

ISOLEMENT DE LA SYNTHETASE DES ACIDES GRAS A PARTIR DE MICROSOMES DE FOIES DE RATS

S. ROUS et L. AUBRY

Département de Biochimie médicale, Université de Genève, Suisse

Received 8 February 1971

Some rat liver fatty acid synthetase has been isolated from microsomal fraction. Enzyme activity and electro micrography of purified enzyme show that the microsomal enzyme was the same as that of the supernatant. These results are discussed in relation to the role of microsomes in the de novo synthesis of fatty acid synthesis in the cell.

1. Introduction

Des travaux récents effectués *in vivo* [1, 2] ou avec du foie de rat perfusé [3] ont remis en question la participation respective des diverses structures cellulaires à la synthèse des acides gras. Ainsi cette synthèse ne prédominerait pas dans le cytoplasme, comme on l'avait longtemps supposé, mais dans les microsomes. Ceci posait donc le problème de l'existence de la synthétase des acides gras dans le réticulum endoplasmique, dont dérivent ces particules. Pour Wakil, en effet, cette enzyme est exclusivement localisée dans le cytoplasme [4]. Cependant on sait que les microsomes sont capables, même *in vitro*, d'utiliser efficacement le malonyl-CoA [5]. Il s'agit dans ce cas d'un mécanisme d'élongation analogue à celui existant dans les mitochondries [6], mais dans lequel le malonyl-CoA remplace l'acétyl-CoA [7, 10]. Nous avons donc entrepris ce travail afin de rechercher si la synthétase des acides gras pouvait être détectée dans les microsomes en quantité suffisante pour permettre sa caractérisation. Nous n'escomptions pas en obtenir de très grandes quantités puisque, d'après les résultats de Wakil [4], on peut considérer qu'elle quitte les ribosomes pour se localiser dans le cytoplasme aussitôt après avoir été synthétisée. Cette recherche nous a paru néanmoins digne d'intérêt, car l'absence de synthétase dans les microsomes signifierait que la synthèse des acides gras observée *in vivo* dans ces particules s'effectue par un mécanisme différent de celui décrit pour le cytoplasme.

La quantité de synthétase retrouvée dans les microsomes est, dans nos conditions d'isolement, environ le quart de celle du surnageant. La comparaison des images obtenues au microscope électronique de même que l'activité des deux enzymes isolées à partir du surnageant et des microsomes permettent de conclure à leur identité.

2. Partie expérimentale

Vingt rats femelles Wistar nourris *ad libitum* sont exécutés, leurs foies aussitôt prélevés et homogénéisés dans 9 vol. de saccharose 0.25 M. Une centrifugation à 2.600 tpm (1.000 g) pendant 10 min est effectuée pour éliminer les noyaux et débris cellulaires. Le surnageant correspondant est à nouveau centrifugé à 12.000 tpm (17.000 g) pour en extraire les mitochondries. Les microsomes sont obtenus par centrifugation de ce dernier surnageant à 30.000 tpm (105.000 g) pendant 45 min, lavés, puis resuspendus dans 60 ml de tampon phosphate-bicarbonate de K à pH 8. La purification de la synthétase est réalisée en parallèle à partir de cette suspension de microsomes et du surnageant, selon la méthode de Burton et al. [11]. Trois mM d'EDTA, 1 mM de β -mercapto-ethanol sont ajoutés aux deux suspensions de même que du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ solide de façon à donner une saturation de 20%. Après agitation pendant 15 min sous N_2 , le mélange est centrifugé à 12.800 tpm (18.000 g) pendant 10 min. Du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ est ajouté

au surnageant afin d'obtenir une saturation de 33%. Cette suspension est à nouveau centrifugée à 18.000 g pendant 10 min. Le précipité de protéines est dissous dans 25 ml de tampon phosphate 5 mM et mélangé avec un gel de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}$ pesant un poids égal à la moitié du poids des protéines selon Hsu et al. [12]. Cette préparation est centrifugée à 5.900 tpm (4.000 g) pendant 3 min. Le surnageant est alors déposé sur une colonne de DEAE-cellulose ($10 \times 3,5$ cm) préalablement lavée avec du tampon phosphate de K 0,05 M, pH 7. L'élution est pratiquée avec ce même tampon jusqu'à ce que la plupart des protéines absorbées soient éliminées, ce que l'on peut contrôler au spectrophotomètre en mesurant l'absorption des fractions éluées, puis la synthétase est extraite à son tour avec un tampon 0,16 M. Les fractions présentant une absorption supérieure à 0,40 (surnageant), celles supérieures à 0,15 (microsomes), sont conservées et rassemblées. Du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ leur est ajouté de façon à donner une saturation de 33%. Une centrifugation de 10 min à 12.800 tpm (18.000 g) est effectuée. Le précipité recueilli, puis dissous dans du tampon phosphate de K 0,5 M renfermant 1 mM de dithiothreitol et de l'EDTA, est appliqué à une colonne de Sephadex G 100 (22×1 cm). L'élution de l'enzyme est contrôlée au spectrophotomètre. Une partie de la fraction présentant la plus grande absorption est sédimentée par centrifugation à 39.000 tpm (175.000 g) pendant 24 h dans une ultracentrifugeuse Spinco, rotor S.W. 39. Le culot est examiné au microscope électronique après coloration négative par l'acide phosphotungstique. L'activité enzymatique est mesurée au spectrophotomètre selon la méthode de Martin et al. [13]. Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une nmole de NADPH par min/mg de protéine. Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry [14]. Cette expérience a été réalisée 3 fois. Les résultats de ces différents essais ont été concluants.

3. Résultats et discussion

3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la synthétase des acides gras isolée à partir de surnageant ou de microsomes (cf. tableau)

Les mesures de l'activité spécifique des 2 enzymes ont conduit à des résultats tout à fait comparables

Tableau 1
Activité de la synthétase des acides gras du surnageant et des microsomes de foies de rat.

	Microsomes	Surnageant
NADPH transformés (nmoles/min/mg prot.)	73,6 \pm 12	70,6 \pm 2,5

malgré la quantité minimale de protéines utilisée dans les essais réalisés avec la fraction microsomale. Nous pensons donc que la synthétase microsomale s'identifie à celle du surnageant.

3.2. Electromicrographie de la synthétase des acides gras (cf. fig. 1)

La similitude des enzymes du surnageant et des microsomes apparaît également dans les images obtenues au microscope électronique. Nous n'avons rapporté ici que le cliché correspondant à la synthétase microsomale. L'anneau équatorial de cette enzyme tel qu'il a été décrit pour la première fois par Lynen [15] apparaît dans les particules au grossissement de 406.000.

La présence d'une quantité non négligeable de synthétase dans nos préparations de microsomes est donc évidente. Cependant nous ne retrouvons dans ces particules que 23,3% de la quantité totale de synthétase obtenue avec le surnageant, qui est de 8 mg pour 232 g de foies de rats. Ceci signifie donc que si la synthétase des acides gras est réellement associée aux structures du réticulum endoplasmique in vivo,

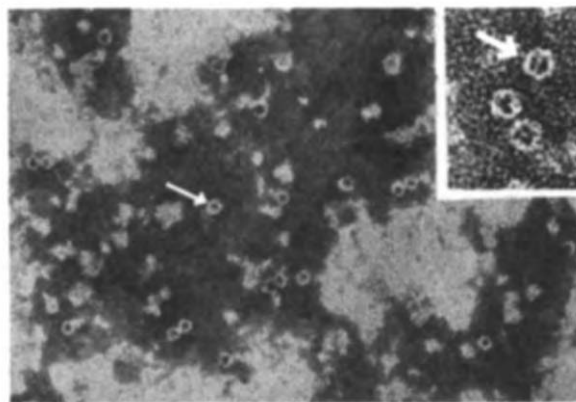


Fig. 1. Synthétase des acides gras isolés à partir de microsomes de foie de rat. Grande partie $\times 151.000$; petite partie $\times 346.000$.

la plus grande partie de cette enzyme est libérée dans le cytoplasme au cours des opérations d'isolement, notamment l'homogénéisation, et la centrifugation. La quantité de synthétase retrouvée dans les microsomes est vraisemblablement sous-estimée car il est connu que cette enzyme est d'autant plus labile qu'elle est en solution plus diluée.

La libération de l'enzyme dans le cytoplasme serait admissible en raison des dimensions importantes de la molécule qui la rendraient plus facilement extractible du réticulum endoplasmique. D'autre part, la répartition de la radioactivité retrouvée dans la chaîne des acides gras de l'animal vivant [1] s'accommode bien avec l'intervention *in vivo* d'un mécanisme de condensation analogue à celui réalisé par la synthétase. Cette dernière supposition est appuyée par un tout récent travail de Landriscina et al. [16] qui ont montré qu'en l'absence d'ATP et *in vitro*, les microsomes peuvent synthétiser une quantité importante d'acides gras par un mécanisme de condensation. Ceci nous permet de suggérer que la synthétase des acides gras pourrait intervenir dans la synthèse microsomale des acides gras chez l'animal vivant.

Remerciements

Nous remercions de Prof. Orci, de l'Institut d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Genève, qui a bien voulu réaliser les electromicrographies. Ce travail a été exécuté grâce à une subvention du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

Références

- [1] P. Favarger, J. Gerlach and S. Rous, FEBS Letters 2 (1969) 289.
- [2] P. Favarger and J. Gerlach, FEBS Letters 13 (1971) 285.
- [3] S. Rous and L. Aubry, Bull. Soc. Chim. Biol. 52 (1970) 411.
- [4] S.J. Wakil, J. Lipid Res. 2 (1961) 1.
- [5] S. Abraham, S. Lorch and E. Chaikoff, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1 (1962) 190.
- [6] E. Quagliariello, C. Landriscina and P. Coratelli, Biochim. Biophys. Acta 164 (1968) 12.
- [7] E. Lorch, S. Abraham and I. L. Chaikoff, Biochim. Biophys. Acta 70 (1963) 627.
- [8] D. J. Nugteren, Biochim. Biophys. Acta 106 (1965) 280.
- [9] R. B. Guchhait, G. R. Putz and J. W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966) 541.
- [10] E. Aeberhard and J. H. Menkes, J. Biol. Chem. 245 (1968) 3834.
- [11] D. N. Burton, A. G. Haavik and J. W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 126 (1968) 141.
- [12] R. Y. Hsu, G. Wasson and J. W. Porter, J. Biol. Chem. 240 (1965) 3732.
- [13] D. B. Martin, M. Horning and P. R. Vagelos, J. Biol. Chem. 236 (1961) 663.
- [14] C. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1961) 265.
- [15] F. Lynen, D. Oesterhelt, E. Schweitzer and K. Willecke, in: Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism, ed. F. C. Gran, Proc. 4th Meeting FEBS, Oslo, 1967 (Academic Press, New York, 1968) pp. 1-24.
- [16] C. Landriscina, G. V. Gnoni and E. Quagliariello, Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 405.