

**ÉTUDE *IN VITRO* DE LA BIOTRANSFORMATION  
DE L'ACIDE OLÉIQUE (1-<sup>14</sup>C)  
DANS LE CONTENU CÆCAL DU LAPIN.  
RÔLES DE LA MICROFLORE  
ET DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE EXOCRINE**

J.-P. PERRET

*Institut Universitaire de Technologie,  
Laboratoire de Physiologie,  
43, boulevard du 11-Novembre-1918,  
69 Villeurbanne*

---

**RÉSUMÉ**

La biotransformation de l'acide oléique (1-<sup>14</sup>C), *in vitro*, dans le contenu cæcal de lapin a été mise en évidence.

- sur des lapins (3) privés de sécrétion pancréatique exocrine
- sur des lapins (3) témoins,

le contenu cæcal ayant été ou non débarrassé, par filtration, de ses micro-organismes avant l'incubation.

Les résultats obtenus constituent une approche des mécanismes de la biotransformation de l'acide oléique au cours d'incubations dont le pH optimum se situe autour de 6,2 à 7.

L'expérience montre que 22,7 à 30,6 p. 100 de l'acide oléique est estérifié sous forme de phospholipides, esters de stérols, et ester méthylique, en 4 à 8 heures chez les lapins témoins. Son hydrogénation est de 60 p. 100 en 8 heures.

L'exclusion de la sécrétion pancréatique exocrine ralentit considérablement ces deux phénomènes. L'estérification ne porte plus que sur 5 p. 100 de l'acide oléique dont 7 p. 100 seulement sont hydrogénés en acide stéarique. L'absence de microorganismes supprime totalement la biotransformation de l'acide oléique.

L'addition de suc pancréatique dans le contenu cæcal de lapin privé de sécrétion pancréatique exocrine rétablit l'estérification (33 p. 100) de l'acide oléique dont l'hydrogénation reste cependant plus faible que chez le témoin (17,8 contre 39,1 p. 100 après 4 heures d'incubation).

Par ailleurs, l'évolution parallèle des phénomènes de biohydrogénation et de formation des esters de stérols suggère que les micro-organismes utilisent les acides gras libres issus de l'activité du suc pancréatique pour former des stérides servant de substrat aux hydrogénases microbiennes.

---

## I. — INTRODUCTION

Le cæcum du Lapin constitue un réservoir où les graisses alimentaires subissent des transformations qualitativement analogues à celles qui ont été mises en évidence dans les préestomacs des ruminants : REISER (1951), GARTON *et al.* (1958). L'hydrolyse des triglycérides et l'hydrogénation des acides gras éthyléniques aboutissent à une saturation remarquable des lipides fécaux et en particulier de ceux des cæcotrophes que le Lapin ingère : BACQUES et PERRET (1971). Ces transformations semblent liées à l'activité des micro-organismes du rumen : WRIGHT (1959), HOBSON et MANN (1961), ou du cæcum : EYSSSEN *et al.*, (1973).

Chez le Rat, la lipolyse est faible mais l'hydrogénation des acides gras longs insaturés est importante : HOET et EYSSSEN (1964), REINA-GUERRA *et al.* (1969). L'étude de l'excrétion fécale des acides gras chez les rats axéniques ou cæcectomisés montre par ailleurs, qu'en dehors de son action sur la motricité intestinale, la flore cæcale modifie les proportions d'acides gras insaturés et saturés : HOET et EYSSSEN (1964), DEMARNE *et al.* (1972).

Chez le Lapin, aucun travail, à notre connaissance, n'a cherché à isoler les souches bactériennes réalisant lipolyse et hydrogénation des acides gras insaturés. On sait que la microflore cæcale, essentiellement anaérobie, est abondante : GOUET et FONTY (1973).

Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence, de façon globale, le rôle de ces micro-organismes. C'est ainsi que la cæcumectomie provoque l'élimination d'une fraction importante d'acides gras insaturés et que la ligature du canal de Wirsung n'empêche pas l'hydrolyse des lipides alimentaires, mais réduit leur absorption : BACQUES et DEMIGNE (1970), BACQUES et PERRET (1971). La cæcumectomie pratiquée 2 mois après la ligature du canal de Wirsung se traduit, là encore, par une désaturation des acides gras éliminés. Par ailleurs, l'apparition d'esters méthyliques d'acides gras est un phénomène dont la signification reste à préciser : BACQUES et PERRET (1970).

Ces conséquences essentielles de l'activité microbienne au niveau du cæcum du Lapin étant bien établies, nous avons cherché à savoir en quoi la digestion des lipides au niveau de l'intestin grêle, et en particulier l'action hydrolysante des lipases pancréatiques, peut influencer l'utilisation et la transformation des produits issus de cette digestion par les micro-organismes cæcaux. Ceci avant de rechercher dans quelle mesure les produits du métabolisme bactérien peuvent subir une absorption au niveau du colon.

Nous avons choisi d'aborder le premier problème par des incubations *in vitro* de contenu cæcal de lapin témoin ou privé de sécrétion pancréatique exocrine, en présence de C<sub>18:1</sub> (1-<sup>14</sup>C), substrat qui est normalement issu de la digestion de graisses dans l'intestin grêle. Les essais ont été effectués soit avec le contenu cæcal complet, soit avec du jus cæcal privé de ses micro-organismes par filtration.

## II. — PROTOCOLE

### 1. — Ligature du canal de Wirsung

Elle est effectuée sous anesthésie générale (Nembutal, 30 mg/kg/IV) selon les règles d'aseptie chirurgicale. Nous utilisons les lapins ( $n = 3$ ) 6 semaines après l'opération. Les animaux, placés en cages individuelles, sont nourris exclusivement de granulés industriels, *ad libitum*.

### 2. — Prélèvements de suc pancréatique

On cathétérise le canal de Wirsung d'un lapin normal anesthésié ; le suc est recueilli pendant 3 heures. Sa sécrétion est accélérée par perfusion veineuse lente de sécrétine (0,3 UI/kg/h) et de pilocarpine (0,03 mg/kg/h). On obtient ainsi un débit de 0,8 ml/kg/h et un suc riche en bicarbonate (plus de 100 mM/l) et pauvre en enzymes (2,5 mg de protéines/ml). Le suc recueilli à la température de 0°C, 20 heures avant les incubations, est conservé à — 4°C sous atmosphère d'azote.

### 3. — Technique d'incubation

#### a) Prélèvement et préparation du contenu cæcal.

Nous avons utilisé 6 lapins (3 témoins, 3 opérés), tués par décollement cervico vertébral puis saignés.

Iléon et colon proximal sont ligaturés à proximité du cæcum qui est alors prélevé. Son contenu est transféré dans une fiole à vide tarée de 250 ml, où circule un fort courant d'azote, en crevant la paroi cæcale et en exprimant le contenu par pression manuelle. Le courant d'azote étant maintenu, le contenu est homogénéisé avec un agitateur en verre. Une moitié du prélèvement est utilisée sans traitement préalable à l'incubation. Des parties aliquotes en sont réparties dans des récipients tarés, purgés de leur air depuis dix minutes par un courant d'azote, et contenant déjà le substrat radioactif et éventuellement le suc pancréatique et le tampon. L'ensemble est homogénéisé avec un agitateur en verre puis à l'aide d'un fort courant d'azote.

L'autre moitié du prélèvement est utilisée pour l'étude de la transformation du  $C_{18:1}$  en l'absence de micro-organismes. Après dilution avec 2 volumes de NaCl 9 p. 1 000 (pH : 6,25) on élimine :

— les débris alimentaires par centrifugation (6 000 g, 15 mn).

— puis les micro-organismes par filtration du surnageant limpide sur des bougies de Chamberland de porosité 2,5  $\mu$ . Le filtrat « acellulaire » utilisé pour les incubations, ne renferme que les produits normalement en solution dans le contenu cæcal, parmi lesquels les enzymes digestifs et éventuellement microbiens, ainsi qu'un nombre très réduit de bactéries.

#### b) Conditions d'incubation.

3 g de contenu cæcal total, ou 3 ml de filtrat acellulaire (= 1 ml du jus cæcal) sont incubés à 38°C sous atmosphère d'azote en présence de 1  $\mu$ Ci de  $C_{18:1}$  ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ).

Pour déterminer les conditions de pH optimales permettant la biotransformation de l'acide oléique marqué, nous avons travaillé :

— soit en milieu tamponné à pH 6 ou 7 ou 8, avec 1 ml de tampon phosphate 0,05 M ;

— soit en milieu non tamponné (pH = 6,2 à 6,3).

Des prélèvements sont effectués à  $t = 1, 2, 4, 8$  et 24 heures.

c) Un essai de détermination de l'origine des esters méthyliques d'acides gras nous a amené à effectuer des incubations de contenu cæcal total de lapin témoin en présence de 5  $\mu$ Ci de Méthionine (Methyl- $^{14}\text{C}$ ). Était ajouté au milieu d'incubation 1 ml d'une association vitamine  $B_{12}$  (1 mg/ml) acide folique (1 mg/ml)  $\text{MgCl}_2$  (0,02M) favorisant les transméthylations.

### 4. — Techniques d'analyse

a) La pureté du  $C_{18:1}$  ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ) est vérifiée par chromatographie sur couche mince puis radiochromatographie en phase gazeuse. Aucune trace de radioactivité n'est décelée ailleurs que sur l'acide oléique libre.

b) L'extraction des lipides du milieu d'incubation, leur purification et le fractionnement de l'extrait sur couche mince ont été décrits dans un travail précédent : BACQUES et PERRET (1971).

Afin de vérifier l'absence d'artéfact issu du mode d'analyse, nous avons effectué des extractions à partir de contenu cæcal total, en présence de C<sub>18:1</sub> (I-<sup>14</sup>C) sans temps d'incubation.

Nous n'avons toujours retrouvé de radioactivité que sur l'acide oléique libre.

Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés à l'aide du diazométhane, à partir des acides gras libres : WOLFF (1968). Cette technique permet de ne pas dénaturer les acides gras plus fragiles, comme les acides à cycle propane dont nous tenions à vérifier une formation éventuelle.

Ils sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne polaire (EGS, 20 p. 100 sur chromosorbe W, 80-100 mesh) et apolaire (Apiezon, 15 p. 100 sur chromosorbe W, 80-100 mesh), avant et après leur hydrogénation catalytique (Pt O<sub>2</sub> sous atmosphère d'hydrogène) : VOGEL (1967). Les temps de retention des divers esters sont comparés à ceux d'un mélange étalon pour les acides à chaîne droite, et aux valeurs publiées : YANO et coll. (1971), GUNSTONE et PERERA (1973), pour les acides cycliques ou ramifiés.

c) La radioactivité des fractions lipidiques séparées par chromatographie sur couche mince est mesurée (d.p.m.) par scintillation liquide. Scintillant = Toluène-PPO-POPOP (860-0,3-0,01).

La radioactivité des acides gras constitutifs de chaque fraction est évaluée, après cracking catalytique des produits séparés par chromatographie en phase gazeuse, à l'aide d'un compteur proportionnel sans fenêtre à circulation de méthane, couplé au chromatographe : KOLB et WIEDEKING (1968).

### III. — RÉSULTATS

#### A. — Influence du pH et du temps d'incubation sur l'estérification de l'acide oléique (I-<sup>14</sup>C)

On n'observe jamais d'incorporation de l'acide oléique dans les glycérides.

Par contre, cette incorporation est immédiate dans les phospholipides et les esters de stérols (fig. 1, tabl. 1).

Dans le premier cas, un pH proche de la neutralité est favorable. Dans le second cas, on n'observe pas de variation dans le pourcentage d'incorporation pour des pH situés entre 6 et 8.

L'apparition d'esters méthyliques d'acides gras est le phénomène majeur. Elle requiert un pH proche de la neutralité (6,2 à 7).

L'étude de la cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les trois fractions estérifiées permet de distinguer deux phases.

La première est caractérisée par une activité estérifiante dominante qui affecte 20 p. 100 de l'acide oléique, et dont la durée est de 2 à 8 heures, selon le pH du milieu. La seconde, plus tardive est dominée par une activité hydrolytique n'affectant pas les stérides, dont le taux croît quel que soit le pH du milieu.

Cette seconde phase nous semble avoir peu d'intérêt car, *in vivo*, le bol alimentaire est à 80 p. 100 évacué 8 heures après son arrivée dans le cæcum : PICKARD et STEVENS (1972), et par ailleurs, une incubation prolongée peut favoriser le développement de micro-organismes n'ayant pas, habituellement, d'activité dans le cæcum.

Nous notons enfin que l'apparition d'esters méthyliques d'acides gras est relativement tardive. Ces esters ne se formeraient pas directement à partir des acides gras libres initialement présents dans le milieu, mais plutôt par transestérification à partir des phospholipides ou des stérides. Ils s'accumulent alors dans le milieu d'incubation.

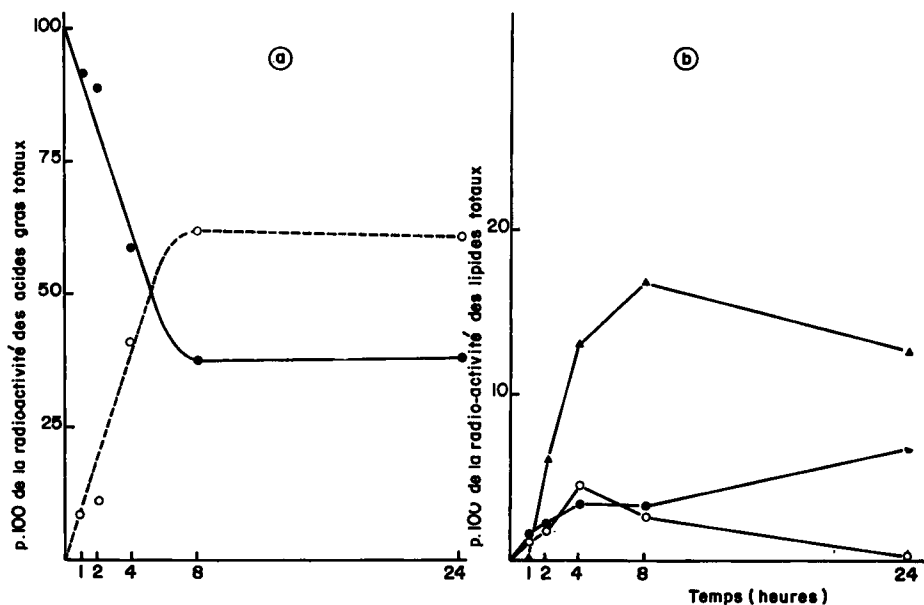


FIG. 1. — Étude cinétique de  
 a : l'hydrogénation de l'acide oléique (1-<sup>14</sup>C)  
 ○-----○ C<sub>18</sub> ●-----● C<sub>18:1</sub>  
 b : l'incorporation de l'acide oléique (1-<sup>14</sup>C) dans les lipides estérifiés du contenu  
 cæcal de lapin témoin incubé sous azote, à 38°C, en milieu non tamponné.  
 ▲ esters méthyliques  
 ● stérides  
 ○ phospholipides

TABLEAU I

Étude cinétique de l'incorporation de la radioactivité initialement liée au C<sub>18:1</sub> (1-<sup>14</sup>C), dans les diverses fractions lipidiques du contenu cæcal total de lapins témoins, en fonction du pH du milieu d'incubation

Les chiffres expriment le pourcentage de la radio-activité totale du milieu.  
 Les incubations sont faites à 38°C sous atmosphère d'azote

pH		Temps d'incubation				
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Phospholipides	6	1	2,9	0	0	0,3
	non tamponné	1,2	1,8	4,5	2,7	0,3
	7	4,6	3,3	3,0	4,9	1,9
	8	2,5	3,8	0,1	0	0
Stérides	6	2,7	3,5	3,4	3,5	4,4
	non tamponné	1,6	2,3	3,5	3,1	6,9
	7	2,8	4,1	3,7	3,6	4,1
	8	3,7	4,0	3,2	3,3	4,8
Esters méthyliques d'acides gras	6	0	1,3	1,5	0	8,7
	non tamponné	0,2	5,9	12,5	16,9	12,7
	7	0	1,5	23,9	15,7	9,4
	8	0	4,8	3,1	0,3	0,6

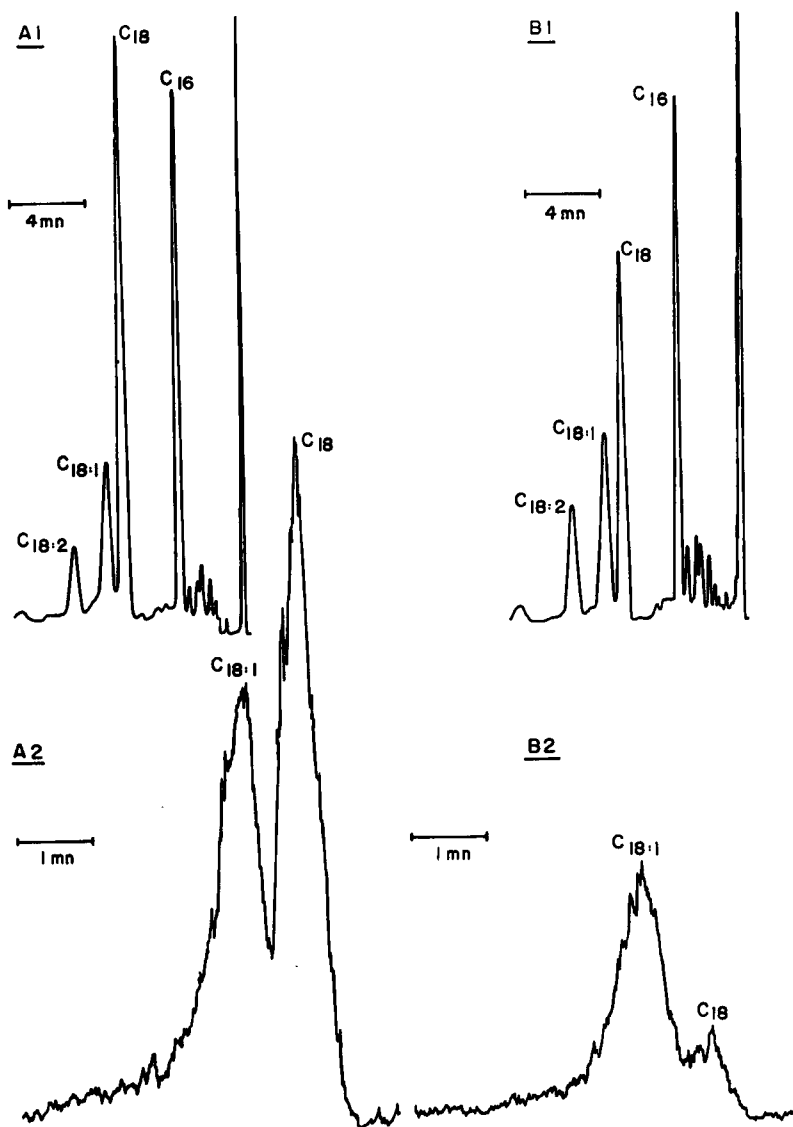


FIG. 2. — Radiochromatographie en phase gazeuse des acides gras totaux du contenu cœcal de lapin

A : témoin

B : avec ligature du canal de Wirsung incubé 4 h à 38°C sous atmosphère d'azote en milieu non tamponné.

1 : chromatogramme (EGS 20 p. 100 sur chrom. W-AW, 80-100 mesh à 195°C ; gaz vecteur N<sub>2</sub> 34 ml/mn ; colonne 3 m.).

2 : radiogramme (volume du compteur : 10 ml ; débits : N<sub>2</sub> 17 ml/mn ; H<sub>2</sub> 22 ml/mn ; CH<sub>4</sub> 11 ml/mn ; constante de temps 3 s.).

B. — *Hydrogénation de l'acide oléique et distribution des acides gras marqués entre les diverses fractions lipidiques*

Pour la suite de ce travail, nous avons préféré opérer en milieu non tamponné où l'incorporation du C<sub>18:1</sub> (I-<sup>14</sup>C) dans les lipides estérifiés s'est avérée être la meilleure.

La saturation de l'acide oléique en acide stéarique s'arrête lorsque 60 p. 100 de l'acide oléique a été transformé, ce qui requiert 8 heures d'incubation (voir tabl. 2 et fig. 1 A).

Les acides gras marqués (C<sub>18</sub> et C<sub>18:1</sub>) ne sont incorporés en quantité équivalente que dans la fraction esters de stérols (tabl. 3). Par contre, on retrouve surtout de l'acide stéarique marqué au niveau des esters méthyliques et l'acide oléique marqué au niveau des phospholipides.

TABLEAU 2

*Influence du pH et du temps d'incubation sur l'hydrogénation du C<sub>18:1</sub> (I-<sup>14</sup>C) dans le contenu cæcal total de lapins témoins*

Les résultats sont exprimés en p. 100 de l'activité des acides gras totaux du milieu d'incubation.

Incubations effectuées à 38°C et sous atmosphère d'azote

		1 h	2 h	4 h	8 h	24h
pH = 7	C <sub>18</sub>	15,2	26,8	41,2	60,8	59,4
	C <sub>18:1</sub>	84,8	73,2	58,8	40,2	40,6
Milieu non tamponné	C <sub>18</sub>	8,8	11,2	39,1	62,0	61,1
	C <sub>18:1</sub>	91,2	88,8	60,9	38,0	38,9

La cinétique de l'hydrogénation de l'acide oléique montre que l'apparition d'acide stéarique marquée est rapide. Elle précède la formation des esters méthyliques d'acides gras.

Elle apparaît donc davantage liée à la formation d'esters de stérols ou de phospholipides.

Il faut noter que l'hydrogénation n'a lieu que pendant la phase d'estérification de l'acide oléique.

C. — *Influence de la suppression de la sécrétion pancréatique exocrine sur l'estérification et l'hydrogénation de l'acide oléique (I-<sup>14</sup>C)*

Après 4 heures d'incubations dans les mêmes conditions que précédemment, les effets obtenus par suite de la suppression de la sécrétion pancréatique exocrine sont caractéristiques (tabl. 3 et 4 ; fig. 2).

1. Diminution de l'intensité de l'incorporation d'acides gras marqués dans les lipides estérifiés (plus particulièrement les phospholipides et les esters méthyliques d'acides gras).

2. Inhibition considérable (81 p. 100) de la saturation de l'acide oléique.
3. L'addition de 0,5 ml de suc pancréatique (contenant environ 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ) au milieu d'incubation,
  - rétablit l'incorporation des acides gras dans les stérides et les esters méthyliques
  - mais ne rétablit que partiellement (45 p. 100) la saturation de l'acide oléique.
4. L'addition de 0,5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  à 1 p. 100 ( $\approx 60 \mu\text{M}$ ), au milieu d'incubation ne rétablit pas l'activité estérifiante du milieu d'incubation et supprime l'hydrogénation de l'acide oléique.

TABLEAU 3

*Répartition de la radioactivité (exprimée en p. 100)  
entre les acides stéarique et oléique,  
au niveau des diverses fractions lipidiques du contenu cæcal*

Conditions d'incubation, temps : 4 h (Milieu non tamponné, température : 38°C ; atmosphère : azote). Influence de la sécrétion pancréatique exocrine et des micro-organismes. (Cases blanches : activité non mesurable par radiochromatographie en phase gazeuse).

		Témoins		Wirsung ligaturé				
		Contenu cæcal total	Filtrat « Acellulaire »	Contenu cæcal total	Contenu cæcal total		Filtrat « Acellulaire »	Filtrat « Acellulaire » + suc pancréatique
					+ suc pancréatique	+ $\text{NaHCO}_3$ (200 mM/l)		
Lipides totaux	$\text{C}_{18}$	39,1	0	7,3	17,8	0	0	0
	$\text{C}_{18:1}$	60,9	100	92,7	82,2	100	100	100
Acides gras libres	$\text{C}_{18}$	37,0	0	15,4	10,1	0	0	0
	$\text{C}_{18:1}$	63,0	100	84,8	89,6	100	100	100
Esters méthyliques d'acides gras	$\text{C}_{18}$	58,1	0		32,0	0	0	0
	$\text{C}_{18:1}$	31,9	0		68,0	100	0	0
Phospholipides	$\text{C}_{18}$	20,1	0				0	0
	$\text{C}_{18:1}$	79,9	0				0	0
Esters de Stérols	$\text{C}_{18}$	47,2	0	0	26,7	0	0	0
	$\text{C}_{18:1}$	52,8	0	100	73,3	100	0	0

Ces résultats montrent que le suc pancréatique intervient de façon positive dans le métabolisme cæcal de l'acide oléique, et ce par l'intermédiaire des enzymes qu'il contient. Le  $\text{NaHCO}_3$  de ce suc pancréatique ne joue aucun rôle. Il faut noter qu'il ne modifie d'ailleurs pas le pH du contenu cæcal puisque celui-ci reste identique à celui des animaux témoins chez les lapins ayant subi la ligature du canal de Wirsung.

Nous notons par ailleurs que l'estérification et l'hydrogénation de l'acide oléique



sont ici encore étroitement liées, et évoluent de façon parallèle. Cependant, il n'apparaît pas de relation entre l'incorporation du  $C_{18:1}$  dans les phospholipides et son hydrogénation.

TABLEAU 4

*Étude de l'influence de la sécrétion pancréatique exocrine et de la présence microbienne sur l'incorporation du  $C_{18:1}$  ( $1-^{14}C$ ) dans les diverses fractions lipidiques du milieu d'incubation*

Conditions d'incubation, temps : 4 h ; température :  $38^{\circ}C$  ;  
atmosphère : azote ; milieu non tamponné

	Témoins		Wirsung ligaturé				
	Contenu cæcal total	Filtrat « Acellulaire »	Contenu cæcal total	Contenu cæcal total		Filtrat « Acellulaire »	Filtrat « Acellulaire » + suc pancréatique
				+ suc pancréatique	+ $NaHCO_3$		
Acides gras libres	79,5	100	95,3	66,8	93,8	100	100
Esters méthyliques et acides gras	12,5	0	1,3	26,0	2,7	0	0
Esters de Stérols	3,5	0	2,5	6,1	2,6	0	0
Phospholipides	4,5	0	0,9	1,1	0,9	0	0

Nous avons vu auparavant (III a, b) que la formation d'esters méthyliques d'acides gras est un phénomène postérieur à l'apparition d'acide stéarique marqué.

L'incorporation de l'acide oléique dans les esters de stérols paraît plus en rapport avec son hydrogénation.

*D. — Influence de la présence de micro-organismes sur l'estérification et l'hydrogénation de l'acide oléique ( $1-^{14}C$ )*

L'absence de micro-organismes dans le milieu d'incubation supprime toute formation d'esters. L'acide oléique n'est pas transformé. L'addition de suc pancréatique au milieu d'incubation ne modifie pas ces résultats (tabl. 3 et 4).

*E. — Essai de détermination de l'origine des groupements méthyles nécessaires à la formation d'esters méthyliques d'acides gras*

Lors d'incubations effectuées en présence de Méthionine (Méthyl- $^{14}C$ ) nous n'avons jamais pu mettre en évidence la moindre incorporation de radio-activité dans les lipides du milieu d'incubation.

## IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons cherché, au moyen d'expériences faites *in vitro*, à déterminer le sort de l'acide oléique ( $1-^{14}C$ ) dans le cæcum du Lapin. Des épreuves effectuées avec le contenu cœcal de lapins privés de sécrétion pancréatique exocrine, où avec du jus cœcal débarrassé de la plupart de ses micro-organismes par filtration, nous ont permis de préciser le mode d'action respectif des enzymes pancréatiques et des micro-organismes vis-à-vis de la biotransformation intestinale de cet acide.

La biotransformation de l'acide oléique dans le cæcum du Lapin étant nulle lorsque le nombre de micro-organismes est très faible alors qu'elle n'est qu'atténuée par suppression de la sécrétion pancréatique exocrine, nous fait émettre l'hypothèse que les enzymes pancréatiques interviennent pour fournir aux micro-organismes des substrats lipidiques simples (acides gras libres, stérols) nécessaires à la synthèse de leurs propres lipides.

Nos résultats indiquent par ailleurs que l'acide oléique serait hydrogéné préférentiellement après son incorporation dans la fraction esters de stérols.

Comme ceux du rumen, les micro-organismes du cæcum ont une activité lipolytique vis-à-vis des triglycérides : GARTON *et al.* (1958), BACQUES et PERRET (1971). Nous trouvons ici qu'ils utilisent les acides gras alimentaires pour la synthèse de leurs propres lipides d'une façon semblable aux micro-organismes du rumen dont HAWKE (1971) a montré qu'ils incorporent 16 à 30 p. 100 de l'acide linoléique présent dans le milieu d'incubation en 2 h 1/2 à 4 h. Cependant, une partie de ce  $C_{18:3}$  (jusqu'à 3 p. 100) est incorporée dans leurs glycérides alors que nous n'avons pu mettre en évidence cette synthèse qui est remplacée, dans le cas des lapins par celle d'esters méthyliques d'acides gras que HAWKE n'a pas noté chez les ruminants.

Actuellement le problème est de savoir si la biotransformation des lipides est un phénomène extra ou intracellulaire. Contrairement à VIVIANI (1970), CLARKE et HAWKE (1970) ne peuvent mettre en évidence de lipases dans le jus de rumen filtré et centrifugé, et déduisent qu'elles sont intracellulaires et non libérées. L'hydrolyse serait donc intracellulaire.

Certains auteurs sont d'accord pour admettre que la biohydrogénation des acides polyinsaturés ne peut être complète que si l'on travaille sur le jus de rumen total : VIVIANI (1970), HAWKE et SILCOCK (1970), ou sur des mélanges de souches bactériennes : EYSSSEN, DE PAUW, DE SOMER (1973). Selon HARFOOT et coll. (1973), l'essentiel de cette biotransformation a lieu au contact des débris alimentaires isolés. Ils suggèrent qu'elle traduit un phénomène extracellulaire, mais on sait que la plupart des micro-organismes sont fixés sur ces débris : HUNGATE (1966) et la méthode utilisée par les auteurs pour séparer débris et micro-organismes n'est pas satisfaisante. Pour nos lapins dont le régime est riche en amidon (50 p. 100) et pauvre en cellulose brute (10 p. 100), les bactéries cœcales ne sont représentées que par des espèces non cellulolytiques qui ne sont vraisemblablement pas fixées sur les débris alimentaires : BACQUES et coll. (résultats non publiés). Le contenu cœcal filtré de ces lapins ne présente aucune activité hydrogénante vis-à-vis du  $C_{18:1}$ .

Même si le mode de filtration du contenu cœcal clarifié à travers des bougies de porosité 2,5  $\mu$  (nous n'avons pu obtenir de filtrat avec des porosités inférieures) ne

permet pas d'obtenir un liquide parfaitement exempt de micro-organismes, il apparaît clairement que ce liquide ne contient pas les enzymes permettant l'hydrogénation de l'acide oléique, qui doit donc être intracellulaire.

Par ailleurs, le parallélisme de l'incorporation du  $C_{18:1}$  dans les esters de stérols et de son hydrogénation, conduit à émettre l'hypothèse que le  $C_{18:1}$  est hydrogéné après captation sous forme libre et incorporation dans les stérides des micro-organismes. Ces micro-organismes pourraient être des protozoaires plutôt que des bactéries. Chez ces dernières, les stérols ne sont pas un élément constitutif habituel : ASSELINEAU (1962). Ils ont été mis en évidence de manière quasi constante chez les ciliés, les trichomonadines et les amébiens nus qui forment l'essentiel des protozoaires parasites ou symbiontes hébergés dans le tube digestif des vertébrés. Pour nombre d'espèces appartenant à ces trois classes, les stérols représentent même un facteur de croissance : SEAMAN (1955), VAN WAGTENDONK (1955).

Nos conditions d'incubations ne peuvent refléter absolument celles qui existent *in vivo*.

1. Elles peuvent modifier l'activité résiduelle des lipases pancréatiques. Si celles-ci paraissent capables de restaurer en partie la biohydrogénation de l'acide oléique dans le contenu cæcal, elles n'agissent que dans la mesure où le milieu d'incubation peut leur fournir des substrats. Il semble douteux que ces enzymes jouent *in vivo* un rôle important au niveau du cæcum. Le pH de ce dernier (6,25) est peu favorable à leur action excepté celle de la cholestérol estérase.

2. Elles peuvent modifier l'activité d'enzymes d'origine microbienne éventuellement présents dans le contenu cæcal. Mais il semble peu probable que ceux-ci soient totalement inactivés lors de la préparation du surnageant cæcal « acellulaire », qui respecte le pH du milieu initial. Si le potentiel d'oxydoréduction de ce milieu a pu être modifié, il faut noter cependant que jusqu'à présent son influence n'a été soulignée que pour l'hydrogénation de l'acide linoléique trans-transconjugué en acide oléique : KEPLER et TOVE (1967), EYSSSEN *et al.* (1973).

3. Elles peuvent enfin modifier la flore initiale du cæcum, qui est en majeure partie composée d'anaérobies strictes : GOUET et FONTY (1973). Si les résultats que nous obtenons ne peuvent représenter quantitativement les phénomènes ayant lieu *in vivo*, ils confirment les modifications qualitatives de l'excrétion fécale des acides gras qui ont été observées après ligature du canal de Wirsung : BACQUES et DEMIGNE (1970). Il existe donc bien chez le Lapin une flore cæcale capable de réaliser l'hydrogénation des acides gras insaturés et dont l'activité dépend fortement, entre autres, de la sécrétion pancréatique exocrine.

L'arrêt de cette sécrétion empêche l'arrivée dans l'intestin grêle de bicarbonates, mais elle ne modifie pas le pH du contenu cæcal. MARTY et RAYNAUD (1966) signalent que le pH de l'intestin grêle est proche de la neutralité (6,9 à 7,45) alors que le pH stomacal est acide (1,7 à 2,7). Or le suc pancréatique n'est déversé qu'à l'extrémité du duodénum. Il ne joue donc qu'un faible rôle dans la régulation du pH intestinal. Il convient par ailleurs de noter que la ligature du canal de Wirsung est très bien supportée par le Lapin qui ne présente aucun trouble intestinal. Cet ensemble de faits suggère que la suppression de la sécrétion pancréatique exocrine n'intervient pas tellement en modifiant la flore cæcale (ce que seuls des dénombrements et des identifications de souches pourraient prouver), mais plutôt en augmentant la quantité d'acides gras et de stérols libres arrivant au niveau du cæcum.

Le mécanisme que nous proposons n'est pas en désaccord avec celui suggéré par les auteurs ayant travaillé chez les ruminants. Nous pensons que le métabolisme lipidique des micro-organismes doit être considéré dans son ensemble et que l'incorporation des acides gras libres du milieu dans les lipides microbiens doit être lié au processus d'hydrogénation au même titre que l'hydrolyse des lipides alimentaires.

La formation d'esters méthyliques d'acides gras est difficilement explicable. Nous l'avions déjà signalée : BACQUES et PERRET (1970). De nombreux auteurs ont mis en garde contre l'éventualité d'un artéfact dû à l'extraction, à la concentration ou au stockage de lipides en milieu alcoolique. Nous n'avons pu mettre en évidence la formation d'oléate de méthyle ( $1-^{14}C$ ) au cours de l'extraction des lipides de contenu caecal marqué avec de l'acide oléique ( $1-^{14}C$ ) et non incubé.

Il semble que cette formation d'esters méthyliques ait une signification biologique puisque leur présence a été signalée dans de nombreux tissus animaux et végétaux, et chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*.

Nous avons vu que la méthionine ne fournit pas, dans nos conditions de travail, les radicaux  $CH_3$ , nécessaires à la formation d'esters méthyliques ou d'acides gras à cycle propane dont KANESHIRO et THOMAS (1969) avaient suggéré qu'ils pouvaient représenter un intermédiaire dans un processus de transméthylation-hydrogénation de l'acide oléique.

La présence de ces esters correspond peut-être à un processus de détoxification. Leur apparition est d'autant plus marquée que l'hydrogénation de l'acide oléique est importante, et elle évolue parallèlement à l'incorporation d'acides gras dans la fraction esters de stérols.

Cette formation d'esters de stérols avait déjà été soulignée : BACQUES et PERRET (1971). Elle semble davantage liée à l'activité des micro-organismes qu'à celle du suc pancréatique ou de tout autre enzyme intestinal, bien que le pH du contenu caecal (6,25) et la particularité de la sécrétion biliaire du Lapin (glycodéoxycholate dominant) soient favorables à l'activité estérifiante de la cholestérol estérase : KORZENOVSKY et coll. (1960), GREGG et POLLEY (1966), GALLO-TORRES *et al.* (1971).

*Reçu pour publication en mai 1975.*

## SUMMARY

### IN VITRO BIOTRANSFORMATION OF OLEIC ACID ( $1-^{14}C$ ) IN RABBIT CAECAL CONTENTS. ROLES OF MICROFLORA AND EXOCRINE PANCREATIC SECRETION

The biotransformation of oleic acid ( $1-^{14}C$ ) *in vitro* in rabbit caecal contents is studied on :

- rabbits (3) deprived of exocrine pancreatic secretion,
- control rabbits (3).

Caecal contents are cleared or not of microorganisms by filtration before incubation.

The results obtained constitute an approach to the mechanisms of oleic acid biotransformation during incubations having an optimum pH ranging from 6.2 to 7.

The experiment shows that 22.7 to 30.6 p. 100 of the oleic acid is esterified in the form of phospholipids, sterol esters and methyl ester in 4 to 8 hours in control rabbits. Its hydrogenation is 60 p. 100 in 8 hours.

The exclusion of exocrine pancreatic secretion slows down these two phenomena considerably. Not more than 5 p. 100 of the oleic acid is esterified ; only 7 p. 100 of that is hydrogenated into stearic acid. The absence of microorganisms totally abolishes oleic acid biotransformation.

The addition of pancreatic juice into the caecal contents of rabbits deprived of exocrine pancreatic secretion re-establishes esterification (33 p. 100) of oleic acid. However, its hydrogenation remains lower than in the controls (17.8 vs 39.1 p. 100 after 4 hours of incubation).

Moreover, the parallel evolution of biohydrogenation phenomena and of sterol ester formation suggests that microorganisms use free fatty acids from pancreatic juice activity to form sterides which serve as a substrate for microbial hydrogenases.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASSELINEAU J., 1962. *Les lipides bactériens*. Hermann éd., Paris.
- BACQUES Cl., DEMIGNE C., 1970. Influence de la ligature du canal pancréatique et de la cœcectomie sur l'excrétion fécale des lipides chez le Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **164**, 1500-1504.
- BACQUES Cl., PERRET J. P., 1970. Mise en évidence de la présence d'esters méthyliques d'acides gras dans le tractus digestif du Lapin en alimentation contrôlée. *C. R. Acad. Sci.*, D, **270**, 1807-1810.
- BACQUES Cl., PERRET J. P., 1971. Modifications apportées par la cœcectomie à la répartition et à la nature des constituants lipidiques du contenu digestif du Lapin. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **11**, 113-127.
- CLARKE D. G., HAWKE J. C., 1970. Studies on rumen metabolism. VI. *In vitro* hydrolysis of triglyceride and isolation of a lipolytic fraction. *J. Sci. Fd. Agric.*, **21**, 446-452.
- DEMARNE Y., SACQUET E., FLANZY J., GARNIER H., 1972. Influences cumulées de la cœcectomie et de l'état axénique sur l'utilisation digestive apparente de la ration et des acides gras chez le Rat. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 139-148.
- EYSSSEN H., DE PAUW G., DE SOMER P., 1973. Dans : *Germ-free research : Biological effect of gnotobiotic environments*. J. B. HENEGHAN ed. N. Y. Acad. Press, 277-283.
- GALLO-TORRES H. G., MILLER O. N., HAMILTON S. G., 1971. Further studies on the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut. *Arch. Biochim. Biophys.*, **14**, 22.
- GARTON G. A., HOBSON P. N., LOUGH A. K., 1958. Lipolysis in the rumen. *Nature, London*, **182**, 1511-1512.
- GOUET Ph., FONTY G., 1973. Évolution qualitative et quantitative de la microflore digestive du Lapin holoxénique selon l'âge et le niveau du tractus digestif. *Journées de recherches avicoles et cunicoles*, 7-13.
- GREGG J. A., POLLEY J. R., 1966. Excretion of bile acids in normal rabbits. *Amer. J. Physiol.*, **211**, 1147.
- GUNSTONE F. D., PERERA B. J., 1973. Fatty acids. Part 40. The synthesis and chromatographic and spectroscopic properties of the disubstituted cyclopropanes derived from all the methyl trans-octadecenoates. *Chem. Phys. Lipids.*, **10**, 303-308.
- HARFOOT C. G., NOBLE R. C., MOORE J. H., 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms *in vitro*. *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 961-970.
- HARFOOT C. G., NOBLE R. C., MOORE J. H., 1973. Food particles as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem. J.*, **132**, 829-832.
- HAWKE J. C., SILCOCK W. R., 1970. The *in vitro* rates of lipolysis and biohydrogenation in the rumen contents. *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 201-212.
- HAWKE J. C., 1971. The incorporation of long chain fatty acids into lipids by rumen bacteria and the effect on biohydrogenation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **248**, 167-170.
- HOET P. P., EYSSSEN H., 1964. Steatorrhea in rats with an intestinal cul de sac. *Gut*, **5**, 309-314.
- HOBSON P. N., MANN S. O., 1961. The isolation and culture of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.*, **25**, 227-232.
- HUNGATE R. E., 1966. *The rumen and its microbes*. N. Y. Academic. Press.
- KANESHIRO T., THOMAS P. J., 1969. Methylation of fatty acids in a methionine dependant Agrobacterium tumefaciens controlled with exogenous methionine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **178**, 26-35.
- KEPLER C. R., TOVE S. B., 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^{19}$  cis,  $\Delta^{11}$  trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5686-5692.
- KOLB B., WIEDEKING E., 1968. Radio gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters and steroids. *Zeitschr. f. Anal. Chem.*, **243**, 129-142.
- KORZENOVSKY M., WALTERS C., HARVEY O., DILLER E., 1960. Some factors which influence catalytic influence of pancreatic cholesterol-esterase. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **105**, 303.

- MARTY J., RAYNAUD P., 1966. Étude de l'acidité organique au niveau du tube digestif chez le Lapin. *Arch. Sci. Physiol.*, **20**, 515-524.
- PICKARD D. W., STEVENS C. E., 1972. Digesta flow through the rabbit large intestine. *Am. J. Physiol.*, **222**, 1161-1166.
- REINA-GUERRA M., TENNANT B., HAROLD D., GOLDMAN M., 1969. The absorption of fat by germfree and conventionalized rats. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **3**, 297-300.
- REISER R., 1951. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by the ruminant. *Fdn. Proc. Fdn. Am. Soc. Exp. Biol.*, **10**, 236.
- SEAMAN G. R., 1955. Metabolism of free living ciliates. In *Protozoa*, vol. II. HUTNER et LWOFF ed, N. Y. Acad. Press, 96.
- VAN WAGTENDONK W. J., 1955. The nutrition of ciliates. In *Protozoa*, vol. II. HUTNER et LWOFF ed, N. Y. Acad. Press, 76-77.
- VIVIANI R., 1970. Metabolism of long chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid. Res.*, **8**, 305.
- VOGEL A. I., 1967. *Practical organic chemistry*. LONGMANS, GREEN et coll. ed., London, 470-474.
- WOLFF J. P., 1968. *Manuel d'analyse des corps gras*. Azoulay, Paris.
- WRIGHT D. E., 1959. Hydrogénation of lipids by rumen protozoa. *Nature, London*, **184**, 1875.
- YANO I., NICHOLS B. W., MORRIS L. J., JAMES A. T., 1971. The distribution of cyclopropane and cyclopropene fatty acids in higher plants (Malvaceae). *Lipids*, **7**, 30-34.
-