

Localisation subcellulaire de l'acyl-CoA synthétase de la muqueuse intestinale

La synthèse des triglycérides lymphatiques dans la muqueuse intestinale nécessite l'intervention préalable d'un enzyme activant les acides gras libérés au cours de l'hydrolyse intraluminaire des graisses alimentaires. Cet enzyme a été caractérisé¹⁻⁶. Sa dépendance clairement établie⁶ vis à vis de ATP et CoA permet sans doute* de le classer dans le groupe des acyl-CoA synthétases (Acid: CoA ligases, EC 6.2.1.3). Par contre, sa localisation au sein des cellules mucosales est encore incertaine puisque l'incorporation d'acides gras à des glycérides a été réalisée jusqu'ici à l'aide de la fraction mitochondriale⁴, de la fraction microsomale^{5,7}, et même du surnageant⁸ des homogénats de muqueuse.

L'étude de la localisation subcellulaire d'un enzyme exige évidemment que l'on sache mesurer l'activité de cet enzyme avec sécurité. Dans le présent travail, l'acyl-CoA synthétase de la muqueuse est dosée par l'intermédiaire du palmityl hydroxamate qu'elle forme en présence de palmitate et d'hydroxylamine à un pH voisin de la neutralité⁹. On incube durant 30 min à 37° dans un volume total de 4 ml, du palmitate d'ammonium (6 μ moles), de l'hydroxylamine à pH 8.3 (2 mmoles), ATP (60 μ moles), CoA (1 μ mole), $MgCl_2$ (30 μ moles), NaF (100 μ moles), du glutathion réduit (60 μ moles) et le système enzymatique étudié. Après addition de 2 ml d'acide perchlorique à 14% et centrifugation, le culot est traité par le perchlorate ferrique dans des conditions déjà décrites⁹. La coloration est mesurée à 520 m μ dans un appareil Coleman Junior (tubes Coleman pHB). Afin de mesurer exclusivement les hydroxamates dus à l'action de l'acyl-CoA synthétase, et non pas ceux résultant de simples réactions d'échange⁹, on effectue des expériences témoins en l'absence de cofacteurs (ATP et CoA) et on les déduit des précédentes.

Le choix d'une durée d'incubation de 30 min est justifié par le fait que les cinétiques de formation des hydroxamates sont linéaires durant cette période. Cependant, la Fig. 1 indique que, au moins dans nos conditions opératoires, la pente des droites cinétiques n'est proportionnelle à la quantité d'enzyme (exprimée dans la Fig. en mg de protéines⁹) qu'à l'intérieur d'une zone relativement étroite. Au delà, les courbes s'infléchissent et prennent même une pente négative dans le cas de la fraction microsomale. Si l'on n'y prend garde, des erreurs considérables par défaut peuvent donc être faites, spécialement pour la fraction microsomale où, à partir d'une certaine concentration en protéines, on arrive à trouver d'autant moins d'activité que l'on utilise plus d'enzyme. Ce phénomène paradoxal est sans doute à l'origine des incertitudes qui se sont manifestées jusqu'ici à propos de la localisation de l'enzyme.

Des homogénats à 10% (pds. frais: volume) de muqueuse intestinale dans une solution 0.28 M en mannitol¹⁰ et 0.01 M en phosphate de potassium (pH 7.5) sont débarrassés des noyaux, du mucus et de divers débris cellulaires par une centrifugation préliminaire de 450 $\times g$ durant 10 min. Après lavage du culot par le mannitol-phosphate (le 1/4 du volume initial), les surnageants réunis** sont soumis à deux centrifugations successives de 4500 $\times g$ durant 10 min et 105 000 $\times g$ durant 30 min qui

* La conversion par l'enzyme de ATP en AMP + PP n'a pas encore été démontrée.

** Les activités enzymatiques et les teneurs en protéines de ces liquides servent de base 100 à tous les calculs ultérieurs en pourcentages.

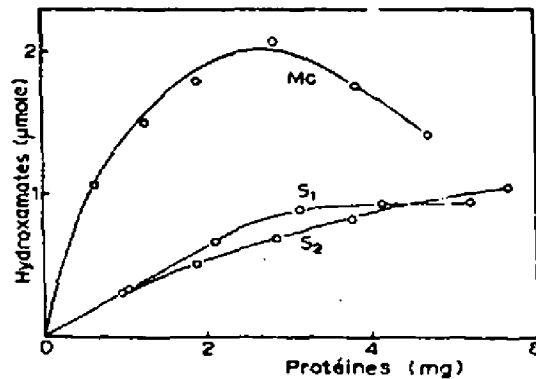


Fig. 1. Formation d'hydroxamates en 30 min en fonction de la quantité d'enzyme utilisée. Les fractions S_1 , S_2 et M_c dont la préparation est décrite dans le texte, correspondent, respectivement, au surnageant $450 \times g$ (10 min), au surnageant $4500 \times g$ (10 min) et au culot $105\,000 \times g$ (30 min) (fraction microsomale). Les résultats concernant le surnageant S_2 et le culot M_p sont corrigés afin de tenir compte de l'inactivation partielle intervenant durant leur préparation à partir du surnageant S_1 .

permettent de sédimenter les fractions dites mitochondriale et microsomale. Dans certaines expériences, une fraction intermédiaire est obtenue en intercalant entre les deux opérations précédentes une centrifugation de $15\,000 \times g$ durant 10 min. L'acyl-CoA synthétase est dosée dans les fractions et dans le surnageant final en observant les précautions rappelées ci-dessus. La cytochrome oxydase (EC 1.9.3.1), grâce à laquelle on caractérise d'habitude les mitochondries, est déterminée en traçant la cinétique de réoxydation à l'air du cytochrome *c* réduit par l'acide ascorbique¹¹. La phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1), apparemment caractéristique des microsomes, est déterminée par colorimétrie de l'orthophosphate libéré du β glycérophosphate à pH 9.5 (réf. 12). Les diagrammes de la Fig. 2 sont établis dans le système conventionnel de DE DUVE¹³. Les ordonnées indiquent les "activités spécifiques relatives" (% de

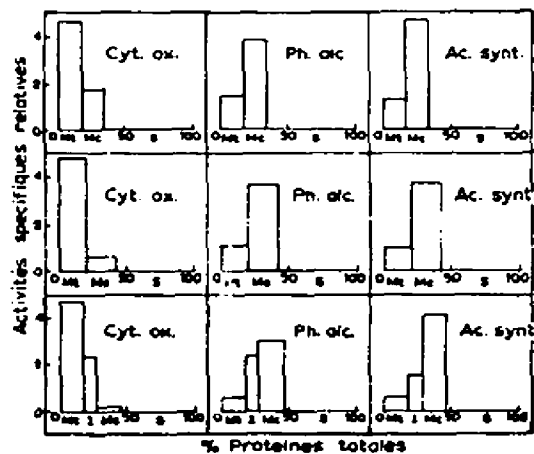


Fig. 2. Localisation subcellulaire de l'acyl-CoA synthétase de la muqueuse intestinale. M_1 , fraction mitochondriale; M_2 , fraction microsomale; I, fraction intermédiaire; S, surnageant final; Cyt. ox., cytochrome oxydase; Ph. alc., phosphatase alcaline; Ac. synt., acyl-CoA synthétase.

l'activité: % des protéines dans chaque fraction) et les abscisses indiquent les % de protéines. Les hauteurs et les aires des rectangles donnent donc une expression relative, respectivement, du degré de pureté et de la quantité de chaque enzyme dans chaque fraction. Compte tenu des inactivations durant le laps de temps nécessaire aux centrifugations, le total des activités retrouvées dans les diverses fractions est 95% pour la cytochrome oxydase, 80%, pour la phosphatase alcaline et 92-95% pour l'acyl-CoA synthétase.

Le simple fait que le surnageant de la centrifugation $4500 \times g$ durant 10 min contienne la quasi totalité de l'acyl-CoA synthétase (Fig. 1) suggère déjà que cet enzyme n'est pas localisé dans les mitochondries. La Fig. 2 le confirme de façon particulièrement nette. On voit que la faible activité acyl-CoA synthétase de la fraction mitochondriale et, le cas échéant, de la fraction intermédiaire, est toujours accompagnée d'une activité phosphatasique du même ordre. Elle est donc imputable à une faible contamination de la fraction mitochondriale par des microsomes. En outre, aucune trace d'activité acyl-CoA synthétase n'est jamais décelable dans les surnageants. L'enzyme est manifestement localisé dans les mêmes particules que la phosphatase alcaline, c'est à dire, selon toute apparence, dans les microsomes. Son activité spécifique dans les fractions microsomales est 4 fois plus élevée que dans les surnageants obtenus à $450 \times g$ durant 10 min.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide matérielle du Centre National de la Recherche Scientifique, du National Institute of Health (Grant No A-4642) et de la Fondation Rockefeller (Grant No RF 62022).

*Institut de Chimie Biologique,
Faculté des Sciences,
Marseille (France)*

G. AILHAUD
D. SAMUEL
P. DESNUELLE

¹ A. M. DAWSON ET K. J. ISSELBACHER, *J. Clin. Invest.*, 39 (1960) 150.

² B. CLARK ET G. HÜSCHER, *Nature*, 185 (1960) 35.

³ J. R. SENIOR ET K. J. ISSELBACHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 399.

⁴ B. CLARK ET G. HÜSCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1961) 479.

⁵ J. R. SENIOR ET K. J. ISSELBACHER, *Federation Proc.*, 20 (1961) 245.

⁶ G. AILHAUD, L. SARDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 261.

⁷ J. R. SENIOR ET K. J. ISSELBACHER, *Federation Proc.*, 21 (1962) 288.

⁸ G. HÜSCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 582.

⁹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.

¹⁰ J. R. SENIOR ET K. J. ISSELBACHER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1454.

¹¹ C. H. HOGEBOM ET W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 513.

¹² R. K. MORTON, *Biochem. J.*, 57 (1954) 595.

¹³ C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX ET P. APPELMANS, *Biochem. J.*, 60 (1955) 604.

Reçu le 2 Juillet, 1962

Biochim. Biophys. Acta 67 (1963) 150-152