

## LA LOCALISATION MICROSOMALE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS DANS LE FOIE DE LA SOURIS VIVANTE

P. FAVARGER et J. GERLACH

*Département de Biochimie Médicale de l'Université, Genève, Suisse*

Received 8 February 1971

Mice were given glucose-U- $^{14}\text{C}$  and acetate-1- $^{14}\text{C}$  and the radioactivity of triglyceride and phospholipid glycerol and fatty acids was measured 30 sec, 3 or 30 min after the i.v. administration in liver microsomes and supernatant. After the acetate administration the radioactivity of palmitic and stearic acids and that of their carboxyl carbons was also measured. The repartition of the radioactivity was discussed in relation with the localization of fatty acid synthesis. In agreement with our previous results it was suggested that the endoplasmic reticulum is the main site of this synthesis.

### 1. Introduction

Plusieurs travaux récents de notre laboratoire [1–4] ont apporté des arguments expérimentaux permettant de suggérer que la plus grande partie des acides gras synthétisés dans le foie de souris est élaborée *in vivo* par un système enzymatique localisé dans le réticulum endoplasmique et non dans le cytoplasme, comme cela est généralement admis [5]. En effet, l'incorporation de divers précurseurs marqués au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  est toujours plus forte dans la fraction microsomale si leur administration précède de peu le sacrifice de l'animal, alors que plus tard on en retrouve une plus grande proportion dans les acides gras du surnageant. Une objection à l'encontre d'une participation importante des microsomes à la synthèse des acides gras, est que les acyl ACP seraient élaborés par une acétyl-CoA carboxylase et une synthétase cytoplasmique, puis qu'une estérification très rapide en phospholipides et en glycérides par des enzymes fixées sur le réticulum endoplasmique permettrait de les retrouver surtout dans les microsomes. S'il en était ainsi, l'incorporation du glucose dans le glycérol lipidique des microsomes devrait précéder celle des acides gras si, comme on peut s'y attendre, la synthèse du glycérophosphate à partir du glucose précède celle des acides gras. Nous avons donc mesuré à 2 temps différents l'incorporation de glucose-U- $^{14}\text{C}$

dans le glycérol et les acides gras des phospholipides et des triglycérides des microsomes et du surnageant de foie de souris. En outre, l'incorporation de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$  dans ces deux lipides, dans leurs acides palmitique, stéarique et oléique, ainsi que dans les carboxyles de ces acides, nous a permis d'affirmer qu'*in vivo*, comme *in vitro* [6] la synthèse microsomale n'est pas un simple mécanisme d'élongation.

L'incorporation du glucose est aussi hâtive dans les acides gras que dans le glycérol des lipides microsomaux, alors que dans les lipides du surnageant la radioactivité du glucose apparaît plus rapidement dans le glycérol. Cette observation est difficilement compatible avec une capture, par les éléments du réticulum endoplasmique, des acides gras élaborés par une enzyme cytoplasmique.

### 2. Matériel et méthodes

Les souris, normalement alimentées, reçoivent en injection intraveineuse du glucose-U- $^{14}\text{C}$  ou de l'acétate-1- $^{14}\text{C}$ . Elles sont exécutées après 30 sec, 3 ou 30 min. Le foie est homogénéisé dans 10 vol. de saccharose 0,25 M et les mitochondries, les microsomes et le surnageant sont isolés d'après la technique de Christ et Hulsman [7]. Les lipides sont alors extraits au chloroforme-méthanol d'après Folch [8] et

Tableau 1  
Incorporation totale du  $^{14}\text{C}$  du glucose dans les triglycérides et les phospholipides des portions cellulaires du foie de souris in vivo.

| Nos souris            | 3 minutes                   |       |        |                          |        |        | 30 minutes                  |         |         |                          |         |         |
|-----------------------|-----------------------------|-------|--------|--------------------------|--------|--------|-----------------------------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
|                       | Activité totale acides gras |       |        | Activité totale glycérol |        |        | Activité totale acides gras |         |         | Activité totale glycérol |         |         |
|                       | 1                           | 2     | 3      | 1                        | 2      | 3      | 4                           | 5       | 6       | 4                        | 5       | 6       |
| <i>Surnageant (S)</i> |                             |       |        |                          |        |        |                             |         |         |                          |         |         |
| Triglycérides         | 2.400                       | 705   | 6.300  | 2.000                    | 1.645  | 4.890  | 197.500                     | 47.500  | 46.900  | 130.500                  | 53.600  | 49.500  |
| Phospholipides        | 1.300                       | 330   | 920    | 20.175                   | 19.100 | 10.400 | 18.700                      | 4.920   | 3.490   | 24.500                   | 11.700  | 5.360   |
| Total                 | 3.700                       | 1.035 | 7.220  | 22.175                   | 20.745 | 15.290 | 216.200                     | 52.420  | 50.390  | 155.000                  | 65.300  | 54.860  |
| <i>Microsomes (M)</i> |                             |       |        |                          |        |        |                             |         |         |                          |         |         |
| Triglycérides         | 6.300                       | 2.790 | 18.600 | 9.025                    | 6.020  | 20.050 | 120.500                     | 27.400  | 23.900  | 90.250                   | 25.200  | 28.400  |
| Phospholipides        | 20.200                      | 4.570 | 21.000 | 33.750                   | 17.950 | 27.800 | 148.000                     | 73.600  | 86.500  | 312.250                  | 77.800  | 83.500  |
| Total                 | 26.500                      | 7.360 | 39.600 | 42.775                   | 23.970 | 47.850 | 268.500                     | 101.000 | 110.400 | 401.500                  | 103.000 | 111.900 |
| <i>M/S</i>            |                             |       |        |                          |        |        |                             |         |         |                          |         |         |
| Triglycérides         | 2.6                         | 4.0   | 3.0    | 4.5                      | 3.7    | 4.1    | 0.61                        | 0.58    | 0.51    | 0.69                     | 0.47    | 0.57    |
| Phospholipides        | 15.5                        | 14.0  | 23.0   | 1.7                      | 0.94   | 2.7    | 7.9                         | 15.0    | 24.8    | 12.7                     | 6.6     | 15.6    |
| Activité totale       | 7.2                         | 7.1   | 5.5    | 1.9                      | 1.15   | 3.1    | 1.24                        | 1.9     | 2.2     | 2.6                      | 1.6     | 2.0     |

Les activités totales sont exprimées en dpm. Les rapports *M/S* correspondent à l'activité totale présente dans les acides gras et le glycérol des microsomes par rapport à ceux du surnageant.

Tableau 2  
Incorporation in vivo de l'acétate-1-<sup>14</sup>C dans les différents acides gras de la souris 30 sec ou 30 min après l'injection du précurseur.

|                      | Activité totale<br>extrait brut |         | Acides               | Répartition du <sup>14</sup> C<br>dans les acides gras<br>en % du total |       | Activité<br>spécifique |         | % activité dans<br>le carboxyle |       |
|----------------------|---------------------------------|---------|----------------------|---|-------|------------------------|---------|---------------------------------|-------|
|                      | 30 sec                          | 3 min   |                      | 30 sec  | 3 min | 30 sec                 | 3 min   | 30 sec                          | 3 min |
| <i>Surnageant</i>    |                                 |         |                      |   |       |                        |         |                                 |       |
| Glycérides           | 326.000                         | 107.200 | Palmitique           | 69,6  | 78,0  | 79.700                 | 30.600  | 15,4                            |       |
|                      |                                 |         | Oléique + linoléique | 13,4  | 16,8  | 9.900                  | 720     | —                               |       |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 17,0  | 5,2   | 274.000                | 3.190   | 38,4                            |       |
| Phospholipides       | 374.000                         | 40.800  | Palmitique           | 60,3  | 74,0  | 115.000                | 26.600  | 15,3                            |       |
|                      |                                 |         | Oléique + linoléique | 1,7   | 8,3   | 5.400                  | 860     | —                               |       |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 38,0  | 17,7  | 100.000                | 13.600  | 30,4                            |       |
| <i>Mitochondries</i> |                                 |         |                      |   |       |                        |         |                                 |       |
| Glycérides           | 403.000                         | 67.900  | Palmitique           | 78,0  | 71,0  | 86.700                 | 25.500  | 13,0                            |       |
|                      |                                 |         | Oléique + linoléique | 8,9   | 25,1  | 6.650                  | 1.270   | —                               |       |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 13,4  | 3,9   | 246.000                | 1.370   | 25,9                            |       |
| Phospholipides       | 1.275.000                       | 157.000 | Palmitique           | 68,0  | 67,0  | 175.000                | 19.100  | 11,9                            |       |
|                      |                                 |         | Oléique + linoléique | 2,0   | 8,6   | 17.800                 | 672     | —                               |       |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 30,0  | 24,4  | 76.250                 | 9.950   | 25,9                            |       |
| <i>Microsomes</i>    |                                 |         |                      |   |       |                        |         |                                 |       |
| Glycérides           | 3.015.000                       | 520.000 | Palmitique           | 69,7  | 73,0  | 1.340.000              | 181.000 | 13,5                            | 11,5  |
|                      |                                 |         | Oléique              | 10,8  | 22,6  | 394.000                | 7.570   | —                               | —     |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 19,5  | 4,3   | 3.450.000              | 106.000 | 37,5                            | 42,6  |
| Phospholipides       | 5.760.000                       | 770.000 | Palmitique           | 62,2  | 68,0  | 355.000                | 30.900  | 13,5                            | 11,5  |
|                      |                                 |         | Oléique + linoléique | 1,8   | 7,7   | 35.500                 | 1.220   | —                               | —     |
|                      |                                 |         | Stéarique            | 36,0  | 24,3  | 254.000                | 13.200  | 29,8                            | 50,9  |

l'extrait total est chromatographié sur acide silicique selon Fillerup et Mead [9] pour en isoler les fractions phospholipide et triglycéride dont la radioactivité est mesurée; après saponification, les acides gras sont méthylés [10] et chromatographiés en phase gazeuse. Après dilution les acides palmitique et stéarique sont décarboxylés par la méthode de Schmidt [11, 12]. Le  $\text{BaCO}_3$  provenant des groupements carboxylés est transféré dans une petite cupule suspendue dans un flacon de 20 ml, fermé par un capuchon en caoutchouc, et contenant du solvène (Packard). Le  $\text{CO}_2$  est déplacé par HCl et recueilli dans 1 ml de solvène auquel on ajoute 15 ml de mélange scintillant. La radioactivité du glycérol est calculée par la différence entre la radioactivité des triglycérides et des phospholipides, d'une part, et celle de leurs acides gras, d'autre part.

### 3. Résultats et discussion

Les tableaux 1 et 2 rassemblent les résultats principaux. Trois minutes après l'injection du glucose- $U\text{-}^{14}\text{C}$ , la radioactivité présente dans le glycérol ou dans les acides gras lipidiques est beaucoup plus faible qu'après 30 min. Cette différence est frappante pour les acides gras du surnageant.

L'incorporation du glucose dans le glycérol des 'phospholipides' du surnageant est particulièrement précoce. Elle est plus tardive pour les acides gras de la même fraction. Comme cette fraction contient les acides phosphatidiques, cette observation paraît correspondre à la synthèse d'acides phosphatidique à partir de glycérol marqué, à un moment où la transformation du glucose- $^{14}\text{C}$  en acides gras ne fait que commencer.

Tout au début de la synthèse des graisses, 3 min après l'injection de glucose, la concentration de  $^{14}\text{C}$  croît encore dans chacun des métabolites qui interviennent ici. Les acides gras microsomaux contiennent à ce moment 5,5 à 7,2 fois plus de  $^{14}\text{C}$  que ceux du surnageant, alors que le glycérol qui les estérifie n'en renferme que 1,1 à 3,1 fois plus. Puisque la synthèse du glycérophosphate à partir du glucose n'est pas en retard sur celle des acides gras, il faut bien admettre que ces derniers, incorporés plus précocement dans les lipides microsomaux, ont été synthétisés sur place, contrairement au glycérophosphate qui est d'origine cytoplasmique. L'incorporation prépondérante du

$^{14}\text{C}$  dans les acides gras microsomaux ne peut donc pas provenir d'une capture par le glycérol microsomal d'acides gras synthétisés dans le cytoplasme. Après 30 min le  $^{14}\text{C}$  des acides gras microsomaux ne représente plus que 1,2 à 2,2 fois la quantité présente dans le cytoplasme qui s'est enrichi en acides gras marqués, au détriment de ceux que le réticulum endoplasmique a synthétisés. La proportion relative de glycérol marqué total ne subit que peu de variations entre 3 et 30 min. (La rapidité de l'incorporation du glycérophosphate dans les phospholipides du surnageant laisserait supposer que certaines estérifications pourraient se produire dans le cytoplasme.)

Le tableau 2 donne quelques renseignements sur la composition des acides gras synthétisés dans les 3 principales fractions cellulaires. Il s'agit de deux expériences correspondant respectivement à l'incorporation de l'acétate- $1\text{-}^{14}\text{C}$  pendant les 30 premières sec (500  $\mu\text{Ci}$ ) ou pendant les 3 premières min (50  $\mu\text{Ci}$ ) consécutives à l'injection du précurseur. On observe une grande similitude dans la répartition de la radioactivité totale dans les acides gras des triglycérides et des phospholipides isolés du surnageant et des microsomes. La proportion du  $^{14}\text{C}$  présente dans le carboxyle des acides palmitique et stéarique est également très semblable et permet d'affirmer que le premier des deux acides se forme presque seulement par une synthèse de novo plutôt que par élongation. Ces observations ne sont guère explicables que par une origine commune.

Les résultats de ces essais ne sont donc compatibles ni avec une estérification microsomale assez précise pour capter les acides gras synthétisés dans le cytoplasme, ni avec l'existence de systèmes enzymatiques de synthèse indépendants dans ces deux fractions. Ils s'accordent en revanche avec l'idée que la synthèse des acides gras se produit de façon prépondérante sur le réticulum endoplasmique, où seraient localisées les enzymes présidant à ce phénomène. La localisation de la synthétase d'acides gras dans le surnageant de l'homogénat hépatique serait donc un artefact dû à l'homogénéisation et à la centrifugation qui entraînent dans cette fraction la plus grande partie de la synthétase, alors que les lipides que cette dernière vient de synthétiser restent pour la plupart fixés aux éléments du réticulum. Un travail de notre Département, publié conjointement [13] démontre d'ailleurs sans équivoque la présence de la synthétase dans la fraction microsomale.

**Remerciements**

Ce travail a été exécuté grâce à une subvention du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

**Références**

- [1] P.Favarger, J.Gerlach et S.Rous, FEBS Letters 2 (1969) 289.
- [2] P.Favarger, Journal de Médecine de Besançon, 5ème année, 5 (1969) 317.
- [3] S.Rous, L.Aubry et F.Bonini, FEBS Letters 7 (1970) 32.
- [4] S.Rous, L.Aubry et P.Favarger, Bull. Soc. Chim. Biol. 52 (1970) 927.
- [5] S.J.Wakil, J. Lipid Res. 1 (1961) 1.
- [6] C.Landriscina, G.V.Gnoni et E.Quagliariello, Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 405.
- [7] E.J.Christ et N.C.Hülsmann, Biochim. Biophys. Acta 60 (1962) 72.
- [8] J.Folch, M.Lees et G.H.Sloane Stanley, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497.
- [9] D.L.Fillerup et J.F.Mead, Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 83 (1953) 574.
- [10] R.Lasker et G.H.Theilacker, J. Lip. Res. 3 (1962) 60.
- [11] J.F.Mead, G.Steinberg and D.R.Howton, J. Biol. Chem. 205 (1953) 683.
- [12] R.Blomstrand, Acta Chem. Scand. 8 (1954) 1487.
- [13] S. Rous et L. Aubry FEBS Letters 13 (1971) 282.