

BIOCHIMIE. — *Biosynthèse des acides gras à longue chaîne dans les microsomes de cerveau de souris.* Note (*) de MM. **Jean-Marie Bourre, Serge Pollet, M^{lles} Gisèle Dubois et Nicole Baumann**, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Dans les microsomes de cerveau de souris, la formation des acides gras saturés à longue chaîne pourrait se faire par l'intermédiaire de deux systèmes distincts : l'un donnant de l'acide stéarique, l'autre des acides gras à chaîne plus longue.

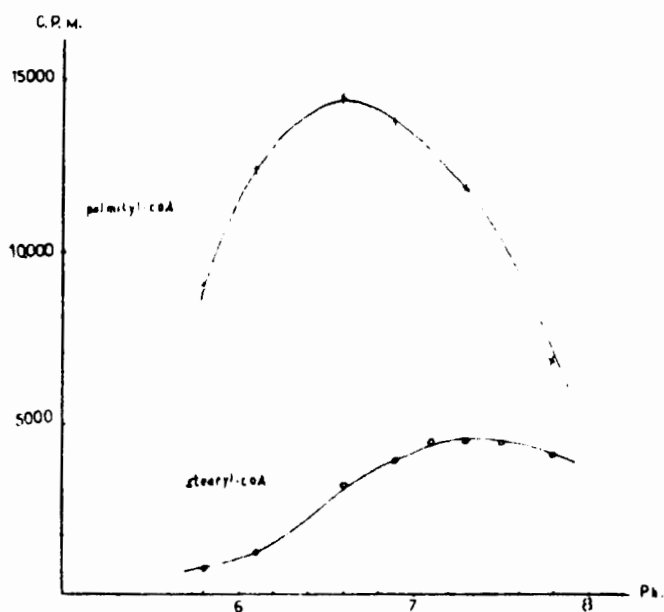
Les acides gras à longue chaîne sont des constituants importants des sphingolipides cérébraux, principalement ceux de la matière blanche. Nous avons pu montrer chez la souris Quaking, atteinte d'une maladie héréditaire caractérisée par un défaut de myélinisation du système nerveux central, une diminution des acides gras à longue chaîne non hydroxylés, à 24 atomes de carbone plus particulièrement [(¹), (²)]. Cette anomalie peut s'expliquer par un blocage enzymatique au niveau de la biosynthèse des acides gras. Le système *de novo* fonctionne normalement chez la souris mutante (³) et ne produit que peu d'acide stéarique. Celui-ci est présent en quantité relativement normale chez la souris Quaking. Les acides palmitique et stéarique ayant des vitesses de renouvellement semblables, on peut proposer l'existence de deux systèmes d'allongement distincts faisant suite au système *de novo* : l'un donnant de l'acide stéarique, l'autre des acides gras à chaîne plus longue, ce dernier pouvant être perturbé chez la souris Quaking. C'est dans le but de différencier ces deux systèmes qu'une étude de l'allongement dans les microsomes du cerveau de souris a été entreprise.

MÉTHODES. — Pour préparer les microsomes on utilise des lots de souris de 18 jours, âge où la myélinisation est active. Après élimination du sang, les cerveaux sont homogénéisés dans un tampon saccharose 0,32 M, phosphate de potassium pH 6,9, 0,1 M, chlorure de sodium 0,9 %. Fragments cellulaires et mitochondries sont éliminés par centrifugation à 17 000 g pendant 30 mn. Les microsomes, obtenus par une centrifugation du surnageant, une heure à 100 000 g, sont lavés par homogénéisation dans le tampon et recentrifugés dans les mêmes conditions. Les protéines sont dosées par spectrophotométrie (⁴). L'incubation se fait en présence de malonyl-CoA 1-3 ¹⁴C (2 mC/mM), des différents substrats, de solution enzymatique et de tampon (q. s. p. 1 ml). Les acides gras formés sont extraits par deux fois 4 ml d'éther de pétrole (45-60 °C) après hydrolyse alcaline et acidification, puis éventuellement méthylés en présence de BF₃ (⁵) pour étudier les produits de la réaction enzymatique. Cette étude est faite soit par chromatographie en phase gazeuse avec comptage automatique de la radioactivité de l'éluat (appareil Barber-Coleman) (¹⁰) soit par deux chromatographies successives sur couche mince : une première plaque de gel de silice H sépare esters du cholestérol, acides gras hydroxylés et non hydroxylés (solvant : éther de pétrole-éther 80/20, v/v, révélateur : rhodamine) ; les acides gras non hydroxylés extraits sont alors divisés en saturés et divers types d'insaturés sur une plaque de gel de silice H imprégnée à 15 % de nitrate d'argent (solvant :

hexane-benzène 3/7 v/v). Dans ce cas, la radioactivité est mesurée par scintillation liquide en présence de Cab-O-Sil.

RÉSULTATS. — Les microsomes ne sont souillés ni par des enzymes solubles (pas d'activité de la glucose-6-phosphate déhydrogénase) ni par des enzymes mitochondriaux (absence d'activité malate déhydrogénase). Le lavage est indispensable.

— L'incubation se fait à 38 °C pendant 30 mn à pH 7 en présence de 3 mg de protéines, de 50 μ M de malonyl CoA et 50 μ M d'acyl CoA. Le NADPH est indispensable. comme il n'est pas inhibiteur on en met un excès : 500 μ M. Le NADH n'est pas utile : 5 μ M ne permettent de recouvrer que 30 % de l'incorporation : en présence de NADPH il y a même une très légère diminution de cette incorporation.



Allongement du palmitoyl-CoA et du stéaryl-CoA en fonction du pH du milieu d'incubation

— Le malonyl CoA est fixé en quantité différente selon la présence de palmitoyl CoA ou de stéaryl CoA (activité spécifique 2,5 fois plus grande en présence du premier qu'en présence du second). Même en l'absence d'acyl-CoA il y a incorporation de malonyl CoA dans les acides gras. Une étude en fonction du pH montre qu'avec le palmitoyl-CoA le maximum d'incorporation est à 6,6, avec le stéaryl à 7,3 et, en l'absence d'acyl-CoA, à 7,5. En faisant varier le temps d'incubation ou la concentration en protéines l'allongement du stéaryl-CoA se fait à une vitesse beaucoup plus lente que celui du palmitoyl CoA.

Dans les conditions opératoires on ne synthétise pas d'acides gras hydroxylés et 10 à 15 % de l'activité se retrouve dans les insaturés.

La décarboxylation ⁽⁶⁾ des produits de la réaction donne :

TABLEAU

Substrat	Malonyl-CoA seul	Palmityl-CoA + Malonyl-CoA	Stéaryl-CoA + Malonyl-CoA	Acétyl-CoA + Malonyl-CoA
Unité C ₂ ajoutée	2,3	1,3	2,6	4

Par chromatographie en phase gazeuse, en présence de palmityl-CoA on trouve 80 % de l'activité au niveau du stéarate, en présence de stéaryl-CoA l'activité se situe dans le palmitate et dans les acides gras à longue chaîne.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — L'allongement des acides gras de longueur de chaîne moyenne, mis en évidence dans les microsomes de foie de rat ⁽⁷⁾, existe aussi dans le cerveau de souris. Le palmityl CoA est allongé de deux atomes de carbone comme le prouvent chromatographie et décarboxylation. Le stéaryl-CoA est allongé en acide gras à longue chaîne, mais en même temps il faut noter qu'il existe parallèlement une importante incorporation du malonyl dans le palmitate. Celle-ci peut être due soit au système *de novo* ⁽⁸⁾ qui n'est pas inhibé par le stéaryl-CoA, soit à l'allongement des acides gras endogènes à chaîne plus courte. Ceci explique l'incorporation de malonyl-CoA en l'absence d'acyl-CoA.

L'ensemble de ces résultats, particulièrement les courbes en fonction du pH permet de postuler l'existence de deux systèmes d'allongement distincts dans les microsomes : l'un donne de l'acide stéarique, l'autre des acides gras à chaîne plus longue ; ces derniers pourraient être synthétisés dans les microsomes de la matière blanche, lieu possible de la formation de la membrane myélinique ⁽⁹⁾. Des études sont en cours pour déterminer si la souris Quaking, déficiente en myéline, a une perturbation dans le système d'allongement de l'acide stéarique.

(*) Séance du 7 septembre 1970.

(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) S. POLLET, J.-M. BOURRE et N. A. BAUMANN, *Comptes rendus*, 268, Série D, 1969, p. 2146-2149.

(4) E. LAYNE, *Methods in Enzymology*, 3, 1957, p. 451-454.

(5) W. P. MORRISON et L. M. SMITH, *J. Lip. Res.*, 5, 1964, p. 600-608.

(6) E. F. PHARES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 1951, p. 173.

(7) D. H. NUGTEREN, *Biochimica et Biophysica Acta*, 106, 1965, p. 280-290.

(8) E. LORCH, S. ABRAHAM et I. L. CHAIKOFF, *Bioch. Bioph. Acta*, 70, 1963, p. 627.

(9) Y. KISHIMOTO, B. W. AGRANOFF, N. S. RADIN et R. M. BURTON, *J. Neurochem.*, 16, 1969, p. 397.

(10) Le Professeur Mazliak a bien voulu nous permettre d'utiliser son appareil.

(Laboratoire de Neurochimie, I. N. S. E. R. M.,
Clinique des Maladies du Système Nerveux,
Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière,
47, boulevard de l'Hôpital, 75-Paris, 13^e.)

BIOCHIMIE. — *Etude des lipides cérébraux de la souris « Quaking » au cours de la myélinisation.* Note (*) de MM. **Claude Jacque, Jean-Marie Bourre,** M^{lles} **Paquita Moreno et Nicole Baumann,** présentée par M. Jacques Tréfoüël.

La souris « Quaking » est un mutant atteint d'une maladie héréditaire touchant la myélinisation du système nerveux central. Au cours de la croissance de l'animal les cérébrosides cérébraux augmentent beaucoup plus lentement que chez le témoin pendant la même période. Le cholestérol et les phospholipides présentent une évolution identique chez la souris « Quaking » et chez le témoin.

Les souris « Quaking » sont atteintes d'une maladie héréditaire du système nerveux central dans laquelle la teneur en myéline est considérablement réduite. Au cours d'études récentes sur les lipides cérébraux, chez le mutant adulte, nous avons montré que les cérébrosides sont fortement diminués [Baumann et coll. [(¹), (²)]] ainsi que les acides gras à longue chaîne [Jacque et coll. (³)]. Les cérébrosides sont des lipides caractéristiques de la myéline ; dans les cerveaux de souris [Folch-Pi (⁴)] et de rat [Wells et Dittmer (⁵)], ils augmentent bien plus fortement que les autres lipides au cours de la myélinisation. Afin de voir si, chez les souris « Quaking », il y aurait un défaut d'élaboration de ces constituants essentiels de la myéline, nous avons examiné l'évolution des proportions des lipides cérébraux au cours de la myélinisation. Ce processus de maturation cérébrale peut, chez la souris, être suivi tout du long du fait de son apparition tardive, post-natale.

Les dosages et les chromatographies sur couche mince des lipides cérébraux ont été effectués comme il a été décrit antérieurement (¹). Chaque analyse a été pratiquée sur des lots de 10 souris. Les témoins étaient constitués d'hétérozygotes et d'homozygotes de phénotype normal et de même fratrie. Les examens n'ont pas été effectués sur des souris « Quaking » de moins de 12 jours car avant cet âge il n'est pas possible de reconnaître les homozygotes « Quaking ».

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES LIPIDES CÉRÉBRAUX. — Les cérébrosides donnent normalement 2 taches ; chez la souris « Quaking » ces taches sont nettement diminuées [(¹), (²)]. L'étude en fonction de l'âge montre qu'ils apparaissent chez les témoins entre le 12^e et le 15^e jour (*fig. 1*). Avant cette date ils sont en quantité trop faible pour pouvoir être détectés par chromatographie sur couche mince. Les 2 taches, qui correspondent à la cérasine et à la phrénosine, semblent apparaître simultanément. Les sulfatides atteignent une quantité détectable au même âge que les cérébrosides et augmentent comme eux jusqu'au 25^e jour. Les autres lipides (cholestérol et glycérophosphatides) sont présents dès la naissance et ne semblent pas subir d'augmentation relative jusqu'à l'âge adulte. Chez la souris « Quaking » (*fig. 2*) les cérébrosides apparaissent plus tard mais la tache correspondant à la cérasine n'atteint jamais le seuil de détection. La phrénosine est visible à l'âge de 21 jours. Les sulfatides ne sont pas détectables.

DOSAGES DES LIPIDES CÉRÉBRAUX (tableau). — Chez les souris témoins le taux des cérébrosides cérébraux augmente nettement au cours de la myélinisation entre