

REFERENCES

- 1 W. J. SCHMIDT, *Sitzber. naturw. Abt. Niederrh. Ges. Natur- u. Heilk.*, (1923) 1.
- 2 R. STÜHLER, *Fortschr. Gebiete Röntgenstrahlen*, 57 (1938) 231.
- 3 D. CARLSTRÖM, *Acta Radiol. Suppl.*, 121 (1955).
- 4 J. B. FINEAN AND A. ENGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 178.
- 5 D. CARLSTRÖM AND J. B. FINEAN, *ibid.*, 13 (1954) 183.
- 6 R. A. ROBINSON AND M. L. WATSON, *Anat. Record*, 114 (1953) 383; *Conf. on Metabolic Interrelations, Trans. 5th Conf.*, (1953) 72.
- 7 W. SCHWARTZ AND G. PAHLKE, *Z. Zellforsch. u. mikroskop. Anat.*, 38 (1953) 475.
- 8 H. FERNÁNDEZ-MORÁN, *Exptl. Cell Research*, 5 (1953) 255.; *Congr. latino-amer. neurochir. Montevideo*, 6 (1955) 599.
- 9 H. FERNÁNDEZ-MORÁN, *J. Biophys. & Biochem. Cytol.*, (1956) in press.

Received July 16th, 1956

SUR QUELQUES ESSAIS DE PURIFICATION DE LA LIPASE PANCRÉATIQUE

L. SARDÀ, G. MARCHIS-MOUREN, M. J. CONSTANTIN ET P. DESNUELLE
Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

La purification de la lipase pancréatique mérite d'être entreprise car: (a) cet enzyme joue un rôle important pendant la digestion intestinale des graisses; (b) doué apparemment d'une certaine solubilité dans l'eau mais capable d'hydrolyser des substrats insolubles à une vitesse considérable, il doit posséder des propriétés et une structure bien particulières; (c) les travaux récemment consacrés à l'étude du mode d'action de la lipase sur les triglycérides *in vitro*¹⁻³ auraient intérêt à être répétés avec des préparations enzymatiques pures.

Plusieurs tentatives sérieuses⁴⁻⁶ ont d'ailleurs été faites en vue de cette purification. Mais les résultats obtenus jusqu'ici se prêtent mal à une discussion objective car deux erreurs fondamentales ont été commises. La première est d'avoir considéré *a priori* la lipase comme un enzyme instable et d'avoir voulu la stabiliser par diverses substances qui gênent ultérieurement la purification⁴. En fait, la lipase jouit d'une stabilité satisfaisante dès que les enzymes protéolytiques qui l'accompagnent dans les extraits pancréatiques sont inhibés ou éliminés⁷. La deuxième erreur est d'avoir utilisé des techniques incorrectes pour la mesure de l'activité lipasique. Les critiques formulées au sujet de ces techniques sont déjà connues⁷⁻⁹. Tantôt, le substrat est choisi de façon si malheureuse⁵ que la nature même de l'enzyme en cours de purification paraît incertaine. Tantôt, les conditions dans lesquelles s'effectuent les mesures sont si peu conformes aux règles élémentaires de l'enzymologie⁴ qu'il est difficile d'attribuer aux résultats une signification précise. Le rendement des opérations et le degré de purification réellement obtenu restent donc douteux. Toutefois, malgré tant de défauts qui en limitent singulièrement la portée, les travaux antérieurs sur la lipase suggèrent que cet enzyme passe aisément en solution quand on traite de la pancréatine bien dégraissée par de l'eau ou divers liquides aqueux et qu'il précipite comme une protéine ordinaire par addition de sels neutres, d'acétone ou d'alcool.

Bibliographie p. 274.

L'objet du présent travail est de décrire quelques nouveaux essais de purification basés principalement sur des précipitations sélectives et sur des électrophorèses préparatives de zone. Ces essais ont été effectués sous le contrôle constant d'un test récemment mis au point dans ce Laboratoire⁸ et capable de donner en quelques minutes une expression valable de la teneur en lipase d'une solution quelconque. Ils ont permis d'éliminer complètement les acides nucléiques présents dans les extraits initiaux de pancréatine ainsi que la majeure partie des protéines étrangères. L'activité spécifique de ces extraits a été augmentée 63 fois au maximum.

TECHNIQUES UTILISÉES

1. Mesure potentiométrique de l'activité lipasique⁸

On fait agir la lipase à 37° sur une émulsion de triglycérides stabilisée par la gomme arabique et contenant du taurocholate de Na et CaCl₂. On mesure en fonction du temps la quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH du mélange à 8.0. La réaction est d'ordre 0 pendant toute la durée de l'expérience. L'unité lipase est la quantité d'enzyme capable de libérer 10 μ -équivalents acides en 1 minute.

2. Evaluation de la teneur en protéines totales

On utilise généralement la technique colorimétrique de LOWRY¹⁰. Une courbe de référence tracée avec de la sérumalbumine cristallisée de cheval permet par convention d'exprimer les résultats en mg d'azote protéique. Ces résultats ont été comparés aussi souvent que possible avec ceux fournis par la spectrophotométrie à 280 μ m, en utilisant le cas échéant la formule empirique établie par KALCKAR¹¹ pour les mélanges de protéines et d'acides nucléiques. La concordance n'est jamais absolue car chaque technique comporte sa part d'arbitraire. Mais elle est assez bonne pour justifier pleinement dans le cas présent l'emploi généralisé de la technique de LOWRY. L'activité spécifique des solutions est le nombre d'unités lipase pour 0.5 mg d'azote protéique*.

3. Electrophorèse de zone

Les essais d'orientation concernant le comportement électrophorétique de la lipase ont été réalisés avec du papier Whatman No. 1 en présence de tampon acétate, tris** et véronal à différents pH et différentes forces ioniques. La bande de papier (25 \times 5 cm) était suspendue verticalement dans un bain de toluène à 4°, ses deux extrémités plongeant dans du tampon placé lui-même sous toluène. Ce dispositif, imaginé par MICHL¹² pour l'électrophorèse des aminoacides et des peptides dans un gradient de potentiel élevé, donne avec certaines protéines des résultats très satisfaisants. Il évite l'évaporation superficielle et il permet d'évacuer de façon très efficace les calories dues à l'effet Joule. La condition essentielle du succès de l'opération est évidemment que les protéines ou les enzymes étudiés ne soient ni dénaturés ni inactivés à l'interface eau-toluène. Cette condition est pleinement satisfaite dans le cas de la lipase. Une solution de lipase imprégnant une bande de papier conserve toute son activité après un séjour de 12 h dans le toluène à + 4°.

La solution étudiée est appliquée sur la bande de papier à l'aide d'une seringue micrométrique Agla ou à l'aide d'un tube de verre finement étiré que l'on pèse avant et après l'opération. L'électrophorèse une fois faite, on retire la bande du bain de toluène, on la secoue afin de faire tomber les gouttes de solvant adhérant au papier et on la découpe transversalement en languettes de 0.5 cm de largeur. On élue chaque languette en l'imprégnant 3 fois d'eau ou de tampon et en chassant le liquide par centrifugation. On dose les protéines et la lipase dans chaque éluat. Pour déterminer le flot électroosmotique, on dépose une goutte de glucose à 1% sur une bande identique à la première, on place les deux bandes côté à côté dans l'appareil et on révèle la position finale de la tache de glucose par un simple chauffage *** de 15 min à 110°.

L'électrophorèse de zone dans une colonne d'amidon a été réalisée selon les prescriptions générales de FLODIN ET PORATH¹³. Les deux branches de l'appareil, c'est à dire la colonne d'amidon proprement dite (42 \times 3 cm) et la branche remplie de tampon, étaient munies d'une double enveloppe dans laquelle une pompe faisait circuler de l'eau glacée. Ce dispositif simple a permis de

* Afin d'éviter des valeurs trop élevées, nous avons légèrement modifié la définition initiale⁸ de l'activité spécifique de la lipase et nous avons pris comme base 0.5 mg d'azote protéique au lieu de 1 mg.

** Le tampon tris est le tris(hydroxyméthyl)amino-méthane.

*** Quand l'électrophorèse a été faite en milieu acide, il est bon de plonger la bande dans un tampon légèrement alcalin avant de la chauffer.

maintenir une température de $+1^{\circ}$ à l'intérieur de l'appareil pendant toutes les opérations. D'autre part, les bacs à électrodes (contenance totale: 500 ml) possédaient deux compartiments communiquant à travers la paroi de séparation par un petit tube (diamètre: 0.6 cm; longueur: 2 cm) rempli de laine de verre. Le premier compartiment était relié à l'appareil et l'autre contenait l'électrode (charbon). On a ainsi évité toute variation intempestive de pH dans la colonne pendant les électrophorèses de longue durée, même quand le pouvoir tampon de l'électrolyte était faible.

Le volume mort de notre colonne était de 40-46 ml, soit environ le tiers du volume total. Le flot électroosmotique, déterminé à l'aide du glucose*, était de 1.2 cm/heure avec le tampon tris $M/40$ pH = 8.0. La tension aux bornes était de 700 volts, déterminant dans la colonne un gradient de potentiel de 5.9 volts cm^{-1} environ.

Dans les conditions expérimentales adoptées, le flot électroosmotique était dirigé vers le haut. Il était donc nécessaire de faire pénétrer les substances étudiées d'environ 25 cm dans la colonne afin qu'elles ne soient pas chassées hors de l'amidon pendant l'électrophorèse. Cette pénétration, ainsi d'ailleurs que l'élation postérieure à l'électrophorèse, étaient effectuées sous une légère pression assurant à la colonne un débit de 10 ml/heure. Un débit plus rapide aurait provoqué un élargissement notable des bandes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Extraction à partir de pancréatine (stade 1)

Plusieurs études systématiques ont déjà été effectuées en vue de déterminer les meilleures conditions pour l'extraction de la lipase à partir de la pancréatine de porc**, 4-6,14. Mais leurs résultats sont si contradictoires qu'il nous a paru nécessaire de soumettre ce problème simple à un nouvel examen. Nous avons fait varier les facteurs suivants: la température, la durée de l'extraction, les proportions respectives de la pancréatine et du liquide d'extraction, le pH et la teneur en électrolyte de ce liquide. La lipase doit être extraite à 0° et non à 37° comme le conseillent KING ET GLICK¹⁴. De plus, la présence d'un électrolyte dans le liquide d'extraction n'est nullement nécessaire. NaCl à 10%¹⁴ provoque une inactivation rapide de l'enzyme. MgSO_4 0.1 N⁵ n'améliore pas le rendement pourvu que la pancréatine soit bien dégraissée. Enfin, contrairement aux indications de HERR ET SUMNER⁶, une extraction alcaline ne présente aucun intérêt car elle n'augmente pas la quantité de lipase extraite et elle favorise la solubilisation des protéines étrangères et des acides nucléiques. La technique suivante semble donc la meilleure:

La pancréatine (10 g) est agitée à 0° avec 60 ml d'eau pendant 20 min. La suspension est centrifugée*** pendant 10 min et le culot est lavé deux fois par 20 ml d'eau. Les extraits réunis (E_1) sont limpides et légèrement jaunâtres. Les substances dissoutes représentent à peu près 60% du poids initial de la pancréatine. On y trouve 40,000 unités lipase, c'est à dire la majeure partie de l'activité mesurable de la pancréatine. L'activité spécifique est 50. Ces extraits, très instables, doivent être immédiatement purifiés.

2. Précipitation par le sulfate d'ammonium (stade 2)

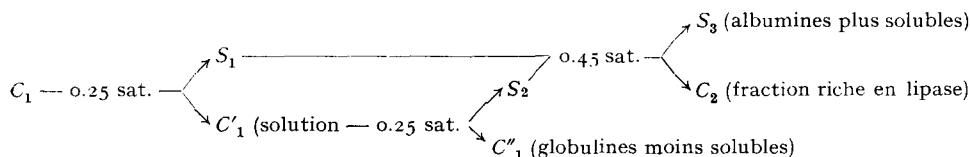
Se comportant comme une globuline⁵, la lipase est insoluble dans Am_2SO_4 à demi-saturation. Le liquide E_1 à 0° est donc additionné de son volume d'une solution saturée

* On ne semble pas avoir signalé jusqu'ici que les molécules de glucose ne circulent pas librement dans la colonne d'amidon. Elles subissent un certain retard ($R = 0.67$ environ) pendant le déplacement de leurs solutions. Il faut évidemment tenir compte de ce retard dans le calcul du flot.

** Cette pancréatine, préparée selon la technique de WILLSTÄTTER ET WALDSCHMIDT-LEITZ⁴, a été débarrassée de ses fibres (environ 1/3 du poids total) en la tamisant dans un tamis étanche No. 90 monté sur une machine à agiter horizontale. Le tamis contenait quelques débris de verre qui raclaient les fibres etaidaient la poudre à passer à travers le tamis.

*** Toutes les centrifugations sont faites dans un champ centrifuge d'environ 15,000 g, à 0° (liquides aqueux) ou à -12° (mélanges eau-acétone).

de Am_2SO_4 . Après 15 min, le mélange est centrifugé pendant 5 min et le culot est lavé par Am_2SO_4 0.5 sat. à 0°. Ce culot (C_1) est ensuite dissout dans un volume d'eau glacée égal au volume initial et la solution limpide est additionnée à nouveau de Am_2SO_4 saturé. L'addition se fait goutte à goutte sous une bonne agitation mécanique. La courbe de la Fig. 1 permet d'étudier avec précision les diverses étapes de la précipitation. On voit que la lipase se trouve parmi les globulines les plus solubles. Plus la concentration en Am_2SO_4 approche de la demi-saturation, plus les fractions sont pures*. La meilleure purification est obtenue entre 0.25 et 0.45 sat. Mais, afin d'éviter une perte considérable de lipase (environ 30%), le culot obtenu à 0.25 sat. (C'_1) est dissout et la solution est à nouveau précipitée à 0.25 sat. Les deux liquides surnageants (S_1 et S_2) sont alors réunis et précipités à 0.45 sat. Le culot finalement obtenu (C_2) contient environ 90% de l'activité lipasique de l'extrait E_1 . Son activité spécifique est 100-110, soit à peu près le double de celle de l'extrait initial.



L'augmentation de l'activité spécifique traduit d'ailleurs assez imparfaitement l'efficacité réelle du traitement au sulfate d'ammonium. Celui-ci élimine non seulement la moitié des protéines étrangères, mais aussi les acides nucléiques présents dans l'extrait E_1^{**} . La Fig. 2 permet de comparer les spectres de E_1 et de la solution du culot C₂.

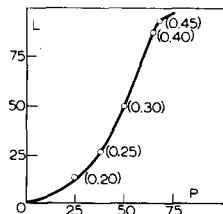


Fig. 1. Précipitation au sulfate d'ammonium. P et L sont respectivement les pourcentages de protéines totales (déterminées par la technique colorimétrique de LOWRY) et les pourcentages de lipase (déterminée par le test d'activité) précipités pour chaque concentration en sulfate d'ammonium. Les chiffres entre parenthèses expriment cette concentration de la façon conventionnelle, c'est à dire en fraction de saturation.

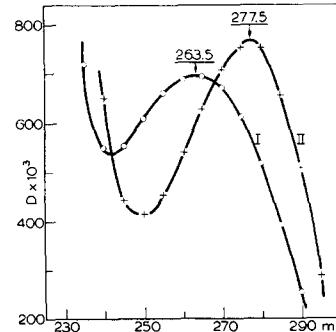


Fig. 2. Spectres de l'extrait E_1 et de la solution du culot C_2 . Courbe I: extrait E_1 à 1% (dilution $1/20^\circ$). Courbe II: solution du culot C_2 dans un volume égal au volume initial de E_1 (dilution $1/5^\circ$).

On voit que la précipitation déplace l'absorption maximum de 2635 à 2775 Å. Le culot C_2 ne contient donc plus que des protéines. La précipitation au sulfate d'ammonium stabilise également la lipase en éliminant la majeure partie des enzymes protéolytiques qui l'accompagnent. Les culots C_2 peuvent être conservés à 0° pendant plus d'une semaine sans que leur activité baisse sensiblement.

* Dans le mode de représentation adopté, plus les fractions sont pures, plus la pente de la tangente à la courbe est grande dans la région considérée.

Il y a à peu près 43 % de substances non-protéiques dans l'extrait E_1 .

Par contre, la solution des culots C_2 s'inactive rapidement quant on la dialyse contre de l'eau. Cette inactivation, signalée d'ailleurs à plusieurs reprises dans des travaux antérieurs^{4,5}, est intéressante car elle peut éventuellement trahir un caractère particulier de la structure de la lipase. En fait, elle n'est due ni à la perte d'un coenzyme ou d'un activateur, ni à l'abaissement de la force ionique au-dessous d'une certaine limite. Une étude systématique effectuée avec du diisopropylfluorophosphate nous a montré que sa cause réelle est la présence dans les culots C_2 de précurseurs d'enzymes protéolytiques*. Ces précurseurs paraissent plus difficiles à éliminer que les enzymes eux-mêmes. Ils deviennent actifs pour une raison indéterminée pendant la dialyse et ils provoquent alors la destruction de la lipase. Cette destruction ne se produit d'ailleurs plus en milieu acide. Il est important de savoir qu'une solution de culot C_2 ou toute autre solution de lipase purifiée de façon analogue peut être dialysée pendant 48 h à +4° sans perte notable contre un tampon à pH = 5.0.

3. *Précipitation par l'acétone (stade 3)*

On dissout le culot C_2 dans 100 ml d'eau à 0° (concentration en protéines de la solution: 1% environ). On ajoute du sulfate d'ammonium saturé pour éléver la force ionique à 0.6, on plonge la solution dans un bain à -12° et on ajoute immédiatement de l'acétone à -12° goutte à goutte** sous forte agitation. Quand la concentration en acétone atteint la valeur désirée, on laisse 30 min à -12° sans interrompre l'agitation et on centrifuge 5 min. La courbe de la Fig. 3 montre que la lipase est accompagnée pendant tout le début de sa précipitation d'une quantité à peu près constante de protéines étrangères. On obtient entre le point 0 et le point A (0-45.5% d'acétone) des fractions dont l'activité spécifique est uniformément de 270-280. A partir du point A, les protéines étrangères commencent à précipiter en masse et l'activité spécifique de la fraction AB n'est plus que de 60. Nous sommes donc contraints de nous arrêter à 46% d'acétone et d'abandonner par conséquent environ 25% de la lipase dans le surnageant. Le fractionnement 0-46 nous donne un culot (C_3) où la lipase est purifiée 2.7 fois par rapport au culot C_2 . Le rendement est de 77%.

4. *Précipitation acétonique en présence de calcium (stade 4)*

Le culot C_3 est difficilement soluble en milieu neutre ou légèrement acide. On le met en suspension dans 30 ml d'eau à 0° et on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque N/10 pour aider la dissolution. Quand le pH de cette solution est abaissé à 6.3 par addition de CH₃COOH N/10, il se forme un précipité abondant et relativement peu actif dont la séparation peut être envisagée. Mais nous préférons à l'heure actuelle nous arrêter à pH = 7.6, réduire la solubilité de la lipase par addition de certains cations minéraux et procéder à une nouvelle précipitation acétonique. Les résultats obtenus en présence d'acétate de calcium M/20 sont donnés dans la Fig. 4. En prenant la fraction AB (C_4) entre 10 et 37.5% d'acétone, on purifie la lipase environ 2 fois (activité spécifique: 480-550) avec un rendement de 76%.

Le fait que l'acétate de calcium diminue beaucoup la solubilité de la lipase à

* Il s'agit là, non d'enzymes protéolytiques immédiatement actifs comme dans le cas des extraits bruts E_1 ⁷, mais bien de précurseurs car une seule addition de diisopropylfluorophosphate protège la lipase de façon très imparfaite. Plusieurs additions échelonnées dans le temps sont nécessaires. Elles doivent être suivies chaque fois d'une courte incubation en milieu alcalin.

** L'addition d'acétone est réglée de façon que la concentration de ce solvant atteigne 45% en 1/4 d'heure environ.

pH = 7.6 dans les mélanges eau-acétone suggère l'existence d'interactions* entre l'enzyme et les ions Ca^{++} . Ces interactions ne sont malheureusement pas l'apanage exclusif de la lipase. Le calcium favorise aussi la précipitation d'autres protéines et le degré de purification obtenu n'est en somme pas excellent. Mais, si la lipase possédait malgré tout pour les ions Ca^{++} une affinité légèrement supérieure à celle des autres protéines, l'espérance subsisterait d'améliorer le caractère sélectif de la précipitation en abaissant la concentration de l'ion. Des expériences ont donc été faites à force ionique constante, en remplaçant peu à peu l'acétate de calcium par l'acétate de sodium. Aucune amélioration n'a été constatée. Les courbes de précipitation de la lipase et des autres protéines sont décalées de la même façon vers les fortes concentrations d'acétone.

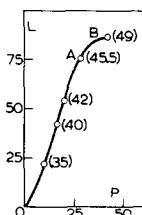


Fig. 3.

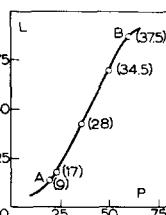


Fig. 4.

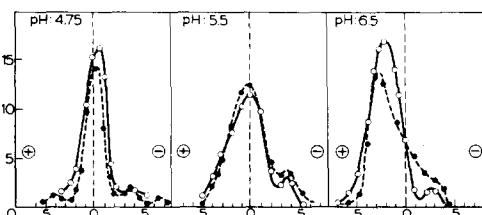


Fig. 5.

Fig. 3. Première précipitation acétonique. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages d'acétone. Les autres conventions sont celles de la Fig. 2.

Fig. 4. Précipitation acétonique en présence de calcium. Mêmes conventions que pour la Fig. 3.

Fig. 5. Comportement électrophorétique de la lipase sur papier en fonction du pH. Electrophorèse sur papier Whatman No. 1 de solutions d'un culot C_2 dans les tampons $M/20$ acétate pH = 4.75 et 5.5 et phosphate $M/20$ pH = 6.5. Différence de potentiel aux bornes: 300 volts. Durée de l'électrophorèse: 2 h. Volume approximatif de la solution mise sur le papier: 0.05 ml. Concentration en protéines de cette solution: 3 %. Nombre d'unités lipase: 50. La position de départ matérialisée par le trait vertical d'abscisse 0 est établie en tenant compte du flot électroosmotique. Les ordonnées représentent les pourcentages (par rapport aux quantités totales mises en jeu) de la lipase et des protéines retrouvées dans les éluats de chaque languette. Chaque languette (1 cm) est matérialisée sur l'axe des abscisses par un trait de séparation. La lipase est représentée par un trait plein et les protéines totales par un pointillé.

Le baryum et le magnésium exercent un effet analogue à celui du calcium. La purification qu'ils permettent d'obtenir est toutefois un peu moins bonne. En présence de zinc ou de manganèse d'autre part, la lipase et les protéines étrangères précipitent en bloc dès le début. C'est donc l'acétate de calcium à la concentration $M/20$ qui semble donner les meilleurs résultats.

5. Précipitation ultérieure par l'acétone en l'absence de calcium

On dissout le culot C_4 dans 15 ml d'une solution de versène $M/10$ à pH = 5.5 afin de désioniser le calcium. Après une incubation de 1 h à 0° , on ajoute de l'acétone à -12° . La fraction (C_5) qui précipite entre 25 et 40% d'acétone contient 60% de la lipase et possède une activité spécifique de 700-710.

En somme, les précipitations sélectives que nous venons d'étudier permettent de purifier l'extrait initial E_1 , soit 10-11 fois avec un rendement global en lipase de 50% (stades 2-4) soit 14-15 fois avec un rendement de 30% (stades 2-4 + la dernière précipitation acétonique). Cette dernière précipitation provoque d'ailleurs une baisse

* Ces interactions vont se manifester aussi pendant l'électrophorèse de la lipase (voir plus loin)

importante du rendement sans augmenter beaucoup l'activité spécifique. Elle ne fait donc pas encore partie de notre schéma habituel de purification.

6. *Quelques essais infructueux de précipitation sélective*

Contrairement à ce que pourraient suggérer les chiffres publiés par HERR ET SUMNER⁶, l'usage de l'éthanol ne semble pas présenter d'intérêt pour la purification de la lipase. Ce solvant est en effet moins sélectif que l'acétone. Il ne permet pas d'autre part d'améliorer sensiblement la pureté du culot C_4 .

Divers auteurs ont en outre prétendu que la lipase pouvait être purifiée en séparant le précipité qui se forme quand on acidifie les extraits bruts de pancréatine. Le précipité obtenu en acidifiant l'extrait E_1 à pH = 4.4 contient effectivement 80% de la lipase. Mais la précipitation n'a aucun caractère sélectif. Tous les culots recueillis par centrifugation à pH = 5.2, 4.75 et 4.4 possèdent la même activité spécifique que l'extrait initial. Ce résultat négatif n'est d'ailleurs pas surprenant. La lipase ne précipite plus en milieu acide dès que les premiers stades de sa purification ont été franchis. Dans les extraits E_1 , ce sont vraisemblablement les acides nucléiques qui provoquent une précipitation générale en milieu acide et la lipase, entraînée par hasard, se retrouve dans toutes les fractions.

7. *Electrophorèse sur papier*

L'électrophorèse des protéines sur papier n'est pas toujours facile. Dans le cas présent, l'écueil principal est la dénaturation progressive que subissent, malgré toutes les précautions prises (voir plus haut), la lipase et les autres protéines qui l'accompagnent. Cette dénaturation se traduit par une inactivation rapide de l'enzyme et une difficulté croissante à éluer les protéines. En règle générale, l'électrophorèse doit durer au maximum 3 h, ce qui est évidemment insuffisant pour qu'un fractionnement effectif soit réalisé. En outre, des interactions extrêmement vigoureuses apparaissent, non seulement entre le papier et les protéines, mais aussi entre la lipase et les autres protéines. Nous avons constaté à plusieurs reprises un phénomène fort curieux : quand les conditions expérimentales de l'électrophorèse sont telles que les protéines se séparent en plusieurs bandes, chaque bande possède invariablement un peu d'activité lipasique. On pourrait en conclure que le pancréas contient plusieurs lipases. Mais, malgré les affirmations d'ailleurs fort contestables de BOISONNAS⁵, cette conclusion serait contraire à tout ce qui a été observé jusqu'ici*. Il est beaucoup plus vraisemblable qu'une partie de la lipase ait été entraînée ou freinée dans son mouvement par d'autres protéines contractant avec elle des associations.

L'existence de semblables interactions nous empêche d'attribuer une trop grande signification aux diagrammes de la Fig. 5 relatifs à l'influence du pH sur la migration électrophorétique de la lipase dans le papier. L'enzyme paraît isoélectrique un peu au-dessous de pH = 5.5. Mais il accompagne en fait dans tous les diagrammes un bloc très mal différencié de protéines qui peut avoir altéré son comportement normal**.

Malgré ces incertitudes, l'électrophorèse sur papier nous apporte un renseignement intéressant dont nous allons bientôt faire usage : la séparation des protéines qui

* A condition évidemment de définir la lipase comme étant un enzyme hydrolysant les glycérides supérieurs et non comme une estérase possédant une spécificité plus ou moins vague.

** Cette valeur trouvée pour le point isoélectrique de la lipase semble néanmoins confirmée par le fait que l'enzyme manifeste une solubilité minimum entre pH = 5.0 et 5.5.

accompagnent la lipase est meilleure quand la force ionique de l'électrolyte est faible et quand cet électrolyte contient des ions calcium.

8. Electrophorèse de zone dans des colonnes d'amidon (stade 5)

Plusieurs circonstances favorables font de l'électrophorèse de zone dans l'amidon une technique efficace pour purifier la lipase: (a) La lipase en effet n'est pas adsorbée par l'amidon à pH alcalin. Quand on lui fait simplement traverser la colonne par gravité, elle sort sous forme d'un pic parfaitement symétrique, dès que le volume mort de cette colonne est lui-même sorti. (b) Elle conserve la quasi-totalité de son activité pendant plus de 36 h à $+1^\circ$ au sein de l'amidon. (c) Les interactions entre la lipase et les protéines qui l'accompagnent semblent plus faibles dans l'amidon que sur le papier. (d) Enfin, ce type d'électrophorèse est utilisable sur le plan préparatif car des quantités relativement grandes de protéines et de lipase peuvent être introduites dans la colonne sans que les bandes s'élargissent indûment. Les quantités maxima utilisées dans le présent travail (60 mg de protéines; 1500 unités lipase) seraient selon toute vraisemblance susceptibles d'être largement dépassées. C'est en réalité la solubilité à pH = 8.0 des protéines des culots C_2 et C_4 qui a représenté jusqu'ici le seul facteur limitant.

De nombreuses électrophorèses ont été réalisées. Les Figs. 6 et 7 indiquent les résultats de cinq opérations choisies parmi les plus significatives. Le tableau I résume

TABLEAU I
CONDITIONS PARTICULIÈRES DES ÉLECTROPHORÈSES DES FIG. 6 ET 7

Diagramme correspondant	Caractéristiques des solutions étudiées						Rendement d'élution	
	Provenance	Volume (ml)	Teneur en protéines		Teneur en lipase		des protéines	de la lipase
			mg	%	Nombre d'unités	Activité spécifique		
Fig. 6 à gauche	C_2	1.0	23	2.3	500	65	74	99
Fig. 6 à droite	C_2	0.9	31	3.4	1075	103	65	82
Fig. 7 (A)	C_2	1.0	28	2.8	950	103	98	103
Fig. 7 (B)	C_2	0.9	61	5.8	1485	96	95	100
Fig. 7 (C)	C_4	0.7	4	0.5	513	478	64	89

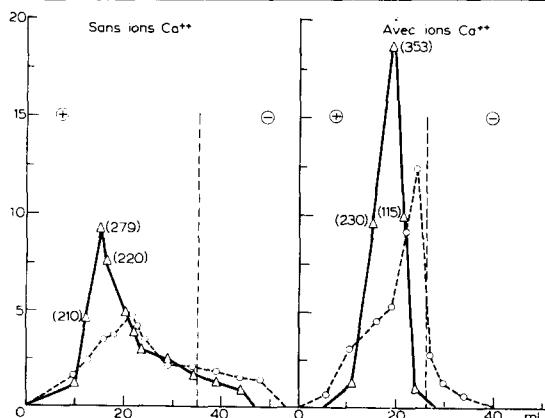


Fig. 6. Influence du calcium pendant l'électrophorèse de la lipase sur amidon. Electrophorèse de la solution d'un culot C_2 dans le tampon tris $M/40$ à pH = 8.0. Gradient de potentiel dans la colonne: 5.9 volts cm^{-1} environ. Durée: 12 h. Temp. $+1^\circ$. Les traits verticaux en pointillé représentent la position initiale des substances dans la colonne, compte tenu du flux électroosmotique. Les ordonnées correspondent aux pourcentages par ml d'élut (calculés par rapport aux quantités totales introduites dans la colonne) de la lipase et des protéines retrouvées dans chaque fraction. Les abscisses donnent les volumes d'élut en ml. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique de chaque fraction. La lipase est en trait plein et les protéines sont en pointillé. Diagramme de gauche: tampon tris seul. Diagramme de droite: tampon tris contenant de l'acétate de calcium à la concentration $M/200$.

les conditions particulières dans lesquelles se sont déroulées ces cinq opérations. Les conditions générales sont indiquées dans les légendes des figures.

L'examen des diagrammes des Fig. 6 et 7 suggère les quelques commentaires suivants:

(1) Étudions tout d'abord sur la Fig. 6 l'influence des ions calcium. Cette influence est double. En premier lieu, le calcium diminue considérablement la mobilité électrophorétique de la lipase et d'une partie des protéines étrangères. Nous retrouvons là une manifestation extrêmement suggestive de ces interactions existant entre le calcium d'une part, la lipase et quelques autres protéines d'autre part. Ces substances parcourent un chemin moins grand vers l'anode parce qu'elles se sont chargées d'ions positifs Ca^{++*} . En outre, le calcium supprime les interactions entre la lipase et certaines protéines. La symétrie du pic de lipase devient aussi parfaite que si l'électrophorèse n'avait pas eu lieu. Ce fait nous paraît important car il montre que nous avons

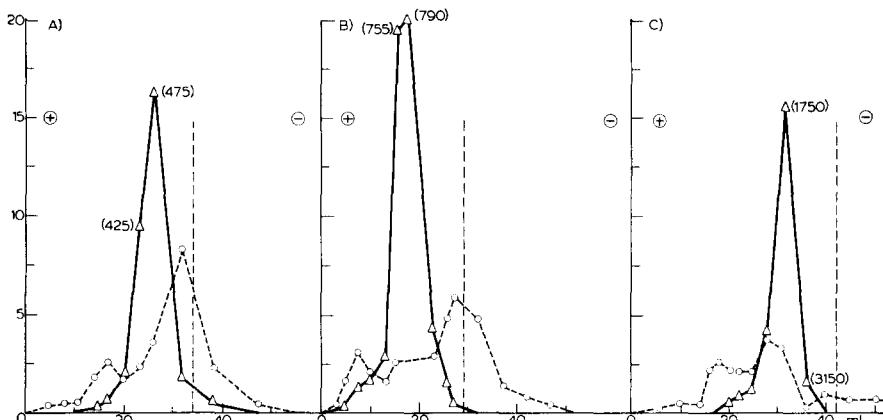


Fig. 7. Divers essais d'électrophorèse des solutions de lipase. Electrophorèses de solutions de culots C_2 ou C_4 dans un tampon véronal $M/40$ pH = 8.0 contenant de l'acétate de calcium à la concentration $M/200$. Mêmes conventions d'écriture et mêmes conditions générales que pour les diagrammes de la Fig. 6. Diagramme A: culot C_2 ; 12 h. Diagramme B: culot C_2 ; 24 h. Diagramme C: culot C_4 ; 24 h.

affaire vraisemblablement à une seule protéine (ou tout au moins à une seule famille de protéines voisines) douée d'activité lipasique, et il améliore l'efficacité de l'électrophorèse en tant que moyen de purification de l'enzyme. Nous obtenons en effet dès maintenant des fractions purifiées environ 3.5 fois par rapport au culot C_2 .

(2) Le diagramme A de la Fig. 7 nous apprend que cette efficacité est augmentée en remplaçant le tampon tris $M/40$ pH = 8.0 par le véronal à la même concentration et au même pH. Le pic de lipase commence à se placer entre deux pics de protéines, l'un plus lent et l'autre plus rapide. La fraction principale est purifiée environ 5 fois par rapport au culot C_2 . Une nouvelle élévation de la force ionique (véronal $M/20$ au lieu de $M/40$) provoquerait la réapparition d'interactions gênantes entre la lipase et les autres protéines.

* Cette variation de la mobilité n'est pas due à l'augmentation de la force ionique par l'acétate de Ca. Quand on passe du tris $M/40$ au véronal $M/40$ et même au véronal $M/20$, on augmente beaucoup plus la force ionique sans modifier de façon sensible la mobilité de la lipase. Il s'agit donc bien d'une action spécifique des ions Ca^{++} .

(3) Après 24 h (diagramme B de la Fig. 7), la distance séparant les deux pics de protéines est évidemment plus grande. Le pic de lipase est donc mieux dégagé et l'activité spécifique de la quasi-totalité de l'enzyme atteint 780 environ, soit 8 fois plus que le culot C_2 et 1.5 fois plus que le culot C_4 (obtenu après 2 précipitations acétoniques du culot C_2).

(4) Enfin le diagramme C de la Fig. 7 correspond à une électrophorèse du culot C_4 dans le véronal $M/40$ pendant 24 h. La double précipitation acétonique fournissant ce culot C_4 a pour effet principal d'éliminer presqu'entièrement les protéines moins mobiles que la lipase. Les protéines de même mobilité ont aussi disparu en partie. L'activité spécifique de 60% de la lipase s'élève maintenant à 1800 soit 3.5 fois plus que celle du culot C_4 . Une petite fraction (6%) sur la branche droite du pic principal possède même une activité spécifique de 3150, valeur maximum que nous n'avons pas encore pu dépasser.

Le Tableau II indique le schéma de purification qui nous paraît le plus logique dans l'état actuel de nos connaissances. La dernière ligne relative à la petite fraction d'activité spécifique 3150 n'est évidemment pas significative sur le plan préparatif à cause du faible rendement qu'elle mentionne. Son intérêt est de fixer une limite inférieure à l'activité spécifique de la lipase pure et de montrer par conséquent une partie du chemin qui reste à parcourir pour la purification complète de cet enzyme.

TABLEAU II
SCHÉMA PROVISOIRE DE PURIFICATION

Stades	Techniques	Activité spécifique de la fraction	Purification	Rendement %
1	Extraction de la pancréatine par l'eau (E_1)	50	—	100
2	Double précipitation par Am_2SO_4 (C_2)	100-110	2	90
3	1° Précipitation acétonique (C_3)	270-280	5	70
4	2° Précipitation acétonique (C_4)	480-550	10	53
5	Electrophorèse	1800 3150	36 63	32 3

Cette fraction d'activité spécifique 3150 donne avec intensité la réaction colorée des lipoprotéines avec le noir Soudan. Il n'est pas possible en ce moment de savoir si cette réaction est due à la lipase elle-même ou à certaines impuretés protéiques dont la préparation n'est pas encore débarrassée. Dans le cas où la lipase serait réellement une lipoprotéine, on comprendrait mieux comment cet enzyme peut entrer si facilement en relation avec un substrat lipidique insoluble dans l'eau.

RÉSUMÉ

Au cours du présent travail, la purification de la lipase pancréatique a été étudiée sous le contrôle constant d'un test potentiométrique utilisant un substrat de triglycérides émulsionnés. L'extraction de la lipase à partir de pancréatine de porc, sa précipitation sélective au moyen de sulfate d'ammonium, d'acétone ou d'éthanol, son comportement pendant l'électrophorèse de zone sur papier ou dans l'amidon ont été examinés. Finalement, un schéma provisoire de purification a été établi. Il comporte deux précipitations par le sulfate d'ammonium, deux précipitations par l'acétone et une électrophorèse préparative de zone dans une colonne d'amidon à pH 8.0 pendant 24 h en présence d'ions calcium. Il permet à l'heure actuelle de purifier la lipase 35 fois par rapport à l'extrait

initial avec un rendement de 30% ou 63 fois avec un rendement de 3%. Le pancréas ne paraît contenir qu'une seule protéine, ou tout au moins une seule famille de protéines voisines, douée d'activité lipasique.

Quelques renseignements intéressants sur les propriétés de la lipase ont été recueillis au cours de ces essais. Il existe des interactions entre la lipase et les ions Ca^{++} . Ces interactions modifient considérablement la mobilité électrophorétique de l'enzyme et sa solubilité dans les mélanges eau-acétone. D'après les résultats de l'électrophorèse sur papier, le point isoélectrique de la lipase serait aux environs de pH 5.0-5.5. Contrairement à ce que l'on croyait jusqu'ici, la lipase partiellement purifiée peut être dialysée sans inactivation notable quand le liquide extérieur est un tampon à pH 5. Enfin, les préparations de lipase les plus pures donnent encore avec le noir Soudan la réaction colorée caractéristique des lipoprotéines.

SUMMARY

In this work the purification of pancreatic lipase was studied, while a constant check of the activity was kept by means of a potentiometric test, using emulsified triglycerides as substrate. Extraction of the lipase from pig pancreatin, its selective precipitation with ammonium sulfate, acetone or ethanol, and its behaviour during zone electrophoresis on paper or on starch were examined. Finally a provisional scheme of purification was drawn up. It entails two precipitations using ammonium sulphate, two precipitations using acetone and a preparative zone electrophoresis on a starch column at pH 8.0 for 24 hours in the presence of calcium ions. At present it is possible to purify the lipase 35 times, giving a yield of 30% with respect to the initial extract, or 63 times, giving a yield of 3%. The pancreas seems to contain only a single protein with lipase activity, or at least a single family of closely related proteins.

Some interesting information concerning the properties of the lipase was gathered in the course of these experiments. Interactions exist between the lipase and Ca^{++} ions, and these interactions considerably modify the electrophoretic mobility of the enzyme and its solubility in the water-acetone mixtures. According to the results of paper electrophoresis, the isoelectric point of the lipase should be about pH 5.0-5.5. Contrary to what was formerly believed, the partially purified enzyme can be dialysed without noticeable inactivation if the external liquid is a buffer of pH 5. Finally the most pure preparations of the lipase give with Sudan Black the characteristic colour reaction of lipoproteins.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- ² P. DESNUELLE, M. NAUDET ET M. J. CONSTANTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 561; 7 (1951) 451.
- ³ B. BORGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 491.
- ⁴ R. WILLSTÄTTER ET E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Z. physiol. Chem.*, 125 (1923) 132.
- ⁵ R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 1577.
- ⁶ E. B. HERR, JR., ET J. B. SUMNER, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Ser. A, II, No. 60 (1955) 64.
- ⁷ P. DESNUELLE, M. J. CONSTANTIN ET L. SARDA, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1956) 625.
- ⁸ P. DESNUELLE, M. J. CONSTANTIN ET J. BALDY, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 285.
- ⁹ P. DESNUELLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 909.
- ¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ¹¹ H. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 461.
- ¹² H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
- ¹³ P. FLODIN ET J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 175.
- ¹⁴ D. GLICK ET C. G. KING, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 2445.

Reçu le 3 juillet 1956