

ACTIVITÉ ET ACTION DES SELS BILIAIRES SUR LA LIPASE PANCRÉATIQUE

P. DE MOERLOOSE

*Laboratoire de Chimie Médicale et Pharmaceutique,
Université de Gand, Belgique*

INTRODUCTION

Afin de réunir les conditions optimales pour la standardisation de la lipase pancréatique, nous avons étudié certains facteurs importants, principalement l'action d'activation par les sels biliaires. Depuis les travaux de Willstätter *et al.*^{1,2}, on a eu l'habitude de déterminer l'activité lipolytique des extraits pancréatique en présence d'ions Ca^{2+} et de sels biliaires, en premier lieu des solutions de taurocholate de sodium. Plusieurs auteurs, principalement Desnuelle et ses collaborateurs³⁻⁵, ont étudié également l'action des activateurs sur l'hydrolyse des triglycérides. Grâce à l'analyse chimique des produits de dégradation, ils ont pu observer *in vitro* que la pancréatine n'hydrolyse pas complètement les triglycérides, mais qu'essentiellement il y a formation de di- et de monoglycérides et peu de glycérol.

La transformation de triglycérides en diglycérides représente la réaction principale, si le milieu à pH 8 ne contient que des sels biliaires. Tandis que la dégradation s'étend jusqu'au stade de monoglycérides si le milieu contient outre les sels biliaires une quantité déterminée d'ions Ca^{2+} , soit un équivalent de calcium par chaîne d'acide gras libérable. L'activation par les ions Ca^{2+} consisterait dans l'élimination de l'interface huile/eau des acides gras libérés, sous forme de savons de calcium. Ainsi les triglycérides non hydrolysés et les diglycérides peuvent à leur tour entrer en contact avec l'enzyme. Cependant, l'action des sels biliaires reste jusqu'à présent inexpiquée, bien que plusieurs hypothèses ont été proposées. On pourrait associer cette action à leur pouvoir solubilisant et à leurs propriétés tensioactives. Au cours de travaux antérieurs⁶⁻⁸, nous avons observé que la structure micellaire, le pouvoir solubilisant et autres propriétés des acides biliaires sont très influencés par la présence d'impuretés. Ainsi nous nous sommes proposé d'étudier l'action des sels biliaires à l'aide de produits purifiés.

MÉTHODES

Pour mesurer l'activité lipolytique, nous avons suivi la méthode potentiométrique de Desnuelle, Constantin et Baldy⁹. Cette méthode où on emploie comme substrat une émulsion stable d'huile d'olive, a l'avantage qu'elle permet de suivre l'action lipolytique en fonction du temps. À température constante le substrat tamponné est porté à pH 8,2 par addition de soude 0,1 N. On détermine en fonction du temps la quantité de soude 0,1 N nécessaire pour ramener le pH à 8,2, quand il est tombé par l'action de

l'enzyme à 8,0. Après plusieurs opérations de ce genre, on peut tracer une courbe des équivalents acides libérés par la lipase en fonction du temps, et déterminer la vitesse initiale de lipolyse. Nous avons étudié ainsi l'action des solutions de cholate de sodium, de désoxycholate de sodium et de taurocholate de sodium sur l'activité lipolytique des extraits pancréatiques.

Les premiers essais ont été effectués dans un milieu dépourvu de sels de calcium, afin de connaître l'action isolée des sels biliaires, et aussi parce qu'en présence d'ions Ca^{2+} les sels biliaires donnent eux-mêmes des sels de calcium insolubles. Pourtant des essais ultérieurs en présence de calcium ont donné les mêmes résultats.

RÉSULTATS

L'effet de la concentration en sels biliaires

Dans le *Tableau 1* sont consignées les activations relatives pour différentes concentrations en sels biliaires. Nous avons comparé deux préparations d'enzymes d'une activité lipolytique fort différente (A et B).

Tableau 1. L'activation de deux préparations d'enzymes lipolytiques (A et B) par les sels biliaires

Concentration des sels biliaires (mmol/l.)	Augmentation (%) de l'activité lipolytique (µéq. acides libérés par rapport à l'essai à blanc) avec l'addition du sel biliaire :					
	Cholate de sodium, utilisant la préparation d'enzyme :		Désoxycholate de sodium, utilisant la préparation d'enzyme :		Taurocholate de sodium, utilisant la préparation d'enzyme :	
	A (après 500")	B (après 250")	A (après 500")	B (après 250")	A (après 500")	B (après 250")
33,3	—	—	—	—	52,9	—
16,6	92,9	420,0	108,4	431,1	44,2	189,4
3,33	81,6	172,5	122,4	—	—	—
1,66	72,9	—	—	240,0	74,7	55,3
0,83	61,7	97,5	100,0	95,4	50,0	55,3
0,17	19,7	40,6	37,6	56,4	0	0
0,083	0	0	13,4	15,5	—	—

Ces résultats montrent que l'activation du désoxycholate est la plus prononcée, et que celle du taurocholate est nettement inférieure à celle des deux autres sels biliaires. L'effet de la variation de la concentration est aussi moins prononcé pour le taurocholate. L'activation s'étend jusqu'aux très faibles concentrations (le désoxycholate de sodium jusqu'à 0,083 mmol/l., le cholate de sodium jusqu'à 0,17 mmol/l. et le taurocholate de sodium jusqu'à 0,83 mmol/l.). Ces concentrations sont nettement inférieures aux concentrations critiques micellaires (6 à 8 mmol/l. pour le désoxycholate de sodium, 30 mmol/l. pour le cholate de sodium). Il est à remarquer que l'activation par le cholate ne diffère que très peu de celle du désoxycholate, bien que son pouvoir solubilisant soit nettement inférieur.

L'activation de la lipolyse par les sels biliaires ne va pas de pair avec leur

LES SELS BILIAIRES ET LA LIPASE PANCRÉATIQUE

structure micellaire en solution. L'hypothèse, que les sels biliaires agissent comme agent solubilisant ou émulsionnant des acides gras libérés, semble donc infirmée. Ceci est confirmé par l'action inhibitrice, qu'exercent selon Wills¹⁰ plusieurs détergents, aussi bien anioniques que cationiques, sur la lipase pancréatique. Nous avons étudié l'effet du dodécylsulfate de sodium et du bromure de cétyltriméthylammonium (cétavlon). L'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase pancréatique est entièrement inhibée par le dodécylsulfate de sodium, aussi bien aux concentrations faibles qu'élevées. Le cétavlon active légèrement la réaction à des concentrations inférieures à 0,33 mmol/l., mais inhibe dès que la concentration augmente. Ces résultats semblent contredire l'action des substances tensioactives par un effet émulsionnant.

On observe aussi que l'action des sels biliaires dépend du degré de pureté de la pancréatine elle-même. Chez la pancréatine A (la moins pure), l'activité lipolytique n'augmente plus à partir d'une certaine concentration en sels biliaires. L'activité de la pancréatine B, au contraire, augmente de façon continue avec une concentration croissante en sels biliaires. L'action des sels biliaires semble donc augmenter avec l'activité même de la pancréatine.

L'influence de la température

L'activité lipolytique a été mesurée à des températures variant de 20° à 40°, en absence et en présence de désoxycholate, de cholate et de taurocholate de sodium (6,66 mmol/l.) (voir *Tableau 2*).

Tableau 2. L'effet de la température sur l'activité lipolytique

<i>Température</i> (°C)	<i>Activité lipolytique (μéq. acides libérés) avec l'addition du sel biliaire :</i>							
	<i>Sans sels biliaires</i>		<i>Cholate de sodium</i>		<i>Désoxycholate de sodium</i>		<i>Taurocholate de sodium</i>	
	<i>sans CaCl₂</i>	<i>avec CaCl₂</i>	<i>sans CaCl₂</i>	<i>avec CaCl₂</i>	<i>sans CaCl₂</i>	<i>avec CaCl₂</i>	<i>sans CaCl₂</i>	<i>avec CaCl₂</i>
20	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
25	91,4	105,3	119,1	133,3	126,4	142,8	118,3	127,3
30	100,0	96,2	144,5	165,1	198,6	178,5	145,8	150,0
35	90,3	90,9	175,4	174,3	231,9	191,4	166,7	157,9
40	—	85,5	—	198,8	225,7	207,1	168,3	157,9

En absence de sels biliaires, la vitesse de réaction initiale ne varie pas sensiblement avec la température, seulement une légère diminution de l'activité enzymatique est observée aux températures élevées. En présence de sels biliaires, avec ou sans ions Ca²⁺, la vitesse de réaction initiale augmente rapidement avec la température. L'action par le désoxycholate de sodium est légèrement supérieure à l'action par les autres sels biliaires. En supposant que la réaction d'hydrolyse se passe de la même façon aux différentes températures, l'énergie d'activation en présence de sels biliaires atteint une valeur de 10,1 kcal/mole. Nous confirmons ainsi les observations

de Desnuelle, concernant une modification de la cinétique de la lipolyse en présence de sels biliaires.

L'influence de la composition du substrat

Il fut indispensable afin de pouvoir déterminer le poids moléculaire moyen, de connaître la composition triglycéridique de l'huile d'olive. À cette fin la composition en acides gras de l'huile d'olive employée fut, après saponification, déterminée par isomérisation alcaline suivie de spectrophotométrie et par chromatographie en phase gazeuse. On trouve la composition en acides gras dans le *Tableau 3*.

Tableau 3. La composition des acides gras obtenus après saponification de l'huile d'olive

<i>Acide gras</i>	%
Acide palmitique	14,0
Acide palmitoléique	2,2
Acide stéarique	1,6
Acide oléique	72,6
Acide linolique	8,8
Acide linoléique	0,69

En milieu hétérogène nous avons employé comme substrat des émulsions d'huile d'olive, de trioléine et d'un mélange de trioléine et de tristéarine. En milieu homogène nous avons employé comme substrat des solutions de Tween-20 (monolaurate de polyhydroxyéthylènesorbitane) suivant l'essai proposé par Boissonas¹¹.

Les sels biliaires activent surtout l'hydrolyse des triglycérides de l'huile d'olive. Leur action est réduite à moitié lorsqu'on emploie comme substrat un mélange de trioléine et de tristéarine et retombe au quart pour les émulsions de trioléine. Cette action est nulle sur l'hydrolyse du Tween-20. L'activation de la lipolyse par les sels biliaires se manifeste donc uniquement dans un milieu hétérogène. Ce qui semble prouver que leur action s'exerce à l'interface huile/eau.

En nous basant sur les travaux de Todor¹², et de Sarda et Desnuelle¹³, qui ont montré que l'activité de la lipase dépend de l'étendue de l'interface huile/eau dans l'émulsion, on aurait pu supposer que l'écart pour les différents substrats était dû à une différence du degré de dispersion des émulsions employées. Cependant l'examen microscopique nous a montré que le degré de dispersion dans les trois cas était sensiblement identique (diamètre des globules $\pm 10 \mu$). L'effet n'est pas dû à une spécificité de substrat de la lipase, car les essais sans sels biliaires ne diffèrent que peu. La différence entre les trois émulsions doit être attribuée à la composition en triglycérides.

CONCLUSIONS

Il est démontré que les sels biliaires activent la lipolyse à des concentrations encore inférieures à la concentration critique micellaire. En leur présence

la vitesse de réaction initiale augmente avec la température et ils n'agissent comme agent activateur qu'en phase hétérogène émulsionnée. Les recherches de Schønheyder et Volqvartz¹⁴ sur la lipase pancréatique et l'estérase hépatique ont montré que, dans les milieux homogènes en absence de sels biliaires, la vitesse de réaction initiale dépend de la température. Puisqu'au contraire dans des systèmes hétérogènes l'effet de la température ne se produit qu'en présence de sels biliaires, nous pouvons en conclure que les sels biliaires améliorent le contact entre la lipase, dont on sait¹⁵ qu'en solution aqueuse elle est adsorbée sur une émulsion aqueuse de triglycérides, et le substrat, de façon que la réaction se passe comme dans un milieu homogène.

En se basant sur ces résultats on peut proposer pour la pratique clinique la méthode suivante pour la détermination de l'activité lipolytique: À une émulsion d'huile d'olive, tamponnée⁹ à l'aide d'une solution 0,005 M de tris(hydroxyméthyl)aminométhane, on ajoute 5 ml d'une solution, 0,1 M de désoxycholate de sodium. Le tout est placé dans un thermostat à 37° et le pH est porté à 8,2 à l'aide de soude 0,1 N. On ajoute alors 1 ml de sérum et on mesure le temps nécessaire pour faire retomber le pH jusqu'à 8,0. On détermine ensuite la quantité de soude nécessaire pour ramener le pH exactement à 8,2. On exprime les résultats en unités, soit en μ moles d'acides gras libérés par 1 ml de sérum après 1 min (poids moléculaire moyen des acides gras : 277).

Références

- ¹ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz et F. Memmen. *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's*, **125**, 93 (1923)
- ² A. K. Balls, A. B. Matlack et I. W. Tucker. *J. Biol. Chem.*, **122**, 125 (1937)
- ³ P. Desnuelle, M. Naudet et J. Rouzier. *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**, 561 (1948)
- ⁴ P. Desnuelle, M. Naudet et M. J. Constantin. *Biochim. et Biophys. Acta*, **5**, 561 (1950)
- ⁵ P. Desnuelle et M. J. Constantin. *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 531 (1952)
- ⁶ P. De Moerloose et R. Ruysen. *Mededeel. Kl. Wetenschapp., Koninkl. Belg. Acad.*, **XX**, No. 5 (1958)
- ⁷ P. De Moerloose et R. Ruysen. *J. pharm. Belg.*, **1959**, 95
- ⁸ P. De Moerloose. *Mededeel. Kl. Wetenschapp., Koninkl. Belg. Acad.*, **XXII**, No. 7 (1960)
- ⁹ P. Desnuelle, M. J. Constantin et J. Baldy. *Bull. soc. chim. biol.*, **37**, 285 (1955)
- ¹⁰ E. D. Wills. *Biochem. J.*, **60**, 529 (1955)
- ¹¹ R. A. Boissonas. *Helv. Chim. Acta*, **31**, 1571 (1948)
- ¹² P. J. Todor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **25**, 223 (1950)
- ¹³ L. Sarda et P. Desnuelle. *Biochim. et Biophys. Acta*, **30**, 513 (1958)
- ¹⁴ F. Schønheyder et K. Volqvartz. *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 306 (1952)
- ¹⁵ L. Sarda, G. Marchis-Mouren et P. Desnuelle. *Biochim. et Biophys. Acta*, **24**, 425 (1957)