

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Dr. W. A. J. BORG for his interest during the work and for critically reading the manuscript, and to Dr. K. PUNT for kindly supplying some samples of human blood.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> K. C. WINKLER, *Thesis*, Leiden, 1938.
- <sup>2</sup> H. L. BOOIJ AND H. G. BUNGENBERG DE JONG, *Protoplasmatologia*, Vol. I, 2, Springer, Vienna 1956, p. 141.
- <sup>3</sup> W. D. STEIN AND J. F. DANIELLI, *Discussions Faraday Soc.*, 21 (1956) 238.
- <sup>4</sup> A. K. PARPART AND R. BALLENTINE, in E. S. G. BARRON, *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*, Acad. Press, New York 1952, p. 135.
- <sup>5</sup> A. K. PARPART, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 19 (1942) 248.
- <sup>6</sup> F. R. CROPPER AND A. HEYWOOD, *Nature*, 174 (1954) 1063.
- <sup>7</sup> A. T. JAMES AND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
- <sup>8</sup> S. R. LIPSKY, R. A. LANDOWNE AND M. R. GODET, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 336.
- <sup>9</sup> H. WAGNER, L. ABISCH AND K. BERNHARD, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 1536.
- <sup>10</sup> R. HÖBER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 7 (1936) 367.
- <sup>11</sup> A. K. PARPART AND A. J. DZIEMIAN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 8 (1940) 17.
- <sup>12</sup> M. H. JACOBS, H. N. GLASSMAN AND A. K. PARPART, *J. Exptl. Zool.*, 113 (1950) 277.
- <sup>13</sup> R. HÖBER AND S. L. ØRSKOV, *Arch. ges. Physiol., Pflüger's*, 231 (1933) 599.
- <sup>14</sup> M. H. JACOBS, H. N. GLASSMAN AND A. K. PARPART, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 7 (1935) 197.

*Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 103

## QUELQUES REMARQUES COMPLÉMENTAIRES SUR L'HYDROLYSE DES TRIGLYCERIDES PAR LA LIPASE PANCRÉATIQUE

M. J. CONSTANTIN, L. PASERO ET P. DESNUELLE

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

(Reçu le 18 février 1960)

## SUMMARY

*Some additional remarks on the hydrolysis of triglycerides by pancreas lipase*

1. *In vitro* lipolysis of triglycerides is impeded by difficulties due to the conflict between hydrolysis, on the one hand, and progressive inactivation of the lipase, on the other. The maximum rate of hydrolysis attainable consequently depends in the first place on the relation between the amounts of enzyme and substrate present. It is found that, when the initial proportion of the enzyme is increased, the lipolysis tends to become total.
2. However, even when lipolysis is ultimately total, considerable quantities of transitory partial glycerides are formed while lipolysis is going on.
3. The "activating" effect on lipolysis commonly attributed to calcium ions and bile salts is discussed.
4. Some consequences of these *in vitro* observations on the nature of the products absorbed by intestinal mucosa and on the mechanism of triglyceride resynthesis in this mucosa, are briefly considered.

*Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 103-109

## INTRODUCTION

Des expériences déjà anciennes<sup>1-3</sup> ont montré que: (a) l'hydrolyse *in vitro* des triglycérides par la lipase pancréatique paraît s'arrêter spontanément bien avant que toutes les liaisons ester du substrat aient été coupées; (b) lorsque la vitesse de l'hydrolyse devient nulle, les mélanges engendrés contiennent des quantités considérables de glycérides partiels; (c) ces derniers sont principalement des diglycérides en l'absence d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et des monoglycérides en leur présence.

De tels résultats peuvent être interprétés comme signifiant que la lipolyse *in vitro* est normalement incomplète et que le calcium incite la lipase à convertir les diglycérides en monoglycérides. La première proposition est d'ailleurs en bon accord avec les difficultés notoires qu'éprouve la lipase à hydrolyser les glycérides partiels qu'elle a elle-même formés. Ces difficultés proviennent, on le sait, de l'existence d'hydroxyles dans les molécules en question et de la spécificité de position de la lipase, grâce à laquelle l'enzyme arrache beaucoup plus vite les chaînes externes que les chaînes internes<sup>4-6</sup>. Quant à la deuxième proposition, elle serait susceptible de fournir une explication plausible à l'effet "activateur" communément attribué au calcium pendant la lipolyse.

Toutefois, des expériences ultérieures effectuées avec de la pancréatine de porc<sup>7</sup> et du suc pancréatique de rat<sup>8,9</sup> suggèrent que la lipolyse *in vitro* peut quelquefois aller très loin. Le suc pancréatique de rat en présence de bile paraît même engendrer dès le début beaucoup de glycérol libre<sup>9</sup>, ce qui excluerait dans ce cas la formation transitoire de quantités appréciables de glycérides partiels.

Bien que les conditions régnant dans le duodénum pendant la digestion des triglycérides soient vraisemblablement fort différentes de celles de la lipolyse *in vitro*, il est intéressant de déterminer avec précision les facteurs contrôlant le taux maximum d'hydrolyse susceptible d'être atteint au cours de ce dernier phénomène. Les glycérides se présentent en effet devant la paroi intestinale dans l'état où les a mis la lipase. Si l'hydrolyse est complète, ce sont des acides qui pénètrent dans la muqueuse et qui servent à la resynthèse des triglycérides à partir d'un précurseur tricarboné soluble<sup>10</sup>. Si l'hydrolyse est au contraire incomplète, la paroi absorbe un mélange d'acides gras et de glycérides partiels, lesquels peuvent servir directement à la resynthèse au sein d'une phase insoluble.

L'objet du présent travail est de montrer que l'un des facteurs essentiels contrôlant le taux d'hydrolyse est la quantité relative de lipase par rapport aux triglycérides à hydrolyser. Quelques observations concernant le rôle des ions calcium et des sels biliaires pendant la lipolyse sont également discutées.

## TECHNIQUES

La plupart des techniques ont déjà été décrites. La lipase est employée, soit à l'état de pancréatine de porc, soit sous la forme de préparations apparemment pures obtenues par précipitation, adsorption et électrophorèse d'extraits de pancréatine<sup>11</sup>. Toutes choses égales d'ailleurs, les résultats obtenus sont identiques dans les deux cas. Le nombre d'unités lipase est déterminé par titrimétrie à pH constant sur une émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique<sup>11,12</sup>. La composition finale des mélanges, c'est à dire leur teneur en triglycérides, diglycérides, monoglycérides, glycérol et acides libres est déterminée par titrage<sup>8</sup> ou chromatographie<sup>13</sup>.

Les conditions expérimentales adoptées pour les lipolyse sont les suivantes:

*Essais en présence de calcium:* Tampon chlorure d'ammonium-ammoniaque 0.02 M pH 8.0 contenant assez de chlorure de calcium pour fournir  $\frac{1}{2}$  Ca<sup>++</sup> par chaîne libérable et, sauf spécification contraire, 0.2 % de taurocholate de Na. Pendant l'expérience, le pH est maintenu à 8.0 par addition d'ammoniaque 5 M.

*Essais en l'absence de calcium:* Tampon phosphate 0.1 M pH 8.0 contenant, sauf spécification contraire, du taurocholate de Na à la concentration de 0.2 %. Le pH est maintenu à 8.0 en ajoutant avec précaution et sous agitation de la soude 0.5 N. Toutes les expériences sont faites à 37°.

## RÉSULTATS

Il est manifeste qu'en insolubilisant les savons solubles formés par la lipolyse, les ions Ca<sup>++</sup> facilitent beaucoup l'interprétation générale des résultats. Ils diminuent en effet la probabilité de certains phénomènes parasites, tels que la resynthèse, l'échange entre chaînes libres et combinées et l'arrêt prématuré de la réaction dû à l'encombrement de l'interface. Nos premières expériences, reproduites dans les Figs. 1 et 2, ont donc été réalisées en présence d'assez de calcium pour insolubiliser toutes les chaînes susceptibles d'être libérées (3 ions Ca<sup>++</sup> pour 2 moles de triglycérides).

Les courbes des Figs. 1 et 2 seront commentées un peu plus loin. Notons simplement ici que: (a) Quand les quantités de lipase sont relativement faibles par rapport aux quantités de triglycérides à hydrolyser (13.3 unités/g; Fig. 1), la lipolyse paraît bien, comme on l'avait constaté jusqu'ici, s'arrêter, ou au moins ralentir très fortement, avant que toutes les chaînes aient été libérées. (b) Mais, avec 400 unités/g, le taux d'hydrolyse augmente régulièrement en fonction du temps pour atteindre bientôt 100 %. (c) Le taux maximum susceptible d'être atteint au bout de 3 h (Fig. 2) s'élève quand le rapport lipase/triglycérides s'accroît. Au début, tout accroissement

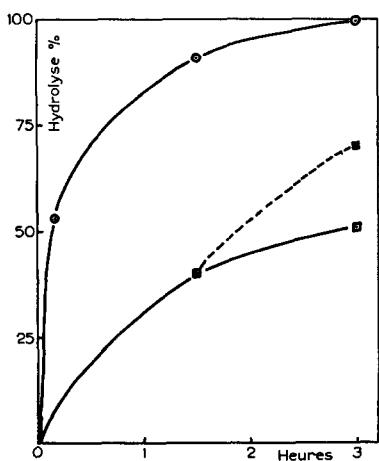


Fig. 1. Influence de la quantité de lipase sur la cinétique de la lipolyse en présence de calcium et de taurocholate. □ et ○: 13.3 et 400 unités lipase/g de triglycérides, respectivement. ······, cinétique du phénomène quand on ajoute à nouveau 13.3 unités lipase au cours de la 1ère expérience.

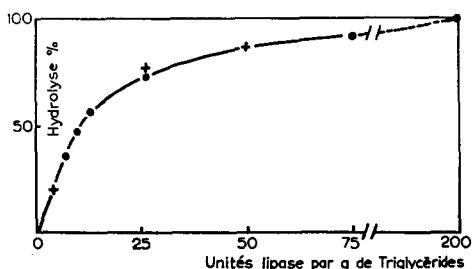


Fig. 2. Variation en fonction du rapport lipase/triglycérides du taux d'hydrolyse au bout de 3 h (expériences avec calcium et taurocholate). On fait varier systématiquement le rapport lipase/triglycérides, soit en augmentant la quantité d'enzyme pour un poids donné de substrat (points noirs), soit en augmentant le poids du substrat pour un nombre donné d'unités enzymatiques (croix).

de ce rapport exerce un effet considérable. Avec 25 unités/g, le taux est déjà de 70 %. Puis, la courbe s'infléchit et arrive asymptotiquement à l'ordonnée 100 %. (d) Une nouvelle addition de lipase au cours de la 1ère expérience de la Fig. 1 (courbe en pointillé de cette figure) redonne à la lipolyse une vitesse analogue à sa vitesse initiale.

D'autres essais ont ensuite été faits dans le but de mieux connaître l'influence des ions calcium et des sels biliaires sur le déroulement général de la lipolyse. Les résultats de ces essais sont réunis dans le Tableau I. On voit tout de suite que: (a) En 180 min, 400 unités lipase sans calcium donnent un taux d'hydrolyse plus faible que 260 unités avec calcium en 15 min. Les lipolyses sans calcium semblent donc être beaucoup plus malaisées. (b) Néanmoins, quand on augmente considérablement les quantités de lipase (4,000 unités/g) on atteint en 180 min un taux de 83 %. (c) L'effet exercé par le taurocholate sur le taux maximum d'hydrolyse est moins frappant. On constate toutefois qu'il l'augmente à des concentrations relativement modestes (0.2 %), mais qu'à des concentrations supérieures (1 %), il paraît au contraire le diminuer.

TABLEAU I  
INFLUENCE DU CALCIUM ET DU TAUROCHOLATE SUR LE TAUX D'HYDROLYSE

No. des essais	Unités lipase/g de triglycérides	Durée (min)	Ca <sup>++</sup>	Concentration en taurocholate (%)	Taux d'hydrolyse (%)
1	260	15	+	0.2	58
2	400	60	+	0.2	83
3	400	180	—	0.2	42
4	4,000	180	—	0.2	83
5	400	40	+	0.0	61
6	400	40	+	0.2	80
7	200	180	+	0.0	100
8	200	180	+	0.2	100
9	200	180	+	0.6	97
10	4,000	180	—	0.0	77
11	4,000	180	—	0.2	83
12	4,000	180	—	1.0	64

Une fois que les variations du taux d'hydrolyse sont déterminées, il devient intéressant d'étudier la nature et les proportions des produits formés. La question la plus importante est la suivante: quand toutes les conditions sont réunies pour que la lipolyse soit en définitive totale, cette lipolyse engendre-t-elle transitoirement des glycérides partiels, ou, comme semble le suggérer le travail de BORGSTRÖM<sup>9</sup> donne-t-elle dès le début principalement naissance à du glycérol?

Les diagrammes des Figs. 3 et 4 indiquent les résultats obtenus, non pas en fonction du temps comme dans nos publications antérieures<sup>2,3</sup>, mais en fonction du taux d'hydrolyse. Ce nouveau mode de représentation est certainement plus logique que l'ancien. Il permet aussi une comparaison immédiate entre les résultats de plusieurs expériences réalisées dans des conditions différentes. Des taux d'hydrolyse variant de 11 à 91 % ont été, par exemple, obtenus en changeant les quantités de lipase, son état de pureté, la concentration du taurocholate et la durée des essais. On voit que tous ces éléments n'affectent en rien les caractères fondamentaux du phénomène, puisque les points se placent le long de courbes régulières.

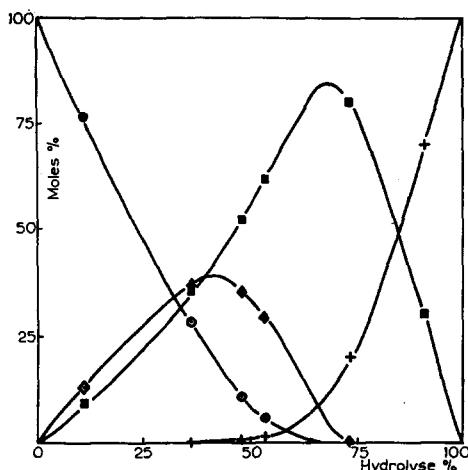


Fig. 3. Les trois étapes de la lipolyse des triglycérides (essais en présence de calcium). Les proportions des divers constituants ont été calculées comme d'habitude en partant du principe que l'hydrolyse de 100 moles de triglycérides peut engendrer au maximum 100 moles de diglycérides, 100 moles de monoglycérides, 100 moles de glycérol et 300 moles d'acides. ○, triglycérides; ■, monoglycérides; ◇, diglycérides; ×, glycérol.

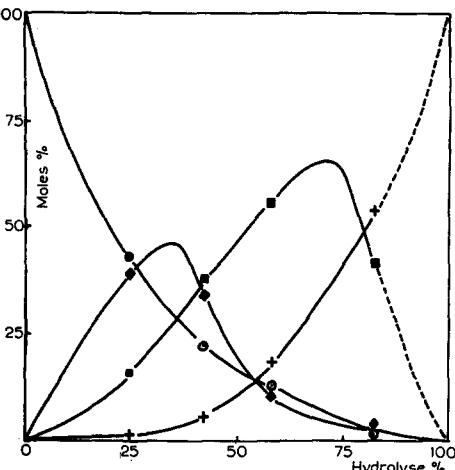


Fig. 4. Les trois étapes de la lipolyse des triglycérides (essais en l'absence de calcium). Même mode de calcul et mêmes symboles que pour la Fig. 3. Résultant d'une extrapolation peut-être inexacte, le tracé des courbes est en pointillé à partir d'un taux d'hydrolyse de 83 %.

La conclusion la plus évidente qui s'impose après examen des Figs. 3 et 4 est qu'en toutes circonstances, la lipolyse paraît s'effectuer en trois étapes successives dont les vitesses vont en décroissant. Au fur et à mesure que le taux d'hydrolyse s'élève, les triglycérides sont remplacés par des diglycérides dont les proportions sont maximum pour un taux de 40 %. Puis, viennent les monoglycérides qui, à leur tour, passent par un maximum pour un taux de 70 %. Enfin, à partir d'un taux de 70 %, les proportions du glycérol libre augmentent très vite. Les résultats sont analogues en présence et en l'absence de calcium. En l'absence de calcium toutefois, nous n'avons pas pu dépasser expérimentalement un taux d'hydrolyse de 83 %, bien que les quantités de lipase aient été portées à 4,000 unités/g. Des difficultés expérimentales empêchant d'aller au-delà, nous ne pouvons pas affirmer que les lipolySES *in vitro* en l'absence de calcium peuvent réellement être totales. Les courbes de la Fig. 4 ont donc été terminées en pointillé. Il est clair néanmoins qu'un taux d'hydrolyse de 83 % implique déjà la formation de beaucoup de glycérol libre.

#### DISCUSSION

Considérés dans leur ensemble, les résultats précédents suggèrent quelques réflexions:

1. Il semble tout d'abord que les divergences d'opinions concernant le caractère plus ou moins complet de la lipolyse *in vitro* aient été dues, dans une large mesure, à l'ignorance où se trouvaient les auteurs des quantités de lipase qu'ils mettaient en jeu au cours de leurs expériences. Le taux maximum d'hydrolyse susceptible d'être atteint *in vitro* dépend en premier lieu des quantités de lipase utilisées par rapport aux quantités de triglycérides à hydrolyser (Figs. 1 et 2; Tableau I). Quand ces

quantités sont faibles, la lipolyse s'arrête prématûrement. Quand elles sont élevées, la lipolyse est totale ou quasi totale.

2. L'une des causes de l'arrêt prématûré de la lipolyse est vraisemblablement l'inactivation progressive de l'enzyme qui, comme on le sait, est instable à 37° et pH 8 même en présence de calcium et de son substrat. On remarquera en effet qu'au moment où la lipolyse fléchit, une nouvelle addition de lipase la fait repartir (courbe en pointillé de la Fig. 1). Il est d'ailleurs facile de constater expérimentalement qu'une grande partie de l'activité lipasique a disparu à la fin des expériences de la Fig. 1, c'est à dire au bout de 3 h.

3. Le fait que la lipolyse puisse être totale ne paraît pas affecter le principe maintes fois reconnu selon lequel cette lipolyse s'effectue en trois étapes engendrant successivement des diglycérides, des monoglycérides et du glycérol. Dans nos conditions tout au moins, les mélanges engendrés contiennent toujours des proportions très notables de glycérides partiels, sauf évidemment quand le taux d'hydrolyse approche de 100 %. Nos expériences sont d'autre part en bon accord avec l'idée que la vitesse des trois réactions successives décroît dans l'ordre indiqué ci-dessus. On voit en effet que: (a) les monoglycérides disparaissent moins vite que les diglycérides puisque leur maximum est plus élevé (Figs. 3 et 4); (b) les proportions de glycérol ne commencent à devenir notables qu'au moment où le taux d'hydrolyse dépasse 70 %; (c) la forme de la courbe de la Fig. 2 indique que l'hydrolyse est d'autant plus difficile qu'elle est plus poussée. En somme, compte tenu de son inactivation progressive, la lipase ne peut faire face à des difficultés croissantes que si elle est relativement abondante au début de l'expérience. Dans le cas contraire, les quantités restantes deviennent vite incapables de mener l'hydrolyse à son terme.

4. Le rôle des ions calcium et du taurocholate mérite également quelques commentaires. Le calcium n'est pas un véritable "activateur" de la lipolyse car il n'augmente pas sa vitesse initiale<sup>14</sup>. Il n'a pas non plus d'influence spécifique sur le déroulement de la lipolyse puisque les diagrammes des Figs. 3 et 4 sont pratiquement superposables. Par contre, le Tableau I nous apprend que sa présence permet à la lipolyse d'aller plus vite et plus loin avec des quantités moindres de lipase. Cet effet non spécifique nous paraît dû, en grande partie tout au moins, au fait que la formation de savons de calcium insolubles débarrasse l'interface des savons solubles qui l'encombrent. Le pouvoir inhibiteur considérable des savons d'ammonium est mis en évidence par le fait que les lipolyzes sans calcium au cours desquelles le pH est maintenu à 8.0 au moyen d'ammoniaque, sont extrêmement lentes. Il est donc permis de penser que les savons de sodium sont aussi des inhibiteurs pour des raisons purement stériques et que le calcium favorise la lipolyse en les éliminant.

Par contre, une publication prochaine montrera que le taurocholate est un véritable activateur. Dans les circonstances les plus favorables, il est capable de quadrupler la vitesse initiale de la lipolyse<sup>14</sup>. Notons simplement pour l'instant que l'action de ce taurocholate peut être favorable ou défavorable selon la concentration (expériences 10-12 du Tableau I).

5. Enfin, l'influence décisive exercée par la valeur du rapport lipase/triglycérides sur le taux maximum de lipolyse *in vitro* suggère que la nature des produits pénétrant dans la muqueuse, et par conséquent le mécanisme de la resynthèse intervenant dans cette muqueuse, dépendent de l'abondance relative à un moment donné de la sécrétion externe du pancréas et des triglycérides en provenance de l'estomac. Si l'arrivée des

triglycérides dans le duodénum est importante et si la sécrétion pancréatique est faible ou pauvre en lipase, on peut penser que les produits absorbés sont principalement des glycérides partiels et des acides. Dans le cas contraire, ces produits doivent être principalement du glycérol et des acides. Si cette image est exacte, les théories en apparence opposées de PFLÜGER-VERZAR<sup>15</sup> et de HOPPE SEYLER-FRAZER<sup>16</sup> concernant l'absorption intestinale des glycérides se trouveraient réconciliées.

#### RÉSUMÉ

1. La lipolyse *in vitro* des triglycérides est contrecarrée par les difficultés croissantes de l'hydrolyse et l'inactivation progressive de la lipase. Le taux maximum d'hydrolyse susceptible d'être atteint dépend donc en premier lieu des quantités d'enzyme par rapport au substrat. En augmentant les proportions initiales de la lipase, on constate que la lipolyse tend à devenir totale.

2. Même quand elle est finalement totale, la lipolyse engendre de façon transitoire des quantités considérables de glycérides partiels.

3. Le rôle "activateur" communément attribué aux ions Ca<sup>++</sup> et aux sels biliaires pendant la lipolyse est discuté.

4. Quelques incidences possibles de ces observations *in vitro* sur la nature des produits absorbés par la muqueuse intestinale et sur le mécanisme de la resynthèse des triglycérides dans cette muqueuse, sont brièvement envisagées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- <sup>2</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 561.
- <sup>3</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561.
- <sup>4</sup> F. SCHÖNHEYDER ET K. VOLQVARTZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 288.
- <sup>5</sup> F. H. MATTSON ET L. W. BECK, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 735.
- <sup>6</sup> P. SAVARY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 349.
- <sup>7</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 251.
- <sup>8</sup> B. BORGSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 557.
- <sup>9</sup> B. BORGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 491.
- <sup>10</sup> G. C. BUELL ET R. REISER, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 217.
- <sup>11</sup> G. MARCHIS-MOUREN, L. SARDA ET P. DESNUELLE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 83 (1959) 309.
- <sup>12</sup> P. DESNUELLE, M. J. CONSTANTIN ET J. BALDY, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 285.
- <sup>13</sup> P. SAVARY, J. FLANZY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 414.
- <sup>14</sup> L. SARDA, Expériences inédites.
- <sup>15</sup> F. VERZAR ET E. J. McDougall, *Absorption from the intestine*, Longmans, Green and Co., London 1936.
- <sup>16</sup> A. C. FRAZER, *Physiol. Revs.*, 26 (1946) 103.