

Biosynthèse des acides gras dans les microsomes de cerveaux de souris.

Serge POLLET, Jean-Marie BOURRE, Gérard CHAIX, Odile DAUDU et Nicole BAUMANN.
Laboratoire de Neurochimie, Hôpital de la Salpêtrière, 75013 Paris.
 (22/9/1972).

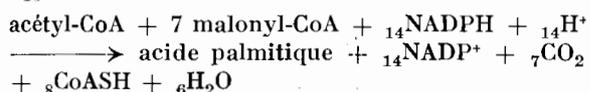
Summary. — The biosynthesis of fatty acids in mouse brain microsomes involves several enzymatic systems :

— One *de novo* system uses acetyl-CoA and malonyl-CoA as substrates. Like the « soluble » fraction, microsomes contain acetyl-CoA carboxylase and malonyl-CoA-decarboxylase ; nevertheless the microsomal synthetase is different from the « soluble » synthetase.

— Two elongation systems, one system using palmitoyl-CoA as substrate yields C_{18} fatty acids, another system using stearyl-CoA yields longer chain fatty acids.

La myéline est un constituant important du système nerveux central. Cette membrane a une teneur élevée en sphingolipides contenant des acides gras à longue chaîne [1, 2, 3]. Les forces de cohésion sont soit des interactions électrostatiques, soit des liaisons « hydrogène » entre lipides et protéines, soit des forces de dispersion de Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées. L'action de ces dernières est d'autant plus forte que les chaînes hydrocarbonées sont plus longues [4, 5, 6, 7]. On comprend alors l'importance de la présence des acides gras à longue chaîne et leur contribution à la stabilisation de la myéline [8, 9].

Il existe deux systèmes principaux de biosynthèse des acides gras : — le premier, de type *de novo*, conduit à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA à des acides gras de chaîne moyenne (C_{16} , C_{18}) [10, 11] selon la réaction globale :



La première « unité C_2 » de l'acide palmitique provient de l'acétyl-CoA, les 14 autres atomes de carbone proviennent du malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par un complexe multienzymatique se trouvant dans la fraction soluble de la cellule.

— Le deuxième processus est moins bien connu. Il allonge les acides gras formés *de novo* par additions successives de deux atomes de carbone provenant soit de l'acétyl-CoA soit du malonyl-CoA. Ce système d'allongement a lieu principalement dans les mitochondries et dans les microsomes [12, 13, 14].

Dans les microsomes de cerveaux de souris, au moment de la myélinisation, on voit apparaître transitoirement les galactolipides caractéristiques de la myéline et leurs acides gras à longue chaîne [15, 16]. Il semble donc que ces microsomes jouent un rôle important dans la biosynthèse de ces lipides myéliniques.

MATERIELS ET METHODES.

Les microsomes cérébraux sont préparés à partir de souris de souche C57, âgées de 18 jours, période d'intense myélinisation.

100 à 200 cerveaux sont homogénéisés au froid dans un tampon saccharose 0,32 M, phosphate de potassium 0,1 M pH 6,9, NaCl 0,9 p. cent. L'homogénat est centrifugé à 17 500 g pendant 30 min (centrifugeuse « Sorvall » RC. 2B) afin d'éliminer les noyaux, débris cellulaires, myéline, synaptosomes, mitochondries et membranes plasmiques [21]. Le surnageant est ensuite centrifugé à 104 000 g pendant 1 h (ultracentrifugeuse « Spinco » L2.50). Le culôt est remis en suspension dans le tampon d'homogénéisation. Une seconde centrifugation à 104.000 g pendant 1 h conduit à la fraction microsomale appelée par la suite « microsomes totaux ».

Cette préparation répond à un certain nombre de critères de pureté [15, 16] :

— vérification par microscopie électronique de l'absence de noyaux, débris cellulaires, myéline, synaptosomes et mitochondries ;

— absence d'activité de la malate-déshydrogénase, enzyme marqueur des mitochondries [22] ;

— absence d'activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, enzyme caractéristique de la fraction soluble de la cellule [23] ;

— absence d'activité de la 5' nucléotidase, enzyme des membranes plasmiques [24] ;

— absence d'activité de la ribonucléoside-2'-3'-cyclique-phosphate-diesterase, enzyme marqueur de la myéline [25].

L'activité enzymatique de biosynthèse des acides gras est testée par incubation des protéines microsomales dans le tampon d'homogénéisation. La concentration en protéines est estimée par la méthode de Lowry [26].

TABLEAU I.
Conditions d'incubation
de la fraction « microsomes totaux ».

Saccharose	272 μ M
Tampon PO_4^{3-}	0,1 M pH 6,9 85 μ M
NaCl	131 μ M
NADPH	500 m μ M
Malonyl-CoA [1-3- 14 C] (1 μ Ci/ μ M)	} 50 m μ M
ou Acétyl-CoA [1- 14 C] (1 μ Ci/ μ M)	
Acyl-CoA (C_{16} ou C_{18})	50 m μ M
Température d'incubation	37°
Durée d'incubation	30 mn
Arrêt de l'incubation	0,5 ml KOH à 15 p. cent dans Méthanol.

Les substrats de la réaction pourront être :

— l'acétyl-CoA [1- 14 C] (4 μ Ci/ μ M ou 1 μ Ci/ μ M) en présence de malonyl-CoA si l'on veut étudier le système de type *de novo*.

— le malonyl-CoA [1-3- 14 C] (4 μ Ci/ μ M ou 1 μ Ci/ μ M) seul si l'on veut étudier son incorporation dans les acides gras endogènes.

— le palmityl-CoA ou le stéaryl-CoA en présence de malonyl-CoA [1-3- 14 C] (1 μ Ci/ μ M) si l'on veut étudier le système d'allongement des acides gras proprement dit.

Les substrats radioactifs sont fournis par N.E.N., les substrats non radioactifs par « Pabst-Laboratory ».

Les acides gras formés dans le milieu d'incubation (1 ml) sont extraits par 2 fois 5 ml d'éther de pétrole (P.E. 40° - 60°) en milieu acide (0.5 ml

BIOCHIMIE, 1973, 55, n° 3.

d'HCl 5,5 N) [1] éventuellement après une hydrolyse alcaline par 0,5 ml de KOH à 15 p. cent dans le méthanol. Les produits radioactifs sont détectés par un compteur à scintillation liquide « Packard », le solvant de scintillation étant constitué par une solution de 2-5 diphényl-oxazol (P.P.O.) 0,4 p. cent et de 1-4 bis [2-(4 méthyl-5-phényloxazolyl)]-benzène (diméthyl POPOP) à 0,03 p. cent dans du toluène.

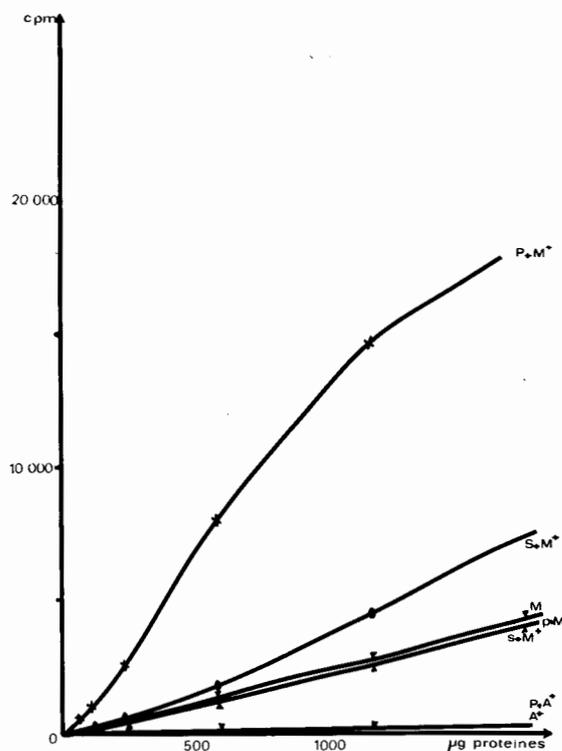


FIG. 1. — Etude de l'incorporation du Malonyl-CoA [1,3- 14 C] dans les microsomes totaux.

Acides libres (C_{16} ou C_{18}) 50 m μ M.

P : Palmityl-CoA. p : acide palmitique.

S : Stéaryl-CoA. s : acide stéarique.

M⁺ : Malonyl-CoA [1,3- 14 C].

A⁺ : Acétyl-CoA [1- 14 C] seul ou en présence d'Acyl-CoA (C_{16} ou C_{18}).

RESULTATS.

1) Etude enzymatique de la fraction « microsomes totaux ».

L'étude des différents systèmes de biosynthèse des acides gras a été entreprise sur la préparation de « microsomes totaux ». Les conditions d'incubation sont résumées dans le tableau I. Il en résulte que :

a) Dans les « microsomes totaux » le malonyl-CoA est incorporé ; l'acétyl-CoA seul n'est pas un

substrat réactionnel de biosynthèse des acides gras dans ces conditions d'incubation. De même, en présence d'acyl-CoA, ces derniers ne sont pas allongés par l'acétyl-CoA (fig. 1).

b) Les dérivés acyl-CoA sont allongés en présence de malonyl-CoA. Seuls ces derniers sont énergétiquement valables. En effet, si l'on étudie l'activité enzymatique en présence de 50 μM d'acides gras « libres » (C_{16} - C_{18}) au lieu de 50 μM d'acyl-CoA, en fonction de la concentration en protéines, on constate que (fig. 1) :

— ces acides gras « libres » ne sont certainement pas des substrats d'allongement puisque l'activité enzymatique est confondue avec celle obtenue en présence de malonyl-CoA seul.

— Le palmityl-CoA est un substrat plus actif que le stéaryl-CoA. Ces deux substrats semblent présenter un comportement enzymatique différent.

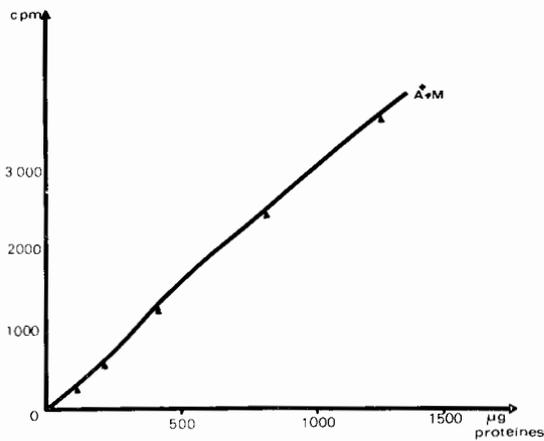


FIG. 2. — Incorporation de l'Acétyl-CoA [1- ^{14}C] (4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$) en présence de Malonyl-CoA.

M : Malonyl-CoA.
A⁺ : Acétyl-CoA 1- ^{14}C .

c) Enfin, le malonyl-CoA seul est incorporé. Cette incorporation peut être due soit à un allongement des acides gras endogènes, soit à une réaction du type synthèse *de novo* après décarboxylation partielle en acétyl-CoA, soit aux deux types de réaction.

Il existe, en effet, une réaction enzymatique analogue à celle observée dans le surnageant de centrifugation des microsomes contenant le complexe synthétasique *de novo*. Si l'on incube les microsomes en présence d'acétyl-CoA [1- ^{14}C] et de malonyl-CoA, l'activité enzymatique en fonction de la concentration en protéines (fig. 2) n'est pas

négligeable. Il ne peut s'agir d'une éventuelle carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA puisque, dans ces conditions d'incubation, l'acétyl-CoA seul n'est pas incorporé dans les microsomes. La possibilité d'une décarboxylation du malonyl-CoA n'est donc pas à écarter.

L'activité enzymatique d'incorporation du malonyl-CoA seul est relativement faible. Elle n'est pas négligeable si on la compare à l'activité d'incorporation du malonyl-CoA en présence de stéaryl-CoA.

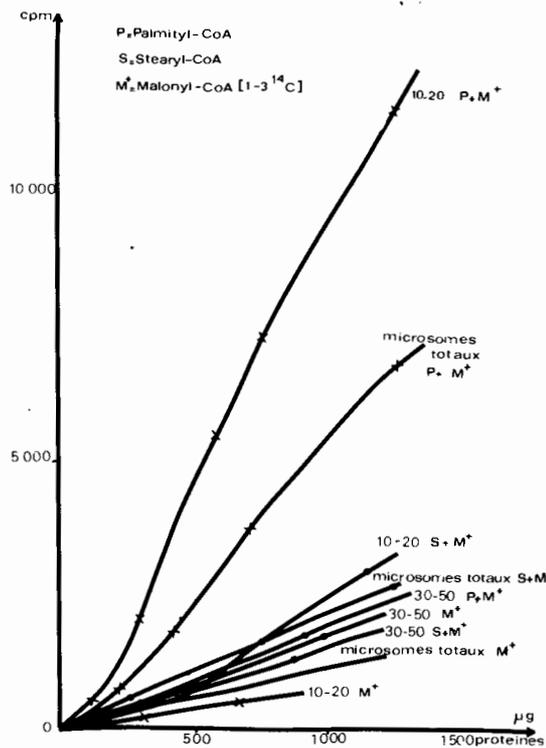


FIG. 3. — Incorporation du Malonyl-CoA [1.3- ^{14}C] seul ou en présence d'Acyl-CoA sur diverses « coupes » au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

P : Palmityl-CoA.
S : Stéaryl-CoA.
M : Malonyl-CoA [1.3- ^{14}C].

2) Purification des microsomes.

Les protéines sont sélectivement précipitées par addition d'une quantité connue d'une solution de sulfate d'ammonium saturée (« coupes » au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) [2]. Les conditions d'incubation étant les mêmes que pour les microsomes totaux, cette technique a permis de mettre en évidence deux fractions enzymatiques différentes :

— une fraction enzymatique appelée « 10-20 p. cent » c'est-à-dire précipitant lorsque le

pourcentage de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ passe de 10 à 20 p. cent. Cette fraction conduit à l'activité enzymatique maximum d'incorporation du malonyl-CoA en présence d'acyl-CoA (fig. 3 et 4). Dans cette fraction il existe également une activité en présence d'acétyl-CoA [$1\text{-}^{14}\text{C}$] et de malonyl-CoA, mais elle est minime.

— Une fraction enzymatique appelée « 30-50 p. cent », c'est-à-dire précipitant lorsque le pourcentage de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ passe de 30 à 50 p. cent. Elle présente une activité maximum d'incorporation du malonyl-CoA seul et d'acétyl-CoA [$1\text{-}^{14}\text{C}$] en présence de malonyl-CoA (fig. 3 et 4). L'activité d'allongement pourrait être

3) Etude enzymatique de la fraction « 10-20 p. cent ».

L'étude des différents systèmes a été entreprise en faisant varier les conditions d'incubation : durée, température, force ionique, pH, concentrations en cofacteurs et substrats. Les expériences ont permis de dégager les résultats suivants :

a) Dans le but d'obtenir séparément, dans la fraction « 10-20 p. cent », l'activité d'incorporation du malonyl-CoA en présence d'acétyl-CoA, activité apparemment de type *de novo*, on peut éviter d'hydrolyser. En effet, si les produits de l'activité d'allongement des acides gras semblent être membranaires [3], ceux de la synthétase *de novo* pourraient ne pas l'être, en admettant que cette activité soit identique dans les microsomes et dans leur surnageant.

Lors de l'étude des « microsomes totaux » l'incubation est arrêtée par 0,5 ml de KOH à 15 p. cent dans le méthanol par ml d'incubat, l'extraction des acides gras se faisant par l'éther de pétrole après passage en milieu acide. On évite l'hydrolyse alcaline sur la fraction « 10-20 p. cent » en arrêtant l'incubation par 0,5 ml d'HCl 5,5 N.

La comparaison, entre la radioactivité extraite après arrêt par HCl et après hydrolyse alcaline, montre qu'il existe deux pools d'acides gras synthésés.

— l'un, intéressant les longues chaînes exogènes ou endogènes, semble lié aux membranes. En effet, l'incubation du malonyl-CoA seul ou en présence d'acyl-CoA, arrêtée par HCl, fournit, après extraction par l'éther de pétrole, environ le 1/4 de la radioactivité totale. Après cette extraction, une hydrolyse alcaline de l'incubat conduit aux 3/4 restants. Cette radioactivité totale est la somme des cpm obtenus après arrêt par HCl puis après hydrolyse alcaline.

— le 2^e pool d'acides gras obtenu, à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, semble beaucoup moins lié aux membranes. La radioactivité totale se répartit à part égale entre l'extrait après arrêt par HCl et l'extrait après arrêt par HCl puis méthanolyse.

Enfin, on constate qu'une heure d'hydrolyse alcaline à 100° de l'incubat « 10-20 p. cent » fournit la même radioactivité qu'après hydrolyse à froid par KOH et extraction immédiate par l'éther de pétrole. L'hydrolyse alcaline semble donc instantanée. Si elle n'est pas complète, les acides gras restant fixés aux membranes sont fortement liés, puisqu'ils résistent à toute tentative d'extraction.

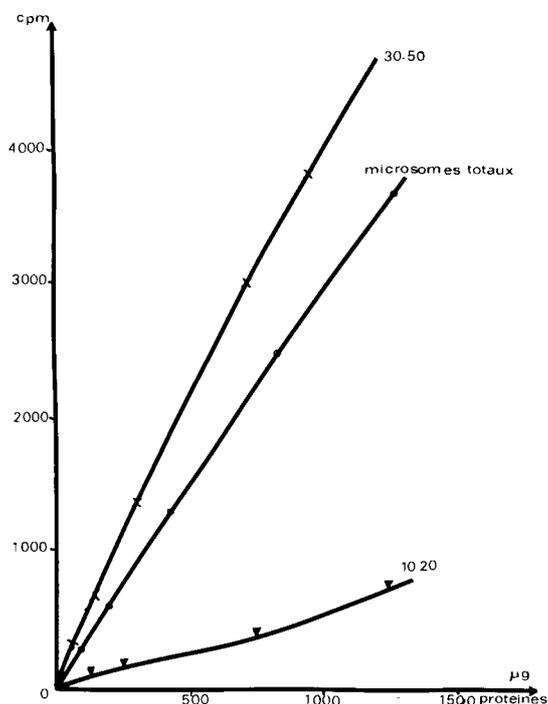


FIG. 4. — Incorporation du Malonyl-CoA en présence d'Acétyl-CoA [$1\text{-}^{14}\text{C}$] ($4\ \mu\text{Ci}/\mu\text{M}$) dans diverses « coupes au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ».

nulle en présence de stéaryl-CoA puisque l'incorporation du malonyl-CoA, associée au stéaryl-CoA, est inférieure à celle observée en présence de malonyl-CoA seul.

La fraction « 10-20 p. cent » va donc permettre d'étudier préférentiellement l'activité enzymatique d'allongement, la fraction « 30-50 p. cent » renseignera sur l'activité de type *de novo*.

b) Des expériences de pré-incubation de la fraction « 10-20 p. cent », à des températures variables allant de 37° à 60° pendant des temps allant de 5 min à 30 min, ont permis d'étudier la stabilité des différents systèmes (fig. 5). Le plus stable est celui mettant en jeu l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA. Le système d'incorporation du malonyl-CoA en présence de palmityl-CoA est plus stable qu'en présence de stéaryl-CoA.

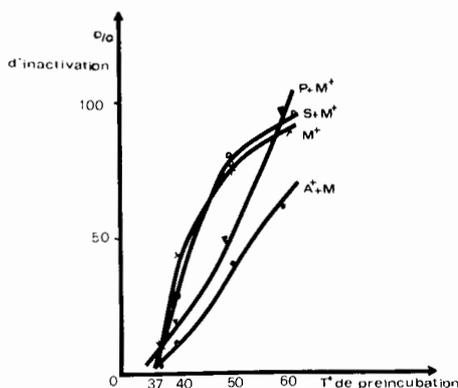


Fig. 5. — Inactivation des différents systèmes en fonction de la température de pré-incubation.

P : Palmityl-CoA.
 S : Stéaryl-CoA.
 M⁺ : Malonyl-CoA [1.3-¹⁴C] (1 μCi/μM).
 M : Malonyl-CoA.
 A⁺ : Acétyl-CoA [1-¹⁴C] (4 μCi/μM).

c) L'étude des cinétiques de réaction (tableau II) a montré que :

— l'incorporation du malonyl-CoA en présence de palmityl-CoA est plus rapide qu'en présence de stéaryl-CoA.

TABLEAU II.

Cinétique des réactions de biosynthèse des acides gras dans la fraction « 10-20 p. cent ».

Réactions	Vo
Palmityl-CoA + Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C].....	1300
Stéaryl-CoA + Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C].....	190
Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C].....	50
Acétyl-CoA [1- ¹⁴ C] + Malonyl-CoA.....	35

Vo : vitesse initiale : quantité de produits (coups par minute) par mg de protéines et par minute.

— De même, l'incorporation du malonyl-CoA seul a une cinétique différente de celle observée en présence d'acétyl-CoA.

d) L'étude des autres conditions d'incubation est résumée dans le tableau III. On remarque en plus que :

— une concentration en ions PO₄³⁻ supérieure à 170 μM inhibe l'allongement du palmityl-CoA

TABLEAU III.

Influence des conditions d'incubation sur la fraction « 10-20 p. cent ».

Maximum d'activation par :	Palmityl-CoA + Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	Stéaryl-CoA + Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	Acétyl-CoA [1- ¹⁴ C] + Malonyl-CoA
Force ionique (PO ₄ ³⁻)	170 μM	peu sensible	peu sensible	peu sensible
Température	34°	37°	40°	40°
pH	6,7	7,0	7,3	6,9
NADPH	15 mμ M	10 mμ M	pas d'influence de 1 mμ M à 1000 mμ M	pas d'influence de 1 mμ M à 1000 mμ M
P. cent d'activation par le NADPH	750	400	170	240
NADP	250 mμ M	100 mμ M	pas d'influence de 10 mμ M à 1000 mμ M	pas d'influence de 10 mμ M à 1000 mμ M
P. cent d'activation par le NADH	370	90	110	56
Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	100 mμ M	75 mμ M	50 mμ M	—
Acyl-CoA	15 mμ M	8 mμ M	—	—
A.T.P.	2 μ M	2 μ M	2 μ M	pas d'influence de 0,5 μ M à 20 μ M
P. cent activation par l'ATP	29	120	690	0

Conditions établies pour 300 μg de protéines.

alors qu'elle a peu d'influence sur les autres systèmes.

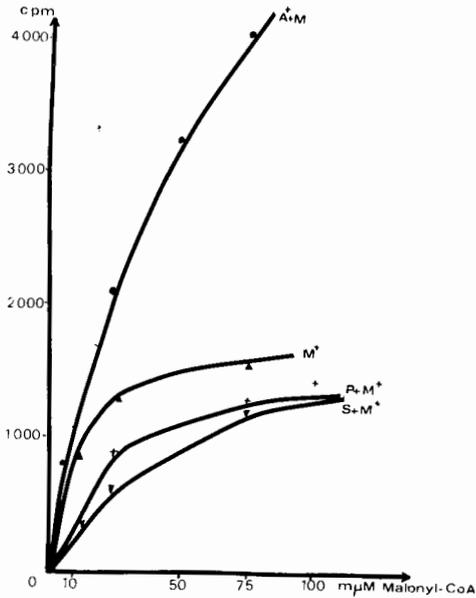


Fig. 6. — Incorporation du Malonyl-CoA dans la fraction « 30-50 % », l'incubation étant arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N.

Protéines 600 μg.

A⁺ : Acétyl-CoA [1-¹⁴C] (4 μCi/μM).

M⁺ : Malonyl-CoA [1.3-¹⁴C] (1 μCi/μM).

M : Malonyl-CoA.

P : Palmityl-CoA.

S : Stéaryl-CoA.

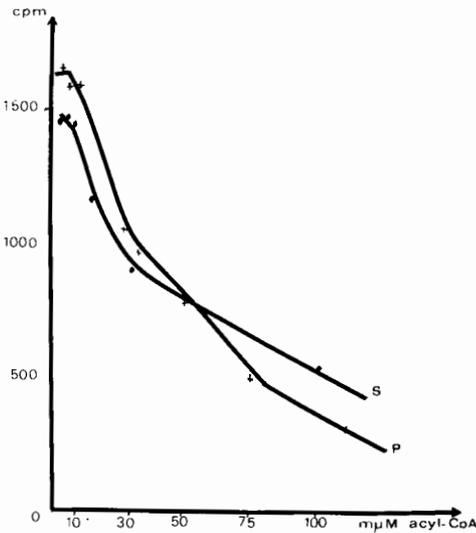


Fig. 7. — Inhibition de l'incorporation du Malonyl-CoA par les Acyl-CoA dans la fraction « 30-50 % ». L'incubation est arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N.

Protéines 680 μg.

P : Palmityl-CoA.

S : Stéaryl-CoA.

— le NADH, lorsqu'il est associé au NADPH, n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de la fraction « 10-20 p. cent », même pour des concentrations en NADH très supérieures à celles du NADPH.

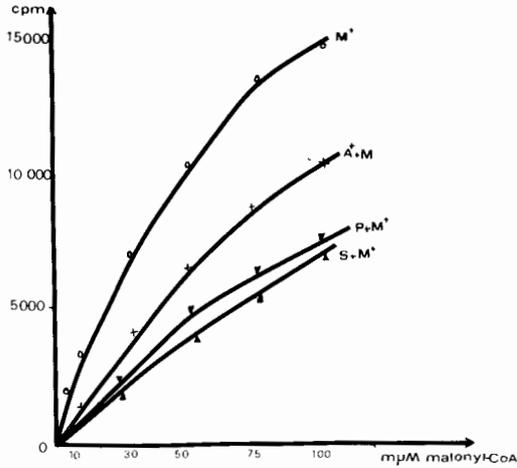


Fig. 8. — Incorporation du Malonyl-CoA dans la fraction « S-25-35 % ». L'incubation étant arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N.

Protéines 1000 g.

P : Palmityl-CoA.

M : Malonyl-CoA.

S : Stéaryl-CoA.

A⁺ : Acétyl-CoA [1-¹⁴C] (1 μCi/μM).

M⁺ : Malonyl-CoA [1.3-¹⁴C] (1 μCi/μM).

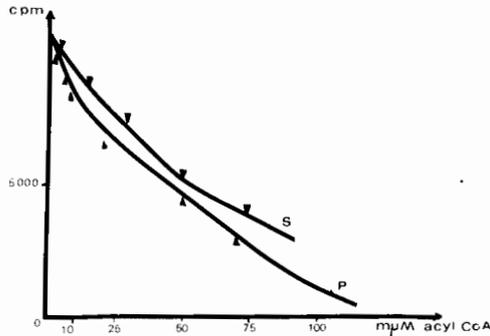


Fig. 9. — Inhibition de l'incorporation du Malonyl-CoA par les Acyl-CoA (C₁₆ ou C₁₈) dans la fraction « S-25-35 % ». L'incubation étant arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N.

Protéines 840 μg.

P : Palmityl-CoA.

S : Stéaryl-CoA.

M⁺ : Malonyl-CoA [1.3-¹⁴C].

— un excès d'acyl-CoA est fortement inhibiteur de l'activité d'allongement aussi bien du palmityl-CoA que du stéaryl-CoA.

— enfin, l'influence de l'A.T.P. se fait surtout sentir sur l'incorporation du malonyl-CoA seul.

e) Il en résulte qu'il semble bien exister deux systèmes enzymatiques d'allongement des acyl-CoA, l'un en présence de palmityl-CoA, l'autre en présence de stéaryl-CoA [27, 28]. D'autre part, l'incorporation du malonyl-CoA seul présente des conditions d'activité maxima différentes de celles obtenues en présence d'acyl-CoA ou d'acétyl-CoA.

4) Etude enzymatique de la fraction « 30-50 p. cent ».

Cette fraction est souillée par une légère activité d'allongement principalement en présence de palmityl-CoA. Contrairement à la fraction « 10-

d'acétyl-CoA — est du même type que celle observée dans la fraction soluble de la cellule. Ainsi les résultats obtenus sur la fraction « 30-50 p. cent » seront-ils comparés à ceux obtenus sur une fraction enzymatique purifiée de la fraction soluble (surnageant de centrifugation des microsomes).

Cette dernière fraction est obtenue par précipitation fractionnée des protéines en présence de $SO_4(NH_4)_2$, lorsque le pourcentage de saturation passe de 25 p. cent à 35 p. cent [29]. Cette fraction sera appelée « S. 25-35 p. cent ». Son incubation est arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N. Dans ces conditions comme la fraction microsomale « 30-50 p. cent », « S. 25-35 p. cent » présente, en plus de

TABLEAU IV.

Comparaison des conditions d'incubation optima pour les fractions « 30-50 p. cent » et « S-25-35 p. cent ».

Maximum d'activation par	"30-50 p. cent"		"S. 25-35 p. cent"	
	Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	Acétyl-CoA [1- ¹⁴ C] + Malonyl-CoA	Malonyl-CoA [1.3- ¹⁴ C]	Acétyl-CoA [1- ¹⁴ C] + Malonyl-CoA
Force ionique (PO_4^{3-})	peu d'influence	90 μ M	peu d'influence	peu d'influence
Température	37°	40°	40°	41°
pH	7,3	6,9	6,75	6,55
NADPH	30 m μ M	40 m μ M	30 m μ M	40 m μ M
% activation par le NADPH	700	160	absolument indispensable > 2000	indispensable > 1500
Malonyl-CoA	50 m μ M	30 m μ M	80 m μ M	15 m μ M
Acétyl-CoA [1- ¹⁴ C]	—	25 m μ M	—	10 m μ M
ATP	peu d'influence	peu d'influence	peu d'influence	peu d'influence

Conditions établies pour 300 μ g de protéines.

20 p. cent », l'activité d'allongement n'est pas mise en évidence si l'on évite d'hydrolyser par KOH. L'incubation est donc arrêtée par 0,5 ml d'HCl 5,5 N. L'étude de l'incorporation du malonyl-CoA en fonction de la concentration de ce substrat montre que :

— les courbes obtenues en présence de palmityl-CoA et de stéaryl-CoA sont confondues et en-dessous de la courbe obtenue en présence de malonyl-CoA seul (fig. 6).

— L'incorporation du malonyl-CoA est inhibée par un excès d'acyl-CoA (fig. 7).

La fraction « 30-50 p. cent » sera étudiée comme la fraction « 10-20 p. cent » en faisant varier les conditions d'incubation. Toutefois, l'activité enzymatique principale de cette fraction — incorporation du malonyl-CoA en présence

l'incorporation du malonyl-CoA en présence d'acétyl-CoA, une incorporation de malonyl-CoA seul (fig. 8). L'étude de cette dernière activité en fonction de la concentration en malonyl-CoA et l'inhibition par les acyl-CoA (fig. 9) conduit à penser que l'allongement est également inexistant dans cette fraction.

Les conditions d'incubation seront donc étudiées de façon comparative entre les deux fractions « 30-50 p. cent » et « S. 25-35 p. cent ». Les résultats sont résumés dans le tableau IV.

DISCUSSION.

Dans les microsomes de cerveaux de souris, les acides gras peuvent être synthétisés de façon *de novo* comme dans la fraction soluble de la cellule, à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Ces acides gras peuvent être également allongés en

chaînes plus longues. Lorsque l'on compare les activités d'allongement et de synthétase de type *de novo* on constate que ces deux activités sont également importantes (tableau V).

Il a en effet été montré [31] que les acyl-CoA (50 μ M), en présence de 100 μ g de protéines microsomales, sont transformés à 90 p. cent en acides gras libres et 10 p. cent en acyl-membranes.

TABLEAU V.

Comparaison des activités d'allongement et de synthétase de type *de novo*.

Pour 1000 μ g de protéines	Palmityl-CoA + Malonyl-CoA [1,3- 14 C] (" 10-20 p. cent ")	Stéaryl-CoA + Malonyl-CoA [1,3- 14 C] (" 10-20 p. cent ")	Malonyl-CoA [1,3- 14 C] (" 30-50 p. cent ")	Acétyl-CoA [1- 14 C] + Malonyl-CoA (" 30-50 p. cent ")
Acides gras formés (coups par minute)	9500	2100	400	7000 (*)

(*) L'activité est rapportée au Malonyl-CoA en supposant valable l'équation classique
 Acétyl-CoA [1- 14 C] + 7 Malonyl-CoA \longrightarrow C₁₆ COOH.

Les « coupes » au SO₄ (NH₄)₂ ont permis de mettre en évidence :

a) deux systèmes enzymatiques d'allongement des acides gras, l'un à partir du palmityl-CoA, l'autre à partir du stéaryl-CoA. Ces deux systèmes utilisent comme substrats, uniquement le malonyl-CoA et non l'acétyl-CoA. Une étude des produits de la réaction effectuée sur la préparation de « microsomes totaux » montre que le premier système conduit à la formation de C₁₈, le deuxième conduit aux acides gras à chaîne plus longue (C₂₄) [27].

b) Une incorporation de malonyl-CoA seul, qui peut être due soit à un allongement des acides gras endogènes, soit à une réaction de synthétase de type *de novo* par l'intermédiaire d'une malonyl-CoA-décarboxylase transformant le malonyl-CoA en acétyl-CoA. Or, il existe une enzyme, la phosphotransacétylase (P.T.A.), spécifique de l'acétyl-CoA, hydrolysant rapidement ce dernier en acétate, en présence d'arséniate [30]. L'incubation de la fraction « 10-20 p. cent » en présence de P.T.A., entraîne une très forte diminution de l'activité d'incorporation du malonyl-CoA en présence d'acétyl-CoA, alors que l'incorporation du malonyl-CoA seul n'est pas affectée. Cette dernière activité est donc essentiellement une activité d'allongement des acides gras endogènes puisque le malonyl-CoA n'est pas transformé en acétyl-CoA. La différence de comportement de ce système par rapport à celui observé en présence d'acyl-CoA tendrait à distinguer, dans un milieu biologique, l'effet de substrats naturels (acides gras membranaires) et de substrats « artificiels » (acyl-CoA).

Si l'on suppose que le substrat naturel est ce complexe acyl-membrane (acides gras liés aux membranes) on peut expliquer les différences de comportement du malonyl-CoA lors de son incorporation seul ou en présence d'acyl-CoA par l'intervention, dans le cas d'un substrat artificiel (acyl-CoA), d'une autre enzyme, une thiolase, parallèlement à l'enzyme de biosynthèse des acides gras.

Cette hypothèse pourrait également expliquer les faibles rendements (de l'ordre de 1 à 2 p. cent) des réactions enzymatiques, puisque 90 p. cent des acyl-CoA sont transformés en acides gras libres, substrats inactifs pour l'allongement.

L'incubation de la fraction « 30-50 p. cent » et de la fraction « S. 25-35 p. cent », en présence de P.T.A., entraîne une perte quasi totale de l'activité enzymatique d'incorporation du malonyl-CoA en présence d'acétyl-CoA. En présence de malonyl-CoA seul, dans les deux fractions, microsomales et solubles, on note une perte d'activité de l'ordre de 90 p. cent. L'incorporation du malonyl-CoA seul, dans ces deux fractions, se fait donc essentiellement par l'intermédiaire d'une malonyl-CoA-décarboxylase, transformant le malonyl-CoA en acétyl-CoA. La réaction de type *de novo* prend ensuite le relais.

c) L'étude comparative des deux systèmes microsomaux et solubles permet d'affirmer que, dans les deux cas, il existe une synthétase de type *de novo* utilisant comme substrat l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA. Ces deux enzymes ont des comportements différents. Il ne peut donc être question d'une même enzyme microsomale passant dans la fraction soluble au cours des différentes manipulations.

d) Enfin, si l'on étudie la présence dans les microsomes de l'acétyl-CoA carboxylase, mise en évidence par Wakil dans la fraction soluble de la cellule [32] par incubation en présence de 50 μM de NaHCO_3 , MnCl_2 1 μM et 10 μM d'ATP, on constate que cette enzyme se trouve dans les microsomes, et en particulier dans la fraction « 10-20 p. cent ». Les microsomes présentent donc, outre une malonyl-CoA décarboxylase, une acétyl-CoA-carboxylase et ces deux enzymes sont certainement différentes puisqu'elles sont situées dans deux fractions distinctes « 10-20 p. cent » d'une part, « 30-50 p. cent » d'autre part.

Remerciements.

Nous tenons à remercier M^{me} le Docteur B. Berger, qui a bien voulu contrôler, en microscopie électronique, la pureté de nos préparations.

Ce travail a pu être effectué grâce à l'I.N.S.E.R.M., la D.G.R.S.T. et la D.R.M.E.

RÉSUMÉ.

La biosynthèse des acides gras dans les microsomes de cerveaux de souris met en jeu plusieurs systèmes enzymatiques.

— Un système de synthèse de type *de novo* en présence d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Ce système, tout comme celui étudié dans la fraction soluble de la cellule, fait intervenir une acétyl-CoA-carboxylase et une malonyl-CoA-décarboxylase. Le comportement de cette synthétase de type *de novo* est cependant différent de celui de la fraction soluble. Il s'agit donc de deux enzymes différentes.

— Deux systèmes d'allongement, l'un à partir du palmitoyl-CoA forme des acides gras en C_{16} , l'autre à partir du stéaryl-CoA conduit aux acides gras à chaîne plus longue.

BIBLIOGRAPHIE.

- O'Brien, J. S. & Sampson, E. L. (1965) *J. Lipid. Res.*, **6**, 537-544.
- Norton, W. T. & Autilio, L. A. (1966) *J. Neurochem.*, **13**, 213-222.
- Pilz, M. & Mehl, E. (1966) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **346**, 306-309.
- O'Brien, J. S. (1965) *Science*, **147**, 3662, 1099-1107.
- Schmitt, F. O., Bear, R. S. & Palmer, K. J. (1941) *J. Cell. Comp. Physiol.*, **18**, 31-42.
- Finean, J. B. (1953) *Exp. Cell. Res.*, **5**, 202-215.
- Finean, J. B. & Burge, R. E. (1963) *J. Mol. Biol.*, **7**, 672-682.
- O'Brien, J. S., Sampson, E. L. & Stern, M. B. (1967) *J. Neurochem.*, **14**, 357-365.
- Van Den Heuvel, F. A. (1963) *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **40**, 455-471.
- Majerus, P. W. & Vagelos, P. R. (1967) *Advan. Lipid. Res.*, **5**, 1-33.
- Brady, R. O. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 11, 3099-3103.
- Harlan, W. R. Jr. & Wakil, S. J. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 2, 131-135.
- Harlan, W. R. Jr. & Wakil, S. J. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 10, 3216-3223.
- Holloway, P. W. & Wakil, S. J. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 8, 2489-2495.
- Bourre, J. M., Pollet, S., Daudu, O. & Baumann, N. (1972) *Cr. Acad. Sci.*, **274 D.**, 2100-2103.
- Bourre, J. M., Pollet, S., Daudu, O. & Bauman, N. (1972) *Brain Res.*, (sous presse).
- Norton, W. T. & Autilio, L. A. (1965) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **122**, 77-85.
- Kishimoto, Y., Davies, W. E. & Radin, N. S. (1965) *J. Lipid. Res.*, **6**, 532-536.
- Mandel, P. & Bieth, R. (1951) *Bull. Soc. Chim.*, **33**, 973-981.
- Folch, J. (1965) *Biochemistry of the developing nervous System* (H. Waelsch) Academic Press. N.Y., 121-136.
- Lippel, K. & Mead, J. F. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 669-680.
- Englard, S. & Siegel, L. (1969) *Methods in Enzymology*, **XIII**, 99-100.
- Kornberg, A. & Horecker, B. L. (1955) *Methods in Enzymology*, **I**, 323-324.
- Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rumke, Ph. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 126-145.
- Drumond, C. J., Eng, D. Y. & McIntosh, C. A. (1971) *Brain Res.*, **28**, 153-163.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Pollet, S., Bourre, J. M., Daudu, O. & Baumann, N. (1971) *Cr. Acad. Sci.*, **273 D.**, 1426-1429.
- Bourre, J. M., Pollet, S., Dubois, G. & Baumann, N. (1970) *Cr. Acad. Sci.*, **271 D.**, 1221-1223.
- Pollet, S., Bourre, J. M. & Baumann, N. (1969) *Cr. Acad. Sci.*, **268 D.**, 2146-2149.
- Stadtman, E. R. (1957) *Methods in Enzymology*, **III**, 931-941.
- Pollet, S., Bourre, J. M., Daudu, O. & Baumann, N. (1971) *Cr. Acad. Sci.*, **273 D.**, 1632-1635.
- Wakil, S. J. (1963) *Methods in Enzymology*, **VI**, 540-544.