

# FORMATION DE GLYCÉRIDES PARTIELS PENDANT LA LIPOLYSE DES TRIGLYCÉRIDES DANS L'INTESTIN

par

P. DESNUELLE ET M. J. CONSTANTIN

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

La formation de glycérides partiels pendant la lipolyse *in vitro* a été mise clairement en évidence dans une série de travaux récents. La lipase pancréatique (pancréatine ou suc pancréatique de sécrétine) arrache les trois chaînes grasses des triglycérides en trois étapes successives bien distinctes. Ces étapes sont franchies par l'enzyme avec une difficulté croissante. (1) A pH 7 ou 8 et en présence d'un peu de sels biliaires, seule la première chaîne est hydrolysée facilement. La lipolyse, dans sa réalisation la plus simple, engendre donc surtout des diglycérides<sup>1</sup>. (2) Les ions calcium\* permettent à l'enzyme d'hydrolyser la deuxième chaîne et la lipolyse devient alors „génératrice de monoglycérides”<sup>1, 2</sup>. Dans les deux cas, il se forme très peu de glycérol libre. (3) En présence d'une abondante phase aqueuse contenant beaucoup de calcium et de sels biliaires, la lipolyse devient „génératrice de glycérol”. Mais, même dans ces conditions, elle engendre encore au minimum deux mol de glycérides partiels pour 1 mol de triacylglycerol<sup>4</sup>.

Tous ces résultats ont été obtenus grâce à un ensemble de techniques permettant d'analyser de façon satisfaisante les hydrolysats glycéridiques partiels. Il est intéressant d'appliquer ces mêmes techniques à la phase lipidique du contenu intestinal afin de savoir si la digestion intraluminaire des glycérides obéit aux mêmes règles que la lipolyse *in vitro*<sup>\*\*</sup>.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### *I. Analyse d'un hydrolysat glycéridique partiel*

#### *1. Isolement des lipides*

Le liquide résultant de la lipolyse est versé dans 5 fois son volume d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther contenant 1% d'acide acétique\*\*\*. On fait bouillir  $\frac{1}{4}$  d'heure, on laisse

\* WILLSTAETTER *et al.*<sup>2</sup> ont signalé que de très faibles quantités de chlorure de calcium augmentent beaucoup l'activité lipolytique des extraits glycérolés de pancréas. Cet effet est attribué à la formation de savons de calcium qui amélioreraient la liaison entre l'enzyme et les glycérides. L'effet mentionné ici semble tout différent. D'une part, il se manifeste avec la pancréatine et le suc pancréatique (et non pas exclusivement avec les extraits). D'autre part, il exige la présence de fortes quantités d'ions calcium (et non pas de faibles quantités de savons de calcium). Son interprétation, basée sur l'existence d'encombrements moléculaires à l'interface glycérides-eau se trouve dans le mémoire cité sous la référence<sup>3</sup>.

\*\* La présence de glycérides partiels dans l'intestin du rat a d'ailleurs été déjà annoncée par FRAZER<sup>5</sup>. Mais la technique utilisée par cet auteur n'est pas quantitative. Elle ne permet pas non plus de différencier les diglycérides des monoglycérides.

\*\*\* Sauf si le liquide contient déjà de l'acide acétique (voir les expériences avec chlorure de calcium).

décanter, on filtre le liquide surnageant et on traite à nouveau le résidu solide par 20-40 ml du mélange alcool-éther bouillant. Après un troisième traitement, les extraits sont évaporés sous vide à une température inférieure à 50° jusqu'à ce que l'éther et l'alcool aient disparu. La phase aqueuse restante est transférée, en s'aidant de 100 ml d'éther, dans une ampoule à décanter et elle est extraite trois fois à l'éther. Les extraits éthérisés sont lavés 4 fois avec un peu d'eau puis ils sont évaporés sous vide à une température inférieure à 50°. L'élimination de l'acide acétique est facilitée à ce moment par des additions successives d'eau, d'alcool à 50°, d'alcool à 95°, d'alcool-éther et d'éther anhydre. La dernière solution éthérisée est filtrée au besoin puis elle est évaporée à poids constant. Le résidu est finalement dissout dans l'éther et la solution est portée à 25 ml.

### 2. Microdosage des $\alpha$ -monoglycérides\*

Une partie aliquote de la solution précédente (contenant au maximum 0.09 millimol d' $\alpha$ -monoglycérides) est placée dans un tube rodé de 40 ml. On évapore l'éther et on dissout le résidu dans 1.5 ml d'un mélange à 1 partie d'acide acétique et 2 parties de chloroforme. On ajoute 5 ml de réactif périodique\*\*, on agite et on rince le rodage et les parois du tube avec 2 ml d'acide acétique. On laisse réagir 30 min à 27°. On ajoute 1.5 ml d'IK à 15% puis 5 ml exactement d'hyposulfite N/10 et on termine le dosage iodométrique à la microburette en présence d'embois d'amidon. Soient  $t$  et  $x$  le nombre de ml d'hyposulfite versés, respectivement, dans l'essai à blanc et dans l'essai réel.

Le nombre de millimol d' $\alpha$ -monoglycérides dans la prise d'essai est:  $\frac{t-x}{20}$ . Pour que le dosage soit correct, il est indispensable que  $x$  soit supérieur à 0.8  $t$ .

### 3. Microdosage des acides libres et combinés et du glycérol combiné

Dans ce qui suit, nous appelons "acides combinés", les chaînes grasses restées en liaison ester pendant la lipolyse. Une saponification complète permet de libérer ces chaînes et de les doser. Le "glycérol combiné" appartient évidemment aux triglycérides et aux glycérides partiels. On le trouve dans la phase aqueuse résultant de la saponification complète du mélange lipidique.

Une nouvelle partie aliquote de la solution éthérisée est placée dans un ballon de 50 ml muni de deux rodages\*\*\*. L'éther est évaporé et le résidu est dissout dans 3 ml d'alcool absolu. Après addition de 4 gouttes de phénolphthaléine à 1% dans l'alcool, on titre l'acidité libre par addition de soude décarbonatée en solution alcoolique N/10 jusqu'à la première coloration rose persistante. La microburette contenant la soude est protégée contre toute rentrée de CO<sub>2</sub> par un tube contenant de la chaux sodée. De l'azote dépourvu de CO<sub>2</sub> barbote dans le liquide pendant tout le dosage et pendant toutes les opérations ultérieures. Un essai à blanc permet de tenir compte de l'acidité de l'alcool.

Ce titrage une fois effectué, on ajoute dans le ballon 2 ml exactement de soude décarbonatée en solution alcoolique N et on amène le volume à 9 ml avec de l'alcool absolu. On fait bouillir à reflux pendant 3/4 d'heure, on refroidit, on ajoute 5 ml exactement d'HCl alcoolique N/5 et on termine le dosage à la microburette. Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions. La différence entre cet essai et l'essai réel permet de calculer le nombre de chaînes grasses combinées dans la prise d'essai.

Le contenu du ballon est transféré dans une ampoule à décanter. On rince avec 2 ml d'HCl N aqueux puis avec assez d'eau pour que le volume total soit de 30 ml. On extrait 3 fois avec 10 ml d'éther de pétrole (50-60°). Les phases éthérisées sont réunies et lavées deux fois avec 5 ml d'eau. Les solutions aqueuses sont placées dans un ballon rodé, l'éther de pétrole est chassé sous vide à la température ordinaire et le volume est porté à 50 ml.  $x$  ml de cette dernière solution sont placés dans un tube rodé avec (5- $x$ ) ml d'eau et 5 ml de réactif périodique. Après 30 min à 27°, un titrage iodométrique identique à celui décrit ci-dessus pour les  $\alpha$ -monoglycérides, donne la quantité de glycérol contenu à l'état combiné par les glycérides de la prise d'essai.

Soit  $M$  le nombre de millimol de monoglycérides\$,  $A$  le nombre de millichaines grasses combinées,

\* Cette technique représente une adaptation à l'échelle microanalytique de l'excellente technique iodométrique de POHLE ET MEHLENBACHER (modifiée par HANDSCHUMACHER ET LINTERIS<sup>6</sup>).

\*\* 500 mg de métaperiodate de Na sont dissous dans 20 ml d'eau. On complète à 100 ml avec de l'acide acétique glacial.

\*\*\* Le premier (standard No 0) supporte une petite tubulure permettant une arrivée d'azote dépourvu de CO<sub>2</sub>. Le deuxième (standard No 1) sert à fixer un réfrigérant pendant la saponification.

<sup>6</sup> Les résultats de l'oxydation périodique qui, on le sait, correspondent aux  $\alpha$ -monoglycérides, sont multipliés par 1.5 afin de tenir compte des  $\beta$ -monoglycérides engendrés au cours de la lipolyse<sup>1</sup>.

$G$  le nombre de millimol de glycérol combiné. Soit d'autre part,  $T$  et  $D$  le nombre de millimol de triglycérides et de diglycérides. On pose:

$$\begin{aligned} T &= A + M - 2G \\ D &= 3G - 2M - A \end{aligned}$$

et la teneur de l'hydrolysat partiel en triglycérides, diglycérides, monoglycérides et acides libres se trouve ainsi déterminée. En outre, s'il s'agit d'une lipolyse *in vitro*, au cours de laquelle aucun élément n'a pu s'échapper, le glycérol libéré par l'enzyme est calculé en retranchant  $G$  du glycérol combiné initial.

Cet ensemble de microtechniques nous a donné des résultats très satisfaisants. Sa validité a été maintes fois vérifiée avec des mélanges de glycérides et d'acides gras purs. Une analyse complète peut généralement être effectuée dès que l'on dispose de 250-300 mg du mélange.

## II. Résultats experimentaux

### 1. Expériences sans chlorure de calcium

La plupart de ces expériences ont été réalisées sur des rats blancs souche Commentry préalablement triés en lots homogènes. Après un jeûne de 24 h, les animaux reçoivent par intubation gastrique 1 ml d'huile d'olive neutre et 2 ml d'eau distillée à 37° puis ils sont sacrifiés au bout de 3 h par une dose léthale d'éther. Leur intestin, qui présente généralement un aspect laiteux tout-à-fait caractéristique et dont les chylifères sont gorgés de graisse, est ligaturé 1 cm au-dessous du pylore et juste avant la jonction iléo-caecale. Le segment ainsi délimité est prélevé, fixé sur une canule et lavé\* immédiatement avec 25-50 ml d'eau à 40° sous une pression de quelques cm de mercure. Le liquide sortant est versé dans l'alcool-éther et le mélange est traité comme il est indiqué plus haut. On récupère ainsi en moyenne 150 mg de lipides intraluminaires par rat.

Deux expériences ont en outre été réalisées sur le chien. Les animaux avaient jeûné 48 h. Ils ont été sacrifiés par injection intraveineuse de chloroforme, respectivement, 3 et 5 h après avoir reçu une pâtée contenant 50 g de saindoux.

### 2. Expériences avec chlorure de calcium

Certains lots de rats ont reçu par intubation 1 ml d'huile d'olive et 2 ml d'une solution aqueuse contenant 71.2 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$ . Le Tableau I indique quelle est alors la teneur en calcium du contenu gastrique et intestinal pendant la période de digestion. Au cours de ces expériences et au cours de celles consacrées à l'analyse proprement dite des lipides, les lavages ont été faits avec de l'acide acétique *N* afin de mieux entraîner les savons de calcium éventuellement formés.

\* En frottant légèrement l'intestin entre deux doigts pendant le lavage, on entraîne une crème blanchâtre qui représente vraisemblablement les couches externes de la muqueuse. Cet entraînement n'est pas souhaitable pour deux raisons: d'une part, la structure des glycérides de la muqueuse n'est probablement pas identique à celle des glycérides intraluminaires que nous désirons étudier. D'autre part, cette crème est riche en phosphatides et en cholestérol qui, nous le verrons tout-à-l'heure, risquent de fausser les résultats. Pendant le lavage, l'intestin pend donc librement au bout de la canule.

\*\* Soit 1/4 de la quantité d'ions  $\text{Ca}^{++}$  nécessaires à la salification de tous les acides gras libérables.

TABLEAU I

DOSAGE DU CALCIUM<sup>7</sup> DANS LE TUBE DIGESTIF DES RATS

Chaque animal a reçu 1 ml d'huile d'olive et 2 ml d'une solution contenant 71.2 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Durée de l'expérience (h)	Quantité de calcium (en % de la quantité administrée) retrouvée dans	
	l'estomac	l'intestin
1	58	14
2	15	25
3	5	24

Le Tableau II donne la composition en poids\* des lipides intraluminaires du rat et du chien, après administration ou non de chlorure de calcium.

TABLEAU II

## COMPOSITION (%) EN POIDS DES LIPIDES INTRALUMINAIRES

Durée de l'expérience (h)	Acides libres	Monoglycérides	Diglycérides	Triglycéride	
<b>Intestin du rat (sans calcium)</b>					
Lot 1                    3                    15.6                    4.1                    26.3                    50.5					
Lot 2	3	24.3	6.8	32.9	31.6
Lot 3	4	23.4	4.4	13.1	59.6
<b>(avec calcium)</b>					
Lot 4	3	41.5	9.4	16.6	33.4
Lot 5	3	45.8	14.2	11.9	27.5
<b>Intestin du chien (sans calcium)</b>					
Chien 1	3	16.7	2.5	19.2	58.0
Chien 2	5	49.2	8.0	27.3	9.9

Le pourcentage de phospholipides dans les lipides des rats 1, 2, 3, 4 et 5 est, respectivement: 3.2; 0.8; 4.3; 1.6 et 2.2. Celui du cholestérol est: 1.1; 1.0; 1.5; 1.2 et 1.5.

Dans le Tableau III enfin, les résultats du Tableau II ont été recalculés sans faire intervenir les triglycérides au moment de la détermination des pourcentages. A titre de comparaison, nous avons également mentionné dans ce tableau les proportions pondérales des acides et des glycérides partiels formés pendant la lipolyse *in vitro*.

## III. Discussion des résultats

L'examen des Tableaux I, II et III suggère les commentaires suivants:

i. Avant de chercher à interpréter les chiffres du Tableau II, il convient de se demander quel degré de confiance on peut leur accorder. Les résultats concernant les

\* Il serait évidemment sans intérêt de rapporter ici, comme nous l'avons fait *in vitro*, les proportions molaires des divers constituants à 100 mol de triglycérides initiaux. La résorption provoque en effet l'élimination continue de lipides dont la composition est indéterminée.

TABLEAU III

ACIDES LIBRES ET GLYCÉRIDES PARTIELS DANS LES LIPIDES INTRALUMINAIRES  
ET PENDANT LA LIPOLYSE *in vitro*

Tous les chiffres de ce tableau (% en poids) ont été obtenus en n'incluant pas les triglycérides dans le calcul des pourcentages.

	Durée de l'expérience (h)	Acides libres	Monoglycérides	Diglycérides
<b>Expériences sans calcium</b>				
<i>In vitro</i> <sup>1</sup>	1 $3\frac{1}{4}$	37.5 38.0	6.9 7.0	55.4 54.7
<i>In vivo</i>				
Rats 1	3	33.9	8.9	57.2
Rats 2	3	38.0	10.6	51.5
Rats 3	4	57.2	10.7	32.2
Chien 1	3	43.5	6.5	50.0
Chien 2	5	58.2	9.4	32.3
<b>Expériences avec calcium</b>				
<i>In vitro</i> <sup>1,3</sup>	1	49.0	19.5	30.5
<i>In vivo</i>				
Rats 4	3	61.5	14.0	24.7
Rats 5	3	63.8	19.8	16.6

acides gras et les monoglycérides, déterminés directement par des techniques éprouvées, doivent selon toute vraisemblance être tenus pour exacts. Ceux concernant les triglycérides et les diglycérides sont obtenus (voir plus haut) par un système de deux équations faisant intervenir le glycérol et les acides combinés. Or, si les techniques analytiques permettant de mesurer ces deux grandeurs sont par elles-mêmes exactes, le calcul qui leur fait suite n'est applicable qu'à des mélanges contenant exclusivement des triglycérides et des glycérides partiels. La présence éventuelle de substances non-glycéridiques dans les lipides intestinaux peut donc provoquer ici des erreurs assez sensibles. Toutefois, le dosage colorimétrique du phosphore<sup>8</sup> et du cholestérol total<sup>9</sup>, effectué pour chaque expérience, montre que la teneur en phosphatides et en cholestérol (libre ou estérifié) des lipides intraluminaires est toujours trop faible (Tableau II) pour modifier la signification générale de nos résultats\*.

2. Il semble donc que l'intestin des rats et des chiens renferme bien des quantités importantes de glycérides partiels pendant la période de digestion des triglycérides. Les trois chaînes grasses des triglycérides sont hydrolysées *successivement* dans le tube digestif, comme elles le sont *in vitro* par la pancréatine ou le suc pancréatique. Aucun élément particulier, aucun facteur supplémentaire ne viennent altérer *in vivo* ce caractère fondamental de la lipolyse *in vitro*.

3. Rappelons d'autre part que l'addition d'une quantité substantielle d'ions calcium permet à la lipolyse *in vitro* de libérer plus d'acides et d'engendrer plus de

\* L'erreur est encore négligeable, comme le prouve un calcul simple, quand le mélange renferme 4 % en poids de dioléophosphatidylcholine et 1.5 % d'oléate de cholestérol.

monoglycérides<sup>1,3</sup>. Pour que cet effet se manifeste pleinement, il faut que les ions calcium présents puissent convertir en savons au moins le quart des chaînes grasses libérables<sup>3</sup> (soit 1/8 ion Ca<sup>++</sup> par chaîne). Nous avons donné du chlorure de calcium à deux lots de rats (Lots 4 et 5). Quand, au bout de 3 h, les animaux sont sacrifiés, leur intestin contient environ 25% du calcium (Tableau I) et 15-20% des lipides administrés. La proportion entre calcium et chaînes grasses, qui était initialement égale à 1/8, atteint donc vraisemblablement 1/6 pendant la troisième heure de la digestion. Cette proportion est bien suffisante pour que l'effet des ions calcium puisse éventuellement se manifester.

Le Tableau II nous apprend que les lipides intraluminaires des rats ayant reçu du calcium (lots 4 et 5) sont plus acides que ceux des autres lots. Ce fait n'est d'ailleurs pas très significatif car on sait que les savons de calcium sont difficilement résorbables et il n'est pas étonnant qu'on les retrouve sous forme d'acides libres dans les extraits. Mais ces mêmes extraits contiennent également plus de monoglycérides et moins de diglycérides que les autres. Il semble donc bien que les ions calcium exercent une influence analogue *in vivo* et *in vitro*.

4. La teneur de l'intestin en triglycérides dépend de certains facteurs mal contrôlables, dont le plus important paraît être la vitesse du transit gastrique. En laissant de côté ces triglycérides pendant le calcul des pourcentages, on élimine donc un élément variable gênant et on explicite mieux les effets vérifiables de la lipolyse. L'examen des chiffres ainsi obtenus (Tableau III) montre que, en présence ou en l'absence de calcium, les proportions relatives des acides et des glycérides partiels intraluminaires ne sont jamais très différentes de celles que l'on trouve *in vitro* dans les mêmes conditions. On constate simplement une certaine accumulation d'acides à la fin de la digestion.

Ce fait suggère que la résorption ne manifeste vraisemblablement pas une sélectivité bien marquée vis-à-vis des produits principaux de la lipolyse intralumininaire. Il semble, en d'autres termes, que les acides gras *et* les glycérides partiels soient résorbés simultanément et que leurs proportions relatives dans le mélange résorbé soient analogues à celles qu'engendre la lipolyse. Cette conception est d'ailleurs compatible avec la théorie de la résorption particulaire<sup>10</sup> et avec les résultats de travaux récents utilisant du glycérol et des acides marqués<sup>11,12</sup>.

## RÉSUMÉ

1. Des microtechniques analytiques sont décrites permettant de déterminer avec précision la teneur d'un hydrolysat glycéridique partiel en acides libres, triglycérides, diglycérides, monoglycérides et éventuellement glycérol libre.

2. Les lipides du contenu intestinal du rat et du chien renferment des glycérides partiels pendant la période de digestion des triglycérides. La présence d'ions calcium dans le tube digestif augmente la proportion des monoglycérides et diminue celle des diglycérides. La lipolyse intralumininaire possède donc les mêmes caractères que la lipolyse *in vitro*. L'une et l'autre sont vraisemblablement incomplète.

3. On trouve dans les lipides intraluminaires à peu près les mêmes proportions d'acides et de glycérides partiels que dans les lipides engendrés par la lipolyse *in vitro*. Les acides et les glycérides partiels semblent donc être résorbés simultanément.

## SUMMARY

1. Some analytical microtechniques are described which permit the accurate determination of the content of a partial glyceridic hydrolysate in free acids, triglycerides, diglycerides, monoglycerides, and eventually free glycerol.

*Bibliographie p. 537.*

2. The lipids of the intestinal contents of rat and dog contain some partial glycerides during the period of digestion of the triglycerides. The presence of calcium ions in the digestive track augments the proportion of the monoglycerides and diminishes that of the diglycerides. The intraluminar and *in vitro* lipolysis possess therefore the same characteristics. Both are probably incomplete.

3. Nearly the same proportions of acids and partial glycerides are found in the intraluminar lipids and in the lipids produced by lipolysis *in vitro*. The acids and partial glycerides seem then to be resorbed simultaneously.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Analytische Mikromethoden werden beschrieben, mit deren Hilfe man genau den Gehalt eines partiellen Glycerid-Hydrolysates an freien Säuren, Triglyceriden, Diglyceriden, Monoglyceriden und eventuell an freiem Glycerin bestimmen kann.

2. Die Lipoide des Darminhaltes der Ratte und des Hundes enthalten während der Verdauungsperiode der Triglyceride partielle Glyceride. Das Vorhandensein von Calciumionen im Verdauungskanal bewirkt, dass der Gehalt an Monoglyceriden zunimmt, der Gehalt an Diglyceriden aber abnimmt. Die intraluminäre Lipolyse hat also dieselben charakteristischen Züge wie die *in vitro* Lipolyse. Beide sind wahrscheinlich unvollständig.

3. In den intraluminären Lipoiden findet man ungefähr dieselben Gehalte an Säuren und partiellen Glyceriden, wie in den Lipoiden, welche durch *in vitro* Lipolyse gebildet worden waren. Die Säuren und partiellen Glyceride scheinen also gleichzeitig resorbiert zu werden.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 561.
- <sup>2</sup> R. WILLSTAETTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ ET F. MEMMEN, *Z. physiol. Chem.*, 125 (1923) 93.
- <sup>3</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561.
- <sup>4</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 451.
- <sup>5</sup> A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- <sup>6</sup> E. HANDSCHUMACHER ET L. LINTERIS, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 24 (1947) 143.
- <sup>7</sup> L. VELLUZ ET R. DESCHAZEUX, *C.R. Soc. Biol.*, 104 (1930) 976.
- <sup>8</sup> I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- <sup>9</sup> M. MACHEBOEUF ET J. L. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24 (1942) 296;  
J. L. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 26 (1944) 239.
- <sup>10</sup> A. C. FRAZER, *Physiol. Revs.*, 26 (1946) 103.
- <sup>11</sup> P. FAVARGER, R. A. COLLET ET E. CHERBULIEZ, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1641.
- <sup>12</sup> R. REISER, M. J. BRYSON, M. J. CARR ET K. A. KUIKEN, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 131.

Reçu le 25 mars 1952