

BBA 75677

## LIAISONS DES LIPIDES DANS LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ET LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

MARIE-THÉRÈSE SAUNER ET MARIANNE LÉVY

*Laboratoire des Membranes biologiques, Faculté des Sciences, 1 rue Victor Cousin, Paris 5<sup>e</sup> (France)*

(Réçu le 18 mars, 1971)

## SUMMARY

*Lipid linkages in the endoplasmic reticulum and in the mitochondrial membranes*

Using solvents of increasing polarity, we have been able to show that there are at least three types of phospholipid linkages in the isolated mitochondrial membranes and in the endoplasmic reticulum.

We discuss the kind of linkage in correlation with the chemical nature of phospholipids.

Etudiant les différentes formes d'associations lipides-protéines dans les fantômes d'érythrocytes, PAPART ET BALLENTINE<sup>1</sup> d'une part et ROELOFSEN *et al.*<sup>2</sup> d'autre part, établissent une distinction entre lipides faiblement et fortement liés dans ces membranes. Leurs conclusions reposent sur les résultats acquis après traitement des fantômes d'érythrocytes par des solvants de polarité croissante.

Le présent travail rapporte les résultats obtenus dans des conditions similaires sur les membranes mitochondriales et le réticulum endoplasmique.

Les membranes mitochondriales sont préparées suivant la technique de LÉVY *et al.*<sup>3</sup>, le réticulum endoplasmique suivant la technique de DALLNER *et al.*<sup>4</sup>. Les teneurs en phospholipides, cholestérol, protéines de ces membranes ont été données et discutées dans un précédent mémoire par LÉVY ET SAUNER<sup>5</sup>. Dans le présent mémoire nous ne donnerons donc que les techniques d'extraction fractionnée des phospholipides de ces membranes par des solvants de polarité croissante.

Les membranes mitochondriales et le réticulum endoplasmique sont lyophilisées dans des conditions standard. Elles sont immédiatement soumises à l'action des solvants pour éviter toute réhydratation. A 1 g de poids sec, on ajoute selon ROELOFSEN *et al.*<sup>2</sup>, 125 ml d'éther anhydre (séché sur sodium). Le mélange est agité, laissé au repos 20 h à la température de la pièce puis centrifugé à 5000 × g. Le surnageant est prélevé et le précipité P<sub>1</sub> est lavé 3 fois avec la même quantité d'éther et recentrifugé. Les surnageants sont réunis et évaporés à sec à basse température. Les extraits à l'éther sont appelés "lipides très faiblement liés". Le précipité P<sub>1</sub> est repris par de l'éther-éthanol (96 %) dans les proportions employées pour l'éther. La suite des opérations est la même. Les extraits à l'éther-éthanol sont appelés "lipides faiblement liés".

Ayant constaté que le précipité P<sub>2</sub>, résultant de la précédente extraction, contenait encore des lipides, nous avons procédé à une troisième extraction selon la

technique de FOLCH *et al.*<sup>6</sup> au chloroforme-méthanol-eau. Ces extraits sont appelés "lipides fortement liés".

Enfin, dans chacune des expériences, nous avons également extraits selon la technique de FOLCH *et al.*<sup>6</sup> "les lipides totaux contenus dans ces membranes".

Dans chacune des fractions ainsi extraites, les lipides sont analysés et dosés comme il a été dit dans réf. 5.

Pour faciliter la compréhension des résultats, nous n'avons pas exprimé ceux-ci en valeur absolue mais en pour-cent des valeurs correspondantes contenues dans l'extrait total.

TABLEAU I

EXTRACTION DU MÉLANGE DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES PAR DES SOLVANTS DE POLARITÉ CROISSANTE

Matériel	% des phospholipides totaux présents dans chaque membrane		
	Extrait à l'éther	Extrait à l'éther-éthanol	Extrait au chloroforme- méthanol-eau
Membrane externe mitochondriale	0.2	89.6	10.2
Membrane interne mitochondriale	3.9	76.9	19.2
Réticulum endoplasmique	7.6	47.1	45.3

Le Tableau I donne le pourcentage par rapport aux phospholipides totaux contenus dans les membranes, du mélange des phospholipides extraits des différents types de membrane par des solvants de polarité croissante. Il représente la moyenne de 5 expériences. Le pourcentage d'erreur calculé à partir de l'erreur standard est inférieur à 10 % dans les deuxième et troisième colonnes et de l'ordre de 20 % dans la première colonne, ce qui se conçoit, compte tenu des très faibles quantités extraites.

L'examen des chiffres permet de constater une action de chacun de ces solvants, ce qui permet de conclure qu'il existe au moins trois formes de liaison des phospholipides, l'une très faible rompue par l'éther, l'autre faible rompue par l'éther-éthanol et la troisième forte rompue par le chloroforme-méthanol-eau. Le pourcentage des phospholipides liés par l'une ou l'autre forme varie toutefois d'une membrane à l'autre. C'est ainsi que les membranes mitochondriales possèdent une très forte proportion de lipides faiblement liés alors que dans le réticulum endoplasmique les proportions de lipides faiblement et fortement liés sont pratiquement équivalentes. On peut également constater que, contrairement aux deux autres membranes, la membrane externe des mitochondries ne possède pas de phospholipides très faiblement liés.

Nous avons cherché à savoir si chacune des fractions mises en évidence correspondait à des entités chimiques différentes de phospholipides. Ces analyses n'ont pu être faites dans le cas de la membrane externe des mitochondries pour laquelle nous disposons d'une trop faible quantité de matériel biologique. Les phospholipides extraits par le chloroforme-méthanol-eau n'ont pu être mesurés expérimentalement, compte tenu du mauvais pouvoir de résolution des plaques de chromatographie. Nous avons dû calculer le taux de phospholipides de cette fraction par différence

TABLEAU II

EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE PAR DES SOLVANTS DE POLARITÉ CROISSANTE

<i>Phospholipides</i>	<i>% du total de chacun des phospholipides</i>		
	<i>Extrait à l'éther</i>	<i>Extrait à l'éther-éthanol</i>	<i>Extrait* au chloroforme-méthanol-eau</i>
Lysophosphatidylcholine	4.0	33.5	62.5
Sphingomyéline	2.0	30.5	67.5
Phosphatidylcholine	2.9	46.0	51.1
Phosphatidylinositol	2.2	16.6	81.2
Phosphatidyléthanolamine + phosphatidylsérine	7.3	67.0	25.7
Acide phosphatique + cardiolipide	1.0	15.5	83.5

\* Les chiffres obtenus dans cette colonne ont été calculés comme il a été dit dans le texte.

TABLEAU III

EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES DE LA MEMBRANE INTERNE MITOCHONDRIALE PAR DES SOLVANTS DE POLARITÉ CROISSANTE

<i>Phospholipides</i>	<i>% de chacun des phospholipides</i>		
	<i>Extrait à l'éther</i>	<i>Extrait à l'éther-éthanol</i>	<i>Extrait* au chloroforme-méthanol-eau</i>
Lysophosphatidylcholine	0.3	0.8	98.9
Sphingomyéline	0.3	43.5	56.2
Phosphatidylcholine	3.3	86.4	13.3
Phosphatidylinositol	—	11.0	89.0
Phosphatidyléthanolamine + phosphatidylsérine	1.3	84.8	13.9
Acide phosphatidique + cardiolipide	1.4	29.4	69.2

\* Les chiffres obtenus dans cette colonne ont été calculés comme il a été dit dans le texte.

entre les phospholipides totaux et la somme de ceux extraits par l'éther et l'éther-éthanol.

Les résultats sont consignés dans les Tableaux II et III. Ils représentent la moyenne de 5 expériences avec une marge d'erreur inférieure à 10 %. De l'examen des chiffres; nous pouvons constater:

(1) Dans ces deux types de membrane, le mélange des acides phosphatidiques et des cardiolipides d'une part et des phosphatidylinositols d'autre part, ne sont pas extraits par l'éther, faiblement extraits par l'éther-éthanol mais sont par contre extraits par des solvants polaires (chloroforme-méthanol-eau).

(2) La lysophosphatidylcholine, surtout dans le cas de la membrane interne, n'est extraite que par des solvants polaires.

(3) Le mélange phosphatidyléthanolamine *plus* phosphatidylsérine est au contraire presque totalement extrait de ces deux membranes par des solvants peu polaires (éther-éthanol).

(4) En ce qui concerne la phosphatidylcholine, le problème est plus complexe

puisque'elle est presque totalement extraite de la membrane interne par des solvants peu polaires alors que dans le réticulum endoplasmique, 50 % reste fortement lié aux membranes.

Les résultats obtenus sur la membrane interne sont en accord avec ceux obtenus sur la mitochondrie par FLEISCHER *et al.*<sup>7</sup>. Utilisant comme solvant l'acétone en milieu aqueux, il distingue des phospholipides faiblement liés (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine) et fortement liés (phosphatidylinositol et cardiolipides).

A quels types de liaison peuvent correspondre ces distinctions entre très faiblement, faiblement et fortement liés? Nous basant sur les conceptions théoriques énoncées par SALEM<sup>8</sup> sur les liaisons lipide-protéine, on peut supposer que les lipides fortement liés pourraient l'être par des forces ioniques intervenant entre protéines basiques et phospholipides acides. Dans cette classification, seuls les cardiolipides et les phosphatidylinositols devraient être fortement liés aux membranes. Or ce n'est pas le cas puisque la lysophosphatidylcholine (phospholipide neutre) est fortement liée et la phosphatidylcholine, également neutre, peut être en partie fortement liée (50 % dans le réticulum endoplasmique). Le problème des forces de liaison est donc plus complexe et ne doit pas être seulement relié à la charge du groupement polaire, comme l'avait déjà souligné VAN DEENEN<sup>9</sup> à propos des érythrocytes. De plus, dans un travail récent, WIRTZ *et al.*<sup>10</sup> montrent que la force de cohésion des lécithines dans les membranes dépend de leur teneur en acides gras essentiels, tels que l'acide arachidonique. L'importance de cet acide est également soulignée par DE PURY ET COLLINS<sup>11</sup> lorsqu'ils étudient les modes d'association de la protéine structurale des mitochondries avec les lécithines.

En ce qui concerne les lipides très faiblement et faiblement liés, on peut supposer qu'ils le sont par des forces, soit de polarisation, soit de type Van der Waals<sup>8</sup>, soit comme l'ont montré récemment SHIPLEY *et al.*<sup>12</sup> et BERGER *et al.*<sup>13</sup>, par des forces de liaison hydrophobe.

TABLEAU IV

EXTRACTION DU CHOLESTÉROL DE DIFFÉRENTS TYPES DE MEMBRANES PAR DES SOLVANTS DE POLARITÉ CROISSANTE

Matériel	‰ du cholestérol total		
	Extrait à l'éther	Extrait à l'éther-éthanol	Extrait* au chloroforme-méthanol-eau
Membrane interne mitochondriale	6.6	56.0	37.4
Réticulum endoplasmique	35.0	4.4	60.6

\* Les chiffres obtenus dans cette colonne ont été calculés comme il a été dit dans le texte.

Enfin le Tableau IV montre que le cholestérol peut se lier différemment suivant le type de membrane (faiblement et fortement lié dans la membrane interne, très faiblement et fortement lié dans le réticulum endoplasmique). Dans les érythrocytes, ROELOFSEN *et al.*<sup>2</sup> n'avait mis en évidence qu'un type de liaison (très faible).

L'ensemble de ces résultats met donc en évidence la complexité des modes

d'association des lipides au sein des membranes, non seulement pour des entités chimiques différentes, mais au niveau d'une même entité chimique.

Ce travail a bénéficié d'une subvention de la D.G.R.S.T.

#### RÉSUMÉ

Utilisant des solvants de polarité croissante, nous avons pu établir qu'il existait au moins trois types de liaisons des phospholipides dans les membranes mitochondriales et le réticulum endoplasmique isolés et purifiés.

La corrélation entre le type de liaison mis en évidence et la nature chimique des phospholipides a été discutée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. K. PAPART ET R. BALLENTINE, dans E. S. G. BARROW, *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, 1952.
- 2 B. ROELOFSEN, J. GIER ET L. L. M. VAN DEENEN, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 63 (1964) 233.
- 3 M. LÉVY, R. TOURY ET J. ANDRÉ, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 599.
- 4 G. DALLNER, P. SIKIEVITZ ET G. PALADE, *J. Cell Biol.*, 30 (1966) 73.
- 5 M. LÉVY ET M. T. SAUNER, *Chem. Phys. Lipids*, 2 (1968) 291.
- 6 M. FOLCH, M. LEES ET G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 266 (1957) 497.
- 7 S. FLEISCHER, G. BRIERLEY, H. KLOUVEN ET D. B. SLAUTERBACK, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3264.
- 8 SALEM, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40 (1962) 1287.
- 9 L. L. M. VAN DEENEN, dans J. JARNEFELT, *Regulatory Functions of Biological Membranes*, Elsevier, Amsterdam, 1968, p. 72.
- 10 K. W. A. WIRTZ, L. M. G. VAN GOLDE ET L. L. M. VAN DEENEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 218 (1970) 176.
- 11 G. G. DE PURY ET F. D. COLLINS, *Chem. Phys. Lipids*, 1 (1966) 1.
- 12 G. G. SHIPLEY, B. B. LESLIE ET D. CHAPMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 1.
- 13 K. U. BERGER, M. D. BARRATT ET U. B. KAMAT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40 (1970) 1273.

*Biochim. Biophys. Acta*, 241 (1971) 97-101