

SA

BIOCHIMIE EXPÉRIMENTALE. — *Biosynthèse de l'acide lignocérique dans deux organelles (mitochondries et microsomes) au cours du développement cérébral de la Souris, normal et pathologique (Quaking et Jimpy).* Note (*) de M. Jean-Marie Bourre, M^{me} Marion Paturneau-Jouas M^{lles} Odile Daudu et Nicole Baumann, présentée par M. Raymond Turpin.

Lignoceric Acid Biosynthesis in Two Organelles (Mitochondria and Microsomes) During Brain Development in Normal and Mutant (Quaking and Jimpy) Mice, by Jean-Marie Bourre, Marion Paturneau-Jouas, Odile Daudu and Nicole Baumann..... 409

In microsomes, biosynthesis of lignoceric acid from its direct precursor (behényl-CoA) is largely increased during myelination. The peak is hardly detectable in Quaking; in Jimpy, the synthesis is nearly absent (3% of normal value); in the adult Quaking, the synthesis is normal. Mitochondria are capable of synthesizing lignoceric acid. This synthesis increases regularly during brain development and is normal in both mutants. Saturated fatty acid analysis in brain mitochondria shows that these organelles contain mainly palmitic and stearic acids. However, very long chains are also detectable. Thus it appears that mitochondria synthesize their own acids. Microsomes synthesize their own acids also and myelin fatty acids. There is no interplay between microsomal and mitochondrial metabolisms.

Les acides gras à très longues chaînes, acide lignocérique plus particulièrement sont très importants dans le cerveau car ils participent à la stabilité de la membrane myélinique. Ils sont synthétisés dans les microsomes [(1), (5)] ou les mitochondries [(6), (7)]. Ils peuvent aussi provenir, en partie, de la nutrition [(8), (9)]. Les microsomes contiennent un système

TABLEAU I
Biosynthèse de l'acide lignocérique en fonction de l'âge

	Age (jours)	4	12	18	25	Adulte
Microsomes (activité spécifique).....	Normaux	0,23	0,62	1,07	0,75	0,37
	Quaking	-	0,38	0,50	0,50	0,30
	Jimpy	-	0,03	0,03	-	-
Mitochondries (activité spécifique).....	Normales	0,05	0,17	0,20	0,24	0,31
	Quaking	-	0,16	0,19	0,22	0,29
	Jimpy	-	0,16	0,19	-	-

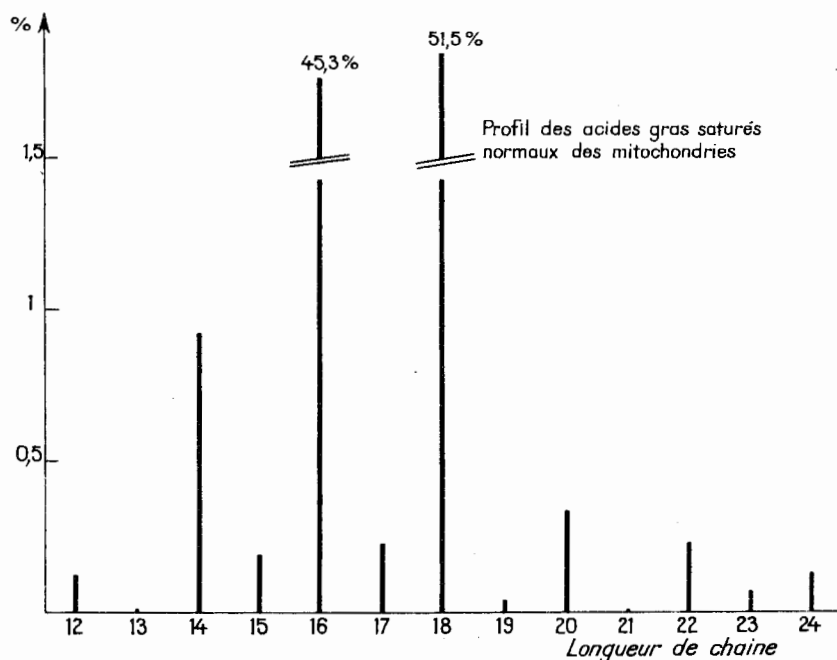
L'activité spécifique est exprimée en nmoles de substrat radioactif ([1-¹⁴C] acétyl-CoA pour les mitochondries ou [1,3-¹⁴C] malonyl-CoA pour les microsomes) allongeant le béhényl-CoA pour synthétiser l'acide lignocérique par milligramme de protéines.

de novo et deux complexes d'allongement [(1), (3)]; les mitochondries possèdent aussi un système *de novo* (7) mais un seul complexe d'allongement (10). Nous nous sommes attachés à déterminer l'évolution de la biosynthèse de l'acide lignocérique dans ces deux organelles, chez des animaux normaux et dysmyéliniques. Chez les mutants Quaking et Jimpy, la démyélinisation respectivement partielle ou totale est liée à une diminution (11) ou à une disparition (12) des acides gras à très longues chaînes myéliniques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les microsomes sont préparés de manière classique (1); les mitochondries sont purifiées sur gradient de centrifugation [(7), (13)]. Pour les microsomes (14) comme pour les mitochondries (7), la pureté est vérifiée par dosage d'enzymes

marqueurs et par microscopie électronique. La synthèse de l'acide lignocérique est mesurée par quantification de sa radioactivité après allongement du béhényl-CoA par le [1,3- ^{14}C] malonyl-CoA ou le [1- ^{14}C] acétyl-CoA (selon l'organelle). Le milieu d'incubation, en présence de 1 mg de protéines microsomales, est constitué par 15 μM béhényl-CoA, 50 μM [1,3- ^{14}C] malonyl-CoA, 500 μM NADPH, 0,272 M sucrose, 85 mM phosphate pH 7,1, 130 mM NaCl; on ajoute, dans 1 ml de milieu, 3 μg de phosphotransacétylase pour empêcher le système *de novo* de fonctionner [(⁴), (⁵), (¹⁵)]. En présence de 1 mg de protéines mitochondriales, le milieu comporte 50 μM béhényl-CoA, 50 μM [1- ^{14}C]

TABLEAU II



acétyl-CoA, 500 μM NADH, 500 μM NADPH, 0,272 M saccharose, 8,5 mM phosphate pH 7,0; 1 mg de « triton X-100 » est ajouté par millilitre de milieu. L'extraction et l'identification des acides gras synthétisés ont été précédemment décrites (⁴). L'analyse des acides gras mitochondriaux a été réalisée après méthylation d'un extrait lipidique de ces organelles. Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Le tableau I montre que la biosynthèse microsomale de l'acide lignocérique est maximale à 18 jours (l'activité spécifique de l'enzyme est 5 fois plus grande à cet âge qu'à 4 jours). Ce pic est réduit chez la Souris Quaking; il est inexistant chez le mutant Jimpy. Il faut noter que la synthèse est normale chez les animaux Quaking adultes: il n'y a pas de récupération éventuelle d'une myélinisation défectueuse. La synthèse mitochondriale croît régulièrement au cours du développement cérébral sans présenter de pic au moment de la myélinisation. Elle est quantitativement normale chez les deux mutants.

Si les acides gras synthétisés dans les microsomes sont utilisés pour élaborer la myéline, la destinée des acides gras mitochondriaux semble être la membrane mitochondriale

elle-même. En effet, les mitochondries contiennent principalement de l'acide palmitique et de l'acide stéarique (tableau II) mais aussi des acides gras à très longues chaînes, y compris de l'acide lignocérique (0,13 %). 0,70 % des acides gras à très longues chaînes ont plus de 18 atomes de carbone, ordre de grandeur comparable à celui des mitochondries humaines (¹⁶) mais très inférieur aux mitochondries de Rat (¹⁷). (Cette dernière préparation est probablement contaminée par de la myéline). Or il est possible de quantifier la quantité d'acides gras présents dans une organelle et le pouvoir synthétique de cette organelle.

Supposant que les acides gras représentent 35 % du poids des lipides et qu'au moins un tiers de ces acides sont saturés, il est possible d'estimer que les membranes, mitochondriales ou microsomaes, contiennent environ 75 µg d'acide stéarique par milligramme de protéines. Or, à partir du palmityl-CoA, les possibilités de synthèse *in vitro* de l'acide stéarique sont, dans les microsomes et les mitochondries d'animaux âgés de 18 jours,

TABLEAU III
Biosynthèse de l'acide lignocérique dans deux organelles

	Nombre de complexes d'allongement	Donneur de carbone	Donneurs d'hydrogène	Rôle dans la myélinisation	Perturbations pathologiques		Destinée
					Quaking	Jimpy	
Microsomes :	2	Malonyl-CoA	NADPH	+++	- 70 %	- 97 %	Myéline
Mitochondries :	1	Acétyl-CoA	NADH (+ NADPH)	0	- 0 %	- 0 %	Mitochondries (?)

respectivement environ 30 et 2,5 µg/mg protéines/jour. Nous savons que les microsomes synthétisent plus qu'ils n'en ont besoin car ces organelles élaborent les acides gras myéliniques (¹¹). Par contre, les mitochondries cérébrales ont la capacité *in vitro* de renouveler tout leur acide stéarique tous les 30 jours. Or des études de vitesse de renouvellement ont montré que, *in vivo*, les phospholipides mitochondriaux du cerveau ont des demi-vies variant selon la molécule de 17 à 40 jours (¹⁸). Donc dégradation et synthèse semblent être du même ordre de grandeur dans les mitochondries. Sans pouvoir exclure un transport mitochondrial, il apparaît que ces organelles sont autonomes pour leurs besoins en acides gras. En dernier lieu, les synthèses mitochondriale et microsomaes sont sensiblement égales chez les animaux adultes. Toutefois, la synthèse microsomaes est un peu plus élevée: elle doit supporter le renouvellement des acides gras myéliniques qui est très lent.

Deux organelles d'une même cellule peuvent donc synthétiser les mêmes acides (l'acide lignocérique en l'occurrence) mais par deux voies biochimiques distinctes, ces acides ayant des destinées très différentes (tableau III). En effet, microsomes et mitochondries n'ont pas le même nombre de complexes d'allongement; les donneurs de carbone sont différents; les réducteurs sont NADPH seul dans un cas alors que les mitochondries ont besoin de NADH + NADPH [(¹), (²), (¹⁰)]. Si l'une des organelles est défaillante (les microsomes), l'autre ne pourra compenser le défaut. Chez des animaux partiellement (Quaking) ou totalement (Jimpy) démyélinisés, les synthèses microsomaes sont réduites respectivement de 60 % et 97 % alors que les synthèses mitochondriales sont normales.

(*) Séance du 31 mai 1976.

- (¹) J. M. BOURRE, S. A. POLLET, G. DUBOIS et N. A. BAUMANN, *Comptes rendus*, 271, série D, 1970, p. 1221.
- (²) E. AEBERHARD et J. M. MENKES, *J. Biol. Chem.*, 243, 1968, p. 3834-3840.
- (³) J. M. BOURRE, S. A. POLLET, G. CHAIX, O. L. DAUDU et N. A. BAUMANN, *Biochimie*, 55, 1973, p. 1473-1479.
- (⁴) J. M. BOURRE, O. L. DAUDU et N. A. BAUMANN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 1975, p. 1027-1033.
- (⁵) J. M. BOURRE, O. L. DAUDU et N. A. BAUMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 424, 1976, p. 1-7.
- (⁶) S. C. BOONE et S. J. WAKIL, *Biochemistry*, 17, 1970, p. 1470-1479.
- (⁷) M. PATURNEAU-JOUAS, N. A. BAUMANN et J. M. BOURRE, *Biochimie*, 58, 1976, p. 341-349.
- (⁸) G. A. DHOPESHWARKAR, C. SUBRAMANIAN et J. F. MEAD, *Biochim. Biophys. Acta*, 296, 1973, p. 257-264.
- (⁹) N. GOZLAN-DEVILLIERRE, N. BAUMANN et J. M. BOURRE, *Comptes rendus*, 282, série D, 1976, p. 1825.
- (¹⁰) M. PATURNEAU-JOUAS, N. A. BAUMANN et J. M. BOURRE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (sous presse).
- (¹¹) N. A. BAUMANN, J. M. BOURRE, C. JACQUE et M. L. HARPIN, *J. Neurochem.*, 20, 1973, p. 753-759.
- (¹²) J. L. NUSSBAUM, N. NESKOVIC et P. MANDEL, *J. Neurochem.*, 18, 1971, p. 1529-1543.
- (¹³) J. EICHBERG, V. P. WHITTAKER et R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 92, 1974, p. 91-100.
- (¹⁴) J. M. BOURRE, S. A. POLLET, O. L. DAUDU et N. A. BAUMANN, *Brain Res.*, 51, 1973, p. 225-239.
- (¹⁵) S. A. POLLET, J. M. BOURRE, G. CHAIX, O. L. DAUDU et N. A. BAUMANN, *Biochimie*, 55, 1973, p. 333-341.
- (¹⁶) B. GERSTL, L. F. ENG, R. B. HAYMAN et P. BOND, *Lipids*, 4, 1968, p. 428-434.
- (¹⁷) F. YATSU et S. MOSS, *J. Neurochem.*, 18, 1971, p. 1895-1901.
- (¹⁸) M. E. SMITH, *Biochim. Biophys. Acta*, 164, 1968, p. 281-284.

Laboratoire de Neurochimie,
I.N.S.E.R.M. U. 134,
Hôpital de la Salpêtrière,
75634 Paris Cedex 13.