

solution de 3,8 g de  $\text{LiAlH}_4$  (0,1 mole) dans 100 cm<sup>3</sup> d'éther anhydre. La réduction est effectuée comme dans le cas précédent; on chauffe cependant pendant 2 h. le mélange réactionnel. L'huile brune obtenue après l'extraction éthanolique ne cristallise pas, mais elle présente une forte réaction alcaline. On l'épuise plusieurs fois par de l'acétate d'éthyle bouillant légèrement acidifié avec de l'acide acétique. Par refroidissement, on obtient de fines aiguilles incolores dont le F. (153—154°) ne change pas après recristallisation de l'acétate d'éthyle. Le produit est très soluble dans l'eau et l'éthanol, peu dans l'acétate d'éthyle, insoluble dans l'acétone et l'éther. Sa solution aqueuse est neutre, et l'analyse montre qu'il s'agit de l'acétate d'un phényl-3-sérinol.

$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ , $\text{CH}_3\text{COOH}$	Calculé C 58,15	H 7,49	N 6,16	$\text{H}_2\text{O}$ 0%
(227)	Trouvé „	58,19	„ 7,54	„ 6,15 „ 0%

En vue de déterminer la configuration stérique de ce produit, on en a acétylé 200 mg dans 3 cm<sup>3</sup> de pyridine et 1 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique. Les cristaux du dérivé triacétylé fondent à 115°. Le produit initial possède donc la configuration érythro<sup>1)</sup>.

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}$	Calculé C 61,43	H 6,48	N 4,77%
(293)	Trouvé „	61,28	„ 6,59 „ 4,97%

### RÉSUMÉ.

Le traitement du phénylhydrazone-2-benzoylacétate d'éthyle par l'hydrure de lithium et d'aluminium conduit presque exclusivement à la phénylhydrazone de l'aldéhyde benzoïque, confirmant ainsi le comportement général des produits  $\beta$ -amino- $\alpha, \gamma$ -dicarbonylés au cours de leur réduction. Nous montrons cependant que la réduction de l'isonitroso-2-benzoylacétate d'éthyle par  $\text{LiAlH}_4$  en allo-DL-phényl-3-sérinol est possible dans certaines conditions.

Institut de chimie de l'Université de Zurich.

## 229. Recherches sur la cholestérollestérase des villosités intestinales

par E. F. Metzger et P. Favarger.

(21 VII 52)

### Introduction.

Le métabolisme du cholestérol, si l'on considère son côté purement lipidique et non hormonal, dépend de l'action des cholestérol-estérases. Ces enzymes, qui estérifient le cholestérol ou hydrolysent les esters du cholestérol, ont deux fonctions dépendant plus ou moins l'une de l'autre. L'enzyme est destiné d'une part à maintenir dans les tissus la proportion des deux formes compatible avec la structure et les fonctions physico-chimiques de ces milieux, mais la cholestérollestérase joue d'autre part un rôle plus spécifique dans la résorption et le transport des acides gras et du cholestérol lui-même. Dans le cadre de ce travail, nous ne nous intéresserons qu'au tube digestif et aux phénomènes de résorption.

<sup>1)</sup> J. Controulis, M. Rebstock & H. M. Crooks, Am. Soc. **71**, 2463 (1949).

Dans l'intestin, le cholestérol et ses esters sont soumis à l'action des enzymes pancréatique et intestinal.

En 1916, *Mueller*<sup>1)</sup> expliquait le premier la présence des esters du cholestérol dans la lymphe par l'action d'un ferment pancréatique, et remarquait que la muqueuse intestinale n'a pas d'activité enzymatique. *Froehlicher & Süllmann*<sup>2)</sup> estimaient en revanche que les esters de la lymphe étaient formés dans les cellules épithéliales de l'intestin. *Klein*<sup>3)</sup> fut le premier à mettre en évidence une activité cholestérolestérasique dans la paroi intestinale; il observa une hydrolyse.

En 1949, *Nieft*<sup>4)</sup> prépare un extrait de muqueuse intestinale qui hydrolyse les esters. Il peut aussi réaliser une estérisation au moyen d'un extrait provenant de rats nourris pendant deux ou trois semaines avec un régime contenant 1% de lanoline.

Par un procédé d'extraction un peu différent, *Swell, Byron & Treadwell*<sup>5)</sup> isolent de la muqueuse intestinale un système enzymatique qui paraît plus actif que celui de *Nieft*. Leur extrait exerce son action soit dans le sens de l'hydrolyse, soit dans celui de l'estérisation, sans qu'il soit nécessaire de nourrir les rats avec du cholestérol. L'activité augmente si les rats reçoivent un régime riche en graisse; elle diminue si les rats sont dépancréatisés. Les auteurs en déduisent que l'enzyme de la muqueuse provient en réalité de la sécrétion pancréatique.

*Le Breton*<sup>6)</sup>, qui étudia l'action d'un extrait de la glande pancréatique et celle du suc pancréatique, conclut que le cholestérol s'estérifie dans la lumière intestinale.

Toutes ces recherches utilisent des préparations enzymatiques et des substrats souvent artificiels. Beaucoup de travaux sur la cholestérolestérase pancréatique furent exécutés au moyen d'extraits de l'organe, c'est-à-dire avec un mélange d'enzymes endo- et exocellulaires. Leurs résultats ne nous permettent pas de prévoir dans quel sens la réaction se produira *in vivo* à l'extérieur ou à la surface des cellules épithéliales.

Nous avons repris ces essais en procédant de la manière suivante: le substrat est constitué par du sérum humain inactivé, qui a de grands avantages sur les substrats artificiels. Nos sources d'enzymes sont soit les villosités intestinales de Rat râclées et rapidement lavées, soit un homogénéisat de ces villosités. Ces conditions nous paraissent moins artificielles que celles qui furent adoptées antérieurement.

Dans tous nos essais, et quelles que soient les conditions, la réaction se produit dans le sens de l'hydrolyse. Nous n'avons jamais observé une estérisation.

### Partie expérimentale.

Nous avons employé pour nos expériences des rats albinos adultes des deux sexes. Leur poids variait entre 180 et 250 g.

Ces rats reçoivent une nourriture composée de 15% de farine de viande, 85% de grain, correspondant à 26% de protéines, 6% de graisse, 48% de glucides, et 12% d'eau.

*Prélèvement du tissu.* Après avoir tué les rats par un coup sur la nuque, on prélève immédiatement l'intestin grêle que l'on ouvre longitudinalement. L'intestin est lavé dans une solution physiologique de *Krebs*.

Par un léger râclage, on prélève les villosités, on les met dans quelques cm<sup>3</sup> de solution physiologique et on centrifuge 30 secondes à 1000 g pour séparer les graisses.

<sup>1)</sup> *J. H. Mueller*, *J. Biol. Chem.* **27**, 463 (1916).

<sup>2)</sup> *E. Froelicher & H. Süllmann*, *Bioch. Z.* **274**, 21 (1934).

<sup>3)</sup> *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **259**, 268 (1939).

<sup>4)</sup> *M. L. Nieft*, *J. Biol. Chem.* **177**, 151 (1949).

<sup>5)</sup> *L. Swell, J. E. Byron & C. R. Treadwell*, *J. Biol. Chem.* **186**, 543 (1950).

<sup>6)</sup> *E. Le Breton & J. Pantaleon*, *Arch. Sci. Physiol.* **1**, 63 (1947).

On jette le surnageant et passe les villosités (culot de centrifugation) à travers une gaze. On les suspend ensuite dans la solution physiologique. Pour certains essais, les villosités sont broyées au moyen de l'appareil de *Potter*<sup>1)</sup>.

Cette suspension de villosités, homogénéisée ou non, nous sert de source d'enzyme.

*Substrat.* Nous utilisons du sérum sanguin humain inactivé à 56—60° pendant 1 h.

*Incubation.* Les essais biologiques ont été réalisés de la façon suivante: à 3 cm<sup>3</sup> de substrat, on ajoute 25 mg de glycocholate de sodium (qui agira comme activateur), 0,9 cm<sup>3</sup> d'une solution physiologique ou d'un tampon phosphate, et enfin 0,1 cm<sup>3</sup> d'une suspension de villosités intestinales, préparée comme décrit ci-dessus. Pour les essais destinés à établir la courbe d'hydrolyse en fonction du temps, il est nécessaire d'augmenter ces quantités pour pouvoir faire plusieurs prélèvements. Immédiatement après l'adjonction des villosités, on secoue l'essai énergiquement pour le rendre homogène et on en prélève 1,3 cm<sup>3</sup> pour doser le cholestérol libre et total. Cette analyse nous donnera les valeurs pour le temps 0. Le reste de l'essai est incubé dans un bain à 37° où il sera agité pour que le milieu reste aussi homogène que possible. Après quelques heures, on fera un deuxième prélèvement qui servira à une seconde analyse.

*Analyse du cholestérol et de ses esters.* Le cholestérol sérique et ses esters sont dosés selon la méthode colorimétrique de *Schoenheimer & Sperry*<sup>2)</sup>. Nous avons suivi quelques-unes des modifications apportées à la méthode par *Sobel & Mayer*<sup>3)</sup>.

Les lectures colorimétriques ont été effectuées au moyen d'un absorptiomètre photoélectrique *Hilger-Spekker*, et nous avons utilisé un filtre Ilford (6600 à 7000 Å).

Toutes les analyses sont faites à double. La précision de la méthode et de  $\pm 2\%$ .

*Activation de l'hydrolyse par le glycocholate de sodium.* Nous avons effectué des essais avec des concentrations croissantes de cet activateur. Ces chiffres n'ont qu'une valeur relative, car d'après *Tayeau*<sup>4)</sup>, l'activité des sels biliaires est fortement augmentée si ceux-ci sont en liaison avec les protéines.

**Tableau 1.**  
Hydrolyse en fonction du temps.

% de glycocholate de Na	Hydrolyse après			
	0 h.	1 h.	4 h.	6 h.
5% <sub>00</sub>	0%	12%	23%	35%
12% <sub>00</sub>	0%	8%	29%	36%
25% <sub>00</sub>	0%	10%	28%	41%

**Tableau 2.**  
Hydrolyse en 4 h. en fonction de la concentration en glycocholate.

Rat N°	Glycocholate de Sodium		
	5% <sub>00</sub>	12% <sub>00</sub>	25% <sub>00</sub>
117	Hydr. 7%	Hydr. 13%	Hydr. 25%
118	„ 95%	„ 78%	„ 77%
119	„ 34%	„ 42%	„ 39%
120	„ 10%	„ 69%	„ 65%
130	„ 61%	„ 65%	„ 66%
131	„ 35%	„ 36%	„ 41%

<sup>1)</sup> V. R. Potter & C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. **114**, 495 (1936).

<sup>2)</sup> R. Schoenheimer & W. M. Sperry, J. Biol. Chem. **106**, 745 (1934).

<sup>3)</sup> A. E. Sobel & M. Mayer, J. Biol. Chem. **157**, 258 (1945).

<sup>4)</sup> F. Tayeau & R. Nivet, J. de Physiol. **43**, 876 (1951).

*Influence du pH sur l'hydrolyse des esters du cholestérol.* Nous ajoutons au milieu réactionnel un tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), dont le pH varie de 3,3 à 8,0. Il est choisi de façon que le pH final s'établisse de 6,3 à 8,4, après mélange avec le sérum et la préparation enzymatique.

Toutes les mesures de pH sont effectuées avec un pH-mètre *Beckman*, modèle G.

**Tableau 3.**  
Influence du pH sur l'hydrolyse.

	pH 6,3—6,5	pH 6,8	pH 7—7,5	pH 7,5—7,7	pH 8,4—8,7
Moyenne de 8 rats	hydr. 30,8%	hydr. 48%	hydr. 59%	hydr. 50%	hydr. 23%

*Influence de la concentration de l'enzyme.* L'importance de l'hydrolyse des esters croît avec la quantité d'enzyme présent dans l'essai. S'il y a suffisamment d'enzyme, tous les esters peuvent être scindés. L'homogénéisation ne semble pas avoir d'influence sur l'ampleur de l'hydrolyse. En effet, si pour un même rat on homogénéise une partie des villosités au moyen de l'appareil de *Potter & Elvehjem*, l'activité sera sensiblement la même que celle de la partie non broyée. *Essai:* 3  $\text{cm}^3$  sérum sanguin + 25 mg glycocholate de sodium + solution de *Krebs* pour compléter le volume de l'essai à 4  $\text{cm}^3$ . Durée de l'incubation: 4 h.

L'azote des préparations enzymatiques est dosé d'après la microméthode de *Kjeldahl*.

**Tableau 4.**  
Activité de l'enzyme.

Rat N°	Chol. présent ds l'essai	Cholestérol libéré par		
		0,1 $\text{cm}^3$ villosités	1 mg N	1 g de tissu intestinal
114	4,8 mg	2 mg	3,3 mg	8 mg
115	6 mg	2,9 mg	5,5 mg	12 mg
116	6,3 mg	4,3 mg	9,9 mg	17 mg
119	5,4 mg	1,5 mg	3,1 mg	6 mg

**Tableau 5.**  
Influence de la quantité de préparation enzymatique.

Rats N°	Quantité de villosités	% d'esters du chol. hydrolysés après 4 h.
72, 73	0,1 $\text{em}^3$ bouillies	0%
72, 73	0 $\text{em}^3$	0%
72, 73	0,1 $\text{em}^3$ fraîches	95%
115, 116	0,01 $\text{em}^3$ fraîches	7%
115, 116	0,05 $\text{em}^3$ fraîches	34%
115, 116	0,1 $\text{em}^3$ fraîches	83%
115, 116	0,1 $\text{em}^3$ non homog.	71%
115, 116	0,1 $\text{em}^3$ homogénisées	71%

*Inhibition de l'hydrolyse.* Supposant que le sens de la réaction que nous étudions dépend de la concentration de ses constituants au départ, nous avons essayé de déplacer cet équilibre.

On ajoute à un essai normal d'hydrolyse (contenant donc du sérum, du glyco-cholate de sodium, le tampon et des villosités) de l'oléate de sodium.

L'hydrolyse est d'autant moins marquée que la quantité d'oléate est plus grande, mais le sens de la réaction ne change pas.

**Tableau 6.**  
Influence de l'oléate de sodium.

	Hydrolyse des esters du cholestérol					
	ds l'exp. témoin après 1 h.	après 4 h.	avec 3%/ <sub>00</sub> d'oléate après 1 h.	après 4 h.	avec 10%/ <sub>00</sub> d'oléate après 1 h.	après 4 h.
Exp. 1	18%	54%	3%	25%	2%	10%
Exp. 2	33%	96%	14%	68%	1%	19%

*Essai d'estérification du cholestérol.* Partant de ce phénomène d'inhibition, nous avons essayé de réaliser un milieu qui devrait être favorable à une estérification.

Dans ce but, nous avons ajouté des villosités intestinales à du sérum sanguin humain inactivé. Après environ 4 h., la presque totalité des esters est hydrolysée. On chauffe 1 h. à 56—60° pour inactiver l'enzyme des villosités. On ajoute des villosités fraîches, et pour certains essais, de l'oléate de sodium, de façon à constituer un milieu favorable à la formation d'esters.

Une autre série de rats reçoit pendant 1 semaine un régime contenant 1% de cholestérol. Ce régime d'orientation pourrait influencer les systèmes enzymatiques de l'intestin.

Les villosités de ces rats sont mises en contact avec du sérum sanguin dont les esters du cholestérol ont été préalablement hydrolysés.

Dans tous ces essais, aucune estérification du cholestérol n'a pu être mise en évidence. Dans certains cas où la teneur initiale en esters était de 5%, l'hydrolyse s'est poursuivie jusqu'à leur disparition.

#### Discussion.

Les nombreuses contradictions que l'on rencontre dans la bibliographie concernant l'action des cholestérolestérases pancréatiques et intestinales ne doivent pas nous étonner.

Les particularités des systèmes enzymatiques agissant sur les lipides sont différentes de celles des autres systèmes. Le déroulement de la réaction dépend dans une plus grande mesure de facteurs physico-chimiques, notamment de l'état de dispersion. La compétition comme accepteurs d'acides gras, entre le cholestérol d'une part, et les autres constituants du milieu (protéines, sels biliaires) d'autre part, joue un grand rôle. Une faible variation de pH peut modifier considérablement la stabilité des lipoprotéines en cause. L'hétérogénéité du système est très grande, et la loi d'action de masse basée sur l'ensemble des concentrations du système, ne peut déployer tous les effets.

Il paraît très difficile, pour l'instant, d'obtenir un milieu synthétique dans lequel l'état de dispersion des substrats et des enzymes,

la composition des lipoprotéines en cause, soient seulement apparentés aux systèmes qui existent *in vivo*.

De nombreux expérimentateurs ont démontré que les tissus contiennent des cholestérolestérases; mais ces essais, aussi complets qu'ils soient, ne peuvent pas nous renseigner sur l'activité ou la fonction réelle de ces cholestérolestérases *in vivo*.

Le cholestérol ingéré naturellement est pour la plus grande partie sous forme de lipoprotéines, et il est vraisemblable que la formation de lipoprotéines accompagne également l'émulsionnement des lipides qui doit nécessairement précéder la résorption.

Faute de pouvoir réaliser une suspension homogène de telles lipoprotéines, nous avons choisi le sérum sanguin inactivé comme substrat. La très grande majorité du cholestérol sérique se trouve sous forme de lipoprotéines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  (*Cohn*<sup>1)</sup>). L'expérience nous a montré que les cholestérolestérases étaient plus actives sur un tel substrat. Malgré la diversité des sérum, nous avons toujours eu des résultats reproductibles.

En ce qui concerne l'activation des cholestérolestérases, quelques essais nous ont prouvé que l'action de la bile totale était identique à celle de la quantité correspondante de glycocholate. Aussi la plupart de nos essais ont-ils été faits avec du glycocholate de sodium qui est d'un emploi plus commode.

A l'encontre d'autres expérimentateurs, nous avons utilisé l'homogénéisat total ou la suspension des villosités aussi fraîches que possible. Des contrôles histologiques ont montré que les suspensions obtenues par ráclage étaient constituées par une grande majorité de cellules épithéliales intactes. La plupart des villosités sont arrachées complètement, mais la suspension renferme aussi un grand nombre de cellules épithéliales libres ou plus ou moins groupées. Il nous paraît significatif que l'homogénéisat n'ait pas une activité plus grande que la suspension de villosités. On peut rapprocher ce résultat de celui de *Swell, Byron & Treadwell*<sup>2)</sup>, qui supposent que l'enzyme de la muqueuse intestinale est d'origine pancréatique. Si cet enzyme exerce surtout son action en étant adsorbé sur la membrane extérieure des cellules épithéliales, il n'est guère étonnant que l'activité des cellules intactes soit aussi grande que celle de l'homogénéisat.

Le fait que nos préparations n'ont jamais favorisé autre chose qu'une hydrolyse des esters du cholestérol, même en présence d'un excès de cholestérol libre et d'acides gras libres, fait supposer que l'estérification ne se produit pas non plus *in vivo* dans l'épithélium intestinal. Ces résultats paraissent opposés à ceux de *Chaikoff*<sup>3)</sup> et

<sup>1)</sup> *E. S. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes, P. S. Muford, J. N. Ashworth, M. Melin & H. L. Taylor, Soc. 68, 459 (1946).*

<sup>2)</sup> *L. Swell, J. E. Byron & C. R. Treadwell, J. Biol. Chem. 186, 543 (1950).*

<sup>3)</sup> *J. L. Chaikoff, B. Bloom, M. D. Siperstein, J. Y. Kiyasu, W. O. Reinhardt, W. G. Dauben & J. F. Eastham, J. Biol. Chem. 194, 407 (1952).*

*Bollman & Flock<sup>1)</sup>*, qui suggèrent une estérification dans la paroi intestinale. Ils sont confirmés par les essais *in vivo* que nous avons effectués au moyen de cholestérol marqué au deutérium<sup>2)</sup>.

#### RÉSUMÉ.

L'activité cholestérolestérasique des villosités intestinales de Rat est étudiée en fonction du temps, du pH, de la composition du substrat et de la concentration en enzyme. Dans toutes les conditions choisies, on observe une hydrolyse des esters du cholestérol et jamais une estérification du cholestérol libre.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève.

### 230. La résorption intestinale du deutério-cholestérol et sa répartition dans l'organisme animal sous forme libre et estérifiée

par P. Favarger et E. F. Metzger.

(21 VII 52)

En étudiant le métabolisme du cholestérol, nous devons considérer que ce corps a deux fonctions distinctes. Il est premièrement le précurseur de toute une série de substances fonctionnelles, sels biliaires, hormones, vitamines. Deuxièmement, il intervient dans la résorption et le transport des graisses. Cette dernière fonction est en rapport avec la synthèse et l'hydrolyse des esters du cholestérol et avec leurs propriétés physico-chimiques.

Ces rôles biologiques du cholestérol peuvent être particulièrement bien étudiés à l'aide d'éléments lourds ou radioactifs. Ainsi la synthèse du cholestérol à partir d'éléments en C<sub>2</sub> fut prouvée par *Bloch & Rittenberg<sup>3)</sup>* à l'aide d'acide acétique marqué au D. Ces résultats furent confirmés et élargis par des travaux utilisant le <sup>14</sup>C.

Les isotopes ont aussi permis d'étudier les problèmes biologiques du point de vue dynamique. *Pihl, Bloch & Anker<sup>4)</sup>* travaillant avec l'acide acétique au <sup>14</sup>C, ont fixé la demi-durée de vie du cholestérol hépatique du Rat à 6 jours ; l'administration d'eau lourde à un homme permit à *London & Rittenberg<sup>5)</sup>* de mesurer la demi-durée de vie du cholestérol sérique, qui est de 8 jours.

<sup>1)</sup> *J. L. Bollman & E. V. Flock*, Am. J. Physiol. **164**, 480 (1951).

<sup>2)</sup> *P. Favarger & E. F. Metzger*, Helv. **35**, 1805 (1952).

<sup>3)</sup> *K. Bloch & D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **145**, 625 (1942).

<sup>4)</sup> *A. Pihl, K. Bloch & H. J. Anker*, J. Biol. Chem. **183**, 441 (1950).

<sup>5)</sup> *J. M. London & D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **184**, 687 (1950).