

## Etude comparée de l'effet de la colipase pancréatique sur l'activité des lipases de mammifères et de champignons

par R. JULIEN, Joelle RATHELOT, P. CANIONI, L. SARDA

Institut de Chimie Biologique, Université d'Aix-Marseille I  
Centre St-Charles, place V.-Hugo, 13331 Marseille Cedex 3.

---

**Summary.** *Effect of pancreatic colipase on the lipase activity of mammals and molds : A comparative study.*

In order to better characterize the specificity of pancreatic colipase interaction with lipase, we studied the effect of the coprotein on the lipase activity of mammals and of the molds *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum*. Bile salts activity dependence curves against emulsified triolein showed that lipases from microorganisms were inhibited by bile salts in the same concentration range as pancreatic lipases. However, colipase did not restore enzymatic activity. Experiments carried out with *Rhizopus* lipase, acting on emulsified tributyrin in the presence of bile salts or non-ionic detergents, also demonstrated that pancreatic colipase failed to reactivate the enzyme. Kinetic studies of the hydrolysis of emulsified tributyrin, performed in the absence of detergent, showed that pancreatic and mold enzymes both inactivate upon denaturation at the tributyrin/water interface. When colipase was added to the system, pancreatic lipase was fully protected against surface denaturation. In contrast, colipase had no effect on the activity of mold lipases. From the results, it can be concluded that colipase specifically interacts with lipase synthesized by the same organ.

---

### Introduction.

La colipase est une protéine de la sécrétion pancréatique des mammifères. Sa fonction est de permettre à la lipase d'être pleinement active en présence de concentrations physiologiques en acides biliaires. En l'absence de colipase les acides biliaires sont des inhibiteurs puissants de la réaction de lipolyse. Chez les animaux supérieurs la colipase est un cofacteur protéique essentiel intervenant directement dans le processus de gestion des triglycérides.

Dans le cadre d'une étude générale de l'interaction des colipases pancréatiques avec les lipases d'autres espèces, animales ou végétales, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet respectif des acides biliaires et de la colipase pancréatique sur l'activité de lipases agissant normalement dans des milieux dépourvus en acides biliaires comme les lipases exocellulaires des champignons *Rhizopus arrhizus* et *Geotrichum candidum*.

## Matériel et méthodes.

La lipase pancréatique de mouton (poids moléculaire 49 000) et la colipase A de bœuf ont été purifiées dans notre laboratoire (Canoni *et al.*, 1975 ; Rathelot *et al.*, 1975a, b). La lipase de *Rhizopus arrhizus* (poids moléculaire 40 000) a été fournie par Precibio, France et celle de *Geotrichum candidum* par le Dr Iwai, Osaka, Japon. Les sels biliaires totaux (concentration micellaire critique 2 mM) ont été préparés à partir de la bile de bœuf (Montet et Dervichian, 1971). L'activité lipase en présence de tributyrine et de trioléine est déterminée potentiométriquement respectivement à pH 8 et à pH 9 (Canoni *et al.*, 1975, Rathelot *et al.*, 1975a, b). Les détergents non ioniques Brij 35 et Triton X 100 ont été fournis par BDH.

## Résultats et discussion.

La teneur en lipase et en colipase des pancréas de mammifères varie de façon importante suivant les espèces (tabl. 1). A partir des mesures d'activité directe, c'est-à-dire réalisées sans addition de colipase, et des mesures d'activité totale faites en présence d'un excès de colipase, on peut estimer la quantité de cofacteur présent dans chaque homogénat, sachant que dans les conditions de mesure utilisées, les lipases pures ont une activité directe inférieure à 1 p. 100 de leur activité totale. L'activité lipase directe des pancréas de cheval, bœuf et mouton ne représente qu'une fraction de l'activité totale mesurée en présence d'un excès de colipase alors que chez le porc la quantité de colipase présente dans la glande est toujours suffisante pour donner à l'enzyme au moins 90 p. 100 de son activité totale. Les pancréas des deux ruminants se caractérisent par leur faible teneur en lipase. Les lipases de chacun de ces mammifères sont réactivées par les colipases de n'importe laquelle des autres espèces.

TABLEAU 1

Valeur moyenne de l'activité lipase du pancréas de quelques Mammifères  
Homogénat 25 p. 100 dans l'eau + benzamidine 1 mM + DFP 1 mM à 4 °C)

	Activité lipase totale (excès de colipase)	Activité lipase directe (sans addition de colipase)	
	Unités * par gramme de tissu		p. 100 de l'activité totale
Porc .....	13 000	11 500	90
Cheval .....	6 000	1 200	20
Bœuf .....	2 800	2 000	70
Mouton .....	1 700	1 000	57

\* 1 unité = 1  $\mu$ M d'acide gras libéré par min.

Activité sur trioléine - gomme arabique en présence de sels biliaires de bœuf 6 mM à pH 9,0 et 25 °C.

Les courbes de dépendance en acides biliaires des lipases de mammifères agissant sur la trioléine émulsifiée (Julien *et al.*, 1972 ; Rathelot *et al.*, 1975 *a, b*, Canioni *et al.*, 1975) diffèrent sensiblement de celles obtenues avec les lipases de champignons (fig. 1) mais, par contre, quelle que soit l'enzyme, on observe une inhibition presque totale de l'activité aux concentrations en acides biliaires que l'on trouve dans la lumière intestinale. L'addition de colipase n'a aucun effet sur l'activité des lipases de champignons alors qu'elle restaure entièrement l'activité de la lipase pancréatique dans un domaine relativement large de concentration en détergent.

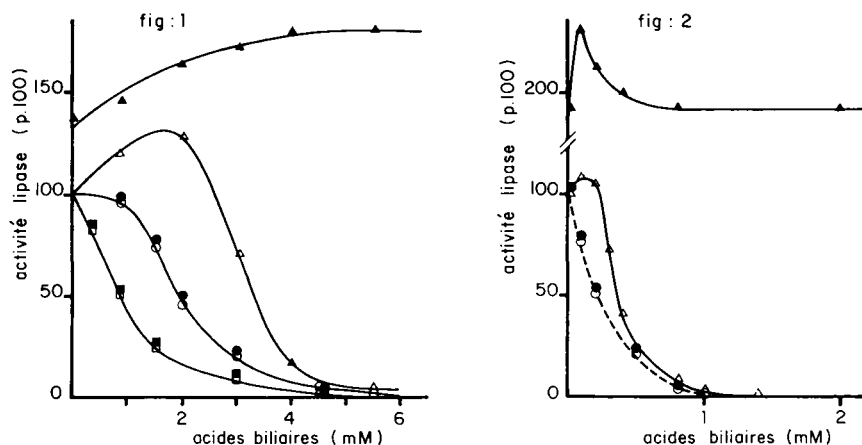


FIG. 1. — Influence de la concentration en acides biliaires sur la vitesse initiale d'hydrolyse de la trioléine par des lipases de différentes origines. Les mesures sont effectuées à pH 9 et à 20 °C en absence de colipase et en présence d'un excès de coprotéine. Les acides biliaires utilisés sont les acides biliaires totaux de bœuf. Les activités enzymatiques sont exprimées par rapport à l'activité mesurée en absence d'acides biliaires et de colipase (100 p. 100).

□, ■ : lipase de *Geotrichum candidum* ; ○, ● : lipase de *Rhizopus arrhizus* ; △, ▲ : lipase pancréatique de mouton.

(Les symboles pleins représentent les essais effectués en présence de colipase).

FIG. 2. — Influence de la concentration en acides biliaires sur la vitesse initiale d'hydrolyse de la tributyrine en émulsion par des lipases de différentes origines. Les mesures sont effectuées à pH 8 et à 20 °C en absence de colipase et en présence d'un excès de coprotéine. Les acides biliaires utilisés sont les acides biliaires totaux de bœuf. Les activités enzymatiques sont exprimées par rapport à l'activité mesurée en absence d'acides biliaires et de colipase (100 p. 100).

○, ● : lipase de *Rhizopus arrhizus* ; △, ▲ : lipase pancréatique de mouton.

(Les symboles pleins représentent les essais effectués en présence d'un excès de colipase).

Les acides biliaires inhibent l'hydrolyse de la tributyrine par la lipase pancréatique et la lipase de *Rhizopus arrhizus*. La colipase ne réactive que la lipase pancréatique. En présence de détergents non ioniques (Triton X 100 ou Brij 35), on observe une forte inhibition de la lipase pancréatique qui est supprimée par la colipase dans un domaine étroit de concentration en détergent (fig. 3). L'inhibition de la lipase de *Rhizopus arrhizus* est plus faible mais la colipase n'a, par contre, aucun effet réactivateur (Canioni *et al.*, 1976).

Ces résultats qui indiquent l'absence d'interaction entre la colipase et les lipases fongiques ont été confirmés par des études cinétiques de l'hydrolyse de la tributyrine en l'absence de détergent. La vitesse de la réaction catalysée par la lipase pancréatique diminue exponentiellement en fonction du temps lorsque la température est supérieure à 20 °C (fig. 4). Cette perte d'activité est d'autant plus rapide que la température est élevée. Les résultats sont identiques dans le cas de la lipase de *Rhizopus arrhizus*. La perte d'activité est attribuée à la dénaturation de l'enzyme à l'interface triglycéride-eau. En présence de colipase les cinétiques d'hydrolyse par la lipase de *Rhizopus arrhizus* ne sont pas modifiées alors que dans le cas de la lipase pancréatique la réaction devient d'ordre zéro et la vitesse initiale est doublée. La colipase est donc sans effet sur la dénaturation de la lipase de champignons.

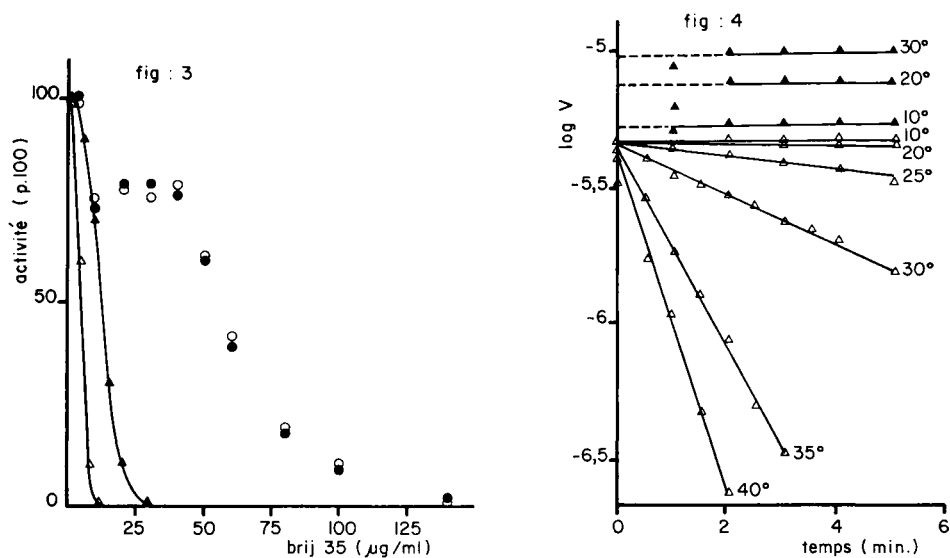


FIG. 3. — Influence des détergents non ioniques sur l'activité des lipases de différentes origines. Effet du BRIJ 35 sur la lipase pancréatique de mouton et la lipase de *Rhizopus arrhizus*.

Δ, ▲ : lipase de mouton ; ○, ● : lipase de *Rhizopus arrhizus*.

(Les symboles pleins représentent les activités en présence d'un excès de colipase). Les résultats sont exprimés, dans chaque cas, par rapport à l'activité mesurée en absence de détergent.

FIG. 4. — Représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la variation de l'activité de la lipase pancréatique de mouton vis-à-vis de la tributyrine en fonction du temps à différentes températures. La concentration en lipase est de  $9,5 \cdot 10^{-10}$  M. Les mesures sont effectuées à pH 8 en absence de colipase (Δ) et en présence d'un excès de cofacteur (▲). (v est exprimé en mole d'acide gras libéré par min).

Dans toutes les conditions expérimentales utilisées, la lipolyse par les lipases de champignons n'est pas modifiée par la présence de colipase pancréatique. L'interaction à l'interface entre l'enzyme du pancréas et son cofacteur apparaît spécifique. L'extension de cette étude aux systèmes lipase-colipase d'autres espèces animales ou

végétales devrait contribuer à définir les limites de la spécificité de cette interaction et à localiser au niveau moléculaire les sites de reconnaissance de l'enzyme et de son cofacteur protéique.

Commission CNERNA Digestion-Absorption/Association  
des Physiologistes, Paris 5-6 octobre 1978.

### Références

- CANIONI P., BENAÏBA A., JULIEN R., RATHELOT J., BENABDELJIL A., SARDA L., 1975. Ovine pancreatic lipase : Purification and some properties. *Biochimie*, **57**, 35-41.
- CANIONI P., JULIEN R., RATHELOT J., SARDA L., 1976. Inhibition of sheep pancreatic lipase activity against emulsified tributyrin by non ionic detergents. *Biochimie*, **58**, 751-753.
- JULIEN R., CANIONI P., RATHELOT J., SARDA L., PLUMMER J. H., 1972. Studies on bovine pancreatic lipase and colipase. *Biochim. biophys. Acta*, **280**, 215-224.
- MONTET J. C., DERVICHIAN D. G., 1971. Solubilisation micellaire du cholestérol par les sels biliaires et les lécithines extraits de la bile humaine. *Biochimie*, **53**, 751-754.
- RATHELOT J., JULIEN R., CANIONI P., SARDA L., 1975a. Isolation and partial characterization of bovine pancreatic colipase. *Biochimie*, **57**, 1123-1130.
- RATHELOT J., JULIEN R., CANIONI P., COEROLI C., SARDA L., 1975b. Studies on the effect of bile salt and colipase on enzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*, **57**, 1117-1122.
-