

BBA 66202

## L'ACTIVITÉ TRIGLYCÉRIDE-ESTÉRISE DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

J. BOYER ET H. GIUDICELLI

*Laboratoire de la Clinique Endocrinologique, Hôpital de la Conception, F-13, Marseille, 5<sup>e</sup> (France)*

(Reçu le 8 juin, 1970)

## SUMMARY

Human adipose tissue contains an enzyme which catalyzes *in vitro* the hydrolysis of short-chain and partially water-soluble triglycerides. The catalytic activity is maximum toward a substrate in the dispersed state in an isotropic medium.

In a system at 37° containing 1 mM tributyrin, this triglyceride esterase shows the highest activity at pH  $8.5 \pm 0.5$ . It is inhibited by NaCl (1 M), sodium taurocholate (20 mM), dimethylformamide (1.3 M) and NaF (10 mM) in the proportions of 65%, 33%, 50% and 100%, respectively.

The apparent  $K_m$  of this enzyme with tributyrine as substrate has been measured in delipidated extracts of human adipose tissue, and in fat, liver and kidney extracts of rat and rabbit. All the values range between 0.1 mM and 0.7 mM.

The levels of this triglyceride esterase are different in the various tissues of the same organism. In the studied species (human, rat and rabbit) the activity per mg of proteins has been found maximum in liver, high in adipose tissue and relatively low in kidney.

## INTRODUCTION

L'hydrolyse des glycérides dans le tissu adipeux, ou dans d'autres tissus où s'effectue la dégradation des lipides simple, met en jeu un équipement enzymatique mal connu. A priori, il paraît légitime de ne considérer comme lipolytiques que les enzymes de type lipasique, dont SCHÖNHEYDER ET VOLQVARTZ<sup>1</sup>, et DESNUELLE<sup>2</sup> ont établi qu'ils sont actifs à l'interface créée par la présence d'un substrat insoluble dans l'eau.

Parallèlement à ce type d'enzyme, sur lequel nous avons fourni récemment des détails<sup>3,4</sup>, il existe dans le tissu adipeux humain une activité enzymatique de niveau relativement élevé, qui catalyse *in vitro* l'hydrolyse de triglycérides à chaînes très courtes, comptant moins de 6 atomes de carbone. Sous le nom de tributyrinase, cette activité a été décrite notamment par LYNN ET PERRYMAN<sup>5</sup> dans le tissu adipeux de porc, par KUPIECKI<sup>6</sup>, BIALE *et al.*<sup>7</sup>, CRUM ET LECH<sup>8</sup> dans le tissu adipeux de rat et par SCHNATZ<sup>9</sup> dans le tissu adipeux humain. Des activités apparemment semblables, mais

étudiées à l'aide de substrats quelquefois différents, ont été mises en évidence dans des préparations de divers organes, chez l'homme et chez l'animal.

Nous présentons dans ce travail certaines données relatives à l'activité tributyrinase du tissu adipeux humain, comparativement à des résultats obtenus à l'aide de préparations de tissus homologues de rat et de lapin.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

La tributyrine et le taurocholate de sodium sont des produits Sigma (Saint-Louis, Mo); la tripropionine, la triacétine, la diacétine, la monoacétine et la diméthylformamide sont des produits Fluka (Buchs, Suisse). L'acide butyrique et la monobutyryne sont des produits Prolabo. Ce dernier monoglycéride a été purifié avant usage par chromatographie préparative en couche mince de Silicagel G, dans le système hexane-éther éthylique (40:60, v/v); les isomères de position n'ont pas été séparés.

##### *Préparation des extraits tissulaires*

Des fragments de tissu adipeux humain ont été prélevés au cours d'interventions chirurgicales et immédiatement rincés dans une solution aqueuse contenant KCl 0.15 M et EDTA  $10^{-4}$  M. L'homogénéisation des fragments tissulaires est effectuée à 4° dans le même milieu (3 ml/g) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turax, pendant 3 min. L'homogénat est ensuite centrifugé à  $12\,000 \times g$  pendant 10 min à 4°. Après élimination de la couche grasse flottante, le surnageant est prélevé et constitue l'extrait enzymatique brut servant aux mesures. Il peut être conservé plusieurs semaines à -15° sans perdre son effet catalytique sur l'hydrolyse des liaisons ester de la tributyrine.

Pour certaines expériences, l'extrait brut a été soumis à une précipitation par l'acétone. La précipitation a été réalisée en ajoutant lentement à la préparation enzymatique maintenue à -20° de l'acétone froid jusqu'à une concentration atteignant selon les besoins 90 ou 98% (v/v) de ce solvant. La suspension est agitée pendant 10 min et centrifugée à  $10\,000 \times g$  pendant 10 min, à basse température. Le précipité est redissous dans une solution de KCl 0.15 M EDTA  $10^{-4}$  M. Les préparations finales, limpides, constituent les extraits "délipidés" auxquels il sera fait référence ci-dessous sous l'étiquette E-90 ou E-98, selon qu'ils auront été obtenus après traitement dans 90 ou 98% d'acétone, respectivement.

Les extraits d'autres tissus humains, ou provenant de tissus d'espèces animales (rat, lapin) ont été préparés d'une manière identique. Les prélèvements ont été effectués sur des animaux anesthésiés et exsangüés.

Les concentrations en protéines ont été mesurées par la méthode de Lowry *et al.*<sup>10</sup>.

##### *Mesure de l'activité hydrolytique*

Dans le système de base, le substrat de la réaction est constitué par de la tributyrine 1 mM, soniquée pendant 30 sec dans de l'eau avec un Sonifier Branson (en moyenne 10 watts par ml de mélange). Outre le substrat, le milieu réactionnel contient NaCl 0.15 M, l'enzyme et de l'eau dans un volume total de 15 ml. Les mesures sont effectuées à pH 7.4 et à 25° ou 37°, selon les besoins, avec agitation continue. L'acidité

libérée dans le milieu après l'addition d'enzyme est titrée par NaOH 10 mM délivrée automatiquement par l'intermédiaire d'un titrateur-enregistreur Radiometer. La vitesse initiale des réactions est déterminée graphiquement à partir de la pente de la droite qui représente le débit de soude en fonction du temps. Avant le déclenchement de la réaction, un enregistrement est effectué pour évaluer la vitesse de l'hydrolyse spontanée, qui est déduite de la vitesse mesurée après l'addition d'enzyme.

Nous avons déterminé que, dans les conditions expérimentales choisies, l'acide butyrique possède un  $pK$  apparent de 4.8 et se trouve complètement dissocié aux pH supérieurs à 6. En l'absence d'effet tampon le nombre de  $\mu$ équiv de soude délivré est donc égal au nombre de  $\mu$ équiv d'acides libérés. Une unité enzymatique correspond à la libération d'un  $\mu$ équiv d'acide par min.

## RESULTATS

### *Influence de la concentration du substrat sur l'activité tributyrinase*

La Fig. 1 donne un exemple de la validité du système de mesure de l'hydrolyse des liaisons ester de la tributyrine par un extrait de tissu adipeux humain. On voit que, dans les conditions expérimentales de base, la vitesse des réactions est proportionnelle à la quantité d'enzyme prise pour essai.

La Fig. 2 rassemble les résultats relatifs aux variations de l'activité tributyrinase du tissu adipeux humain en fonction de concentrations variables de substrat, et de son état physique. On observe que la courbe A, représentant les vitesses de réaction en fonction de l'augmentation des quantités de substrat dans le milieu de base, ressemble à une courbe de Michaelis. La vitesse maximum de la réaction est pratiquement

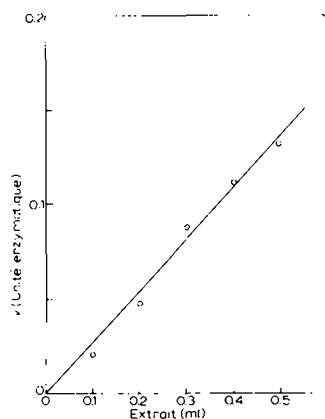


Fig. 1. Relation entre le volume d'extrait enzymatique pris pour essai et la vitesse mesurée des réactions. Les mesures sont réalisées dans le milieu de base à pH 7.4 et à 37° en présence de tributyrine 1 mM.

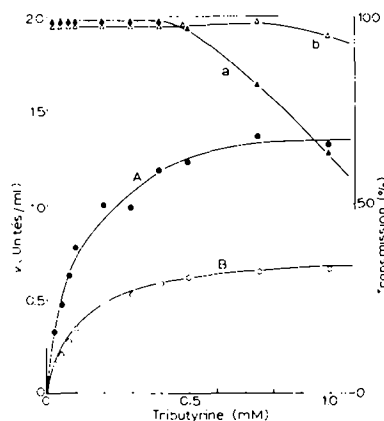


Fig. 2. Activité tributyrinase en fonction de la concentration du substrat. Les milieux réactionnels ont été préparés en agitant pendant 2 heures à 25° les quantités indiquées de tributyrine dans le milieu de base contenant (○—○) ou non (●—●) 10% (v.v) de diméthylformamide (1.3 M). Avant d'ajouter l'enzyme, on a mesuré la transmission optique à 400 nm de chaque préparation contenant (△—△) ou non (▲—▲) 10% de diméthylformamide. Les réactions enzymatiques ont été réalisées à 25° et à pH 7.4 à l'aide d'un extrait de tissu adipeux sous-cutané humain de type E-90 (voir le texte).

atteinte dans un milieu contenant la tributyrine à la concentration 0.5 mM, qui maintient le milieu isotrope. Au delà de cette concentration la transmission optique du milieu décroît (courbe a), indiquant que la saturation en tributyrine est dépassée. Cette coïncidence pouvait faire craindre que l'arrêt de l'augmentation de la vitesse des réactions à ce niveau soit dû non pas au fait que la vitesse maximum était atteinte, mais seulement à la limitation du nombre des molécules de substrat présentes à l'état dispersé.

Une expérience semblable a donc été réalisée dans un milieu contenant 10% (v/v) de diméthylformamide, concentration qui permet la solubilisation dans l'eau d'une quantité de tributyrine approximativement double (courbe b) de celle obtenue dans le milieu précédent. On note que dans ces conditions la vitesse des réactions est réduite d'environ 50% (courbe B) mais que la vitesse maximum est néanmoins atteinte dans un milieu contenant le substrat à la concentration 0.5 mM. On admet qu'à cette concentration de substrat, et dans ce milieu isotrope, la totalité des molécules d'enzyme présentes sont sous la forme de complexe enzyme-substrat et que, à cet égard, les conditions sont telles que la réaction peut s'effectuer à la vitesse maximum.

Dans les deux cas (courbes A et B) le franchissement de la limite de solubilité du substrat ne s'accompagne d'aucune modification mesurable de l'activité catalytique de l'enzyme.

#### *Effet de la diméthylformamide sur l'activité tributyrinase*

Dans un milieu contenant 10% de diméthylformamide et toutes choses étant égales par ailleurs, la vitesse des réactions d'hydrolyse est diminuée d'environ 50% (Fig. 2, courbe B). Il ne s'agit pas d'une diminution apparente due à une modification des conditions de titrage de l'acide butyrique libéré. Nous avons vérifié que dans le milieu considéré l'acide butyrique présente le même  $pK$  apparent qu'en milieu aqueux (4.8) et se trouve entièrement ionisé au pH des réactions. Il ne se produit pas non plus d'inactivation de l'enzyme en présence de diméthylformamide. En employant des quantités convenables d'enzyme, il a été possible de réaliser dans des milieux contenant jusqu'à 50% de diméthylformamide des réactions qui sont restées parfaitement linéaires pendant plusieurs minutes. En outre, la Fig. 3 montre que le  $K_m$  de l'enzyme vis-à-vis de la tributyrine (0.2 mM) n'est pas modifié par la présence de diméthylformamide.

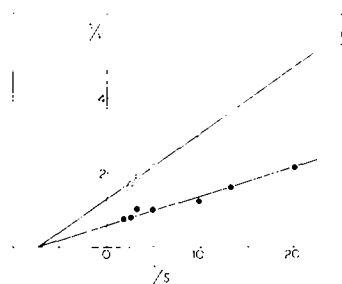


Fig. 3. Représentation selon Lineweaver-Burk de l'effet de la variation de la concentration de tributyrine (mM) sur l'activité tributyrinase (Unités/ml d'extrait) d'un extrait de tissu adipeux sous-cutané humain. Les réactions enzymatiques, déjà présentées dans la Fig. 2 ont été réalisées dans le milieu de base contenant (○) ou non (●) 10% de diméthylformamide.

Il paraît donc s'agir d'un phénomène d'inhibition non compétitive affectant la vitesse de décomposition du complexe enzyme substrat.

### Influence du pH

La Fig. 4 montre la variation de l'activité tributyrinase mesurée à des pH compris entre 6.0 et 9.0 dans des conditions de concentration de substrat qui correspondent à la vitesse maximum de la réaction à pH 7.4 et à 37°. La courbe traduit

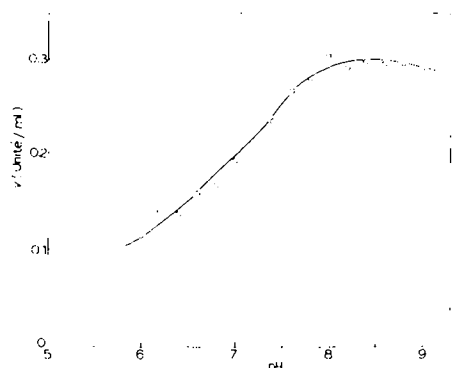


Fig. 4. Influence du pH sur l'activité triglycéride-estérase du tissu adipeux humain. Les réactions ont été réalisées dans le milieu de base à 37°, contenant de la tributyrine 1 mM.

l'existence d'une zone d'activité optimum à  $\text{pH } 8.5 \pm 0.5$ . L'observation de cette courbe suggère que l'enzyme doit porter un groupement ionisable qui contrôle la décomposition du complexe enzyme-substrat et qui doit être sous la forme basique pour être fonctionnel.

A pH 7.4 la vitesse des réactions est inférieure d'environ 15% à la vitesse mesurée au pH optimum. Le pH 7.4, proche du pH physiologique, a cependant été choisi pour la réalisation des mesures standard.

TABEAU I

NIVEAUX D'ACTIVITÉ ET  $K_m$  DE LA TRIBUTYRINASE PRÉSENTE DANS DIVERS EXTRAITS TISSULAIRES DE L'HOMME, DU RAT ET DU LAPIN

Les mesures ont été réalisées à pH 7.4 et 25°. Les niveaux d'activité enzymatique des différents extraits ont été déterminés dans des préparations non purifiées; le milieu de mesure de base contenait de la tributyrine 1 mM. Les  $K_m$  ont été déterminés à l'aide d'extraits délipidés de type E-98; les faibles différences observées sont peut-être dues au fait que ces préparations enzymatiques contenaient la quasi-totalité des protéines extraites et n'ont fait l'objet, à cet égard, d'aucune purification. Ces valeurs de  $K_m$  permettent néanmoins de comparer entre elles les activités tributyrinase de divers extraits tissulaires obtenus dans des conditions expérimentales identiques.

Espèce	Activité enzymatique (Unité/mg de protéines)			$K_m$ (mM)		
	Foie	Tissu adipeux	Rein	Foie	Tissu adipeux	Rein
Homme	0.8	0.3	0.03	—	0.6	—
Rat	0.6	0.2	0.04	0.2	0.2	0.2
Lapin	2.2	0.6	0.3	0.4	0.7	0.1

*Niveaux d'activité et  $K_m$  de la tributyrinase présente dans les extraits tissulaires de diverses espèces*

Le Tableau I rassemble les chiffres exprimant l'activité tributyrinase extraite de divers tissus humains et, pour comparaison, de tissus homologues de rat et de lapin. On voit que, dans ces trois espèces, les extraits hépatique et adipeux contiennent les plus fortes activités par mg de protéines. Dans les extraits de rein, une activité relativement forte a seulement été retrouvée d'une manière régulière chez le lapin.

Nous avons mesuré les variations de l'activité tributyrinase de ces extraits en fonction de concentrations croissantes de substrat. Dans tous les cas, l'extrait enzymatique employé était constitué par une préparation de type E-98 (cf. MATÉRIEL ET MÉTHODES). À l'aide des courbes de Michaelis obtenues dans ces conditions nous avons évalué le  $K_m$  apparent de la tributyrinase mesurée dans ces diverses préparations

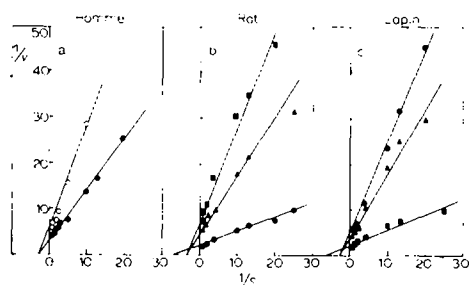


Fig. 5. Représentation selon Lineweaver-Burk des relations entre la concentration de substrat (mM) et la vitesse mesurée des réactions dans divers systèmes enzymatiques. Les mesures ont été effectuées à pH 7.4 et à 25° à l'aide d'extraits de type E-98. a: hydrolyse de la tributyrine (●—●) et de la tripropionine (○—○) par un extrait de tissu adipeux sous-cutané humain. b, c: hydrolyse de la tributyrine par des extraits de tissu adipeux (●—●), de foie (▲—▲) et de rein (■—■) de rat (b) et de lapin (c).

(Fig. 5). Les valeurs obtenues sont rassemblées dans la partie droite du Tableau I. On constate que ces valeurs sont toutes du même ordre et sont comprises entre 0.1 mM et 0.7 mM.

*Influence de la nature du substrat et de diverses substances sur l'activité triglycéride-estérase du tissu adipeux humain*

La tributyrine et la tripropionine représentent deux substrats également favorables pour la mesure de l'activité triglycéride-estérase du tissu adipeux humain. Les  $K_m$  de l'enzyme vis-à-vis de ces deux molécules sont semblables (Fig. 5, a) et égaux à 0.6 mM. De même, pour des quantités égales d'enzyme prises pour essai, les vitesses de réaction sont très voisines.

Les triglycérides constitués de chaînes à 6-12 atomes de carbone n'ont pas permis la réalisation de réactions enzymatiques correctes du point de vue cinétique. Aucune activité n'a pu être enregistrée avec la technique employée vis-à-vis des triglycérides comportant des chaînes à 18 atomes de carbone. Les extraits se sont avérés inactifs sur la tri-, di- et la monoacétine. Nous n'avons pas obtenu non plus d'hydrolyse mesurable en présence de monobutyryne purifiée.

Diverses substances, interférant dans le système réactionnel, ont été ajoutées dans le milieu de mesure. Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau II.

TABLEAU II

EFFET DE DIVERSES SUBSTANCES SUR L'ACTIVITÉ TRIBUTYRINASE DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

Les réactions ont été réalisées à 37° dans le milieu de mesure de base (tributyryne 1 mM) auquel ont été ajoutés les divers produits aux concentrations indiquées.

Substance ajoutée	Concentration	Pourcentage d'activité par rapport au témoin (%)
NaCl	0.1 M	100
	1.0 M	65
KCl	0.1 M	100
	1.0 M	65
NaF	0.1 mM	53
	1.0 mM	14
	10.0 mM	0
Taurocholate de sodium	0.2 mM	100
	2.0 mM	42
	20.0 mM	33

## DISCUSSION

L'activité tributyrinase mesurée dans les extraits de tissu adipeux humain ressemble par plusieurs aspects à l'activité "alcaline" étudiée par SCHNATZ *et al.*<sup>8,11,12</sup> dans des extraits de même provenance. Les deux enzymes manifestent une activité catalytique maximum à pH alcalin. Le NaF, à des concentrations convenables, inhibe totalement leur activité. En fonction de la sensibilité à cet inhibiteur, il n'a pas été mis en évidence deux tributyrinases distinctes, telles que CRUM *et al.*<sup>13,14</sup> en ont récemment postulé l'existence dans le tissu adipeux de rat.

L'étude de l'activité catalytique de l'enzyme par rapport à l'état physico-chimique du substrat montre que l'enzyme étudiée est selon toute vraisemblance une estérase, active *in vitro* sur un substrat triglycéridique dans un état physique tel qu'il maintient le milieu isotrope. Dans les conditions expérimentales employées, la vitesse maximum des réactions est atteinte en présence de concentrations de tributyrine inférieures à la saturation.

L'enzyme est dénuée d'activité lipasique mesurable et paraît devoir être distinguée des enzymes lipolytiques cellulaires. A la lumière de ces résultats on peut se demander si l'attribution à la triglycéride-lipase du tissu adipeux d'une activité vis-à-vis de la tributyrine environ 25 fois supérieure à celle qu'elle manifeste vis-à-vis de la trioléine<sup>15</sup> est justifiée et n'est pas la conséquence, au moins partiellement, d'une activité distincte de type estérasique.

Le tissu adipeux humain ne contient pratiquement que des glycérides dont les chaînes ont plus de 12 atomes de carbone<sup>16</sup>. Dès lors le substrat et le rôle physiologique de l'activité enzymatique étudiée demeurent inconnus. Il est remarquable de constater que, en termes d'activité par mg de protéines, le niveau de l'activité tributyrinase a été trouvé considérablement plus élevé dans les extraits de foie et, à un

moindre degré, de graisse, deux tissus où le métabolisme lipidique est particulièrement actif. De ce point de vue nos résultats ne recoupent pas totalement ceux de CRUM ET LECH<sup>13</sup>, qui rapportent des niveaux d'activité deux fois plus hauts dans le tissu adipeux que dans le foie de rat.

L'activité triglycéride-estérase étudiée est mesurable dans les extraits de divers tissus de l'homme et des mammifères. L'absence de disposer d'études suffisamment précises réalisées avec des préparations enzymatiques purifiées, on ignore si les activités mesurées correspondent à la même enzyme. SCHNATZ ET CORTNER<sup>12</sup>, dans le seul cas du tissu adipeux humain et sur la base de séparations électrophorétiques en gel d'amidon, concluent à l'existence de plusieurs isozymes.

La détermination des  $K_m$  apparents que nous avons réalisée à partir de différents extraits tissulaires de rat, de lapin et d'extraits de tissu adipeux humain a révélé une grande similitude dans les valeurs obtenues, suggérant que les enzymes en cause, s'ils sont multiples dans un même organisme, ont des propriétés catalytiques très voisines. Sur cette base, on peut considérer que les différences d'activité mises en évidence dans les divers extraits tissulaires d'un même animal sont bien la conséquence de différences de niveaux enzymatiques dans les organes considérés.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur J. Vague, Directeur de la Clinique Endocrinologique, où ces expériences ont été réalisées. Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat 6700884) et d'une aide de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

#### RÉSUMÉ

Le tissu adipeux humain contient une enzyme qui catalyse in vitro l'hydrolyse des triglycérides à chaînes de carbone très courtes, partiellement solubles dans l'eau. L'activité catalytique maximum est obtenue en présence d'un substrat à l'état dispersé et en milieu isotrope.

Dans un milieu à 37° contenant de la tributyrine 1 mM, cette triglycéride-estérase manifeste une activité maximum à pH 8.5  $\pm$  0.5. Elle est inhibée par NaCl (1 M), le taurocholate de sodium (20 mM), la diméthylformamide (1.3 M) et NaF (10 mM) dans les proportions respectives de 65%, 33%, 50% et 100%.

Le  $K_m$  apparent de l'enzyme vis-à-vis de la tributyrine a été mesuré dans des extraits délipidés de tissu adipeux humain, de tissus adipeux, hépatique et rénal de rat et de lapin. Les valeurs obtenues sont toutes comprises entre 0.1 mM et 0.7 mM.

Les niveaux de cette activité triglycéride-estérase sont variables dans les différents tissus d'un même organisme. Dans les espèces étudiées (homme, rat, lapin) l'activité exprimée par mg de protéines a été trouvée maximum dans le foie, forte dans le tissu adipeux et relativement faible dans le rein.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. SCHÖNHEYDER ET K. VOLQVARTZ, *Acta Physiol. Scand.*, 9 (1945) 57.
- 2 P. DESNUELLE, *Advan. Enzymol.*, 23 (1961) 129.
- 3 J. BOYER ET H. GIUDICELLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 202 (1970) 219.



- 4 J. BOYER, J. LE PETIT ET H. GIUDICELLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 210 (1970) 411.
- 5 W. S. LYNN ET N. C. PERRYMAN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1912.
- 6 F. P. KUPIECKI, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 230.
- 7 Y. BIALE, E. GORIN ET E. SHAFRIR, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 28.
- 8 J. J. LECH ET D. N. CALVERT, *Can. J. Chem.*, 46 (1968) 707.
- 9 J. D. SCHNATZ, *Life Sci.*, 3 (1964) 851.
- 10 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 11 J. D. SCHNATZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 116 (1966) 243.
- 12 J. D. SCHNATZ ET J. A. CORTNER, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 3850.
- 13 L. R. CRUM ET J. J. LECH, *Biochim. Biophys. Acta*, 178 (1969) 508.
- 14 L. R. CRUM, R. G. HARBECKE, J. J. LECH ET D. N. CALVERT, *Biochim. Biophys. Acta*, 198 (1970) 229.
- 15 M. A. RIZACK, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 657.
- 16 J. HIRSCH, in A. E. RENOLD, ET G. F. CAHILL, *Handbook of Physiology on Adipose Tissue*, Amer. Physiol. Soc., 1965, p. 181.

*Biochim. Biophys. Acta*, 220 (1970) 525-533