

Smp. 218–220°,  $[\alpha]_D = +66,7^\circ$  bzw.  $+70,4^\circ$  ( $c = 0,330$  bzw.  $0,881$  in Chloroform). – Reaktionsprodukt: 790 mg, an 15,8 g Silicagel chromatographiert; Hexan, Hexan-Benzol (1:1), Benzol und Benzol-Äther (98:2) eluierten 15 kristallisierte Fraktionen von Acetyloleanolsäure (703 mg), die alle nach Kristallisation aus Methanol im Bereiche zwischen 260 und 269°, davon 568 mg bei 268–269° schmolzen. Identifikation mit authentischer Acetyloleanolsäure (Smp. 267–269°; Lit. <sup>16)</sup><sup>17)</sup> 259–264°, bzw. 268°) durch Mischprobe und IR.-Spektrum.

Benzol-Äther (9:1) und Äther eluierten noch insgesamt 47 mg unreiner Oleanolsäure vom Smp. 293–300° (Lit. <sup>16)</sup> 305–308°), die nach IR.-Spektrum noch geringe Mengen Acetyl-oleanolsäure enthielt.

Das in der Tabelle aufgeführte Ergebnis eines mit O-Acetyl-oleanolsäure-methylester in 2,6-Lutidin durchgeführten Halolyse-Ansatzes wurde auf analoge Weise wie in den drei oben beschriebenen Versuchen ermittelt.

Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Double-Beam-Spectrophotometer, Modell 21, aufgenommen und die Analysen in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Bei Modellversuchen mit 3 $\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -cholensäure-methylester, 3 $\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -ätiolensäure-methylester und O-Acetyl-oleanolsäure-methylester wurde gefunden, dass die von TASCHNER & LIBEREK, l. c.<sup>4)</sup> beschriebene Methode der Halolyse von Carbonsäureestern mit Lithiumjodid sich für die selektive Spaltung von Carbo-methoxygruppen neben äquatorial gebundenen, hydrolytisch leicht verseifbaren Acetoxygruppen eignet. Dies gilt im besonderen auch für die sterisch stark behinderte Carbomethoxygruppe des O-Acetyl-oleanolsäure-methylesters, welcher durch Erhitzen mit Lithiumjodid in 2,4,6-Collidin praktisch einheitlich zu Acetyloleanolsäure gespalten wird, was in bemerkenswertem Gegensatz zu den Verhältnissen bei der alkalischen Hydrolyse steht.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

<sup>17)</sup> E. WEDEKIND & W. SCHICKE, Z. physiol. Chem. 195, 132 (1931).

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

### IX. La transformation du glucose en acides gras par la voie oxydative chez la Souris *in vivo*

par Luc Paunier et Pierre Favarger

(31 X 59)

#### Introduction

Depuis la découverte par WARBURG, en 1931, de l'oxydation directe du glucose par l'intermédiaire de l'acide phospho-6-gluconique, de nombreux auteurs se sont attachés à prouver l'existence de cette réaction dans les organismes supérieurs, puis à déterminer son importance quantitative.

Les recherches sur l'importance quantitative de la voie oxydative sont fondées sur trois types de considérations théoriques:

1. Le C-1 du glucose est converti directement en  $\text{CO}_2$  par la voie oxydative. Par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF (E. M.) en revanche, le C-1 du glucose devient le C du groupe méthyle de l'acide pyruvique et ne se transforme en  $\text{CO}_2$  qu'après le passage par le cycle des acides tricarboxyliques. En dosant le  $\text{CO}_2$  produit à partir du glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ] d'une part, et à partir du glucose-[6- $^{14}\text{C}$ ] ou U- $^{14}\text{C}$  d'autre part, on peut calculer l'importance de la voie oxydative. Mais cette méthode peut prêter à de nombreuses critiques et les conclusions qu'on en tire attribuent trop d'importance à la voie oxydative<sup>1</sup>). En effet, il suffit de deux intermédiaires pour produire du  $^{14}\text{CO}_2$  à partir du glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ], tandis qu'il en faut une vingtaine par la voie d'E. M. et le cycle des acides tricarboxyliques. En outre, ces intermédiaires peuvent disparaître de la circulation en s'incorporant dans les acides gras ou les acides aminés.

2. La resynthèse du glucose par le cycle d'E. M. n'affecte pas la distribution du C dans la molécule, tandis que la resynthèse d'un hexose à partir d'un pentose par la transaldolase et la transcétolase entraîne un changement de place des atomes de C. On peut donc estimer l'importance de chacune des deux voies en mesurant la concentration isotopique des différents carbones du glucose provenant du glycogène hépatique, après injection de glucose spécifiquement marqué.

3. Les carbones 1, 2 et 3 du glucose ne sont transformés directement en triose et en acide pyruvique que par la voie d'E. M. Par la voie oxydative, le C-1 du glucose est oxydé directement en  $\text{CO}_2$ , tandis que les carbones 2 et 3 deviendront les C-1 et C-2 du pentose. En comparant l'incorporation du  $^{14}\text{C}$  du glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ] à celle du glucose-[6- $^{14}\text{C}$ ] dans un dérivé de l'acide pyruvique comme l'alanine ou l'acide lactique, on pourra estimer directement l'importance de la voie oxydative.

De nombreux auteurs, employant l'une ou l'autre de ces méthodes, ont essayé de définir l'importance de la voie oxydative. Ces travaux, exécutés pour la plupart *in vitro*, aboutissent souvent à des résultats contradictoires. Les conditions expérimentales, la conduite du raisonnement mathématique semblent entraîner ces grandes variations dans les résultats.

Il nous a semblé intéressant de reprendre le problème, de l'étudier *in vivo* en nous rapprochant le plus possible des conditions physiologiques.

Nous avons choisi les acides gras comme révélateurs de la voie oxydative. Leur synthèse se fait surtout dans le tissu adipeux, tissu plus spécialisé que le foie, au nombre de réactions biochimiques certainement plus limité. Une fois synthétisés, les acides gras sont mis en réserve et ne seront métabolisés que lentement. On aura donc une image plus stable du métabolisme glucidique que si l'on travaille avec le foie, où la rapidité extrême des processus cataboliques peut masquer un phénomène isolé.

**Partie expérimentale.** — La méthode que nous avons employée pour analyser les acides gras est commune aux quatre expériences que relate ce travail. Seuls diffèrent les sucres administrés, la position du  $^{14}\text{C}$  dans la molécule de glucose et la durée de l'expérience. Ces détails seront donnés dans le texte et dans la légende des tableaux.

Des souris mâles pesant entre 18 et 25 g sont isolées le soir précédant l'expérience et reçoivent chacune 1 g de pain. Le jour de l'expérience, on leur fait manger toutes les 2 h une petite quantité de pain. Enfin, dans la demi-heure qui précède l'injection du sucre radioactif, elles ingèrent 0,5 g de pain. Il est très important, si on veut obtenir des résultats homogènes, que

<sup>1</sup>) H. G. WOOD, *Physiol. Review* 35, 841 (1955).

toutes les souris soient soumises à un régime alimentaire absolument semblable. Le traitement décrit ci-dessus place l'animal dans des conditions favorables à la synthèse lipidique. On injecte dans la veine caudale le sucre radioactif dissous dans 0,3 ml d'une solution isotonique. Les animaux sont tués par décapitation 3, 12, et 60 min après l'injection, rapidement disséqués et immédiatement fixés dans l'alcool bouillant. On «saponifie» l'animal par la potasse alcoolique (eau-alcool 1:2, KOH 20%), extrait l'insaponifiable par l'éther de pétrole, puis, par le même solvant, les acides gras, après avoir acidifié la liqueur par HCl. Les acides gras sont lavés à l'eau puis lavés à fond avec une solution aqueuse de glucose pour éliminer toute trace du sucre radioactif injecté. On les dépose en couche mince dans des cupules d'aluminium et détermine leur radioactivité au moyen d'un compteur sans fenêtre à courant gazeux.

*Analyse de l'acide palmitique.* On sépare les acides gras saturés des non-saturés par une double précipitation comme sels de plomb. Les savons de Pb des acides saturés séparés lors de la première précipitation sont débarrassés des acides non-saturés radioactifs par traitement avec de l'acide oléique. On chromatographie les acides solides selon HOWARD & MARTIN<sup>2)</sup>. On isole l'acide palmitique, mesure son activité spécifique et procède à sa décarboxylation par la réaction de SCHMIDT, modifiée par BLOMSTRÖND<sup>3)</sup> et réalisée dans un appareil à combustion humide<sup>4)</sup>. Des essais de décarboxylation avec de l'acide palmitique-[1-<sup>14</sup>C] et de l'acide stéarique-[2-<sup>14</sup>C] nous ont montré que la méthode était précise et les résultats reproductibles. Le BaCO<sub>3</sub> provenant de la décarboxylation est compté en couche mince.

**Série 1.** – Le glucose-[1-<sup>14</sup>C] ne fournit des acides gras radioactifs que s'il est métabolisé par la voie d'E. M. La radioactivité du glucose-[6-<sup>14</sup>C] en revanche, est incorporée dans les acides gras aussi bien par la voie oxydative que par la voie d'E. M. En comparant l'incorporation de la radioactivité du glucose-[1-<sup>14</sup>C] à celle du glucose-[6-<sup>14</sup>C], on peut évaluer d'une façon simple et directe l'importance de la voie oxydative.

On injecte à une série de 12 souris 5 microcuries de glucose-[1-<sup>14</sup>C], et à une seconde série de 12 souris, 5 microcuries de glucose-[6-<sup>14</sup>C]. Les souris sont tuées 12 min après l'injection. On dose la radioactivité des acides gras de la carcasse, du foie et des graisses brunes interscapulaires.

*Résultats.* L'incorporation de la radioactivité du glucose-[6-<sup>14</sup>C] dans les acides gras de la carcasse est très significativement supérieure à celle du glucose-[1-<sup>14</sup>C] (tableaux 1 et 2). On calcule l'importance de la voie oxydative à partir des deux moyennes. La différence entre l'incorporation de l'activité du glucose-[6-<sup>14</sup>C] et celle du glucose-[1-<sup>14</sup>C] correspond au nombre de molécules de glucose qui ont subi directement une oxydation de leur carbone 1. Le rapport de cette différence avec le nombre total de molécules incorporées dans les acides gras (mesuré par l'incorporation d'activité de glucose-[6-<sup>14</sup>C]) correspond à l'importance de la voie oxydative<sup>5)6)</sup>. Pour la carcasse, les valeurs obtenues nous permettent de calculer que le 39% des molécules de glucose suivent cette voie.

Dans le foie, la différence entre les moyennes est importante et permet d'estimer à 32% la proportion des molécules de glucose dégradées par la voie oxydative. Mais la dispersion des résultats est plus grande, et la signification statistique, moins bonne.

Pour les graisses brunes interscapulaires, la différence entre les moyennes des deux séries est si petite qu'elle n'est pas significative, et de plus la grande dispersion

<sup>2)</sup> C. A. HOWARD & A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* **46**, 532 (1950).

<sup>3)</sup> R. BLOMSTRÖND, *Acta chem. scand.* **8**, 1487 (1954).

<sup>4)</sup> A. ENGELHORN & P. FAVARGER, Travail en préparation.

<sup>5)</sup> S. ABRAHAM, P. F. HIRSCH & I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* **217**, 31 (1954).

<sup>6)</sup> A. L. BLACK, M. KLEIBER, E. M. BUTTERWORTH, G. B. BRUBACHER & J. J. KANEKO, *J. biol. Chemistry* **227**, 537 (1957).

des résultats empêche de toute manière de tirer une conclusion sur l'importance de la voie oxydative.

Pour n'avoir plus à comparer 2 groupes d'animaux entre eux, nous avons procédé à une seconde expérience qui nous a permis de calculer l'importance de chacune des deux voies au moyen du même animal.

Tableau 1. Incorporation totale de la radioactivité du glucose-[1-<sup>14</sup>C] et du glucose-[6-<sup>14</sup>C] dans les acides gras de la Souris (carcasse, foie, graisses brunes interscapulaires)

Les animaux ont été tués 12 min après l'injection de 5  $\mu$ c de glucose. L'activité est exprimée en c.p.m.  $\cdot 10^{-3}$

Souris No.	Glucose-[6- <sup>14</sup> C]			Souris No.	Glucose-[1- <sup>14</sup> C]		
	Carcasse	Foie	Gr. brunes		Carcasse	Foie	Gr. brunes
1	196	14,3	9,8	1'	106	5,3	3,2
2	298	19,4	5,8	2'	100,3	1,9	3,3
3	188,5	10,5	2,5	3'	115	6,1	1,8
4	285,5	7,8	8,6	4'	131	3,8	5,9
5	189	5,2	10,4	5'	174	7,3	3,6
6	139	3,7	1,9	6'	196	7,1	5,7
7	197	3,3	3,7	7'	78,5	9,9	6,9
8	404	13,6	4,1	8'	167,8	1,8	1,2
9	215	8,1	2,6	9'	253,4	6,2	7,8
10	158	3,8	1,9	10'	98	6,5	2,2
11	246	4,8	1,9	11'	108	3,8	2,8
12	(59)	5,1	1,6	12'	144	2,2	1,4

Tableau 2. Incorporation de la radioactivité du glucose-[6-<sup>14</sup>C] et du glucose-[1-<sup>14</sup>C] dans les acides gras de la Souris (carcasse, foie et graisses brunes interscapulaires)

Les valeurs représentent la radioactivité retrouvée en c.p.m.  $\cdot 10^{-3}$  et sont des moyennes calculées d'après les chiffres du tableau 1. S = écart type

	Glucose-[1- <sup>14</sup> C]	Glucose-[6- <sup>14</sup> C]	Voie oxydative
Carcasse	139,4 S = 51 0,01 > P > 0,001	228,9 S = 75	39%
Foie	5,2 S = 2,5 0,05 > P > 0,02	8,6 S = 5,3	32%
Gr. brunes	3,8 S = 2,2 0,6 > P > 0,5	4,5 S = 3,2	

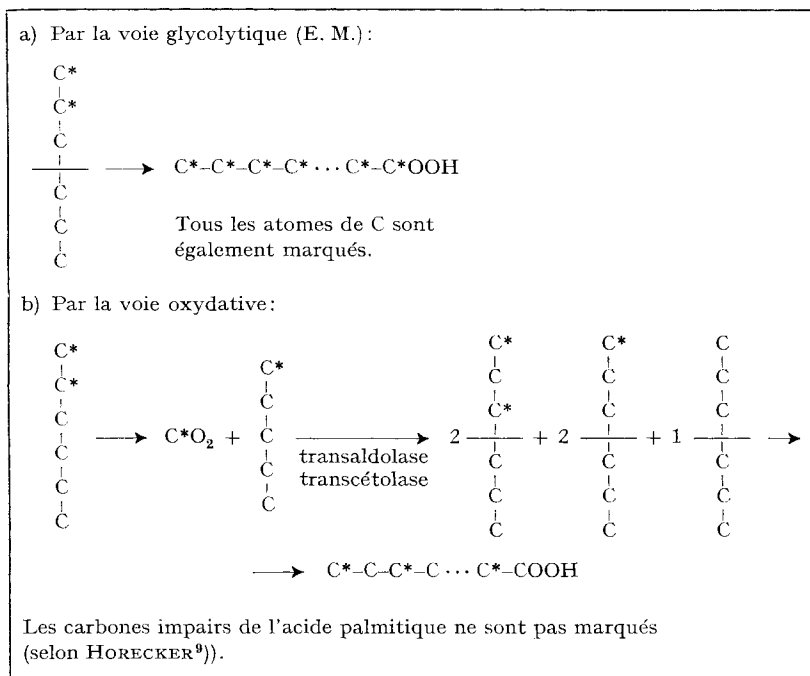
Les travaux de DAUBEN<sup>7)</sup> ainsi que des recherches de notre laboratoire<sup>8)</sup> ont montré que si l'on injecte de l'acétate-[1-<sup>14</sup>C] à une souris bien nourrie, le groupe carboxyle de l'acide palmitique contient le 8<sup>e</sup> environ de l'activité totale de la molécule. On peut en déduire que, dans des conditions normales d'alimentation, la plus grande partie de l'acide palmitique est synthétisée par condensation presque

<sup>7)</sup> W. G. DAUBEN, E. HOERGER & J. W. PETERSEN, J. Amer. chem. Soc. 75, 2347 (1953).

<sup>8)</sup> V. HANDWERCK & P. FAVARGER, Helv. 42, 508 (1958).

simultanée d'éléments en  $C_2$ . Les acides gras intermédiaires (lauryl-, myristyl-CoA) ne quittent pas le système enzymatique et ne peuvent se mélanger à ceux de même type présents dans la cellule. La concentration isotopique des molécules d'acétate reste donc constante dans le lieu de cette synthèse et l'activité se répartit également tout le long de la chaîne de l'acide palmitique.

*Schéma des deux voies principales de dégradation du glucose*



Avec le glucose-[1,2- $^{14}C$ ], les deux processus conduisent aux résultats suivants:  
 a) Par la voie d'E. M., on obtient des radicaux en  $C_2$  uniformément marqués (voir schéma ci-dessous).

b) Par la dégradation oxydative du glucose, le C-1 est oxydé en  $CO_2$ . Seul le C-2 des radicaux acétyle dérivant des pentoses sera marqué, et nous obtiendrons un acide palmitique marqué uniquement sur ses C pairs; son groupe carboxyle ne sera pas marqué.

On peut, en déterminant le nombre de molécules d'acide palmitique marquées de chaque sorte, établir l'importance de chacune des deux voies.

Nous avons d'abord procédé à une expérience de contrôle préliminaire, pour estimer l'importance du passage de l'acide pyruvique dans le cycle des acides dicarboxyliques, dans des conditions exactement semblables à celles de notre expérience. En effet, si la synthèse de l'acide gras se fait à partir d'un acide acétique, dérivant d'un acide pyruvique -[3- $^{14}C$ ] qui n'a pas passé par les acides dicarboxyliques, on ne doit trouver aucune activité sur le groupe carboxyle de l'acide palmitique, puisque

<sup>9)</sup> B. L. HORECKER & A. H. MEHLER, *Ann. Rev. Biochemistry* 24, 207 (1955).

cet acide acétique est marqué sur son groupe méthyle seulement. Si, au contraire, l'acide pyruvique dérivant de la glycolyse s'est transformé transitoirement en acides fumarique et succinique, l'acide acétique résultant aura ses deux atomes de carbone marqués.

Il était important de voir dans quelle mesure cette redistribution<sup>10)</sup> de la radioactivité allait influencer notre mesure de la voie oxydative. L'acide pyruvique qui dérive du glucose-[1,2-<sup>14</sup>C] par la voie oxydative est marqué sur ses carbones 1 et 3, et, s'il passe encore par les acides dicarboxyliques, sur ses carbones 1, 2 et 3. Ce dernier acide pyruvique donne de l'acide acétique-[1,2-<sup>14</sup>C], c'est-à-dire le même que celui qui dérive du glucose-[1,2-<sup>14</sup>C] par la voie glycolytique. Ce passage par les acides dicarboxyliques pouvait donc masquer tout ou partie du passage du glucose par la voie oxydative.

**Série 2.**—*Expérience préliminaire à la série 2.* On injecte à deux groupes de 3 souris 15 microcuries de glucose-[6-<sup>14</sup>C] et les tue resp. 12 et 60 min après l'injection. On analyse la répartition de l'activité sur les atomes de C de l'acide palmitique.

Tableau 3. Répartition de la radioactivité dans la molécule d'acide palmitique chez la Souris après injection de 15  $\mu$ c de glucose-[6-<sup>14</sup>C]

Les animaux ont été tués 12 et 60 min après l'injection. L'incorporation totale est donnée en % de la radioactivité administrée. La radioactivité du carboxyle est donnée en % de la radioactivité de la molécule d'acide palmitique

	Souris N°	Incorpora- tion totale	Carboxyle	% de passage par les acides dicarboxyliques
12 min.	13	1,6	2,9	46
	14	5,2	1,7	27
	15	1,7	1,9	30
60 min.	16	3	2,3	37
	17	10,8	1,9	30
	18	3,7	1,6	26

*Résultats* (voir tableau 3). Le groupe carboxyle de l'acide palmitique formé à partir du glucose-[6-<sup>14</sup>C] renferme de 1,6 à 2,9% de l'activité totale de la molécule. Ces chiffres correspondent au passage d'une quantité importante d'acide pyruvique par le cycle des acides dicarboxyliques; cette quantité peut être évaluée facilement. Les carbones pairs d'une part, les carbones impairs d'autre part, sont marqués, nous l'avons vu, à peu près également tout le long de la chaîne de l'acide palmitique. Il est simple de déterminer comme suit la radioactivité moyenne de chacune de ces sortes de carbone. Soit A l'activité du groupe carboxyle (ou l'activité moyenne des C impairs) exprimée en % de l'activité totale de la molécule. On a:

$$(100-8 A)/8 = \text{Activité moyenne des C pairs (= B)}.$$

Le rapport  $2 A/(B + A)$  nous donne directement la proportion des molécules d'acide pyruvique ayant passé par les acides dicarboxyliques. Les résultats obtenus après 12 ou après 60 min sont peu différents l'un de l'autre. A première vue on s'attendrait à trouver une redistribution plus forte après un temps prolongé qu'après

<sup>10)</sup> Equivalent du terme anglais «randomisation».

un temps très court. Nos résultats s'expliquent pourtant facilement, car le tissu adipeux fixe les acides gras au fur et à mesure de leur synthèse. Il se comporte un peu comme une trappe qui enfermerait les molécules formées pendant les 12 ou les 60 min suivant l'injection. Les molécules d'acide palmitique n'étant pas remises en circulation et le passage de l'acide pyruvique par les acides dicarboxyliques s'effectuant à un rythme constant, l'activité relative des atomes de C pairs par rapport aux impairs ne doit pas changer dans une grande mesure.

Dans l'animal entier, 25 à 40% des molécules d'acide pyruvique passeraient par le cycle des acides dicarboxyliques. HIATT *et coll.*<sup>11)</sup> ont incubé des tranches de foie et de diaphragme avec du pyruvate-[2-<sup>14</sup>C] et examiné la répartition de l'activité sur les atomes de C du glucose provenant de l'hydrolyse du glycogène. Ils trouvent dans le foie une forte activité sur les carbones 1 et 6 et en déduisent que 90% des molécules d'acide pyruvique passent par le cycle dicarboxylique. Dans le muscle, au contraire, les carbones 1 et 6 n'étant pas marqués, le passage ne se produit pas.

Nos résultats donnent une appréciation utile sur l'importance de ce cycle dans l'animal entier.

*Série 2 (tableau 4).* On injecte aux souris 15 microcuries d'un mélange à parties égales des glucoses [1-<sup>14</sup>C] et [2-<sup>14</sup>C], ce qui au point de vue métabolique est l'équivalent d'une injection de glucose-[1,2-<sup>14</sup>C]. On tue les animaux 3, 12 et 60 min après l'injection et analyse la répartition de l'activité dans l'acide palmitique (v. tableau 4).

On calcule l'importance de la voie oxydative à partir de deux données: a) l'activité spécifique de l'acide palmitique, b) l'activité de son groupe carboxyle.

Après l'injection de glucose-[1,2-<sup>14</sup>C], nous obtenons un acide palmitique marqué de deux façons:

1. Les atomes de C de l'acide palmitique synthétisé par E. M. renferment tous la même proportion de <sup>14</sup>C.

Tableau 4. Radioactivité de l'acide palmitique et de son groupe carboxyle chez la Souris après injection de l'équivalent de 15  $\mu$ c de glucose-[1,2-<sup>14</sup>C]

Les souris ont été tuées 3, 12 et 60 min après l'injection. L'activité est exprimée en c.p.m. par  $\mu$ mole d'acide palmitique

	Souris N°	Acide palmitique	-COOH	Voie oxydative
3 min.	24	1220	76	0%
	25	667	41	6%
12 min.	19	5370	270	40%
	20	6610	358	35%
	21	668	35	35%
	22	628	32	38%
	23	2160	112	32%
60 min.	26	410	19	50%
	27	346	17,5	40%

2. Seuls les carbones pairs de l'acide palmitique synthétisé par la voie oxydative sont radioactifs<sup>9)</sup>. Cependant les C impairs sont marqués faiblement par le passage de l'acide pyruvique dans le cycle des acides dicarboxyliques. D'après l'expérience préliminaire ci-dessus, le carboxyle

<sup>11)</sup> H. H. HIATT, M. GOLDSTEIN, J. LAREAU & B. L. HORECKER, *J. biol. Chemistry* 237, 303 (1958).

de l'acide palmitique contient 2% de l'activité totale de la molécule, ce qui permet de calculer l'importance de la redistribution de la manière suivante: l'activité moyenne des C pairs étant posée égale à 1, si  $x$  est l'activité moyenne des C impairs, on aura:

$$x/(8+8x) = 2/100 \text{ d'où } x = 16/84 = 0,19.$$

L'activité contenue dans les deux types d'acide palmitique peut donc être représentée comme suit (les chiffres sous les C indiquent l'activité relative):

1. par E. M.:	C*-C*-C*-C*- . . . C*-C*OOH
	1 1 1 1 . . . 1 1
2. par voie oxydative:	C*-C -C*-C - . . . C*-COOH
	1 0,19 1 0,19 . . . 1 0,19

Soit A la proportion de molécules d'acide palmitique synthétisées par E. M., et B, celles synthétisées par la voie oxydative. On a donc:

1.  $A(16 \cdot 1) + B(8 \cdot 1 + 8 \cdot 0,19) = \text{Activité moyenne totale de la molécule.}$

2.  $A \cdot 1 + B \cdot 0,19 = \text{Activité moyenne du groupe carboxyle.}$

On tire facilement A et B de ces deux équations à deux inconnues.

$$100 \cdot B/(A+B) = \% \text{ de la voie oxydative.}$$

Ces calculs ne donnent qu'une approximation à  $\pm 10\%$ .

Nous n'avons pas tenu compte de l'éventualité de passages successifs du glucose dans le cycle d'interconversion des oses. On pourrait penser en effet que si le glucose obtenu après un premier passage dans le cycle, soit le glucose-[1,3-<sup>14</sup>C], entre une deuxième fois, puis une troisième dans le cycle, nous aurions un glucose marqué assez fortement sur son carbone 2. Mais si la voie glycolytique est deux fois plus importante que la voie oxydative, on peut calculer que 95% de la radioactivité provenant du glucose-[1,2-<sup>14</sup>C] ont disparu du «pool» des hexoses après deux passages dans le cycle (chiffre calculé d'après la méthode de WOOD & KATZ<sup>12</sup>). Une interconversion non oxydative des oses ne peut pas modifier sensiblement les résultats<sup>13</sup>).

Après 3 min, l'activité est répartie également le long de la chaîne de l'acide palmitique, puisque le groupe carboxyle renferme le 1/16 de l'activité de la molécule entière. L'importance de la voie oxydative ne se manifeste pas encore, car après un temps si court, le pentose obtenu par l'oxydation du glucose n'a pas eu le temps de passer par le cycle d'interconversion des oses et de s'incorporer dans les acides gras.

Après 12 min, nous retrouvons les valeurs obtenues dans l'expérience 1:35 à 40% du glucose incorporé dans les acides gras ont passé par la voie oxydative.

Après 60 min, les deux résultats que nous avons sont un peu plus élevés qu'après 12 min, mais la différence n'est pas significative.

### Discussion

Dans les recherches où l'on utilise des animaux intacts, les expériences de courte durée ont des avantages certains: elles permettent d'obtenir une sorte d'instantané des réactions biologiques qui sont pour ainsi dire saisies au passage, dans des conditions aussi physiologiques que possible. Au contraire, les expériences de longue durée sont souvent moins significatives, car les résultats peuvent être brouillés par des réactions d'interconversion<sup>14</sup>). Mais si l'on choisit un temps trop court, le phénomène étudié peut ne pas encore se manifester. Les résultats de la série 2 sont signifi-

<sup>12</sup>) H. G. WOOD & J. KATZ, *J. biol. Chemistry* 233, 1279 (1958).

<sup>13</sup>) S. KORKES, *Ann. Rev. Biochemistry* 25, 685 (1956).

<sup>14</sup>) H. R. V. ARNSTEIN & D. KLEGEVIC, *Biochem. J.* 62, 199 (1956).



catifs à cet égard. Nous avons expérimenté à 3, 12 et 60 min. Après 3 min, l'importance de la voie oxydative ne se manifeste pas encore dans la molécule d'acide palmitique. Les réactions d'interconversion ont donc besoin d'un certain temps pour atteindre leur équilibre. Ce dernier doit s'établir assez rapidement après les 12 premières min, car les résultats obtenus après 60 min ne sont que légèrement différents de ceux des essais de 12 min.

Tableau 5. *Incorporation du ribose-[1-<sup>14</sup>C] dans les acides gras de la Souris*

Les souris A, A', B et B' ont reçu en injection intraveineuse 5  $\mu$ c de ribose-[1-<sup>14</sup>C], dilués par 5 mg de ribose inactif. Les souris C, C', D et D' ont reçu 5  $\mu$ c de ribose-[1-<sup>14</sup>C] sans dilution (0,37 mg de ribose). Les souris A, B, C, D ont été tuées 12 min après l'injection; les souris A', B', C', D', 60 min après. L'activité est exprimée en c.p.m.  $\cdot 10^{-3}$

	Carcasse	Foie	Intestin	Gr. brunes	Activité totale	% incorporé
A	3,3	0,5	0,4	0,04	4,24	0,05
B	1,8	0,15	0,06	0,07	2,1	0,02
C	31,2	1,5	0,8	1,2	34,7	0,43
D	11,4	0,2	0,6	0,09	12,3	0,16
A'	36	1,6	2,1	0,38	40	0,51
B'	29	0,9	1,0	0,5	31,4	0,39
C'	63,5	0,8	2,5	2,5	69,3	0,87
D'	64,5	2,3	2,4	2,8	72,0	0,90

Il est intéressant de comparer ces résultats obtenus en fonction du temps avec ceux que nous a donnés une expérience antérieure. Nous avons injecté à des souris du ribose-[1-<sup>14</sup>C] et mesuré la radioactivité des acides gras de la carcasse, du foie, de l'intestin et des graisses brunes, 12 et 60 min après l'injection (tableau 5). La distribution de la radioactivité dans les acides gras des différents organes étudiés n'est pas différente de celle que l'on obtient après des injections de glucose radioactif, mais le facteur temps joue un rôle beaucoup plus important. Après 60 min, les souris ont incorporé trois à quatre fois plus d'activité dans leurs acides gras qu'après 12 min. Si le ribose radioactif est dilué par du ribose inactif, cet effet du temps est encore plus marqué. D'autre part, la proportion de la radioactivité incorporée par rapport à celle qui est administrée baisse fortement si le ribose radioactif est dilué par de l'inactif (tableau 5). Cette inertie relative ne doit pas surprendre, car le ribose libre n'est ni un toxique qui doit être rapidement métabolisé, ni un composé strictement physiologique s'insérant immédiatement dans les cycles métaboliques; en effet, le ribose ne paraît jamais exister en quantité notable sous sa forme libre. Si le ribose que nous avons injecté a été métabolisé si lentement, c'est peut-être que, dans les conditions de notre expérience, sa phosphorylation n'a pu se produire à un rythme suffisant. SEGAL<sup>15)</sup>, dans un travail sur le métabolisme du ribose chez l'Homme, retrouve le même phénomène. S'il injecte 5 microcuries de ribose-[1-<sup>14</sup>C], l'activité du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> expiré varie beaucoup avec la quantité pondérale du ribose injecté: elle diminue lorsque la quantité de ribose augmente. Avec le glucose, au contraire, on n'arrive pas facilement à obtenir un effet de dilution. D'après les travaux de notre

<sup>15)</sup> S. SEGAL & J. FOLEY, J. clin. Invest. 37. 719 (1958).

laboratoire, l'activité spécifique des acides gras synthétisés par l'animal ne dépend pas de la dilution du glucose radioactif avec du glucose inactif<sup>16</sup>). En effet, la synthèse des acides gras participe au mécanisme régulateur de la glycémie.

Ces expériences montrent à nouveau combien il est important de n'employer que des précurseurs physiologiques et sous leur forme physiologique, et de choisir des temps appropriés au phénomène qu'on désire mettre en évidence.

La première série d'expériences est d'une interprétation facile. La comparaison de l'incorporation du glucose-[1-<sup>14</sup>C] avec celle du glucose-[6-<sup>14</sup>C] dans les acides gras comporte peu de risques d'erreur, car la perte d'activité sur le carbone 1 du glucose ne peut être due qu'à son oxydation directe. Cette expérience nous permet d'affirmer que dans nos conditions de travail, la voie oxydative intéresse 30 à 40% des molécules de glucose. BLACK *et coll.*,<sup>6)</sup> emploient la même méthode chez la Vache en lactation: ils comparent la contribution du glucose-[1-<sup>14</sup>C] et celle du glucose-[6-<sup>14</sup>C] à la formation du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> expiratoire et du glycérol, de l'alanine et de la sérine radioactives dans le lait. Pour l'alanine, leurs résultats sont voisins des nôtres, mais pour les trois autres composés, leurs chiffres sont deux fois plus élevés.

Les résultats obtenus pour un tissu ou un composé déterminés n'ont donc pas toujours une signification générale.

La plupart des auteurs ont étudié la répartition de l'activité à l'intérieur des molécules de glycogène après l'administration de glucose marqué en différentes positions. Ils concluent que la voie oxydative joue un petit rôle chez l'animal<sup>17</sup>). Dans la plupart de ces expériences, on a administré à l'animal à jeun des quantités de glucose assez fortes pour favoriser la synthèse du glycogène. Dans ces conditions, le catabolisme et la resynthèse du glucose par la voie oxydative doivent être lents, comparés à la néoglucogenèse par la voie d'E. M. La distribution de l'isotope à l'intérieur de la molécule reflétera davantage la voie métabolique employée pour la synthèse de ce glycogène que l'ensemble des voies cataboliques du glucose.

La deuxième méthode que nous avons employée pour déterminer l'importance de la voie oxydative nous a donné les mêmes résultats que notre première expérience. Cette méthode comportait cependant certains risques d'erreurs. Le ribose-[1-<sup>14</sup>C] provenant de l'oxydation du glucose-[1,2-<sup>14</sup>C] peut suivre des voies métaboliques variées. S'il participe, par exemple, à la formation des acides nucléiques en quantité importante, nous ne nous en apercevrons pas en étudiant la répartition de l'activité à l'intérieur de la molécule d'acide palmitique. On trouverait alors une valeur trop faible pour l'oxydation directe du glucose. Des travaux récents<sup>18)19)</sup> ont démontré que le ribose des acides nucléiques était synthétisé par voie oxydative autant que non oxydative. Les travaux de MARKS notamment montrent que le métabolisme du ribose est étroitement lié à celui des hexoses et que les interconversions sont importantes et rapides<sup>18)</sup>. On ne peut donc pas dire que le pentose formé par oxydation

<sup>16)</sup> P. FAVARGER & J. GERLACH, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 16, 188 (1958).

<sup>17)</sup> I. A. BERNSTEIN, K. LENTZ, M. MALM, P. SCHAMBYE & H. G. WOOD, *J. biol. Chemistry* 215, 137 (1955); B. BLOOM, F. EISENBERG JR. & D. STETTEN JR., *ibid.* 222, 301 (1956); P. A. MARKS & P. FEIGELSON, *J. clin. Invest.* 36, 1279 (1957).

<sup>18)</sup> P. A. MARKS & P. FEIGELSON, *J. biol. Chemistry* 226, 1001 (1957).

<sup>19)</sup> S. KIT, J. KLEIN & O. L. GRAHAM, *J. biol. Chemistry* 229, 853 (1957); H. H. HIATT, *J. clin. Invest.* 36, 1408 (1957).

du C-1 du glucose soit aiguillé vers des tâches particulières comme la synthèse des acides nucléiques. Il y participe, certes, mais en restant dans le «pool» des hexoses et pentoses, et d'ailleurs la quantité de ribose dévié vers les acides nucléiques doit être faible.

D'après des travaux effectués dans notre laboratoire, on peut admettre que la synthèse des acides gras se fait surtout dans le tissu adipeux. Cette synthèse demandant du TPNH, on comprend que la voie oxydative y soit si importante. D'après les travaux de HERS<sup>20)</sup>, de KINOSHITA<sup>21)</sup> et de CAHILL<sup>22)</sup>, l'importance de la voie oxydative peut varier avec la présence ou l'absence de composés capables d'oxyder le TPNH. D'après HERS, la production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ] dans les tranches de foie de lapin est fortement augmentée par la présence de substrats capables d'oxyder le TPNH, tels que le glycéraldéhyde, la glucuronolactone ou la glucosone. Ces corps, sous l'action d'une aldose-réductase, réagissent avec le TPNH pour former l'alcool primaire correspondant. KINOSHITA retrouve le même phénomène dans ses travaux sur l'épithélium de la cornée de bœuf.

D'après SIPERSTEIN & FAGAN<sup>23)</sup>, l'importance de la synthèse des acides gras dépend en partie de la quantité de glucose métabolisé par la voie oxydative. En effet, la production d'acides gras radioactifs à partir d'acétate-[1- $^{14}\text{C}$ ] par des tranches de foie et en présence de glucose-6-phosphate est fortement augmentée si on ajoute du TPN au milieu. Cette adjonction de TPN favorise l'oxydation directe du glucose. Cet effet est particulièrement net avec des tranches de foie d'animaux rendus diabétiques par l'alloxane.

Toutes ces expériences démontrent donc que la voie oxydative du glucose et la synthèse des acides gras sont deux processus dépendant étroitement l'un de l'autre.

Les expériences récentes de MUNTZ & MURPHY<sup>24)</sup> faites sur le foie montrent que là aussi, la voie oxydative joue un grand rôle. Ils injectent dans la veine porte d'un rat du glucose-[2,6- $^{14}\text{C}$ ] et déterminent, après 90 secondes, la répartition de la radioactivité dans le lactate isolé du foie. Ils trouvent l'atome  $\beta$  beaucoup plus marqué que l'atome  $\alpha$ , et cela leur permet de calculer que 29–38% du glucose injecté ont été métabolisés par la voie oxydative. Dans une seconde expérience, ils perfusent des foies de rats avec du sang frais auquel on ajoute successivement du glucose-[6- $^{14}\text{C}$ ] et du glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ]. En mesurant l'augmentation ou la diminution de  $^{14}\text{CO}_2$ , qui se produit lorsqu'on change de sucre dans la perfusion, les auteurs concluent que 55% du glucose sont métabolisés par la voie oxydative. Les travaux fondés sur la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  produite à partir de glucose diversement marqué n'éclaircissent cependant qu'un des aspects du problème: ce type d'expérience nous montre le métabolisme oxydatif du glucose, mais le rôle relatif des deux voies dans les processus anaboliques n'est pas déterminé. Le glycogène, le glycérol et l'alanine peuvent, par

<sup>20)</sup> H. G. HERS & G. DE BÉTHUNE, IVe Congrès intern. Biochimie, Vienne 1958; A Supplement to international Abstracts of biological Sciences, p. 104, Pergamon Press Ltd., Londres, Paris, New York, Los Angeles 1958.

<sup>21)</sup> J. H. KINOSHITA, J. biol. Chemistry 228, 247 (1957).

<sup>22)</sup> G. F. CAHILL, A. B. HASTINGS, J. ASHMORE & S. ZOTTU, J. biol. Chemistry 230, 125 (1958).

<sup>23)</sup> M. D. SIPERSTEIN & V. M. FAGAN, Science 126, 1012 (1957); M. D. SIPERSTEIN, Diabetes 7, 181 (1958).

<sup>24)</sup> J. A. MUNTZ & J. R. MURPHY, J. biol. Chemistry 224, 971 (1957); J. R. MURPHY & J. A. MUNTZ, *ibid.* 224, 987 (1957).

exemple, être rapidement synthétisés par la voie d'E. M., sans qu'une quantité correspondante de CO<sub>2</sub> soit produite.

Les résultats de nos expériences nous suggèrent que 40% environ du glucose utilisé à la synthèse des acides gras ont passé par la voie oxydative et par le cycle d'interconversion des sucres. Ces expériences ont été faites sur l'animal entier et dans des conditions physiologiques. Les résultats de BLACK<sup>6)</sup> et de MUNTZ & MURPHY<sup>24)</sup> se rapportaient au métabolisme de la grande mammaire et du foie. Les nôtres concernent tout d'abord le tissu adipeux et secondairement le foie. Ils reflètent une partie très significative du métabolisme des glucides chez l'animal entier et démontrent l'importance quantitative de l'oxydation directe du glucose chez la Souris *in vivo*.

Ce travail a été effectué grâce à une subvention de la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Berne.

#### SUMMARY

After injecting glucose-[1-<sup>14</sup>C] and glucose-[6-<sup>14</sup>C] into two series of mice and killing 12 min later, fatty acids are isolated and their radioactivity measured. The results for the liver and the carcass differ significantly and permit the assay of the proportion of glucose molecules which have passed by the oxidative pathway, found to be 35–40%.

Mice are killed 3, 12 and 60 minutes after an injection of a mixture 1:1 of glucose-[1-<sup>14</sup>C] and glucose-[2-<sup>14</sup>C], and after isolation of palmitic acid the distribution of radioactivity in the carboxylic group and in the remainder of its molecule is estimated. The results again show that after 12 or 60 min 35–40% of the glucose has passed by the oxidative pathway; after only 3 minutes, the carboxylic group contains 1/16th of the activity, which suggests that during this time only the EMBDEN-MEYERHOF process intervenes.

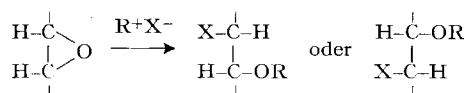
Institut de Chimie physiologique  
de l'Université de Genève

## 17. Zum Verständnis der Epoxydöffnung an Pyranose-Ringen

von G. Huber und O. Schier

(7. 11. 59)

Bei der Einwirkung von sauren, neutralen und basischen Reagenzien auf Anhydrozucker vom Äthylenoxyd-Typ kommt es nach dem Schema



zur Aufspaltung des Epoxyds. Die zahlreichen Möglichkeiten in der Wahl des RX haben dieser Reaktionsfolge in der Chemie der Kohlenhydrate eine grosse Verbreitung gebracht. Wie man aus dem angegebenen Schema sieht, können sich dabei 2 Reaktionsprodukte bilden. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass beide Pro-