

EMPLOI DE LA LIPASE PANCRÉATIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES CORPS GRAS NATURELS

P. SAVARY, J. FLANZY* ET P. DESNUELLE

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

La structure glycéridique des corps gras naturels est intéressante à connaître car elle influe de façon sensible sur le comportement chimique, physique et biologique de ces substances. Elle peut également nous éclairer sur quelques aspects importants du métabolisme des glycérides dans les tissus animaux et végétaux. Son étude précise est malheureusement difficile.

Depuis les travaux classiques de HILDITCH ET LEA¹ et de BROWN², on sait néanmoins que la nature manifeste une certaine tendance à associer des acides saturés (S) et insaturés (I) au sein d'une même molécule glycéridique. Autrement dit, les glycérides disaturés-monoinsaturés (S_2I) et diinsaturés-monosaturés (SI_2), que l'on appelle "glycérides mixtes", semblent prédominer largement. Rien n'empêche d'ailleurs d'inclure dans le groupe des glycérides mixtes, non seulement les glycérides saturés-insaturés précédents, mais aussi ceux qui contiennent au moins deux chaînes de longueur ou d'insaturation différentes (dipalmitostéarine ou dioléolinoléine par exemple). L'autre groupe ne contient plus alors que des glycérides "simples" possédant trois fois la même chaîne (trioléine ou tristéarine par exemple).

Ce fait étant acquis, les opinions divergent dès que l'on cherche à préciser le mode exact de répartition des chaînes dans les glycérides naturels. Cette répartition se fait-elle "au hasard", la nature se conformant aux lois de la probabilité pendant la synthèse de ses glycérides? Est-elle "régulière", trois chaînes identiques ou analogues n'étant associées au sein d'un même glycéride qu'au moment où ces chaînes constituent plus des 2/3 des chaînes totales? Suit-elle une autre loi encore mal connue ou n'observe-t-elle en dernière analyse aucune loi définie? Les travaux postérieurs à ceux de HILDITCH et de BROWN ne permettent pas de donner à ces questions une réponse définitive. Mais l'abondance des glycérides mixtes dans la nature est en tout cas un fait expérimental bien établi.

L'abondance de ces glycérides mixtes incite à étudier le problème de leur isomérisation de position. Dès que deux chaînes sont différentes, deux isomères sont en effet possibles: un isomère symétrique ABA et un isomère dissymétrique AAB. Trois chaînes différentes impliquent la formation de trois isomères: ABC, BAC et ACB. Les renseignements dont nous disposons au sujet de cette isomérisation sont encore très rares. Si la théorie de la distribution "au hasard" est exacte, n'importe quelle chaîne doit occuper en moyenne n'importe quelle position. Or, quelques observations expérimentales semblent suggérer que certains types d'acides occupent au contraire des positions bien déterminées. HILDITCH³ par exemple a noté que l'acide palmitique se trouve en

* Agent contractuel scientifique à l'Institut National de la Recherche Agronomique.

position-2 dans quelques glycérides isolés à l'état pur de la graisse de porc. Plus récemment, QUIMBY, WILLE ET LUTTON⁴ ont comparé les caractéristiques cristallo-graphiques, les courbes de refroidissement et les spectres de diffraction X des graisses de porc et de mouton hydrogénées d'une part, de la 1-palmitodistéarine et de la 2-palmitodistéarine d'autre part. Ils ont confirmé l'opinion de HILDITCH pour ce qui concerne la graisse de porc car certaines fractions de cette graisse manifestent une analogie frappante avec l'isomère 2-palmitique. Quelques fractions de la graisse de mouton hydrogénée se comportent par contre comme l'isomère 1-palmitique.

De telles observations sont intéressantes à plusieurs points de vue. Mais on ne peut guère espérer les généraliser et les rendre quantitatives à l'aide des techniques laborieuses et imprécises utilisées par les auteurs précédents. Nous disposons heureusement à l'heure actuelle d'une autre technique plus satisfaisante pour étudier la structure des glycérides mixtes. Cette technique est basée sur la spécificité de position de la lipase pancréatique.

Une série de récents travaux⁵⁻⁹ ont en effet montré que l'action hydrolytique de la lipase est réglée bien davantage par la position des chaînes dans les glycérides que par la nature chimique de ces chaînes. Quelle que soit leur longueur (de C_{12} à C_{18}) et leur insaturation (de 0 à 2 doubles liaisons), les chaînes en position 1 et 3 (chaînes externes) sont détachées beaucoup plus rapidement par l'enzyme que la chaîne en position 2 (chaîne interne). Les acides libérés pendant la lipolyse proviennent donc principalement des positions 1 et 3. Les chaînes des monoglycérides sont principalement celles qui occupaient la position 2 dans les triglycérides initiaux. Quand la répartition est "au hasard", les acides libres, les acides combinés* et par conséquent les acides totaux ont la même composition⁹. Inversement, toute différence de composition signifie que la répartition n'est pas au hasard. MATTSON ET BECK⁷ ont tout dernièrement envisagé quelques applications de ce principe au cas de la graisse de porc.

Au cours du présent travail, nous avons étudié grâce à la lipase, l'état d'isomérisation des glycérides mixtes de diverses graisses animales et végétales. L'essentiel de notre étude a porté sur les positions respectives occupées dans ces glycérides par les chaînes saturées et insaturées. Il nous a paru alors important de fractionner les graisses afin d'éliminer les glycérides trisaturés et triinsaturés. L'attaque relativement lente des premiers, due à leur point de fusion élevé, risque en effet d'augmenter fallacieusement l'insaturation des acides libres sans qu'aucune considération de position soit en jeu. De plus, la présence de glycérides trisaturés et triinsaturés, pour lesquels le problème des positions respectives des chaînes saturées et insaturées ne se pose pas, risque d'atténuer la netteté des résultats, en adjoignant au phénomène spécifique recherché un phénomène par essence non-spécifique. Enfin, l'état d'isomérisation des glycérides disaturés-monosaturés et celui des glycérides diinsaturés-monosaturés ne sont pas forcément réglés par les mêmes principes. Il est donc bon de séparer ces deux groupes afin de pouvoir les étudier individuellement.

TECHNIQUES UTILISÉES

Matières premières

Les graisses animales sont préparées au laboratoire par extraction de tissus adipeux fraîchement relevés à l'abattoir. L'extraction est réalisée à froid par broyage des tissus avec du sable en pré-

* Nous appelons ici "acides combinés" les acides qui font encore partie d'une molécule glycéridique au moment où la lipolyse est arrêtée et "acides totaux", les acides obtenus par saponification d'un échantillon de la fraction étudiée.

sence de chloroforme. Les extraits sont filtrés, séchés sur Na_2SO_4 , et évaporés. Les dernières traces de solvant sont chassées sous vide.

Les graisses végétales examinées sont des échantillons commerciaux que nous avons quelquefois neutralisés en faisant percoler leurs solutions éthérées à travers une colonne d'Amberlite IRA-400, forme OH^{-10} .

2. Fractionnement de certaines graisses par cristallisation dans l'acétone

Les fractionnements ont été réglés dans chaque cas particulier de façon à obtenir avec un rendement maximum des fractions aussi riches que possible en glycérides S_2I et SI_2 . Le Tableau I indique les poids respectifs et les indices d'iode des fractions obtenues.

Étant donné la composition⁸ des diverses graisses mentionnées dans le Tableau I, on peut calculer l'indice d'iode moyen de leurs glycérides S_2I et SI_2 . Le calcul* donne pour la graisse de boeuf 31.0 et 60.8; pour la graisse de mouton 32.7 et 64.7; pour la graisse de porc 37.1 et 72.3; pour l'huile de palme 35.4 et 69.0. En comparant ces chiffres et ceux du Tableau I, on voit que les fractions 3 + 4 et 6 + 7 (boeuf), 2 et 4 (mouton), 2 et 4 (porc), 2 et 3 (palme) doivent en principe contenir beaucoup de glycérides S_2I et SI_2 , respectivement. Nous allons donc étudier ces fractions avec une attention particulière sans oublier toutefois qu'elles sont loin d'être parfaitement définies.

TABLEAU I
FRACTIONNEMENT DE CERTAINES GRAISSES DANS L'ACÉTONE

Graisse soumise au fractionnement	No. des fractions	% du poids total	Indice d'iode
Boeuf	1	19.6	5.7
	2	4.9	20.3
	3	17.0	28.8
	4	11.0	33.5
	5	3.8	46.1
	6	25.0	54.2
	7	10.1	66.5
	8	8.6	75.4
Mouton	1	24.9	10.2
	2	30.5	35.6
	3	11.1	53.5
	4	20.5	64.2
	5	4.5	75.6
	6	8.5	87.4
Porc	1	31.1	26.8
	2	5.1	37.0
	3	24.5	57.0
	4	26.4	67.0
	5	12.9	90.4
Palme	1	11.0	19.9
	2	47.0	48.1
	3	42.0	69.7

3. Lipolyse

Les conditions opératoires sont celles désignées dans les publications de ce Laboratoire¹¹ sous le nom de "lipolyse sans calcium". On utilise 1.2 g de graisse, 6.5 ml de phosphate $M/10$ $\text{pH} = 7$, 0.15 ml d'une solution de sels biliaires à 10 % et 78 mg de pancréatine. Après 1.5 h à 37° , 20-30 % des chaînes sont habituellement libérées.

4. Fractionnement et analyse des produits engendrés par la lipolyse

Le détail des techniques employées dans ce but a été donné dans nos précédentes publications⁸⁻¹⁰. Rappelons simplement que le mélange engendré par la lipolyse est tout d'abord passé à travers une colonne d'Amberlite IRA-400 pour retenir les acides libres qui sont ultérieurement élués. Une partie

* Ce calcul est évidemment approximatif. Son seul objet est de faire connaître les fractions les plus riches en glycérides S_2I et SI_2 .

des glycérides neutres qui ont traversé cette première colonne est saponifiée afin d'obtenir un échantillon des acides combinés. L'autre partie est chromatographiée dans une colonne de kieselguhr siliconé¹⁰ et la fraction contenant les monoglycérides est recueillie séparément.

L'insaturation moyenne des acides libres, des acides combinés et des monoglycérides est ensuite déterminée soit par la technique de KAUFMANN, soit par une modification de cette technique à l'échelle microanalytique⁹ quand le poids de substance dont on dispose est très faible. Cette détermination suffit en général pour mettre en lumière l'essentiel du phénomène. Quand des résultats plus complets sont désirés, les acides saturés sont séparés par la technique de BERTRAM¹². Leur teneur en acides myristique, palmitique et stéarique est déterminée par chromatographie¹³. L'acide linoléique est dosé par spectrophotométrie ultraviolette et l'acide oléique est calculé par différence à 100.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Position des acides saturés et insaturés dans les glycérides mixtes naturels

1. *Etude des positions externes (positions 1 et 3).* D'après ce qui vient d'être dit, les acides libérés par la lipase sont prélevés principalement sur les positions externes des glycérides. Le Tableau II indique l'insaturation moyenne de ces acides dans le cas des graisses de boeuf, de mouton, de porc et de palme. Le tableau indique également à titre de comparaison l'insaturation moyenne des acides totaux et combinés. On remarquera que l'insaturation des acides totaux est bien égale dans chaque cas à la somme des insaturations des acides libres et combinés. Les analyses sont donc certainement correctes.

TABLEAU II

INSATURATION MOYENNE DES ACIDES LIBRES, COMBINÉS ET TOTAUX

(Cas de graisses préalablement fractionnées)

Pour connaître les conditions et les résultats du fractionnement,
voir le texte et les chiffres du Tableau I.

Graisses utilisées	No. de la fraction	Glycérides prédominants	Taux de lipolyse (%)	Indice d'iode des acides		
				Totaux	Libres	Combinés
Boeuf	3	S_2I	27	30	17	37
Boeuf	4	S_2I	27	35	26	35
Boeuf	6	SI_2	26	57	45	59
Boeuf	7	SI_2	28	70	62	72
Mouton	2	S_2I	27	37	21	43
Mouton	4	SI_2	27	67	51	72
Porc	2	S_2I	25	39	57	33
Porc	3	$S_2I + SI_2$	25	60	80	50
Porc	4	SI_2	20	70	82	65
Palme	2	S_2I	25	50	30	57
Palme	3	SI_2	30	73	59	81

Les chiffres du Tableau II montrent tout d'abord que, dans les 4 cas étudiés, l'indice d'iode des chaînes externes est toujours différent de celui des chaînes internes. La répartition des chaînes entre les deux positions n'est donc jamais "au hasard". Elle dépend manifestement de leur plus ou moins grande insaturation. Ce principe fondamental étant dégagé, les deux alternatives possibles doivent être considérées. Les positions externes sont occupées préférentiellement, ou bien par des chaînes saturées (cas du boeuf, du mouton et de la palme: graisses de type I), ou bien par des chaînes insaturées (cas du porc: graisses de type II). Nos résultats permettent en outre de voir

que les deux groupes de glycérides mixtes (S_2I et SI_2) extraits d'une même graisse obéissent toujours à la même règle, quelle que soit cette règle. Autrement dit, les deux groupes appartiennent soit au type I, soit au type II*.

Le Tableau III fait état de quelques expériences complémentaires entreprises sur d'autres graisses animales et végétales dans le but d'amorcer une systématisation des résultats précédents**.

TABLEAU III
INSATURATION MOYENNE DES ACIDES LIBRES, COMBINÉS ET TOTAUX
(Cas de graisses animales et végétales non fractionnées)

Graisses ou huiles utilisées	Taux de lipolyse (%)	Indice d'iode des acides		
		Totaux	Libres	Combinés
Graisse de cheval	34	85	70	94
Graisse d'oie	21	71	68	72
Beurre de cacao	30	39	12	51
Huile de tournesol	17	131	118	132

Trois des quatre graisses étudiées dans le Tableau III (graisse de cheval, beurre de cacao, huile de tournesol) appartiennent certainement au type I. Les chiffres relatifs au beurre de cacao sont même particulièrement nets, à cause sans doute de l'exceptionnelle richesse de cette graisse en glycérides monoinsaturés. On hésiterait davantage par contre devant le cas de la graisse d'oie si l'on ne savait pas que la graisse de boeuf étudiée dans le Tableau II donne aussi des résultats incertains quand elle n'est pas fractionnée (indice d'iode des acides totaux, combinés et libres: 41, 42 et 42, respectivement). On peut donc penser que les quatre graisses du Tableau III appartiennent au type I comme celles de boeuf, de mouton et de palme.

Un travail récent de CLÉMENT ET CLÉMENT¹⁴ renforce d'ailleurs l'impression que le type de structure appelé ici type I est beaucoup plus fréquent que le type II. Bien que les auteurs aient interprété leurs résultats de façon assez discutable, les résultats eux-mêmes ne semblent pas devoir être mis en doute. Ils suggèrent que les chaînes externes des graisses du tissu adipeux de l'homme et du rat, les huiles d'arachide, de soja, de colza et de lin sont relativement plus saturées que les chaînes internes. En somme, dans 13 graisses (6 graisses animales de dépôt et 7 graisses végétales (6 extraites de graines et 1 extraite d'un fruit)), on trouve un excès de chaînes saturées en position externe. Dans une seule graisse (graisse de dépôt du porc), on trouve au contraire un excès de chaînes insaturées dans cette position.

Étant isolé, le cas de la graisse de porc paraît mériter un examen plus approfondi. On sait en particulier que le porc est le siège d'une lipogénèse très active au moment de sa période d'engraissement. La structure "anormale" que nous venons de mettre en évidence est-elle l'apanage de ces graisses hâtivement constituées ou se rencontre-t-elle aussi dans les dépôts formés de façon plus lente par les animaux maigres? Cette structure en outre est-elle la même dans toutes les graisses de dépôt de l'animal, quelle que

* Les fractions intermédiaires, c'est à dire les fractions dont l'indice d'iode est compris entre ceux des glycérides S_2I et SI_2 ont également été étudiées. Les résultats n'ont pas été reproduits dans le Tableau II car ils sont analogues aux autres.

** Au cours de cette nouvelle série d'expériences, les graisses ont été utilisées telles quelles sans fractionnement préalable dans l'acétone.

TABLEAU IV
LIPOLYSE DE DIVERSES GRAISSES DE PORC NON FRACTIONNÉES

Localisation anatomique de la graisse	Etat de l'animal	Taux de lipolyse (%)	Indice d'iode des acides	
			Libres	Combinés
Sous-glossienne	gras	25	91	73
	maigre	26	101	81
Région inguinale	gras	28	92	69
	maigre	25	104	81
Sous-cutanée dorsale	gras	35	104	76
	maigre	32	112	87
Sous-péritonéale	gras	31	93	64
	maigre	27	110	88

soit leur localisation anatomique? Les chiffres du Tableau IV permettent de répondre sans ambiguïté à ces deux questions. Dans tous les cas étudiés, les chaînes insaturées sont fixées préférentiellement en position externe.

2. *Etude de la position interne (position 2)*. Le Tableau V indique l'insaturation moyenne de la chaîne des monoglycérides formés pendant la lipolyse des glycérides S_2I du mouton, des glycérides mixtes du porc et des glycérides totaux du beurre de cacao. Le tableau rappelle également l'insaturation des acides libres (voir Tableau II). Il donne enfin l'insaturation des acides totaux et des acides appartenant aux di- et aux triglycérides.

TABLEAU V
INSATURATION MOYENNE DE LA CHAÎNE DES MONOGLYCÉRIDES

Graisse utilisée	No. de la fraction	Glycérides prédominants	Taux de lipolyse (%)	Indice d'iode des acides				
				Libres	Des mono-glycérides	Des di-glycérides	Des tri-glycérides	Totaux
Mouton	2	S_2I	29	21	53	43	37	37
Porc	3	$S_2I + SI_2$	34	85	16	51	65	63
Beurre de cacao	—	—	32	12	87	52	52	39

Les chiffres du Tableau V mettent tout d'abord en lumière un fait attendu. A un excès de chaînes saturées en position externe doit selon toute évidence correspondre un excès de chaînes insaturées en position interne, et inversement. Les monoglycérides du mouton et du beurre de cacao doivent donc avoir un indice d'iode élevé et ceux du porc, un indice d'iode bas. Les chiffres montrent aussi que les triglycérides conservent à peu près la même insaturation moyenne pendant la lipolyse (comparaison entre les chiffres des deux dernières colonnes du Tableau V). Les phénomènes de transacylation signalés par BORGSTRÖM¹⁵ jouent donc dans le cas présent un rôle assez modeste et la lipase semble hydrolyser à une vitesse analogue tous les triglycérides qui lui sont offerts. Ces deux remarques facilitent beaucoup l'interprétation de l'ensemble de nos résultats. Mais l'intérêt majeur des chiffres du tableau réside dans la comparaison qu'ils permettent de faire entre les indices d'iode des acides libres et les indices des acides appartenant aux monoglycérides. Si les chaînes saturées et insaturées étaient réparties "au hasard" sur les positions externes et internes, ces indices devraient être

identiques deux à deux. Or, nous les trouvons dans un rapport de 1 à 2.5 pour les glycérides S_2I du mouton, de 5 à 1 pour les glycérides mixtes du porc et de 1 à 7 pour le beurre de cacao non fractionné. La relation existant entre l'insaturation des chaînes et leur position apparaît ainsi en toute clarté.

II. Etude plus précise du groupe des acides saturés et du groupe des acides insaturés

Nous avons jusqu'ici considéré deux groupes de chaînes (saturées et insaturées) et nous avons constaté que ces deux groupes étaient inégalement répartis sur les positions externes et internes des glycérides. Il est intéressant maintenant d'aller un peu plus loin et de se demander si le comportement individuel de chaque chaîne est identique au comportement moyen du groupe auquel elle appartient. Le Tableau VI permet de comparer les positions respectives occupées par les chaînes palmitiques et stéariques* dans les glycérides mixtes des graisses de boeuf, de mouton, de porc et de palme. Le Tableau VII donne les mêmes indications pour ce qui concerne les chaînes oléiques et linoléiques dans la graisse de porc.

TABLEAU VI

COMPORTEMENT INDIVIDUEL DES ACIDES PALMITIQUE ET STÉARIQUE PENDANT LA LIPOLYSE DE DIVERSES GRAISSES

M, P, S: Teneur des acides saturés totaux en acides myristique, palmitique et stéarique, respectivement.

Graisses utilisées	No. de la fraction	Taux de lipolyse (%)	Glycérides pré-dominants	Composition (%) des acides saturés					
				Libres			Combinés		
				M	P	S	M	P	S
Boeuf	3	22	S_2I	—	49	51	—	50	50
	6	24	SI_2	—	70	30	—	69	31
Mouton	2	20	S_2I	—	40	60	—	43	57
Porc	2	32	S_2I	1.5	33	65.5	3	65	32
	4	35	SI_2	5	41	54	6	75	19
Palme	2	26	S_2I	3	84	13	1.5	84.5	14
	3	30	SI_2	2	88	10	2	86	12

Considérons tout d'abord les chaînes palmitiques et stéariques (Tableau VI). Elles se comportent de façon identique dans toutes les graisses dites de type I (boeuf, mouton, palme). Mais la graisse de porc fait une fois encore exception. Cette graisse libère proportionnellement plus d'acide stéarique que d'acide palmitique. Or, rien ne peut laisser supposer que les glycérides stéariques soient hydrolysés plus vite que les glycérides palmitiques**. La meilleure hypothèse est donc que les chaînes palmitiques occupent encore plus souvent la position interne que les chaînes stéariques dans les glycérides mixtes de la graisse de porc. Rappelons d'ailleurs que HILDITCH³ a pu isoler avec une aisance surprenante des glycérides 2-palmitiques à partir de cette graisse.

L'étude concernant les chaînes oléiques et linoléiques n'a été réalisée jusqu'ici

* Dans notre précédente publication⁹ nous avons vérifié que les chaînes laurique, palmitique, oléique et linoléique sont lipolysées à la même vitesse quand elles occupent en moyenne les mêmes positions (distribution "au hasard"). Mais nous n'avons pas procédé à une semblable vérification pour les chaînes stéariques. C'est maintenant chose faite.

** Bien au contraire, les chaînes stéariques, par suite de leur point de fusion élevé, ont plutôt tendance à retarder en général la lipolyse des glycérides qui les renferment.

TABLEAU VII
COMPOTEMENT INDIVIDUEL DES ACIDES OLÉIQUE PENDANT LA LIPOLYSE DE
LA GRAISSE DE PORC

O, L et Ln: Teneur (%) des acides insaturés en acides oléique, linoléique et linoléique, respectivement.

No. de la fraction	Taux de la lipolyse (%)	Composition (%) des acides insaturés					
		Libres			Combinés		
		<i>O</i>	<i>L</i>	<i>Ln</i>	<i>O</i>	<i>L</i>	<i>Ln</i>
2	32	89	11	—	92	8	—
3	33	84	16	—	83	17	—
4	35	82	18	—	83	17	—
5	24	73	23	4	72	24	4

que dans le cas de la graisse de porc (Tableau VII). Cette graisse est en effet la seule, parmi celles que nous avons fractionnées, à renfermer des quantités notables d'acide linoléique. Aucune conclusion générale ne peut donc être tirée. Il est néanmoins curieux de constater que dans cette graisse qui constitue justement l'exemple unique d'une différence de comportement entre les chaînes palmitiques et stéariques, le comportement des chaînes oléiques et linoléiques est identique.

En somme, dès que l'on fait intervenir des détails de structure il, est normal de se heurter à des situations particulières. Les expériences précédentes sont simplement préliminaires.

DISCUSSION

Si les êtres vivants ne manifestaient aucun discernement pendant la formation de leurs glycérides de réserve, s'ils estérifiaient par conséquent n'importe quel hydroxyle du glycérol par n'importe quelle chaîne, les proportions respectives des glycérides "simples" et "mixtes" devraient être déterminées par un calcul de probabilité¹⁶ et la répartition des chaînes sur les positions externes et internes devrait être indépendante de la nature chimique de ces chaînes. Le fait que la première condition soit quelquefois satisfaite n'a pas peu contribué à accréditer la légende selon laquelle la distribution des chaînes grasses dans les glycérides naturels obéirait de plus ou moins près aux lois du hasard. Le principal intérêt du présent travail est de montrer que, si la deuxième condition imposée par la distribution "au hasard" est pleinement satisfaite dans les mélanges de glycérides obtenus par voie chimique (estérification ou interestérification), elle semble par contre n'être jamais satisfaite dans les glycérides mixtes naturels (animaux et végétaux). Certains types de chaînes occupent préférentiellement certaines positions au sein de ces glycérides.

Dire que les chaînes saturées se trouvent généralement en excès sur les positions externes et les chaînes insaturées en excès sur les positions internes, revient d'ailleurs à dire que l'isomère prédominant* est le symétrique *SIS* dans la fraction S_2I et le dissymétrique *IIS* dans la fraction SI_2 . Cette remarque peut être étendue au cas particulier du porc. Il suffit d'en inverser tous les termes. L'état d'isomérisation des glycérides

* L'adjectif "prédominant" indique ici que l'isomère considéré est plus abondant que dans le cas d'une distribution "au hasard". Ce mode de distribution exige la présence de 2 mole d'isomère dissymétrique pour 1 mole d'isomère symétrique.

mixtes naturels est donc déterminé, non par une considération de symétrie ou de dissymétrie, mais bien, comme nous l'indiquions tout à l'heure, par la tendance que manifestent certaines chaînes à occuper certaines positions.

Il conviendrait maintenant de chercher à savoir jusqu'où va cette tendance, en comparant par exemple les résultats obtenus avec les fractions naturelles et avec les glycérides purs correspondants (voir Tableau IV de la référence⁹). Diverses circonstances** font qu'une telle comparaison ne peut à l'heure actuelle être très précise. Tout l'aspect quantitatif du problème sera donc discuté dans une prochaine publication, à la lumière de nouvelles expériences plus démonstratives. Mais l'impression générale prévaut que le phénomène étudié n'a pas un caractère absolu, sauf peut-être dans le cas du beurre de cacao dont les monoglycérides semblent entièrement insaturés. Ce phénomène est néanmoins assez net et assez intrigant pour qu'on se préoccupe dès maintenant d'éclaircir son origine et de déterminer ses conséquences biologiques.

RÉSUMÉ

1. Grâce à sa spécificité de position, la lipase pancréatique permet d'étudier commodément la structure des glycérides mixtes naturels. Dans tous les cas envisagés (graisses animales de dépôt, graisses végétales des graines et des fruits), la distribution des chaînes entre les positions externes et internes n'obéit pas aux lois du hasard. Elle dépend dans une certaine mesure (qui reste d'ailleurs à préciser) de la nature chimique de ces chaînes.

2. Dans tous les cas, sauf celui du porc, on trouve dans tous les glycérides mixtes un grand excès de chaînes insaturées en position interne. L'isomère prédominant est donc le symétrique chez les glycérides disaturés-monoinsaturés et le dissymétrique chez les glycérides diinsaturés-monoinsaturés. Toutes les positions internes du beurre de cacao semblent même être occupées par des chaînes insaturées.

3. Une situation exactement inverse se rencontre dans la graisse de dépôt du porc, quelle que soit la localisation anatomique de cette graisse et l'état d'engraissement de l'animal.

4. Les acides palmitique et stéarique occupent en moyenne les mêmes positions, sauf encore une fois dans le cas du porc où le premier occupe plus souvent la position interne que le second. La répartition de l'acide oléique ne diffère cependant pas de celle de l'acide linoléique dans cette graisse.

SUMMARY

1. Owing to its specificity as to site of attack, pancreatic lipase can conveniently be used to study the structure of the natural mixed glycerides. In all the cases examined (animal depot-fats, vegetable fats of seeds and fruits) the distribution of the chains between the outer and inner positions was not random. It depends to a certain extent (still to be specified) on the chemical nature of these chains.

2. In all the cases, except that of the pig, a great excess of unsaturated chains is found at position-2 of all the mixed glycerides. The predominant isomer is, in the case of the disaturated-mono-unsaturated glycerides, the symmetrical one, and in the case of the diunsaturated-mono-saturated glycerides the asymmetric one. In the case of cacao butter all the positions-2 seem to be occupied by unsaturated chains.

3. The situation is exactly the reverse in pig depot-fat wherever it occurs in the body or whatever the state of fattening of the animal.

4. On an average palmitic and stearic acids occupy the same positions, again except in the case of the pig where the former is more often situated at position-2 than the latter. The distribution of oleic acid, however, does not differ from that of linoleic acid in pig fat.

* Le fait en particulier que les fractions appelées S_2I et SI_2 sont loin, malgré toutes les cristallisations, d'être parfaitement définies. Des cristallisations trop poussées ne seraient d'ailleurs pas d'un bien grand secours car elles fourniraient des fractions avec un rendement si faible qu'aucune conclusion générale ne pourrait être tirée.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ T. P. HILDITCH ET C. H. LEA, *J. Chem. Soc.*, (1927) 3106.
- ² J. B. BROWN, *Chem. Revs.*, 20 (1941) 333.
- ³ T. P. HILDITCH, *The Chemical Constitution of Natural Fats*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1944, p. 216.
- ⁴ O. T. QUIMBY, R. L. WILLE ET E. S. LUTTON, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 30 (1953) 186.
- ⁵ F. H. MATTSON, J. H. BENEDICT, J. B. MARTIN ET L. W. BECK, *J. Nutrition*, 48 (1952) 335.
- ⁶ B. BORGSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 557.
- ⁷ F. H. MATTSON ET L. W. BECK, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 735.
- ⁸ P. SAVARY ET P. DESNUELLE, *Compt. rend.*, 240 (1955) 2571.
- ⁹ P. SAVARY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 349.
- ¹⁰ P. SAVARY ET P. DESNUELLE, *Bull. soc. chim. France*, (1954) 936.
- ¹¹ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561.
- ¹² S. H. BERTRAM, *Z. Untersuch. Lebensm.*, 55 (1928) 179.
- ¹³ P. SAVARY ET P. DESNUELLE, *Bull. soc. chim. France*, 20 (1953) 939.
- ¹⁴ G. CLÉMENT ET J. CLÉMENT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1319.
- ¹⁵ B. BORGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 491.
- ¹⁶ M. NAUDET, *Thèse*, Marseille, 1947.

Reçu le 28 novembre 1956.

Short Communications

Flavin adenine dinucleotide (FAD) metabolism and lactation

The form in which riboflavin occurs in milk has been shown to vary with species. DAVIS *et al.*¹ suggested that while riboflavin occurs free in cow milk, at least part of that occurring in sow milk is in a combined form, from which free riboflavin is readily liberated. This has recently been confirmed by MODI AND OWEN², who also showed that the riboflavin in sow milk is almost exclusively in the combined form, identified by them as FAD. In cow milk, however, free riboflavin was shown to be accompanied by only relatively small amounts of FAD. Whether the FAD is itself combined or free, was not investigated. Combined FAD is an active component of a number of enzyme systems, and hence species differences in its distribution may in turn reflect wider metabolic differences. Studies have therefore been made of the occurrence and metabolism of FAD in the lactating sow and cow.

Free FAD in milk and in blood was determined by the manometric method of OCHOA AND ROSSITER³. The sample of milk or blood to be determined, or a standard solution of FAD, was diluted to 2 ml with *M*/15 sodium pyrophosphate buffer, pH 8.3, and placed in the main chamber of a Warburg vessel along with 1 ml of a solution in the same buffer of the specific protein of D-amino acid oxidase⁴. The central well of the vessel contained filter paper moistened with 0.2 ml *N* alkali, and the side limb 0.2 ml of 4.5% DL-alanine in pyrophosphate buffer. The alanine was then mixed with the contents of the main chamber, the flask shaken at 37° C for 15 min, and the rate of oxygen uptake measured during the following 30 min. Under these conditions, 0.5 µg FAD produced an oxygen uptake of approximately 80 µl, the rate being constant over the 30 min period. The relationship between oxygen uptake and FAD present was linear for quantities up to 1.0 µg.

Milk from individual cows and from individual sows after injection with oxytocin was ultra-filtered⁵, and the FAD present in 2 ml portions of the filtrate determined. Free FAD was absent from all samples of ultrafiltrate from cow milk, while sow milk contained 0.15–0.20 µg/ml. This was confirmed qualitatively by paper chromatographic examination. When chromatographed on Whatman No. 31 extra thick paper using the butanol/acetic acid/water system of CRAMMER⁶, concentrated ultrafiltrate from cow milk, in all cases, yielded only fluorescent spots corresponding to riboflavin and riboflavin-5'-phosphate. With similar material from sow milk, however, a spot corresponding to FAD was obtained. In most cases this was unaccompanied by riboflavin or