

BBA 45989

ETUDE DE L'EVOLUTION DES ACTIVITES DES ENZYMES MITOCHONDRIAUX DE L'HEPATOCYTE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU RAT

M. LEVY ET R. TOURY

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Faculté des Sciences, Paris (France)

(Reçu le 4 mai, 1970)

SUMMARY

Study on the evolution of mitochondrial enzyme activities in hepatocyte during rat development

Some constitutive enzymes of the three isolated fractions of mitochondria outer membrane, inner membrane and matrix, have been investigated in rat hepatocyte during a period varying from the foetal state to the 15th day after birth.

In the three mitochondrial fractions, activities of the studied enzymes present different evolutions. In the matrix, the tricarboxylic enzyme activities have already reached their normal values before birth. In the outer membrane, the NADH-cytochrome *c* reductase activity increases regularly, in the same way as that of the endoplasmic reticulum NADH-cytochrome *c* reductase. In the inner membrane, the oxygen consumption is very low before birth, then increases suddenly from the 5th to the 8th day after birth, when it reaches the normal values. The limiting factor of the respiratory chain activities is neither cytochrome oxidase nor the first dehydrogenases.

INTRODUCTION

Le mécanisme de la biogénèse des mitochondries a suscité au cours de ces dernières années un intérêt croissant. L'ensemble des résultats obtenus à ce jour, amène à penser que la mitochondrie synthétiserait elle-même un petit nombre de ses constituants protéiques localisés essentiellement sur la membrane interne¹⁻⁶.

Nous avons abordé ce problème par l'étude de l'évolution des activités des enzymes mitochondriaux de l'hépatocyte au cours du développement du rat depuis la période prénatale jusqu'au sevrage. Nous avons suivi l'apparition des activités enzymatiques au niveau des trois fractions isolées de la mitochondrie: matrice, membrane externe, membrane interne. Nous avons choisi comme marqueurs de la matrice quelques enzymes du cycle tricarboxylique, de la membrane externe la NADH-cytochrome *c* réductase (NADH:ferricytochrome *c* oxydoréductase, EC 1.6.99.3), de la membrane interne les chaînes respiratoires.

Dans les mêmes conditions expérimentales, DALLNER *et al.*⁷ avaient précédemment suivi l'évolution des enzymes du réticulum endoplasmique. Compte-tenu des similitudes déjà observées entre la membrane externe et le réticulum endoplasmique⁸,

nous avons comparé l'évolution de l'activité de la NADH-cytochrome *c* réductase de la membrane externe à celle du réticulum endoplasmique.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Des rats de race Wistar sont croisés au laboratoire et soumis à un régime équilibré jusqu'à la fin des expériences.

Les foetus, au nombre d'une centaine environ, sont prélevés par césarienne à partir de 25 rates au 18ième jour de gestation. Les jeunes rats sont tués à 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, ou 32 jours. Suivant leur âge, leur nombre varie de 20 à 50, de façon à obtenir 35 g de foie environ.

Les mitochondries et les trois fractions mitochondrielles: matrice, membrane externe, membrane interne, sont préparées suivant la méthode précédemment décrite⁹. Le réticulum endoplasmique est obtenu par centrifugation à 100000 × *g* pendant 60 min (40000 tours/min, centrifugeuse Spinco, modèle L, rotor No. 40) du surnageant des mitochondries après élimination totale de celles-ci. Le culot obtenu est lavé par de l'eau bi-distillée, puis centrifugé à 100000 × *g* pendant 60 min.

Les protéines sont déterminées, soit par la méthode du biuret¹⁰, soit par la technique de LOWRY *et al.*¹¹.

Les mesures de consommation d'oxygène à l'appareil de Warburg en présence de β -hydroxybutyrate, ou de succinate, et les déterminations spectrophotométriques des activités cytochrome-oxydasiques (ferricytochrome *c* oxydoréductase, EC 1.9.3.1) et NADH-cytochrome *c* réductasique sont effectuées d'après les méthodes précédemment décrites⁹.

Les activités de l'aconitase (citrate-hydrolyase, EC 4.2.1.3) et de la fumarase (EC 4.2.1.2) sont mesurées par augmentation de l'absorption à 240 nm dans un milieu de volume total 3 ml, contenant, dans le cas de l'aconitase: citrate de sodium 0.03 M, tampon phosphate 0.05 M (pH 7.4), protéines 0.5–0.8 mg. Pour la mesure de l'activité de la fumarase, le citrate de sodium est remplacé par du malate de sodium 0.05 M et la quantité de protéines est de 0.2–0.3 mg (bibl. 12).

L'activité de la malate-déshydrogénase (*L*-malate:NAD oxydoréductase, EC 1.1.1.37) est mesurée par diminution de l'absorption à 340 m μ dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: oxalo-acétate de sodium 0.25 mM, NADH 0.07 mM, tampon phosphate 50 mM (pH 7.4), protéines 0.03–0.05 mg (bibl. 13).

L'activité de l'isocitrate-déshydrogénase (*D*-isocitrate:NADP oxydoréductase, EC 1.1.1.42) est mesurée par augmentation de l'absorption à 340 m μ dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: DL-isocitrate de sodium 0.006 M, NADP 0.00135 M, MnSO₄ 0.02 M, tampon Tris 0.25 M (pH 7.6), protéines 0.3–0.8 mg (bibl. 14).

L'activité de la glutamate-déshydrogénase (*L*-glutamate:NAD oxydoréductase, EC 1.4.1.2) est mesurée par augmentation de l'absorption à 340 m μ dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: glutamate de sodium 0.01 M, NAD 0.01 M, tampon phosphate 0.04 M (pH 7.6), protéines 1.0 mg (bibl. 15).

L'activité de la β -hydroxybutyrate-déshydrogénase (*D*-3-hydroxybutyrate:NAD oxydoréductase, EC 1.1.1.30) est mesurée par diminution de l'absorption à 340 nm dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: acéto-acétate de sodium 0.07 M, NADH 0.07 mM, KCN 1 mM, tampon phosphate 33 mM (pH 7.0), protéines 0.2–0.3 mg. L'acéto-acétate de sodium est préparé extemporanément par action de NaOH (1 M) sur de l'acéto-acétate d'éthyle¹⁶.

L'activité de la succinate-déshydrogénase (succinate:phénazinemétosulfate oxydoréductase, EC 1.3.99.1) est mesurée par diminution de l'absorption à 600 m μ dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: phénazinemétosulfate 2 mM, dichlorophénolindophénol 0.05 mM, KCN 1 mM, succinate de sodium 20 mM, tampon phosphate 20 mM (pH 7.6), protéines 0.1–0.2 mg (bibl. 17). Le matériel enzymatique est incubé dans la cuve en présence du tampon phosphate et du KCN pendant 15 min à 20° de façon à obtenir des activités maximales. Le départ de la réaction est donné par addition du succinate. Une cuve témoin contient le même milieu moins le succinate.

L'activité de la NADH-déshydrogénase (NADH:FAD oxydoréductase, EC 1.99) est mesurée par diminution de l'absorption à 600 nm dans un milieu de volume total 3 ml, contenant: NADH 2.5 mM, FAD 0.076 mM, dichlorophénolindophénol 0.05 mM, KCN 1 mM, tampon phosphate 40 mM (pH 7.4), protéines 0.05–0.10 mg. Une incubation préalable de l'enzyme en présence du tampon phosphate n'est pas nécessaire.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Matrice

Les résultats sont groupés dans le Tableau I. Ils donnent les moyennes des valeurs absolues des activités de la malate-déshydrogénase, de la glutamate-déshydrogénase, de l'aconitase, de la fumarase et de l'isocitrate-déshydrogénase mesurées sur la matrice des mitochondries de foie de jeunes rats depuis le stade prénatal jusqu'au sevrage. La Fig. 1 représente les pourcentages de ces activités par rapport à celles correspondantes chez l'adulte.

On constate que, hormis l'isocitrate-déshydrogénase, les activités de ces enzymes restent constantes et identiques à celles de l'adulte. L'isocitrate-déshydrogénase présente, au contraire, une activité beaucoup plus élevée chez le foetus; celle-ci décroît ensuite, tout en se maintenant encore élevée chez le jeune rat de 32 jours.

L'augmentation d'activité d'un seul des enzymes du cycle tricarboxylique (isocitrate-déshydrogénase) paraît, *a priori*, surprenante. Nous avons tenté d'en dégager la signification.

TABLEAU I

ACTIVITÉS DE QUELQUES ENZYMES DE LA MATRICE DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE JEUNES RATS

Age des animaux (jours)	Malate- déshydrogénase (nmoles NADH oxydé/min par mg de protéines)	Glutamate- déshydrogénase (nmoles NAD réduit/min par mg de protéines)	Aconitase (nmoles cis- aconitate apparu/min par mg de protéines)	Fumarase (nmoles fumarate apparu/min par mg de protéines)	Isocitrate- déshydrogénase (nmoles NADPH apparu/min par mg de protéines)
Foetus	4060	21.8	37.9	732	347
1	5070	24.2	25.8	767	217
5	5190	20.1	24.2	756	210
6	4100	23.4	21.4	676	253
7	4300	17.4	27.3	669	153
8	4950	—	37.6	756	282
15	3980	20.1	26.9	810	207
32	4160	20.2	29.4	739	120
Adulte	4022	22.0	33.0	710	67

Des travaux récents^{18,19} ayant montré par ailleurs, la présence de cet enzyme dans les peroxysomes, nous nous sommes demandés si l'augmentation de cette activité enzymatique pouvait être imputable à l'enzyme des peroxysomes contaminant les mitochondries foetales. Nous avons tenté de le vérifier. Pour cela, il convient de rappeler que la fraction appelée "matrice" est constituée, comme il a été indiqué précédemment⁹, par le mélange d'une première fraction matricielle (S_2) ayant diffusé à

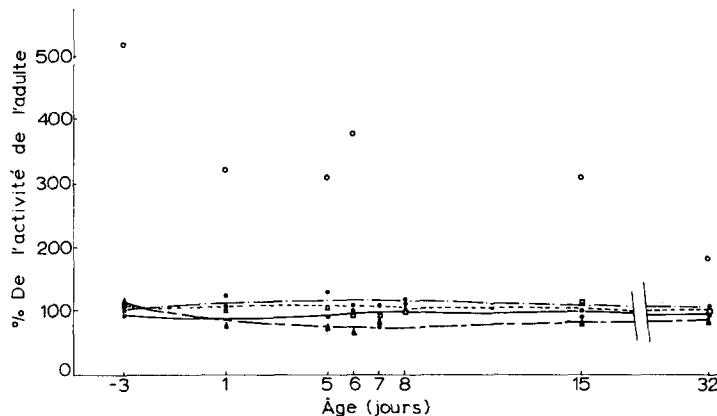


Fig. 1. Activités de quelques enzymes de la matrice des mitochondries de foie de jeunes rats.
 ●—●, malate-déshydrogénase; ○—○, glutamate-déshydrogénase; ○, isocitrate-déshydrogénase; △---△, aconitase; □---□, fumarase.

travers la membrane interne des mitochondries à une membrane obtenues par action de la digitonine et d'une deuxième fraction matricielle (S_4) provenant de l'action des ultra-sons sur les mitochondries à une membrane. Par ailleurs, certains auteurs ont montré que la digitonine a pour effet de rompre la membrane des peroxysomes libérant ainsi leur contenu matriciel¹⁹. Si donc, les mitochondries de départ sont contaminées par des peroxysomes, on devrait retrouver l'isocitrate-déshydrogénase de ces derniers associée à la fraction (S_2). Pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse, nous avons été amenés à mesurer comparativement l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase dans les fractions (S_2) et (S_4) chez l'adulte et chez le foetus, pour lequel nous avions constaté le maximum d'augmentation.

Le Tableau II montre clairement que l'augmentation de l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase ne se retrouve que dans la fraction (S_4) d'origine purement mito-

TABLEAU II

ACTIVITÉS COMPARÉES DE L'ISOCITRATE-DÉSHYDROGÉNASE DES FRACTIONS S_2 ET S_4 CHEZ L'ADULTE ET CHEZ LE FOETUS

Animaux	Activité mesurée (nmoles NADPH apparu/min par mg de protéines)	
	S_2	S_4
Adulte	102	104
Foetus	116	414

chondriale. On ne peut donc attribuer ce phénomène à une contamination des mitochondries foetales par des peroxysomes. Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, d'expliquer de façon satisfaisante l'augmentation de cette activité enzymatique. Ce résultat peut néanmoins être rapproché du fait que cet enzyme présente également une activité très élevée dans le placenta²⁰.

Membrane externe

Le Tableau III donne les mesures des activités comparées de la NADH-cytochrome *c* réductase de la membrane externe et du réticulum endoplasmique. Sur la Fig. 2 sont portées les valeurs des pourcentages de ces activités par rapport à celles correspondantes chez l'adulte.

On constate que l'activité de la NADH-cytochrome *c* réductase de la membrane externe croît progressivement et parallèlement à celle du réticulum endoplasmique. Les valeurs mesurées par nous sur le réticulum endoplasmique sont en accord avec

TABLEAU III

ACTIVITÉS COMPARÉES DE LA NADH-CYTOCHROME *c* RÉDUCTASE DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE LA MEMBRANE EXTERNE DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE JEUNE RAT

Age des animaux (jours)	Activité mesurée (nmoles cytochrome <i>c</i> réduit/min par mg de protéines)	
	Réticulum endoplasmique	Membrane externe
Foetus	72	167
1	33	175
5	80	274
6	100	293
7	316	375
8	350	418
13	546	548
15	897	976
32	1630	1705
Adulte	1670	1590

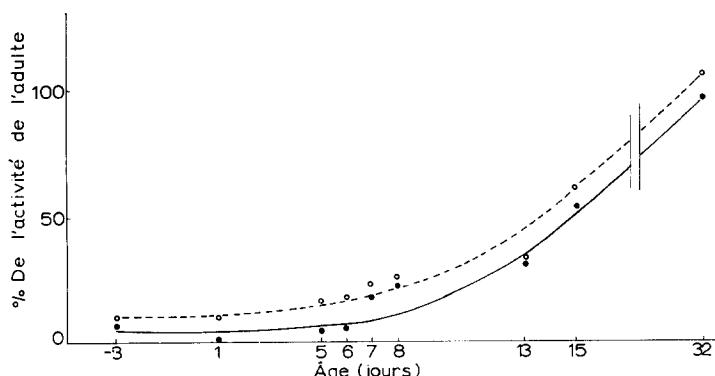


Fig. 2. Activités NADH-cytochrome *c* réductasiques comparées du réticulum endoplasmique et de la membrane externe. — — —, membrane externe; — — —, réticulum endoplasmique.

celles obtenues précédemment par DALLNER *et al.*⁷. La similitude d'évolution de l'activité de la NADH-cytochrome *c* réductase sur ces deux types de membranes renforce l'idée de la possibilité d'une origine commune de la membrane externe des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

Membrane interne

Les activités globales des chaînes respiratoires sont très inférieures à celles de l'adulte chez le foetus et chez le jeune rat avant le 5^{ème} jour. Leurs valeurs croissent ensuite entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour pour atteindre les valeurs correspondantes de l'adulte (Tableau IV, Fig. 3). Des résultats analogues ont été trouvés par d'autres auteurs sur des mitochondries de différents tissus au cours du développement du rat²¹⁻²⁴.

TABLEAU IV

ACTIVITÉS DES CHAÎNES RESPIRATOIRES DE LA MEMBRANE INTERNE DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE JEUNES RATS

Age des animaux (jours)	Activité mesurée (O_2 consommé: natomes/min par mg de protéines)	
	β -Hydroxy- butyrate-oxydase	Succinate- oxydase
Foetus	15.7	15.0
2	22.5	17.4
4	22.5	24.8
5	34.6	34.0
6	37.4	35.9
7	45.4	54.0
8	58.0	58.0
10	57.5	76.9
15	59.9	64.5
Adulte	64.6	73.1

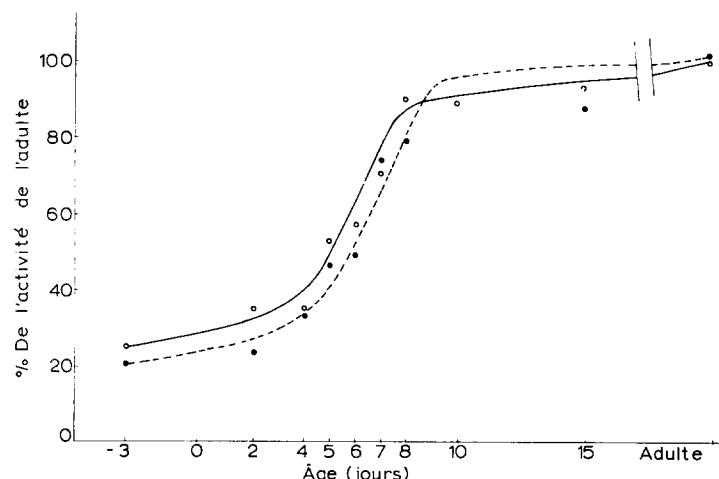


Fig. 3. Activités des chaînes respiratoires de la membrane interne des mitochondries de foie de jeunes rats. ○—○, β -hydroxybutyrate-oxydase; ●---●, succinate-oxydase.

Pour tenter de déterminer le facteur limitant l'activité globale des chaînes respiratoires avant le 5ième jour après la naissance, nous avons mesuré comparativement les activités de certains de leurs enzymes constitutifs, à savoir, d'une part, celle de la cytochrome-oxydase, d'autre part, celles des trois premières déshydrogénases: β -hydroxybutyrate-déshydrogénase, succinate-déshydrogénase, NADH-déshydrogénase.

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité de la cytochrome-oxydase a, dès le stade foetal, atteint des valeurs sensiblement égales à celles de l'adulte (Tableau V, Fig. 4).

TABLEAU V

ACTIVITÉ DE LA CYTOCHROME-OXYDASE DE LA MEMBRANE INTERNE DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE JEUNES RATS

Age des animaux (jours)	Activité mesurée (nmoles cytochrome c oxydé/min par mg de protéines)
Foetus	378
1	448
2	875
4	376
5	620
6	462
7	416
8	428
10	558
15	621
Adulte	524

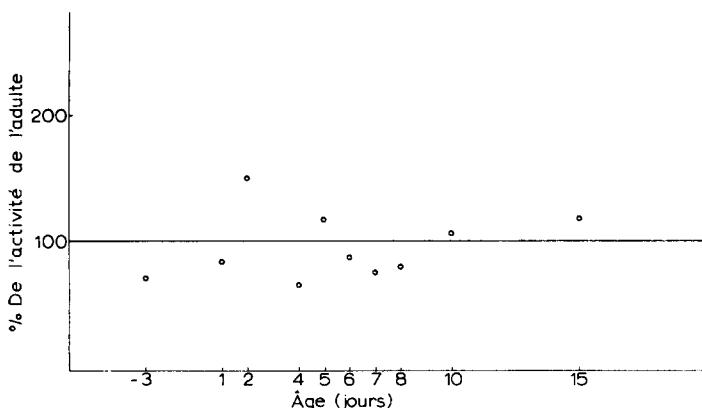


Fig. 4. Activités de la cytochrome-oxydase de la membrane interne des mitochondries de foie de jeunes rats.

Les activités de la succinate-déshydrogénase et de la NADH-déshydrogénase sont plus faibles chez le jeune rat pendant tout son développement (Tableau VI, Fig. 5). On serait donc amenés à supposer, *a priori*, que ce sont elles qui limitent les activités globales des chaînes respiratoires. Toutefois, cette hypothèse est à rejeter

TABLEAU VI

ACTIVITÉS DES DÉSHYDROGÉNASES DE LA MEMBRANE INTERNE DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE JEUNES RATS

Age des animaux (jours)	<i>nmoles de substrat oxydé/min par mg de protéines</i>		
	β -Hydroxy- butyrate- deshydrogénase	NADH- deshydrogénase	Succinate- deshydrogénase
2	56	192	131
4	171	193	218
5	268	215	164
6	322	185	246
7	442	—	230
8	333	140	144
10	464	266	190
15	384	234	191
32	310	361	262
Adulte	164	572	243

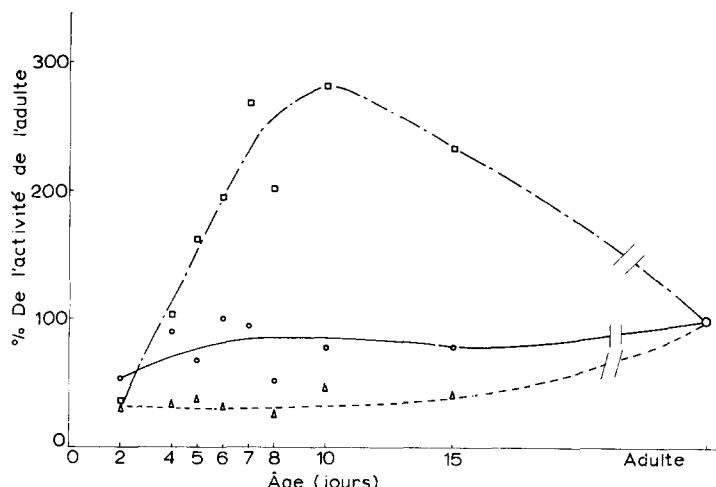


Fig. 5. Activités des déshydrogénases de la membrane interne des mitochondries de jeunes rats. \square --- \square , β -hydroxybutyrate-déshydrogénase; \circ --- \circ , succinate-déshydrogénase; \triangle --- \triangle , NADH-déshydrogénase.

puisque les activités mesurées sont, même dans ces conditions, toujours supérieures aux activités globales des chaînes correspondantes.

Contrairement à ce que l'on observe pour les deux autres déshydrogénases, l'activité de la β -hydroxybutyrate-déshydrogénase croît rapidement après la naissance pour atteindre dès le 4^{ème} jour une valeur égale à celle de l'adulte qu'elle dépasse ensuite pour parvenir au 8^{ème} jour à une valeur de l'ordre de trois fois supérieure (Tableau VI, Fig. 5). Il est possible que l'augmentation de cette activité enzymatique soit liée à une synthèse accrue des acides gras.

On peut donc conclure que ni les déshydrogénases, ni la cytochrome-oxydase, ne sont les facteurs limitants des activités globales des chaînes respiratoires jusqu'au 51ème jour. L'élément, ou les éléments, responsables restent à déterminer.

Rapprochant nos résultats de ceux obtenus sur les mitochondries de levures^{1, 25-28}, on est amenés à supposer avec ces auteurs que les chaînes d'oxydation phosphorylante pourraient se constituer à partir de certains de leurs éléments, auxquels d'autres s'ajouteraient ensuite au cours du développement pour la rendre fonctionnelle.

RÉSUMÉ

Nous avons suivi l'activité de quelques enzymes constitutifs des trois fractions isolées de la mitochondrie: membrane externe, membrane interne et matrice, dans l'hépatocyte de rat pendant une période allant du stade foetal au 151ème jour après la naissance.

Dans la matrice, les activités des enzymes du cycle tricarboxylique ont déjà atteint leur valeur normale avant la naissance.

Dans la membrane externe, l'activité de la NADH-cytochrome *c* réductase augmente régulièrement et de la même manière que celle de la NADH-cytochrome *c* réductase du réticulum endoplasmique.

Dans la membrane interne, la consommation d'oxygène est très faible avant la naissance, puis augmente rapidement entre le 51ème et 81ème jour après la naissance, pour atteindre alors sa valeur normale.

Les facteurs limitant l'activité de la chaîne respiratoire ne sont, ni la cytochrome-oxydase, ni les premières déshydrogénases.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. B. ROODYN ET D. WILKIE, *The Biogenesis of Mitochondria*, Methuen, London, 1968.
- 2 G. D. CLARK-WALKER ET A. W. LINNANE, *J. Cell Biol.*, 34 (1967) 1.
- 3 D. S. BEATTIE, R. E. BASFORD ET S. B. KORITZ, *Biochemistry*, 6 (1967) 3099.
- 4 B. KADENBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 134 (1967) 430.
- 5 W. NEUPERT, D. BRIDCZA ET T. BUCHER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 (1967) 488.
- 6 S. YANG ET R. S. CRIDDLE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 429.
- 7 G. DALLNER, P. SIKIEVITZ ET G. E. PALADE, *J. Cell Biol.*, 30 (1967) 97.
- 8 D. F. PARSONS, G. WILLIAMS, W. THOMPSON, D. WILSON ET B. CHANCE, dans E. C. SLATER, J. M. TAGER, E. QUAGLIARIELLO ET S. PAPA, *Proc. Round Table Discussion Mitochondrial Structure and Compartmentation*, Bari, Adriatica Editrice, Bari, 1967, p. 29.
- 9 M. LEVY, R. TOURY ET J. ANDRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 599.
- 10 H. W. ROBINSON ET C. G. HODGEN, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 707.
- 11 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 12 E. RACKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 211.
- 13 S. OCHOA, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955, tome 1, p. 735.
- 14 C. B. ANFINSEN, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955, tome 1, p. 695.
- 15 R. H. KIELLEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 447.
- 16 J. MELLANBY ET D. H. WILLIAMSON, dans H.-U. BERGMEYER, *Methods in Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963, p. 454.
- 17 A. I. CAPLAN ET J. W. GREENAWALT, *J. Cell Biol.*, 36 (1968) 15.
- 18 F. LEIGHTON, B. POOLE, P. B. LAZAROW ET C. DE DUVE, *J. Cell Biol.*, 41 (1969) 521.
- 19 P. BAUDHUIN, dans A. LIMA DE FARIA, *Handbook of Molecular Cytology*, 1969, p. 1180.
- 20 A. C. VILLEE, *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem.*, Tokyo, Pergamon Press, London, 1958, p. 317.
- 21 K. H. KIESLING ET G. C. LUNDQUIST, *Exptl. Cell Res.*, 26 (1962) 198.
- 22 K. H. KIESLING, *Exptl. Cell Res.*, 28 (1962) 145.

- 23 H. A. MINTZ, D. H. YAWN, B. SAFER, E. BRESNICK, A. LIEBELT, Z. R. BLAILOCK, E. R. RABIN ET A. SCHWARTZ, *J. Cell Biol.*, 34 (1967) 513.
- 24 J. M. MILSTEIN, J. G. WHITE ET K. F. SWAINAN, *J. Neurochem.*, 15 (1968) 411.
- 25 P. P. SLONIMSKY, *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem. Brussels, 1956*, Academic Press, New York, 1956, p. 242.
- 26 W. BARTLEY ET E. R. TUSTANOFF, *Biochem. J.*, 99 (1966) 599.
- 27 A. W. LINNANE, E. VITOLS ET P. G. NOWLAND, *J. Cell Biol.*, 13 (1962) 345.
- 28 G. SCHATZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 96 (1965) 342.

Biochim. Biophys. Acta, 216 (1970) 318-327