

SUR UN NOUVEAU TYPE DE LIPOLYSE 'IN VITRO' UNE LIPOLYSE "GÉNÉRATRICE DE GLYCÉROL"

par

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

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

Depuis quelques années, nous avons entrepris l'étude 'in vitro' de la lipolyse des triglycérides par la lipase pancréatique. Nos expériences suggèrent clairement que l'enzyme hydrolyse les trois liaisons ester de son substrat en trois étapes successives bien distinctes, dont la difficulté va en croissant^{1,2,3}. La première hydrolyse (génératrice de diglycérides) est relativement aisée. La deuxième (génératrice de monoglycérides) est déjà plus difficile; elle ne fait des progrès rapides que si le milieu renferme des ions Ca^{++} en quantité suffisante^{2,3}. La troisième (génératrice de glycérol), enfin, s'est toujours, jusqu'ici, révélée fort lente*. En d'autres termes, la lipolyse *in vitro* donne beaucoup plus facilement naissance, semble-t-il, à des glycérides partiels qu'à du glycérol.

BALLS⁵, toutefois, utilisant il est vrai des conditions bien peu physiologiques, n'a pas trouvé de glycérides partiels pendant la lipolyse de la tristéarine. La phase grasse des milieux qu'il obtient, en effet, une fois privée de ses acides par le carbonate de Na, paraît ne jamais renfermer autre chose que de la tristéarine pure. Ces résultats sont, on le voit, diamétralement opposés aux nôtres.

Il est évidemment possible d'admettre que, travaillant dans des conditions nouvelles, l'enzyme manifeste un comportement nouveau. Mais, avant de chercher à interpréter les résultats de BALLS, nous avons voulu en vérifier l'exactitude. Cette vérification préalable, d'ailleurs, nous a paru d'autant plus nécessaire que l'auteur précédent soumet assez malencontreusement les produits de la lipolyse à une longue filtration en présence de carbonate, au cours de laquelle les glycérides partiels, éventuellement formés par l'enzyme, sont susceptibles d'être perdus ou transformés en triglycérides et en glycérol^{6**}.

Nous avons donc, tout d'abord, fait agir la lipase pancréatique dans les conditions expérimentales préconisées par BALLS et nous avons étudié la composition des milieux grâce à des techniques analytiques prudentes et dûment éprouvées. Le détail de cette étude sera donné plus loin. Disons tout de suite, cependant, que ces milieux, comme tous ceux étudiés jusqu'ici, contiennent des quantités très importantes de glycérides partiels. Les conclusions de l'auteur américain semblent donc inexactes. Néanmoins, dans ces nouvelles conditions, la lipase pancréatique forme beaucoup plus de glycérol qu'à l'ordinaire. Etant donné l'état actuel de nos connaissances concernant la résorption

* La vitesse de cette dernière hydrolyse n'est cependant pas nulle, contrairement à ce que semble croire FRAZER⁴.

** Nous montrerons plus loin avec quelle facilité la structure des milieux de lipolyse peut être modifiée sous l'influence des alcalis.

intestinale des lipides^{7,8} ce nouveau type de lipolyse "génératrice de glycérol" semble important. Nous l'avons donc étudié de façon approfondie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Techniques utilisées

Dans ce cas comme dans les autres, le problème consiste à déterminer, sans provoquer de remaniements structuraux, la teneur des milieux de lipolyse en glycérol, en acides libres et en mono-, di- et triglycérides. Pour le résoudre, nous avons jusqu'ici séparé les milieux en deux fractions: l'une, hydrosoluble, où l'on dose le glycérol et l'autre, éthérosoluble, où l'on détermine l'acidité, les α -monoglycérides et le nombre des fonctions hydroxyle. Au cours du présent travail, la présence de quantités considérables de sels biliars et, éventuellement*, de glycérol, nous a obligé à consacrer un soin spécial au fractionnement initial des milieux. Quand la phase aqueuse contient beaucoup de glycérol, en particulier, il devient nécessaire de laver la phase éthérée au moins 15 fois avec de l'eau afin d'éliminer totalement le polyalcoool. Ces lavages répétés ne provoquent heureusement aucun entraînement des monoglycérides.

En outre, nous avons résolu d'abandonner définitivement le dosage des groupes hydroxyle⁹ dans les fractions éthérosolubles. Il nous est apparu en effet, avec une netteté de plus en plus grande mais sans qu'il nous soit possible d'en discerner clairement la raison, que ce dosage conduit à des résultats souvent inexacts. Un exposé détaillé de nos observations dans ce domaine fera d'ailleurs l'objet d'une prochaine publication. Signalons simplement, pour l'instant, que plus le milieu est riche en acides gras, plus les échecs sont fréquents. Il pourrait alors sembler logique d'éliminer les acides, préalablement au dosage. Simple dans son principe, cette élimination se heurte en réalité à de grosses difficultés. Si, en effet, on traite une solution éthérée d'acides gras et de glycérides partiels par CO_2K_2 dans l'alcool à 50%, on constate qu'une fraction notable des monoglycérides est entraînée dans la phase hydroalcooolique. Ce fait, par lui-même, n'est pas très gênant car les monoglycérides peuvent être récupérés et dosés après acidification de cette dernière phase. Mais, circonstance plus grave, on s'aperçoit aisément que le traitement au carbonate a provoqué d'importants remaniements dans la structure des glycérides partiels. Le nombre des fonctions hydroxyle, en effet, a fortement baissé, sans que, d'ailleurs, la teneur en acides gras libres et en monoglycérides ait varié**.

Nous avons alors essayé de précipiter les savons sous forme solide en neutralisant par de la soude alcooolique concentrée une solution acétonique du mélange gras. Cette technique donne d'assez bons résultats avec les mélanges de glycérides partiels obtenus par voie chimique mais elle provoque souvent des remaniements dans les milieux de lipolyse. Ces remaniements se manifestent par une augmentation sensible de la teneur en α -monoglycérides dosables au periodate***.

Tous ces essais infructueux montrent clairement que les milieux de lipolyse ne doivent, *sous aucun prétexte*, être traités par un alcali pendant leur analyse.

Ayant ainsi perdu tout espoir d'améliorer, par un moyen simple, la précision du dosage des fonctions hydroxyle, nous avons cherché à analyser nos milieux par une technique totalement différente, dite du "glycérol combiné". Cette technique, proposée il y a quelques années pour les produits d'interestérification glycérides-glycérol¹⁰, consiste à doser par le bichromate le glycérol qui prend naissance pendant la saponification d'un certain poids du mélange glycéridique[§].

* Quand on s'en tient littéralement aux conditions opératoires de BALLS.

** On peut supposer qu'une transformation du type: 3 diglycérides \rightarrow 2 triglycérides + 1 glycérol soit intervenue.

*** Cette remarque présente un certain intérêt car elle montre que les milieux de lipolyse contiennent des glycérides partiels très instables; parmi ceux-ci, doivent se trouver les β -monoglycérides dont la présence a déjà été signalée¹.

§ L'analyse une fois effectuée, on procède au calcul suivant: Soit une lipolyse ayant transformé 100 mol de triglycérides en un mélange contenant, respectivement, T, D, M, G et $3A$ mol de triglycérides, de diglycérides, de monoglycérides, de glycérol et d'acides gras. Soit G' le nombre de molécules de "glycérol combiné" dans ce mélange. On a évidemment: $G = 100 - G'$. Comme A et M , d'autre part, sont susceptibles d'être déterminés directement, il reste 2 inconnues T et D que l'on calcule grâce aux deux équations suivantes:

$$\begin{aligned} T + D + M &= G' \\ \text{et } D + 2M + 3G &= 3A \end{aligned}$$

Le dosage au bichromate, d'ailleurs, est peu satisfaisant à bien des égards. Nous l'avons donc remplacé par l'excellente méthode au periodate de sodium¹¹. Voici notre mode opératoire:

Dans un ballon rodé de 50 ml, on pèse 0.5 g du mélange glycéridique (constituant la fraction éthérosoluble de nos milieux de lipolyse) et on y ajoute 7 ml de NaOH *N*/2 dans l'alcool à 96°. On chauffe à reflux pendant $\frac{3}{4}$ d'heure, on refroidit puis on transvase dans une ampoule à décantation de 100 ml en s'aidant de 15 ml d'eau. On acidifie la liqueur par 5 ml de SO_4H_2 *N* et on extrait 3 fois avec 15 ml d'éther de pétrole ($E_b < 60^\circ$). Après avoir lavé les extraits 2 fois avec 15 ml d'eau, on réunit toutes les eaux dans un ballon, on chasse l'éther sous vide à une température inférieure à 20°, et on porte à 150 ml. 5 ml de la solution précédente sont alors placés dans un tube rodé avec 5 ml d'un réactif contenant 0.5 g de métaperiodate de Na pour 20 ml d'eau et 80 ml d'acide acétique. On ajoute 2 ml d'acide acétique que l'on fait couler le long des parois du tube afin de les rincer et on laisse réagir pendant 30 min à 27°. Puis, on verse 2.5 ml d'IK à 15% et 5 ml d'hyposulfite *N*/10. On termine enfin le dosage iodométrique à la microburette en présence d'empois d'amidon.

Un essai à blanc est mené parallèlement avec 5 ml d'eau et 5 ml de réactif periodique.

La technique qui vient d'être décrite** nous a donné d'excellents résultats dans toute une série d'essais-témoin effectués sur des mélanges connus de trioléine, dioléine et monooléine.

2. Résultats expérimentaux

Etude des lipolyses selon BALLS

2.4 g de trioléine pure (obtenue par condensation de l'acide oléique pur et du glycérol) sont dissous dans un mélange contenant 1.8 g de sels biliaires (préparés à partir de bile de bœuf), 2.4 ml d'eau et 21.6 ml de glycérol. La solution est ensuite additionnée d'un mélange comprenant 120 ml de tampon $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ 0.02 *M* à $p_H = 8.0$, 1 ml de CaCl_2 à 48% et 0.36 g de pancréatine dans 4.8 ml de glycérol à 84%. Le tout est agité puis placé dans un thermostat à 40°. Des additions successives d'ammoniaque 4 *N* assurent, pendant la lipolyse, un p_H constant de 8.0.

Dans ces conditions, les milieux de lipolyse possèdent la composition indiquée dans le Tableau I. Ce même tableau rappelle, à titre de comparaison, les résultats obtenus précédemment, dans nos conditions habituelles de travail^a.

Les chiffres du Tableau I montrent que la lipase pancréatique forme des glycérides partiels, même quand on la fait agir dans les conditions tout-à-fait spéciales préconisées par BALLS. Les proportions des diglycérides et des monoglycérides atteignent en effet 14.2 et 11.2% après 15 min, 10.1 et 48.5% après 50 min. Il semble donc probable que des remaniements structuraux se soient produits pendant les expériences de BALLS, conduisant cet auteur à adopter des conclusions erronées.

Mais un autre fait est également digne de remarque: plus du tiers de la trioléine a subi une hydrolyse totale au bout de 50 min. L'arrachement de la dernière chaîne grasse du triglycéride, si difficile dans nos expériences antérieures, est donc manifestement favorisée par ces nouvelles conditions opératoires.

* Il n'est pas nécessaire de chasser l'alcool car sa présence ne trouble pas le dosage ultérieur au periodate.

** Cette technique semble d'ailleurs pouvoir être appliquée sans inconvénients à des prises d'essai beaucoup plus faibles. Une saponification en tube scellé de 50 mg de mélange gras par 1 ml de soude alcoolique peut en particulier être envisagée.

TABLEAU I
PROPORTIONS MOLAIRES (POUR 100 MOL DE TRIOLÉINE EN JEU)
DES DIVERS CONSTITUANTS DES MILIEUX DE LIPOLYSE

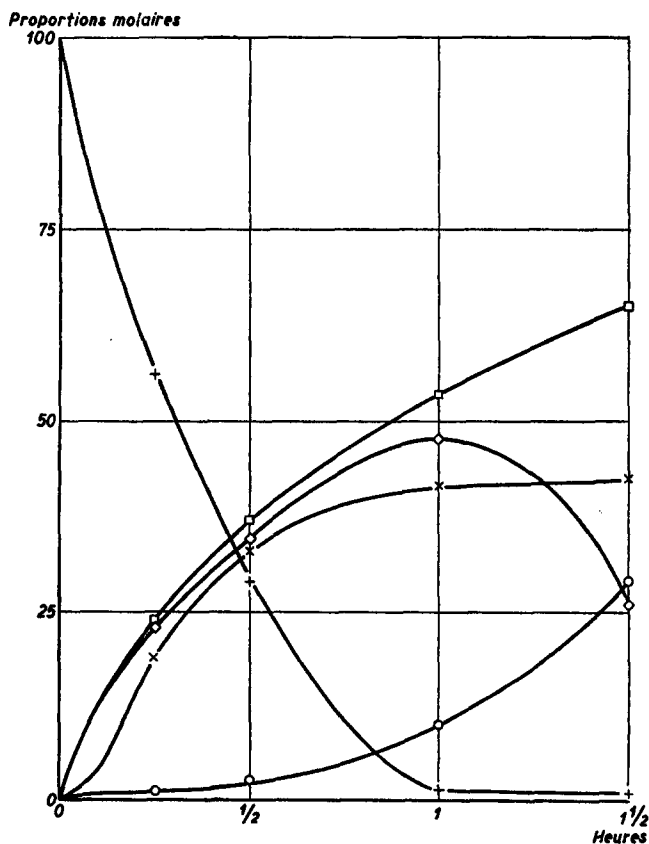
Dans chaque essai, même température, même pH, même quantité d'ions Ca^{++} ($\frac{1}{2}$ ion Ca^{++} par chaîne grasse libérable).

Conditions expérimentales pendant la lipolyse	Durée de la lipolyse (min)	Ac. Oléique libéré	Trioléine restante	Dioléine formée	Monooléine formée	Glycérol formé
Conditions de BALLS (voir le texte)	15	26.7	60.1	14.2	11.2	14.5
	50	72.0	5.1	10.1	48.5	36.3
Nos conditions habituelles en présence d'ions Ca^{++} *	120	69.4	0.4	5.7	79.1	14.8

L'étude d'une telle lipolyse "génératrice de glycérol" est évidemment intéressante. Des essais systématiques* ont donc été réalisés dont on trouvera les résultats dans la Fig. 1.

Les courbes de la Fig. 1 font bien ressortir les analogies et les différences existant entre les lipolyses précédemment étudiées et cette nouvelle lipolyse. Comme nous l'avons déjà constaté dans d'autres conditions, en effet, les triglycérides disparaissent tout d'abord rapidement en formant des diglycérides. Ces diglycérides se transforment

* Notons que, au cours de ces essais, nous n'avons pas procédé aux ajouts massifs de glycérol qui donnent aux expériences de BALLS un caractère si particulier mais dont la signification et l'utilité n'apparaissent pas nettement. Les lipolyses se sont donc déroulées dans un milieu contenant: 2.4 g de trioléine, 1.8 g de sels biliaires dans 24 ml d'eau, 120 ml de tampon, 1 ml de CaCl_2 à 48% et 0.36 g de pancréatine dans 4.8 ml d'eau.



ensuite en monoglycérides, la vitesse de ce dernier phénomène étant plus faible que celle du premier. Les proportions de diglycérides augmentent donc tant que le milieu renferme des triglycérides puis, elles diminuent dès que ceux-ci ont disparu. Quant aux monoglycérides, au lieu de résister à l'action enzymatique comme ils le faisaient jusqu'ici, au lieu par conséquent de s'accumuler en quantités considérables dans le milieu*, ils sont attaqués à leur tour et forment du glycérol.

Il convient de noter, toutefois, que cette dernière attaque est encore bien incomplète. Si l'on essaie, en effet, de poursuivre la lipolyse au-delà de 1 h 30, on constate que l'action enzymatique ralentit progressivement puis s'arrête après 2 h. Les acides libérés représentent alors 70% environ de la quantité maximum et le glycérol, 30-35%. Cet arrêt n'est d'ailleurs pas dû à une altération de l'enzyme, car, comme en témoignent les chiffres du Tableau II, une nouvelle addition d'enzyme ne provoque pas à cet instant de progrès bien sensibles dans la lipolyse.

TABLEAU II
EFFET EXERCÉ PAR L'ADDITION D'UNE NOUVELLE QUANTITÉ
D'ENZYME APRÈS ARRÊT DE LA LIPOLYSE

Essai I: Lipolyse de 1 h 40 dans les conditions précédentes.

Essai II: Identique à l'essai I pendant 1 h 40. Puis, addition de 0.36 g de pancréatine et poursuite de la lipolyse pendant 30 min.

No. de l'essai	Acide oléique libéré	Trioléine restante	Dioléine formée	Monooléine formée	Glycérol formé
I	65.0	3.5	26.2	42.1	28.2
II	69.2	1.0	25.4	38.6	35.0

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Nos diverses études ont ainsi permis de mettre successivement en évidence trois types de lipolyse:

1. Une lipolyse "génératrice de diglycérides"^{1,2,3} qui se manifeste quand la lipase agit sur les triglycérides au sein d'un milieu à $p_H = 7$ ou 8 renfermant une faible quantité de sels biliaires (12.5 mg pour 1 g de substrat; concentration de ces sels dans la phase aqueuse: 0.19%).

2. Une lipolyse "génératrice de monoglycérides"^{2,3} qui se déroule quand le milieu renferme, en plus des sels biliaires précédents, $\frac{1}{2}$ ion Ca^{++} par chaîne grasse libérable.

3. Une lipolyse "génératrice de glycérol" qui se produit au sein d'une phase aqueuse abondante contenant des ions Ca^{++} et beaucoup de sels biliaires (750 mg pour 1 g de substrat; concentration de ces sels dans la phase aqueuse: 1.2%).

Au cours de cette dernière lipolyse, d'ailleurs, les quantités de glycérol libéré ne dépassent pas 30-35%. Il est donc manifeste que, même dans ces conditions favorables, l'enzyme parvient difficilement à arracher la troisième chaîne grasse de son substrat.

Rappelons enfin que nous avons attribué³ la stabilité des monoglycérides pendant

* Rappelons que, dans nos expériences antérieures en présence d'ions Ca^{++} ^{2,3}, les proportions des monoglycérides atteignaient 80%.

la lipolyse du deuxième type, à l'orientation qu'acquièrent ces molécules au contact de la phase aqueuse. Si l'on admet cette hypothèse, on peut penser que, pendant la lipolyse du 3^{me} type, l'action solvante ou dispersante des sels biliaires soit suffisante pour arracher, tout au moins partiellement, les monoglycérides de l'interface, les entraîner dans la phase aqueuse et provoquer ainsi leur dégradation.

RÉSUMÉ

1. La composition d'un mélange contenant des acides gras, des triglycérides, des glycérides partiels et du glycérol peut être déterminée, de façon particulièrement commode, grâce au dosage des acides, des monoglycérides et du "glycérol combiné". On fait usage, pour les deux derniers dosages, de l'oxydation périodique.

2. Des conditions opératoires ont été trouvées dans lesquelles la lipase pancréatique parvient à hydrolyser complètement (jusqu'au stade glycérol) un tiers environ des molécules triglycéridiques qui lui sont offertes. Les deux autres tiers sont transformés en glycérides partiels. Ces nouvelles conditions sont caractérisées par la présence, dans le milieu de lipolyse, d'une abondante phase aqueuse très riche en sels biliaires.

SUMMARY

1. The composition of a mixture containing fatty acids, triglycerides, partial glycerides, and glycerol can be determined particularly conveniently by estimating the acids, the monoglycerides, and the "combined glycerol". For the last two determinations, use is made of periodate oxidation.

2. Experimental conditions have been found in which pancreatic lipase leads to the complete hydrolysis (to the glycerol stage) of about one third of the triglyceride molecules subjected to its action. The remaining two thirds is converted to partial glycerides. The outstanding feature of these reaction conditions is the presence, in the lipolysis medium, of a large aqueous phase rich in bile salts.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Zusammensetzung eines Gemenges, das Fettsäuren, Triglyzeride, partielle Glyzeride und Glycerin enthält, kann besonders zweckmässig durch Bestimmung der Säuren, der Monoglyzeride und des "gebundenen Glyzerins" festgestellt werden. Die beiden letztgenannten Bestimmungen werden mit Hilfe der Perjodat-Oxydation ausgeführt.

2. Arbeitsbedingungen unter denen die Pankreaslipase ein Drittel der Triglyzeride vollständig (bis zum Glyzerin-Stadium) hydrolysiert, wurden ermittelt. Die übrigen zwei Drittel werden in partielle Glyzeride verwandelt. Unter diesen neuen Bedingungen enthält das Milieu in dem sich die Lipolyse abspielt, eine bedeutende wässrige Phase, welche reich an Gallensalzen ist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Arch. sci. Physiol.*, 2 (1948) 71.
- ² P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 561.
- ³ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561.
- ⁴ A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- ⁵ A. K. BALLS, M. B. MATLAK ET I. W. TUCKER, *J. Biol. Chem.*, 122 (1937) 125.
- ⁶ R. O. FEUGE ET A. T. GROS, *J. Amer. Oil Chemists Soc.*, 26 (1949) 97.
- ⁷ F. VERZAR ET E. J. MACDOUGALL, *Absorption from the intestine*, Longmans, Green and Co, London 1936 et *Colloque International des Lipides*, Paris 1948, p. 43.
- ⁸ A. C. FRAZER, *Physiol. Rev.*, 26 (1946) 103 et *Colloque International des Lipides*, Paris 1948, p. 15.
- ⁹ E. S. WEST, C. L. HOAGLAND ET G. H. CURTIS, *J. Biol. Chem.*, 104 (1934) 627.
- ¹⁰ R. O. FEUGE ET A. E. BAILEY, *Oil and Soap*, 23 (1946) 259.
- ¹¹ Modification de la méthode de H. HANDSCHUMACHER ET L. LINTERIS, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 24 (1947) 143.

Reçu le 13 décembre 1950