

BBA 65672

## SUR LE RÔLE DES IONS CALCIUM DURANT L'HYDROLYSE DES TRIGLYCÉRIDES INSOLUBLES PAR LA LIPASE PANCRÉATIQUE EN PRÉSENCE DE SELS BILIAIRES

GILBERT BENZONANA

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

(Reçu le 13 juillet, 1967)

## SUMMARY

*On the role of  $\text{Ca}^{2+}$  during the hydrolysis of insoluble triglycerides by pancreatic lipase in the presence of bile salts*

Porcine pancreatic lipase (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3) is not active on long chain triglyceride emulsions stabilized by deoxycholate unless calcium ions are present.

The amount of lipase bound at the interface of the emulsified particles can be determined by measuring the activity remaining in the aqueous phase after centrifugation of the emulsion. It was shown in this way that, when bile salts are present, calcium is necessary for the adsorption of lipase at the triglyceride-water interface in the alkaline pH range where the enzyme is normally active.

A determination of the two parameters  $K_m$  and  $V$  of the reaction indicates that  $K_m$  varies proportionally to the reciprocal value of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration whereas  $V$  remains constant. Hence, calcium is bound by lipase rather than by the substrate. The  $K_m$  of the reaction at pH 9.0 and  $37^\circ$  is  $0.25 \pm 0.03 \text{ m}^2/\text{l}$  in the presence of 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Under the same conditions, the association constant of calcium for lipase is  $1.2 \cdot 10^4 (\text{moles/l})^{-1}$  and the association constant of the complex lipase-calcium for the emulsified substrate is  $5.0 (\text{m}^2/\text{l})^{-1}$ .

It is possible that the role of calcium is to compensate the electrostatic repulsion existing between the negatively charged lipase molecule and the ionised carboxyls of the bile salts situated at the interface of the emulsified triglyceride particles.

## INTRODUCTION

La lipase pancréatique provoque une hydrolyse très rapide des triglycérides émulsifiés dans l'eau. Il a été montré dans ce laboratoire que la première étape de la catalyse est une adsorption de l'enzyme à l'interface triglycéride-eau<sup>1,2</sup>. Lorsque tous les autres facteurs sont constants, l'aire de l'interface régit la vitesse initiale de l'hy-

drolyse comme le fait la concentration molaire du substrat pour les réactions enzymatiques ordinaires se déroulant au sein d'une phase aqueuse homogène. Quand l'interface a des dimensions réduites, une partie seulement des molécules de lipase sont adsorbées et la vitesse est faible. Quand l'interface devient plus grande pour un même poids de substrat, l'adsorption de l'enzyme et la vitesse de la réaction s'élèvent jusqu'à ce qu'une valeur maximum de la vitesse ( $V$ ) correspondant à une adsorption pratiquement totale de l'enzyme, soit atteinte. De plus, un  $K_m$  apparent peut être défini pour la lipase et déterminé expérimentalement<sup>2</sup> à la condition de remplacer la concentration du substrat par une surface par unité de volume. Nous l'appelons "concentration d'interface" et nous l'exprimons ici en mètres carrés par litre d'émulsion.

Le but de la présente étude est de montrer que la lipase pancréatique de porc fixe  $\text{Ca}^{2+}$  et de souligner l'importance de cette interaction pour l'adsorption de l'enzyme aux interfaces triglycérides-eau en présence de sels biliaries.

## TECHNIQUES

### *Obtention de lipase purifiée<sup>2-4</sup>*

Tous les essais sont réalisés à 0–4°, sauf indication contraire. Une solution à 10% d'une poudre lyophilisée de pancréas de porc<sup>4</sup> est amenée à 0.425 saturation par addition de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solide. Le précipité est repris par 15 ml d'une solution 0.75 M en NaCl et 25 mM en  $\text{CaCl}_2$  (pour 2 g de poudre initiale) et la solution est filtrée à travers une colonne de Sephadex G-200 équilibrée avec la solution précédente. Les fractions du premier pic contenant la lipase "rapide" sont additionnées de butanol (8% en vol.) puis de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.243 g/ml) afin de provoquer après centrifugation la formation d'une couche intermédiaire où la lipase se trouve concentrée. La couche ainsi isolée est dispersée dans 40 ml d'eau et elle est partiellement délipidée par addition de 0.25 vol. d'oxyde d'éthyle à 0° et 1.25 vol. (rapporté à la seule phase aqueuse) d'éthanol absolu à –15°. Après 10 min, le précipité est centrifugé à –15° et le culot est extrait par la quantité minimum d'un tampon à pH 8.0 contenant du Tris 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM et NaCl 30 mM. L'extrait est finalement chromatographié dans une colonne de 45 cm  $\times$  0.9 cm de DEAE-cellulose équilibrée avec le même tampon. Après élution des protéines cationiques, on installe un gradient linéaire de concentration de NaCl, l'émergence du pic de lipase (activité spécifique, 5000–6000) étant obtenue pour une concentration en NaCl de 50 mM. Après dialyse, la lipase purifiée est conservée en solution aqueuse à pH 8.0 (Tris 5 mM) à –20°.

### *Mesure des activités*

Les activités de la lipase sont mesurées selon une technique désormais classique<sup>5</sup> au cours de laquelle les acides gras libérés par la lipase dans une émulsion de triglycérides neutres dans la gomme arabique sont titrés en continu à pH 9.0 durant 2–3 min au moyen d'un pH-stat enregistreur Radiometer. Les vitesses initiales sont directement déduites des pentes des droites inscrites par l'appareil. La validité de cette technique dépend de deux conditions qui n'ont pas jusqu'ici fait l'objet d'un examen détaillé. La première est que les acides gras libérés doivent être complètement ionisés à pH 9.0, sinon les quantités de soude ajoutées par l'appareil seraient inférieures au nombre réel de molécules d'acides. Pour le vérifier, on prépare dans la gomme arabique

ou le désoxycholate des émulsions de triglycérides contenant environ 5% en poids d'acide oléique et on titre ces émulsions entre pH 6.0 et 10.0. On procède de la même façon avec des émulsions de triglycérides neutres et on obtient par différence la courbe de titrage de l'acide oléique au sein des émulsions. Ces courbes sont reproduites dans la Fig. 1. On voit que le  $pK$  apparent de l'acide oléique dans les particules émulsifiées (7.6–7.8) est inférieur de près d'une unité pH à celui observé dans l'éthanol absolu\*. Il en résulte que l'ionisation est complète à pH 9.0. Mais une correction doit évidemment être faite toutes les fois que l'on opère à des pH plus bas.

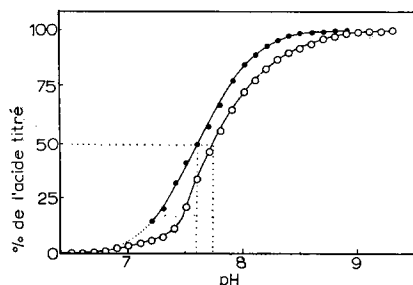


Fig. 1. Courbe de titrage de l'acide oléique dans une émulsion aqueuse de triglycérides stabilisée par la gomme arabique ou le désoxycholate. Les courbes sont obtenues par différence entre le titrage d'une émulsion de triglycérides neutres et une émulsion de ces mêmes triglycérides additionnés de 5% en poids d'acide oléique. Cercles blancs: Les émulsions, stabilisées par la gomme arabique, sont celles utilisées pour le test quantitatif de la lipase. Concentration finale des réactifs: gomme arabique, 3.3%; sels biliaires de boeuf, 0.17% (poids/vol.). Cercles noirs: Les émulsions, stabilisées par le désoxycholate, sont celles utilisées lors de la détermination des paramètres cinétiques de la lipase\*. Concentration finale des réactifs: désoxycholate, 4.15 mM; NaCl, 0.1 M;  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM. La courbe correspondante est interrompue à partir de pH 7, au-dessous duquel le désoxycholate devient insoluble. Les titrages sont faits à 37°.

La deuxième condition est que la vitesse à laquelle le pH-stat injecte la soude dans le mélange triglycérides-lipase, représente bien la vitesse réelle d'hydrolyse des liaisons ester. Autrement dit, il faut que cette dernière soit bien le facteur limitant de l'opération, et non les capacités de l'appareil ou la vitesse de neutralisation des acides. On le vérifie en observant, d'une part, que l'injection de soude s'interrompt fréquemment durant le dosage et, d'autre part, que l'appareil titre une émulsion acide à sa vitesse maximum avec un arrêt brusque au point d'équivalence.

Une unité lipase est définie comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer 1  $\mu$ mole d'acide gras par min dans une émulsion de triglycérides dans la gomme arabique en présence de sels biliaires de boeuf. La vitesse maximum  $V$  obtenue avec cette même quantité de lipase agissant sur une émulsion de triglycérides suspendus dans le désoxycholate est supérieure à 1  $\mu$ mole d'acide gras libéré par min.

#### Préparation des réactifs

**Triglycérides.** Les triglycérides de l'huile d'olive commerciale sont purifiés par l'une ou l'autre des techniques suivantes: (a) Elimination des acides gras libres par l'Amberlite IRA-400. Une solution de 50 g d'huile dans 400 ml d'oxyde d'éthyle dé-

\* G. AILHAUD, expériences non publiées.

peroxydé est chromatographiée dans une colonne (diamètre 3 cm) contenant à sa partie inférieure 10 g (poids sec) d'Amberlite IR-120 forme  $H^+$  et au-dessus 70 g (poids sec) d'Amberlite IRA-400 forme  $OH^-$  préalablement lavée à l'éthanol absolu puis à l'oxyde d'éthyle. L'Amberlite IR-120 est destinée à fixer les impuretés basiques abandonnées par l'IRA-400. Après évaporation de l'éluat sous vide à 25° sous azote, l'huile est conservée à 4° également sous azote. Son acidité résiduelle calculée pour un poids moléculaire moyen des acides gras de 280, est inférieure à 0.01%.

(b) Isolement de la fraction triglycéridique par chromatographie sur Florisil<sup>6</sup>. Cette technique a l'avantage d'éliminer, non seulement les acides libres, mais aussi les diglycérides, les monoglycérides, les phospholipides et les pigments de l'huile. La pureté de la fraction triglycéridique est contrôlée par chromatographie en couche mince de silicagel étalée sur une lame de microscope<sup>7</sup> dans le système oxyde d'éthyle-éther de pétrole-acide acétique (40:60:0.1, v/v/v). On y décèle uniquement une faible quantité d'insaponifiable.

*Sels biliaires.* Le mélange désigné sous le nom de "sels biliaires" est obtenu à partir de bile de boeuf<sup>2</sup>. Il contient les acides taurocholique, taurodésoxycholique, glycocholique et glycodésoxycholique avec une trace d'acide cholique. Il est dépourvu de cholestérol et de pigments. L'acide désoxycholique est un produit commercial (Fluka ou Schuchard) que l'on recristallise<sup>8</sup> dans un mélange acétone-eau (80:20, v/v). Sa pureté, contrôlée par chromatographie sur couche mince de silicagel<sup>9</sup>, est supérieure à 99.5%. Il sert à préparer les solutions de désoxycholate de Na selon une technique déjà décrite<sup>2</sup>.

### *Préparation des émulsions*

La qualité essentielle des émulsions est naturellement d'être attaquée par la lipase à une vitesse élevée. Deux types sont néanmoins préparés, l'un destiné au dénombrement des particules émulsifiées au moyen du compteur électronique Coulter<sup>2</sup>, l'autre devant résister à une centrifugation à  $6000 \times g$  pour la mesure de l'adsorption de la lipase sur les particules. La préparation du premier type a déjà été décrite<sup>2</sup>. L'autre exige l'utilisation de gomme arabique sans laquelle les émulsions ne sont pas assez stables. Mais, étant donné les difficultés qu'elle cause lors des mesures cinétiques, on l'élimine en grande partie par des lavages répétés avec une solution de désoxycholate. 2 g de triglycérides sont émulsifiés à 0° durant 2 fois 30 sec dans 15 ml de gomme arabique à 10% au moyen d'un générateur à ultrasons Branson S 125 équipé d'une micropointe. On dilue l'émulsion par son volume d'eau, on la centrifuge durant 10 min à  $500 \times g$  et on remplace le liquide sous-jacent par le même volume de désoxycholate 4.15 mM. On lave 3 fois de la même façon et on dilue la crème finalement obtenue par un volume convenable de désoxycholate 4.15 mM pour obtenir une émulsion de base que l'on conserve jusqu'à son utilisation.

### *Microdosage du calcium*

Le dosage<sup>10-12</sup> est basé sur la fluorescence que possède la calcéine sous lumière ultraviolette à pH fortement basique en présence de  $Ca^{2+}$  et sur la disparition brusque de cette fluorescence au moment où la totalité de  $Ca^{2+}$  est complexé à l'aide, par exemple, d'une solution titrée d'EDTA.

## RÉSULTATS

*Influence des ions calcium sur la vitesse de lipolyse en présence de sels biliaries*

L'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une émulsion de triglycérides dans la gomme arabique ne provoque aucune variation de vitesse lors de l'hydrolyse de ce substrat par la lipase pancréatique. Nous montrerons en outre dans une publication ultérieure que le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas nécessaire à la manifestation de l'activité lipasique sur une émulsion de triglycérides purs stabilisée par une très faible quantité de savons et en l'absence de sels biliaries. La Fig. 2 montre, par contre, l'influence considérable qu'exercent ces ions dans le cas où l'émulsion est stabilisée par le désoxycholate. Il est important de noter

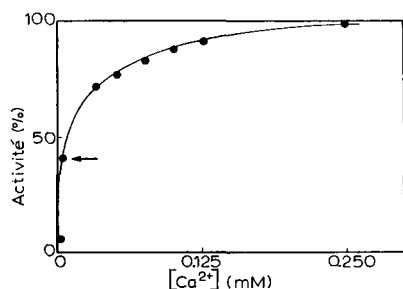


Fig. 2. Variation de la vitesse en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour chaque essai, 0,3 ml. (80 mg de triglycérides) de l'émulsion stabilisée par le désoxycholate (voir le chapitre précédent) est diluée à 40 ml par une solution contenant du désoxycholate, du NaCl et éventuellement du  $\text{CaCl}_2$ . Les concentrations finales de désoxycholate et de NaCl sont 4,15 mM et 0,1 M, respectivement. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  varie de 0,00 à 0,25 mM, la concentration nulle étant obtenue en complexant les ions présents dans les réactifs par une quantité équivalente d'EDTA. Les émulsions sont amenées à pH 9,0 et 37°. On ajoute chaque fois 4,5 unités lipase et on enregistre la vitesse de l'hydrolyse au moyen d'un pH-stat réglé à pH 9,0. La flèche indique la vitesse mesurée lorsque l'émulsion est utilisée telle quelle, sans addition de  $\text{CaCl}_2$  ou d'EDTA.

que les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration d'interface<sup>2</sup> constante. Les ordonnées de la figure ne doivent donc pas être considérées *a priori* comme des vitesses maximum en présence de concentrations saturantes de substrat, mais comme les vitesses réellement mesurées dans les conditions expérimentales choisies.

La flèche de la Fig. 2 indique la vitesse observée lorsque les réactifs constituant l'émulsion sont utilisés directement sans ajout de complexant ou de  $\text{Ca}^{2+}$ . On voit que cette vitesse est à peu près la moitié de celle obtenue en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 mM. Toutefois, en dépit des traitements de purification qui leur ont été appliquées, les composants de l'émulsion renferment encore des traces de  $\text{Ca}^{2+}$  décelables par un dosage à la calcéine. Ce dosage, dans les conditions où il est effectué, est spécifique de  $\text{Ca}^{2+}$ . Seul  $\text{Sr}^{2+}$  peut éventuellement interférer dans ces conditions opératoires<sup>10</sup>. En complexant ces ions par une quantité équivalente d'EDTA (rapport molaire 1:1), on diminue à nouveau la vitesse jusqu'à la faire passer au-dessous de 5% de sa valeur normale. On peut donc dire que l'hydrolyse des triglycérides par la lipase au sein d'une émulsion dans le désoxycholate dépend de façon absolue de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Rôle des ions calcium dans la fixation de la lipase sur les particules émulsifiées*

Les résultats précédents peuvent signifier que le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient au cours de la

fixation de la lipase à la surface de l'émulsion ou au cours de l'une des étapes ultérieures du processus catalytique. Pour en décider, l'adsorption de la lipase par l'émulsion en présence de concentrations variables de  $\text{Ca}^{2+}$  a été étudiée par la technique de centrifugation déjà utilisée dans notre précédente publication<sup>2</sup>. Cette technique consiste à centrifuger à  $6000 \times g$  durant 10 min des émulsions contenant des quantités données de lipase. La centrifugation fait monter à la surface les particules émulsifiées qui entraînent la fraction de l'enzyme qui est adsorbée. Comme les émulsions ont été débarrassées au préalable de leurs particules les plus fines par des lavages répétés avec du

TABLEAU I

ADSORPTION DE LA LIPASE SUR L'ÉMULSION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN  $\text{Ca}^{2+}$

pH	Concentration $\text{Ca}^{2+}$ (mM)	Nombre d'unités lipase		Adsorption (%)
		Ajoutées à l'émulsion	Retrouvées dans la phase aqueuse	
5.3	0.5	14.0	1.9	86
	0.0*	14.2	2.1	85
	0.0*	14.5	1.3	90
7.5	0.5	8.8	1.8	80
	0.25	8.1	2.3	72
	0.0	10.6	10.1	5
9.0	0.5	8.4	3.3	60
	0.25	7.4	4.5	39
	0.0	7.7	7.2	7

\* L'excès molaire d'EDTA par rapport au  $\text{Ca}^{2+}$  est de 45 fois dans le premier essai et de 80 fois dans le second.

désoxycholate (voir plus haut), les phases aqueuses sous-jacentes sont limpides. On y dose l'activité restante et on en déduit les quantités de lipase adsorbée. Ces quantités sont indiquées dans le Tableau I en fonction du pH et de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour les essais à pH 7.5 et 9.0, l'émulsion (0.2 ml correspondant à 5 mg de triglycérides) préparée spécialement en vue de la centrifugation est diluée avec 3.8 ml d'un tampon Tris 10 mM contenant du NaCl 0.1 M et du désoxycholate 4.15 mM. On ajoute  $\text{CaCl}_2$  ou EDTA afin d'ajuster la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à la valeur désirée. Pour les essais à pH 5.3, on dilue l'émulsion avec un tampon acétate 12.5 mM contenant du NaCl 0.1 M. Le désoxycholate, qui est insoluble à pH acide, est remplacé par une quantité équivalente de sels biliaires de boeuf. De plus, la faible affinité de l'EDTA pour le  $\text{Ca}^{2+}$  à bas pH est compensée en utilisant un excès de 45–80 fois par rapport à la quantité calculée<sup>13</sup>. Dans chaque cas, la lipase est incubée à 0° durant 10 min avec l'émulsion avant d'être centrifugée également à 0°.

Le Tableau I confirme en premier lieu une observation antérieure<sup>2</sup> selon laquelle la lipase s'adsorbe mieux sur les particules émulsifiées de triglycérides à pH acide qu'à pH neutre ou alcalin. Mais le fait le plus frappant est sans doute que, dans ces deux derniers domaines de pH où la lipase est normalement active, le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle déterminant lors de son adsorption. L'adsorption de l'enzyme est en effet de 60–80% en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  50 mM. Elle tombe à 5–7% en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est donc dès

maintenant fort probable que l'effet de  $\text{Ca}^{2+}$  sur la lipolyse d'émulsions stabilisées par le désoxycholate est essentiellement dû à leur influence favorable lors de l'étape primaire d'adsorption.

On notera qu'au contraire, l'adsorption de la lipase à pH acide ne semble pas dépendre de la présence du calcium.

#### *Etude cinétique des interactions de la lipase avec les ions calcium*

On a déterminé l'influence de  $\text{Ca}^{2+}$  sur les paramètres cinétiques  $V$  et  $K_m$  de la réaction de lipolyse en faisant varier la concentration de ces ions entre des limites aussi larges que possible. Tous les autres facteurs susceptibles d'intervenir dans le processus catalytique, tels que la concentration en NaCl et en désoxycholate, la température et

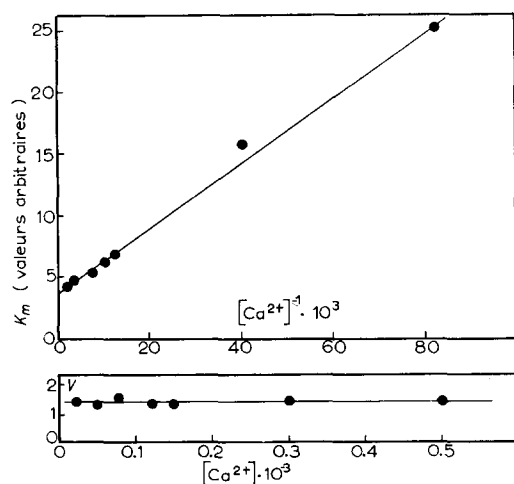
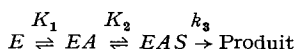


Fig. 3. Influence de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  sur les paramètres cinétiques  $V$  et  $K_m$  de la réaction. Pour chaque concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , les paramètres  $V$  et  $K_m$  sont déterminés par la technique de Lineweaver-Burk en portant l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration d'interface. Cette concentration est exprimée ici en unités arbitraires correspondant à des dilutions différentes d'une même émulsion de base, ce qui explique l'expression de  $K_m$  elle aussi en unités arbitraires. Dans tous les essais, les concentrations du désoxycholate et de NaCl sont 4.15 mM et 0.1 M, respectivement. Le pH est 9.0 et la température 37°. Les quantités de lipase sont comprises entre 4.5 et 6.7 unités. Le volume total est 40 ml.  $V$  est la vitesse maximum exprimée en  $\mu\text{moles}$  d'acides gras libérés par 1 unité lipase durant 1 min.

le pH ont été maintenus constants. Les résultats de l'étude sont donnés par la Fig. 3.

La Fig. 3 montre que  $V$  est indépendant de la concentration du calcium alors que  $K_m$  est proportionnelle à l'inverse de sa valeur. Cette observation est compatible avec l'étude qualitative précédente indiquant que le calcium intervient dans l'étape primaire d'adsorption de l'enzyme sur son substrat. Mais elle nous permet de pousser l'analyse un peu plus loin en indiquant que le calcium se fixe sur l'enzyme et non sur le substrat.

S'il en est bien ainsi, en effet, on peut écrire :



où  $E$ ,  $A$  et  $S$  sont, respectivement, l'enzyme, l'activateur (dans ce cas, le calcium) et le substrat.  $K_1$  et  $K_2$  sont des constantes d'équilibre,  $k_3$  est la constante de vitesse de la dernière étape. La vitesse ( $v$ ) de la réaction est alors donnée par l'équation:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{\frac{1 + K_1[A]}{K_1K_2[A]} + [S]}$$

où  $E_0$  est la quantité totale d'enzyme et les grandeurs entre crochets correspondent à des concentrations (molaires pour l'activateur et l'enzyme, en surface par unité de volume pour le substrat insoluble).

En assimilant l'équation précédente à une équation de Michaelis, il vient:

$$V = k_3[E_0]$$

$$K_m = \frac{1 + K_1[A]}{K_1K_2[A]} = \frac{1}{K_1K_2} \times \frac{1}{[A]} + \frac{1}{K_2}$$

L'hypothèse est donc conforme aux faits expérimentaux. Si le calcium se fixe sur la lipase pour donner un complexe lipase-calcium,  $V$  doit effectivement être indépendant de la concentration de l'activateur et  $K_m$  varier comme l'inverse de cette concentration.

## DISCUSSION

Le cas des émulsions des triglycérides dans le désoxycholate paraît à première vue être un cas particulier puisqu'on peut préparer des émulsions stables à l'aide de nombreux autres émulsifiants. Toutefois, les sels biliaires sont présents dans l'intestin en même temps que les triglycérides d'origine alimentaire et ils sont considérés souvent comme les émulsifiants "naturels" de ces triglycérides. On doit donc s'attendre à ce qu'une partie au moins des résultats exposés ci-dessus soient applicables dans les conditions de la lipolyse *in vivo*.

Nos connaissances sur le rôle de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le phénomène de lipolyse sont encore fragmentaires. Lorsqu'ils sont utilisés en très grosses quantités, ces ions permettent à la lipolyse *in vitro* de progresser jusqu'au stade des monoglycérides<sup>14</sup>. En outre, ils paraissent améliorer la stabilité de la molécule de lipase à l'égard de l'inactivation thermique<sup>13</sup>. Le mérite de l'étude précédente est de démontrer pour la première fois que la lipase fixe  $\text{Ca}^{2+}$  et que cette fixation préalable est indispensable pour que l'enzyme puisse s'adsorber aux particules émulsifiées de triglycérides dans le cas particulier où ces particules sont stabilisées par des sels biliaires.

On sait qu'il est possible d'exprimer numériquement le  $K_m$  de la réaction de lipolyse en milieu hétérogène dès que l'on a déterminé l'aire de l'interface de l'émulsion au moyen, par exemple, d'un compteur électronique Coulter<sup>2</sup>. L'opération, réalisée dans un volume de 40 ml à pH 9.0 et 37° en présence de désoxycholate 4.15 mM, NaCl 0.1 M et  $\text{CaCl}_2$  0.3 mM avec 5 unités de lipase pour des concentrations d'interface allant de 0.025 à 0.41 m<sup>2</sup>/l, fournit une valeur de  $K_m$  égale à  $0.25 \pm 0.03$  m<sup>2</sup>/l. Si la lipase était saturée en calcium,  $K_m$  serait égal à  $1/K_2$  et sa valeur serait 0.2 m<sup>2</sup>/l. SCHØNHEYDER ET VOLQVARTZ<sup>15</sup> ont déterminé le  $K_m$  de la réaction de lipolyse de la tricaproïne dans des conditions où la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  (8 mM) est probablement saturante. Le système utilisé par ces auteurs ne diffère pas essentiellement du nôtre



puisqu'il comporte du NaCl 0.1 M et du taurocholate 0.1 mM. La valeur de  $K_m$  trouvée à pH 7.5 et à 30° est 0.05 m<sup>2</sup>/l. On serait donc tenté de conclure que le  $K_m$  de la lipase diminue d'environ 5 fois lorsque la longueur des chaînes du substrat triglycérique passe de 18 à 6 carbones. La valeur relative à la tricaproïne risque cependant de comporter une large marge d'incertitude car SCHÖNHEYDER ET VOLQVARTZ ont estimé l'interface de leurs émulsions par des observations au microscope optique. Cette technique n'est certainement pas aussi précise que le comptage électronique qui permet à la fois d'abaisser le diamètre minimum des particules observables, d'opérer sur un nombre de particules de 10 à 100 fois supérieur et d'augmenter à volonté le nombre des mesures relatives à une même émulsion.

La détermination de  $K_m$  permet en outre de calculer  $K_1$  et  $K_2$  à l'aide des données cinétiques précédentes:

$$K_1 = 1.2 \cdot 10^4 \text{ (moles/l)}^{-1}$$

$$K_2 = 5 \text{ (m}^2/\text{l)}^{-1}$$

$K_1$  est la constante d'affinité de la lipase pour le calcium dans les conditions opératoires utilisées. On voit qu'elle est relativement faible, ce qui explique pourquoi l'EDTA complexe aussi facilement le calcium en présence de lipase. C'est aussi sans doute une des raisons pour lesquelles l'enzyme ne s'adsorbe jamais complètement sur les particules émulsifiées, même lorsque l'interface et la concentration du calcium sont en large excès.

La constante  $K_1$  peut d'ailleurs être calculée à partir des données du Tableau I, en faisant uniquement appel à des considérations d'adsorption. Il suffit en effet d'admettre que la quantité de lipase adsorbée correspond au nombre de molécules du complexe lipase-calcium ( $EA$ ). Pour une adsorption de 50%, on peut alors écrire  $[E] = [EA]$  et l'équation  $K_1 = [EA]/[E][A]$  devient  $K_1 = 1/[A]$ . Or, en se rapportant au Tableau I, on trouve que la lipase est adsorbée à 50% pour une concentration en calcium de  $0.3 \cdot 10^{-4}$  M à pH 9 et de  $1.0 \cdot 10^{-4}$  M à pH 7.5. Etant donné les incertitudes des expériences du Tableau I et leur nombre limité, on peut dire que l'accord entre les deux évaluations de  $K_1$  est très satisfaisant.

Le nombre d'ions calcium fixés par une molécule de lipase ne peut encore être précisé. Le fait de savoir pourquoi le complexe lipase-calcium est capable de s'adsorber aux interfaces triglycérides-eau, alors que la lipase seule en est incapable en présence de sels biliaires, mériterait aussi d'être étudié. Une hypothèse est que les charges négatives portées par les carboxyles ionisés des molécules de sels biliaires empêchent à pH 9.0 ou 7.5 l'approche de la molécule de lipase dont le point isoélectrique est 5.2 et qui possède par conséquent elle-même une charge négative dans cette région de pH. Le  $\text{Ca}^{2+}$  contrebalance peut-être les répulsions électrostatiques et crée des points d'ancrage pour la lipase comme on l'a suggéré par exemple dans le cas de la phospholipase A du venin de serpent<sup>16</sup>. Cette hypothèse, dont la validité reste à démontrer, est en tout cas compatible avec le fait que le calcium n'est pas indispensable à pH 5.3 où la lipase est isoélectrique<sup>17</sup> et les carboxyles de l'interface ne sont pas ionisés<sup>18</sup>.

## RÉSUMÉ

La lipase pancréatique de porc n'est pas active en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  sur les émulsions de triglycérides à longues chaînes stabilisées par du désoxycholate.

La quantité de lipase fixée à l'interface des particules émulsifiées peut être déterminée en mesurant l'activité restant dans la phase aqueuse des émulsions après centrifugation de celles-ci. Il peut être ainsi montré que le calcium est nécessaire en présence de sels biliaires pour la fixation de la lipase à l'interface triglycérides-eau dans le domaine des pH alcalins où l'enzyme est normalement actif.

Une étude cinétique indique que le  $K_m$  de la réaction de lipolyse est inversement proportionnel à la concentration du calcium alors que  $V$  reste constant. Par conséquent, le calcium est fixé par la lipase plutôt que par le substrat. Le  $K_m$  de la réaction à pH 9.0 et 37° en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  0.3 mM est  $0.25 \pm 0.03 \text{ m}^2/\text{l}$ . Dans les mêmes conditions, la constante d'association du calcium pour la lipase est  $1.2 \cdot 10^4 (\text{moles/l})^{-1}$  et la constante d'association du complexe lipase-calcium pour le substrat émulsifié est  $5.0 (\text{m}^2/\text{l})^{-1}$ .

Il est possible que le rôle du calcium soit de compenser la répulsion électrostatique qui doit exister entre la lipase chargée négativement à pH 9.0 et les carboxyles ionisés des sels biliaires se trouvant à l'interface des particules émulsifiées.

#### REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Mrs. P. DESNUELLE et M. LAZDUNSKI pour leurs conseils durant la réalisation de ce travail et la rédaction du manuscrit. Il remercie également le Centre National de la Recherche Scientifique et le National Institute of Health (U.S.A.) pour leur soutien financier.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. SARDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 513.
- 2 G. BENZONANA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 105 (1965) 121.
- 3 L. SARDA, M. F. MAYLIÉ, J. ROGER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 183.
- 4 G. BENZONANA, B. ENTRESSANGLES, G. MARCHIS-MOUREN, L. PASÉRO, L. SARDA ET P. DESNUELLE, dans R. M. C. DAWSON ET D. N. RHODES, *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, Wiley, London, 1964, p. 141.
- 5 P. DESNUELLE, M. J. CONSTANTIN ET J. BALDY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37 (1955) 285.
- 6 K. K. CARROLL, *J. Lipid Res.*, 2 (1961) 135.
- 7 J. J. PEIFFER, *Mikrochim. Acta*, (1962) 529.
- 8 A. F. HOFMANN, *Acta Chem. Scand.*, 17 (1963) 173.
- 9 A. F. HOFMANN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 127.
- 10 E. A. STEIN, J. HSIU ET E. H. FISHER, *Biochemistry*, 3 (1964) 56.
- 11 H. DIEHL ET J. L. ELLINBOE, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 882.
- 12 S. J. SOCOLAR ET J. I. SALACH, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 473.
- 13 E. D. WILLS, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 481.
- 14 P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561.
- 15 F. SCHÖNHEYDER ET K. VOLQVARTZ, *Acta Physiol. Scand.*, 9 (1945) 57.
- 16 R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 88 (1963) 414.
- 17 L. SARDA, G. MARCHIS-MOUREN, M. J. CONSTANTIN ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 264.
- 18 G. BENZONANA, Thèse de Doctorat, Marseille, 1967.