

Biosynthèse des acides gras dans les mitochondries de cerveau de souris en présence de malonyl-CoA ou d'acétyl-CoA.

Marion PATURNEAU-JOUAS, Nicole BAUMANN et Jean-Marie BOURRE.
Laboratoire de Neurochimie, INSERM U. 134, Hôpital de la Salpêtrière,
75013 Paris.
(19-9-1975).

Summary. — Incorporation of malonyl-CoA or acetyl-CoA is studied in mouse brain mitochondrial fatty acids.

Rupture of mitochondria is necessary ; Triton X-100 gives the best result. Other detergents or sonication are of lesser efficiency. Cofactor requirements have been studied ; NADH and NADPH have been tested ; ATP increases biosynthesis and CoA causes an inhibition. Two systems of biosynthesis are involved :

— One is a *de novo* system using malonyl-CoA. Malonyl-CoA alone is incorporated and synthesizes mainly C₁₆, indicating the existence of a malonyl-CoA decarboxylase although elongation of short chain fatty acids cannot be excluded. Addition of acetyl-CoA increases the biosynthesis and palmitoyl-CoA when added causes an inhibition.

— The other system, using acetyl-CoA, elongates exogenous palmitoyl-CoA ; endogenous acyl-CoAs are not elongated by acetyl-CoA.

All these results are confirmed by radiogas chromatographic studies of the reactions products.

INTRODUCTION.

La biosynthèse des acides gras semble s'effectuer distinctement dans trois compartiments cellulaires : mitochondries, microsomes et cytosol.

Le système *de novo* soluble, utilisant acétyl-CoA et malonyl-CoA, a été très étudié dans les plantes, microorganismes et tissus animaux [1 à 7] ainsi que dans le cerveau [8, 9] ; il synthétise de l'acide palmitique et de petites quantités d'acide stéarique et d'acide myristique. Nous avons montré que les microsomes cérébraux contiennent au moins trois systèmes distincts : *de novo*, allongement du palmitoyl-CoA de deux atomes de carbone seulement et allongement du stéaryl-CoA en acides gras à chaîne très longue [10 à 14]. Ces organelles synthétisent donc toute la gamme des acides gras.

La biosynthèse des acides gras dans les mitochondries de cerveau a été très peu abordée [15 à 19] ; par contre de nombreux travaux ont été réalisés dans le foie et le cœur. Dans ces organes, si la biosynthèse des acides gras au niveau des mitochondries est reconnue [20, 21, 22, 23], il n'y a pas d'accord entre les différents auteurs pour ce qui est de la présence éventuelle de l'allonge-

ment des acides endogènes ; la réalité de la synthétase est discutée et l'on ne sait si le malonyl-CoA est intermédiaire ou non ; la nature du donneur d'hydrogène est imprécise ; les mécanismes de stimulation de la synthèse par les intermédiaires du cycle de Krebs sont inconnus [21]. Si allongement et système *de novo* coexistent, ils peuvent être deux systèmes différents [24, 25] ou deux expressions du même système enzymatique [26, 27]. La présence du système *de novo* a été niée par certains [28] tandis que d'autres l'ont purifié à partir de la membrane externe des mitochondries de foie de rat [29]. Pour les uns le malonyl-CoA est utilisé dans la synthèse *de novo* mais pas dans l'allongement, pour d'autres il n'est qu'un intermédiaire des systèmes [20, 21, 30, 31], pour d'autres encore il n'est pas utilisé dans les réactions [26, 27, 32, 33]. De plus, les mitochondries contiendraient des enzymes carboxylant l'acétyl-CoA en malonyl-CoA [40] et décarboxylant le malonyl-CoA en acétyl-CoA [41]. L'identité et l'utilité des cofacteurs est très discutée : NADH et NADPH sont les cofacteurs utilisés conjointement [15, 23, 25, 33, 34] à moins que le NADH ne soit seul réellement actif [32] ou le plus actif [35]. Le NADP, en présence d'intermédiaires du cycle de Krebs, convient tout aussi bien [21] mais ces intermédiaires n'interviendraient qu'en modifiant

le rapport NADH/NAD [15, 34]. La localisation cytologique de l'allongement est tout aussi ambiguë : il peut se situer sur les membranes externe et interne [36], la membrane interne contenant le système *de novo* alors que la membrane externe présenterait seule l'activité d'allongement [37] ; pour certains, c'est la membrane externe qui contiendrait le système *de novo* [29]. Il a été proposé que le procédé d'allongement soit l'inverse de celui de la β -oxydation [38, 42] bien que cela ait été nié [32, 37]. Enfin, la réalité de l'allongement d'acides gras exogènes a été purement et simplement niée dans les mitochondries [39], l'allongement exclusif des acides gras endogènes [32, 33] couplé à leur dégradation ne servant qu'en transfert d'hydrogène [39].

Etant donné le rôle fondamental joué par les acides gras dans les structures membranaires cérébrales, il est important que soit précisé leur mode de biosynthèse. Ce travail se propose donc de vérifier l'existence des systèmes mitochondriaux dans le cerveau et d'étudier leur mode d'action en présence de deux substrats, l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA.

MATERIEL ET METHODES.

I. — PRODUITS CHIMIQUES.

Les produits radioactifs sont obtenus à la « New England Nuclear Corp. » (Boston, Mass.) ; les acides gras froids, les substrats et cofacteurs : NADH, NADPH, ATP, CoA, AMP, chez « P-L Biochemicals Inc. » ; le P.P.O. et le P.O.P.O.P. chez « Packard Instrument Co. ». Tous les autres produits utilisés proviennent de chez « Merck ».

II. — PRÉPARATION DES MITOCHONDRIES.

Elle est effectuée d'après la méthode de Whittaker [43] modifiée au Laboratoire. Les cerveaux de souris C57 noires sont prélevés, lavés puis homogénéisés dans 10 ml/g de tissu frais de tampon Saccharose 0,32 M Phosphate 0,01 M. L'homogénéisation se fait au moyen de 12 « allers et retours » d'un piston en téflon dans un appareil de Potter-Elvehjem en verre. Les débris tissulaires, noyaux et gros fragments myéliniques sont éliminés par deux centrifugations successives de cinq minutes à 2.000 g dans une centrifugeuse Sorvall RC2. Une troisième centrifugation à 12.500 g pendant trente minutes permet d'éliminer dans le surnageant la fraction microsomale. Le culot est constitué de mitochondries impures. Ce culot est repris dans 1 ml du même tampon par gramme de tissu frais, homogénéisé comme décrit précédemment et déposé sur un gradient discontinu com-

posé de 13 ml de saccharose 1,2 M et 13 ml de saccharose 0,8 M. Une centrifugation à 53.000 g pendant 120 minutes dans une centrifugeuse Spinco L2-50 sépare les fractions myélinique et synaptosomale du culot mitochondrial. Celui-ci est repris dans 1 ml de tampon.

Les protéines des différentes fractions sont dosées par la méthode de Lowry [44].

III. — PURETÉ MITOCHONDRIALE.

Elle est déterminée par deux techniques différentes : microscopie électronique et enzymes marqueuses. Pour la microscopie électronique, le culot mitochondrial est prélevé à la spatule, ~~lavé à l'eau distillée~~ et fixé pendant 24 heures dans du glutaraldehyde à 2,5 p. cent dans du tampon de Sorensen 0,1 M. Après lavage dans ce même tampon, le culot est refixé pendant 1 heure dans de l'acide osmique à 2 p. cent dans le tampon ; puis il est déshydraté et inclus dans l'Epon. Les coupes ultrafines sont contrastées avec de l'uranyl acétate et du citrate de plomb et étudiées au moyen d'un microscope électronique Hitachi HU.II.A.

Trois enzymes marqueuses ont été utilisées pour vérifier la pureté des mitochondries.

— La 5' nucléotidase, marqueur de la membrane plasmique [45] :

Les cerveaux sont préparés dans du tampon saccharose 0,32 M, Tris 0,16 M pH 7,5 ; le milieu d'incubation (1 ml) est composé de tampon Tris (0,05 mM), KCl (0,1 mM), $MgCl_2$ (0,005 mM), Triton X-100 (0,04 p. cent), Saccharose (0,96 mM) et AMP (0,004 mM à pH 7,2). Après 30 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par 5 ml de TCA à 8 p. cent. Après centrifugation et élimination des protéines, 3,6 ml de H_2SO_4 (1,4 N) puis 0,2 ml de Molybdate d'Ammonium à 5 p. cent et enfin 0,2 ml de réactif de Fiske et Subbarow sont ajoutés successivement à 1 ml de surnageant. Après 7 minutes d'ébullition puis refroidissement, la densité optique est lue à 830 nm [46], avec une gamme étalon constituée à partir d'une solution de phosphore à 40 $\mu g/ml$ de tampon.

— La Glucose-6-Phosphatase, marqueur de la fraction microsomale [47] :

Les mitochondries sont préparées dans du tampon saccharose (0,32 M), acide maléique (0,1 M) pH 7. Le milieu d'incubation (1 ml) est composé de 0,1 mM de Glucose-6-Phosphate et 0,06 mM de maléate. Après 30 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par 5 ml de TCA à 8 p. cent ; le dosage du phosphore est effectué comme pour la 5'nucléotidase.

— La Glucose-6-Phosphate déshydrogénase, enzyme marqueuse de la fraction soluble [48] :

Les cerveaux sont préparés dans du tampon saccharose 0,32 M, Tris 0,1 M, pH 7,5. Le mélange réactionnel qui contient l'enzyme est composé de

IV. — BIOSYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES ACIDES GRAS.

La biosynthèse est mesurée par la quantité d'acétyl-CoA ou de malonyl-CoA marqués, incorporés dans les acides gras. Le milieu d'incubation

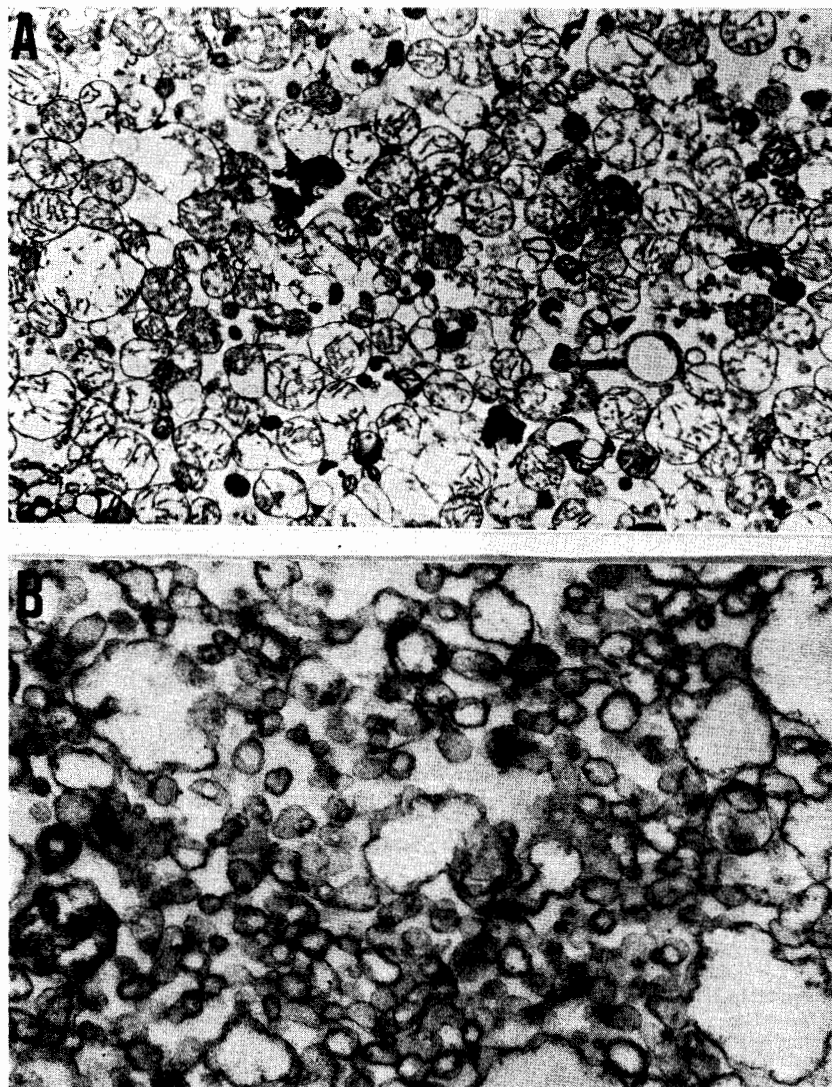


FIG. 1. — Pureté des mitochondries déterminée par microscopie électronique.

A : avant traitement (G = 7 700).

B : après traitement par le Triton X-100 (G = 27 500).

tampon Tris (0,15 mM pH 7,8), $MgCl_2$ (0,01 mM), $NADP^+$ (0,054 mM) au lieu du NAD^+ qui s'est révélé inactif, et d'eau distillée qsp 3 ml. La variation de la densité optique, témoin de la formation de $NADPH$, est suivie à 340 nm au moyen d'un spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

est composé de 1 mg d'enzyme, de 50 nMoles d'acétyl-CoA [$1-^{14}C$] ou de malonyl-CoA [$1,3-^{14}C$] à $2 \mu Ci/\mu Mole$ et en quantités variables de tampon saccharose 0,32 M, phosphate 0,01 M pH 7, des différents substrats et des différents cofacteurs. L'incubation effectuée pendant 30 minutes à 37°

est arrêtée par 0,5 ml de KOH méthanolique à 15 p. cent. Après saponification 30 minutes à 100° et acidification par 0,5 ml d'HCl 5,5 N, les acides gras sont extraits par deux fois 5 ml d'éther de pétrole (PE 60°-80°C).

Pour réaliser la caractérisation des acides gras, les deux extraits réunis sont évaporés à sec sous N₂. On additionne 10 ml d'un mélange de 2,5-diphényloxazol (P.P.O.) à 0,4 p. cent et de 1,4-bis [2(4-méthyl,5-phényloxazolyl)] benzène à 0,03 p. cent dans le toluène, pour compter la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide Packard Tricarb. Les extraits sont aussi éventuellement méthylés [49]. Les esters méthyliques sont chromatographiés en phase gazeuse (appareil « Hewlett-Packard ») et les produits radioactifs sont détectés à l'aide d'un compteur « Panax » couplé au chromatographe. La colonne utilisée est une colonne de SE 30 à 10 p. cent sur chromosorb. La détection se fait par ionisation de flamme. La chromatographie est effectuée en programmation de température de 165° à 260°C à une vitesse de 2°/mn. La nature des pics est déterminée par calcul des Rf et par cochromatographie en utilisant des mélanges d'étalons.

RESULTATS.

I. — PURETÉ DES MITOCHONDRIES.

La micrographie électronique (figure 1A) représentant une préparation mitochondriale de routine

met en évidence la grande pureté de la fraction mitochondriale. Quelques très rares synaptosomes et ribosomes peuvent parfois être mis en évidence. Quelques mitochondries apparaissent abimées : cela est dû au procédé d'inclusion pour la microscopie.

Le tableau I présente les valeurs d'activité spécifique et d'activité totale qui ont été obtenues pour les enzymes marqueuses des différentes fractions. On observe dans les mitochondries une activité totale résiduelle de 2 p. cent de 5'nucléotidase par rapport à l'activité dans le surnageant 2.000 g qui sera toujours pris comme référence, et une activité spécifique élevée (0,6 μ Moles P/h/mg protéines). Par contre, les valeurs obtenues pour la Glucose-6-Phosphatase (activité totale = 0,1 p. cent et activité spécifique = 0,1 μ Moles P/h/mg protéines) et pour la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (activité totale = 0,2 p. cent et activité spécifique = 0,005 unités DO/mn/mg protéines) sont infimes et négligeables.

Il est important de constater que la contamination par les microsomes ou la fraction soluble peut être considérée comme nulle. De plus, le rendement de préparation des mitochondries est de 32 ± 11 p. cent par rapport à l'homogénat de départ (dosé par la monoamine oxydase, la tyramine radioactive étant le substrat [50]). Ainsi une contamination de 2 p. cent du culot mitochondrial par les membranes plasmiques peut être tenue pour extrêmement faible.

TABLEAU I.
*Pureté des mitochondries
déterminée par le dosage d'enzymes marqueuses.*

Fractions	5' Nucléotidase			Glucose-6-phosphatase			Glucose-6-phosphate déshydrogénase		
	AS	AT	p. cent AT	AS	AT	p. cent AT	AS	AT	p. cent AT
Surnageant 2.000 g	0,7	40	100	0,7	138	100	0,04	7	100
Surnageant 12.500 g	0,2	7	17	1	99	72	0,06	6	88
Culot 12.500 g	1,3	23	58	0,4	32	24	0,008	0,55	8
Surnageant 53.000 g	1,7	17	43	0,9	32	23	0,003	0,09	1
Culot mitochondrial	0,6	0,9	2	0,1	0,15	0,1	0,005	0,015	0,2

Les conditions d'obtention des fractions sont décrites avec les méthodes.
AS : activité spécifique — AT : activité totale. Pour la 5'nucléotidase, l'activité spécifique est exprimée en μ Moles de phosphate par heure et par mg de protéines. Il en est de même pour la glucose-6-phosphatase. Pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, les valeurs sont en unités de densité optique par minute et par mg de protéines.

II. — BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS.

A. — Rupture des mitochondries.

L'effet des détergents est montré sur la figure 2. Lorsque des doses variables de Triton X-100, déoxycholate ou digitonine sont ajoutées au milieu d'incubation, seul le Triton a un effet important. On observe, en présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], d'abord un accroissement de la radioactivité extraite puis une diminution, le maximum étant obtenu pour 1 mg de Triton X-100 (l'activité est multipliée par 5). En présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C], seule l'addition de Triton X-100 provoque l'apparition d'une très légère activité, maximale pour une dose de 2,5 mg.

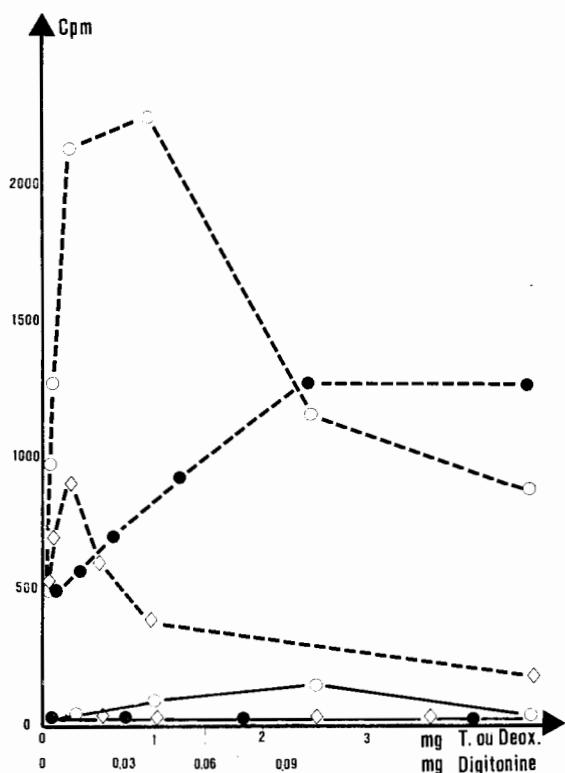


FIG. 2. — Effet des détergents sur la biosynthèse des acides gras, en présence d'acétyl-CoA (traits pleins) ou de malonyl-CoA (traits discontinus).

Triton : ○, T. Digitonine : ●.
Déoxycholate : ◇, Deox.

Si une solution mitochondriale à 2 mg de protéines/ml est soniquée des durées variables puis incubée, on observe en présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], un accroissement de la radioactivité extraite, maximum pour une durée de sonication de 3 mn, puis un décroissement du à une dénaturation probable de l'enzyme qui n'a plus d'activité

après 6 minutes de sonication. En présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C], aucune activité n'est décelée.

Toutes les expériences suivantes seront donc effectuées en présence de 1 mg de Triton. A cette dose, les mitochondries sont brisées comme le montre la photographie au microscope électronique (figure 1 B).

B. — Etude des cofacteurs.

1) Effet des nucléotides NADH et NADPH (figure 3).

— En présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] l'addition de quantités croissantes de NADPH permet l'apparition puis l'augmentation de l'activité biosynthétique. Un effet identique quoique moindre est observé avec le NADH pour lequel un plateau est atteint à la concentration de 3.000 μM. L'addition de quantités variables de NADH en présence d'une quantité constante de NADPH permet d'observer une courbe de même pente avec un décalage à l'origine. En l'absence de cofacteur, aucune activité n'est décelée. En présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C], il y a très peu d'augmentation de l'activité quel que soit le cofacteur.

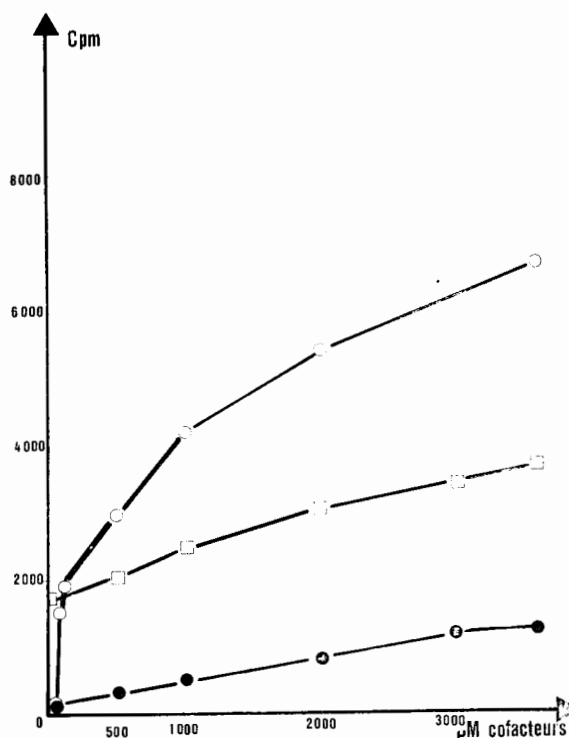


FIG. 3. — Effets des nucléotides NADPH et NADH.

● : NADH seul, ○ : NADPH seul, □ : NADH en présence de NADPH (100 μM).

— Les produits de réaction en présence de malonyl-CoA ont été analysés par chromatographie : (tableau II A). Cette technique montre que la majeure partie de la radioactivité se trouve sur l'acide palmitique. Les acides stéarique et myristique en contiennent un peu ; enfin, les acides

le Triton (1 mg), du NADPH (500 μ M) et du NADH (500 μ M).

2) Effet de l'ATP et du CoA.

En présence de malonyl-CoA [$1,3-^{14}$ C], l'addition de quantités croissantes d'ATP entraîne une

TABLEAU II.
Produits des réactions enzymatiques.

Longueur de chaîne	12	14	16	18	20	22	24
	p. cent	p. cent	p. cent	p. cent	p. cent	p. cent	p. cent
Milieu d'incubation							
A	nd	4	85	7	1	1	nd
B	nd	4	88	6	tr	tr	nd

Les produits des réactions sont étudiés dans deux milieux d'incubation :

A : Malonyl-CoA (50 μ M), NADPH (500 μ M), NADH (500 μ M), Triton X-100 1 g/l.

B : Malonyl-CoA (50 μ M), NADPH (500 μ M), NADH (500 μ M), Triton X-100 1 g/l,

ATP (5 mM), CoA (50 μ M).

nd : indétectable.

tr : trace.

arachidique et béhénique sont très faiblement radioactifs.

Les expériences suivantes seront effectuées avec un milieu d'incubation (1 ml) comprenant, outre

augmentation de la radioactivité extraite (figure 4). En présence d'acétyl-CoA [$1-^{14}$ C] aucun effet n'est observé. La figure 5 montre que le CoA a un effet

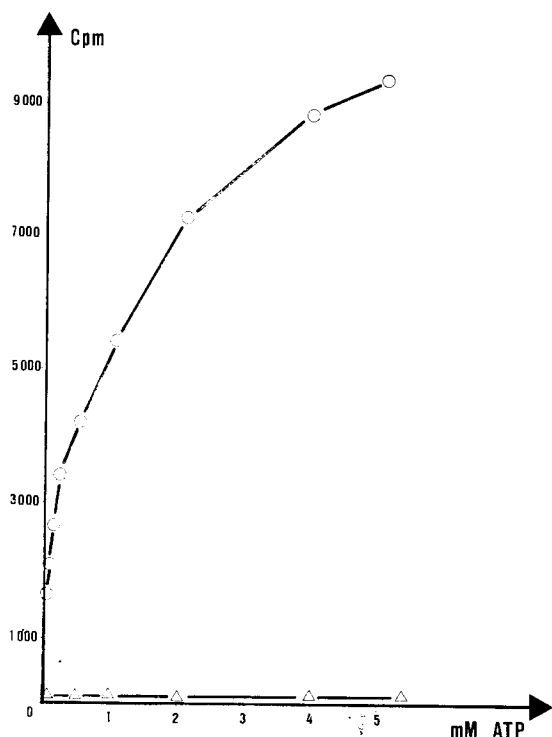


FIG. 4. — Effet de concentrations croissantes en ATP sur l'incorporation du malonyl-CoA (O) ou de l'acétyl-CoA (Δ) dans les acides gras.

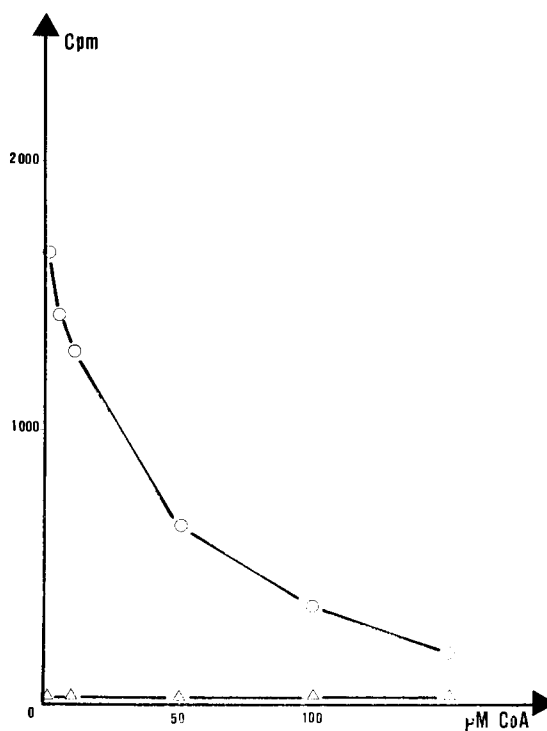


FIG. 5. — Effet de concentrations croissantes de CoA sur l'incorporation du malonyl-CoA (O) ou de l'acétyl-CoA (Δ) dans les acides gras.

inhibiteur sur la biosynthèse des acides gras en présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C] et d'ATP. En présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C] et d'ATP, aucun effet n'a été observé.

L'analyse par chromatographie des produits de la réaction (tableau II B) montre que l'addition d'ATP et de CoA au milieu d'incubation ne modifie pas le profil des acides gras, si ce n'est par une légère diminution au niveau des acides gras à chaîne très longue.

C. — Effet des substrats.

1) Effet de l'acétyl-CoA.

En présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], l'addition de quantités croissantes d'acétyl-CoA met en évidence une activité biosynthétique de type *de novo* (figure 6). On a vu en effet que l'acétyl-CoA n'est pas incorporé s'il est seul dans le milieu d'incubation et ce quelle que soit la concentration

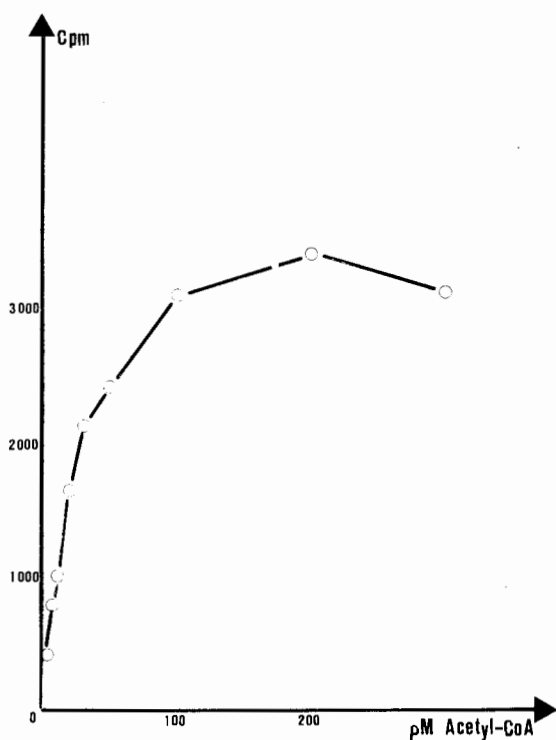


FIG. 6. — Biosynthèse des acides gras en présence de malonyl-CoA et de concentrations variables d'acétyl-CoA.

en protéines. Ce système *de novo* n'est pas du à une contamination des mitochondries par la fraction soluble ou par les microsomes car d'une part les dosages d'enzymes marqueurs excluent cette hypothèse (voir précédemment) et d'autre part

toutes les activités *de novo* microsomales et solubles sont trouvées dans le surnageant de centrifugation 12.500 g. La fraction sucrose 1,2 M immédiatement supérieure au culot mitochondrial lors de la préparation ne contient que très peu d'activité négligeable par rapport à celle des mitochondries.

2) Effet du palmityl-CoA.

En présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], l'addition de doses croissantes de palmityl-CoA entraîne une inhibition croissante de la biosynthèse des acides gras. Au contraire, en présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C], une activité biosynthétique apparaît dont le maximum est atteint après un ajout de 30 nMoles de palmityl-CoA : figure 7.

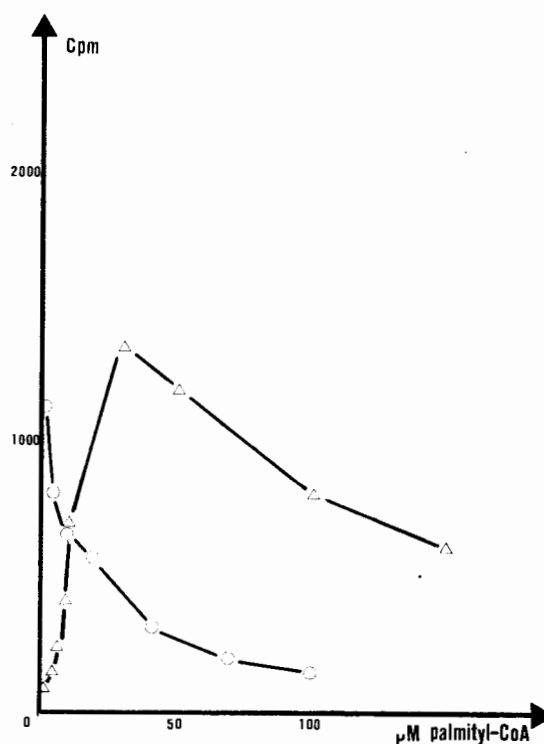


FIG. 7. — Effet de concentrations croissantes de palmityl-CoA sur l'incorporation du malonyl-CoA (O) ou de l'acétyl-CoA (Δ).

DISCUSSION.

La pureté de la préparation mitochondriale est bien mise en évidence sur les micrographies électroniques et par le dosage des enzymes marqueuses. En ce qui concerne ces dernières, il est fondamental de constater que la contamination par les microsomes ou la fraction soluble peut être

considérée comme nulle. Ainsi les systèmes de biosynthèse des acides gras mitochondriaux ne sont souillés, ni par la synthétase soluble, ni par les diverses enzymes microsomaux. Si la persistance d'une activité enzymatique élevée de la 5'nucléotidase dans les mitochondries pourrait laisser croire à une importante contamination membranaire (par la membrane plasmique), cette hypothèse doit être écartée au vu des photos en microscopie électronique. Bien plus, c'est la spécificité même de la 5'nucléotidase en tant que « marqueur » des seules membranes plasmiques qui paraît contestable ; cette enzyme, en effet, a déjà été retrouvée dans les microsomes et le réticulum endoplasmique du foie de rat [51, 52, 53], et dans les microsomes de cerveau de rat [54] et de souris [55].

L'effet de la rupture des mitochondries, mesuré par l'augmentation de la biosynthèse des acides gras, montre, en présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], la supériorité de l'effet du Triton (x 5) par rapport aux autres détergents (x 2) et à la sonication (x 3). Cette supériorité paraît confirmée par le fait que seule l'addition de Triton X-100 permet de faire apparaître une légère activité biosynthétique en présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C]. La microscopie électronique montre que les mitochondries rompues par le détergent forment de nombreuses vésicules. Le fait de trouver une activité après rupture des organelles suggère que les enzymes sont intramitochondriales.

L'addition des différents cofacteurs, NADH, NADPH, ATP et CoA, séparément ou ensemble, ne permet pas l'apparition d'une biosynthèse en présence d'acétyl-CoA [1-¹⁴C] seul. En présence de malonyl-CoA [1,3-¹⁴C], par contre, le NADPH est indispensable à la biosynthèse des acides gras ; il ne peut être que partiellement remplacé par le NADH à des doses beaucoup plus élevées. Toutefois, l'allure des courbes suggère que ces deux nucléotides pourraient agir indépendamment et que leurs effets sont additifs. L'activité biosynthétique qui peut être multipliée par 6 par l'addition d'ATP est au contraire inhibée si l'on ajoute du CoA. Cette biosynthèse est de type *de novo* comme le montrent l'expérience d'addition croissante d'acétyl-CoA en présence de malonyl-CoA et l'analyse par chromatographie des produits de réaction avec ou sans ATP : 88 p. cent C₁₆ + 6 p. cent C₁₈ (tableaux IIA et IIB). Le malonyl-CoA semble donc être partiellement dégradé en acétyl-CoA pour permettre au processus *de novo* de fonctionner. Il pourrait aussi allonger des acyl-CoAs à chaîne courte. L'existence du système *de novo* est encore confirmée par l'inhibition de la biosynthèse lorsque du palmityl-CoA est ajouté au milieu

d'incubation, en présence de malonyl-CoA (phénomène du à une rétro-inhibition par le produit de réaction ou à un effet détergent de l'acyl-CoA exogène). Au contraire, lorsqu'il est ajouté en présence d'acétyl-CoA, une activité biosynthétique apparaît, probablement due à un allongement du palmityl-CoA.

En conclusion, l'acétyl-CoA seul n'est pas incorporé dans les mitochondries de cerveau de souris, mais le malonyl-CoA l'est, qui est impliqué dans une biosynthèse de type *de novo*. Au contraire, en présence d'un acyl-CoA à chaîne plus longue, la biosynthèse semble consister en un allongement par l'acétyl-CoA de l'acyl-CoA fourni, cet acyl-CoA ne pouvant être allongé par le malonyl-CoA. Il apparaît donc que seul un acyl-CoA exogène est susceptible d'être allongé par l'acétyl-CoA dans les mitochondries.

Des expériences sont en cours pour vérifier ces hypothèses.

Remerciements.

Nous tenons à remercier le Docteur Brigitte Berger pour la réalisation des micrographies et Monsieur François Lachapelle pour l'élevage des animaux.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière de l'I.N.S.E.R.M. et de la D.G.R.S.T.

RÉSUMÉ.

L'incorporation de l'acétyl-CoA ou du malonyl-CoA dans les acides gras des mitochondries cérébrales de souris est étudiée. Cette étude nécessite la rupture des mitochondries qui est réalisée au mieux par le Triton X-100 (d'autres détergents ou la sonication étant moins actifs). Les cofacteurs nécessaires, NADH et NADPH, sont précisés, leurs effets analysés. Le rôle de l'ATP et du CoA est abordé, le premier augmentant la biosynthèse, le second l'inhibant. L'acétyl-CoA ne semble pas pouvoir allonger les acides gras endogènes ; il peut par contre allonger le palmityl-CoA ajouté au milieu d'incubation. Au contraire, le malonyl-CoA permet la biosynthèse des acides gras par un mécanisme *de novo* ; ajouter de l'acétyl-CoA au malonyl-CoA augmente l'activité. Le malonyl-CoA semble donc être partiellement dégradé en acétyl-CoA pour permettre au processus *de novo* de fonctionner. L'analyse des produits de réaction confirme ces résultats. Le palmityl-CoA n'est pas allongé par le malonyl-CoA mais au contraire son addition au milieu d'incubation annule la biosynthèse des acides gras par inhibition du système *de novo*.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Lynen, F. (1961) *Fed. Proc.*, **20**, 941-951.
2. Brady, R. O., Bradley, R. M. & Trams, E. G. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 3093-3098.
3. Wakil, S. J. & Bressler, R. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 687-693.
4. Porter, J. W. & Tietz, A. (1957) *Biochem. Biophys. Acta*, **25**, 41-52.
5. Alberts, A. W., Goldman, P. & Vagelos, P. R. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5201-5209.

6. Lennarz, W. J., Light, R. J. & Bloch, K. (1962) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**, 840-844.
7. Barron, E. J., Squires, C. & Stumpf, P. K. (1961) *J. Biol. Chem.*, **238**, 557-562.
8. Brady, R. O. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 3099-3103.
9. Pollet, S. A., Bourre, J. M. & Baumann, N. A. (1969) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **268**, 2146-2149.
10. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Dubois, G. & Baumann, N. A. (1970) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **271**, 1221-1223.
11. Pollet, S. A., Bourre, J. M., Chaix, G., Daudu, O. & Baumann, N. A. (1973) *Biochimie*, **55**, 333-341.
12. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Chaix, G., Daudu, O. & Baumann, N. A. (1973) *Biochimie*, **55**, 1473-1479.
13. Goldberg, I., Schechter, I. & Bloch, K. (1973) *Science*, **144**, 497-499.
14. Bourre, J. M., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 1027-1034.
15. Aeberhard, E. & Menkes, J. H. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3834-3840.
16. Boone, S. C. & Wakil, S. J. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1470-1479.
17. Yatsu, F. & Moss, S. (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1895-1901.
18. Carey, E. M. & Cantrill, R. C. (1975) *J. Neurochem.*, **24**, 807-809.
19. Moss, S. A. & Yatsu, F. M. (1974) *Lipids*, **9**, 957-961.
20. Hulsmann, W. C. (1960) *Biochem. Biophys. Acta*, **45**, 623-627.
21. Hulsmann, W. C. (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, **58**, 417-429.
22. Shaw, W. N., Dituri, F. & Gurin, F. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 417-421.
23. Wakil, S. J., McLain, L. W. & Warshaw, J. B. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 31-32.
24. Harlan, W. R. & Wakil, S. J. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 131-135.
25. Harlan, W. R. & Wakil, S. J. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 3216-3223.
26. Hull, F. E. & Whereat, A. F. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4023-4028.
27. Whereat, A. F., Hull, F. E. & Orishimo, M. W. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4013-4022.
28. Christ, E. J. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, **152**, 50-62.
29. Howard, C. F. Jr (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, **164**, 448-450.
30. Christ, E. J. & Hulsmann, W. C. (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, **60**, 72-79.
31. Hulsmann, W. C. & Dow, D. S. (1964) *Biochem. Biophys. Acta*, **84**, 486-489.
32. Dahlen, J. V. & Porter, J. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 207-223.
33. Quagliariello, E., Landiscrina, C. & Coratelli, P. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, **164**, 12-24.
34. Barron, E. J. (1966) *Biochem. Biophys. Acta*, **116**, 425-440.
35. Witt-Peeters, E. M. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, **176**, 453-462.
36. Witt-Peeters, E. M., Scholte, H. R. & Elenbaas, H. L. (1970) *Biochem. Biophys. Acta*, **210**, 360-370.
37. Whereat, A. F., Orishimo, M. W. & Nelson, J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6498-6506.
38. Colli, W., Minkle, P. C. & Pulmann, M. E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **214**, 6432-6443.
39. Grunnet, N. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 909-917.
40. Hulsmann, W. C. (1966) *Biochem. Biophys. Acta*, **125**, 398-407.
41. Makada, H. I., Wolfe, J. B. & Wick, A. N. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 145-149.
42. Englund, S. & Siegel, L. (1969) *Methods in Enzymol.*, **XIII**, 99-106.
43. Eichberg, J., Whittaker, O. P. & Dawson, R. M. C. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 91-100.
44. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
45. Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rumke, P. R. (1964) *Biochem. Biophys. Acta*, **90**, 126-145.
46. Bartlett, G. R. (1951) *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468.
47. Swanson, M. A. (1955) *Methods in Enzymol.*, **II**, 541-543.
48. Demoss, R. D. (1955) *Methods in Enzymol.*, **I**, 328-332.
49. Morrisson, W. R. & Smith, L. M. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 600-608.
50. Wurtman, R. J. & Axelrod, J. (1963) *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 1439-1443.
51. Song, C. S. & Bodansky, O. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 694-701.
52. Reid, E. (1967) *Enzyme Cytology*, Academic Press, London, 321.
53. Widnell, C. C. (1972) *The Journal of Cell Biology*, **52**, 542-558.
54. Banik, N. L. & Davison, A. N. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 1051-1062.
55. Bourre, J. M., Pollet, S. A., Daudu, O. L. & Baumann, N. A. (1973) *Brain Research*, **51**, 225-239.