

Activité des acides gras resp. «solides» (S) et «liquides» (L) des 4 souris de la série A^{a)}

Les souris reçoivent $100 \cdot 10^6$ c.p.m. d'acétate-[1-¹⁴C] en injection intraveineuse.

^{a)} voir légende ci-dessus

			Poids total acides gras	Poids de chaque fraction	Activités spécifiques	Activités totales	$\frac{\text{AS solides}}{\text{AS liquides}}$	$\frac{\text{AT solides}}{\text{AT liquides}}$
			g	mg	c/min/mg	c/min		
3 min	1	S	1,460	501	10·150	$10^6 \times 5,09$	6,2	4,0
		L		770	1·645	$10^6 \times 1,27$		
	2	S	1,378	491	4·900	$10^6 \times 2,40$	5,65	3,85
		L		722	865	$10^6 \times 0,625$		
30 min	3	S	1,449	540	12·700	$10^6 \times 6,95$	4,7	3,48
		L		735	2·710	$10^6 \times 2,00$		
	4	S	1,410	516	11·050	$10^6 \times 5,70$	4,1	2,71
		L		776	2·690	$10^6 \times 2,10$		

RÉSUMÉ

Des souris ont été tuées 3 ou 30 minutes après injection intraveineuse d'acétate-[1-¹⁴C].

Dans les lipides totaux, la moyenne des rapports de l'activité spécifique des acides saturés à celle des acides non saturés est de 4,84 après 3 minutes et de 3,88 après 30 minutes.

On en déduit qu'une partie seulement des acides monoéthéniques se forme à partir des acides saturés correspondants.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève

55. Recherches sur la synthèse des graisses à partir d'acétate ou de glucose

VIII. Les mécanismes d'élongation des acides gras saturés supérieurs étudiés chez la Souris *in vivo*

par Victor Handwerck et Pierre Favarger

(16 I 59)

Les différentes enzymes qui sont nécessaires à la synthèse des acides gras d'après le schéma de LYNEN interviennent chacune plusieurs fois. Leur organisation fonctionnelle doit être d'une précision extrême pour permettre l'élaboration simultanée ou successive des principaux acides dans les tissus animaux. Cette organisation n'est certainement pas identique dans la glande mammaire, par exemple, et dans les autres tissus, puisque la composition du mélange d'acides gras n'est pas du tout la même. Dans l'ensemble des travaux consacrés à l'étude de la formation des acides gras saturés à partir d'acétate marqué, on relève quelques résultats qui suggèrent l'intervention de plusieurs mécanismes de synthèse.

Nous avons abordé l'étude de ce problème en comparant chez la Souris les activités spécifiques des trois principaux acides gras saturés (myristique, palmitique et stéarique) 3 et 30 minutes après l'administration intraveineuse d'acétate-[1-¹⁴C], et en mesurant la proportion d'isotope présente dans le carboxyle de chacun d'eux.

Par ce moyen il devait être possible de compléter et de préciser l'image statique de la synthèse obtenue par DAUBEN *et al.*¹⁾ au moyen d'une seule mesure faite 4 h après administration d'acétate, et de donner, par l'emploi d'intervalles de temps plus courts, une représentation plus fidèle et plus dynamique des mécanismes de synthèse instantanés.

Partie expérimentale. – *Série de souris A*: Deux groupes de 2 souris mâles chacun, pesant de 24 à 27 g, ont été privés de nourriture pendant 8 h, puis nourris avec 1,5 g de pain une demi-heure avant l'expérience.

Elles ont reçu une injection d'acétate-[1-¹⁴C] (en solution isotonique) dans une veine caudale et ont été tuées après 3 ou 30 min par section de la nuque. On a fendu leur paroi abdominale pour accélérer la fixation, effectuée immédiatement dans l'alcool bouillant.

Après saponification de l'animal entier (4 h à reflux dans un mélange eau-alcool 1:2 contenant 20% de KOH), dilution par H₂O, extraction de l'insaponifiable par l'éther de pétrole, puis acidification, les acides gras ont été extraits par l'éther de pétrole. L'extrait a été lavé deux fois par de l'eau additionnée de 5% d'acétate de Na, puis deux fois à l'eau distillée, et enfin évaporé sous CO₂.

Afin de faciliter la séparation chromatographique de l'acide myristique, on a ajouté 80 mg d'acide myristique inactif, aux acides gras totaux de chaque souris (poids: de 1,380 à 1,460 g). Ceux-ci ont été ensuite fractionnés dans un volume total d'alcool correspondant à 100 ml par 1 g d'acides, par adjonction de la moitié de leur poids d'acétate de Pb, à l'ébullition. Après repos d'au moins 3 h à 16° et centrifugation, la solution des acides liquides a été soumise à un « washing out » par adjonction, à l'ébullition, d'acide palmitique, puis d'acétate de Pb dissous dans un peu d'alcool et en quantités égales au 1/10 du poids du mélange initial des acides²⁾. Après repos d'au moins 3 h à 16° et centrifugation, le précipité a été rejeté.

Les savons de Pb des acides solides séparés lors de la première précipitation ont été également soumis à un « washing-out » par ébullition dans un volume d'alcool égal au volume initial auquel a été ajouté 400 mg d'acide oléique. Après repos à 16° et centrifugation, le liquide a été rejeté.

Les acides solides et les acides liquides ont été libérés par acidification au moyen d'acide nitrique dilué, extraits à l'éther de pétrole, et les extraits lavés à l'eau distillée. L'éther de pétrole a été évaporé sous CO₂.

Les acides solides ont été fractionnés en acide myristique, palmitique et stéarique par chromatographie d'après HOWARD & MARTIN³⁾.

Après lavages répétés de chaque fraction à l'eau distillée pour éliminer toute trace de l'indicateur (bleu de bromothymol), la mesure de l'indice d'iode a permis de tenir compte, pour les calculs de l'activité spécifique, de la présence d'acide oléique inactif provenant du « washing out ». Les acides séparés ont été décarboxylés par la réaction de SCHMIDT⁴⁾, après dilution par le même acide inactif.

Les acides gras et le BaCO₃ provenant de leur décarboxylation sont déposés en couche mince dans des cupules d'aluminium, et leur activité est mesurée au moyen d'un compteur à gaz sans fenêtre. Les acides solides sont préalablement dilués par de l'acide oléique pour assurer le dépôt d'une couche régulière. Les activités spécifiques sont rapportées à une couche infiniment mince.

Série de souris B. Pour celles-ci nous n'avons pas ajouté d'acide myristique inactif avant le fractionnement; la faible quantité de cet acide présente dans le mélange naturel n'a pu être obtenue à l'état suffisamment pur pour être décarboxylée utilement.

¹⁾ W. G. DAUBEN, E. HOERGER & J. W. PETERSEN, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2347 (1953).

²⁾ R. SCHOENHEIMER & D. RITTENBERG, J. biol. Chemistry **113**, 505 (1936).

³⁾ G. A. HOWARD & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. **46**, 532 (1950).

⁴⁾ J. F. MEAD, G. STEINBERG & D. R. HOWTON, J. biol. Chemistry **205**, 683 (1953); R. BLOMSTRAND, Acta chem. scand. **8**, 1487 (1954).

Résultats. – La méthode des savons de Pb, comme toutes les autres méthodes par précipitation, ne permet pas de séparer complètement les acides solides des acides liquides. Des essais préliminaires au moyen d'acides marqués⁵⁾ ont montré que, dans nos conditions expérimentales de précipitation, la séparation des acides solides entraîne une perte qui est de 45% pour l'acide myristique, de 25% pour l'acide palmitique et de 16% pour l'acide stéarique.

Nous avons tenu compte du facteur nécessaire dans le calcul de l'activité spécifique réelle de l'acide myristique, puisque la dilution de celui-ci a eu lieu avant cette séparation.

Les tableaux 1 et 2 permettent de comparer les activités spécifiques de chacun des acides saturés et de l'ensemble des acides liquides, ainsi que la répartition de la radioactivité.

Tableau 1. *Activités spécifiques des acides gras*

exprimées en c.p.m./mg et corrigées pour tenir compte des dilutions. Elles représentent donc les activités spécifiques réelles et non pas celles qui sont lues sur le compteur. Les souris ont reçu 100 millions de c.p.m. d'acide acétique-[1-¹⁴C] (pour les souris de la série A) et 18 millions (pour la série B)

Série	N° de l'animal	AS acides liquides	AS acide myristique	ASmyrist. AS palm.	AS acide palmitique	AS acide stéarique	AS stéar. AS palm.
A	1	1.645	8.250	63	13.100	10.250	78,5
3 min A	2	865	3.680	56	6.650	5.250	80
B	11-14	228	—	—	1.170	1.030	88
A	3	2.710	8.850	55,5	15.900	15.300	96,5
30 min A	4	2.690	9.100	62,5	14.600	12.700	87,0
B	15-18	208	—	—	755	730	97

L'activité spécifique de l'acide myristique ne représente que le 60% environ de celle du palmitique et ne paraît pas augmenter au cours du temps. L'activité spécifique observée pour l'acide stéarique, en revanche, se rapproche avec le temps de celle de l'acide palmitique, puisqu'elle en représente le 79% à 3 minutes et le 92% environ à 30 minutes. Il faut souligner la différence de ces valeurs avec celles trouvées par POPJAK⁶⁾ après une synthèse de plusieurs heures dans la glande mammaire; l'activité spécifique de l'acide myristique y devient alors presque aussi forte que celle de l'acide palmitique, mais celle des acides non saturés demeure beaucoup plus faible. On constate donc une fois de plus le caractère particulier du métabolisme de la glande mammaire.

En ce qui concerne l'activité spécifique du carboxyle, il est instructif de rapprocher nos valeurs de celles de DAUBEN *et al.*¹⁾ qui n'avaient étudié, dans des conditions analogues, que l'acide palmitique et l'acide stéarique, mais après une durée unique de 4 heures. Nous avons suivi la méthode de calcul de ces auteurs.

Pour l'acide stéarique, cette activité, qui représente le 16,2% du total à 3 minutes, s'élève à 19,6% après 30 minutes (différence significative); elle atteint, selon DAUBEN, 29% après 4 heures. Il est donc certain que le carboxyle contient dans tous les cas une activité bien supérieure au $\frac{1}{6}$ (valeur théorique) de celle de toute la molécule.

⁵⁾ P. FAVARGER & J. GERLACH, Arch. Sci. **11**, 539 (1958).

⁶⁾ G. POPJAK, T. H. FRENCH, G. D. HUNTER & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. **48**, 612 (1951).

Tableau 2. Répartition de l'activité dans la molécule des acides saturés

I. Activités spécifiques du BaCO₃ provenant respectivement de la combustion de la molécule entière ou de la décarboxylation de chaque acide (en c.p.m./mg de BaCO₃).

Auparavant, chaque acide avait subi une dilution différente et arbitraire (deux dilutions pour l'acide myristique); les valeurs des activités spécifiques du tableau 2 sont donc sans rapport constant avec celles du tableau 1.

II. Activité du carboxyle en % de l'activité totale. La précision des mesures est de $\pm 8\%$ pour l'acide myristique, $\pm 7\%$ pour les deux autres.

	Série	N° de l'animal	Ac. myristique		Ac. palmitique		Ac. stéarique	
			Molécule entière	Carboxyle	Molécule entière	Carboxyle	Molécule entière	Carboxyle
I	3 min	A 1	28,1	51,9	333	575	137	377
		A 2	16,7	36,3	220	370	68,9	117
		B 11-14	—	—	67,5	126	58,5	188
	30 min	A 3	17,3	35,0	262	507	95,0	342
		A 4	19,5	43,9	162	284	91,6	317
		B 15-18	—	—	43,5	80	41,5	159
II	3 min	A 1		13,2		10,8		15,3
		A 2		15,6		10,5		17,0
		B 11-14		—		11,7		18,0
	30 min	A 3		14,5		12,1		20,0
		A 4		16,1		11,0		19,2
		B 15-18		—		11,5		21,4

Pour l'acide palmitique, ce pourcentage d'activité demeure constant, dans la limite de précision des mesures, tant à 3 ou 30 minutes qu'après 4 heures. La valeur moyenne représente un peu moins du $\frac{1}{8}$ (valeur théorique) de l'activité totale de la molécule, ce qui fait supposer que les atomes de C pairs contiennent chacun 1 à 2% de la radioactivité introduite¹⁾ dans cette position par un mécanisme complexe faisant peut-être intervenir l'interconversion des oses.

Pour l'acide myristique enfin, que n'ont pas mesuré DAUBEN *et al.*, nous trouvons 14,4 et 15,3% d'activité dans le carboxyle à 3 et 30 minutes respectivement. La différence n'est pas significative et nous pouvons considérer ce pourcentage comme constant. Dans ce cas également, ces valeurs sont très voisines du $\frac{1}{7}$ théorique de l'activité totale.

Discussion et conclusions. – Pour interpréter les résultats obtenus, il est nécessaire de préciser la nature des mécanismes de synthèse possibles. Il n'est pas question de mettre en doute le schéma de LYNEN, mais celui-ci laisse pourtant subsister le problème important que voici :

Deux possibilités existent pour le mécanisme des adjonctions successives de chaînons dicarboxylés. Selon la première, les intermédiaires (par exemple lauryl-, myristyl-, palmityl-CoA) ne quittent pas le système enzymatique, et sitôt formés subissent immédiatement l'adjonction d'un nouvel élément en C₂ (acétyl-CoA); ce processus, très rapide, ne s'arrête qu'après la formation d'un acide spécifique de chaque système enzymatique. Selon la seconde possibilité, ces intermédiaires sont désactivés à chaque étape, quittent le système responsable de leur synthèse et se confondent alors avec

ceux qui existent déjà dans le milieu cellulaire; mais dans ce cas, chaque étape de la synthèse (adjonction de l'élément en C_2) suppose à son tour l'activation préalable de l'acide correspondant prélevé dans le milieu cellulaire, c'est-à-dire d'un acide synthétisé à un moment nettement antérieur.

C'est pour ce dernier type que l'on pourrait proprement parler d'une *synthèse par élongation*, au moyen d'un système enzymatique «ouvert», disséminé dans les éléments cytoplasmiques. Ainsi, dans une cellule, chaque molécule d'acide stéarique, par exemple, serait toujours synthétisée par adjonction d'une molécule d'acétyl-CoA à une molécule d'acide palmitique déjà formée. L'existence d'un tel mécanisme résulte clairement d'expériences telles que celles de ANKER⁷⁾, et il semble prépondérant dans la glande mammaire d'après les recherches de POPJAK⁸⁾.

Au contraire, le premier des schémas suggérés plus haut pourrait être appelé *mécanisme de condensation*; en poussant les choses à l'extrême, il s'agirait de systèmes «fermés» aussi nombreux que les différents acides gras, et les élongations proprement dites seraient impossibles. Pour chaque acide gras, les intermédiaires de la synthèse ne quitteraient pas le système enzymatique et ne pourraient donc pas se mélanger à ceux de même type présents dans la cellule, ni par conséquent être dilués par eux. Les molécules d'acétate utilisées presque simultanément seraient pratiquement toutes à la même concentration isotopique. La possibilité d'un tel mécanisme est suggérée par les travaux de RITTENBERG & BLOCH⁸⁾, BRADY & GURIN⁹⁾, HIRSCH *et al.*¹⁰⁾ et surtout de DAUBEN *et al.*¹⁾. Ces derniers auteurs ont mesuré la répartition de la radioactivité dans les acides gras de souris 4 h après administration d'acétate-[1-¹⁴C]. Le carboxyle contient alors 13% de l'activité totale de la molécule dans le cas de l'acide palmitique, et 29% dans le cas de l'acide stéarique. Ils expliquent cette répartition en admettant que l'acide palmitique se forme par le mécanisme de condensation rapide qui vient d'être décrit; dans ce cas, chaque fragment dicarboné doit avoir la même radioactivité, égale au $\frac{1}{8}$ de celle de la molécule entière, soit 12,5%. L'acide stéarique au contraire est formé par élongation de l'acide palmitique préexistant; dans ce cas, le carboxyle doit contenir plus de 11,1% ($\frac{1}{9}$) de l'activité totale et cette valeur doit croître avec le temps, tout au moins pendant la période où l'acétate marqué s'incorpore dans les acides gras. Les proportions de l'activité totale que nous retrouvons dans le carboxyle de l'acide myristique et dans celui de l'acide palmitique sont assez proches des concentrations théoriques pour que l'on puisse admettre un mécanisme de condensation. En revanche, le carboxyle de l'acide stéarique contient une proportion de l'activité totale bien supérieure au $\frac{1}{9}$, ce qui témoigne sans équivoque d'une élongation.

La répartition de l'activité dans la molécule, ainsi que les différences d'activité spécifique entre les trois acides gras saturés peuvent le mieux s'expliquer de la manière suivante:

1. L'acide myristique ne peut être un précurseur important de l'acide palmitique, puisque son activité spécifique est plus faible.
2. La vitesse de synthèse de l'acide palmitique dépasse celle des deux autres acides gras, puisqu'il renferme, après 3 minutes déjà, une plus grande proportion de ¹⁴C.

⁷⁾ H. S. ANKER, J. biol. Chemistry **194**, 177 (1952).

⁸⁾ D. RITTENBERG & K. BLOCH, J. biol. Chemistry **154**, 311 (1944).

⁹⁾ R. O. BRADY & S. GURIN, J. biol. Chemistry **186**, 461 (1950).

¹⁰⁾ P. F. HIRSCH, W. J. LOSSOW & I. L. CHAIKOFF, J. biol. Chemistry **221**, 509 (1956).

3. Les deux mécanismes de synthèse sont autonomes, puisque la proportion des deux acides gras néoformés reste constante entre 3 et 30 minutes, et que d'autre part la proportion de ^{14}C dans le carboxyle est comparativement un peu plus faible pour l'acide palmitique que pour l'acide myristique.

4. La synthèse de l'acide stéarique en revanche, quoique plus lente que celle de l'acide palmitique, n'en est pas indépendante, puisque les activités spécifiques des deux acides gras sont plus voisines l'une de l'autre à 30 qu'à 3 minutes, et que les proportions de ^{14}C contenues dans le carboxyle de l'acide stéarique témoignent d'une élongation de l'acide palmitique, qui n'exclut pas toutefois l'intervention parallèle de la synthèse par condensation.

CONIGLIO *et al.*¹¹⁾ ont constaté que chez le Rat, le jeûne n'affecte pas de la même façon la synthèse de l'acide stéarique et celle de l'acide palmitique; ces auteurs concluent également à l'existence parallèle de mécanismes de condensation et d'élongation.

La prédominance, pour un acide donné, de l'un ou l'autre de ces mécanismes traduit peut-être la vitesse relative d'activation de l'acide immédiatement précurseur. Celle-ci serait par exemple faible pour l'acide myristique, et par conséquent le myristyl-CoA néoformé constituerait le précurseur prépondérant de l'acide palmitique. Dans le cas de l'acide palmitique, en revanche, cette vitesse d'activation deviendrait assez élevée pour que l'acide préexistant fournisse une fraction importante du précurseur de l'acide stéarique.

Nos résultats s'accordent donc bien avec l'hypothèse qu'il existe plusieurs systèmes enzymatiques pour la synthèse des acides gras, et qu'il existe dans le cycle des acides gras différents enzymes spécifiques pour telle ou telle longueur de chaîne¹²⁾.

RÉSUMÉ

Des souris ont été tuées 3 ou 30 minutes après injection intraveineuse d'acétate [$1\text{-}^{14}\text{C}$]. Les acides myristique, palmitique et stéarique des lipides totaux ont été isolés et décarboxylés.

Par rapport à celle de l'acide palmitique, l'activité spécifique de l'acide myristique est de 60% environ après 3 comme après 30 minutes; celle de l'acide stéarique est de 79% après 3 minutes et de 92% après 30 minutes.

Le groupe carboxyle de l'acide myristique et celui de l'acide palmitique contiennent respectivement $\frac{1}{7}$ et $\frac{1}{8}$ de l'activité totale de la molécule et ces valeurs sont identiques après 3 ou 30 minutes. Au contraire, le carboxyle de l'acide stéarique contient plus du $\frac{1}{9}$ de l'activité et ce rapport augmente de 3 à 30 minutes.

On en déduit que dans les conditions normales d'alimentation, l'acide myristique et l'acide palmitique sont surtout synthétisés indépendamment l'un de l'autre par un mécanisme de condensation, tandis que l'acide stéarique résulte en bonne partie d'une élongation de l'acide palmitique.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève

¹¹⁾ J. G. CONIGLIO & D. L. CATE, *J. biol. Chemistry* **232**, 361 (1958).

¹²⁾ Une partie de ce travail a été résumée dans les Comptes rendus de la Société suisse de Physiologie, Chimie physiologique et Pharmacologie, *Helv. physiol. Acta* **16**, C69 (1958).