

Biosynthese de Lipides dans les Mitochondries de la Feuille d'Olivier

L. M. Daza et J. P. Donaire

Departamento de Bioquímica Vegetal
Estación Experimental del Zaidín
(C.S.I.C.)
Granada (Espagne)

(Reçu le 3 d'Août de 1981)

L. M. DAZA and J. P. DONAIRE. *Lipid Biosynthesis in Mitochondria from Leaves of Olive Tree*. Rev. esp. Fisiol., 38, 103-108. 1982.

Phospholipids, neutral lipids and, to a lesser extent, glycolipids are the principal lipid components of mitochondria of young olive tree leaves. These lipids are rich in palmitic and oleic acid content.

The *in vivo* incorporation of 1-¹⁴C-acetate into the mitochondrial lipids takes place especially in phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. The saturated, and especially monounsaturated, acids of these lipids constitute the most actively synthesized fatty acids.

In vitro, neutral lipids (mono- and diacylglycerol) and phospholipids (lysophospholipids, phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine) incorporate a major percentage of radioactivity and in them the saturated and monounsaturated fatty acids are most actively synthesized.

Les mitochondries de tissus photosynthétiques ont été l'objet de études peu nombreuses: les difficultés de méthodologie que suppose l'isolement de ces organites dans ce type de tissus en sont la principale cause. Cependant, dans la biochimie des lipides végétaux, les travaux de MAZLIAK *et al.* (17) sur les mitochondries isolées à partir de différentes espèces végétales sont devenus classiques par la vaste information fournie sur la capacité biosynthétique et les facteurs la limitant. Ces auteurs ont mis en évidence une biosynthèse d'acides gras bien définie qui serait rigoureusement dépendante de

l'état morphologique et de la fonction respiratoire.

Récemment, à propos d'étude de graines en germination, certains auteurs ont suggéré la localisation exclusive de la biosynthèse des acides gras dans les plastes, lesquels agiraient comme source de radicaux acyles dans la synthèse des lipides de structure mitochondriaux (20, 21). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de MAZLIAK *et al.* (17).

Dans ce travail nous avons recherché la capacité de biosynthèse des lipides par les mitochondries de jeunes feuilles de plantules d'Olivier, en suivant l'incorpo-

ration de différents précurseurs radioactifs.

Matériel et méthodes

Matériel Végétal. On a utilisé des jeunes feuilles (2-3 mois) de plantules d'Olivier (*Olea europaea* L. cv. Martefio) en phase de croissance végétative, maintenues en serre à 15-22° C de température et soumises à une photopériode de 16 heures/jour sous un éclairage de 8.000 lux.

Préparation des mitochondries. Les mitochondries des tissus photosynthétiques forment un groupe de particules qui ne sont pas nettement séparées des chloroplastes, peroxyosomes où des microsomes par des procédés classiques de la centrifugation différentielle. L'obtention de préparations pures, dépourvues de chloroplastes, peroxyosomes où de membranes microsomaux, nécessite le passage des culots bruts sur gradients de densité.

Les mitochondries de feuilles d'Olivier sont préparées par centrifugation différentielle puis purifiées sur un gradient de densité selon les techniques précédemment décrites en détail par DAZA *et al.* (6). Le progrès de la purification est suivi en notant l'accroissement de l'activité NADH-cytochrome c réductase sensible à l'antimycine, ramenées au mg de protéines. L'absence de contamination des préparations obtenues par d'autres organites cellulaires est vérifiée en étudiant l'activité d'autres enzymes marqueurs: la NADH-cytochrome c réductase insensible à l'antimycine pour les microsomes, la uricase et la catalase pour les peroxyosomes et les chloroplastes par leur contenu en chlorophylle. Le maximum d'activité spécifique de la NADH-cytochrome c réductase sensible à l'antimycine marque la position des mitochondries dans les gradients.

Au point de vue physiologique les activités respiratoires et l'efficacité des phosphorylations oxydatives se déroulant dans

les mitochondries de feuilles d'Olivier ont été mesurées par la méthode ampérométrique de CHANCE et WILLIAMS (5). Ces résultats indiquent que les mitochondries purifiées se montrent capable d'oxyder l'acide succinique et que les phosphorylations d'ADP en ATP y sont effectivement couplées aux oxydations respiratoires. Par ailleurs, un examen en microscopie électronique montre que les culots contiennent en majeure part des mitochondries, ayant conservé en général leur intégrité morphologique. Il faut remarquer, que les culots que nous avons obtenus contiennent des chloroplastes et des vésicules membranaires de taille diverse en nombre assez faible (6).

Biosynthèse des lipides. Pour l'étude *in vivo*, 8,0 nmoles d'acetate-1-¹⁴C (activité spécifique 60 mCi/mmol) en solution aqueuse sont déposées sur plusieurs feuilles de petites branches de 30-40 cm et on introduit les branches dans un vase avec de l'eau et le tout maintenu à 22° C sous une illumination constante de 8.000 lux. Après différents temps d'incubation, on isole les mitochondries et on détermine la radioactivité incorporée dans les lipides et les acides gras.

Lors de l'étude *in vitro* le milieu d'incubation des mitochondries était constitué par: succinate de sodium (2,5 mM), ATP (1 mM), NADPH (1 mM), CoA (1 mM), tampon Tris-CHI (50 mM), pH 7,5 et 1-2 mg de protéines mitochondries dans un volume final de 1,5 ml. On agite constamment pendant le temps de l'expérience, après avoir ajouté au mélange 4,3 nmoles d'acetate-1-¹⁴C où malonyl-CoA-2-¹⁴C. Les protéines mitochondriales sont dosées par la méthode de LOWRY *et al.* (12).

Analyse de lipides. Les lipides totaux des mitochondries sont obtenus selon BLIGH et DYER (4), les différents types de lipides selon GRENIER *et al.* (8), et les différents molécules de phospholipides et

lipides neutres par les méthodes de LE-PAGE (11) et MANGOLD (14) respectivement. La détermination du contenu en acides gras a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse selon LECHE-VALLIER (10) et le ^{14}C incorporé dans les différents acides gras a été déterminé par comptage en compteur à scintillation liquide (Packard Tri-Carb), après séparation par chromatographie sur couches minces selon la méthode de MORRIS *et al.* (18).

Resultats et discussion

LIPIDES DES MITOCHONDRIES. Les mitochondries de la feuille de l'Olivier se caractérisent par leur contenu élevé en phospholipides et en lipides neutres et, en moindre proportion, en glycolipides (tableau I).

La présence de glycolipides dans ces fractions subcellulaires a été l'objet de controverse, certains auteurs l'ayant justifiée comme un résultat de contamination plastidiale (2). Cependant, BIALE *et al.* (3) ont mis en évidence leur présence en proportion élevée dans les mitochondries de l'Avocat.

Les lipides mitochondriaux présentent un contenu élevé en acides oléique et palmitique, fait qui caractérise ces organites par comparaison avec d'autres espèces végétales riches en acides polyinsaturés du type linoléique et α -linolénique (1, 15, 16).

BIOSYNTHESE DES LIPIDES. *Etude in vivo.* On a recherché la capacité de biosynthèse des lipides totaux à partir de l'acetate-1- ^{14}C par les mitochondries en suivant l'incorporation spécifique de précurseur radioactif dans les lipides totaux en fonction du temps et, parallèlement, en déterminant sont incorporation relative dans les différentes molécules lipidiques.

Intensité de synthèse des lipides totaux.

Dans le tableau II on montre l'incorporation de l'acetate-1- ^{14}C dans les lipides totaux de mitochondries. La radioactivité des lipides mitochondriaux est faible mais suffisante pour les analyses ultérieures.

L'incorporation se fait essentiellement dans les phospholipides, maintenant constant le pourcentage d'incorporation dans chaque catégorie lipidique (phospholipi-

Tableau II. Incorporation de l'acetate-1- ^{14}C in vivo dans les lipides totaux des mitochondries de feuille d'Olivier.

La radioactivité est exprimés en pmoles de précurseur incorporé dans les mitochondries de 10 feuilles (a) et en pmoles par mg de protéines (b). Resultats moyens de trois analyses.

Acétate-1- ^{14}C Incorporation	Temps d'incubation (h)				
	1	4	8	10	24
a	1,6	6,3	7,1	8,7	8,8
b	70,8	275,4	308,1	376,1	382,5

Tableau I. Acides gras totaux et des différentes catégories lipidiques de mitochondries de la feuille d'Olivier en % d'acides gras et en μg d'acides gras totaux par mg de protéines. Resultats moyens de quatre analyses.

Lipide	C 16:0	C 16:1 cis-9	C 16:1 trans-3	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	Masse totale d'acides gras ($\mu\text{g}/\text{mg}^{-1}$ protéines)
Lipides totaux	37,8	2,8	—	7,9	28,9	3,9	18,7	n.d.
Phospholipides	31,6	3,5	—	4,6	36,8	13,1	10,4	37,0
Glycolipides	34,9	1,2	—	5,0	34,7	6,0	18,2	15,2
Lipides neutres	34,8	—	—	9,5	30,8	11,1	13,8	37,1

—: non détecté; n.d.: non déterminé.

des, glycolipides, lipides neutres) durant toute l'incubation (tableau III). Pour les phospholipides, il faut remarquer la synthèse préférentielle de phosphatidyléthanolamine + phosphatidylglycérol et phosphatidylcholine et, en moindre proportion, d'acide phosphatidique et du phosphatidylinositol (tableau IV).

Tableau III. Incorporation d'acétate-1-¹⁴C in vivo dans les différentes catégories lipidiques des mitochondries de la feuille d'Olivier, en % de la radioactivité totale incorporée. Résultats moyens de trois analyses.

Lipide	Temps d'incubation (h)			
	1	4	8	24
Phospholipides	67,0	63,2	60,7	57,8
Glycolipides	16,0	14,6	16,1	15,6
Lipides neutres	17,0	22,1	23,2	26,6

Tableau IV. Incorporation d'acétate-1-¹⁴C in vivo dans les différents phospholipides de mitochondries de la feuille d'Olivier, en % de la radioactivité incorporée dans les phospholipides totaux.

Résultats moyens de trois analyses.

Lipide	Temps d'incubation (h)	
	4	24
Phosphatidylinositol	—	13,3
Phosphatidylcholine	34,2	30,6
Phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol	51,6	49,4
Acide phosphatidique	14,2	6,8

—: non détecté.

Intensité de la synthèse des acides gras. Afin de définir le renouvellement des acides gras dans les mitochondries on a recherché la capacité de synthèse de ces molécules.

Dans le tableau V, on montre les valeurs relatives de synthèse des différents acides gras mitochondriaux. Remarquons le taux de biosynthèse élevée des acides saturés et monoinsaturés.

Etude in vitro. Les résultats de l'incorporation de l'acétate-1-¹⁴C (0,72 nmoles $\times$ heure⁻¹ $\times$ mg⁻¹ de protéines) et malonylCoA-2-¹⁴C (1,07 nmoles $\times$ heure⁻¹ $\times$ mg⁻¹ de protéines) dans les acides gras des mitochondries isolées de la feuille d'Olivier, mettent en évidence avec les deux précurseurs l'existence d'une capacité de synthèse d'acides gras bien définie: ce qui suggère la présence dans les mitochondries non seulement d'un système de synthèse *de novo* mais aussi de thiokinase et d'acétylCoA carboxylase. A ce sujet, MACEY et STUMPF (13) et MAZLIAK *et al.* (17) avaient déjà observé dans les mitochondries de différents espèces végétales l'existence d'une capacité biosynthétique similaire avec ces deux précurseurs.

Plusieurs auteurs (13, 17) ont montré la nécessité d'ajouter aux milieux d'incubation des mitochondries des cofacteurs divers (NADPH, CoA et, plus spécialement, succinate) afin d'obtenir de bons taux d'incorporation des précurseurs dans les acides gras à longue chaîne et, quoi-

Tableau V. Incorporation de l'acétate-1-¹⁴C in vivo dans les acides gras des mitochondries de la feuille d'Olivier, en % de la radioactivité incorporée. Résultats moyens de trois analyses.

Temps d'incubation (h)	Saturés	Monoinsaturés	DiInsaturés	TriInsaturés	Hydroxyacides
1	22,7	48,5	10,2	7,1	11,7
4	28,6	55,4	7,9	4,8	3,1
8	29,5	55,9	6,5	4,3	3,8
24	25,1	57,5	10,7	6,6	—

—: non détecté.

que l'effet de ces cofacteurs n'ait pas été expérimenté pour la synthèse lipidique dans les mitochondries de la feuille d'Olivier, les milieux d'incubation utilisés en ont systématiquement contenu.

Le tableau VI montre les valeurs en pourcentage d'incorporation de l'acétate- $1-^{14}\text{C}$ dans les acides gras. Il faut remarquer les taux de biosynthèse élevés des acides saturés et monoinsaturés résultats qui concordent avec ceux signalés par MAZLIAK *et al.* (17).

La légère synthèse d'acides diinsaturés suggère aussi l'existence d'une activité désaturante des monoinsaturés. Ce fait est l'objet de controverse et son existence est niée par quelques chercheurs (17). Cependant BEN ABDELKADER *et al.* (21) et DIZENGREMEL *et al.* (7) ont signalé une faible activité désaturasique dans les mitochondries végétales.

Le tableau VII indique les taux d'incorporation dans les catégories lipidiques mitochondriales. Il apparaît un taux élevé d'incorporation dans les lysophospholipides et les lipides neutres (diacylglycérols et monoacylglycérols). Les phospholipides, constituants majeurs de ces organites, se synthétisent en faible proportion (la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol étant les molécules qui se marquent le plus). Ces données contrastent avec les études *in vivo* où l'on

Tableau VII. Biosynthèse *in vitro* de différentes molécules lipidiques par les mitochondries isolées de la feuille d'Olivier, à partir d'acétate- $1-^{14}\text{C}$, en pourcentage d'incorporation après 30 minutes d'incubation.

Résultats moyens de trois analyses.

Lipide	Incorporation %
Lysophospholipides	22,5
Phosphatidylcholine	12,5
Phosphatidylglycérol	15,2
Phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine	7,3
Acide phosphatidique	7,0
Monogalactosyldiacylglycérols	3,0
Digalactosyldiacylglycérols	2,5
Monoacylglycérols et Diacylglycérols	30,1

a obtenu une synthèse préférentielle de phospholipides, ce que suggère l'existence d'une coopération intracellulaire dans la synthèse des différentes molécules phospholipidiques.

Beaucoup de travaux ont montré l'incapacité des mitochondries pour la synthèse des phospholipides de leurs membranes. Récemment, cependant, SPARACE et MOORE (19) ont fourni des données, en travaillant sur des graines, qui suggèrent l'existence dans les membranes externe et interne mitochondriales d'enzymes impliquées dans la synthèse de ces molécules.

De toute façon, une ample recherche à ce sujet met en évidence l'existence d'un échange actif phospholipidique entre microsomes et mitochondries (9, 16).

Remerciements

Les auteurs veulent témoigner leur reconnaissance à Dr. Tremolieres, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, 75005, Paris, France, pour la correction du manuscrit et à Mll. M. Garrido, Estación Experimental del Zaidin, Granada, pour leur aide technique. La «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica», Espagne, a subventionné ces travaux.

Tableau VI. Biosynthèse *in vitro* d'acides gras des lipides totaux à partir d'acétate- $1-^{14}\text{C}$ par de mitochondries isolées de la feuille d'Olivier, en 30 minutes d'incubation et en pourcentage d'incorporation.

Résultats moyens de trois analyses.

Acide	Incorporation %
Hydroxyacides	16,5
Triinsaturés	—
Diinsaturés	6,9
Monoinsaturés	39,4
Saturés	37,1

—: non détecté.

Resumé

Les phospholipides, les lipides neutres et, en moindre proportion, les glycolipides, sont les principaux composants lipidiques des mitochondries de la feuille jeune de l'Olivier. Ces lipides présentent un contenu élevé en acide palmitique et oléique.

L'incorporation *in vivo* de l'acétate-1-¹⁴C dans les lipides des mitochondries se fait essentiellement dans la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol. Les acides saturés et monoinsaturés de ces lipides sont les acides gras qui sont synthétisés le plus activement.

In vitro, les lipides neutres (mono et diacylglycérol et les phospholipides (lysophospholipides, phosphatidylglycérol et phosphatidylcholine) sont les molécules qui incorporent un pourcentage majeurs de la radioactivité et où sont synthétisés le plus activement les acides gras saturés et monoinsaturés.

Resumen

Los fosfolípidos, los lípidos neutros y, en menor proporción, los glucolípidos constituyen los principales componentes lipídicos de las mitocondrias de la hoja joven de olivo. Estos lípidos presentan un contenido elevado en ácidos palmítico y oleico.

La incorporación *in vivo* de acetato-1-C¹⁴ en los lípidos de mitocondrias tiene lugar, esencialmente, en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol. Los ácidos saturados y monoinsaturados de estos lípidos son los ácidos grasos más activamente sintetizados.

In vitro, los lípidos neutros (mono y diacylglicerol) y los fosfolípidos (lisofosfolípidos, fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina) incorporan un porcentaje mayor de radioactividad, siendo en ellos sintetizados, más activamente, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

Références

1. BEN ABDELKADER, A. et MAZLIAK, P.: *CR. Acad. Sci., Paris*, 261, 2942-2945, 1965.
2. BEN ABDELKADER, A. CHERIF, A. DEMANDRE, L. et MAZLIAK, P.: *Eur. J. Biochem.*, 3, 7-10, 1973.
3. BIALE, J. B., YANG, S. F. et BENSON, A. A.: *Fed. Proc.*, 25, 405, 1966.
4. BLIGH, E. C. et DYER, W. B.: *Can. J. Biochem. Biophys.*, 37, 911-917, 1959.
5. CHANCE, B. et WILLIAMS, G. R.: *Nature*, 176, 250-254, 1955.
6. DAZA, L. M., LÓPEZ-GORGE, J. et DONAIRE, J. P.: *Rev. esp. Fisiol.*, 36, 7-12, 1980.
7. DIZENGREMEL, P., KADER, J. C., MAZLIAK, P. et LANCE, C.: *Plant Sc. Letter*, 11, 151-157, 1978.
8. GRENIER, G., TREMOLIERES, A., THERRIEN, M. P. et WILLEMOT, C.: *Physiol. Vég.*, 11, 253-265, 1973.
9. KADER, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 31-44, 1975.
10. LACHEVALLIER, D.: *C.R. Acad. Sci., Paris*, 263, 1849-1852, 1966.
11. LEPAGE, M.: *Lipids*, 2, 244-250, 1967.
12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. Y., FARR, A. L. et RANDAL, R. Y.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
13. MACEY, N. J. K. et STUMPF, P. K.: *Plant Physiol.*, 43, 1637-1647, 1968.
14. MANGOLD, H. K.: *J. Am. Oil. Chemists Soc.*, 41, 762-773, 1964.
15. MAZLIAK, P.: *Phytochem.*, 6, 941-956, 1967.
16. MAZLIAK, P. et BEN ABDELKADER, A.: *Phytochem.*, 20, 2879-2890, 1971.
17. MAZLIAK, P., OURSEL, A., BEN ABDELKADER, A. et GROBOIS, M.: *Eur. J. Biochem.*, 28, 399-341, 1972.
18. MORRIS, L. J., WHARRY, D. M. et HAMMOND, W. E.: *J. Chromatog.*, 31, 69-76, 1967.
19. SPARACE, S. A. et MOORE, T. S.: *Plant Physiol.*, 63, 963-972, 1979.
20. VICK, B. et BEEVERS, H.: *Plant Physiol.*, 62, 173-178, 1978.
21. WEAIRE, P. G. et KEKWIK, R. G. O.: *Biochem. J.*, 164, 439-445, 1975.