

Ontogénèse des trois systèmes de biosynthèse des acides gras dans les microsomes cérébraux : Relation avec la myélinisation.

Jean-Marie BOURRE \diamond , Odile DAUDU et Nicole BAUMANN.

Laboratoire de Neurochimie, INSERM U 134,
47, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13.

(14-4-1976).

La myéline, membrane remarquable par sa composition biochimique et son rôle physiologique, est caractéristique par son contenu en acides gras à très longues chaînes. Or ceux-ci sont synthétisés au niveau des microsomes [1] par trois complexes enzymatiques distincts [2-4], qu'ils soient saturés [5] ou monoinsaturés [6]. L'activité synthétique totale de l'homogénat cérébral [7] ou de microsomes isolés [8, 9] est maximale au moment de la myélinisation. Si le système de novo soluble est sans relation avec cette période [10, 11] il semble que l'allongement d'acyl-CoA soit lié aux dépôts de la myéline [12-14], car la déposition des acides gras à très longues chaînes correspond à la myélinisation [15]. Si cette myélinisation est diminuée (mutant Quaking) ou quasiment absente (mutant Jimpy) la synthèse est corrélativement réduite ou presque nulle [14]. Ce travail a pour but de préciser l'évolution des systèmes de biosynthèse des acides gras microsomaux et solubles au cours de l'ontogénèse en étudiant l'allongement, par le malonyl-CoA en présence de NADPH, soit de l'acétyl-CoA (mécanisme *de novo*) soit d'acyl-CoA de longueurs de chaînes croissantes (de 16 à 22 atomes de carbone).

MATERIEL ET METHODES.

Les microsomes de cerveau de souris de différents âges sont préparés de manière classique [2]. Les cerveaux sont homogénéisés par 5 ml de tampon par gramme mais on utilise un nombre décroissant de cerveaux en fonction de l'âge pour centrifuger toujours un même volume d'homogénat (car les cerveaux sont d'autant plus légers que l'animal est plus jeune). La pureté des microsomes est vérifiée par le dosage d'enzymes marqueurs et la microscopie électronique [1]. Les acyl-CoA sont synthétisés à partir de l'acide gras libre et du CoA [16]. Le milieu d'incubation contient l'acyl-CoA (palmityl-CoA 50 μ M, stéaryl-CoA 30 μ M, arachidyl-CoA 20 μ M, béhényl-CoA 17 μ M) du malonyl-CoA [$1-^{14}$ C] (50 μ M) du NADPH (500 μ M), du saccharose (272 mM), du phosphate pH 7,1 (85 mM) du NaCl (0,13 mM). Ce milieu final est de 1 ml et comporte aussi les protéines microsomaux (de 0 à 1 mg) et 3 μ g de phospho-transacétylase. Pour le système *de novo* 1 mg de surnageant 100.000 g, ou de microsomes, est incubé en présence de acétyl-CoA [$1-^{14}$ C] (25 μ M), malonyl-CoA (50 μ M), NADPH (500 μ M) et de tampon. Dans tous les cas les incubations sont de 60 minutes à 37°C. Après saponification et acidification les acides gras synthétisés sont extraits sélectivement et leur radioactivité déterminée.

\diamond A qui toute correspondance doit être adressée.

RESULTATS ET DISCUSSION.

La figure 1 montre le rendement de préparation des microsomes cérébraux en fonction de l'âge. Si la quantité de protéines par gramme de cerveau aug-

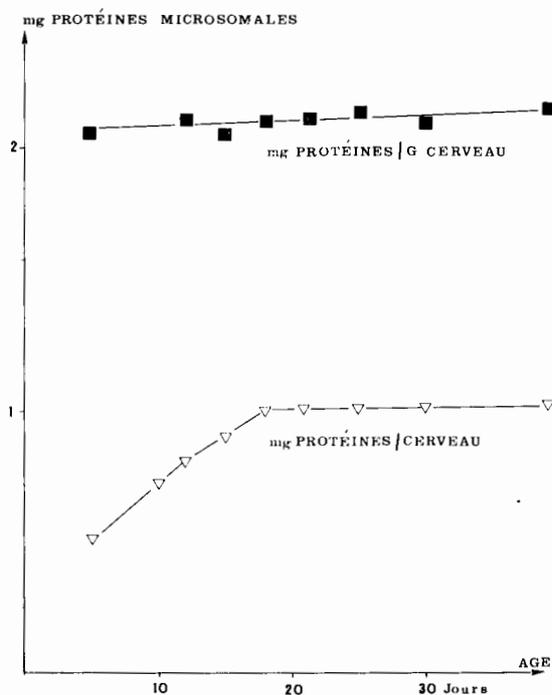


FIG. 1. — Quantité de protéines microsomaux en fonction de l'âge, évaluée par cerveau ou par gramme de cerveau.

Chaque point est la moyenne de 5 expériences au moins.

mente légèrement au cours du développement cérébral, il n'en est pas de même pour la quantité de protéines microsomaux par cerveau : entre 3 jours et 18 jours, il y a une augmentation régulièrement croissante permettant de doubler les valeurs qui passent de 0,5 mg à 1 mg par cerveau ; ceci correspond à la maturation du réticulum endoplasmique des cellules cérébrales observée en histologie.

La figure 2 compare l'évolution des systèmes *de novo* solubles et microsomaux. Le premier a un maximum d'activité à 6 jours, donc bien avant que la myélinisation ne soit commencée ; le deuxième a une activité spécifique croissante jusqu'à 10 jours, est stable jusqu'à 12 jours puis décroît ensuite. Les variations constatées, quoique faibles, sont significatives. Le système *de novo* microsomal n'est donc pas dû à une contamination par le système cytosolique car les cinétiques enzymatiques sont distinctes [3] et les évolutions ontogéniques différentes.

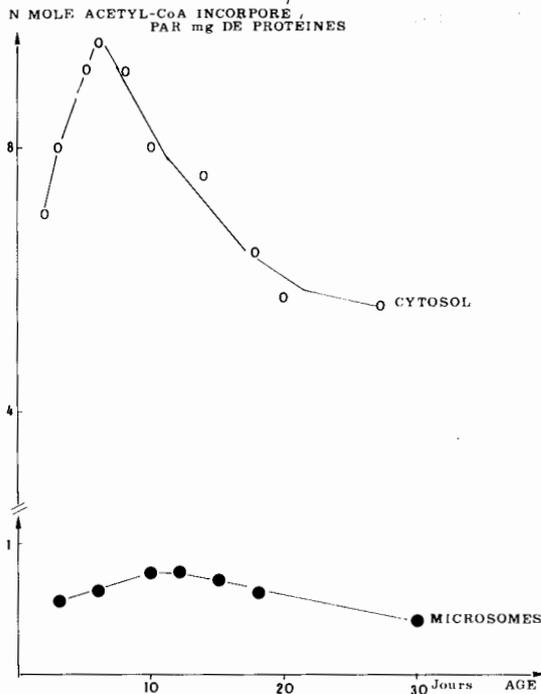


FIG. 2. — Evolution en fonction de l'âge des systèmes de novo soluble et microsomal.

Chaque point est la moyenne de 5 expériences au moins. Si on utilise un coefficient de sécurité de 99 p. cent, les valeurs sont : à 4 jours $0,68 \pm 0,11$; à 10 jours : $0,82 \pm 0,14$; à 30 jours : $0,49 \pm 0,12$.

La figure 3 étudie l'allongement de 4 acyl-CoA au cours de la myélinisation. Il y a un pic d'activité spécifique à 15 jours pour l'allongement du palmityl-CoA, à 18 jours pour l'allongement des stéaryl-CoA, arachidyl-CoA et béhényl-CoA. Ce pic est encore plus important si les valeurs sont exprimées par cerveau (activité totale de synthèse d'un cerveau à un âge donné). L'activité spécifique maximale correspond exactement à la vitesse maximale de dépôt de acides gras myéliniques ; de plus l'activité d'animaux de 30 jours (fin de myélinisation) est égale à celle de ceux de 10 jours (début de myélinisation). L'interprétation statistique des résultats montre qu'ils sont significatifs.

La différence observée entre certains de nos résultats et ceux d'autres auteurs [12, 13] pourrait peut-être s'expliquer par le système d'incubation utilisé. En effet, nous ajoutons dans ce dernier de la phospho-

transacétylase, étudiant ainsi seulement l'allongement des acyl-CoA [3, 5], le système *de novo* étant éliminé. Or, selon la longueur de chaîne, 30 à 50 p. cent du malonyl-CoA incorporé l'est par le mécanisme *de novo* (en absence de phosphotransacétylase) [5, 6, 16].

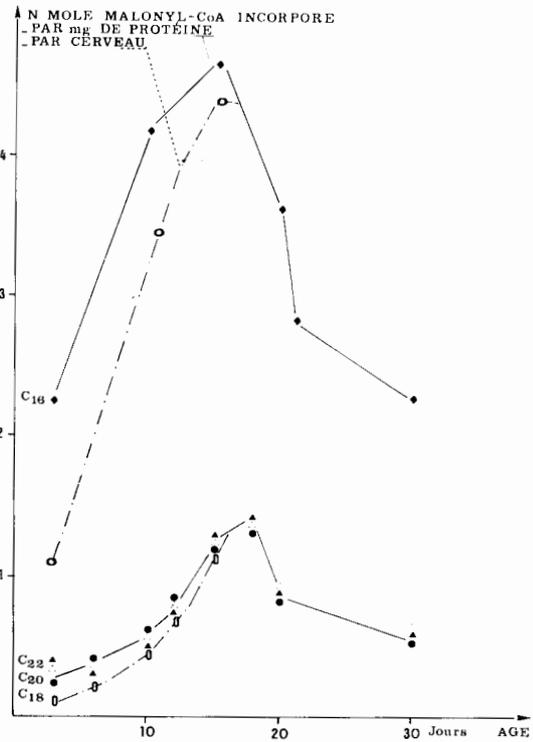


FIG. 3. — Allongement d'acyl-CoA au cours de la maturation cérébrale.

◆ : palmityl-CoA, ● : stéaryl-CoA, △ : arachidyl-CoA, ▲ : béhényl-CoA. L'ordonnée donne le nombre de nanomoles de malonyl-CoA incorporé dans les acides gras en présence de l'acyl-CoA correspondant. Le malonyl-CoA peut être utilisé pour allonger les acides endogènes, mais en présence de béhényl-CoA par exemple ce mécanisme ne représente que 10 p. cent de l'activité totale [5].

En traits pleins : activité par mg de protéines microsomaux.

En pointillé : activité totale par cerveau (déduite de la précédente en tenant compte des valeurs de la figure 1).

Chaque point est la moyenne de 5 expériences au moins. Ils sont déterminés par le calcul de la pente de la courbe de l'activité d'allongement en fonction de la concentration en protéines. Si on utilise un coefficient de sécurité de 99 p. cent, pour l'allongement des acyl-CoA à 18, 20, 22 atomes de carbone les valeurs sont à 18 jours de $1,42 \pm 0,18$ et à 30 jours de $0,62 \pm 0,12$. Pour l'allongement du palmityl-CoA, aux mêmes âges, les valeurs sont respectivement $4,18 \pm 0,2$ et $2,2 \pm 0,21$.

Les systèmes microsomaux semblent donc bien liés aux phénomènes de myélinisation. Dans les mitochondries cérébrales [17-20], la biosynthèse des acides gras à très longues chaînes est aussi réalisée. Mais des

études ontogénétiques chez des animaux normaux et mutants ont montré que les synthèses mitochondriales d'acides gras étaient sans rapport aucun avec les phénomènes de myélinisation [21, 14]. Des auteurs [18] ont montré que la synthèse mitochondriale varie en fonction de l'âge, mais ces résultats sont d'analyse difficile car ils concernent l'ensemble des familles d'acides gras (saturés, mono-insaturés et poly-insaturés) avec une expression des résultats en pourcentage relatif et non pas en valeurs absolues.

Le fait que l'activité de la synthèse *de novo* soluble précède la myélinisation n'exclue pas la possibilité de voir cette voie jouer un rôle dans le dépôt des acides gras myéliniques.

Cette étude confirme l'existence de trois systèmes dans les microsomes pour réaliser la synthèse des acides gras à très longues chaînes : un système *de novo* et deux systèmes d'allongement. Le premier, allongeant le palmityl-CoA en acide stéarique (C_{16} -élongase), a une activité et un maximum ontogénétique différent du deuxième, allongeant le stéaryl-CoA en chaînes très longues (C_{25} -élongase). Il est remarquable de constater que stéaryl-CoA, arachidyl-CoA et béhényl-CoA sont allongés identiquement. Leur évolution ne permet pas de montrer l'existence supposée [3, 12] d'un troisième système allongeant le stéaryl-CoA en acide arachidique.

Il y a donc une évolution ontogénique cohérente des trois systèmes microsomaux : le premier est maximal vers 10-12 jours, le deuxième l'est vers 15 jours, le troisième vers 18 jours. Il est normal que les trois systèmes ne soient pas simultanément maximum à 18 jours (date de l'acmé de myélinisation, bien vue en histologie) car en fait le dépôt de la myéline et sa maturation biochimique se font en deux temps : la membrane contient d'abord des sphingolipides formés d'acides gras à chaînes moyennes (C_{16} et C_{18}) puis, plus tard, constitués de très longues chaînes (C_{24} principalement) [22]. Les complexes enzymatiques de synthèse des acides gras myéliniques sont probablement localisés dans les cellules gliales [23].

Remerciements.

Les auteurs tiennent à remercier le Dr Berger qui a réalisé les micrographies électroniques de microsomes ; et Monsieur Lachapelle pour l'élevage des animaux.

Ce travail a pu être réalisé grâce à des crédits de P.N.S.E.R.M. (ATP 6.74.27) et de la D.G.R.S.T. (ACC 74.7.0597)

BIBLIOGRAPHIE.

1. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1973) *Brain Res.*, **51**, 225-239.
2. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Dubois, G. & Baumann, N. A. (1970) *C. R. Acad. Sci.*, **271**, 1221-1223.
3. Pollet, S. A., Bourre, J. M., Chaix, G., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1973) *Biochimie*, **55**, 333-341.
4. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Chaix, G., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1973) *Biochimie*, **55**, 1473-1479.
5. Bourre, J. M., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 1027-1033.
6. Bourre, J. M., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 1-7.
7. Cook, H. W. & Spence, M. W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 129-141.
8. Aeberhard, E., Grippo, J. & Menkes, J. M. (1969) *Ped. Res.*, **3**, 590-596.
9. Carey, E. M. & Parkin, L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 176-189.
10. Volpe, J. J., Lyles, T. O., Roncari, D. A. & Vagelos, P. R. (1973) *J. Biol. Chem.*, **7**, 2502-2513.
11. Cantrill, R. C. & Carey, E. M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 165-175.
12. Goldberg, I., Schechter, I. & Bloch, K. (1973) *Science*, **182**, 497-499.
13. Brophy, P. J. & Vanle, D. E. (1975) *Biochem. J.*, **152**, 495-501.
14. Bourre, J. M., Paturneau-Jouas, M., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, sous presse.
15. Baumann, N. A., Bourre, J. M., Jacque, C. & Pollet, S. A. (1971) *Lipid, malnutrition and the developing brain*. Ciba Foundation Symposium 91-100.
16. Bourre, J. M. & Daudu, O. L. (1976) *Biochimie*, soumis pour publication.
17. Boone, S. C. & Wakil, S. J. (1970) *Biochem. J.*, **9**, 1470-1479.
18. Yatsu, F. & Moss, S. (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1895-1901.
19. Paturneau-Jouas, M., Baumann, N. & Bourre, J. M. (1976) *Biochimie*, **58**, 341-349.
20. Paturneau-Jouas, M., Baumann, N. & Bourre, J. M. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1326-1334.
21. Bourre, J. M., Paturneau-Jouas, M., Daudu, O. & Baumann, N. (1976) *C. R. Acad. Sci.*, **283**, 409-412.
22. Baumann, N., Bourre, J. M., Jacque, C. & Harpin, M. L. (1973) *J. Neurochem.*, **20**, 753-759.
23. Fewster, M. & Mead, J. F. (1968) *J. Neurochem.*, **15**, 1041-1052.