Les diagrammes de solubilité communiqués permettent de trouver toutes les valeurs numériques (composition des solutions de roulement, température de cristallisation, quantités d'eau à introduire et à évaporer) nécessaires à l'établissement d'un procédé en cycle pour la préparation de KH_2PO_4 par «double décomposition» selon $KCl + NaH_2PO_4 = KH_2PO_4 + NaCl$.

SUMMARY

The solubility isotherms of the quarternary system Na^+–K^+–Cl^-–$H_2PO_4^-$–H_2O are given for 0°, 25° and 75°. Additional data have been used for the establishment of the polytherms, between 0° and 100°, of the two «3 salt lines» (saturation with $NaCl + KCl + KH_2PO_4$, and $NaCl + KCl$ + a sodium dihydrogenophosphate) and of two «2 salt surfaces» (saturation with $NaCl + KCl$, and $NaCl + KH_2PO_4$). The parameters of the two invariant points of the system have been established by interpolation. The salts NaCl and KH_2PO_4 form the «stable salt pair» at all temperatures between 0° and 100°.

Institut de chimie minérale
et analytique de l'Université, Lausanne

---

290. Recherches sur la synthèse des acides gras XIII. Influence de l'acétazolamide seul ou associé à l'insuline sur la synthèse *in vivo* des acides gras chez la souris

par **S. Rous** et **P. Favarger**

Dédié au Professeur TH. POSTERNAK à l'occasion de son 60e anniversaire

(13 IX 63)

Dans le cadre de nos essais sur la biosynthèse des acides gras, nous avons voulu chercher chez l'animal vivant une confirmation de l'existence du système non mitochondrial, système qui fait intervenir la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA sous l'influence de la biotine. Parallèlement à ce système, il est en effet classique d'admettre la présence d'un système mitochondrial responsable du mécanisme d'élongation par addition d'une molécule d'acétyl-CoA à un acide gras à nombre déjà élevé d'atomes de C[1]). Seul le mécanisme de condensation (sous la dépendance du système non mitochondrial) utilise le CO_2 pour former le malonyl-CoA indispensable à son fonctionnement. L'emploi d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, en l'occurrence l'acétazolamide, qui a entre autres effets celui de diminuer les réserves en CO_2 disponible de l'organisme, semblait donc tout indiqué pour bloquer préférentiellement ce mécanisme.

D'autre part, quelques résultats récents faisaient état d'un certain pouvoir hyperglycémiant des salidiurétiques[2]). On est donc en droit de se demander s'il existe une relation de cause à effet entre les modifications constatées dans la synthèse des acides

---

[1]) S. J. WAKIL, J. Lip. Research *2*, 1 (1961).

[2]) P. KISSEL, G. DEBRY & J. LECLERC, Thérapie *17*, 1103 (1962).

gras et la glycémie, et lequel de ces deux facteurs déterminait l'autre. Dans le cas où une inhibition de la synthèse se manifesterait, il semblait intéressant d'étudier également le comportement de la glycémie et de la synthèse des acides gras, si de l'insuline était donnée en association à l'acétazolamide.

Partie expérimentale. – Après un régime sans graisse d'une dizaine de jours, 150 souris environ de 18 à 22 g (au cours de plusieurs expériences successives) sont mises à jeuner la veille au soir de l'expérience. Le lendemain matin, elles sont réalimentées au moyen du même régime, à volonté, pendant une demi-heure. On interrompt, puis reprend l'alimentation (1 g) trois quarts d'heure avant l'introduction de la substance marquée. Celle-ci est administrée dans une veine caudale et les animaux sont tués 30 s après l'injection de l'acétate ou 12 min après celle du glucose. L'insuline est administrée par voie intrapéritonéale à raison de 4 U par animal, 60 min avant le sacrifice. L'acétazolamide est donné soit *per os* (125 mg par souris 3 h avant l'exécution), soit en injection intraveineuse (10 mg par souris 27 min avant l'exécution). Après ablation du foie, les carcasses sont traitées par KOH alcoolique 10%, les acides gras, extraits, et leur radioactivité est déterminée. Dans certains cas, l'analyse était poussée plus loin: après hydroxylation[3]) et séparation des différents acides saturés par chromatographie sur colonne[4]), le pourcentage de radioactivité retrouvée dans chaque acide était estimé. Les mesures de glycémie effectuées parallèlement ont été faites selon la technique de HAGEDORN et JENSEN.

Résultats. – Nous ne rapporterons ici que les résultats de trois séries d'essais d'inhibition par l'acétazolamide sur l'ensemble des essais qui étaient tous concordants: deux séries à partir de glucose, et une à partir d'acétate, des renseignements identiques ayant été obtenus au cours des autres essais (cf. tableaux 1 et 3).

Tableau 1. *Action de l'acétazolamide sur la synthèse des acides gras totaux après injection d'acétate-[1-^{14}C]*

Les souris reçoivent 125 mg d'acétazolamide administré *per os*, 3 h avant l'injection, de 20 μC d'acétate-[1-^{14}C] (dans une veine caudale 30 s avant l'exécution)
carcasse $p < 0{,}001$; foie $p = 0{,}05$

Groupes	N° de souris	*Carcasses* Activité totale des acides gras totaux en cpm	*Foies* Activité totale des acides gras totaux en cpm
acétazolamide	1	810.000	54.000
	2	790.000	59.500
	3	990.000	47.300
	4	510.000	20.000
	5	780.000	72.100
normal	6	3.000.000	196.000
	7	4.150.000	67.000
	8	2.020.000	73.100
	9	2.520.000	127.000

I. *Acétate.* – a) *Carcasses:* tout d'abord on assiste à une baisse spectaculaire de la synthèse globale des acides gras (des valeurs n'atteignant que 10% de la synthèse normale ont pu même être observées chez les animaux traités). D'autre part, le pourcentage de radioactivité retrouvé dans l'acide palmitique par rapport aux acides gras totaux est plus grand chez les souris non traitées que chez celles qui ont reçu de l'acé-

[3]) G. DUPUIS & P. FAVARGER, Helv. physiol. pharmacol. Acta, à l'impression.
[4]) G. A. HOWARD & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. *46*, 532 (1950).

Tableau 2. *Action de l'acétazolamide sur la synthèse de l'acide palmitique*

Les valeurs sont exprimées en centièmes de l'activité des acides gras totaux retrouvée dans l'acide palmitique.

1. Acétazolamide administrée *per os*: 125 mg 3 h avant l'exécution. Souris soumises préalablement à un régime sans graisse.
2. Acétazolamide administrée par voie i. v. 10 mg/souris 27 min avant l'exécution, soit 12 min avant l'introduction du glucose. Souris soumises préalablement à un régime normal.

Groupes	N° de souris	1. après injection d'acétate-[1-^{14}C]	N° de souris	2. après injection de glucose-[U-^{14}C]
acétazolamide	1	52,8%	1	26 %
	3	57 %	2	29,6%
	5	34,4%	3	26,5%
			4	42 %
normal	6	62 %	1	76 %
	7	64,7%	2	75,2%
	8	62,4%	3	70 %

Tableau 3. *Action de l'acétazolamide sur la synthèse des acides gras totaux et sur la glycémie après injection de glucose-[U-^{14}C]*

Les souris reçoivent par voie intraveineuse 10 mg d'acétazolamide 27 min avant l'exécution et 8 μC de glucose-[^{14}C] 15 min plus tard

Groupes	Nombre de souris	Moyennes des activités totales retrouvées dans les ac. gras tot. (en cpm)		Glycémie	
acétazolamide	5	49.225	$0{,}001 < p < 0{,}01$	303	$0{,}001 < p < 0{,}01$
normal	5	226.375		209.25	

tazolamide (tableau 2). Ceci est donc en présomption d'une inhibition préférentielle de la synthèse de cet acide, synthèse que l'on sait être sous la dépendance du système non mitochondrial. Les différences observées entre les souris normales des 2 expériences tiennent vraisemblablement aux différences de régime. On sait en effet que plus un animal possède un taux élevé d'acide palmitique dans ses réserves, plus il en synthétise[5]).

b) *Foies:* Dans le foie, une inhibition nette de la lipogenèse a également été enregistrée. Cependant on constate que le rapport de la radioactivité des acides gras totaux de la carcasse à celle des acides gras totaux du foie passe en moyenne de 3,3 pour les animaux non traités à 2 pour ceux qui ont reçu de l'acétazolamide. La baisse de synthèse, quoique nette au niveau du foie, est donc moins marquée qu'au niveau de la carcasse.

II. *Glucose.* Les résultats obtenus avec l'acétazolamide sont en plein accord avec les précédents et paraissent encore plus nets. Cependant ici la dose d'acétazolamide avait été administrée par voie i. v. et était donc plus efficace.

Le dosage simultané du glucose sanguin a révélé une hyperglycémie chez les animaux traités à l'acétazolamide.

[5]) S. Rous & P. Favarger, Helv. physiol. pharmacol. Acta *21*, 125 (1963).

Tableau 4. *Suppression par l'insuline de l'action de l'acétazolamide sur le métabolisme gluco-lipidique*

Les souris des groupes I à III reçoivent en injection intrapéritonéale 4 U d'insuline Novo 1 h avant l'exécution, et/ou 10 mg d'acétazolamide en injection intraveineuse 27 min avant l'exécution, le glucose-[U-^{14}C] (12 μC) étant injecté 15 min après l'acétazolamide

Groupes	Activité totale retrouvée dans les acides gras totaux en cpm	Glycémie
I. Insuline + acétazolamide	388.200	77
II. insuline	498.200	86
III. acétazolamide	30.690	288
IV. normal	431.200	197

Activité totale retrouvée dans les acides gras totaux en cpm :

- I – II : $0{,}30 < p < 0{,}40$
- I – III : $0{,}001 < p < 0{,}01$
- I – IV : $p > 0{,}90$
- II – III : $p < 0{,}001$
- II – IV : $p = 0{,}70$
- III – IV : $0{,}01 < p < 0{,}02$

Glycémie :

- I – II : $0{,}40 < p < 0{,}50$
- I – III : $p < 0{,}001$
- I – IV : $0{,}01 < p < 0{,}02$
- II – III : $p < 0{,}001$
- II – IV : $0{,}01 < p < 0{,}02$
- III – IV : $p < 0{,}01$

Pour vérifier l'existence d'une relation éventuelle entre cette hyperglycémie et l'inhibition de la synthèse, nous avons entrepris une série d'expériences à partir de souris ayant reçu de l'acétazolamide en association ou non à l'insuline (v. tableau 4).

Un même blocage de la lipogenèse est observé chez les souris traitées à l'acétazolamide par rapport aux normales. Dans cette série de souris, l'insuline seule n'influence pas significativement la synthèse des acides gras à partir de glucose. Mais, fait assez surprenant, l'association d'insuline à l'acétazolamide lève l'inhibition exercée par l'acétazolamide, et à un retour à la normale de la lipogenèse et de la glycémie s'associe un retour à la normale du taux de synthèse des acides gras.

Discussion. – Devant la diversité des facteurs pouvant intervenir dans la régulation de la lipogenèse et de la glycémie, des difficultés s'élèvent pour l'interprétation de tels résultats.

Dans une série d'essais, nous avons administré du $ClNH_4$ à la place de l'acétazolamide, ce qui nous a permis d'éliminer la contribution de l'acidose. Les pH sanguins obtenus étaient semblables dans les deux cas (moyenne 6,96), mais aucune baisse de la synthèse des acides gras n'a été observée après administration de $ClNH_4$.

Une confirmation de ce que l'action inhibitrice de l'acétazolamide portait avant tout sur la synthèse de l'acide palmitique (autrement dit sur le mécanisme de condensation), nous a été donnée par l'examen de la radioactivité retrouvée dans le carboxyle de ce même acide. En effet, sous l'influence de l'acétazolamide une quantité appréciable de cet acide, contrairement à la normale, est synthétisée par le mécanisme d'élongation comme en témoigne la plus grande radioactivité retrouvée dans son carboxyle (moyenne de 29,8% pour les souris traitées à l'acétazolamide, contre 15,2% chez les témoins).

Un autre fait plaide en faveur de cette action préférentielle de l'acétazolamide sur le mécanisme de condensation: l'accroissement des activités spécifiques des acides non saturés et stéarique (acides que l'on sait être en grande partie synthétisés par le système mitochondrial), les chiffres observés pour l'acide stéarique atteignant ici des valeurs supérieures à ceux de l'acide palmitique correspondant.

Cependant, en raison de l'importance considérable de la diminution de synthèse, il est difficile d'admettre que l'action de l'acétazolamide s'exerce uniquement sur ce système et l'on doit y voir un phénomène beaucoup plus général affectant l'ensemble des mécanismes intervenant dans la synthèse des acides gras, en relation peut-être avec l'hyperglycémie d'accompagnement.

Que ces anomalies se rétablissent sous l'action de l'insuline n'est pas pour simplifier le problème. L'hypothèse d'une compétition de substrat, analogue à celle invoquée pour l'iodacétamide, doit être rejetée. Car, si *in vivo* nous avons pu retrouver comme *in vitro* une inhibition de synthèse à partir de l'iodacétamide[6]) et un rétablissement de cette synthèse sous l'action de l'insuline, l'analogie d'action entre ces deux substances semble s'arrêter là, ne serait-ce que par le fait qu'*in vivo* l'arrêt de synthèse enregistré avec l'iodacétamide n'est pas associé à une hyperglycémie.

Il ne semble pas non plus ici que l'acétazolamide exerce une action directe sur l'insuline. En effet, d'après nos essais effectués *in vitro* en vue d'estimer les quantités

---

[6]) I. A. MIRSKY & G. PERISUTTI, Biochim. biophysica Acta *3*, 490 (1962); S. ROUS & P. FAVARGER, Helv. physiol. pharmacol. Acta, à l'impression.

de glucose prélevées au milieu par du tissu adipeux inguinal en présence et en l'absence d'acétazolamide, l'hyperglycémie ne paraît pas être imputable à un trouble de la perméabilité cellulaire.

Cette constatation exclut en l'occurrence l'éventualité d'une action au moins extra-cellulaire différente pour l'insuline endogène et l'insuline exogène, les avis étant unanimes à reconnaître à l'insuline une action facilitant la pénétration intracellulaire du glucose.

Ceci élimine également la possibilité d'une action de l'acétazolamide sur le zinc de l'insuline. De même une action directe sur les phénomènes de pénétration ne peut être admise, puisque même au niveau du foie, où la pénétration des sucres s'effectue sans difficulte, une inhibition nette de la synthèse des acides gras a été observée. On peut attribuer l'affaiblissement de cette inhibition dans le foie à la présence dans cet organe de mitochondries en plus grand nombre. Leurs fonctions enzymatiques, au moins celles responsables de la synthèse des acides gras, doivent être en effet moins sensibles à l'acétazolamide, puisqu'elles n'utilisent pas le malonyl-CoA. Un autre fait mérite d'être signalé en rapport avec l'action de l'insuline au niveau du foie: contrairement à ce qui se passe pour la carcasse, l'insuline ne supprime que très partiellement l'influence inhibitrice de l'acétazolamide. Ceci souligne une fois de plus l'action surtout périphérique de cette hormone.

Conclusion. – L'acétazolamide exerce une action inhibitrice sur la synthèse des acides gras. Tout en affectant préférentiellement le mécanisme de condensation (acide palmitique), cette action doit aussi – vu son importance – porter sur les autres mécanismes. Cette inhibition qui peut être levée par administration d'insuline semble relever d'un défaut d'utilisation des sucres, témoignant vraisemblablement d'un mauvais fonctionnement du cycle tricarboxylique et non d'une action directe ou indirecte au moins extra-cellulaire sur l'insuline. Un ralentissement des combustions cellulaires (glucose) ou un accroissement de la glycogénolyse paraissent moins probables.

Ce travail a été exécuté grâce à une subvention du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, à Berne.

SUMMARY

Mice were given acetazolamid orally or intravenously. Some of them were also given simultaneously insulin intraperitoneally. The synthesis of radioactive fatty acids was measured after injection of acetate-[1-^{14}C] or glucose-[U-^{14}C]. Administration of acetazolamid inhibits significantly the synthesis of fatty acids and hyperglycemia can be observed. The synthesis of palmitic acid is preferentially inhibited. Insulin injection suppresses this inhibition. These results are discussed in connection with a more specifical action on the non mitochondrial condensation system.

Institut de Biochimie médicale
de l'Université de Genève