

**ACTIVITE SUCCINO-DESHYDROGENASIQUE DES MICROSOMES
ET MODE D'INCORPORATION DU SUCCINATE 2,3-¹⁴C
DANS LES ACIDES GRAS DES MICROSOMES
DE FOIE DE RAT *IN VITRO***

Simonne ROUS, Lydia AUBRY et François BONINI

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

Received 23 January 1970

The incorporations of 2,3-¹⁴C-succinate 2-¹⁴C-acetate into fatty acids of different cellular fractions of rat liver were studied. Acetate was incorporated mainly into supernatant and succinate into microsomal fatty acids. Mitochondria only could intensively decarboxylate pyruvate. Avidine inhibited fatty acid synthesis from succinate mainly in the supernatant. It is suggested that succinate is an important physiological precursor of fatty acids in the liver and that an active succino-dehydrogenase is present in microsomes.

1. Introduction

Des travaux récents ont démontré que le succinate constitue une excellente source d'hydrogène pour la synthèse des acides gras hépatiques *in vivo* [1, 2] mais les modalités de son incorporation sont totalement inconnues. Il est ainsi difficile d'admettre que la succino-déshydrogénase soit exclusivement mitochondriale [3], alors que la synthèse des acides gras prédomine *in vivo* dans les microsomes [4]. C'est pourquoi nous avons voulu comparer l'incorporation de succinate-2, 3-¹⁴C dans les acides gras des différentes fractions cellulaires de foie de rat *in vitro* afin de nous assurer qu'aucune succino-déshydrogénase n'existait dans les microsomes. L'utilisation de succinate marqué au carbone nous a été dictée par le souci d'éviter toute cause d'erreur relative à l'utilisation des précurseurs tritiés qui sont l'objet de nombreuses réactions d'échange même *in vitro*. L'incorporation de succinate-2,3-¹⁴C dans les acides gras nécessitant comme première étape une déshydrogénation, ce précurseur pouvait être avantageusement substitué au succinate-2,3-³H₂. Théoriquement, en effet, il devait rejoindre "le pool" acétyl CoA après transformations successives en oxaloacétate, pyruvate puis décarboxylation de ce dernier. Ceci nous conduisit à étudier parallèlement l'activité "pyruvate décarboxylante" de chaque fraction cellulaire. Finalement nous avons recherché quelle était l'action de

l'avidine sur la synthèse des acides gras à partir de succinate-2,3-¹⁴C.

Nous avons constaté que le succinate, contrairement à l'acétate, s'incorporait préférentiellement dans les microsomes témoignant ainsi de l'existence d'une succino-déshydrogénase active dans ces particules. En outre la faible capacité des microsomes à décarboxyler le pyruvate, de même que la faible inhibition exercée par l'avidine en présence de ces particules nous incitent à suggérer que le succinate emprunte pour se transformer en acides gras la voie suivante: succinate → fumarate → malate → oxaloacétate. Ce dernier subit une décarboxylation oxydative qui le conduit directement au malonyl CoA sans passer par l'acétyl CoA.

2. Parti expérimentale

Des foies de rat sont homogénéisés dans 8 volumes de saccharose 0,25 M puis les fractions cellulaires séparées par centrifugations successives (10 min à 800 g; 10 min à 17.500 g; 60 min à 105.000 g) pour éliminer les noyaux et débris cellulaires, pour obtenir les mitochondries, et enfin pour séparer les microsomes du surnageant. Toutes ces opérations sont effectuées entre 0 et 4°C. Les protéines sont dosées selon la technique

de Jacobi et coll. [5] modifiée par addition de dés-oxycholate [6]. Une quantité égale de chaque fraction, calculée pour donner toujours une concentration en protéines comprise entre 1 mg et 1,5 mg est introduite dans un milieu renfermant, pour 2 ml: CO_2HK : 10 μM ; ATP: 40 μM ; cystéine: 30 μM ; Cl_2Mg , $6\text{H}_2\text{O}$: 70 μM ; citrate de Na: 75 μM ; Cl_2Mn , $4\text{H}_2\text{O}$: 1 μM . Coenzymes d'oxydoréduction: NAD ou NADP: 1 μM ou encore aucun coenzyme. Les précurseurs radioactifs sont dilués par 1 μM du même composé non radioactif. Après 1 h 30 min l'incubation est stoppée par addition de KOH alcoolique. Une saponification de 4 h précède l'extraction des acides gras succédant elle-même à l'élimination de l'insaponifiable. Un "washing-out" à l'aide des précurseurs non radioactifs est effectué puis la radioactivité des acides gras mesurée par scintillation liquide [2].

La décarboxylation du pyruvate-1- ^{14}C s'effectue dans un milieu d'incubation analogue, mais un dispositif spécial (cupules en plastique renfermant du solvène Packard) permet de recueillir le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé. Le solvène est recueilli et compté dans le même mélange scintillant que celui utilisé pour les acides gras. L'addition de succinate ou citrate ne change pas les propor-

tions trouvées dans chaque fraction lorsque l'on compare les incorporations de succinate-2,3- ^{14}C et d'acétate-2- ^{14}C . La pureté de nos fractions a été contrôlée au microscope électronique (Institut d'Histologie de l'Université de Genève).

3. Résultats et discussion

3.1. Incorporation de succinate 2,3- ^{14}C dans les acides gras des différentes fractions cellulaires de foie (cf. tableau)

Alors que l'acétate s'incorpore beaucoup plus intensément dans le surnageant, conformément aux résultats trouvés par Wakil [7] et très peu dans les microsomes, le succinate s'incorpore très bien dans ces particules, parfois même mieux que dans les mitochondries. Ceci sous-entend donc l'existence d'une succinodéshydrogénase active dans les microsomes. La présence de cet enzyme dans les microsomes a également été suspectée par d'autres auteurs [8]. Pour confirmer cette interprétation nous avons étudié la décarboxylation du pyruvate-1- ^{14}C dans les différentes fractions. On constate que seules les mitochondries sont capables de dé-

Tableau
Incorporation d'acétate-2- ^{14}C et de succinate-2,3- $^{14}\text{C}_2$ dans les acides gras des différentes fractions cellulaires de foie de rat *in vitro*. Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines pour 10 μCi de chaque précurseur (S = écart standard). Les valeurs entre crochets correspondent au rapport des activités spécifiques par rapport à celles du surnageant.

	No. exp.	Acetate-2- ^{14}C			No. exp.	Succinate-2,3- ^{14}C		
		Surnageant	Mitochondries	Microsomes		Surnageant	Mitochondries	Microsomes
NAD	6	1504	637	296	5	222	503	1112
		(S = 293)	(S = 379)	(S = 117)		(S = 38)	(S = 115)	(S = 347)
		[1]	[0,45] [S = 0,21]	[0,14] [S = 0,11]		[1]	[2,18] [S = 0,14]	[5,04] [S = 0,18]
NADP	7	1770	505	274	5	230	569	963
		(S = 444)	(S = 133)	(S = 81)		(S = 59)	(S = 156)	(S = 274)
		[1]	[0,32] [S = 0,06]	[0,13] [S = 0,04]		[1]	[2,22] [S = 0,05]	[4,48] [S = 0,11]
O coenzyme ox.-réd.	5	913	571	81	5	109	534	796
		(S = 251)	(S = 197)	(S = 77)		(S = 31)	(S = 46)	(S = 433)
		[1]	[0,64] [S = 0,16]	[0,11] [S = 0,037]		[1]	[4,78] [S = 0,11]	[7,46] [S = 0,10]

carboxyler activement le pyruvate. Il est donc peu probable que l'activité succino-déshydrogénasique constatée dans les microsomes soit due à une contamination à partir de l'enzyme mitochondrial. Car on ne voit pas en effet pourquoi seule la succino-déshydrogénase mitochondriale aurait été libérée et non la pyruvate décarboxylase, enzyme également mitochondrial. Ces résultats nous incitent à penser que dans les microsomes le succinate ne passe pas obligatoirement par le pyruvate et de ce fait par l'acétyl CoA pour se transformer en acides gras. Pour préciser ce point nous avons contrôlé:

3.2. L'effet de l'avidine sur l'incorporation de succinate-2,3-¹⁴C dans les acides gras

L'avidine inhibe la transformation de l'acétyl CoA en malonyl CoA. Elle aurait donc dû réduire notablement l'incorporation du succinate dans les acides gras si ce dernier rejoignait l'acétyl CoA. Le fait que la synthèse des acides gras est beaucoup moins inhibée dans les microsomes (27%) que dans le surnageant (83,4%) nous fait fortement douter de cette possibilité. L'absence totale d'inhibition dans les mitochondries confirme les résultats trouvés par d'autres auteurs [9]. En accord avec nos résultats, Abraham et coll. [10] ont montré que les microsomes de foie de rat étaient incapables de convertir l'acétate et l'acétyl CoA en acides gras mais utilisaient bien le malonyl CoA. Pour expliquer l'ensemble de nos résultats nous proposons la séquence de réactions suivantes:

Le succinate se déshydrogène dans les microsomes en fumarate puis en oxaloacétate. A ce moment, l'oxaloacétate au lieu de se transformer en pyruvate, acétyl CoA (voie qui semble prédominer surtout dans les mitochondries) subit une décarboxylation oxydative qui le conduit directement au malonyl CoA. La possibilité d'une décarboxylation oxydative de l'oxaloacétate a été évoquée par Kallen et Lowenstein [19] mais passe pour être accessoire. Cette voie aurait l'avantage de supprimer le problème posé par le transport de l'acétyl CoA hors des mitochondries d'autant plus que l'enzyme clivant le citrate semble très peu actif *in vivo* [12]. On peut en effet admettre que le pyruvate issu du glucose peut se carboxyler directement dans le cytoplasme et que l'oxaloacétate ainsi formé se décarboxyle en malonyl CoA. Une autre possibilité serait que même la fraction du pyruvate destinée à la synthèse des

acides gras pénètre dans les mitochondries, se convertisse en fumarate et succinate qui diffuseraient dans le cytoplasme et suivraient la voie indiquée ci-dessus.

Ces résultats confirment une fois de plus que la synthèse des acides gras a pour siège principal les microsomes, et ce, même *in vitro*, pour autant que l'on mette ces particules en présence d'un précurseur approprié.

In vivo les métabolites du glucose devraient peut-être passer par les mitochondries ou le cytoplasme pour pouvoir rejoindre l'étape oxaloacétate.

Nous suggérons en conclusion: 1. que l'activité succino-déshydrogénasique des microsomes, contrairement à ce qui est généralement admis, est loin d'être négligeable. 2. que le succinate emprunte pour s'incorporer dans les acides gras une voie qui ne passe ni par le pyruvate ni par l'acétyl CoA mais rejoint directement le malonyl CoA.

Les acides dicarboxyliques à 4 carbones constitueraient ainsi non seulement les transporteurs des précurseurs cytoplasmiques indispensables à la néoglucogénèse mais aussi à la synthèse des acides gras hépatiques.

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

Références

- [1] W.W.Shreeve, Ann. N. Y. Acad. Sci. 131 (1965) 464.
- [2] S.Rous, L.Luthi, M.-J.Burlet et P.Favarger, Biochim. Biophys. Acta 152 (1968) 462.
- [3] T.P.Singer et E.B.Kearney, Enzymes 7 (1963) 383.
- [4] P.Favarger, J.Gerlach et S.Rous, FEBS Letters 2 (1968) 289.
- [5] F.Jayle in: Techniques de laboratoire, ed. Loiseleur, Vol. 2 (Masson, Paris 1963) p. 79.
- [6] E.Jacobi, M.Jacobi, R.Sanadi et L.Bradley, J. Biol. Chem. 233 (1956) 147.
- [7] S.J.Wakil, J. Lipid Res. 2 (1961) 1.
- [8] C.Bhuvaneswaran et T.E.King, Biochim. Biophys. Acta 132 (1967) 282.
- [9] W.R.Harlan et S.J.Wakil, Biochem. Biophys. Res. Commun. 8 (1962) 131.
- [10] S.Abraham, S.Lorch et E.Chaikoff, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1 (1962) 190.
- [11] R.G.Kallen et J.M.Lowenstein, Federation Proc. 21 (1962) 289.
- [12] R.Arbex, S.Rous et P.Favarger, sous presse.