

Substrats et produits de l'allongement des acides gras dans les microsomes de cerveaux de souris.

S. POLLET, J. M. BOURRE, G. CHAIX, O. DAUDU et N. BAUMANN. ◇
Laboratoire de Neurochimie, INSERM U 134, Hôpital de la Salpêtrière,
47, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13.
(8-1-1975).

Summary. — In brain microsomes, palmitate and stearate elongation involve a membrane lipid-bound substrate. After elongation by malonyl-CoA, acyl-products are partially bound to proteins. Acyl-proteins are not found when endogenous fatty acid elongation takes place.

In the dysmyelinating Quaking mouse mutants, « stearyl-membrane » substrate formation is normal ; thus, the deficiency observed in very long chain fatty acid formation is not due to a lack in substrate formation.

Nous avons précédemment montré [1] que, dans les microsomes de cerveaux de souris, les acyl-CoA sont intégralement transformés. Ils sont, d'une part hydrolysés en acides gras libres et, d'autre part leurs groupements « acyl » sont incorporés dans les membranes. Nous avons également établi que les acides gras libres ne sont pas allongés dans nos conditions expérimentales [2]. Nous nous proposons alors de mettre en évidence la nature membranaire des substrats de l'allongement des acides gras microsomaux ainsi que celle des produits de cet allongement.

MATERIELS ET METHODES.

A — PRÉPARATION DES MICROSOMES.

La méthode de préparation des microsomes cérébraux est celle utilisée lors de l'étude de la biosynthèse des acides gras [2]. Les membranes microsomaux précipitent lorsque le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium passe de 10 à 20 p. cent (fraction « 10-20 p. cent ») sont responsables de l'activité d'allongement des acides gras ; celles précipitant lorsque le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium passe de 30 à 50 p. cent (fraction « 30-50 p. cent ») sont responsables de l'activité de biosynthèse *de novo*.

B — NATURE MEMBRANAIRE DES SUBSTRATS DE L'ALLONGEMENT.

1) Mise en évidence d'une incorporation dans les membranes.

a) Les acyl-CoA [$1-^{14}C$] ou les acides gras libres [$1-^{14}C$] (C_{16} 30 μM , C_{18} 15 μM , 2 $\mu Ci/\mu M$) sont incorporés à qui toute correspondance doit être adressée.

cubés à 37° pendant 30 mn, en présence de 700 μg de « 10-20 p. cent » ou de 650 μg de « 30-50 p. cent » dans les mêmes conditions que lors de l'étude de la biosynthèse des acides gras [2, 3].

b) Après arrêt de l'incubation par HCl 0,1 N, l'incubation est immédiatement extrait par l'acétate d'éthyle et chromatographié sur plaques (chloroforme-acide acétique 90:10 et chloroforme-méthanol-eau 70:30:4) [1]. Après « scanning » de la plaque (scanner « Berthold »), les lipides sont prélevés et leur radioactivité est estimée par comptage dans un compteur à scintillation liquide « Packard ».

c) Dans un deuxième temps, l'incubation n'est pas arrêtée par HCl mais l'incubation est passé directement sur Sephadex G 15 [1]. L'éluion des protéines membranaires est suivie à 260 nm et à 280 nm [4]. Le rendement de la colonne est estimé par dosage des protéines selon la méthode de Lowry [5]. Le pourcentage de radioactivité de l'éluat est calculé par rapport à la radioactivité des substrats de l'incubation.

d) Enfin dans un troisième temps, l'incubation n'est pas arrêtée par HCl mais au bout de 30 mn on ajoute à nouveau « 10-20 p. cent » (700 μg) ou « 30-50 p. cent » (650 μg). La réaction est arrêtée 30 mn plus tard par HCl. Les acides gras libres formés sont extraits par l'acétate d'éthyle et isolés par chromatographie sur plaques (chloroforme-acide acétique 90:10, puis éther le pétrole-éther-acide acétique 80:20:1). La radioactivité de ces acides gras est comparée à celle des acides gras libres obtenus après le type d'incubation décrit dans le paragraphe 1a).

2) *Etude de l'allongement des acides gras après incorporation des substrats dans les membranes.*

Les acyl-CoA [$1-^{14}\text{C}$] sont incubés dans les conditions décrites au paragraphe 1a) (préincubation). Au bout de 30 mn, on ajoute du malonyl-CoA (50 μM) et du NADPH (500 μM) ainsi que « 10-20 p. cent » (700 μg). L'incubation est arrêtée 30 mn après par KOH méthanolique comme lors de l'étude de la biosynthèse des acides gras [2]. Après extraction en milieu acide par l'éther de pétrole et méthylation [6], les produits de l'allongement sont chromatographiés en phase gazeuse et la radioactivité est détectée à l'aide d'un compteur « Panax » couplé au chromatographe [3].

C — NATURE DES PRODUITS DE L'ALLONGEMENT DES ACIDES GRAS.

1) L'allongement des acyl-CoA [$1-^{14}\text{C}$] dans « 10-20 p. cent » est étudié par incubation de ces derniers en présence de malonyl-CoA et de NADPH. L'allongement des acides gras endogènes est étudié par incubation de malonyl-CoA [$1-3\ ^{14}\text{C}$] en présence ou non d'acyl-CoA non radioactifs. Les conditions sont celles utilisées lors de l'étude de la biosynthèse des acides gras [2].

2) Les produits de l'allongement sont étudiés comme il est indiqué au paragraphe B-1b).

3) D'autre part, on peut isoler les acides gras libres de l'incubat comme il est indiqué dans le paragraphe B-1d). Ces acides gras sont méthylés et chromatographiés en phase gazeuse. Leur profil

est comparé à celui des acides gras liés aux lipides de l'incubat.

RESULTATS.

A — NATURE MEMBRANAIRE DES SUBSTRATS DE L'ALLONGEMENT.

1) *Mise en évidence d'une incorporation dans les membranes.*

a) Les résultats des chromatographies sur plaques (Matériels et Méthodes B-1b)) sont consignés dans le tableau I. Dans les deux fractions « 10-20 p. cent » et « 30-50 p. cent », les acyl-CoA sont essentiellement transformés en acides gras libres. Cependant, dans la fraction « 10-20 p. cent », aussi bien en présence de palmitoyl-CoA que de stéaryl-CoA, on retrouve de la radioactivité au niveau des phospholipides et du cholestérol, ce qui n'est pas le cas dans la fraction « 30-50 p. cent ». Enfin, en présence d'acides gras libres, la radioactivité retrouvée au niveau des lipides est négligeable.

b) Après passage sur colonne de Sephadex G 15, le pourcentage de radioactivité au niveau des membranes, compte-tenu des rendements de colonne, est indiqué dans le tableau I. En présence de palmitoyl-CoA, la radioactivité se retrouve essentiellement dans la fraction « 10-20 p. cent » ; en présence de stéaryl-CoA, elle se retrouve à la fois dans « 10-20 p. cent » et dans « 30-50 p. cent ». En présence d'acides gras libres, l'éluat membranaire n'est pas radioactif.

TABLEAU I.

Pourcentage d'acyl-CoA et d'acides gras libres incorporés dans les membranes (après passage sur Sephadex G 15) et dans les lipides.

	" 10-20 p. cent "				" 30-50 p. cent "			
	Palmitoyl-CoA	Stéaryl-CoA	Acide Palmitique	Acide Stéarique	Palmitoyl-CoA	Stéaryl-CoA	Acide Palmitique	Acide Stéarique
1 - Acide gras libres (chromatographie sur plaques)	73	71	94	97	92,5	92	96	96
2 - Lipides (chromatographie sur plaques)	27	29	—	—	—	—	—	—
Cholestérol	15	15	2,5	1	2,5	2,8	1	2
Céramides	2	2	0,2	0,2	1,5	1	0,2	0,5
" Phospholipides "	8	10	2	1	1,5	2,5	2	0,8
Cérebrosides + sphingomyéline	0,5	0,8	0,4	0,4	0,5	0,5	0,3	0,5
Origine (gangliosides + protéolipides)	1,5	1	0,9	0,4	1,5	1,5	0,5	0,2
3 - Membranes (Sephadex G 15)	23	42	2	2	7	48	2	2

(Chromatographies sur plaques - chloroforme-méthanol-eau 70:30:4, chloroforme-acide acétique 90:10). On entend par « phospholipides » tous les phospholipides exceptée la sphingomyéline.

c) Si on réalise les incubations indiquées dans « Matériels et Méthodes B-1d », on constate que le pourcentage de radioactivité au niveau des acides gras libres n'a pas augmenté aussi bien en présence de « 10-20 p. cent » que de « 30-50 p. cent ». Les substrats membranaires ne sont donc pas hydrolysés en acides gras libres.

2) *Etude de l'allongement des acides gras après incorporation des substrats dans les membranes.*

Les pourcentages d'acides gras allongés en utilisant comme substrats les produits d'incorporation

— le NADPH, cofacteur indispensable pour l'allongement, n'a ici aucune influence.

— la distribution de la radioactivité au niveau des lipides en présence de palmityl-CoA [1-¹⁴C] et de malonyl-CoA est identique à celle observée en présence de stéaryl-CoA [1-¹⁴C] seul.

— par contre, le pourcentage de radioactivité au niveau des cébrosides, des céramides et de la sphingomyéline double en présence de stéaryl-CoA [1-¹⁴C] et de malonyl-CoA. Cela est

TABLEAU II.

Influence de la préincubation des acyl-CoA [1-¹⁴C] avec « 10-20 p. cent » ou « 30-50 p. cent » sur l'activité d'allongement.

Conditions d'incubation	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂	C ₂₄	Rendement de l'allongement
Palmityl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent » sans préincubation.....	79	15	2	2	2	21
Palmityl-CoA [1- ¹⁴ C] + « 30-50 p. cent » préincubation 30' + malonyl-CoA + NADPH + " 10-20 p. cent "	97	2,5	0,5	—	—	3
Palmityl-CoA [1- ¹⁴ C] + « 10-20 p. cent » préincubation 30' + malonyl-CoA + NADPH + " 10-20 p. cent "	77	20	1	0,5	1	23
« 30-50 p. cent » préincubation 30' + palmityl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent »	77	20	1,5	0,5	1	23
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent » sans préincubation.....	—	93	3	1	3	7
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + « 30-50 p. cent » préincubation 30' malonyl-CoA + NADPH + " 10-20 p. cent "	—	98	1	0,5	0,5	2
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + « 10-20 p. cent » préincubation 30' malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent »	—	91,5	5	1,5	2	8,5
« 30-50 p. cent » préincubation 30' Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent »	—	94	4	1	1	6

Pourcentage d'acides gras synthétisés.

dans les membranes (Matériels et Méthodes B-2)), sont indiqués dans le tableau II. On a rappelé le profil de synthèse des acides gras obtenus sans préincubation [3]. La préincubation des acyl-CoA (principalement le palmityl-CoA) avec la fraction « 30-50 p. cent » inhibe leur allongement ultérieur par le malonyl-CoA en présence de « 10-20 p. cent ». Par contre, la préincubation des acyl-CoA avec « 10-20 p. cent » conduit à un rendement d'allongement identique à celui observé sans préincubation.

B — NATURE DES PRODUITS DE L'ALLONGEMENT DES ACIDES GRAS.

1) Les résultats des *chromatographies sur plaques* (Matériels et Méthodes C-2) sont indiqués dans le tableau III. On constate que :

BIOCHIMIE, 1975, 57, n° 9.

encore plus net en présence de stéaryl-CoA et de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C].

— avec le malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] incubé seul ou en présence d'acyl-CoA (allongement des acides gras endogènes), le pourcentage de radioactivité au niveau des acides gras libres est négligeable, la plus grande partie se retrouve au niveau des phospholipides.

2) Les résultats des *chromatographies en phase gazeuse* (Matériels et Méthodes C-3)) sont consignés dans le tableau IV. On a rappelé les pourcentages d'acides gras synthétisés dans l'incubation non fractionnée en acides gras libres et liés aux lipides [3] (« incubation totale »). On constate que la synthèse des acides gras à longueur de chaîne supérieure à 18 atomes de carbone conduit à des acides gras apparemment libres.

DISCUSSION.

A — NATURE MEMBRANAIRE DES SUBSTRATS DE L'ALLONGEMENT.

1) Mise en évidence d'une incorporation dans les membranes.

— Le tableau V résume la transformation des acyl-CoA dans les différentes fractions intéressant la biosynthèse des acides gras.

malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] seul la radioactivité retrouvée au niveau des acides gras libres par chromatographie sur plaques est négligeable (tableau III), et d'autre part les expériences décrites dans le paragraphe « Matériels et Méthodes B-1d » montrent que le produit d'incorporation des groupements « acyl » dans les membranes n'est pas hydrolysé. Cette activité enzymatique a été mise en évidence dans de nombreux tissus chez les mammifères [7], en particulier dans le cerveau [8, 9, 10, 11].

TABLEAU III.

Pourcentage d'incorporation des produits d'allongement des acyl-CoA par le malonyl-CoA, incorporation du malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] dans les lipides de « 10-20 p. cent ».

	" 10-20 p. cent "						
	Palmitoyl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH	Palmitoyl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH + Malonyl-CoA	Palmitoyl-CoA + NADPH + Malonyl-CoA [1,3- ¹⁴ C]	Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH	Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH + Malonyl-CoA	Stéaryl-CoA + NADPH + Malonyl-CoA [1,3- ¹⁴ C]	Malonyl-CoA [1,3- ¹⁴ C] + NADPH
Cholestérol.....	14	15	12	14	15	17	1
Céramides.....	2	2	3	2	3	7	4
Cérébrosides + sphingomyéline	0,5	1	10	1	2	18	9
" Phospholipides "	7,5	11	43	9,5	8	21	74
Origine (glangliosides + protéolipides).....	2	1	5	1	1	11	10
Acides gras libres...	74	70	27	72	71	26	2

On entend par « phospholipides » tous les phospholipides exceptée la sphingomyéline.

— On constate tout d'abord qu'il existe dans les microsomes une enzyme assez active transformant la plus grande partie des acyl-CoA en acides gras libres. Cette enzyme ne semble agir qu'en présence d'acyl-CoA puisque, d'une part en présence de

— On constate également qu'une partie des groupements « acyl » des acyl-CoA sont incorporés dans les membranes (tableau I). Cette incorporation peut se faire soit au niveau des lipides, soit au niveau des protéines.

TABLEAU IV.

Pourcentage d'acides gras libres et liés aux lipides synthétisés en présence d'acyl-CoA [1-¹⁴C], de malonyl-CoA et de NADPH.

		C ₁₆	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂	C ₂₄
Palmitoyl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH + malonyl-CoA	Acides gras libres.....	80	17	0,7	1	1
	" Lipides " autres que le cholestérol.....	77	23	—	—	—
	Cholestérol.....	77	23	—	—	—
	Incubat total.....	79	15	2	2	2
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + NADPH + malonyl-CoA	Acides gras libres.....	—	93	4	1,5	1,5
	" Lipides " autres que le cholestérol.....	—	100	—	—	—
	Cholestérol.....	—	100	—	—	—
	Incubat total.....	—	93	3	1	3

— Au niveau des lipides, le tableau I montre que les groupements « acyl » [$1-^{14}\text{C}$] se retrouvent essentiellement dans les phospholipides et le cholestérol de la fraction « 10-20 p. cent ». L'étude préliminaire effectuée sur les microsomes non purifiés par fractionnement au sulfate d'ammonium n'avait pas permis de distinguer cette incorporation [1].

bleau I), on constate qu'en présence de stéaryl-CoA les pourcentages de radioactivité après colonne sont supérieurs à ceux observés après plaques dans les deux fractions « 10-20 p. cent » et « 30-50 p. cent ». Lors du passage sur Sephadex, l'incubation n'a pas été arrêtée par HCl. Il se peut donc qu'elle se poursuive au cours de l'éluat de la colonne. Cependant, nous avons montré qu'au

TABLEAU V.
Transformation des acyl-CoA en présence de microsomes, en l'absence de NADPH et de malonyl-CoA.

		«10-20 p. cent»	«30-50 p. cent»				
Palmityl-CoA	Acide palmitique	75 p. cent	95 à 100 p. cent				
	« Palmityl-membrane »	25 p. cent	—				
	<table border="0"> <tr> <td rowspan="2">} palmityl-lipides.....</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>palmityl-protéines.....</td> <td>—</td> </tr> </table>	} palmityl-lipides.....	—	—	palmityl-protéines.....	—	
} palmityl-lipides.....	—		—				
	palmityl-protéines.....	—					
Stéaryl-CoA	Acide stéarique.....	60 p. cent	50 p. cent				
	Stéaryl-membrane	30 p. cent	—				
	<table border="0"> <tr> <td rowspan="2">} Stéaryl-lipides</td> <td>10 p. cent</td> <td>50 p. cent</td> </tr> <tr> <td>Stéaryl-protéines.....</td> <td></td> </tr> </table>	} Stéaryl-lipides	10 p. cent	50 p. cent	Stéaryl-protéines.....		
} Stéaryl-lipides	10 p. cent		50 p. cent				
	Stéaryl-protéines.....						

— Au niveau des protéines, l'incorporation pourrait être mise en évidence par chromatographie sur plaques à l'origine dans le système chloroforme-méthanol-eau 70:30:4. Or à ce niveau, on observe une radioactivité négligeable. Cependant, si on compare le pourcentage de radioactivité de l'éluat de colonne de Sephadex G 15 à celui obtenu après chromatographie sur plaques (ta-

bout de 30 mn, le stéaryl-CoA est intégralement transformé [1], d'une part par incorporation dans les membranes du groupement « stéaryl » et d'autre part par hydrolyse en acides gras libres. Or le tableau I montre que les acides gras libres ne s'incorporent pas dans les membranes. Dans ces conditions, le taux de radioactivité au bout de 30 mn ne peut plus par la suite augmenter. D'autre part,

TABLEAU VI.
Incorporation du groupement « stéaryl » dans les membranes de « 10-20 p. cent » chez la souris « Quaking ».

	Souris non mutantes	Souris « Quaking »
1 - Membranes (Colonne de Sephadex G 15).....	42	45
2 - Chromatographie sur plaques		
a) Lipides		
- Cholestérol.....	15	14
- Céramides.....	2	2
- Phospholipides.....	10	7
- Cérébrosides + Sphingomyéline.....	0,8	3
- Origine (gangliosides + protéolipides)	1	1
	29	27
b) Acides gras libres.....	71	73

Comparaison avec la non mutante. On entend par « phospholipides » tous les phospholipides exceptée la sphingomyéline.

lorsque l'incubation est directement déposée sur la colonne, en l'absence d'HCl et sans extraction par l'acétate d'éthyle, on peut admettre qu'il n'y a pas destruction des produits de l'incubation. En conséquence, le pourcentage de radioactivité évalué après passage sur colonne représente le pourcentage d'incorporation des groupements « acyl » dans les membranes (lipides et protéines). Il faut donc en déduire qu'après chromatographie sur plaques nécessitant l'arrêt de l'incubation par HCl et l'extraction par l'acétate d'éthyle, les groupements « stéaryl », incorporés au niveau des protéines, sont libérés et se retrouvent sous forme d'acides gras libres. Cette « liaison » acyl-protéine qui se forme essentiellement entre le groupement

de la détermination de la radioactivité extraite par l'acétate d'éthyle peut laisser supposer l'existence d'acyl-CoA non transformés (extraction entre 95 et 100 p. cent).

— Nous avons déjà montré que les acides gras libres ne sont pas des substrats de l'allongement [2]. Ceci est confirmé par le fait que les acyl-CoA, préincubés avec « 30-50 p. cent », donc se transformant essentiellement en acides gras libres pour le palmitoyl-CoA et en acides gras libres avec incorporation du groupement stéaryl au niveau des protéines pour le stéaryl-CoA, ne sont plus allongés par la suite en présence de malonyl-CoA, de NADPH et de « 10-20 p. cent » (tableau II). Cette expérience prouve également que l'incorporation

TABLEAU VII.

Influence de la préincubation du stéaryl-CoA [1-¹⁴C] avec « 10-20 p. cent Qk » sur l'activité d'allongement chez la souris « Quaking ».

Conditions d'incubation	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂	C ₂₄	Rendement
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent T » sans préincubation	93	3	1	3	7
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent Qk » sans préincubation	97	3	—	—	3
Stéaryl-CoA [1- ¹⁴ C] + « 10-20 p. cent Qk » préincubation 30' + malonyl-CoA + NADPH + « 10-20 p. cent T »...	94	3	1,5	6	6

Pourcentage d'acides gras synthétisés. « T » souris non mutante. « Qk » souris « Quaking ».

« stéaryl » et les protéines de « 30-50 p. cent » (40 à 50 p. cent dans « 30-50 p. cent » contre 10 p. cent dans « 10-20 p. cent ») est donc labile. Il ne s'agit donc pas d'une liaison ester comme cela a déjà été observé dans la matière blanche du cerveau [12]. Elle est également de nature différente de celle observée dans l'ACP. Cette fixation des groupements « acyl » sur les protéines est actuellement étudiée par l'intermédiaire de l'albumine [13] ou de lipoprotéines [14]. Ces complexes « acyl-protéines » pourraient servir de transporteurs des acides gras.

2) Etude de l'allongement des acides gras après incorporation des substrats dans les membranes.

— La préincubation des acyl-CoA en présence de membranes microsomales conduit à la formation d'acides gras libres et à l'incorporation des groupements « acyl » soit dans les lipides soit dans les protéines membranaires. En outre, le pourcentage d'incertitude concernant la précision

du groupement « stéaryl » au niveau des protéines de « 30-50 p. cent » ne conduit pas au véritable substrat de l'allongement.

— D'autre part, 5 p. cent d'acyl-CoA éventuellement non transformés ne peuvent fournir 10 à 20 p. cent de produits d'allongement (rendement des réactions d'allongement des acyl-CoA) (tableau II). De plus la préincubation des acyl-CoA avec « 30-50 p. cent » conduisant par la suite à une activité d'allongement négligeable, même s'il reste des acyl-CoA non transformés, ces derniers ne sont certainement pas des substrats d'allongement.

— Il faut donc admettre que le véritable substrat de l'allongement des acides gras dans les microsomes de cerveaux de souris est obtenu par incorporation des groupements « acyl » dans les membranes de « 10-20 p. cent ». Mais l'incorporation du groupement « palmitoyl » au niveau des lipides de « 10-20 p. cent » est de 25 p. cent (tableau V). Or le rendement d'allongement du palmi-

tyl-CoA par le malonyl-CoA est de 21 p. cent (tableau II). D'autre part, les tableaux III et IV montrent que 23 p. cent des 15 p. cent des groupements « palmityl » incorporés dans les lipides autres que le cholestérol sont allongés en C_{18} soit $\frac{23 \times 15}{100} = 3,5$ p. cent. Il en est de même pour le cholestérol. Cette réaction d'allongement conduit donc à $3,5 + 3,5 = 7$ p. cent d'incorporation des groupements « acyl » au niveau de tous les lipides. Or le rendement de la réaction d'allongement du stéaryl-CoA est de 7 p. cent (tableau II). Enfin, si l'on admet que le premier système d'allongement (palmityl-CoA + malonyl-CoA) puisse fournir le substrat pour le deuxième système d'allongement (stéaryl-CoA + malonyl-CoA) [2], on peut alors penser que le véritable substrat de l'allongement est constitué par le produit d'incorporation des groupements « acyl » au niveau des lipides de « 10-20 p. cent ».

— La nature du substrat de l'allongement est confirmée par l'étude de la souris mutante « Quaking ». Cette souche est caractérisée par un défaut de myélinisation du système nerveux central. Nous avons montré que le système d'allongement des acides gras chez les « Quaking » est perturbé à partir du C_{18} , l'allongement du C_{16} semblant normal [3, 15]. L'étude de l'incorporation du groupement « stéaryl » dans les membranes de « 10-20 p. cent » a alors été entreprise chez les « Quaking ».

— En présence de « 10-20 p. cent » « Quaking » (650 μ g), le stéaryl-CoA [$1-^{14}C$] est extrait à 100 p. cent. Le tableau VI fournit les résultats des chromatographies sur plaques et du passage sur colonne (Matériels et Méthodes B-1b) et c)). On constate que l'incorporation du groupement « stéaryl » dans les membranes s'effectue de façon tout à fait analogue chez la souris « Quaking » et chez la souris non mutante. D'autre part, le rendement d'allongement du stéaryl-CoA [$1-^{14}C$], après préincubation en présence de « 10-20 p. cent » « Quaking » et allongement en présence de « 10-20 p. cent » « souris non mutante », est pratiquement identique à celui observé chez la souris non mutante (tableau VII). On peut en déduire que chez la souris « Quaking » le substrat pour l'allongement se forme bien et qu'il est efficace en présence d'enzymes de la souris non mutante.

B — NATURE DES PRODUITS DE L'ALLONGEMENT DES ACIDES GRAS.

1) Chromatographies sur plaques (tableau III).

a) L'allongement du palmityl-CoA [$1-^{14}C$] par le malonyl-CoA conduit essentiellement aux acides en C_{18} [3]. Il semble donc normal que les pourcen-

tages de radioactivité au niveau des lipides soient identiques à ceux obtenus pour le stéaryl-CoA [$1-^{14}C$] seul.

b) L'allongement du stéaryl-CoA [$1-^{14}C$] par le malonyl-CoA conduit aux acides gras à chaînes plus longues (C_{20} , C_{22} , C_{24}) [3]. On voit alors apparaître de la radioactivité au niveau des sphingolipides ce qui est en accord avec les analyses précédemment effectuées sur les lipides cérébraux de souris [16, 17].

c) Le malonyl-CoA [$1,3-^{14}C$] permet l'allongement des acides gras endogènes (de C_{14} à C_{24}) [3].

Ces produits de synthèse restent incorporés dans les membranes puisqu'il n'y a pas de radioactivité au niveau des acides gras libres. Cette observation permet également de supposer qu'il n'y a pas d'incorporation au niveau des protéines. En présence d'acyl-CoA, l'incorporation du malonyl-CoA [$1,3-^{14}C$] est modifiée. On voit apparaître de la radioactivité au niveau des acides gras libres, due à l'allongement des acyl-CoA proprement dits. En présence de stéaryl-CoA, l'incorporation au niveau des sphingolipides est confirmée. D'autre part, le malonyl-CoA [$1,3-^{14}C$] comme les acyl-CoA n'est pas extrait en l'absence de microsomes ; l'acide malonique l'est. En présence de microsomes, le taux de radioactivité extraite par l'acétate d'éthyle chiffre le rendement de biosynthèse des acides gras : 0,5 p. cent dans « 10-20 p. cent », 1,5 p. cent dans « 30-50 p. cent » [3]. Le malonyl-CoA n'est donc pas transformé en acide malonique et l'enzyme hydrolysant semble une fois de plus spécifique des acyl-CoA.

2) Chromatographie en phase gazeuse (tableau IV).

En présence de palmityl-CoA [$1-^{14}C$], les acides gras allongés se retrouvent à la fois au niveau des acides gras libres et au niveau des lipides. Les acides gras provenant de l'allongement du stéaryl-CoA [$1-^{14}C$] se retrouvent essentiellement au niveau des acides gras libres.

Nous avons vu que les groupements « acyl » incorporés dans les membranes ne sont pas hydrolysés par l'enzyme transformant les acyl-CoA en acides gras libres. La radioactivité observée au niveau des acides gras libres par chromatographie en phase gazeuse ne peut donc provenir que de l'incorporation des groupements « acyl » au niveau des protéines (« liaisons » labiles). On peut alors supposer que l'activité d'allongement dans les microsomes conduit finalement à des produits incorporés au niveau des protéines. On peut également admettre que la modification du profil de

radioactivité observé sur plaques au niveau des sphingolipides (tableau III) rend compte d'un changement dans la nature lipidique des substrats de l'allongement des acides gras à longueur de chaîne supérieure ou égale à 20 atomes de carbone.

Enfin l'incorporation du malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] (allongement des acides gras endogènes) conduit uniquement à une incorporation au niveau des lipides. L'allongement des acides gras endogènes se distingue de l'allongement des acyl-CoA essentiellement par le fait qu'il ne fait pas intervenir l'enzyme d'hydrolyse des acyl-CoA (thioesterase). Cette enzyme pourrait agir soit directement soit par l'intermédiaire des produits d'hydrolyse (le CoASH en particulier) dans le transfert des produits de l'allongement des lipides aux protéines membranaires.

RÉSUMÉ.

Dans les microsomes de cerveaux de souris, l'allongement du palmitoyl-CoA et du stéaryl-CoA admet comme substrat un composé incorporé dans les lipides membranaires. Après allongement par le malonyl-CoA, les produits se retrouvent partiellement incorporés dans les protéines, ce qui n'est pas le cas pour l'allongement des acides gras endogènes.

L'étude de l'incorporation du groupement « stéaryl » dans les membranes chez la souris dismyélinique

« Quaking » montre que la déficience d'acides gras à longue chaîne observée chez cette souris n'est pas due à une non formation du substrat.

REFERENCES.

1. Pollet, S., Bourre, J. M., Daudu, O., Baumann, N. (1971) *C. R. Acad. Sci.*, **273-D**, 1632-1635.
2. Pollet, S., Bourre, J. M., Chaix, G., Daudu, O., Baumann, N. (1973) *Biochimie*, **55**, 333-341.
3. Bourre, J. M., Pollet, S., Chaix, G., Daudu, O., Baumann, N. (1973) *Biochimie*, **55**, 1473-1479.
4. Layne, E. (1957) *Methods in Enzymology*, **3**, 451-454.
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
6. Morrisson, W. R., Smith, L. M. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 600-608.
7. Sreer, P. A., Seubert, W., Lynen, F. (1959) *Biochem. Biophys. Acta*, **33**, 313.
8. Kurooka, S., Hosoki, K., Yoshimura, Y. (1972) *J. Biochem.*, **71**, 625-634.
9. Andersen, A. D., Erwin, V. G. (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1179-1186.
10. Lunt, G., Rowe, C. E. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, **152**, 681-693.
11. Rowe, C. (1964) *Biochem. Biophys. Acta*, **84**, 424-434.
12. Stoffyn, P., Foleh-Pi, J. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **44**, 157.
13. Chan, G., Schiff, D., Stern, L. (1971) *Clin. Biochem.*, **4**, 208-214.
14. Shafrir, E., Gatt, S., Khasis, S. (1965) *Biochem. Biophys. Acta*, **98**, 365-371.
15. Bourre, J. M., Pollet, S., Daudu, O., Baumann, N. (1971) *C. R. Acad. Sci.*, **273-D**, 1534-1537.
16. Jacque, C., Harpin, M. L., Baumann, N. (1969) *European J. Biochem.*, **11**, 218-224.
17. Baumann, N., Jacque, C., Pollet, S., Harpin, M. L. (1968) *European J. Biochem.*, **4**, 340-344.