

RÔLE MODESTE DU CITRATE COMME TRANSPORTEUR D'ACÉTYL-CoA CHEZ L'ANIMAL VIVANT.

S. ROUS

Institut de Biochimie médicale, Université de Genève, Suisse

Received 21 December 1970

2,4-¹⁴C-Citrate incorporated to a far greater extent than 1,5-¹⁴C-citrate into liver, carcass or adipose tissue fatty acids of living mice. This finding excludes the possibility that the acetyl units emerge from the mitochondria in the form of citrate.

1. Introduction

Quoique le siège principale de la synthèse des acides gras reste discuté [1], tous les avis sont unanimes à reconnaître qu'à l'exception de quelques rares organes, comme le cœur [2], la synthèse des acides gras s'effectue surtout hors des mitochondries. Or, l'acétyl-CoA est formé dans ces particules et ne peut diffuser comme tel. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le passage des éléments dicarbonés hors des mitochondries. Si certains attribuent au citrate un rôle de transporteur [1-13], d'autres au contraire le contestent [14, 15]. La très modeste incorporation du citrate-1,5-¹⁴C par rapport à celle de l'acétate dans les acides gras de la souris vivante laisse supposer que "l'enzyme clivant le citrate" n'est que faiblement actif *in vivo*. Il est donc difficilement concevable que le citrate représente la forme de transport principale de l'acétyl-CoA vers les lieux où s'effectue la synthèse des acides gras s'il ne peut être clivé après avoir diffusé.

Nous avons effectué ce travail afin de rechercher si une autre voie que celle faisant intervenir la clivage du citrate pouvait conduire à une meilleure utilisation de ce précurseur dans les acides gras. Si tel était le cas, ceci permettrait de conclure que le citrate n'intervient que peu ou pas dans le transport de l'acétyl-CoA. D'autres intermédiaires du cycle de Krebs, tels par exemple des éléments à 4 C, pourraient peut-être assumer cette fonction comme cela se produit dans la

gluconéogenèse [20]. Nous avons donc comparé l'incorporation du citrate-1,5-¹⁴C à celle du citrate 2,4-¹⁴C chez la souris vivante dans les acides gras du foie, du tissu adipeux épидidymaire et de la carcasse.

Une quantité beaucoup plus importante de radioactivité a été retrouvée, dans les acides gras des différents tissus ou organes étudiés, après administration de citrate 2,4-¹⁴C que de 1,5-¹⁴C, corroborant ainsi la théorie selon laquelle la majeure partie de l'acétyl-CoA ne parvient pas au lieu où s'effectue la synthèse des acides gras sous forme de citrate.

2. Partie expérimentale

Dix souris mâles (Swiss de 30-32 g), réparties en 2 groupes, ont été mise à jeûner pendant 12 heures, puis renourries toutes les 2h pendant 8 h, avec un aliment commercial pour souris (Nafag) afin de se placer dans des conditions optimales de lipogenèse, puis elles ont reçu en injection i.v. 15 µCi de citrate 1,5-¹⁴C ou 2,4-¹⁴C (0,12 mg) et ont été exécutées 15 min après. Les foies, les tissus adipeux épididymaires et les carcasses ont été aussitôt prélevés et fixés immédiatement dans de la potasse alcoolique à ébullition. La saponification a été prolongée pendant 4 h. Après élimination de l'insaponifiable, les acides gras ont été extraits à l'éther de pétrole, ont subi un "washing out" avec de l'acide citrique non marqué, et

Table 1
Radioactivité totale des acides gras
après administration de citrate-1,5-¹⁴C ou-2,4-¹⁴C à la souris vivante.

Nos exp.	Carcasses		Foies		Tissus adipeux	
	Citrate-1,5- ¹⁴ C	Citrate 2,4- ¹⁴ C	Citrate-1,5- ¹⁴ C	Citrate-2,4- ¹⁴ C	Citrate-1,5- ¹⁴ C	Citrate-2,4- ¹⁴ C
1 mâles	146.750	1.340.000	9.720	40.000	2.075	45.500
2 femelles	153.600	1.153.600	10.370	28.780		

Les résultats sont exprimés en cpm pour une dose de 10 μ Ci de chaque précurseur (0.12 mg). Les citrates-1,5-¹⁴C et -2,4-¹⁴C ont été administrés par voie i.v. et les souris exécutées 15 min après. Pour les citrates-1,5-¹⁴C et -2,4-¹⁴C, $p < 0,001$ pour les différentes fractions cellulaires de foie.

ont été lavés 2 fois à l'eau-alcool (1:1, v/v) et une fois à l'eau, puis le solvant évaporé sous N₂. La radioactivité a été mesurée avec un scintillateur Tri-Carb, 3 canaux, et le "quenching" déterminé selon Hendler [16]. L'expérience a été répétée 1 seconde fois dans les mêmes conditions, avec des souris femelles.

3. Résultats (cf. tableau)

L'incorporation du citrate-2,4-¹⁴C est environ 4 et 2,8 fois (expériences 1 et 2) supérieure à celle du citrate 1,5-¹⁴C dans les acides gras du foie. Dans la carcasse ou le tissu adipeux, les différences sont encore beaucoup plus prononcées; on trouve respectivement 9 et 7,5 fois (carcasses, exp. 1 et 2) et 22 fois plus (tissu adipeux) de radioactivité dans les acides gras de ces deux tissus après administration de citrate 2,4-¹⁴C que de 1,5-¹⁴C.

4. Discussion

L'importance de l'incorporation du citrate-2,4-¹⁴C comparativement à celle du citrate-1,5-¹⁴C dans les acides gras de la souris vivante laisse sous-entendre que le citrate n'a été soumis que pour une faible part à l'action de "l'enzyme de clivage". Si ce résultat est en accord avec les conclusions d'un précédent travail de notre laboratoire [14], il s'oppose aux résultats obtenus *in vitro*, qui révèlent une excellente incorporation du citrate-1,5-¹⁴C [6, 7, 17-20].

Il n'y a rien d'étonnant néanmoins à ce que le citrate-2,4-¹⁴C s'incorpore mieux que le citrate-1,5-¹⁴C

dans nos essais, même si l'on admet la participation de "l'enzyme clivant le citrate". En effet, l'oxaloacétate résultant de ce clivage peut rejoindre les mitochondries, y pénétrer sous forme d'aspartate, par exemple [21], s'y retransformer en oxaloacétate, puis se décarboxyler en pyruvate et en acétyl-CoA. La radioactivité de ce dernier ne pourrait alors provenir que de l'atome 4 du citrate. Ainsi pourrait s'expliquer la plus forte incorporation du citrate-2,4-¹⁴C que du 1,5-¹⁴C. Toutefois, le premier ne peut donner en aucun cas des valeurs excédant le double de celles trouvées pour le second, et cette limite ne pourrait être atteinte que si le cycle de Krebs ne servait pas à brûler l'acétyl-CoA!

C'est pourquoi nous proposons une autre théorie afin d'expliquer la meilleure incorporation du citrate-2,4-¹⁴C que du 1,5-¹⁴C: le citrate exogène parvenu dans le cytoplasme, puis dans les mitochondries, suivrait les étapes du cycle de Krebs qui conduisent à l'acétyl-CoA par les acides dicarboxyliques et le pyruvate. La radioactivité de l'acétyl-CoA résultant ne pourrait être issue que du citrate-2-¹⁴C. Puisque nous admettons que le transport de cet acétyl-CoA ne peut s'effectuer sous forme de citrate, nous devons donc envisager un autre mode de diffusion. Trois autres théories ont été proposées pour expliquer la sortie de l'acétyl-CoA des mitochondries. Elles invoquent une simple diffusion, soit de l'acétyl-CoA, soit de l'acétate libre, soit encore le transport d'acétyl-CoA sous forme d'acétyl-carnitine. Elles ont été contestées toutes les trois [22, 23]. L'une ou l'autre de ces trois théories serait cependant déjà satisfaisante pour expliquer la meilleure incorporation du citrate-2,4-¹⁴C que du 1,5-¹⁴C. Cependant, nous lui préférons une quatrième qui ferait intervenir, pour la syn-

thèse des acides gras comme c'est le cas pour la gluconéogenèse, la sortie des précurseurs sous forme de malate. Nous admettons que seule une petite fraction du citrate est clivée, la majeure partie étant transformée successivement en α -céto glutarate, succinate, fumarate et malate. Ce dernier migrerait dans le cytoplasme où il serait retransformé en oxaloacétate et éventuellement après deux décarboxylations successives, redonnerait de l'acétyl-CoA, transformation réalisable, semble-t-il [24, 25] mais très controversée. Il pourrait plus vraisemblablement subir une décarboxylation oxydative qui le transformerait directement en malonyl-CoA [26].

Remerciement

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] E.J. Christ et W.C. Hüllsman, Biochim. Biophys. Acta 60 (1962) 72.
- [3] M.S. Kornacker et J.M. Lowenstein, Biochem. J. 94 (1965) 209.
- [4] M.S. Kornacker et J.M. Lowenstein, Biochem. J. 95 (1965) 832.
- [5] M.S. Kornacker et E.G. Ball, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54 (1965) 899.
- [6] A. Spencer, L. Corman et J.M. Lowenstein, Biochem. J. 93 (1964) 378.
- [7] G.A. Leveille et R.W. Hanson, J. Lipid Res. 7 (1966) 46.
- [8] J. Bartley, S. Abraham et I.L. Chaikoff, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 770.
- [9] R. Rognstad et J. Katz, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55 (1966) 1148.
- [10] P.A. Srere, Nature 205 (1965) 766.
- [11] B.R. Martin et R.M. Denton, Biochem. J. 117 (1970) 861.
- [12] J.M. Lowenstein, Metabolic Role of Citrate, Biochem. Soc. Symposia 27 (1968) 61.
- [13] G.O. Greville, in: Citric Acid Cycle, Vol. 1, ed. J.M. Lowenstein (Dekker, New York, London, 1969).
- [14] R. Arbex, S. Rous et P. Favarger, Biochim. Biophys. Acta 218 (1970) 11.
- [15] D.W. Foster et P.A. Srere, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1926.
- [16] R.W. Handler, Anal. Biochem. 7 (1964) 110.
- [17] P.A. Srere et A. Bhaduri, Biochim. Biophys. Acta 59 (1962) 487.
- [18] J.V. Formica, Biochim. Biophys. Acta 59 (1962) 739.
- [19] A.F. Spencer et J.M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 237 (1962) 3640.
- [20] A. Badhuri et P.A. Srere, Biochim. Biophys. Acta 70 (1963) 221.
- [21] H.A. Lardy, V. Paetkau et P. Walter, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53 (1965) 1410.
- [22] J.M. Lowenstein, in: Recent Research on Carnitine, ed. G. Wolff (MIT Press, Cambridge, 1965) p. 97.
- [23] R. Bressler et K. Brendel, J. Biol. Chem. 241 (1966) 4092.
- [24] A.F. d'Adamo et D.E. Haft, J. Biol. Chem. 240 (1965) 613.
- [25] G.A. Leveille et R.W. Hanson, Can. J. Physiol. Pharmacol. 44 (1966) 275.
- [26] S. Rous, L. Aubry et F. Bonini, FEBS Letters 7 (1970) 32.