

## IMPORTANCE RELATIVE DES DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES DANS LA SYNTHÈSE HEPATIQUE DES ACIDES GRAS IN VIVO

P. FAVARGER, J. GERLACH et S. ROUS

*Institut de Biochimie médicale de l'Université de Genève, Suisse*

Reçu le 22 février 1969

The synthesis of fatty acids in mitochondria, microsomes and supernatant of mice liver was studied after administration of glucose  $^{14}\text{C}$  or  $^3\text{H}$ , acetate  $^{14}\text{C}$  or  $^3\text{H}$  and pyruvate  $^{14}\text{C}$ .

The results suggest that the cellular structures corresponding to the microsomes are the major site of fatty acid synthesis in the liver in vivo.

### 1. Introduction

Depuis les travaux de Wakil [1] il semblait définitivement admis que la synthèse des acides gras avait pour siège principal le cytoplasme cellulaire. Depuis peu, toutefois, un doute pouvait être émis sur cette affirmation. D'une part, certains auteurs comme Christ et Hülsmann [2] prétendent que ce sont les mitochondries qui président à la lipogenèse. D'autre part, l'acétyl CoA carboxylase, qui contrôle l'étape limitante de la synthèse des acides gras [3] vient d'être découverte dans les microsomes [4]. Tous ces travaux réalisés in vitro ont jeté la confusion dans les esprits et on peut se demander à laquelle des trois fractions principales de la cellule, mitochondries, microsomes ou surnageant, incombe principalement la tâche de synthétiser les acides gras. Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris de séparer les acides gras des différentes fractions cellulaires de foie après administration de précurseurs radioactifs chez l'animal vivant et avons poussé plus loin notre investigation en séparant les différents acides gras des fractions cellulaires. Les résultats de nos expériences sont en faveur d'une participation plus grande des microsomes à la lipogenèse hépatique in vivo.

### 2. Matériel et méthodes

Les souris alimentées (aliment pour souris "Nafag")

ou privées de nourriture pendant 6 heures reçoivent en injection intraveineuse divers précurseurs radioactifs marqués au moyen de  $^{14}\text{C}$  et de  $^3\text{H}$  et sont exécutées 30 sec, 1, 3, 12 ou 60 min après. Le foie est aussitôt prélevé, refroidi dans la glace et pesé, puis homogénéisé à  $0^\circ$  dans 10 volumes de saccharose 0,25 M. Les mitochondries, les microsomes et le surnageant sont isolés d'après la technique de Christ et Hülsmann [2]. Les culots sitôt obtenus sont resuspendus dans du saccharose 0,25 M refroidi et entreposés dans de la glace. Des contrôles histologiques effectués au microscope électronique nous ont permis de vérifier la validité de notre technique. Une partie aliquote de chaque fraction est utilisée pour doser les protéines par la méthode du biuret [5] modifiée [6]. Les fractions sont ensuite saponifiées au moyen de KOH alcoolique puis les acides gras extraits et leur radioactivité mesurée directement par scintillation liquide. Pour quelques expériences les esters méthyliques des acides gras sont analysés quantitativement par CGL (colonne: longueur 6 pieds diam. 1/8 pouce DEGS 6% sur chromosorb 60–80 mesh,  $175^\circ$ ). La composition ainsi établie, les esters méthyliques totaux d'acides gras sont alors dilués avec un mélange analysé d'esters du commerce. Les esters méthyliques des acides palmitique, stéarique, oléique + linoléique sont recueillis par CGL préparative (Apiezon L 15% sur Aeropak, longueur 10 pieds diam. 3/8 pouce,  $200^\circ$ ), sont saponifiés, les acides gras réextraits par de l'éther de pétrole et leur radioactivité mesurée comme ci-dessus.

### 3. Résultats et discussion

La figure 1 représente les pourcentages d'activité totale retrouvée dans les acides gras des 3 fractions cellulaires de souris exécutées 30 sec, 1, 3, 12 ou 60 min après l'administration intraveineuse de glucose U- $^{14}\text{C}$ , 6- $^3\text{H}$ , 1- $^3\text{H}$ , 1- $^{14}\text{C}$  de pyruvate 2- $^{14}\text{C}$  et d'acé-

tate 1- $^{14}\text{C}$ . Contrairement aux résultats obtenus in vitro le maximum d'incorporation apparaît dans la fraction microsomiale quelle que soit la nature du précurseur utilisé dans nos essais (acétate, glucose ou pyruvate). D'autres travaux [7] in vivo ou au moyen de perfusions hépatiques [8] pouvaient faire suspecter l'existence d'une importante synthèse dans les micro-

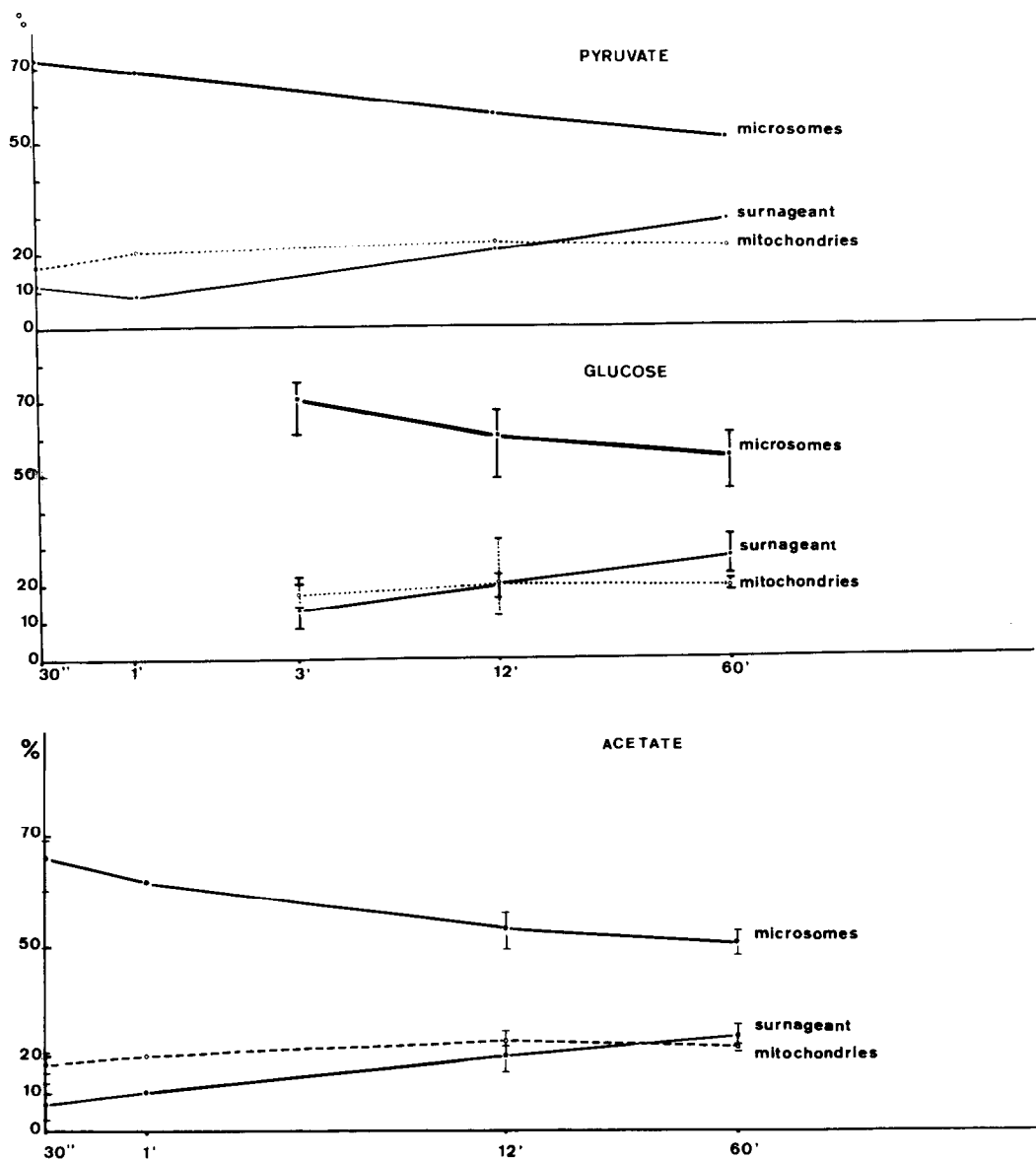


Fig. 1. Incorporation de la radioactivité dans les acides gras des différentes fractions cellulaires du foie en fonction du temps après administration d'acétate, de pyruvate et de glucose.

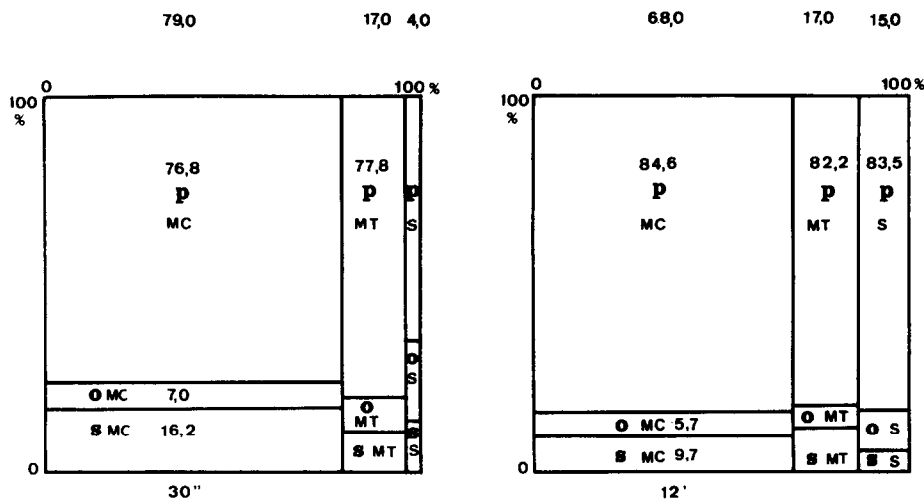


Fig. 2. Incorporation de la radioactivité dans les acides palmitique, stéarique et oléique des différentes fractions cellulaires du foie après administration d'acétate radioactif. MC = microsomes, MT = mitochondries, S = surnageant, P = acide palmitique, O = acide oléique + linoléique, S = acide stéarique. Les valeurs indiquées à l'intérieur des différentes surfaces représentent la participation de chaque acide gras à la synthèse dans chacune des fractions. Pour les valeurs non inscrites lire: A 30 sec: O,MT: 10,8%; S,MT: 11,4%; P,S: 67,4%; O,S: 18,4%; S,S: 14,2%; A 12 min: O,MT: 60%; S,MT: 11,8%; O,S: 10,5%; S,S: 6,0%. Les valeurs indiquées en dehors des surfaces correspondent à la répartition de la synthèse totale dans chaque fraction cellulaire.

somes. L'étude de l'incorporation de la radioactivité en fonction du temps s'avérera néanmoins nécessaire pour étudier la possibilité d'un transfert d'acides gras, formés dans le surnageant par exemple, puis transportés dans ces particules. Or il a été constaté que la radioactivité retrouvée dans les microsomes constitue environ 70% de la radioactivité totale lorsque les souris sont exécutées 30 sec après administration d'acétate radioactif, puis, qu'elle décroît relativement au cours du temps au profit des deux autres fractions. On peut donc suggérer que c'est dans les microsomes que s'effectue la majeure partie de la lipogenèse. Il est à remarquer également que l'acétate s'incorpore légèrement mieux que le glucose dans le surnageant. Ce fait n'a rien d'étonnant car l'acétate étant utilisé beaucoup plus rapidement que le glucose [9] les acides gras synthétisés dans les microsomes à partir d'acétate sont libérés dans le cytoplasme avant ceux qui proviennent du glucose. Cette hypothèse semble confirmée par les constatations suivantes:

- 1) Les différences d'incorporation dans les fractions entre ces deux précurseurs s'amménagent au fur et à mesure que progresse le temps.
- 2) La courbe obtenue à partir de pyruvate, qui est métabolisé beaucoup plus rapidement que le glu-

cose, est tout à fait superposable à la courbe de l'acétate.

L'examen de la répartition de la radioactivité dans les acides gras isolés 30 sec après administration d'acétate nous a révélé que 75% environ de la radioactivité totale est retrouvée dans l'acide palmitique. Après 12 min cet acide voit sa participation croître encore, il constitue alors plus de 80,0% de la synthèse totale.

La figure 2 rend compte des proportions des acides palmitique, stéarique, oléique + linoléique synthétisés dans chaque fraction cellulaire. Plus nettement encore que les courbes précédentes, cette représentation met en valeur l'accroissement des acides gras néoformés dans le surnageant entre 30 sec et 12 min. L'importance relative de la synthèse d'acide stéarique (15,5% contre 6,2% pour l'acide oléique) enregistrée dans les microsomes des souris exécutées 30 sec après l'administration du précurseur radioactif, nous incite à admettre une origine principalement microsomiale à cet acide, contrairement à l'acide oléique qui serait surtout élaboré par les mitochondries (10,8% de la synthèse effectuée par les mitochondries). Si cette observation est en accord avec les résultats obtenus par Lorch [10] à la suite d'une étude de l'incorporation de malonyl CoA par des préparations de microsomes, elle s'oppose

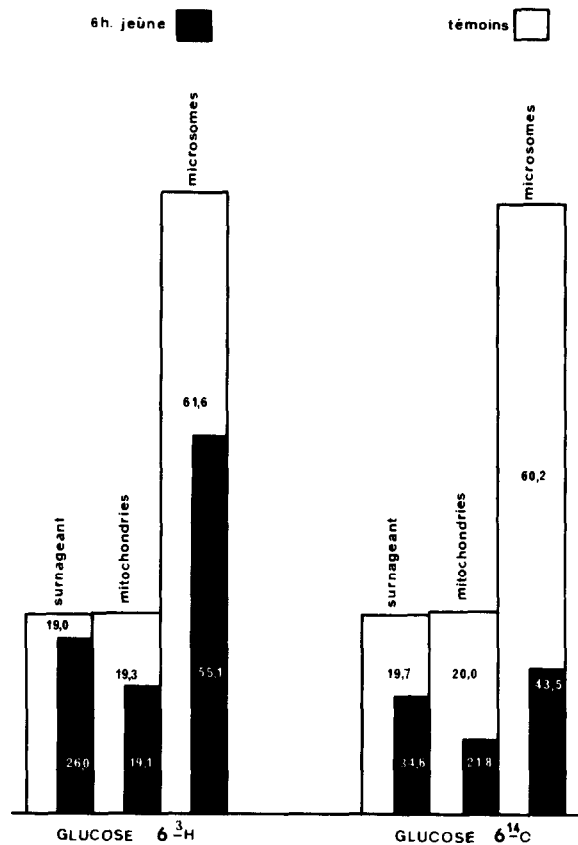


Fig. 3. Répartition des acides gras radioactifs dans les fractions cellulaires du foie.

aux conclusions de Wakil [1] qui voit dans les mitochondries le siège principal de la synthèse de l'acide stéarique. De nos résultats il ne semble pas non plus possible de conclure à une origine commune et unique pour ces deux acides comme des essais *in vivo* [11,12] et *in vitro* [13] avaient déjà permis de le supposer. L'augmentation du pourcentage des acides désaturés dans les microsomes en fonction du temps semble signifier qu'*in vivo* comme *in vitro* [14] les désaturations s'effectuent dans les microsomes.

Sachant qu'après injection de glucose 6-<sup>3</sup>H, 6-<sup>14</sup>C le rapport <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C des acides gras hépatiques est plus élevé chez les animaux à jeun que chez les animaux normalement alimentés, nous avons recherché si cet enrichissement relatif en <sup>3</sup>H prédominait dans une des fractions cellulaires. Les résultats obtenus sont les

suivants: En raison d'une inhibition plus forte dans l'incorporation du glucose U-<sup>14</sup>C le rapport <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C augmente significativement dans les fractions "mitochondries" et "surgeant". Les acides gras des microsomes présentent un enrichissement encore plus net en <sup>3</sup>H, ce qui paraît exclure un lieu de synthèse unique pour les acides gras trouvés dans le surgeant et dans ces particules.

En outre le jeûne affecte tout particulièrement la synthèse microsomiale des acides gras ce qui renforce notre suggestion que la synthèse s'effectue *in vivo* surtout dans les structures cellulaires correspondant à ces particules.

### Remerciement

Ce travail a été exécuté grâce à une subvention du Fonds national suisse de la recherche scientifique, Berne.

### Références

- [1] S.J.Wakil, J. Lipid Res. 1 (1961) 1.
- [2] E.J.Christ and N.C.Hülsmann, Biochim. Biophys. Acta 60 (1962) 72.
- [3] S.Numa, M.Matsushashi et F.Lynen, Biochem. Z. 334 (1961) 203.
- [4] S.A.Margolis et H.Baum, Arch. Biochem. Biophys. 114 (1966) 445.
- [5] F.Jayle, in: Loiseleur, Techniques de Laboratoire, vol. 2 (Masson et Cie, Paris, 1963) p. 79.
- [6] E.Jacobi, M.Jacobi, R.Sanadi et L.Bradley, J. Biol. Chem. 223 (1956) 147.
- [7] R.Scheig, N.M.Alexander and G.Klastkin, J. Lipid Res. 7 (1966) 188.
- [8] S.Rous et P.Favarger, sous presse.
- [9] P.Favarger et J.Gerlach, Helv. Physiol. Acta 13 (1955) 96.
- [10] E.Lorch, S.Abraham et I.L.Chaikoff, Biochim. Biophys. Acta 70 (1963) 627.
- [11] S.Rous, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 254 (1962) 3446.
- [12] G.Dupuis et P.Favarger, Helv. Physiol. Acta 21 (1963) 300.
- [13] P.K.Raju et R.Reiser, Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 48.
- [14] D.K.Bloomfield et K.Bloch, J. Biol. Chem. 235 (1960) 337.