

ECHANGES D'ACIDES GRAS *IN VITRO* ENTRE MITOCHONDRIES, MICROSOMES ET SURNAGEANTS CYTOPLASMIQUES DE CELLULES DE POMMES DE TERRE ET DE CHOU-FLEUR

P. MAZLIAK et A. BEN ABDELKADER

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée (Physiologie Cellulaire) Faculté des Sciences, 12 Rue Cuvier, Paris 5^e, France

(Reçu le 15 mars 1971)

Résumé—Quand des mitochondries de tubercule de Pomme de terre ou d'inflorescence de Chou-fleur, contenant des acides gras marqués à partir du [1-¹⁴C]acétate, sont mises en incubation dans un petit volume de surnageant cytoplasmique avec des microsomes non marqués de la même espèce, la radioactivité spécifique des acides gras mitochondriaux décroît et les acides des microsomes et du surnageant deviennent radioactifs. On obtient le même résultat en mélangeant des microsomes marqués avec des mitochondries de la même espèce. Ces résultats suggèrent un échange d'acides gras des microsomes aux mitochondries et vice versa. Tous les types d'acides gras sont transférés, les acides majeurs étant les plus activement échangés. Il n'y a pas de dégradation des acides gras durant le transfert suivie d'une resynthèse puisque la distribution de la radioactivité totale reste constante parmi les différents acides. Les mêmes transferts sont observés quand des mitochondries de Pomme de terre sont incubées avec des microsomes de Chou-fleur ou réciproquement.

Le surnageant cytoplasmique joue un rôle important dans ces phénomènes; les acides gras marqués du surnageant peuvent être transférés vers les microsomes ou les mitochondries du même tissu. Le transfert est moins actif du surnageant d'une espèce vers les organites d'une autre espèce.

Abstract—When potato tuber or cauliflower buds mitochondria, containing fatty acids labelled from [1-¹⁴C]acetate, are incubated in a small volume of cytoplasmic supernatant with unlabelled microsomes isolated from the same species, the specific radioactivity of the mitochondrial fatty acids decreases and the fatty acids of the microsomes and supernatant become radioactive. The same result is obtained when labelled microsomes are mixed with unlabelled mitochondria. These data suggest an exchange of fatty acids from microsomes to mitochondria and in the opposite way. All types of fatty acids are transferred, the major ones being the most actively exchanged. There is no breakdown of fatty acids and no subsequent synthesis during the transfer since the distribution of the total radioactivity remains constant among the various fatty acids. The same transfers are observed when potato mitochondria are incubated with cauliflower microsomes or reciprocally.

The cytoplasmic supernatant plays an important role in these phenomena; the labelled fatty acids of the supernatant can be transferred to unlabelled microsomes or mitochondria from the same tissue. The transfer is less active from a supernatant of one species to organelles of another species.

INTRODUCTION

DANS un travail précédent,¹ nous avons démontré que des échanges de lipides se produisaient entre mitochondries et microsomes végétaux, lorsque les organites isolés étaient mis simultanément en suspension dans un petit volume de surnageant cytoplasmique. Nous avons également établi que les lipides transférés d'un organite à l'autre passaient transitoirement par le surnageant cytoplasmique. Les échanges étudiés portaient sur les lipides totaux ou les phospholipides des organites. Pour suivre les transferts, nous avons marqué les lipides d'une fraction avec l'un des trois précurseurs radioactifs suivants: 1-[¹⁴C]acétate, 1-3-[¹⁴C]glycérol ou ³²PO₄HNa₂. Nous avons ensuite mélangé la fraction contenant les

¹ A. BEN ABDELKADER et P. MAZLIAK, *Eur. J. Biochem.* **15**, 250 (1970).

lipides marqués avec une fraction ne contenant pas de lipides radioactifs et nous avons observé (1) le transfert des lipides radioactifs d'une fraction à l'autre (avec le 1-[^{14}C]acétate, environ 50% de la radioactivité initiale s'échangeait) (2) la décroissance de l'activité spécifique des lipides de la fraction initialement radioactive. Ces résultats nous avaient permis de calculer les quantités de lipides échangées entre microsomes et mitochondries.

Dans le présent article, nous étudions l'échange des seuls acides gras, entre différents organites cellulaires végétaux, isolés puis rassemblés *in vitro* dans un petit volume de surnageant cytoplasmique. Pour cette étude, les lipides des fractions cellulaires ont été marqués uniquement à partir de 1-[^{14}C]acétate; ce précurseur est très activement incorporé, *in vivo*, dans les acides gras liés aux membranes cellulaires.² Nous avons organisé des échanges d'acides marqués; (1) entre organites cellulaires du même tissu (Pomme de terre ou Chou-fleur); et (2) entre organites cellulaires provenant de deux espèces différentes, par exemple entre mitochondries de Pomme de terre et microsomes de Chou-fleur (ou réciproquement). L'étude par radiochromatographie en phase gazeuse des acides gras des diverses fractions cellulaires, avant ou après les incubations mixtes, nous a permis de déterminer quels sont les acides gras transférés d'une fraction cellulaire à l'autre et dans quelles proportions sont échangés les principaux acides.

RESULTATS ET DISCUSSION

Marquage in vivo des Acides Gras des Organites

Lorsque des tranches de tubercules de Pomme de terre ou des tranches d'inflorescence de Chou-fleur sont mises en incubation, pendant 3 hr, dans une solution contenant du 1-[^{14}C]acétate, les lipides de ces tissus deviennent fortement radioactifs. Si l'on prépare les mitochondries ou les microsomes de ces tissus, et si l'on extrait les acides gras des lipides liés à ces organites, on constate que ces acides sont fortement radioactifs (Tableau 1)—L'analyse par radiochromatographie en phase gazeuse des acides gras montre que dans nos conditions d'expérience, après 3 hr d'incubation, tous les acides gras principaux des lipides membranaires sont marqués, à l'exception de l'acide *linoléique*; des temps d'incubation plus longs³

TABLEAU 1. INCORPORATION DE 1-[^{14}C]ACÉTATE DANS LES ACIDES GRAS LIÉS AUX ORGANITES CELLULAIRES PAR DES TRANCHES DE TUBERCULE DE POMME DE TERRE OU D'INFLORESCENCE DE CHOU-FLEUR

Acide gras	Pour cent de la radio-activité totale incorporée dans les acides gras d'une fraction cellulaire				
	Chou-fleur			Pomme de terre	
	Mitochondries	Microsomes	Surnageant cytoplasmique	Mitochondries	Microsomes
C ₁₆ 0	17,2	21,8	14,6	12,2	15,1
C ₁₈ 0	15,2	12,2	13,7	13,3	8,8
C ₁₈ 1	58,0	53,0	63,2	64,5	66,3
C ₁₈ 2	8,3	12,9	8,5	10,0	9,8
C ₂₀ 0	1,4	—	—	—	—

Conditions expérimentales dans le texte.

² P. MAZLIAK et A. BEN ABDELKADER, *Rev. gén. Bot.* 77, 53 (1970).

³ A. BEN ABDELKADER et P. MAZLIAK, Résultats inédits.

sont nécessaires pour marquer les acides triinsaturés dans des expériences de ce type. L'examen des pourcentages de la radio-activité totale contenus dans chaque acide montre que la répartition des acides nouvellement synthétisés est la même dans les mitochondries et dans les microsomes, à l'intérieur d'un même tissu, et même d'un tissu à l'autre. C'est l'acide oléique qui est le plus activement synthétisé dans ces conditions d'expérience.

Echanges d'Acides Gras entre Mitochondries et Microsomes de Chou-fleur

Lorsque des mitochondries de Chou-fleur, contenant des acides gras marqués au ^{14}C , sont mélangés, pendant 30 ou 60 mn, à des microsomes non radioactifs, dans un petit volume de surnageant cytoplasmique, on constate, après séparation des organites, que des acides gras radioactifs sont apparus dans les microsomes initialement non marqués. La répartition de la radio-activité apparue entre les acides gras des microsomes est tout à fait parallèle à celle existant dans les mitochondries initialement marquées (Tableau 2), que les incubations aient duré 30 ou 60 mn. On peut en conclure: (1) que toutes les catégories d'acides gras marqués ont été transférées, des mitochondries aux microsomes; et (2) que les acides sont transférés proportionnellement à leur importance quantitative. Ainsi les acides contenant le plus de radio-activité dans la fraction donneur sont aussi ceux qui présentent les plus forts pourcentages de la radio-activité totale dans la fraction receveur.

TABLEAU 2. ECHANGES *in vitro* D'ACIDES GRAS MARQUÉS ENTRE MITOCHONDRIES ET MICROSOMES DE CHOU-FLEUR

	Pour cent de la radio-activité totale des acides gras d'une même fraction cellulaire					
	0 mn*		30 mn		60 mn	
	Mitochondries	Microsomes	Mitochondries	Microsomes	Mitochondries	Microsomes
<i>Transfert des mitochondries aux microsomes</i>						
C _{16:0}	17,2	—	13,4	14,2	13,6	12,2
C _{18:0}	15,2	—	12,8	13,8	14,6	20,8
C _{18:1}	58,0	—	64,5	62,0	60,0	49,0
C _{18:2}	8,3	—	9,3	10,0	11,8	10,1
C _{20:0}	1,4	—	—	—	—	7,8
<i>Transfert des microsomes aux mitochondries</i>						
C _{16:0}	—	21,8	—†	18,2	18,6	22,0
C _{18:0}	—	12,2	—	19,9	12,5	18,6
C _{18:1}	—	53,0	—	51,1	56,5	52,5
C _{18:2}	—	12,9	—	8,0	12,2	6,9
C _{20:0}	—	—	—	2,7	—	—

* Temps d'incubation.

† Lot perdu par accident.

L'expérience prouve aussi que le transfert de la radio-activité ne résulte pas d'une dégradation des acides gras marqués en fragments acétate, suivie d'une resynthèse: dans cette hypothèse, la répartition de la radio-activité ne serait pas la même dans les fractions donneur et receveur. L'activité de biosynthèse des lipides des fractions cellulaires isolées est en effet très différente de celle des tranches de tissus.^{2,4} Tout au plus peut-on constater une certaine augmentation des pourcentages de la radio-activité des acides en C_{18:0} et C_{20:0} dans

⁴ P. MAZLIAK et A. BEN ABDELKADER, Résultats inédits.

les microsomes, ce qui pourrait correspondre à une activité d'élongation des acides en C_{16} dans cette fraction. Nous avons vérifié que la composition en acides gras des organites ne changeait pas de façon significative au cours de ces incubations. Les acides polyinsaturés $C_{18:3}$ et $C_{18:2}$ restent les acides majeurs des lipides des mitochondries et des microsomes du Chou-fleur.

Lorsque des microsomes de Chou-fleur contenant des acides gras marqués sont mélangés à des mitochondries non radio-actives, dans un volume de surnageant, on constate également, après séparation des organites, que des acides gras radio-actifs sont apparus dans les mitochondries après 30 ou 60 mn d'incubation. Toutes les catégories d'acides marqués sont ainsi échangées; la répartition de la radio-activité totale entre les divers acides est la même dans les microsomes donneurs et dans les mitochondries receveurs (Tableau 2).

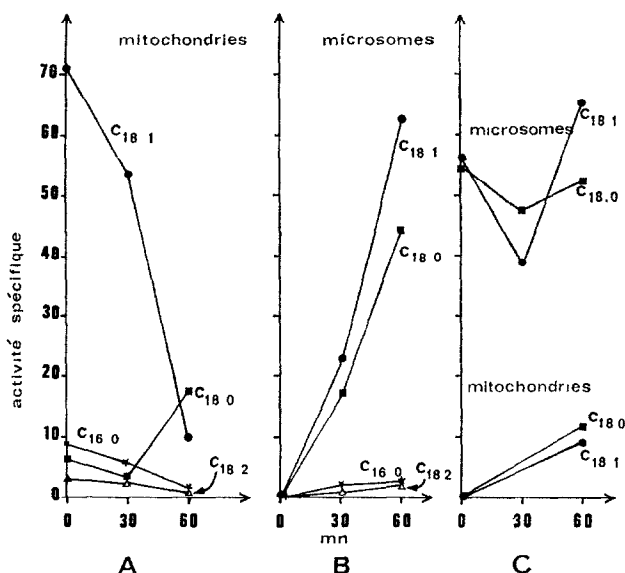


FIG. 1. ECHANGES D'ACIDES GRAS ENTRE MICROSOMES ET MITOCHONDRIES DE CHOU-FLEUR.

A—Evolution des activités spécifiques des acides gras marqués de mitochondries de Chou-fleur mélangés à des microsomes non radio-actifs. B—Evolution des activités spécifiques des acides gras dans des microsomes initialement non marqués mélangés à des mitochondries radio-actives. C—Evolution des activités spécifiques des principaux acides gras marqués au cours d'une incubation mixte de microsomes marqués et de mitochondries non radio-actives. Abréviations utilisées: $C_{16:0}$ = acide palmitique; $C_{18:0}$ = acide stéarique; $C_{18:1}$ = acide oléique; $C_{18:2}$ = acide linoléique; $C_{18:3}$ = acide linoléique.

Si l'on considère la variation des activités spécifiques des acides gras au cours de ces expériences d'incubation mixte, on peut dégager les faits suivants. Dans le cas d'un mélange de mitochondries radio-actives avec des microsomes non marqués, les activités spécifiques de tous les acides gras (sauf l'acide stéarique) diminuent, au cours du temps, dans les mitochondries (Fig. 1 A). Cette diminution est particulièrement accusée pour l'acide oléique, très radioactif au départ. Ces diminutions d'activité spécifique ne peuvent résulter que d'une arrivée d'acides gras non radio-actifs sur les mitochondries. Ces acides non marqués qui diluent la radio-activité initiale proviennent soit du surnageant cytoplasmique, soit des

microsomes non marqués. Des acides gras radio-actifs apparaissent dans les microsomes et l'activité spécifique des acides gras dans cette fraction, nulle au départ, augmente avec le temps d'incubation, en présence des mitochondries radioactives (Fig. 1 B).

Dans l'expérience réciproque (microsomes radioactifs mélangés à des mitochondries non marquées) on constate (Fig. 1 C) que les activités spécifiques des acides gras des microsomes ne diminuent pas (ou très peu) au cours des incubations, ce qui peut s'expliquer ou par une moins grande arrivée d'acides gras non marqués sur les microsomes ou par un aller et retour assez rapide des acides gras marqués entre les microsomes et les mitochondries.

Echanges d'Acides Gras entre Mitochondries et Microsomes de Pomme de Terre

Les mêmes transferts d'acides gras marqués peuvent s'observer entre mitochondries et microsomes de Pomme de terre, mélangés *in vitro* dans un petit volume de surnageant cytoplasmique.

TABLEAU 3. ECHANGES *in vitro* D'ACIDES GRAS MARQUÉS ENTRE MICROSOMES ET MITOCHONDRIES DE POMME DE TERRE

	Pour cent de la radio-activité totale des acides gras d'une même fraction cellulaire			
	0 mn*		30 mn	
	Mitochondries	Microsomes	Mitochondries	Microsomes
<i>Transfert des mitochondries aux microsomes</i>				
C _{16:0}	12,2	—	11,4	17,6
C _{18:0}	13,3	—	14,5	14,5
C _{18:1}	64,5	—	67,0	63,2
C _{18:2}	10,0	—	7,1	4,7
	60 mn		120 mn	
	Mitochondries	Microsomes	Mitochondries	Microsomes
<i>Transfert des mitochondries aux microsomes</i>				
C _{16:0}	10,8	16	20	15,7
C _{18:0}	15,5	19,6	6,6	9,9
C _{18:1}	66,0	60,0	66,0	69,0
C _{18:2}	7,5	4,6	7,4	5,4

* Temps d'incubation.

Au Tableau 3, par exemple, figurent les résultats d'une expérience de mélange de mitochondries contenant des acides gras radio-actifs avec des microsomes non marqués. On note que des acides radio-actifs apparaissent sur les microsomes, que toutes les catégories d'acides marqués passent d'une fraction cellulaire à l'autre, et que la distribution de la radio-activité est la même dans la fraction donneur et dans la fraction receveur, ce qui implique que les échanges portent sur des acides gras entiers, sans distinction ni resynthèse et que les acides sont échangés proportionnellement à leur importance quantitative.

Dans cette expérience, l'activité spécifique de l'acide oléique des mitochondries diminue considérablement au cours de l'incubation, tandis que l'activité spécifique de l'acide oléique

des microsomes augmente. Ceci signifie que l'acide oléique non marqué, provenant du surnageant cytoplasmique ou des microsomes est venu diluer l'acide oléique marqué des mitochondries (Fig. 2).

Prélèvement d'Acides Gras par les Organites dans le Surnageant Cytoplasmique

Lorsque des mitochondries ou des microsomes de Chou-fleur sont mis en suspension pendant 120 mn dans un volume de surnageant cytoplasmique contenant des acides marqués par le 1- ^{14}C acétate, on constate, après recentrifugation des organites hors du milieu, que des acides gras marqués se sont fixés sur les membranes (Tableau 4).

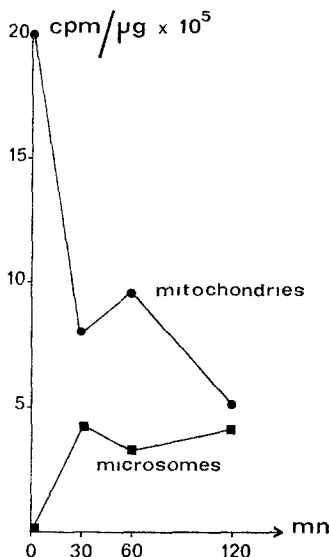


FIG. 2. EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE L'ACIDE OLÉIQUE DES MITOCHONDRIES OU DES MICRO-SOMES DE POMME DE TERRE, AU COURS D'INCUBATIONS MIXTES DE MITOCHONDRIES MARQUÉES AVEC DES MICROSOMES NON MARQUÉS.

La distribution de la radio-activité entre les divers acides gras est la même dans le surnageant initialement marqué et dans les membranes en fin d'expérience. L'acide oléique renferme le maximum de carbone radioactif, dans le surnageant de départ, puis dans les mitochondries ou les microsomes en fin d'expérience. Donc les acides gras marqués du surnageant ont été fixés par les organites, proportionnellement à leur quantité dans le surnageant. Inversement, les organites en suspension ont perdu des acides gras non marqués dans le milieu, puisque les activités spécifiques de tous les acides gras du surnageant cytoplasmique ont beaucoup diminué après deux heures d'incubation (Tableau 4).

Cette expérience confirme le fait que les échanges de lipides entre organites s'effectuent par l'intermédiaire du surnageant cytoplasmique, jouant le rôle d'accepteur transitoire des lipides qui s'échangent.

TABLEAU 4. PRÉLÈVEMENT D'ACIDES GRAS MARQUÉS DANS LE SURNAGEANT (SURN), PAR DES MITOCHONDRIES (MIT) OU DES MICROSOMES (MIC) DE CHOU-FLEUR

	Pour cent de la radio-activité totale des acides gras d'une fraction cellulaire					Activité spécifique $\left(\frac{\text{aire radiochromatogramme}}{\text{aire chromatogramme}} \right)$				
	0*	120 mn				0	120 mn			
	Surn	Surn	Mic	Surn	Mit	Surn	Surn	Mic	Surn	Mit
C ₁₆	14,6	18,9	20	34,7	12,8	11,3	8,0	1,6	18,1	3,1
C ₁₈	13,7	8,8	18,7	4,3	10,5	174	11	8,1	29,3	17,0
C _{18:1}	63,2	58,6	53,4	52,6	70,6	134	32,4	13,9	61,4	61,5
C _{18:2}	8,5	9,5	7,9	8,5	6,1	5,0	5,0	0,6	3,6	0,9
C ₂₀	—	4,2	—	—	—	—	—	—	—	—

* Temps d'incubation.

Echanges d'Acides Gras entre Organites de Deux Espèces Différentes

Pour savoir s'il existe une certaine spécificité dans les phénomènes d'échange des acides gras entre les organites cellulaires, nous avons réalisé des incubations mixtes de microsomes et de mitochondries appartenant à deux espèces différentes: Pomme de terre et Chou-fleur. La composition en acides gras des membranes des organites de ces deux espèces est différente (Tableau 5) et nous voulions savoir si les organites d'une espèce pouvaient accepter au cours des échanges tous les acides gras libérés dans le milieu par les organites de l'autre espèce.

Nous avons d'abord mélangé des microsomes de Pomme de terre contenant des acides gras radio-actifs, avec des mitochondries de Chou-fleur non marquées, dans un volume de surnageant cytoplasmique de Chou-fleur. Ce mélange expérimental entraîne quelques perturbations graves dans la composition en acides gras des organites en présence. Les microsomes de Pomme de terre conservent pendant toute l'expérience leur composition normale en acides gras tandis que les mitochondries de Chou-fleur s'appauvrissent considérablement en acide linoléique: la situation anormale où se trouvent les organites entraîne donc une destruction marquée de cet acide.

TABLEAU 5. COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES LIÉS AUX DIFFÉRENTES FRACTIONS CELLULAIRES DE POMME DE TERRE ET DE CHOU-FLEUR

	Pour cent des acides gras totaux dans une fraction cellulaire					
	Chou-fleur			Pomme de terre		
	Mitochondries	Microsomes	Surnageant cytoplasmique	Mitochondries	Microsomes	Surnageant cytoplasmique
C _{16:0}	17,6	24,3	17,3	18,7	29,5	18,9
C _{16:1}	1,6	—	—	—	—	—
C _{18:0}	2,4	2,2	3,6	10,7	6,6	8,5
C _{18:1}	10,0	9,7	14,9	13,3	3,3	9,6
C _{18:2}	12,2	13,2	12,2	44,6	48,8	42,2
C _{18:3}	45,3	50,5	51,9	12,7	11,8	20,7

TABLEAU 6. ECHANGES D'ACIDES GRAS MARQUÉS ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES DE POMME DE TERRE ET FRACTIONS CELLULAIRES DE CHOU-FLEUR

Les fractions marquées proviennent de tranches de Pomme de terre

Pour cent de la radio-activité totale des acides gras dans une fraction cellulaire											
0*		15 mn			30 mn			60 mn			
Mic†	Mit	Mic	Mit	Surn	Mic	Mit	Surn	Mic	Mit	Surn	
<i>Transfert des microsomes aux mitochondries</i>											
C _{16 0}	24,4	—	24,8	23,2	28,1	32,3	23,1	26,2	27,5	28,3	18,3
C _{18 0}	23,8	—	23,9	20,2	20,9	20,2	20,9	19,7	22,0	19,3	19,3
C _{18 1}	20,6	—	24,8	24,1	33,2	21,2	22,8	30,1	25,1	20,3	39,8
C _{18 2}	23,8	—	17,1	26,8	12,7	15,5	24,5	24,0	16,1	23,9	22,5
C _{20 0}	7,5	—	9,4	5,5	5,1	10,6	8,7	—	9,5	8,2	—
<i>Transfert des mitochondries aux microsomes</i>											
C _{16:0}	—	19†	15,3	17,3	21	22,6	14,5	18,3	16,5	18,5	5
C _{18.0}	—	18	18,5	18,9	10,5	18,2	14,2	6,5	18,8	21,0	11,5
C _{18 1}	—	21	17,1	20,5	17,5	17,1	21,0	35	20,1	17,5	24
C _{18 2}	—	36	36,0	37,0	41	33,8	42,6	40	38,0	36,0	45
C _{20 0}	—	6	12,6	6,3	10,5	8,3	7,8	—	6,6	7,5	—

* Temps d'incubation.

† Dans ces expériences, les tranches de Pomme de terre avaient été laissées 12 h. au contact de l'acétate-1-¹⁴C, ce qui explique qu'un plus fort pourcentage de la radio-activité totale se retrouve dans l'acide linoléique.

Dans ces conditions d'expérience, on constate que des acides gras radio-actifs quittent les microsomes marqués de Pomme de terre pour se retrouver dans le surnageant cytoplasmique et dans les mitochondries de Chou-fleur (Tableau 6). Le transfert d'acides gras se fait là-encore sans métabolisation puisque la distribution de la radio-activité entre les divers acides est la même dans les microsomes de Pomme de terre de départ et dans les organites de Chou-fleur receveurs. Si l'on considère l'évolution des activités spécifiques des divers acides gras dans les organites et le surnageant (Fig. 3), il apparaît clairement que les activités spécifiques ne diminuent pas (ou diminuent peu) dans les microsomes de Pomme de terre tandis qu'elles augmentent rapidement et de façon très importante dans le surnageant de Chou-fleur: les activités spécifiques augmentent plus lentement dans les mitochondries de Chou-fleur. Ces résultats montrent que des acides gras marqués sont relâchés dans le surnageant de Chou-fleur par les microsomes de Pomme de terre. Une faible partie de ces acides gras de Pomme de terre est fixée par les mitochondries de Chou-fleur, sans prélèvement particulier d'un acide gras. Donc les acides gras des organites d'une espèce peuvent être transférés sur les organites d'une autre espèce.

L'expérience inverse, consistant à mélanger des mitochondries de Pomme de terre contenant des acides gras marqués avec des microsomes de Chou-fleur, non marqués, dans du surnageant de Chou-fleur, montre (Tableau 6) qu'un transfert d'acides gras marqués se produit également des mitochondries d'une espèce vers les microsomes et le surnageant cytoplasmique de l'autre espèce. Ce transfert se produit sans métabolisation des acides gras puisque les pourcentages de la radio-activité totale des acides gras se distribuent semblablement entre les acides gras des mitochondries de Pomme de terre et ceux des microsomes de Chou-fleur. Dans cette expérience, c'est l'acide linoléique des Pommes de terre qui contient le plus de carbone radio-actif. Les mitochondries de Pomme de terre, placées dans

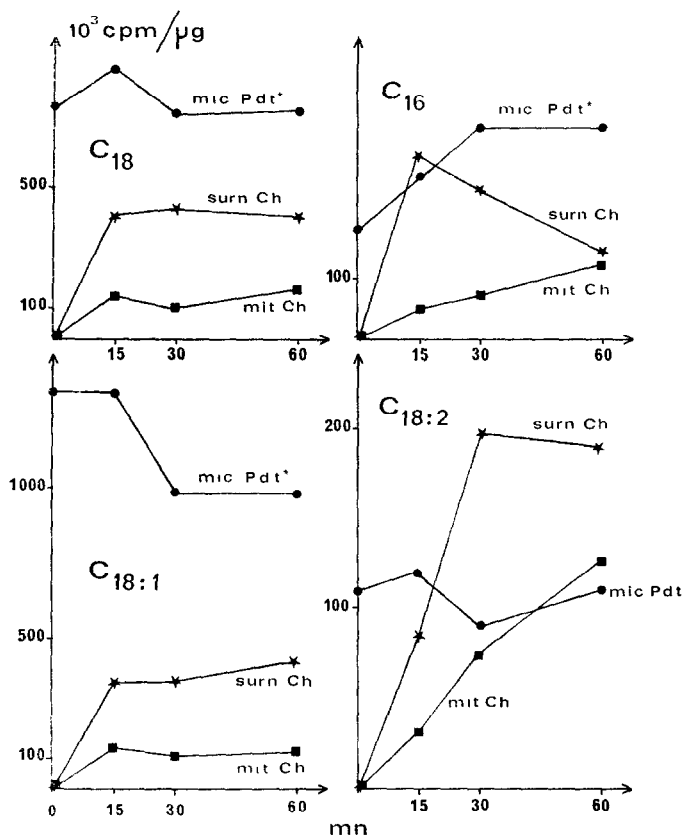


FIG. 3. EVOLUTION DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES ORGANITES ET DU SURNAGEANT DANS UNE INCUBATION MIXTE DE MICROSOMES MARQUÉS DE POMME DE TERRE (mic Pdt) AVEC DES MITOCHONDRIES NON MARQUÉES DE CHOU-FLEUR (mit Ch), DANS UN PETIT VOLUME DE SURNAGEANT DE CHOUFLEUR (surn Ch). MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG. 1.

un surnageant étranger, s'appauvrissent légèrement en acide linoléique, au cours des incubations mixtes tandis que les microsomes de Chou-fleur ne modifient pas leur composition. On constate, de plus, une certaine diminution des activités spécifiques de tous les acides gras dans les mitochondries de Pomme de terre initialement marquées et une augmentation parallèle des activités spécifiques dans les microsomes et dans le surnageant de Chou-fleur (Fig. 4). Apparemment, les microsomes prélèvent plus facilement les acides gras marqués de Pomme de terre dans le surnageant que les mitochondries.

Une dernière série d'expériences a consisté à mélanger des fractions marquées d'inflor-escences de Chou-fleur avec des fractions non marquées de parenchyme de Pomme de terre. Les résultats obtenus furent les mêmes que dans l'expérience précédente: des acides gras radio-actifs des fractions cellulaires de Chou-fleur passaient dans le surnageant cytoplasmique ou sur les fractions cellulaires de Pomme de terre. Le transfert se faisait sans métabolisation des acides gras et les acides contenant le plus de carbone radio-actif étaient les mêmes dans les fractions donneurs et receveurs. Nous avons enfin observé que des organites non mar-qués d'une espèce pouvaient prélever des acides gras dans le surnageant cytoplasmique

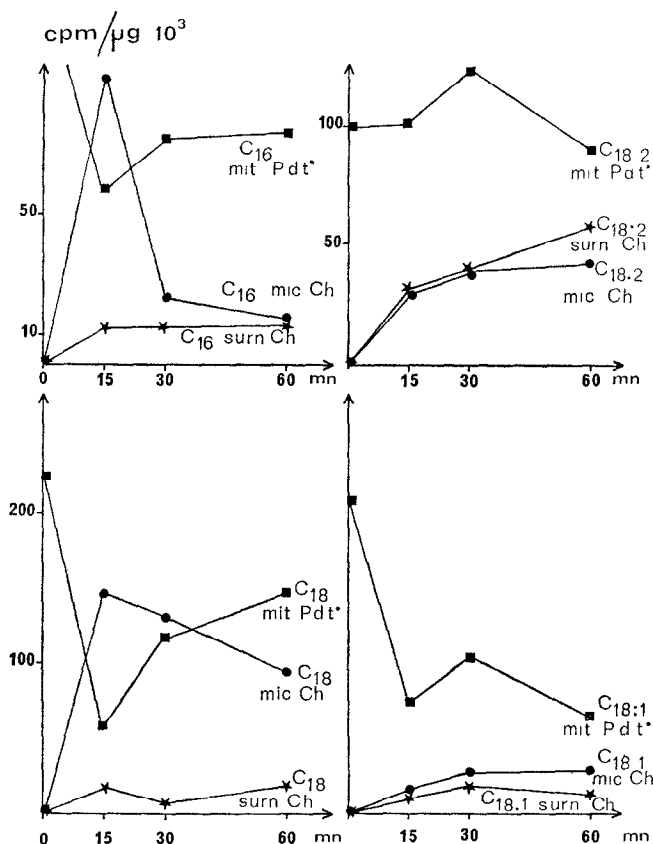


FIG. 4. EVOLUTION DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES ORGANITES ET DU SURNAGEANT DANS UNE INCUBATION MIXTE DE MITOCHONDRIES MARQUÉES DE POMME DE TERRE (mit Pdt) AVEC DES MICROSOMES NON MARQUÉS DE CHOU-FLEUR (mic Ch), DANS UN PETIT VOLUME DE SURNAGEANT DE CHOUFLEUR (Surn Ch). MÊMES ABRÉVIATIONS QU'À LA FIG 1

contenant des lipides marqués de l'autre espèce. Les transferts se faisaient également sans métabolisation.

DISCUSSION

Les expériences décrites dans cet article prouvent que lorsqu'on mélange, *in vitro*, des microsomes et des mitochondries isolés, provenant de la même espèce ou de deux espèces végétales différentes, des acides gras passent, sans être dégradés, d'une fraction cellulaire à l'autre.

Nous pensons pouvoir écarter, pour expliquer ces échanges d'acides, l'éventualité d'une mauvaise séparation des mitochondries et des microsomes après la période d'incubation mixte. En effet, nous avons, systématiquement séparé les organites par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose, comme il est décrit dans la partie expérimentale, et nous avons toujours pris des bandes de même densité pour les mitochondries ou les microsomes. Ce procédé nous permet d'éviter une trop grande contamination réciproque de nos fractions.

Dans notre étude précédente¹ sur les échanges de lipides totaux, nous avons trouvé qu'au cours des incubations mixtes d'organites, jusqu'à 50% de la radio-activité initiale de la fraction donneur pouvait passer sur la fraction receveur. Notre technique de purification systématique des fractions sur gradient de densité nous permet d'écarter des contaminations aussi importantes d'une fraction par l'autre. Les contrôles morphologiques ou enzymatiques que nous avons faits^{1,4} renforcent cette conclusion.

La forme sous laquelle les acides gras passent d'une fraction à l'autre peut être envisagée de trois façons différentes; (1) les acides gras peuvent être transférés, estérifiés par le glycérol des molécules de phospholipides ou de glycérides dont ils font partie; (2) les acides gras peuvent être libérés de ces composés par l'action de phospholipases ou de lipases liées aux membranes⁵ et être transférés sous forme d'acides gras libres, sans doute complexés par des protéines du surnageant cytoplasmique; (3) enfin, des fragments lipoprotéiques entiers de membranes peuvent être transférés des mitochondries aux microsomes. Ces trois modes de transfert pourraient se dérouler simultanément.

Le prélèvement de lipides dispersés dans le milieu par des cellules entières ou des organites en suspension est un phénomène connu.⁶ La perte dans le milieu de lipoprotéines ou de lipides par des tranches de tissu ou des organites en suspension a également été signalée.⁷⁻⁹ Ces phénomènes pourraient résulter de lois purement physico-chimiques et ne nécessiter, pour se produire, aucune intervention enzymatique.¹⁰ Cette façon d'envisager les échanges décrits dans cet article nous semble bien s'accorder avec le résultat retrouvé dans toutes nos expériences: les pourcentages de la radio-activité totale se répartissent de la même façon entre les acides gras des fractions donneurs et receveurs. Cela signifie que tous les acides gras s'échangent, d'autant plus facilement qu'ils sont plus abondants dans la fraction initialement marquée; c'est bien ce que l'on attendrait dans le cas d'échanges purement physico-chimiques. Ce point de vue est encore renforcé par la possibilité démontrée dans cet article, d'échanges interspécifiques: les organites de Chou-fleur (normalement riches en acide linoléique) acceptent les lipides provenant d'organites de Pomme de terre (très riches en acide linoléique et pauvres en acide linolénique). Par ailleurs les organites de Chou-fleur, dans nos conditions d'expérience, ne prélèvent pas spécialement l'acide linolénique dans le milieu, mais indifféremment tous les acides gras, proportionnellement à leur abondance.

Ces phénomènes d'échange, même s'ils sont de nature non enzymatiques, pourraient cependant avoir une grande importance biologique. Nous avons noté, plusieurs fois, par exemple,² que les mitochondries végétales sont généralement très riches en acides gras polyinsaturés et qu'il était extrêmement difficile d'obtenir, à partir de 1-[¹⁴C]acétate, la moindre incorporation de carbone radioactif dans les acides polyinsaturés de mitochondries isolées. Par contre, les acides polyinsaturés des mitochondries sont très activement synthétisés *in vivo*, lorsque le précurseur est fourni à des tranches de tissu.² Nous avons émis l'hypothèse d'une coopération nécessaire entre le cytoplasme et les organites pour la biosynthèse des lipides des membranes mitochondriales.¹¹ Les transferts d'acides gras mis en évidence dans cet article pourraient, s'ils se produisent également, *in vivo*, expliquer la présence des acides polyinsaturés dans les membranes des mitochondries végétales. Ces

⁵ R. DOUCE, Thèse de Doctorat d'Etat, Paris (1970).

⁶ K. W. A. WIRTZ et D. B. ZILVERSMIT, *J. Biol. Chem.* **243**, 3596 (1968).

⁷ L. TATÒ et F. F. RUBALTELLI, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **44**, 2171 (1968).

⁸ A. I. KOOK et D. RUBINSTEIN, *Can. J. Biochem.* **47**, 65-69 (1969).

⁹ A. I. KOOK et D. RUBINSTEIN, *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 396 (1969).

¹⁰ F. B. JUNGALWALA et R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.* **117**, 481 (1970).

¹¹ P. MAZLIAK, U. STOLL et A. BEN ABDELKADER, *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 414 (1968).

acides gras produits dans le cytoplasme ou sur les membranes des microsomes pourraient être transférés secondairement sur toutes les membranes de la cellule, ce qui expliquerait aussi l'uniformité de composition en acides gras de toutes les membranes à l'intérieur d'une cellule.

EXPERIMENTALE

Les techniques expérimentales utilisées dans cette série d'expériences ont été décrites en détail dans un article précédent.¹ Nous allons donc rappeler ici les points les plus importants

Préparation des Organites

Organites non marqués. Les fractions cellulaires sont préparées à partir de 500 g de parenchyme de tubercule de Pomme de terre (variété Bintje) ou 500 g d'inflorescences de Chou-fleur, après homogénéisation du tissu dans 500 ml d'une solution de broyage selon une technique de Baker *et al.*¹² modifiée. Les mitochondries brutes sont obtenues en culot après élimination des noyaux et débris puis centrifugation du broyat cellulaire à 10 000 g pendant 20 mn et les microsomes bruts, après centrifugation du surnageant des mitochondries à 100 000 g pendant 1 h. Ces organites, sont purifiés sur gradient de densité de saccharose. Les *mitochondries pures* sont groupées dans une bande de densité voisine de 1,18; les *microsomes purs* se rassemblent dans des couches de densité inférieure à 1,15. Après centrifugation, les organites purifiés sont remis en suspension dans 3 ml de 'surnageant concentré'. Ce surnageant est obtenu en traitant 150 g de tissu par une faible quantité de milieu de broyage (35 ml) et en centrifugeant directement le broyat à 100 000 g.

L'examen des culots par microscopie électronique et la détermination d'activités enzymatiques (succinate-cytochrome c réductase; NADH cytochrome c réductase, glucose-6 phosphatase) ont permis d'établir que la contamination réciproque d'une fraction par l'autre est très faible.¹

Organites marqués. Les fractions cellulaires sont préparées de la même façon, après incubation préalable des tranches de tissu dans une solution aqueuse contenant du 1-[¹⁴C]acétate (10 μ Ci/ml) pendant 3 ou 12 h.

Mélanges Expérimentaux

Mitochondries marquées et microsomes non marqués. On mélange 0,5 ml de suspension mitochondriale marquée et 0,5 ml de suspension microsomale non marquée. Après un temps d'incubation variable, à 25°, en constante agitation, le mélange est directement purifié sur gradient de densité.

Microsomes marqués et mitochondries non marquées. On mélange 0,5 ml de suspension microsomale marquée et 0,5 ml de suspension mitochondriale non marquée, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Surnageant cytoplasmique marqué et organites non marqués. On mélange 10 ml de surnageant marqué et 0,5 ml de suspension mitochondriale ou microsomale non marquée. A la fin de l'incubation, on centrifuge directement le mélange à 10 000 g pendant 20 mn pour obtenir les mitochondries et à 100 000 g pendant 1 h pour avoir les microsomes.

Extraction et Analyse des Acides Gras

Les lipides des différentes fractions cellulaires sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer¹³

L'extrait lipidique total est traité d'après la technique de Metcalfe *et al.*¹⁴ Les esters méthyliques des acides gras, repris en solution dans un volume déterminé de MeOH sont additionnés d'une quantité connue d'hepta-décanoate de méthyle. Une partie de ce mélange est analysée par radio-chromatographie en phase gazeuse (appareil Barber-Colman, série 5000) sur une colonne (3 m \times 6 mm) de Butane-Diol Succinate (20 % adsorbé sur du chromosorb W) à 195° avec l'argon. Une partie des vapeurs d'acides gras sortant de la colonne est brûlée en passant sur de l'oxyde de cuivre, placé dans un four chauffé à 800°. Le CO₂ résultant passe dans un compteur proportionnel de radioactivité. L'appareil fournit un double enregistrement: le chromatogramme de masse donnant la composition de la solution d'esters méthyliques d'acides gras, et qui permet d'obtenir après triangulation des pics, la composition quantitative en acides gras (par comparaison avec le témoin ajouté); et le chromatogramme de radio-activité, indiquant la distribution de la radio-activité entre les différents acides gras. En mesurant (par scintillation liquide) la radio-activité totale d'une partie aliquotée de la solution d'esters méthyliques, il est possible de connaître la radio-activité totale de chaque acide gras, et donc, sa radio-activité spécifique, rapportée au microgramme d'acide.

Dans certains cas, on a simplement utilisé le rapport des surfaces des pics de radio-activité et des pics de masse pour apprécier la radio-activité spécifique des acides gras.

¹² J. E. BAKER, L. G. ELFVIN, J. B. BIALE et S. T. HONDA, *Plant Physiol.* **43**, 2001 (1968)

¹³ E. G. BLIGH et W. J. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.* **47**, 911 (1959).

¹⁴ L. D. METCALFE, A. A. SCHMITZ et J. R. PELKA, *Analyt. Chem.* **38**, 514 (1966)