

Zusammenfassung.

Nach Fermentierung der Samen von *Evonymus europaea* L. lässt sich anstelle des Triglykosids Evonosid direkt das entsprechende Monoglykosid Evomonosid isolieren. Dieses besitzt wahrscheinlich die Summenformel $C_{29}H_{44}O_8$ und nicht wie früher vermutet $C_{29}H_{44}O_9$.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

14. La cholestérol estérase du tissu adipeux. Sa sensibilité aux actions hormonales

par Odette Schoelly et P. Favarger.

(2 XII 52)

La cholestérol estérase fut mentionnée pour la première fois par *Schultz*¹⁾ qui observa une hydrolyse des esters du cholestérol dans un mélange de sang et de foie de cheval. De nombreux auteurs étudièrent ensuite la cholestérol estérase présente dans différents organes et tissus; leurs résultats sont toutefois souvent contradictoires. Nous allons démontrer l'existence de cet enzyme dans le tissu adipeux et nous l'étudierons en rapport avec le métabolisme des graisses.

On a souvent attribué aux esters du cholestérol le rôle de vecteurs d'acides gras. Cette affirmation paraît justifiée pour les raisons suivantes. La présence des esters du cholestérol dans le sang signifie déjà par elle-même que les acides gras peuvent être transportés sous cette forme. Ceci est dû à leurs propriétés physico-chimiques particulièrement favorables. Les graisses récemment résorbées se fixent sur le cholestérol²⁾, prouvant que les acides gras des esters s'échangent facilement. En outre, la présence d'une cholestérol estérase plasmatique permet de concevoir la fixation, sur le cholestérol, des acides gras libérés par les lécithinases du plasma³⁾.

La synthèse et l'hydrolyse de ces esters se font facilement, l'énergie mise en jeu étant très faible. Le sens de la réaction dépend de facteurs physico-chimiques, comme l'état de dispersion, de l'élimination des produits réactionnels ainsi que de la compétition entre le cholestérol et les autres accepteurs d'acides gras (protéines, sels biliaires). Cet état de choses explique les résultats souvent contradictoires obtenus par les divers expérimentateurs ayant travaillé dans des conditions différentes. Il ne faut cependant pas exagérer

¹⁾ *J. H. Schultz*, *Biochem. Z.* **42**, 255 (1912).

²⁾ *R. A. Collet & P. Favarger*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **7**, C 8 (1949).

³⁾ *E. Le Breton & J. Pantaléon*, *Arch. Sci. Physiol.* **1**, 299 (1947).

ce rôle de transporteur d'acides gras. En cas d'hyperlipémie par exemple, le taux des esters du cholestérol n'augmente pas parallèlement à celui des graisses. L'hypothèse de *Schramm & Wolff*¹⁾, qui suppose une estérification à l'extérieur des cellules et une hydrolyse à l'intérieur de ces dernières, ne doit pas être généralisée. Il y a en effet des milieux extracellulaires (l'intestin, par exemple) où l'estérification ne paraît pas se produire sur une grande échelle²⁾. Le transport des acides gras peut aussi se faire sous forme de phospholipides facilement entraînés dans la circulation en vertu de leurs propriétés hydrophiles. L'étude des lécithinases présente donc un intérêt parallèle à celui de la cholestérol estérase.

Nous nous occuperons ici de ces deux enzymes, et plus spécialement de la cholestérol estérase, en rapport avec leurs fonctions éventuelles dans le tissu adipeux. On sait que les graisses se renouvellent constamment au niveau des dépôts. *Schoenheimer & Rittenberg* ont pu montrer que les graisses ne sont pas stockées uniquement quand elles sont ingérées en excès, mais qu'elles le sont d'une manière constante. Après administration de graisses marquées, on en retrouve 50 % dans les dépôts dans les 4 jours qui suivent l'administration³⁾. Le renouvellement se poursuit même pendant le jeûne⁴⁾. Les mouvements de mobilisation et d'apposition de graisses sont donc constants et ne dépendent que partiellement de l'alimentation de l'animal.

*Shapiro & Wertheimer*⁵⁾ ainsi que *Clément*⁶⁾ ont pu montrer qu'une partie de la synthèse des graisses à partir des glucides se faisait dans le tissu adipeux. Les mêmes auteurs⁷⁾ ont prouvé que l'entrée des graisses dans ce tissu est un processus actif dépendant du métabolisme des cellules, processus inhibé par chauffage à 80°, par addition de NaF, de KCN et par abaissement de la température à moins de 20°.

Le tissu adipeux est donc un laboratoire très actif où il y a constamment formation, départ et arrivée de graisses. Le problème de la mobilisation des graisses présente de nombreuses difficultés. Il est malaisé de comprendre comment les gouttelettes de graisse compactes du tissu adipeux peuvent se transformer en particules finement divisées et en lipoprotéines plasmatiques. Les réactions chimiques qui doivent accompagner ces transformations se produisent certainement sous l'influence des ferments du tissu adipeux. Plusieurs systèmes enzymatiques ont été isolés dans ce tissu; on y trouve en particulier des lipases, des déshydrogénases et des phosphatases⁸⁾.

1) *G. Schramm & A. Wolff*, Z. physiol. Ch. **263**, 61 (1940).

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

3) *R. Schoenheimer & D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **111**, 163 (1935).

4) *K. Bernhard & H. Steinhauser*, Helv. **27**, 207 (1944).

5) *B. Shapiro & E. Wertheimer*, J. Biol. Chem. **173**, 725 (1948).

6) *G. Clément*, Ann. Nutrition **4**, 295 (1950).

7) *B. Shapiro, D. Weissmann, V. Bantor & E. Wertheimer*, Nature **161**, 482 (1948).

8) *E. Wertheimer & B. Shapiro*, Physiol. Rev. **28**, 451 (1948).

La présence d'une cholestérol estérase et d'une lécithinase dans les graisses de réserve paraissait possible *a priori*, puisque les esters du cholestérol et les lécithines ont des propriétés physico-chimiques particulièrement favorables à la formation de lipoprotéines.

I. Mise en évidence de la cholestérol estérase du tissu adipeux et étude de quelques-unes de ses propriétés.

Pour mettre en évidence cet enzyme, nous avons tout d'abord travaillé avec des homogénats de graisses fraîches de Rat, et avec du sérum inactivé comme substrat. Ultérieurement, d'autres essais furent exécutés avec l'insoluble d'extraction éthéro-acétonique des graisses et avec des substrats artificiels.

Mode opératoire: animaux et sources d'enzymes. Des rats albinos des deux sexes pesant de 170 à 250 g sont nourris avec un mélange se composant de 85% de grain et 15% de farine de viande, soit 26% de protéines, 6% de graisses et 48% de glucides, et avec des sels minéraux.

Après avoir tué les rats par un coup sur la nuque, nous prélevons immédiatement de la graisse (périrénales dans les premiers essais, ensuite d'autre source) et l'homogénéisons avec la solution tampon de *Krebs*: environ 200 mg de tissu pour 5 cm³ de tampon, ce qui correspond à 0,4—0,6 mg N₂ par cm³ d'homogénat (dosage au semi-micro-*Kjeldahl*).

Substrat. Sérum humain inactivé par chauffage à 57° pendant 1 h.; il contient 150 à 200 mg% de cholestérol, dont 59 à 68% sous forme d'esters.

Incubation. A un mélange de 3 cm³ de sérum, de 0,9 cm³ de tampon *Sørensen* et de glycocholate de Na (25—100 mg), nous ajoutons 0,2 cm³ d'homogénat. Pour déterminer le taux d'esters au temps 0, on prélève immédiatement 1,35 cm³ du mélange homogène, ce qui correspond à 1 cm³ de sérum. Le reste de la liqueur est incubé à 37° et agité pendant 4 h. Pour l'étude de l'hydrolyse en fonction du temps (essais s'étendant sur une plus longue durée), nous sommes partis de plus grandes quantités pour pouvoir faire plusieurs prélèvements.

Dosage du cholestérol et de ses esters. Le cholestérol et ses esters sont dosés d'après la méthode de *Schoenheimer & Sperry*¹⁾ (colorimètre de *Hilger* avec filtre Ilford 6600 à 7000 Å). Toutes les analyses sont faites à double. La précision de la méthode est de ± 2%.

Résultats.

1. *Rôle du pH.* Les proportions du mélange tampon *Sørensen* ont été changées pour permettre de rechercher le pH d'activité optimum de la cholestérol estérase. La moyenne de 5 essais (durée 8 h. 1/2) est représentée dans la fig. 1. Les mesures sont faites au pHmètre *Beckman*, modèle G.

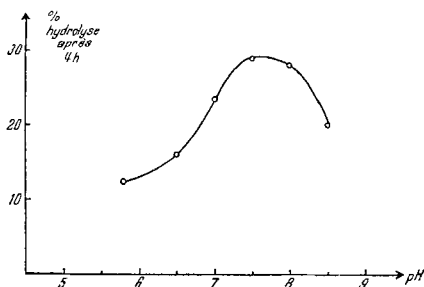


Fig. 1

¹⁾ R. Schoenheimer & W. Sperry, J. Biol. Chem. 106, 745 (1934).

Le degré d'hydrolyse varie passablement d'un rat à l'autre, mais le pH optimum est toujours situé à 7,5–7,6.

Des essais de 24 h. au pH 7,6 ont donné une hydrolyse plus forte allant jusqu'à 70%. La réaction est bien de nature enzymatique, car un homogénat bouilli est totalement inactif.

2. *Rôle des activateurs.* Les sels biliaires activent l'hydrolyse des esters du cholestérol par la cholestérol estérase du tissu adipeux, comme c'est le cas pour les cholestérol estérases d'autres sources (villosités intestinales, pancréas) (tableau 1).

Tableau 1.

Hydrolyse après 4 h.¹⁾
en fonction de la concentration en glycocholate.

Rats No.		16	17	18	19	20	21	Moyennes
Glycocholate dans le sérum	0 ⁰ / ₁₀₀	7%	8%	7%	6%	4%	33%	11%
	8 ⁰ / ₁₀₀	8%	10%	18%	3%	4%	35%	13%
	33 ⁰ / ₁₀₀	23%	25%	26%	17%	15%	38%	25%

Des essais comparatifs montrèrent que le glycocholate sans enzyme n'a aucune action.

3. *Substrats artificiels.* Nous avons tout d'abord choisi un substrat à base d'oléate de cholestéryle préparé selon la méthode de *Swell & Treadwell*²⁾ légèrement modifiée: on homogénéise au moyen de l'appareil de *Potter* un mélange de 13 mg d'oléate de cholestéryle dissous dans 1 cm³ d'éther, 5 cm³ de tampon phosphate de pH 7,7, 250 mg d'albumine, 0,5 cm³ de merthiolate 1⁰/₁₀₀ et 100 mg de glycocholate; on secoue 1 h. à 37°. La durée des essais est de 24 h.

Tableau 2.

Hydrolyse de l'oléate de cholestéryle émulsionné.

	Temps d'incubation	3 h.	6 h.	24 h.
No. 22	Hydrolyse ¹⁾	11%	19%	48%
No. 23		28%	30%	32%

Un autre essai exécuté selon *Nieft*³⁾ avec du palmitate de cholestéryle en solution colloïdale a donné une hydrolyse de 38% après 4 h.

4. *Essais d'estérification.* Il était intéressant de savoir si dans des conditions favorables la cholestérol estérase du tissu adipeux pouvait agir dans le sens d'une estérification. A cet effet, nous avons choisi comme substrat, du sérum totalement hydrolysé au préalable au moyen de villosités intestinales⁴⁾. Après l'avoir inactivé à nouveau, nous l'avons soumis à l'action d'un homogénat de graisses (pH 7,6). (Tableau 3.)

L'estérification est donc faible.

¹⁾ On entend par hydrolyse la diminution des esters à la fin de l'incubation, calculée en % de la valeur initiale.

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

³⁾ *M. L. Nieft & H. Deuel, jr.*, J. Biol. Chem. **177**, 144 (1949).

⁴⁾ *E. F. Metzger & P. Favarger*, Helv. **35**, 1805 (1952).

Tableau 3.
Esterification après 4 h. d'incubation.

Rats No.	25	26	27	28	29	30	31	32	Moyenne
Esterification	0%	1%	4%	4%	11%	13%	13%	15%	7,6%

5. *Action de l'oléate.* Nous avons voulu voir jusqu'à quel point l'équilibre chimique (la proportion des substances dans le mélange initial) est responsable du sens de la réaction globale. Dans ce but, nous avons ajouté de l'oléate de Na en différentes concentrations. L'oléate a une action inhibitrice sur la cholestérol estérase (tableau 4); le pH choisi dans ces essais est toujours celui d'activité maximum (7,6).

Tableau 4.
Inhibition de l'hydrolyse
par des concentrations croissantes d'oléate de Na.

	Concentration en oléate	0	7 ^o / ₁₀₀	14 ^o / ₁₀₀	21 ^o / ₁₀₀
No. 33	Hydrolyse après 4 h. d'incubation	48%	17%	14%	13%
No. 31		47%	43%	41%	33%

Le linoléate de Na a montré une action identique, beaucoup plus forte même dans un cas:

Tableau 5.
Inhibition de l'hydrolyse
par des concentrations croissantes de linoléate de Na.

	Concentration en linoléate	0	7 ^o / ₁₀₀	21 ^o / ₁₀₀
No. 35	Hydrolyse après 4 h. d'incubation	38%	28%	18%
No. 36		25%	13%	0%

6. *Influence de l'origine des graisses.* Nous nous sommes ensuite efforcés de savoir s'il y avait une différence d'activité entre les différentes graisses du Rat. (Tableau 6.)

Tableau 6.
Activité cholestérol estérasique de différentes graisses.
Hydrolyse après 4 h. d'incubation.

Graisses périrénales		Graisses ss-cutanées		Graisses brunes intrascapulaires		Graisses mésentériques	
No. 37	48%	No. 42	35%	No. 46	34%	No. 50	48%
No. 38	43%	No. 43	32%	No. 47	34%	No. 51	59%
No. 39	32%	No. 44	49%	No. 48	48%	No. 52	47%
No. 40	22%	No. 45	43%	No. 49	23%	No. 53	62%
No. 41	43%						
	48%		39%		34%		54%

Les graisses mésentériques montrent une activité supérieure à celle des autres graisses, bien que les ganglions lymphatiques aient été écartés dans la mesure du possible.

Un essai fait avec de la graisse humaine (sein) donna une hydrolyse de 20% après 4 h.

7. *Résidu insoluble restant après l'extraction éthero-acétonique.* Afin de rechercher si l'enzyme est soluble dans les solvants organiques ou lié au tissu conjonctif du tissu adipeux, nous avons fait une extraction à l'éther-acétone et examiné le résidu insoluble. Ceci nous a permis également de faire des mesures vraiment quantitatives quant à la concentration de l'enzyme.

Technique. On homogénéise à 0°, avec l'appareil de *Potter*, de la graisse fraîche (environ 500 mg) deux fois avec 5 cm³ d'acétone et 2 fois avec 5 cm³ d'éther; on filtre, lave à l'éther et sèche à 5°. On reprend la poudre obtenue dans 5 cm³ de mélange tampon et l'utilise comme source d'enzyme selon la méthode habituelle, en employant du sérum comme substrat. Les quantités de poudre sèche obtenues sont de 25 à 30 mg.

On constate toujours une activité identique pour le résidu acétono-insoluble et pour l'homogénat, obtenus à partir de la même quantité de graisse. L'insoluble contient donc toujours la totalité de l'enzyme. Un résidu éthero-acétono-insoluble de graisse périrénale de Porc fut préparé de la même façon, et utilisé comme source d'enzyme pour l'étude de l'activité cholestérolésterasique en fonction de la quantité d'enzyme et en fonction du temps (Fig. 2).

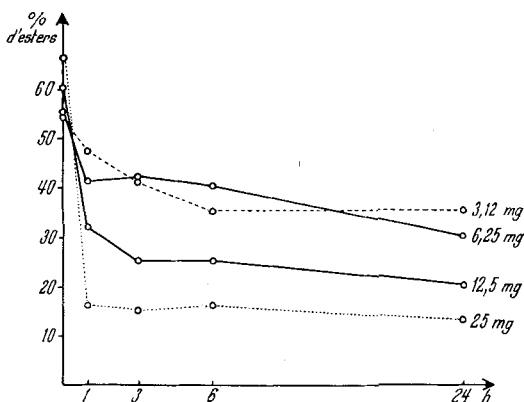


Fig. 2.

On peut hydrolyser dans les conditions optimum 80% des esters du cholestérol en 24 h.

II. Influence de certaines hormones sur l'activité de la cholestérolésterase du tissu adipeux.

La régulation de l'apposition et de la mobilisation des graisses du tissu adipeux est à la fois nerveuse et endocrine. C'est cette dernière qui nous intéressait.

1. *Action des hormones antéhypophysaires.* Les extraits d'hypophyse antérieure provoquent une mobilisation des graisses¹). *Barret, Best et Ridout*²) ont montré, à l'aide de graisses marquées chez la Souris, que ce sont les graisses de dépôt qui s'acheminent vers le

¹) L. H. Best & J. Campbell, *J. Physiol.* **86**, 190 (1936); M. R. A. Chance & T. R. Middleton, *Nature* **152**, 725 (1943).

²) H. M. Barret, C. H. Best & J. H. Ridout, *J. Physiol.* **93**, 367 (1938).

foie sous l'influence de l'hypophyse antérieure. *Stetten* et *Salcedo*¹⁾ sont arrivés au même résultat. Cette action a été attribuée tour à tour à l'hormone thyroïdienne²⁾, à l'hormone adrénoréotrope³⁾ et à l'hormone lactogénique⁴⁾.

Etant donné l'importance des hormones antéhypophysaires dans le métabolisme des graisses, nous avons étudié leur action ainsi que celle de l'insuline et de la thyroxine sur la cholestérol estérase du tissu adipeux.

Technique. Des rats de 180 à 200 g, à jeun depuis 48 h., reçoivent en injection de l'extrait antéhypophysaire sous forme de «Praephyson» de la maison *Promonta G.m.b.H.*, Hambourg (75 mg d'extrait sec par cm³ de solution injectable). L'injection est faite 3 à 6 h. avant la mort de l'animal; les doses injectées sont de 0,25, 0,5, 1,0 et 1,5 cm³ par 100 g de poids du corps. Les animaux de contrôle reçoivent un même volume d'extrait salin d'albumines de bœuf préparé selon *Banga*⁵⁾. Les animaux sont tués d'un coup sur la nuque et les essais poursuivis comme de coutume. On utilise comme source d'enzymes des homogénats de graisses périrénales, et, comme substrat, du sérum.

Résultats. Chez les contrôles, on observe comme dans les essais précédents une hydrolyse moyenne de 24% au bout de 4 h. avec des valeurs extrêmes de 10 et 48% (16 essais). L'injection elle-même et les extraits salins d'albumines sont donc sans effet.

Chez les 6 animaux qui reçoivent des doses élevées de Praephyson (1,5 cm³/100 g, soit 112,5 mg/100 g d'extrait sec), on note 5 fois une inhibition totale ou presque totale de l'hydrolyse; un animal n'a pas réagi et l'hydrolyse était normale: 31%.

Six animaux reçoivent 1 cm³/100 g (soit 75 mg d'extrait sec/100 g); ils montrèrent une inhibition partielle ou totale de leur pouvoir hydrolysant.

Onze animaux reçoivent des doses plus faibles: 0,5 cm³/100 g soit 37,5 mg/100 g d'extrait sec. Chez tous, nous avons observé une estérfication du cholestérol, soit une inversion de l'action normale de la cholestérol estérase du tissu adipeux.

Les résultats sont résumés dans la fig. 3.

Lorsque l'on diminue encore la dose, les résultats sont divergents; nous nous trouvons probablement à la limite d'action de l'hormone (4 essais avec 0,125 cm³/100 g, soit 18,75 mg/100 g d'extrait sec).

Cette inversion de l'activité de la cholestérol estérase du tissu adipeux sous l'influence de petites doses d'hypophyse antérieure est assez remarquable, et nous avons essayé de la reproduire in vitro:

A des concentrations relativement élevées (0,07 à 0,2 cm³/cm³ de substrat), le Praephyson fut sans influence sur l'action hydrolytique du tissu adipeux (6 essais).

Des concentrations plus faibles (0,003 à 0,005 cm³/cm³ de substrat) permirent d'observer une inhibition totale de l'hydrolyse (5 essais) ou une légère estérfication (+8% et +12%).

2. *Action de l'insuline.* L'insuline joue un rôle essentiel dans la synthèse des graisses à partir des glucides⁶⁾. Elle fait régresser la

¹⁾ *D. Stetten & J. J. Salcedo*, *J. Biol. Chem.* **156**, 27 (1944).

²⁾ *J. R. Franckson*, *C. R. Soc. Biol.* **144**, 1720 (1950); *B. M. Dobyms*, *Surg. Gynecol. Obstet.* **82**, 609 (1946).

³⁾ *G. Clément & G. Schaeffer*, *C. R. Soc. Biol.* **141**, 320 (1947); *L. Levin & R. K. Farber*, *Proc. Soc. Biol. Med.* **74**, 758 (1950); *C. H. Li, M. E. Simpson & H. M. Evans*, *Arch. Bioch. Biophys.* **23**, 51 (1949).

⁴⁾ *M. Reiss*, *Endocrinology* **40**, 294 (1947).

⁵⁾ *I. Banga*, *Studies of the Institute of medical Chemistry, University Szeged* **1**, 5 (1941): «Myosin and muscular contraction».

⁶⁾ *D. Stetten & W. Klein*, *J. Biol. Chem.* **162**, 377 (1946).

lipémie chez les rats diabétiques, s'oppose donc à la mobilisation des graisses¹⁾. Chez ces mêmes animaux, la synthèse des graisses à partir de glucose est nettement inhibée dans le foie²⁾. D'autre part, l'insuline empêche la formation de foie gras en cas de diabète pancréatique ou phlorizinique³⁾⁴⁾, ainsi qu'après injection d'hypophyse antérieure⁵⁾.

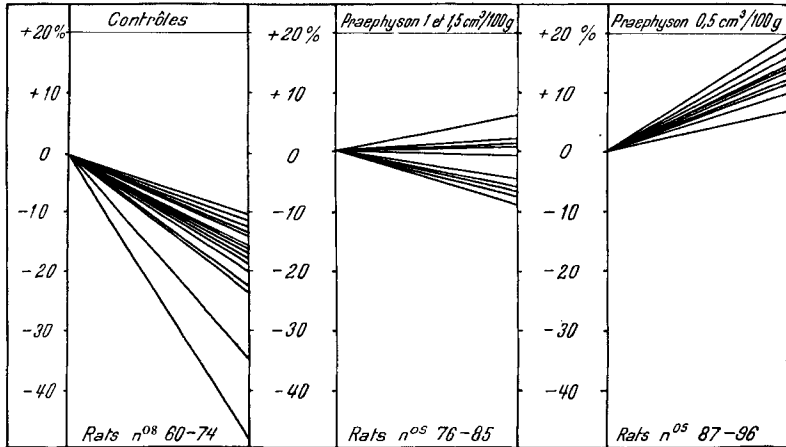


Fig. 3.

Pour voir quelle pouvait être l'action de l'insuline sur la cholestérol estérase du tissu adipeux, nous avons injecté à des rats 5 fois 10 U.I. d'insuline à 1 jour d'intervalle, chaque fois avec 1 cm³ de solution de glucose. Les animaux furent sacrifiés 1 h. après la dernière injection.

Chez 4 animaux, l'hydrolyse a été partiellement ou totalement inhibée. Variation du taux des esters: -4%, -6%, -9%, 0 (rats 106 à 109). Chez un cinquième animal, elle était presque normale: -17% (rat 110).

Nous avons également étudié l'influence *in vitro* de l'insuline sur le tissu adipeux d'animaux préalablement traités avec de petites doses (estérifiantes) d'hypophyse antérieure. On ajoute au substrat 0,33 et 0,07 U./cm³ d'insuline (tableau 7).

Tableau 7.

Influence de l'insuline sur le pouvoir estérifiant de la cholestérol estérase après injection d'hormone antéhypophysaire.

Variations du taux des esters après 4 h. d'incubation.

Rats No.	111	112	113	114	115	116
Pas d'insuline . .	+16%	+13%	+13%	+13%	+13%	+19%
0,33 U./cm ³ . . .	+2%	-12%	0	0	—	—
0,07 U./cm ³ . . .	+8%	0	—	—	0	0

¹⁾ J. P. Peters & D. D. van Slyke, Quantitative clinical chemistry, Interpretations, Vol. 1, p. 503, Baltimore 1946.

²⁾ S. S. Chernick, I. L. Chaikoff, E. J. Masoro & E. Isaeff, J. Biol. Chem. **186**, 527 (1950). ³⁾ E. Wertheimer, Pflüg. Arch. ges. Physiol. **213**, 298 (1926).

⁴⁾ I. Banga, Studies of the Institute of medical Chemistry, University Szeged **1**, 5 (1941): «Myosin and muscular contraction».

⁵⁾ J. Campbell, Am. J. Physiol. **147**, 742 (1946).

L'insuline supprime donc l'action estérifiante de petites doses d'extrait d'hypophyse antérieure, dans un cas elle l'a même renversée. Dans les essais contrôles, on ajoute soit 0,2 ou 0,03 mg de cystéine, soit la même quantité de cystine par cm³ de substrat pour éviter que l'action de l'insuline ne puisse être attribuée aux groupes thiol ou disulfure.

3. *Action de la thyroxine ou du jeûne.* On observe chez les animaux thyroïdectomisés une diminution des réserves graisseuses¹⁾. Il paraissait donc intéressant de connaître l'influence de la thyroxine sur l'activité cholestérolstérasiq ue du tissu adipeux.

Quatre rats reçurent 0,5 mg/kg de thyroxine, mais la cholestérolstérase de leur tissu adipeux se comportait dans ces conditions comme celle des contrôles. Une dose 10 fois plus forte (4 essais) resta dans deux cas sans action; elle provoqua dans un cas une inhibition de l'hydrolyse, et une fois même une estérification (+14%). Les rats ont donc réagi de manière individuelle à la thyroxine.

Enfin, 4 rats furent soumis au jeûne pendant 3 jours et reçurent un repas riche en graisse 3 h. avant d'être sacrifiés. Trois fois le tissu adipeux n'a montré aucune activité enzymatique; l'action hydrolytique de la cholestérolstérase était donc totalement inhibée. Chez le quatrième animal, il y avait même une action estérifiante (+12% d'esters au bout de 4 h.), donc inversion de l'activité normale.

III. Recherche d'une lécithinase dans le tissu adipeux.

D'après *Le Breton* et *Pantaléon*²⁾, la constance du rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié dans le sérum est due à l'action de la β -lécithinase qui libère les acides gras nécessaires à maintenir le taux des esters du cholestérol. L'action de la β -lécithinase est donc intimement liée à celle de la cholestérolstérase. C'est pourquoi nous avons étudié son activité chez des rats non traités et chez des rats traités avec de petites doses d'hypophyse antérieure.

Technique. On prépare un homogénat de graisses comme précédemment et laisse incuber 5 cm³ de sérum avec 0,5 cm³ d'homogénat. On prélève 2,2 cm³ de ce mélange au début, et après 4 h. on dose le phosphore lipidique selon *Youngburg & Youngburg*³⁾.

Résultats. Les valeurs trouvées avant l'incubation varient de 210 à 270 mg selon les différents sérums.

Chez les animaux non traités, il y a au cours de l'incubation une augmentation du phosphore lipidique, donc une estérification (9 essais) (tableau 8).

Tableau 8.

Augmentation des phospholipides après 4 h. ou 24 h. d'incubation en présence de tissu adipeux.

Rats No.	126	127	128	129	130	Moyenne
4 h. . . .	+18%	+13%	+23%	+ 9%	+6,5%	+14%
Rats No.	131	132	133	134		Moyenne
24 h. . . .	+51%	+24%	+28%	+18%		+30%

¹⁾ *E. M. MacKay & J. W. Sherril*, *Endocrinology* **28**, 518 (1941).

²⁾ *E. Le Breton & J. Pantaléon*, *Arch. Sci. Physiol.* **1**, 299 (1947).

³⁾ *Youngburg & Youngburg*, *J. Lab. clin. Med.* **16**, 158 (1930).

Dix animaux reçoivent la dose d'hypophyse antérieure (0,5 cm³/100 g) provoquant un renversement de l'action de la cholestérol estérase du tissu adipeux (voir plus haut). On constate également un renversement de l'action de la lécithinase, mais cette fois dans le sens contraire: c'est l'hydrolyse qui est favorisée par les hormones antéhypophysaires (tableau 9).

Tableau 9.

Augmentation des phospholipides après 4 h. ou 24 h. d'incubation en présence de tissu adipeux.

Animaux traités par l'extrait antéhypophysaire.

Rats No.	136	137	138	139	140	Moyenne
4 h. . . .	-22%	-16%	-13%	-13%	-14%	-14%
Rats No.	141	142	143	144	145 ¹⁾	Moyenne
24 h. . . .	-67%	-68%	-53%	-54%	+27%	-43%

Discussion.

Nous admettons que la cholestérol estérase mise en évidence dans le tissu adipeux est identique à celle qui fut trouvée dans les autres tissus. Le pH d'activité optimum²⁾³⁾ est un peu plus élevé. *Nieft*⁴⁾ indique pour le pancréas 6,7–7,1 et *Metzger*⁵⁾ 7,1–7,5 pour les villosités intestinales. *Klein*⁶⁾ note 5,6 pour l'estérification dans l'extrait de foie et 7,0 pour l'hydrolyse. Dans le sérum, *Nieft*⁷⁾ a trouvé une action hydrolysante maximum au pH 6,4, alors que pour l'estérification l'activité est la plus forte au pH 5,8. La divergence de ces résultats provient certainement de ce que les auteurs ont travaillé dans des conditions différentes. L'activation de l'enzyme par les sels biliaires est comparable à celle qui fut observée dans les préparations provenant d'autres tissus⁸⁾⁹⁾.

Après avoir démontré l'existence d'une cholestérol estérase dans le tissu adipeux, il fallait voir si sa présence correspondait à un rôle spécifique dans la mobilisation et la mise en réserve des graisses. C'est pourquoi nous avons provoqué une mobilisation des graisses par injections d'extraits antéhypophysaires. Lors de la mobilisation

¹⁾ Cet animal n'a pas réagi à l'hypophyse antérieure (augmentation du phosphore lipidique de 27% après 24 h.).

²⁾ *R. Schoenheimer & D. Rittenberg*, *J. Biol. Chem.* **111**, 163 (1935).

³⁾ *K. Bernhard & H. Steinhauser*, *Helv.* **27**, 207 (1944).

⁴⁾ *M. L. Nieft*, *J. Biol. Chem.* **177**, 151 (1949).

⁵⁾ *E. F. Metzger & P. Favarger*, *Helv.* **35**, 1805 (1952).

⁶⁾ *W. Klein*, *Z. physiol. Ch.* **254**, 1 (1938).

⁷⁾ *M. L. Nieft & H. Deuel, jr.*, *J. Biol. Chem.* **177**, 144 (1949).

⁸⁾ *R. S. Yamamoto, N. P. Goldstein & C. R. Treadwell*, *J. Biol. Chem.* **180**, 615 (1949); *F. Taveau & R. Nivet*, *J. de Physiologie* **43**, 876 (1951).

⁹⁾ *E. F. Metzger & P. Favarger*, *Helv.* **35**, 1805 (1952).

des graisses par suite de jeûne ou de «stress», il y a, d'après *Levin & Farber*¹⁾, sécrétion de deux hormones pituitaires: l'A.C.T.H. et un facteur initiateur («triggering factor»). Le premier provoque la sécrétion d'hydroxy-11-stéroïdes qui rendent l'organisme sensible au deuxième facteur. Ce dernier est peut-être l'hormone de croissance, qui serait ainsi responsable de la mobilisation des graisses. Si la cholestérol estérase intervient dans la mobilisation des graisses, l'injection d'hormones antéhypophysaires doit modifier son action *in vivo*, et cette action se reflète effectivement sur le comportement de l'enzyme *in vitro*. Il peut paraître étrange que de faibles doses d'hypophyse provoquent une estérification, alors que les plus fortes ne causent qu'une inhibition de l'hydrolyse. Cette observation n'est cependant pas isolée et la submersion par une hormone peut produire un effet moins puissant ou même opposé à celui de doses physiologiques²⁾. L'adjonction de l'hormone au milieu réactionnel *in vitro* agit dans le même sens en produisant soit une estérification soit plus généralement une inhibition totale de l'hydrolyse, l'effet étant là aussi plus fort avec les faibles concentrations qu'avec les fortes concentrations. La sensibilité de la cholestérol estérase aux hormones antéhypophysaires une fois établie, il fallait chercher à obtenir si possible des précisions sur son mécanisme d'action. La mobilisation des graisses s'accompagne-t-elle vraiment d'une estérification? L'un de nous a relevé plusieurs fois³⁾ combien il était difficile de prévoir le sens des réactions d'hydrolyse ou d'estérification *in vivo*, d'après les résultats d'études *in vitro*. On pouvait supposer que l'administration d'insuline, qui favorise l'apposition des graisses, exercerait une action contraire à celle des hormones antéhypophysaires. Il n'en a pas été ainsi, et cette hormone injectée à des rats ne fait que supprimer l'activité hydrolysante de la cholestérol estérase. Si l'on cherche à produire l'apposition de graisses par un régime riche en graisses suivant un jeûne de plusieurs jours, on obtient des résultats variables et difficiles à interpréter, mais jamais non plus une activation de la réaction d'hydrolyse. Une autre série d'essais donne un résultat plus significatif. Un groupe de rats est traité par une dose d'hormone antéhypophysaire identique à celle qui favorise régulièrement une action estérifiante de la cholestérol estérase. On ajoute de l'insuline au milieu réactionnel *in vitro*, et constate la suppression de cette action estérifiante. L'antagonisme de ces hormones est ainsi mis en évidence une fois de plus. Il s'agit cependant ici d'une réaction d'un type tout différent des réactions qui furent étudiées jusqu'ici, car l'énergie mise en jeu est très petite. On conçoit difficilement comment cette réaction

1) *L. Levin & R. K. Farber*, Trans. New-York Acad. Sc., série II, **13**, 260 (1951).

2) *J. Moore*, C. r. Physiologie et Zoologie **14**, 1 (1941).

3) *P. Favarger*, Exposés annuels de Biochimie médicale dir. par *M. Polonovski*, 13e série, 1951; Bl. Soc. Chim. biol. **33**, 924 (1951).

d'estérification pourrait dépendre de la dégradation des glucides ou de la synthèse des acides gras. On pourrait supposer qu'il s'agit d'une influence très générale d'ordre physico-chimique, par exemple. Nous nous proposons de poursuivre cette étude en examinant notamment l'action des deux hormones combinées *in vivo* ou celle des hormones corticosurrénales.

Un autre résultat nous paraît également significatif. Les lécithinases du tissu adipeux exercent leur action dans le sens de l'estérification, chez les rats non traités. Après l'administration d'hormone antéhypophysaire, on assiste à une hydrolyse. Il n'est guère possible non plus de tirer des conclusions quantitatives de cette observation, mais on peut la rapprocher de l'action complémentaire démontrée par *Le Breton*¹⁾ pour la lécithinase et la cholestérol estérase du plasma sanguin. L'hydrolyse des lécithines sous l'influence du premier de ces deux enzymes fournirait les acides gras nécessaires à l'estérification du cholestérol sous l'influence du second. Il paraît vraisemblable qu'une réaction analogue se produise dans le tissu adipeux en relation avec la mobilisation des graisses. Il ne faut pas oublier que le système nerveux joue aussi un rôle dans la régulation du métabolisme des graisses, le sympathique retardant le transport des graisses, et le para-sympathique l'accéléralant²⁾.

RÉSUMÉ.

Nos recherches permettent de démontrer la présence dans le tissu adipeux d'un enzyme favorisant *in vitro* l'hydrolyse des esters du cholestérol. Son action est étudiée en fonction du pH, de la concentration en enzyme, du temps et de la nature du substrat. Le tissu adipeux des rats traités par une dose appropriée d'extrait antéhypophysaire favorise non pas une hydrolyse des esters du cholestérol, mais une estérification du cholestérol. *In vitro* l'action des hormones antéhypophysaires est analogue. Ajoutée au milieu expérimental, l'insuline supprime l'action de l'extrait antéhypophysaire.

Le tissu adipeux contient également une lécithinase dont l'action est sensible aux hormones antéhypophysaires.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève.

¹⁾ *E. Le Breton & J. Pantaléon*, Arch. Sci. Physiol. **1**, 299 (1947).

²⁾ *G. Clément*, Ann. Nutrition **4**, 295 (1950).