

ACTION DES SELS DE CALCIUM
SUR L'HYDROLYSE DES TRIGLYCÉRIDES PAR LA
PANCRÉATINE ET LE SUC PANCRÉATIQUE

par

P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

Selon ARTOM¹ ET FRAZER², la pancréatine n'hydrolyse pas les triglycérides *in vitro* jusqu'au stade glycérol + acides gras, mais elle se contente de former des glycérides partiels (di- et monoglycérides). Cette observation a été confirmée et précisée récemment dans ce Laboratoire^{3, 4}. Ayant en effet, d'une part, dosé directement les α -monoglycérides au moyen de l'acide périodique⁵ et, d'autre part, trouvé que la pancréatine donne naissance à une mol de β -monoglycéride pour deux mol d' α -glycéride nous avons pu dresser le bilan complet de la lipolyse en fonction du temps et dans diverses conditions. Ces expériences nous ont montré que l'enzyme arrache toujours les trois chaînes grasses d'un triglycéride en trois temps successifs bien distincts. Mais les produits finaux de la réaction sont différents selon que le milieu renferme ou non des sels de calcium. Brièvement résumés, les résultats obtenus ont été les suivants (1-4 h de contact entre enzyme et glycérides) :

1. Si le milieu ($pH = 7$ ou 8) contient des sels biliaires mais est *dépourvu de sels de calcium* (conditions classiques de FRAZER), la transformation partielle des triglycérides en diglycérides par arrachement d'une chaîne grasse représente le phénomène le plus important. La dégradation ultérieure des diglycérides en monoglycérides et des monoglycérides en glycérol est en effet très lente. Dans ces conditions expérimentales, la phase grasse se trouve donc principalement constituée, en fin d'hydrolyse, par des triglycérides, des diglycérides et des acides gras auxquels viennent s'adoindre des monoglycérides en faibles quantités*. La phase aqueuse, de son côté, ne renferme que des traces de glycérol.

2. Si, par contre, le milieu ($pH = 8$) contient non seulement des sels biliaires mais $\frac{1}{2}$ ion Ca^{++} (sous forme de $CaCl_2$) *par chaîne grasse libérable***, les triglycérides *puis les diglycérides* subissent une hydrolyse rapide et complète tandis que les monoglycérides continuent à opposer une grande résistance à l'action enzymatique et s'accumulent dans le milieu.

* — Ces quantités sont toutefois suffisantes pour que les monoglycérides jouent dans le mélange le rôle d'émulsifiant que leur assigne FRAZER.

** — Nous tenons à rectifier ici deux erreurs typographiques de notre publication précédente⁴. Ce n'est pas 1 ion Ca^{++} par chaîne grasse libérable qu'il faut lire, mais $\frac{1}{2}$ ion Ca^{++} (Résumé). Les chiffres suivants sont d'ailleurs en accord avec cette dernière proportion. En outre, ce ne sont pas 7.8 mg de pancréatine qui sont utilisés pendant les lipolyzes (page 566, ligne 29) mais bien 78 mg.

En d'autres termes, les produits principaux de la lipolyse *in vitro* se sont révélés, dans nos expériences avec la pancréatine, être les diglycérides en l'absence de sels de calcium et les monoglycérides en présence de ces sels.

Il nous a paru intéressant, au cours du présent travail, d'étendre ces expériences et d'en interpréter les résultats les plus importants. Nous nous sommes donc posés les questions suivantes: Les traits caractéristiques de l'hydrolyse des triglycérides par la pancréatine peuvent-ils être retrouvés avec le suc pancréatique? L'amplitude de l'action des sels de calcium sur la lipolyse varie-t-elle avec la quantité de sels en jeu? Dans l'affirmative, cette variation est-elle progressive ou se produit-elle brusquement pour des proportions déterminées de sels? Enfin et surtout, quel est le mécanisme de cette action?

Notons dans ce dernier domaine que, lorsqu'une lipolyse se déroule en présence de sels de calcium, le milieu renferme bientôt des savons de calcium. Or, on sait depuis WILLSTAETTER⁶ que ces savons agissent en "activateurs", c'est-à-dire qu'ils augmentent la quantité d'acides gras libérés par unité de temps. Peut-être alors modifient-ils aussi les proportions relatives diglycérides/monoglycérides. Il apparaît donc fondamental de savoir quel est, des ions Ca^{++} fournis directement par les sels de calcium, ou des savons auxquels ils donnent naissance, l'agent responsable du phénomène constaté.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. ACTION DES SELS DE CALCIUM SUR LA LIPOLYSE PAR LE SUC PANCRÉATIQUE

Nos expériences avec le suc pancréatique sont tout-à-fait analogues à celles déjà réalisées avec la pancréatine. Signalons donc simplement que chaque essai a été réalisé avec 1.2 g de trioléine pure de synthèse et 0.4 ml de suc pancréatique de sécrétine (chien)⁷. Après arrêt de la lipolyse et coagulation des protéines, les fractions hydro- et éthératosolubles ont été séparées; puis, le glycérol, les α -monoglycérides et les fonctions -OH ont été dosés par les techniques classiques. En outre, les quantités d'acides gras libérés ont été déterminées soit dans la fraction éthératosoluble (en l'absence de sels de Ca), soit directement dans le milieu total de la lipolyse (en présence de sels de Ca). Dans la Fig. 1, nous avons indiqué en fonction du temps les proportions *molaires* des divers constituants (rapportées à 100 mol pour les glycérides et le glycérol mais à 300 mol pour les acides).

La Fig. 1 comprend deux diagrammes: celui de gauche montre comment disparaissent les triglycérides et comment apparaissent les diglycérides, les monoglycérides, le glycérol et les acides gras quand le milieu de lipolyse est dépourvu de sels de Ca. Le diagramme de droite donne les mêmes renseignements dans le cas où le milieu renferme $\frac{1}{2}$ Ca (sous forme de CaCl_2) par chaîne grasse libérable. L'examen de ces deux diagrammes montre que, malgré quelques différences de détail, la lipolyse provoquée par le suc pancréatique possède les mêmes caractères fondamentaux que celle provoquée par la pancréatine:

1. *En l'absence de sels de Ca*, le suc pancréatique semble passer des diglycérides aux monoglycérides et des monoglycérides au glycérol, un peu plus vite que les pancréatinines précédemment utilisées^{8, 9}. Mais, quoi qu'il en soit, l'un et l'autre de ces agents trans-

⁶ Nous remercions vivement ici M. MORIN, Professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine de Marseille, dans le Laboratoire duquel les prélèvements de suc pancréatique ont été effectués.

Bibliographie p. 568.

forment bien la trioléine en un mélange où prédominent *pondéralement* la trioléine et la dioléine (voir notre précédente publication⁴, p. 568 pour ce qui concerne les pancréatines et le Tableau I du présent travail pour ce qui concerne le suc pancréatique).

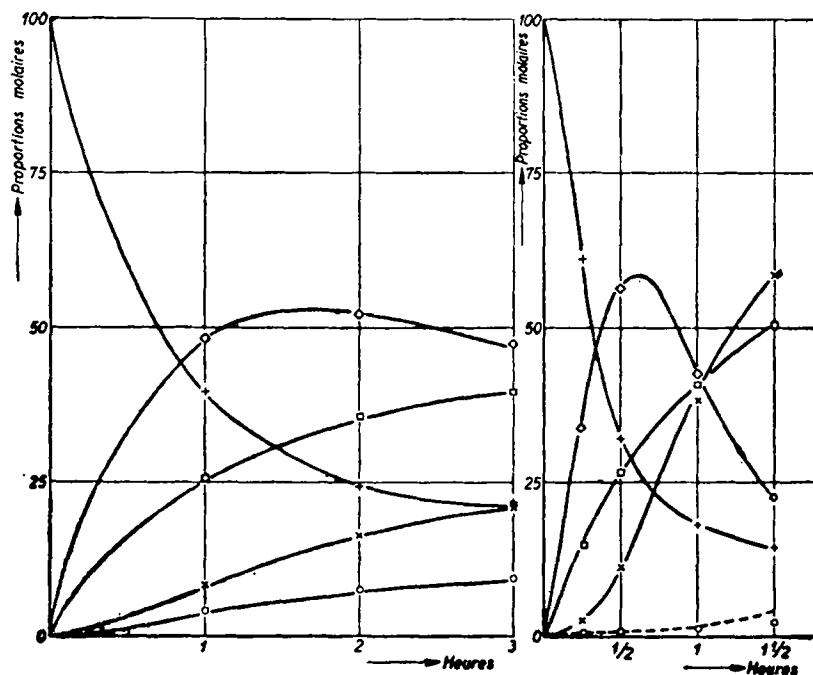


Fig. 1. Hydrolyse des triglycérides par le suc pancréatique

En l'absence de sels de Ca

(Tampon phosphate à pH = 7)

□ Acides gras
○ Glycérol

En présence de $\frac{1}{2}$ ion Ca^{++} par chaîne grasse libérable

(Tampon $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ à pH = 8)

× Monoglycérides
◊ Diglycérides
+ Triglycérides

TABLEAU I

PROPORTIONS *pondérales* (%) DES DIVERS CONSTITUANTS DE LA PHASE GLYCÉRIDIQUE PENDANT L'HYDROLYSE DE LA TRIOLÉINE PAR LE SUC PANCRÉATIQUE

— Pas de sels de Ca + $\frac{1}{2}$ Ca par chaîne grasse libérable

Durée de la lipolyse (h)	Trioléine		Dioléine		Monooléine	
	—	+	—	+	—	+
$\frac{1}{4}$	—	70.4	—	27.4	—	2.2
$\frac{1}{2}$	—	42.3	—	51.7	—	6.0
1	51.7	28.4	44.1	47.2	4.2	24.4
$1\frac{1}{2}$	—	26.7	—	29.7	—	43.6
2	36.0	—	54.5	—	9.5	—
3	34.1	—	52.7	—	13.2	—

2. En présence de $\frac{1}{2}$ Ca par chaîne grasse libérable, on assiste, comme avec la pancréatine, à une accélération considérable de l'hydrolyse des diglycérides et à une accumulation des monoglycérides dans le milieu (Fig. 1 et Tableau I).

II. INFLUENCE EXERCÉE SUR LA LIPOLYSE PAR DES QUANTITÉS VARIABLES DE SELS DE CALCIUM

Les expériences précédentes et celles décrites dans notre dernière publication⁴ ont été réalisées, rappelons-le, soit en l'absence de sels de Ca, soit en présence de quantités juste suffisantes pour que *tous* les acides gras susceptibles d'apparaître pendant la lipolyse puissent trouver à se saturer*. Elles ont démontré sans ambiguïté que ces sels provoquent une augmentation considérable des monoglycérides formés aux dépens des diglycérides et aussi, par conséquent, une augmentation des acides gras libérés.

Il nous a paru intéressant d'étudier, en dehors de ces cas extrêmes, une série de cas intermédiaires afin de déterminer comment varient les proportions des deux constituants

précédents en fonction des quantités de sels de Ca en jeu. La Fig. 2 donne les résultats de cette étude.

Les courbes de la Fig. 2 relatives aux monoglycérides et aux acides gras s'élèvent tout d'abord rapidement dès que l'on met des sels de calcium dans le milieu. Puis, à partir d'une quantité un peu supérieure au quart de celle ordinairement utilisée, ces courbes s'infléchissent légèrement vers le bas et se redressent ensuite. Nos connaissances concernant la nature et les propriétés du système lipolytique du pancréas sont encore bien trop limitées pour que la signification réelle de ces points d'inflexion puisse être utilement discutée. Retenons donc simplement, pour l'instant, que, plus on ajoute de sels de calcium, plus la lipolyse tend à former de monoglycérides. Le passage de la lipolyse "génératrice de diglycérides" à la lipolyse "génératrice de monoglycérides" s'effectue ainsi d'une manière progressive sinon parfaitement régulière.

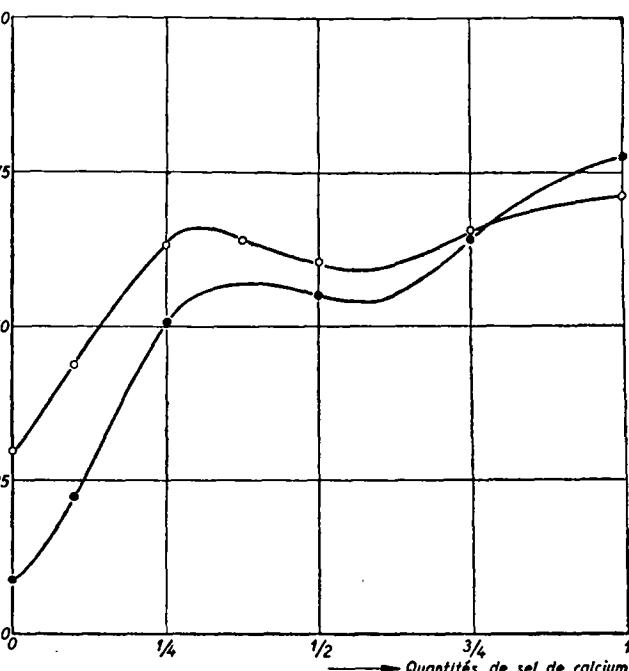


Fig. 2. Variation des quantités de monoglycérides formés et d'acides gras libérés en fonction de la quantité de sels de Ca. L'abscisse 1 correspond à $\frac{1}{2}$ Ca par chaîne grasse libérable.
Durée de la lipolyse: 2 h $\frac{1}{2}$ — Tampon $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ à $\text{pH} = 8$
— Pancréatine "BDH" — Substrat: Trioléine
 o Nb de mol d'acide oléique libéré (pour 300 mol d'acide oléique libérable)
 ● Nb de mol de monoooléine formée (pour 100 mol de trioléine initiale)

"Comme la lipolyse n'est en réalité jamais complète, nos milieux ont toujours renfermé un excès de sels de calcium.

III. INFLUENCE COMPARÉE DES IONS CALCIUM ET DES SAVONS DE CALCIUM
SUR LA LIPOLYSE

Nous avons déjà remarqué dans l'introduction qu'il est intéressant de savoir si l'hydrolyse des diglycérides est provoquée par les ions Ca^{++} eux-mêmes ou par les savons auxquels ils donnent naissance. Deux séries d'expériences ont donc été réalisées, l'une, en présence de $\frac{1}{8}$ ion Ca^{++} (sous forme de CaCl_2) par chaîne grasse et l'autre, en présence d'une quantité équivalente d'oléate de calcium. Notons ici que, dans les expériences de la première série, l'oléate de calcium se forme progressivement à partir de l'acide oléique libre de la phase grasse et les ions Ca^{++} de la phase aqueuse. Il ne serait donc certainement pas tout-à-fait correct de préparer au préalable cet oléate et d'en ajouter simplement une quantité donnée aux expériences de la deuxième série. Après plusieurs essais d'orientation, nous avons réalisé ces dernières expériences de la manière suivante: chaque tube de la deuxième série reçoit tout d'abord 1.2 g d'un mélange gras contenant, d'une part, de la trioléine et de l'acide oléique en proportions convenables ainsi que, d'autre part, le tampon $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($\text{pH} = 8$), les sels biliaires et la pancréatine. Puis, immédiatement après, on ajoute en l'espace de 5 min., sous bonne agitation et par 0.2 ml à la fois, une solution renfermant juste assez de CaCl_2 pour transformer tout l'acide oléique présent en oléate et assez d'ammoniaque pour neutraliser l'acide chlorhydrique prenant naissance au cours de cette transformation. L'oléate de calcium se forme bien ainsi, en présence de l'enzyme, par contact entre les deux phases et sans que le pH varie sensiblement.

Après un séjour d'une durée déterminée dans un thermostat à 37°, la lipolyse a été arrêtée et les acides ainsi que les monoglycérides ont été dosés selon les techniques habituelles. La Fig. 3 permet de suivre, d'une façon comparative, le déroulement de ces diverses lipyses (courbes en traits pleins) ainsi que celui d'une lipolyse sans calcium (courbes en pointillé).

L'ensemble des courbes de la Fig. 3 montre clairement que les ions Ca^{++} représentent pour la lipolyse un agent d'accélération beaucoup plus efficace que l'oléate de calcium. Ce dernier exerce, on le voit, une influence assez faible qui est due vraisemblablement à son pouvoir émulsifiant. Notons ici que les savons alcalino-terreux tendent à former des émulsions du type "eau dans huile" tandis que le système émulsifiant ordinaire des lipyses *in vitro* (sels biliaires, monoglycérides, savons alcalins) donne des émulsions du type "huile dans eau". Nous avons en fait souvent constaté un retournement subit du sens

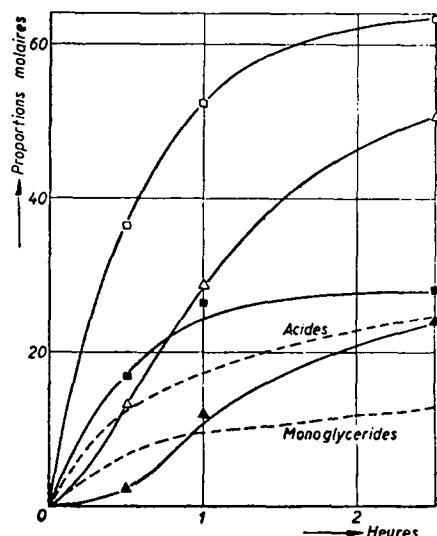


Fig. 3. Lipolyse de la trioléine en présence d'ion Ca^{++} ou d'oléate de calcium

Temp. = 37°. $\text{pH} = 8.0$ Pancréatine "BDH". Chaque milieu renferme au départ $\frac{1}{8}$ de Ca par chaîne grasse libérable.

- Acides gras en présence d'ions Ca^{++}
- Acides gras en présence d'oléate de Ca
- △—△ Monoglycérides en présence d'ions Ca^{++}
- ▲—▲ Monoglycérides en présence d'oléate de Ca
- - - Courbes des acides et des monoglycérides en l'absence de calcium

de l'émulsion quand le milieu de lipolyse renferme des ions Ca^{++} ou des savons de calcium. Quoi qu'il en soit, nos essais montrent que ces phénomènes d'émulsification ne modifient pas de façon sensible les caractères fondamentaux de la lipolyse *in vitro*.

L'action des ions Ca^{++} est par contre considérable et il convient maintenant de chercher à en préciser le mécanisme. Les faits expérimentaux qu'il s'agit d'interpréter sont, rappelons-le, les suivants: En l'absence d'ions Ca^{++} , la lipolyse s'arrête principalement au stade diglycéride. En présence de ces ions elle franchit aisément ce stade et forme des monoglycérides stables. Deux hypothèses fondamentales, entre lesquelles malheureusement nos expériences ne nous permettent pas encore de choisir, peuvent alors être émises: ou bien les ions calcium activent le système enzymatique ou bien ils activent le substrat gras.

L'activation du système enzymatique peut évidemment se concevoir de deux manières car nous ignorons encore si ce qu'il est convenu d'appeler la "lipase pancréatique" contient un ou plusieurs enzymes*. Dans le premier cas, il est possible que les ions Ca^{++} augmentent l'affinité de l'enzyme unique pour les diglycérides (mais non pour les monoglycérides). Dans le deuxième cas, on pourrait imaginer que, en l'absence d'ions Ca^{++} , seule la "triglycéridase" est vraiment active *in vitro* et que les ions activent la "diglycéridase" (mais non la "monoglycéridase").

L'hypothèse de *l'activation du substrat gras*, de son côté, possède le mérite de ne faire appel qu'à des notions bien connues et d'être en parfait accord avec les faits observés. Elle a déjà été brièvement formulée dans nos publications précédentes^{3, 4}, mais il ne semble pas inutile de la développer une fois encore en la précisant. Quand on étudie un processus de lipolyse pancréatique, il ne faut jamais oublier que le système enzymatique est soluble dans l'eau tandis que le substrat y est insoluble. Le processus doit donc se dérouler à une interface. Au début de la lipolyse, la masse graisseuse entière est constituée de triglycérides et l'enzyme peut aisément trouver à l'interface ces triglycérides et les hydrolyser. Mais cette hydrolyse commençante fait apparaître dans la phase grasse des molécules polaires (acides gras, di- puis monoglycérides) qui vont tendre, non pas à se répartir uniformément dans la masse, mais à rester à l'interface au contact de l'eau et y acquérir une orientation plus ou moins précise. Cette tendance est d'ailleurs probablement beaucoup moins marquée pour les diglycérides** que pour les monoglycérides et les acides gras***.

Il semble alors que:

i. Si la phase aqueuse ne contient pas d'ions Ca^{++} , l'interface va être progressivement envahie par une couche mixte contenant des acides gras, des monoglycérides et peut-être aussi des diglycérides. Dans cette couche, d'une part, les molécules diglycéridiques et surtout monoglycéridiques peuvent être stabilisées *par leur orientation* qui dirige les fonctions OH vers l'eau, c'est-à-dire vers l'enzyme, et qui éloigne au contraire de cet enzyme les liaisons ester en les dissimulant dans la phase grasse. Gagnant peu à peu en cohésion, d'autre part, cette couche stable va probablement s'opposer de façon de plus en plus efficace à l'attaque de la phase grasse par l'enzyme. Ainsi se trouverait

* Cette question ne paraissait pas fort importante tant que l'on admettait une hydrolyse directe des triglycérides en glycérol. Elle se pose maintenant avec insistance depuis que l'on sait que cette hydrolyse s'effectue en trois paliers successifs clairement différenciés.

** On sait en effet que les diglycérides abaissent la tension interfaciale huile/eau environ 100 fois moins que les monoglycérides⁷.

*** Qui sont partiellement ionisés au pH où nous travaillons.

expliqué pourquoi la lipolyse s'arrête bien avant d'avoir atteint son terme et pourquoi la phase graisseuse à ce moment contient des triglycérides et des diglycérides.

2. Si la phase aqueuse renferme des ions Ca^{++} , par contre, les acides gras forment des savons que l'on retrouve, partiellement tout au moins, dans l'eau sous forme insoluble. La couche interfaciale se voit donc privée de ces acides et sa cohésion peut alors n'être plus suffisante pour empêcher les triglycérides et les diglycérides d'entrer en contact avec l'enzyme. Mais les monoglycérides, toujours rigidement orientés à l'interface, resteraient stables.

D'après cette dernière hypothèse, en somme, plus les molécules glycéridiques seraient soumises à une orientation interfaciale précise et plus l'enzyme rencontrerait de difficultés, dans des conditions expérimentales données, pour les attaquer. Le rôle des ions calcium serait alors de reporter ces difficultés du stade diglycéride au stade monoglycéride.

RÉSUMÉ

Au cours du présent travail, nous avons étudié en détail l'action des sels de calcium sur l'hydrolyse *in vitro* de la trioléine par la pancréatine et le suc pancréatique ($\text{pH} = 8$). Les principaux résultats obtenus ont été les suivants :

1. La lipolyse de la trioléine par le suc pancréatique possède, malgré certaines différences de détail, les mêmes caractères fondamentaux que celle par la pancréatine. En l'absence de sels de calcium, elle forme principalement de la dioléine. En leur présence, elle va jusqu'à la monooleine. Aucune apparition importante de glycérol n'a jamais pu être notée.

2. Au fur et à mesure que les sels de calcium deviennent plus abondants, la lipolyse passe progressivement du type "générateur de diglycérides" au type "générateur de monoglycérides".

3. L'influence exercée sur la lipolyse par l'oléate de calcium est beaucoup moins importante que celle exercée par une quantité correspondante d'ions Ca^{++} . Ces derniers sont donc doués d'un pouvoir "activateur" propre.

Deux hypothèses sont en outre présentées en vue d'interpréter ces faits expérimentaux. L'une prévoit l'activation par les ions Ca^{++} du ou des enzymes présents dans la lipase pancréatique. L'autre invoque l'activation du substrat par ces mêmes ions, résultant de l'élimination des acides gras interfaciaux. Cette dernière hypothèse, d'autre part, attribue la plus ou moins grande stabilité des glycérides vis-à-vis de l'enzyme, à l'orientation plus ou moins précise qu'ils acquièrent à l'interface huile/eau.

SUMMARY

In this paper the action of calcium salts on the *in vitro* hydrolysis of triolein by pancreatin and by pancreatic juice ($\text{pH} = 8$) has been studied in detail.

The most important results obtained are as follows:

1. Lipolysis by pancreatic juice has, in spite of some slight differences, the same fundamental characteristics as lipolysis by pancreatin. In the absence of calcium salts mostly diolein is formed. In the presence of these salts lipolysis leads to monoolein. No important evidence for the presence of glycerol was found.

2. As the quantity of calcium salts increases, lipolysis gradually passes from the type "generator of diglycerides" to the type "generator of monoglycerides".

3. The influence of calcium oleate on lipolysis is much less important than that of an equivalent quantity of Ca^{++} ions. Therefore the latter must have a special "activating" power.

Further, two hypothesis interpreting these experimental facts are presented.

One of them predicts the activation by Ca^{++} ions of the enzymes contained in the pancreatic lipase.

The other one is based on the activation of the substrate by these same ions, this activation being ascribed to the elimination of interface fatty acids. On the other hand, this hypothesis attributes the stability of the glycerides to the enzyme to their more or less precise orientation at the oil/water interface.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Calciumsalze auf die *in vitro*-Hydrolyse des Trioleins durch Pancreatin und Bauchspeichel ($\text{pH} = 8$) eingehend untersucht. Dies sind die wichtigsten Ergebnisse unserer Untersuchung:

1. Die Lipolyse des Trioleins durch Bauchspeichel hat, trotz gewisser abweichender Einzelheiten dieselben Grundzüge wie die Hydrolyse durch Pancreatin. In Abwesenheit von Calciumsalzen wird hauptsächlich Diolein gebildet, in Gegenwart dieser Salze schreitet die Hydrolyse bis zum Monoolein fort. Bedeutende Mengen Glycerol werden nie gefunden.

2. Wenn die Calciumsalzmenge zunimmt, schreitet die Lipolyse allmählich vom Typus "Diglycerid-Bildner" zum Typus "Monoglycerid-Bildner" fort.

3. Die Wirkung von Calciumoleat auf die Lipolyse ist viel geringer als diejenige einer entsprechenden Menge Ca^{++} -Ionen. Diese haben also eine eigene "aktivierende" Wirkung.

Ausserdem werden zwei Hypothesen zur Auslegung dieser experimentellen Tatsachen vorgeschlagen.

Die eine sieht die Aktivierung des oder der Enzyme der Pankreaslipase vor. Die andere stützt sich auf die Aktivierung des Substrates durch diese selben Ionen, durch Eliminierung der zwischen den Grenzflächen liegenden Fettsäuren.

Diese letztere Hypothese schreibt andererseits die grössere oder geringere Stabilität der Glyceride gegenüber dem Enzym ihrer mehr oder weniger genauen Orientierung an der Grenzfläche Öl/Wasser zu.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. ARTOM ET L. REALE, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 10 (1935) 883.
- ² A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- ³ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Arch. sci. physiol.*, 2 (1948) 71.
- ⁴ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 561.
- ⁵ E. HANDSCHUMAKER ET L. LINTERIS, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 24 (1947) 143.
- ⁶ R. WILLSTAETTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ ET F. MEMMEN, *Z. physiol. Chem.*, 125 (1922) 93.
- ⁷ R. O. FEUGE, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 24 (1947) 49.

Reçu le 24 décembre 1949