

RAPID INDUCTION OF HEPATIC ACETYL-COA CARBOXYLASE ACTIVITY AFTER ESTRADIOL BENZOATE INJECTION IN THE QUAIL

Jean François PAGEAUX, Christian LAUGIER* and Henri PACHECO

Laboratoire de Chimie Biologique et de *Physiologie-Pharmacodynamie, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon,
20 Avenue A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France

Received 3 August 1981

The time course of hepatic Acetyl-CoA carboxylase activity as well as hepatic and plasmatic fatty acids concentrations following a single injection of estradiol benzoate (EB, 0.2 mg/kg) was studied in the quail. Acetyl-CoA carboxylase activity increases rapidly and reaches its peak 3 h after the injection of EB. Similarly, hepatic and plasmatic fatty acids concentrations are significantly increased 6 h after the hormonal injection and attain their highest level 18 h later. These results suggest that estrogen affects the hepatic fatty acids biosynthesis by regulating the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA.

1. Introduction

Bien que la régulation de la biosynthèse des acides gras et du cholestérol ait été très étudiée par de nombreux laboratoires, peu de travaux ont été consacrés au contrôle oestrogénique de ces différentes voies métaboliques [1–3]. Chez la caille, l'injection répétée de benzoate d'oestradiol induit des modifications importantes du métabolisme lipidique dont la plus caractéristique est l'élévation de la concentration des acides gras sériques et hépatiques (respectivement + 1560% et + 234% après 6 jours de traitement à la dose de 0.2 mg/kg) [4,5].

L'acétyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2) étant considérée comme l'enzyme limitante de la biosynthèse hépatique des acides gras, nous avons étudié l'action d'une injection unique de benzoate d'oestradiol sur l'activité de cette enzyme.

Les résultats montrent que la concentration des acides gras hépatiques et sériques augmente significativement dès la 6^{ème} heure après le traitement, atteint un maximum à 24 h, et revient à une valeur semblable à celle mesurée avant le traitement 48 h après l'injection de l'hormone. Parallèlement l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase hépatique augmente rapidement et présente un maximum 3 h après le traitement. Ces résultats suggèrent que les oestrogènes peuvent réguler la biosynthèse des acides gras au niveau de la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA.

2. Matériel et méthodes

Les expériences sont réalisées sur des cailles femelles immatures (*Coturnix coturnix japonica*) élevées dans des conditions constantes de lumière (14 h/jour) et de température ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). A l'âge de 16 jours, les cailles reçoivent une injection intramusculaire de benzoate d'oestradiol (0.2 mg/kg) en solution huileuse sous de 0.1 ml. Les témoins ne reçoivent que l'huile d'olive. Les animaux sont sacrifiés par décapitation à différentes heures après l'injection. Le sang est recueilli sur anticoagulant et centrifugé 10 min à 3000 t/min à 4°C . Le foie est prélevé et pesé.

Le dosage des acides gras sériques et hépatiques est réalisé par chromatographie en phase gazeuse selon une méthode déjà décrite [5].

Pour mesurer l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, le foie est rincé dans un tampon Tris-HCl, pH 7.4, à 4°C (Tris 60 mM, KCl 150 mM, EGTA 0.1 mM) puis homogénéisé dans 10 vol. (poids/vol.) du même tampon à 4°C . L'homogénat est centrifugé à 105 000 $\times g$ pendant 30 min; le surnageant est immédiatement utilisé. A un volume de surnageant sont ajoutés 9 vol. tampon A, pH 7.5, à 37°C : Tris 60 mM, MgCl_2 8 mM, glutathion réduit 3 mM, EGTA 0.1 mM, 0.5 mg BSA/ml, avec (essais) ou sans (contrôles) 5 mM citrate de potassium; le mélange est préincubé 30 min à 37°C . La réaction est initiée par l'addition de 5 vol. tampon A contenant: ATP 6 mM, acétyl-CoA 0.6 mM,

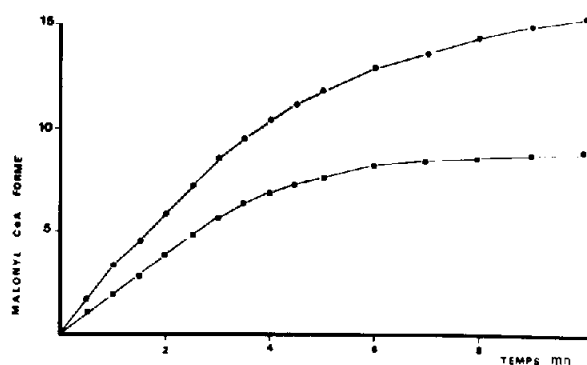


Fig.1. Activité de l'acétyl-CoA hépatique en fonction du temps d'incubation. Les conditions expérimentales correspondent à celles indiquées au chapitre 2. La quantité de malonyl-CoA formée est exprimée en cpm/mg protéin $\times 10^{-3}$: (●) Caille traitée par le benzoate d'oestradiol (0.2 mg/kg) trois heures avant la mesure (équation de régression, $15\,420 - 15\,381 e^{-0.2346 t}$; vitesse initiale, 4235 ± 278 cpm \cdot min $^{-1}$ \cdot mg protéin $^{-1}$); (■) Caille témoin (équation de régression, $9107 - 9326 e^{-0.3918 t}$; vitesse initiale, 3531 ± 254 cpm \cdot min $^{-1}$ \cdot mg protéin $^{-1}$).

KHCO_3 10 mM et 15 μCi de $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-/\text{ml}$ [6]. L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation continue; des aliquotes de 0.5 ml sont prélevées toutes les 30 s pendant 10 min, la réaction est arrêtée par addition de 100 μl d'HCl(6 N). Le milieu réactionnel est évaporé à sec sous courant d'azote à 40°C; le résidu sec est repris par 0.5 ml d'eau distillée et la solution est comptée en scintillation liquide. La radioactivité incorporée dans les témoins sans citrate (moins de 4% de la radioactivité incorporée dans les mêmes essais contenant du citrate) est déduite de la valeur obtenue pour les essais

avec citrate. Comme le montre la fig.1 et comme cela a été noté par plusieurs auteurs [7,8], l'incorporation de $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ dans le malonyl-CoA n'est approximativement linéaire que pendant une très courte période (inférieure à 3 min). Dans ces conditions il est très difficile de mesurer avec précision la vitesse initiale de la réaction, c'est pourquoi nous avons adopté la méthode suivante: les points expérimentaux sont ajustés à un modèle non-linéaire de la forme $y = A - BR^t$ ($A > 0$, $B > 0$, $0 < R < 1$), y représente la quantité de malonyl-CoA formée et t le temps de la réaction en min. L'ajustement est réalisé selon la méthode des moindres carrés d'après le processus itératif de [9].

La variation non-expliquée par le modèle est toujours inférieure à 1% de la variation totale observée pour y . La vitesse initiale de la réaction est calculée par $(dy/dt)_{t=0} = -B \log R$; l'amplitude de l'intervalle de confiance à 5% déterminé pour la vitesse initiale représente moins de 7% de la valeur de cette vitesse. L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase hépatique est exprimée en nmoles de malonyl-CoA formé par min et par mg de protéine soluble.

3. Résultats

L'injection à des cailles femelles immatures d'une dose unique de benzoate d'oestradiol (0.2 mg/kg) induit, 6 h après l'injection, une augmentation significative de la concentration des acides gras sériques (+21%) et hépatiques (+26%) (tableau 1). Cette concentration atteint dans les deux cas un maximum 24 h après l'injection (+83% au niveau sérique, +103% au

Tableau 1
Effet d'une injection de benzoate d'oestradiol (0.2 mg/kg/IM) sur la concentration sérique et hépatique des acides gras et sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase

Temps après l'injection	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Acides gras sériques (mg/ml)	3.57 ± 0.18	2.78 ^a ± 0.15	3.08 ± 0.18	4.34 ^a ± 0.27	5.87 ^a ± 0.54	6.52 ^a ± 0.55	2.99 ± 0.18
Acides gras hépatiques (mg/g de foie)	32.6 ± 2.2	34.7 ± 4.3	34.8 ± 2.4	41.1 ^a ± 4.5	57.0 ^a ± 9.2	66.1 ^a ± 6.4	39.4 ± 5.0
Acétyl-CoA carboxylase (nmol \cdot min $^{-1}$ \cdot mg protéin $^{-1}$)	41.6 ± 0.9	44.5 ± 1.2	57.1 ^a ± 1.7	49.8 ^a ± 1.2	—	44.1 ± 1.6	—

^a Valeur significativement différente ($P < 0.05$) de celle observée pour le groupe témoin (0 h)

Les valeurs représentent la moyenne de 6 animaux \pm SEM. Le poids moyen des animaux utilisés était de 106 ± 2 g

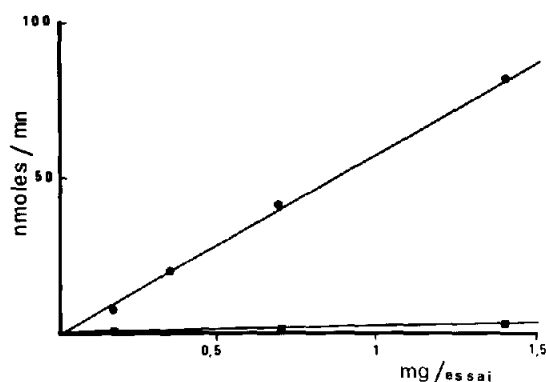


Fig.2. Incorporation de $H^{14}CO_3$ dans le malonyl-CoA en fonction de la quantité de protéines solubles introduites par essai. Les mesures ont été effectuées à partir de surnageant de foie d'animaux témoins selon les conditions précisées au chapitre 2: (●) mesures effectuées en présence de citrate (5 mM); (■) mesures effectuées sans citrate (essais contrôles).

niveau hépatique), et revient, 48 h après le traitement, à une valeur semblable à celle observée chez les animaux témoins. La concentration sérique des acides gras est significativement diminuée (-22%) une h après l'injection de benzoate d'oestradiol; ce phénomène n'est pas observé au niveau hépatique.

La mesure précise de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase impose l'utilisation immédiate du surnageant $105\,000 \times g$: l'activité enzymatique est diminuée d'environ 16% lorsque le surnageant est conservé 2 h à $4^\circ C$ avant d'effectuer les mesures. L'incorporation de la radioactivité dans le malonyl-CoA est linéaire en fonction de la quantité de protéines solubles introduites dans le milieu d'incubation (fig.2). Pour les mesures nous avons utilisé une concentration protéique de 0.7 mg/ml de milieu: dans ces conditions, la radioactivité incorporée dans les essais témoins (sans citrate) est très faible. Si la vitesse initiale de la réaction enzymatique est estimée d'après les mesures obtenues au cours des 2 premières min de la réaction (incorporation approximativement linéaire), l'activité de l'enzyme est sous estimée d'environ 40–50% par rapport à celle déterminée selon notre méthode. L'analyse statistique des résultats montre en outre que la précision sur la mesure de la vitesse initiale de la réaction est bien meilleure dans ce dernier cas.

L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase hépatique augmente significativement dès la 3^{ème} heure qui suit l'injection de benzoate d'oestradiol (+37%, tableau 1) cette augmentation est encore perceptible à la 6^{ème}

heure. L'évolution de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est parallèle à la variation de la concentration plasmatique d'oestradiol qui suit l'injection intramusculaire de l'hormone (max. 3 h, non publiés).

4. Discussion

Deux points principaux émergent de cette étude:

- (i) D'une part la sensibilité du modèle expérimental utilisé. En effet, une seule injection de benzoate d'oestradiol à faible dose est capable d'induire, en 24 h, chez la caille, un doublement de la concentration des acides gras sériques et hépatiques. Chez le mammifère, des modifications de même nature et de même amplitude ne sont observées qu'avec des doses élevées et répétées d'oestrogènes [10,11].
- (ii) D'autre part le rôle de l'oestradiol dans la régulation de la biosynthèse des acides gras. L'injection de benzoate d'oestradiol induit rapidement (3 h après le traitement) l'augmentation de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase hépatique; cette augmentation précède d'environ 3 h l'élévation de la concentration des acides gras hépatiques et sériques.

Le contrôle oestrogénique de l'activité de différentes enzymes impliquées dans la lipogénèse et la biosynthèse du cholestérol a été récemment mis en évidence chez différentes espèces. Ainsi chez le poulet le benzoate d'oestradiol induit une augmentation de la synthèse et de l'activité hépatique de l'acide gras synthétase [12]. Chez le rat [13] et chez le batracien [14], l'oestradiol induit une augmentation de l'activité hépatique de l'acétyl-CoA carboxylase et de l'HMG-CoA réductase. Cependant ces études faisaient appel à des injections répétées (4–21 jours) de doses élevées (1–8 mg/kg) d'hormone. Ces conditions expérimentales ne permettent donc pas, d'une part de différencier un effet physiologique d'un effet pharmacologique de l'hormone et d'autre part d'apprécier la rapidité des modifications concernant l'activité ou la synthèse des enzymes étudiées.

Nos résultats représentent le premier exemple de l'action directe de l'oestradiol sur la régulation d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse hépatique des acides gras. Notre modèle expérimental nous paraît en outre particulièrement indiqué, du fait de sa sensibilité, pour définir les mécanismes moléculaires par lesquels les hormones stéroïdes modifient l'activité ou la synthèse de ces enzymes.

Remerciements

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'INSERM (U 205) et du CNRS (ERA 560).

Bibliographie

- [1] Rodwell, V. W., Nordstrom, J. L. et Mitschelen, J. J. (1976) *Adv. Lipid Res.* 14, 1–74.
- [2] Gibson, D. et Ingebritsen, D. (1978) *Life Sci.* 23, 2649–2664.
- [3] Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1976) *Science* 191, 150–154.
- [4] Laugier, C., Pageaux, J. F., Duperray, B., Pacheco, H. et Brard, E. (1979) *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 57, 396–403.
- [5] Pageaux, J. F., Laugier, C., Duperray, B., Pacheco, H. et Brard, E. (1980) *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 115–121.
- [6] Geelen, M. J. H., Beyen, A. C., Christiansen, R. Z., Lepreau Jose, N. J. et Gibson, D. M. (1978) *FEBS Lett.* 95, 326–327.
- [7] Allred, J. B. et Roehrig, K. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4826–4829.
- [8] Witters, L. A., Moriarity, D. et Martin, D. B. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6644–6649.
- [9] Marquardt, D. W. (1963) *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–441.
- [10] Fewster, M. E., Pirrie, R. E. et Turner, D. A. (1967) *Endocrinology* 80, 263–271.
- [11] Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, H., Miyata, K. et Miyake, T. (1973) *Endocrinol. Jap.* 20, 129–134.
- [12] Aprahamian, S., Arslanian, M. J. et Stoops, J. K. (1979) *Lipids* 14, 1015–1020.
- [13] Abraham, S., Hillyard, L. A., Nannestad-Hansen, F. et Yhuan Lin, C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620, 167–171.
- [14] Philipp, B. W. et Shapiro, D. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2922–2927.