

Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez *Euglena gracilis* (Z)

R. CALVAYRAC*

Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette,
France

Reçu le 4 mai 1970

Relationship between Substrats, Respiration and Structure of Mitochondria in *Euglena gracilis* (Z)

Summary. *Euglena gracilis*, strain Z, was grown in synchronous culture. Carbon source used was either DL-lactic acid (L) or a mixture of L-glutamic and DL-malic acids (GM). Synchronisation was obtained by transferring the cells in the exponential growth phase, at regular intervals—each 3 days—to a fresh medium.

Respiration (measured during a whole cell cycle, 12 h) was $20 \pm 6 \mu\text{l}/\text{H}/10^6$ cells on (GM) and $46 \pm 7 \mu\text{l}/\text{H}/10^6$ cells on (L) medium. At the same time as the increased rate of oxygen uptake on lactate medium, we observed the appearance of a “giant” chondriome in the cells. On glutamate—malate containing medium the size of mitochondria was “normal”.

Euglena gracilis (Z) est capable d'utiliser comme source d'énergie et de carbone pour sa croissance à l'obscurité, différents substrats carbonés qui sont en général des intermédiaires du cycle de Krebs (Hutner et Provasoli, 1951, 1955; Danforth, 1953). L'acétate et l'éthanol sont aussi des substrats favorables (Hutner et Provasoli, 1951, 1955; Cramer et Myers, 1952; Danforth et Wilson, 1957; Wilson et Danforth, 1958), ainsi que le glucose (Cramer et Myers, 1952; Pringsheim, 1955; Hutner, Bach et Ross, 1956; Belsky, 1957; Danforth, 1962; Hurlbert et Rittenberg, 1962).

Nous démontrons que le lactate peut constituer pour l'euglène une excellente source de carbone. On sait que chez l'euglène les conditions de milieu (lumière, obscurité, sources de carbone) peuvent induire des modifications importantes du chondriome (Lefort, 1964), et du taux de la respiration (Sharpless et Butow, 1970a). Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à définir les substrats carbonés capables de jouer un rôle d'inducteurs pour ces modifications affectant à la fois le taux respiratoire et le chondriome.

* Les micrographies électroniques ont été réalisées par Mr. C. Mattei, Technicien CNRS.

Matériel et méthodes

Euglena gracilis lignée Z (Eg) (Algothèque de Cambridge no. 1224—5 d) est cultivée à l'obscurité à 27° C sur milieu minéral auquel a été ajouté comme source de carbone soit de l'acide L glutamique (14 mM) et de l'acide DL malique (15 mM) (GM) (Greenblatt et Schiff, 1959) soit de l'acide DL lactique, 33 mM (L) (Calvayrac et Douce, 1970) (Merck).

Le pH du milieu de culture joue un rôle important dans l'assimilation des substances carbonées par l'euglène (Danforth, 1953; Wilson *et al.*, 1959); afin de limiter le nombre des paramètres contrôlant la respiration, les milieux de culture employés dans cette étude sont tous à pH 3,5 et ne diffèrent donc que par la nature de la source carbonée.

Les euglènes sont remises en culture sur milieu neuf tous les trois jours, le nombre d'euglènes dans la culture est au départ d'environ 20 par μ l. Dans ces conditions, après plusieurs repiquages, en suivant la croissance par comptage à l'aide de la cellule de Malassez, nous observons que les Euglènes se divisent synchroniquement pendant au moins 6 générations.

La respiration est mesurée par la méthode polarographique basée sur le principe de l'électrode de Clark *et al.* (1953) (électrode à membrane), et exprimée en μ l d'oxygène consommé par heure pour 10^6 euglènes (μ l $O_2/H/10^6$ Eg).

Pour l'observation en microscopie électronique, les euglènes sont prélevées en phase exponentielle de croissance lorsque le milieu contient 400 à 600 euglènes par μ l, et dans les 4 heures qui suivent leur division. Une préfixation du matériel est réalisée à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde à 2% dans le milieu de culture pendant 15 min, suivie d'une post fixation par une solution à 2% de tétroxyde d'osmium dans le tampon Palade pendant 15 min. L'inclusion est faite dans l'epon. Les coupes sont réalisées avec un ultramicrotome LKB et l'observation avec un microscope électronique Hitachi "HS 8".

Résultats

Soumises à nos conditions de culture définies précédemment, les euglènes ont un temps de génération voisin de 12 heures (Fig. 1), ce qui nous a permis d'étudier la respiration au cours d'un cycle cellulaire complet (Fig. 2 et 3).

La respiration endogène des euglènes lavées et mises sur milieu minéral est de 20 ± 5 μ l $O_2/H/10^6$ Eg.

D'après la figure (3) nous voyons que sur le milieu (GM) la respiration est à peu près constante durant un cycle cellulaire, elle est voisine de 20 ± 6 μ l $O_2/H/10^6$ Eg, ce qui est du même ordre de grandeur que la respiration endogène.

Sur le milieu (L) le taux respiratoire est plus élevé, puisqu'il atteint 46 ± 7 μ l $O_2/H/10^6$ Eg, et représente plus du double de la respiration endogène. En outre, juste avant la division cellulaire, le taux respiratoire semble s'élever légèrement.

L'observation des micrographies montre que les euglènes cultivées sur milieu (GM) possèdent des mitochondries dont la taille n'excède pas un à deux microns (Fig. 4a). Elles sont nombreuses et leur matrice est remplie de crêtes plus ou moins groupées en faisceau (Fig. 4b).

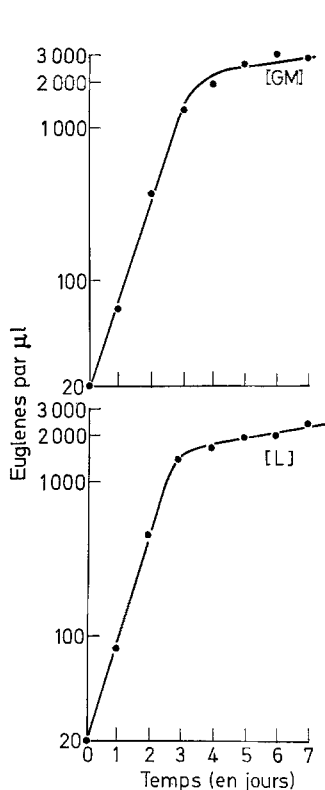


Fig. 1

Fig. 1. Courbe de croissance d'*Euglena gracilis* lignée Z cultivée à l'obscurité (27° C), sur deux milieux contenant l'un (GM) l'acide L glutamique et DL malique, l'autre (L) de l'acide lactique. Temps de génération de 12 h

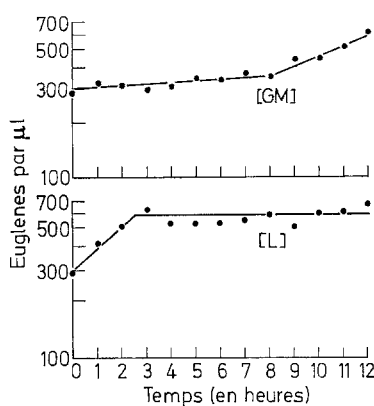


Fig. 2

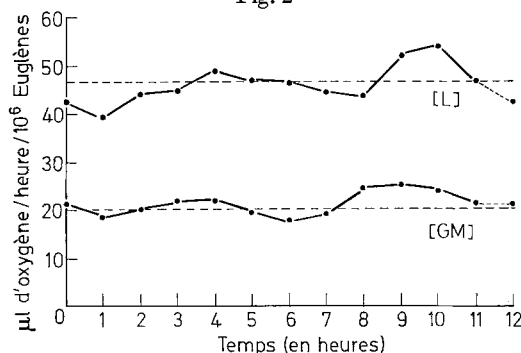


Fig. 3

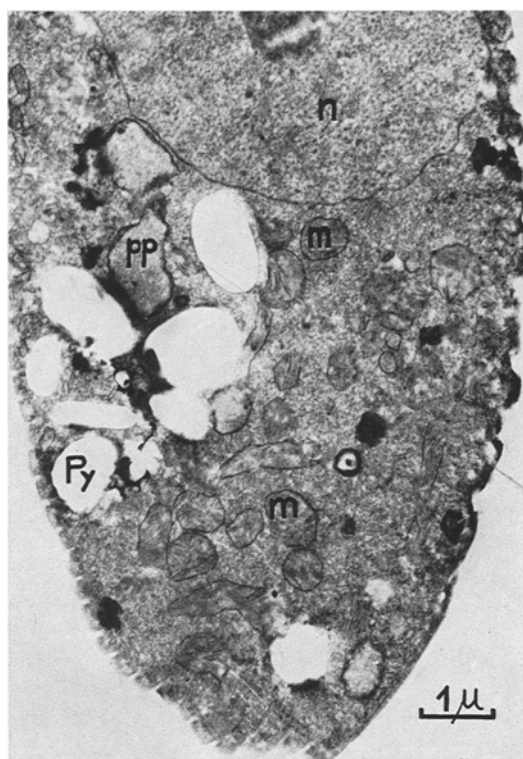
Fig. 2. Courbe de synchronisation des cycles de division d'*Euglena gracilis* lignée Z, (27° C) à l'obscurité, sur 12 heures, cultivée sur les milieux (GM) et (L) et maintenue en phase exponentielle de croissance par des repiquages tous les 3 jours

Fig. 3. Courbe de respiration d'*Euglena gracilis* lignée Z, durant un cycle de division sur milieu (GM) et (L) (27° C à l'obscurité)

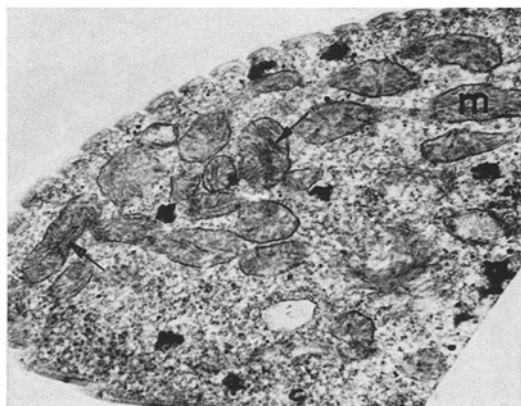
Les mitochondries des euglènes cultivées sur milieu (L) mesurent jusqu'à 10 μ de long et paraissent souvent ramifiées, digitées et anastomosées (Fig. 5a et b).

Discussion

La synchronisation de la division cellulaire des euglènes sur les deux milieux étudiés (L et GM) a permis d'effectuer nos observations cytologiques à un stade physiologique bien déterminé de leur croissance. Nous



a



b

Fig. 4a et b. *Euglène* cultivée sur milieu (GM) à l'obscurité. a coupe transversale; *m* mitochondrie; *n* noyau; *pp* proplaste; *Py* paramylon. b coupe sagittale, les flèches indiquent le groupement en faisceau des crêtes mitochondriales

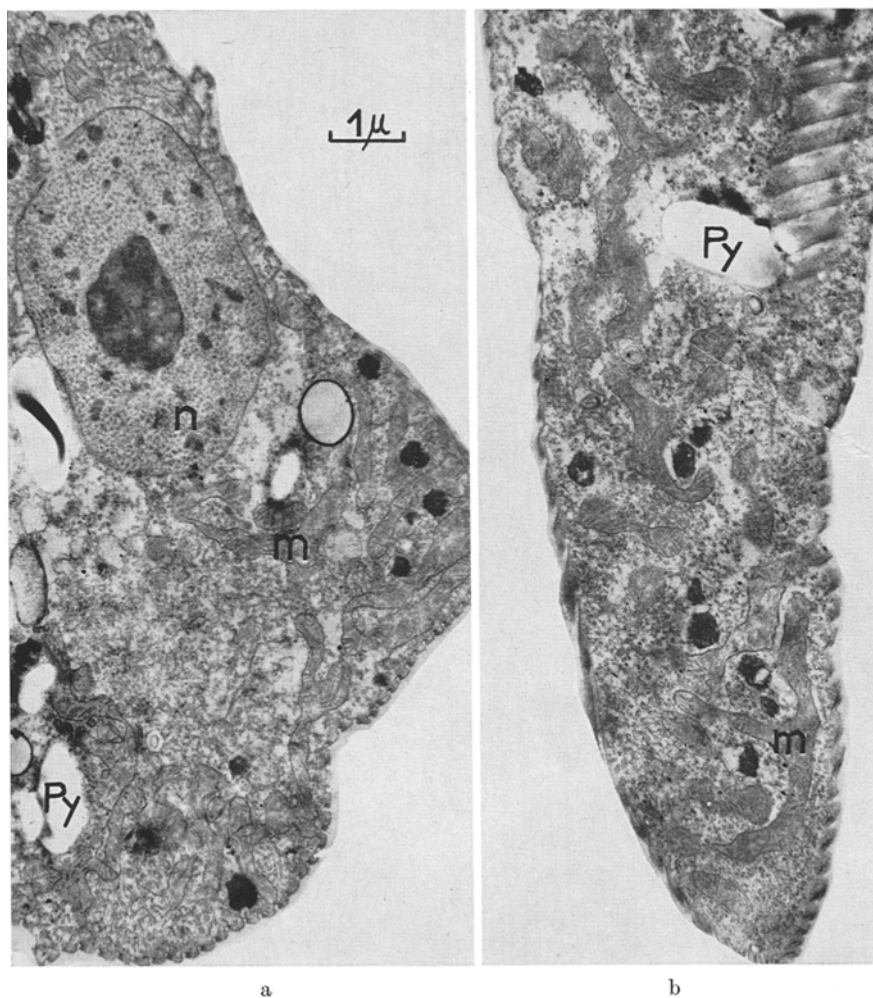


Fig. 5a et b. Euglènes cultivées sur milieu (L) à l'obscurité. a coupe transversale; m mitochondrie; n noyau; Py paramylon. b coupe sagittale

observons (Fig. 3) que la quantité d'oxygène absorbée lors de la respiration des euglènes sur milieu (GM) est d'environ la moitié de celle consommée par les euglènes cultivées sur milieu (L). Ainsi les résultats obtenus avec le glutamate-malate comme source de carbone sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec des milieux supplémentés en glucose. Cultivées sur milieu (GM), les euglènes ont une respiration du même ordre de grandeur que la respiration endogène, soit 20 μ l

$O_2/H/10^6$ Eg (Boehler et Danforth, 1964; Cook et Heinrich, 1965; Heinrich et Cook, 1967) et possèdent alors des mitochondries de type classique (Wolken, 1968; Buetow, 1968). Au contraire les euglènes cultivées sur milieu (L) ont une respiration exaltée, environ le double de la respiration endogène, comme on a déjà pu le montrer pour les milieux supplémentés en éthanol ou en acétate (Buetow, 1961; Heinrich et Cook, 1967). Dans ces conditions de culture, les euglènes possèdent des mitochondries profondément modifiées. Il n'est pas encore possible de savoir si le nombre et la surface mitochondriale augmentent corrélativement ou si l'apparition de mitochondries ramifiées est induite par la coalescence des petites mitochondries préexistantes sans augmentation de la surface membranaire. On peut seulement constater d'une part une corrélation entre l'apparition de ce nouveau chondriome et l'exaltation de la respiration, et d'autre part la réversibilité du phénomène, puisque lors de la remise sur milieu (GM) on retrouve dans l'euglène le profil habituel des petites mitochondries, tel que nous le restituent les Fig. 4a et 4b.

Indépendamment il a été démontré que l'exaltation de la respiration sous l'influence de certains métabolites carbonés comme l'éthanol, l'acétate et le lactate, est liée à l'induction d'une chaîne de transporteur d'électrons insensible à l'antimycine (Sharpless et Butow, 1970a et b).

Les travaux en cours devraient pouvoir permettre de relier entre eux ces trois aspects du même phénomène.

J'exprime ma gratitude au Prof. M. Lefort-Tran, qui a encouragé ce travail et dont les avis m'ont été précieux.

Références

- Belsky, M. M.: The metabolism of glucose and other sugars by the algal flagellate *Euglena gracilis*. Bact. Proc. **123** (1957).
- Boehler, R. A., Danforth, W. F.: Glucose metabolism in non-photosynthetic *Euglena gracilis* var. bacillaris. J. Cell Biol. **23**, 11 A—2 A (1964).
- Buetow, D. E.: Ethanol stimulation of oxidative metabolism in *Euglena gracilis*. Nature (Lond.) **190**, 1196 (1961).
- The biology of *Euglena*, Vol. 1, pp. 157—153. New York: Academic Press 1968.
- Calvayrac, R., Douce, R.: Les polyglycérophospholipides d'*Euglena gracilis*. FEBS Letters (sous presse) (1970).
- Clark, L. C., Jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z.: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J. appl. Physiol. **6**, 189—193 (1953).
- Cook, J. R., Heinrich, B.: Glucose vs. acetate metabolism in *Euglena*. J. Protozool. **12**, 4, 581—584 (1965).
- Cramer, M., Myers, J.: Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. Arch. Mikrobiol. **17**, 384—402 (1952).
- Danforth, W.: Oxidative metabolism of *Euglena*. Arch. Biochem. **46**, 164—173 (1953).

- Danforth, W. F.: Substrate assimilation and heterotrophy. In: R. Lewin, Physiology and Biochemistry of Algae, pp. 99—123. New York: Academic Press, Inc. 1962.
- Wilson, B. W.: Adaptative changes in the acetate metabolism of *Euglena*. J. Protozool. **4**, 52—55 (1957).
- Greenblatt, C. L., Schiff, S. A.: A pheophytin-like pigment in dark-adapted *Euglena gracilis*. J. Protozool. **6**, 23—28 (1959).
- Heinrich, B., Cook, J. R.: Studies on the respiratory physiology of *Euglena gracilis* cultured on acetate or glucose. J. Protozool. **14**, 548—553 (1967).
- Hurlbert, R. E., Rittenberg, S. C.: Glucose metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; growth and enzymatic studies. J. Protozool. **9**, 170—182 (1962).
- Hutner, S. H., Bach, M. K., Ross, G. I. M.: A sugar containing medium for vitamin B 12 assay. With *Euglena*, application to body fluids. J. Protozool. **3**, 101—112 (1956).
- Provasoli, L.: The phytoflagellates. In: A. Lwoff. The Biochemistry and physiology of Protozoa, vol. 1, pp. 27—128. New York: Academic Press, Inc. 1951.
- Comparative biochemistry of flagellates. In: S. H. Hutner and A. Lwoff. The Biochemistry and Physiology of Protozoa, vol. 2, pp. 17—43. New York: Academic Press, Inc. 1955.
- Lefort, M.: Modifications du chondriome dans les cellules étioilées de l'*Euglena gracilis* (Klebs). C. R. Acad. Sci. (Paris) **258**, 4318—4321 (1964).
- Pringsheim, E. G.: Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen. II. *Euglena gracilis* var. *saccharophila* n. var. und eine vereinfachte Nährlösung zur Vitamin B₁₂-Bestimmung. Arch. Mikrobiol. **21**, 414—419 (1955).
- Sharpless, T. K., Butow, R. A.: Phosphorylation sites, cytochrome complement and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. J. biol. Chem. **245**, 50 (1970 a).
- — An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. J. biol. Chem. **245**, 58 (1970 b).
- Wilson, B. W., Buetow, D. E., Jahn, T. L., Levedahl, B. H.: A differential effect of pH on cell growth and respiration. Exp. Cell Res. **18**, 454—455 (1959).
- Danforth, W. F.: The extent of acetate and ethanol oxidation by *Euglena gracilis*. J. gen. Microbiol. **18**, 535—542 (1958).
- Wolken, J. J.: Cellular organelles and lipids. J. Amer. Oil Chem. Soc. **45**, 241—246 (1968).

Dr. R. Calvayrac
Laboratoire de Cytophysiologie
de la Photosynthese
C.N.R.S.
F-91-Gif-sur-Yvette, France