

BIOCHIMIE. — *Etude de la biosynthèse de novo des acides gras dans le cerveau de souris normales, « quaking » et hétérozygotes pour le caractère « quaking ».*  
 Note (\*) de MM. Serge Pollet, Jean-Marie Bourre et M<sup>lle</sup> Nicole Baumann, présentée par M. Jean Roche.

La biosynthèse *de novo* des acides gras a été étudiée dans la fraction soluble du tissu cérébral chez les souris de la souche C 57 normales, « quaking » et hétérozygotes pour le caractère « quaking ».

Les souris « quaking » sont atteintes d'une maladie héréditaire caractérisée par un défaut de myélinisation du système nerveux central. L'analyse des lipides du cerveau a montré une diminution de la teneur en acides gras non hydroxylés à longue chaîne, C 24 principalement [(<sup>1</sup>), (<sup>2</sup>)]. Cette anomalie pourrait être expliquée par un blocage enzymatique en relation avec la biosynthèse des acides gras.

Le cerveau est le seul organe à produire en grande quantité des acides gras à longue chaîne dont le mode de formation est mal connu. Un complexe multi-enzymes (la synthétase) fabrique *de novo*, chez le rat, principalement de l'acide palmitique (<sup>3</sup>), qui serait ensuite repris par un autre système pour être allongé.

Afin de déterminer les acides gras qui serviront de substrats dans le système d'allongement, nous avons étudié la synthétase et ses produits dans le cerveau des souris de la souche C 57 normales, « quaking » et hétérozygotes pour le caractère « quaking ».

I. MÉTHODES. — 1. *Préparation de l'enzyme.* — On utilise des lots de souris de 21 jours, âge correspondant normalement à une période d'intense myélinisation.

Les cerveaux, après élimination du sang, sont immédiatement homogénéisés dans un tampon Tris, HCl 0,05 M-Saccharose 0,25 M-2 Mercapto-éthanol 0,01 M-pH 7,4 (<sup>3</sup>). Les fragments cellulaires et les mitochondries sont éliminés par centrifugation à 48 200 g pendant 30 mn à + 4 °C, et les microsomes, par centrifugation du surnageant, à 100 000 g pendant 1 h. Les protéines sont ensuite précipitées par une « coupe » au Sulfate d'Ammonium comprise entre 25 et 35 % de saturation. Cette fraction protéique est purifiée par un passage sur gel de Phosphate de Calcium ( $\frac{\text{gel en mg}}{\text{protéines en mg}} = 4$  — élution par  $\text{PO}_4^{3-}$  0,05 M).

2. *L'incubation* est effectuée en présence d'Acétyl-CoA 1-<sup>14</sup>C (1  $\mu\text{C}/\mu\text{M}$ ) et les acides gras radio-actifs sont extraits par de l'éther de pétrole. L'activité de la synthétase est déduite de la quantité d'acides gras formés.

La préparation enzymatique présente une activité maximale lorsqu'elle est incubée à 41 °C pendant 30 mn. Les conditions optimales sont les suivantes : tampon  $\text{PO}_4^{3-}$  M pH 6,5 50  $\mu\text{M}$ , 2 Mercaptoéthanol 0,1 M 2,5  $\mu\text{M}$ , NADPH 0,001 M 100  $\text{m}\mu\text{M}$ , Malonyl-CoA 0,001 M 50  $\text{m}\mu\text{M}$ , Acétyl-CoA 0,001 M 7  $\text{m}\mu\text{M}$ , protéines 70  $\mu\text{g}$ , H<sub>2</sub>O q. s. p. 1 ml.

3. *Etude du produit de la réaction.* — Les acides gras radio-actifs, extraits du milieu d'incubation, sont méthylés en présence de BF<sub>3</sub> (<sup>4</sup>). L'extraction par l'éther de pétrole entraînant partiellement des dérivés du Coenzyme A, leurs produits

d'oxydation et de dégradation sont séparés des esters méthyliques par chromatographie sur plaque de gel de silice H (solvant, 20 % d'éther dans l'éther de pétrole ; révélateur : rhodamine) <sup>(2)</sup>. Ces esters contenant toute la radio-activité sont repris par le pentane et chromatographiés en phase gazeuse sur colonne de « SE 52 » (10 % sur Aéropak 30 100/120), en programmation de température de 200 °C à 300 °C. La longueur de chaîne des acides gras formés est déterminée à l'aide de produits de référence.

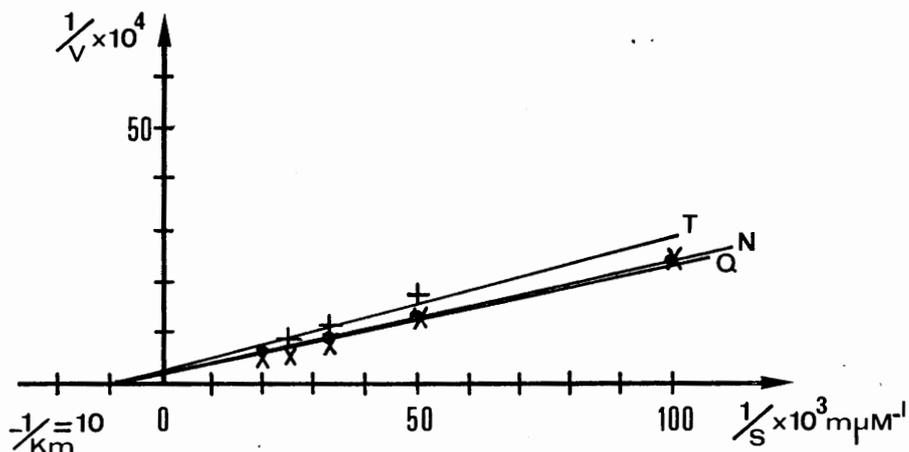


Fig. 1. — Détermination du Km pour le Malonyl-CoA

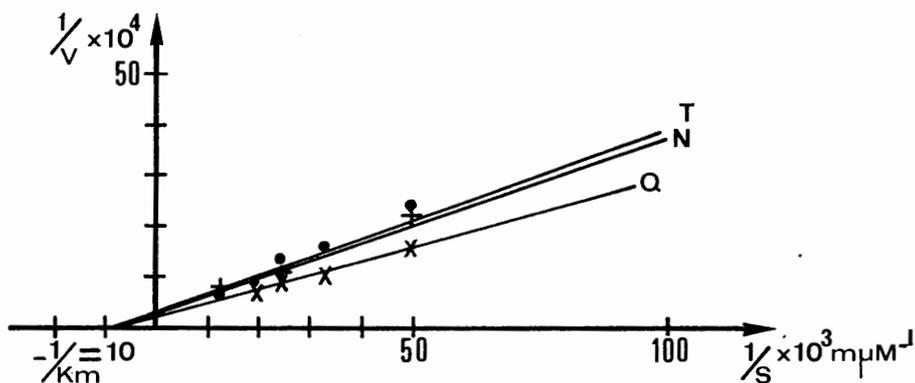


Fig. 2. — Détermination du Km pour le NADPH

La chromatographie sur plaque de « MN cellulose » du produit de l'incubation non méthyliqué (solvant : acétate de sodium 0,1 M pH 4,5-éthanol 1/1 ; révélateurs : Nitroprussiate de Sodium-Soude méthanolique-Rhodamine) <sup>(5)</sup> permet de séparer les acides gras libres de leurs dérivés Acyl-CoA.

II. RÉSULTATS. — Après méthylation du produit d'incubation chez les souris normales, la chromatographie en phase gazeuse montre qu'il s'agit principalement d'ester de l'acide palmitique (C 14, 15 %-C 18, 10 %) (fig. 4 et 5). La chromatographie sur plaque de « MN cellulose » prouve que le produit de la biosynthèse de

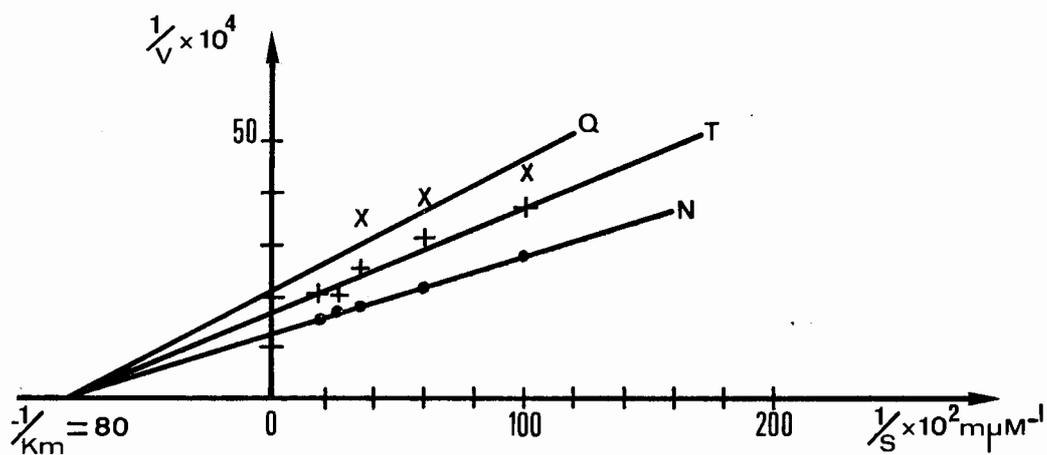
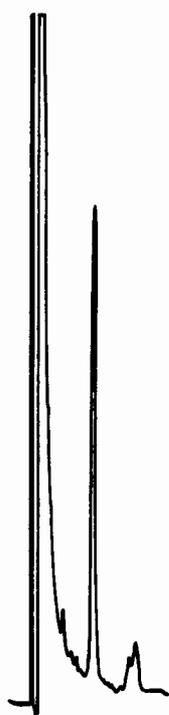


Fig. 3. — Détermination du Km pour l'Acétyl-CoA

Fig. 4 C<sub>14</sub> C<sub>16</sub> C<sub>18</sub>

Produit de la Synthétase

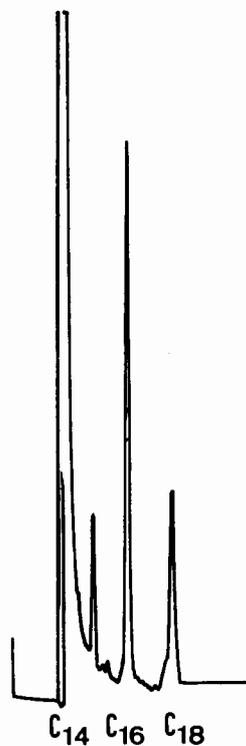


Fig. 5

Produit de la Synthétase + Mélange F

Fig. 4. — Chromatographie en phase gazeuse sur colonne de SE 52 (10 % Aéropak 30 100/120) des esters méthyliques d'acides gras, produits de la biosynthèse *de novo* chez les souris homozygotes normales

Fig. 5. — Co-chromatographie des produits de la biosynthèse *de novo* chez les souris homozygotes normales avec le mélange F (mélange standard des acides en C 14, C 16, C 18)

*nov*o est l'acide gras libre et non le Palmityl-CoA. Enfin, la stœchiométrie de la réaction  $\text{Acétyl-CoA} + 7 \text{ Malonyl-CoA} + {}_{14}\text{NADPH} + {}_{14}\text{H}^+ \rightarrow \text{acide palmitique} + {}_{14}\text{NADP}^+ + 8 \text{ CoASH} + 7 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$ , est respectée par rapport à l'acide palmitique.

Le produit de la réaction est le même pour les 3 lots de souris normales, « quaking » et hétérozygotes pour le caractère « quaking ». De plus, l'activité de la synthétase est identique dans chacun des 3 cas comme le montrent les valeurs des  $K_m$  calculés par la transformation linéaire de Lineweaver et Burk effectuée sur les courbes d'activité enzymatique en fonction de la concentration en chacun des 3 substrats NADPH, Malonyl-CoA, Acétyl-CoA. Les  $K_m$  sont de  $10^{-7}$  M pour le NADPH,  $10^{-7}$  M pour le Malonyl-CoA et  $10^{-9}$  M pour l'Acétyl-CoA (fig. 1, 2, 3).

III. DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les résultats précédents prouvent que la biosynthèse *de novo* des acides gras dans le cerveau s'effectue de la même manière chez les souris normales, « quaking » et hétérozygotes pour le caractère « quaking ». Le point de départ pour le système d'allongement est principalement l'acide palmitique.

D'autre part, la chromatographie en phase gazeuse des extraits lipidiques totaux méthylés a montré, aussi bien chez les homozygotes que chez les hétérozygotes, la même proportion d'acides en C 16 et en C 18 <sup>(2)</sup>. Or la vitesse de renouvellement de ces deux acides est sensiblement la même <sup>(6)</sup> et la biosynthèse *de novo* ne fabrique que très peu de C 18. Il reste donc à préciser le mode de formation de cet acide qui, *a priori*, pourrait être différent à la fois du système *de novo* de la fraction soluble du tissu cérébral et du système d'allongement, puisque l'acide stéarique chez les « quaking » est très peu diminué, alors que les acides gras non hydroxylés de longueur de chaîne supérieure — C 24 principalement — le sont <sup>(2)</sup>.

Enfin, puisque l'activité de la synthétase est la même pour les 3 lots de souris, la diminution de la teneur en acides gras à longue chaîne, observée chez les « quaking », doit être en rapport avec une perturbation du système d'allongement, perturbation dont nous cherchons à préciser la nature.

(\*) Séance du 24 mars 1969.

(1) N. A. BAUMANN, C. JACQUE, S. POLLET et M. L. HARPIN, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 2953.

(2) N. A. BAUMANN, C. JACQUE, S. POLLET et M. L. HARPIN, *European J. Biochem.*, 4, 1968, p. 340-344.

(3) R. O. BRADY, *J. Biol. Chem.*, 235, n° 11, 1960, p. 3099.

(4) W. R. MORRISSON et L. M. SMITH, *J. Lip. Res.*, 5, 1964, p. 600-608.

(5) E. R. STADTMAN, *Methods in Enzymology III*, 1957, p. 931-941.

(6) Y. KISHIMOTO, E. W. DAVIES et N. S. RADIN, *J. Lip. Res.*, 6, 1965, p. 525-531.

(Laboratoire de Neurochimie, I. N. S. E. R. M.,  
Clinique des Maladies du Système Nerveux,  
Hôpital de la Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75-Paris, 13<sup>e</sup>.)