

8

BIOCHIMIE. — *Hydrolyse des acyl-coenzymes A en présence de protéines microsomales. Formation d'un complexe entre acides gras et protéines microsomales.*
Note (*) de MM. **Serge Pollet, Jean-Marie Bourre, M^{lles} Odile Daudu et Nicole Baumann**, présentée par M. Etienne Wolff.

En présence de protéines microsomales les acyl-CoA sont d'une part hydrolysés en acide gras libre, et d'autre part se fixent sur les protéines. Le stéaryl-CoA et le palmityl-CoA ont un comportement différent.

Lors de l'étude de l'allongement des acides gras dans les microsomes de cerveau de souris nous avons remarqué, en absence de NADPH et de malonyl-CoA, que les acyl-CoA sont transformés en un produit extractible par l'acétate d'éthyle. Or, sans protéines, les acyl-CoA ne sont pas extraits par ce solvant alors que les acides gras libres le sont. Le produit de l'incubation de protéines microsomales et d'acyl-CoA pourrait donc être un acide gras libre obtenu soit par déacylation directe, soit après fixation sur un lipide ou une protéine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les microsomes de cerveau de souris de 18 jours sont préparés selon la technique habituelle (1) et dosés par la méthode de Lowry (2). Les substrats radioactifs (acyl-CoA ou acides gras libres) sont incubés à 37 °C dans du tampon phosphate de K 0,1 M pH 7, saccharose 0,32 M, NaCl 0,9 %. Les produits de la réaction sont extraits par l'acétate d'éthyle (2 fois 5 ml/ml de milieu d'incubation).

La rupture de la liaison thioester des acyl-CoA est suivie en spectrophotométrie à 232 m μ (3) ; l'apparition de groupements thiols est suivie par le DTNB (4).

Une chromatographie sur plaque de gel de silice H permet de séparer les lipides extraits du milieu d'incubation par l'acétate d'éthyle (solvant : chloroforme-méthanol-eau 70/30/4 V/V/V).

Le passage sur colonne « Sephadex G 15 » du milieu d'incubation donne dans l'éluat les protéines, dont l'apparition est suivie par le dosage de Layne (5) dans les fractions de 1 ml qui sont successivement collectées. Les acyl-CoA et les acides gras sont retenus.

RÉSULTATS. — 1. *Extraction par l'acétate d'éthyle.* — En l'absence de protéines : 50 nM de substrats sont incubés dans 1 ml de tampon à 37 °C pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par 0,5 ml de HCl 5,5 N. Le palmityl-CoA est extrait à 7 %, le stéaryl à 15 %. Les acides gras libres sont extraits à 100 %.

En présence de protéines (100 μ g), les 50 nM d'acyl-CoA sont extraites à 100 % comme le montre la courbe 1 ; les acides gras libres restent totalement extractibles quelle que soit la concentration en protéines.

Le taux d'extraction des acyl-CoA en fonction du temps d'incubation (courbe n°2) montre une réaction à cinétique rapide, les vitesses de réaction pour le palmityl-CoA et le stéaryl-CoA sont identiques.

2. *Disparition des liaisons thioesters.* — Il y a une diminution de la densité optique à 232 m μ due à l'hydrolyse des liaisons thioesters. L'apparition de groupements thiols libres est confirmée par dosage au DTNB. La vitesse initiale de l'hydrolyse en fonction de la concentration en protéines (courbe 3) montre que la réaction a une cinétique plus rapide en présence de stéaryl-CoA que de palmityl-CoA.

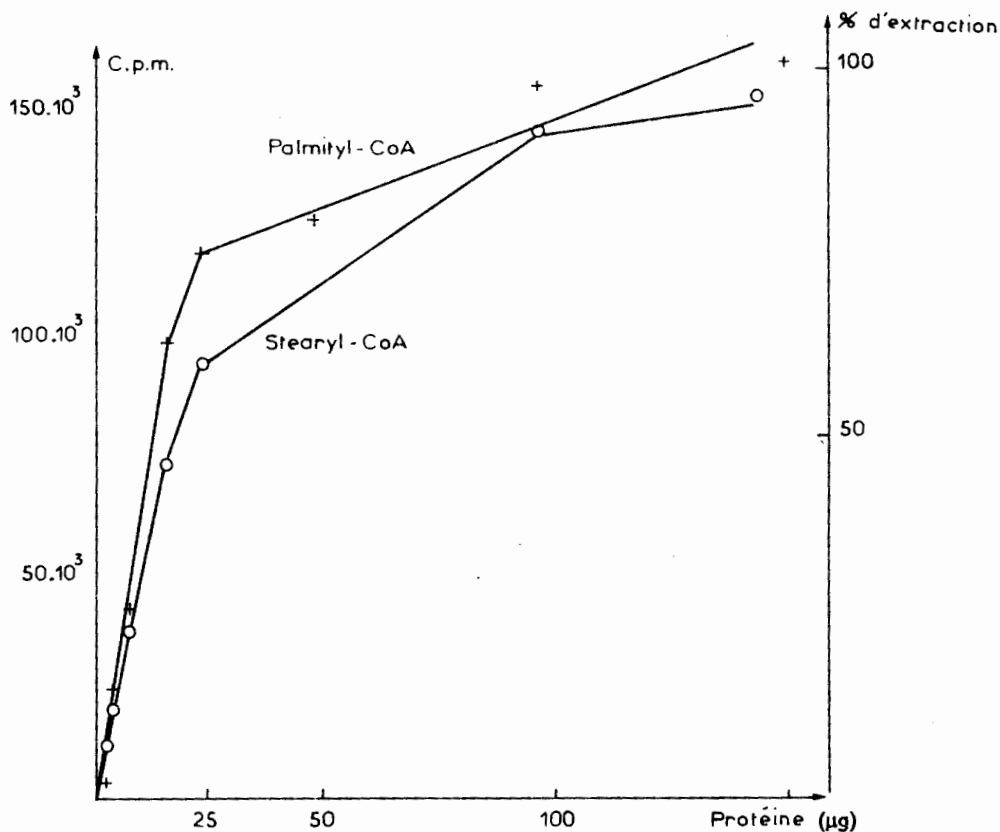


Fig. 1. — Vitesse d'hydrolyse des acyl-CoA en fonction de la concentration en protéines.
+ : stéaryl-CoA ; O : palmityl-CoA

3. *Non-fixation sur les lipides après incubation (non arrêtée par HCl).* — La chromatographie sur plaque des lipides extraits par l'acétate d'éthyle montre que toute l'activité se retrouve au niveau des acides gras libres, et non au niveau des lipides complexes.

4. *Passage sur colonne « Sephadex ».* — La totalité du milieu d'incubation non arrêtée par HCl est déposée sur colonne ; la fraction protéique (1 200 µg) contient 10 % de l'activité du stéaryl-CoA utilisé.

Une purification des protéines est obtenue au moyen d'une coupe au sulfate d'ammonium (30 % de saturation). Dans ces conditions l'éluat protéique (100 µg) contient 20 % de l'activité du stéaryl-CoA utilisé, 5 % du palmityl-CoA. Si des acides gras libres sont utilisés, 2 % de l'activité de l'acide palmitique et 6 % de l'activité de l'acide stéarique sont retrouvés au niveau des protéines.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — La chromatographie sur plaque montre que l'activité en sortie de colonne n'est pas liée aux lipides ; il s'agit donc alors d'un complexe acyl-protéine. Pour 100 μg de protéines la totalité de l'activité est extraite par l'acétate d'éthyle, 10 % provenant d'une liaison faible entre acides gras et protéines (faible puisque détruite par l'acétate d'éthyle), 90 % représentant des acides gras libres.

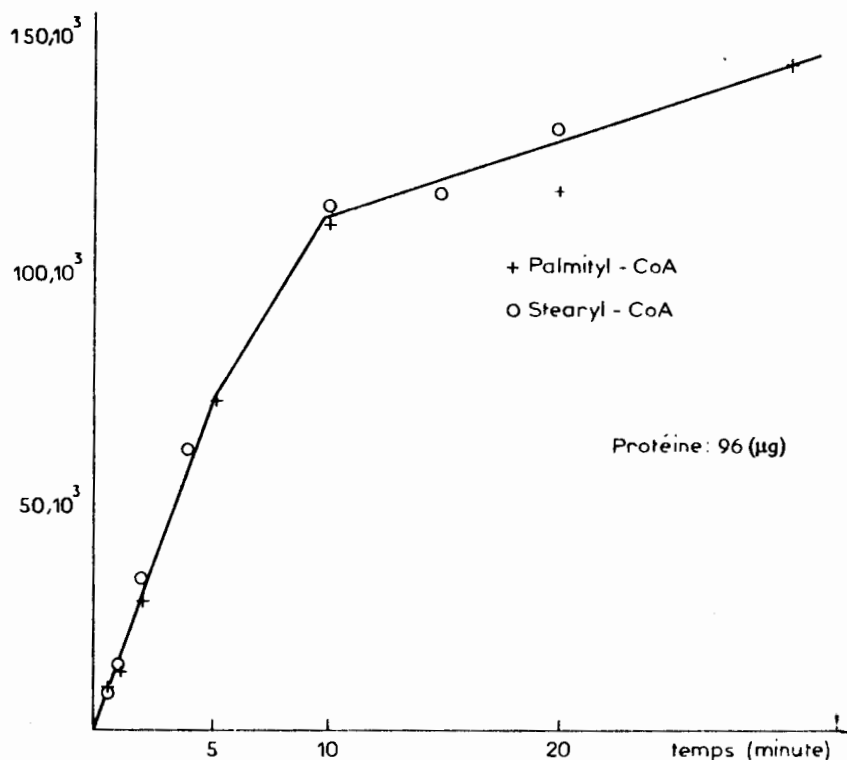


Fig. 2. — Taux d'extraction des acyl-CoA en fonction du temps

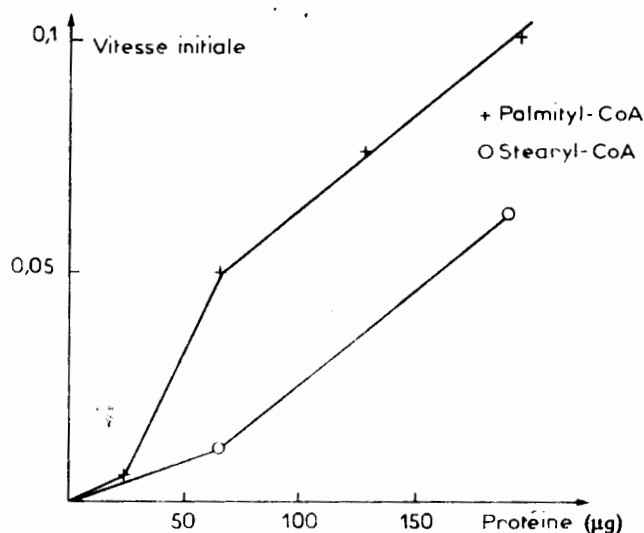


Fig. 3. — Extraction des acyl-CoA par l'acétate d'éthyle en présence de protéines

(4)

Le stéaryl-CoA a une cinétique d'hydrolyse plus rapide que celle du palmityl-CoA. Cette réaction n'est pas réversible dans les conditions expérimentales utilisées puisque les acides gras libres restent totalement extractibles quelle que soit la concentration en protéines.

Il semble que la liaison entre acide gras et protéine se fasse plus facilement avec le stéaryl-CoA qu'avec le palmityl-CoA, particulièrement après purification par coupe au sulfate d'ammonium.

Des travaux sont en cours pour voir si ce complexe ne serait pas un substrat pour l'allongement des acides gras dans le cerveau de souris, et si la différence de comportement du stéaryl-CoA et du palmityl-CoA ne serait pas à l'origine des deux systèmes d'allongement postulés ⁽¹⁾.

(*) Séance du 2 août 1971.

(1) J.-M. BOURRE, S. POLLET, G. DUBOIS et N. BAUMANN, *Comptes rendus*, 271, Série D, 1970, p. 1221.

(2) O. LOWRY, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.

(3) *Methods in Enzymology*, 3, 1957, p. 936.

(4) C. L. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys. Acta*, 4, 1950, p. 305.

(5) E. LAYNE, *Methods in Enzymology*, 3, 1957, p. 453.

Laboratoire de Neurochimie, INSERM,
Clinique des Maladies du Système Nerveux,
CHU Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75-Paris 13^e.