42**: 456-458, 1967.
- Walker, R.R., Leigh, R.A., Mg-dependent, cation-stimulated inorganic pyrophosphate associated from storage roots of red beets (*Beta vulgaris* L.). - Planta **153**: 150-155, 1981.
- Wolswinkel, P.: The role of maternal tissues in the sink control of assimilate transport into developing seeds. - Plant Physiol. Biochem. **25**: 557-566, 1987.
- Xia, J.H., Saglio, P.H., Characterization of the hexose transport system in maize root tips. - Plant Physiol. **88**: 1015-1020, 1988.

Communicated by J. ČATSKÝ