

209. Estérases I.

Dosage d'activité de la lipase de pancréas de porc

par R. A. Boissonnas.

(30 VII 48)

Les estérases sont des enzymes catalysant la réaction :



où l'acide et l'alcool peuvent être mono- ou polyvalents, substitués ou non.

Les estérases sont très répandues dans les organismes végétaux et animaux. Cependant aucune estérase n'a encore été isolée à l'état pur. Leur spécificité est faible : elles ne se distinguent entre elles que par les vitesses relatives auxquelles elles hydrolysent différents substrats. D'autre part, il semble que la plupart des organes contiennent plusieurs estérases différentes.

L'on désigne conventionnellement sous le nom d'estérases simples les estérases qui scindent de préférence les esters d'acides gras inférieurs, et sous le nom de lipases les estérases qui scindent de préférence les esters d'acides gras supérieurs.

Le dosage d'activité de la lipase de pancréas de porc a déjà donné lieu à de nombreux travaux qui se distinguent par les substrats utilisés et par les méthodes employées pour le dosage de l'acide libéré.

Les esters méthyliques, éthyliques, benzyliques ou glycériques des acides gras supérieurs (C_{10} à C_{18}) sont par définition des substrats spécifiques des lipases. Malheureusement la très faible solubilité de ces substrats oblige à travailler en milieu hétérogène. La vitesse de réaction dépend donc de la surface des particules en suspension, c'est-à-dire du degré de dispersion¹⁾. Celui-ci étant influencé par tous les corps agissant sur la tension superficielle qui se trouvent dans le mélange à doser, il est très difficile d'obtenir des mesures d'activité concordantes²⁾. Ainsi beaucoup de corps décrits dans la littérature comme activateurs ou inhibiteurs des lipases n'agissent probablement que sur la tension superficielle.

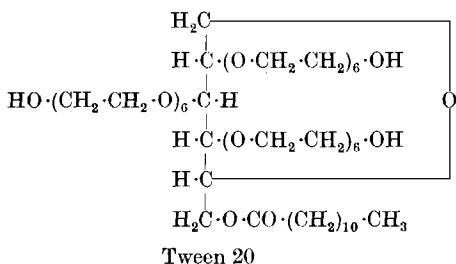
La plus grande solubilité des esters méthyliques, éthyliques ou glycériques des acides gras inférieurs (C_2 à C_4) permet de travailler

¹⁾ F. Schønheyder et K. Volqvartz, Acta physiol. Scand. **9**, 57 (1945).

²⁾ B. Umschweif, Bioch. Z. **249**, 75 (1932); K. G. Falk, J. Biol. Chem. **96**, 53 (1932); D. Glick et C. G. King, J. Biol. Chem. **94**, 497 (1931—32); **97**, 675 (1932).

en milieu homogène. Mais c'est alors la spécificité du substrat qui laisse à désirer¹⁾.

L'emploi du Tween 20 comme substrat par *Archibald* et *Ortiz*²⁾ fut donc un progrès considérable. Le Tween 20 est un produit commercial³⁾ constitué spécialement de monolaurate de poly-hydroxy-éthylène-sorbitane. Il est miscible à l'eau et permet donc de travailler en milieu homogène. Il constitue en outre un substrat spécifique des lipases.



Le dosage de l'acide libéré par action de l'enzyme sur le substrat a été effectué par différentes méthodes:

La méthode alcali-acidimétrique à p_H variable consiste à faire agir l'enzyme sur le substrat et à titrer ensuite à un p_H donné l'acide libéré. La différence avec un blanc sans enzyme permet d'exprimer l'activité de la lipase. La méthode est donc simple.

Cependant, il importe de travailler au voisinage du p_H d'activité maximum et de tamponner le milieu afin que la variation du p_H au cours de la réaction modifie le moins possible l'activité de l'enzyme. Les auteurs appliquant cette méthode utilisent des substrats ayant des p_H d'activité maximum au voisinage de 8 en présence de tampon C₁NH₄—NH₄OH ou glycocolle-NaOH. Le point final du titrage doit donc être supérieur ou inférieur à la zone d'effet de ces tampons, soit aux environs de 9,5⁴⁾ ou de 6,5⁵⁾. Or un acide faible ne peut être titré avec précision qu'au p_H 8. Par conséquent, cette méthode ne permet pas un dosage d'activité sensible et précis dans ces conditions.

¹⁾ *H. Sobotka et D. Glick, J. Biol. Chem.* **105**, 199 (1934).

²⁾ *R. M. Archibald et P. Ortiz, J. Biol. Chem.* **165**, 443 (1946). Les Tweens ont été introduits par *G. Gomori* (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **58**, 362 (1945)) pour la recherche qualitative de la lipase dans les coupes de tissus.

³⁾ *Atlas Powder Company, Wilmington 99, Delaware.*

⁴⁾ *R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz et F. Memmen, Z. physiol. Ch.* **125**, 93 (1923); *H. Sobotka et D. Glick, J. Biol. Chem.* **105**, 199 (1934); *L. Vogel et P. Laeverenz, Z. physiol. Ch.* **234**, 176 (1935); *S. S. Weinstein et A. M. Wynne, J. Biol. Chem.* **112**, 641 (1935—36); *A. K. Balls, M. B. Matlak et I. W. Tucker, J. Biol. Chem.* **122**, 125 (1937—38); *A. K. Balls et M. B. Matlak, J. Biol. Chem.* **123**, 679 (1938); **125**, 539 (1938).

⁵⁾ *R. Willstätter et F. Memmen, Z. physiol. Ch.* **133**, 229 (1924); *D. Glick, Z. physiol. Ch.* **223**, 252 (1934).

La méthode alcali-acidimétrique à p_H constant¹⁾ consiste à maintenir au même p_H la solution faiblement tamponnée par adjonction continue d'alcali pendant la réaction. L'activité de la lipase est mesurée par la quantité d'alcali qu'il a fallu ajouter en un temps donné. La méthode se prête donc à des études sur l'activité en fonction du p_H . Cependant, elle exige l'entièvre attention de l'expérimentateur pendant plusieurs dizaines de minutes et est donc inemployable pour des dosages rapides, en série.

Une variante utilisée par Archibald et Ortiz²⁾ avec le Tween 20 comme substrat, consiste à travailler avec un fort excès de tampon et à extraire ensuite l'acide gras libéré par l'enzyme. Mais les manipulations sont alors trop compliquées et ne permettent pas un dosage rapide.

La méthode stalagmométrique³⁾ (dropping count method) est basée sur la variation de la tension superficielle provoquée par action de l'enzyme sur la tributyrine. La tension superficielle est mesurée par stalagmométrie: la différence entre le nombre de gouttes d'une solution de tributyrine contenant l'enzyme et s'écoulant d'une pipette, au temps zéro, et après un temps donné, exprime l'activité de l'enzyme. Cette méthode est malheureusement peu précise car la vitesse d'écoulement ainsi que tous les corps agissant sur la tension superficielle ont une influence sur le dosage.

La méthode manométrique⁴⁾ consiste à mesurer le CO_2 qui se dégage d'un tampon à l'hydrogénocarbonate sous l'action de l'acide libéré par l'enzyme. Mais la méthode présente l'inconvénient de la complication expérimentale inhérente aux mesures manométriques.

La méthode dilatométrique⁵⁾ basée sur la variation de volume de la solution au cours de la réaction enzymatique ne présente qu'un intérêt théorique.

La méthode néphéломétrique⁶⁾ qui consiste à mesurer, au cours de la réaction enzymatique, la diminution du trouble produit par une suspension de tributyrine ou de trioléine, est trop imprécise par suite de l'instabilité de ces suspensions.

Une méthode colorimétrique⁷⁾ pour le dosage de l'estérase du sérum consiste à mesurer l'intensité de la coloration produite par le p-nitrophénol libéré par action de l'enzyme sur les propionate, butyrate ou valérianate de p-nitrophényle. Malheureusement ces substrats sont très instables.

Entreprenant une étude de la lipase de pancréas de porc, nous désirions une méthode de dosage d'activité à la fois rapide, sensible et

¹⁾ E. Knaffl-Lenz, Arch. Exp. Path. (D) **97**, 242 (1923); P. Rona et R. Ammon, Bioch. Z. **181**, 49 (1927); **249**, 446 (1932); H. Kraut, H. Weischer et R. Hügel, Bioch. Z. **316**, 96 (1943); F. Schönhayder et K. Volqvartz, Acta physiol. Scand. **7**, 376 (1944); **10**, 62 (1945); Enzymol. **11**, 178 (1944); K. Bullok, Quart. J. Pharm. Pharmacol. **18**, 234 (1945); cf. en outre A. K. Balls, M. B. Matlak et I. W. Tucker, J. Biol. Chem. **122**, 125 (1937—38); A. K. Balls et M. B. Matlak, J. Biol. Chem. **123**, 679 (1938); **125**, 539 (1938).

²⁾ R. M. Archibald et P. Ortiz, J. Biol. Chem. **165**, 443 (1946).

³⁾ R. Willstätter et F. Memmen, Z. physiol. Ch. **129**, 1 (1923); N. Wwendsky et P. J. Dobrowitzky, Bioch. Z. **188**, 448 (1927); B. J. Krigsmann, Natuurw. Tijdsch. (Nd), **10**, 137 (1928); E. Bauman et P. Laeverenz, Z. physiol. Ch. **223**, 1 (1934).

⁴⁾ O. Warburg, P. Rona et A. Lasnitzky, Bioch. Z. **152**, 504 (1924); D. R. P. Murray, Biochem. J. **23**, 292 (1929).

⁵⁾ P. Rona et R. Ammon, Bioch. Z. **249**, 446 (1932); R. Ammon et K. Bartscht, Bioch. Z. **268**, 331 (1933—34).

⁶⁾ P. Rona et H. Kleinmann, Bioch. Z. **174**, 18 (1926); E. Herzfeld, Mikroch. **15**, 227 (1934).

⁷⁾ Ch. Huggins et J. Lapidés, J. Biol. Chem. **170**, 467 (1947).

précise. Or, comme nous venons de le montrer, aucune des méthodes décrites dans la littérature ne répond simultanément à ces trois conditions.

Nous avons donc mis au point une nouvelle méthode alcalimétrique à p_H variable, utilisant le Tween 20 comme substrat. Celui-ci offre plusieurs avantages: d'une part il permet de travailler avec un substrat spécifique des lipases en milieu homogène ce qui élimine l'action perturbatrice de tous les corps agissant sur la tension superficielle; d'autre part le p_H d'activité maximum de l'enzyme sur le Tween 20 est de 6,8. Ce p_H est donc suffisamment éloigné du p_H de 8,3 où se trouve le point de virage le plus favorable au titrage précis de l'acide laurique, pour permettre d'effectuer la réaction enzymatique en milieu tamponné, et de sortir de la zone d'effet du tampon pour effectuer le titrage. Nous avons choisi comme tampon l'acétate de sodium dont le pouvoir tampon est nul au p_H 8,3, mais va en augmentant rapidement lorsque le p_H descend (fig. 1).

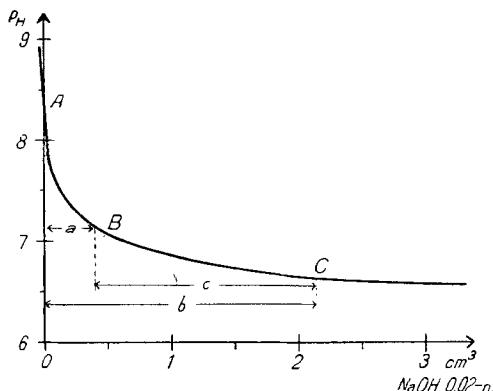


Fig. 1.

Variation du p_H en fonction de la quantité d'acide laurique libéré.

La quantité d'acide laurique est exprimée en équivalent de $\text{cm}^3 \text{NaOH } 0,02\text{-n.}$

- | | |
|---|--|
| A p_H au virage | a blanc |
| B p_H au début de la réaction enzymatique | b essai |
| C p_H à la fin de la réaction enzymatique | c quantité d'acide laurique libéré par l'enzyme. |

Le p_H du mélange tampon-substrat s'établit de lui-même aux environs de 7 (fig. 1, point B), la vitesse d'hydrolyse spontanée du substrat étant minimum à ce p_H . La réaction enzymatique commence donc au p_H 7. Si l'on choisit un temps et une concentration d'enzyme tels que le p_H final ne soit pas inférieur à 6,6 (fig. 1, point C), la réaction enzymatique se déroule suffisamment près du p_H d'activité maximum¹⁾ pour qu'il y ait proportionnalité directe entre la concentration d'enzyme et la quantité d'acide libéré. Après 10 minutes, on titre par

¹⁾ R. M. Archibald et P. Ortiz, J. Biol. Chem. 165, 443 (1946).

NaOH 0,02-n. en présence de rouge de phénol (p_H 8,3; fig. 1, point A). La différence avec un blanc sans enzyme donne la quantité d'acide libéré.

Nous choisissons comme unité d'activité (UA) l'activité d'une quantité d'enzyme qui libérerait l'équivalent de $0,01 \text{ cm}^3 \text{ NaOH}$ 0,02-n. en 10 minutes dans nos conditions de dosage.

Cette méthode permet d'effectuer un dosage en 11 minutes, et cinq dosages en 19 minutes avec une précision de $\pm 2\%$ en utilisant des quantités de lipase correspondant à 5 mgr. de poudre sèche de pancréas de porc.

Au triple point de vue de la rapidité, de la précision et de la sensibilité, cette nouvelle méthode offre donc de réels avantages sur les méthodes de dosage de la lipase décrites jusqu'ici.

Nous exprimons notre vive reconnaissance au Prof. *Kurt H. Meyer* pour ses précieux conseils et son intérêt.

Ce travail a été exécuté grâce à une bourse de la *Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie* que nous remercions chaleureusement pour son appui.

Partie expérimentale.

Appareillage.

Thermostat à $20^\circ \pm 0,2^\circ$.

Eprouvettes de $110 \times 28 \text{ mm}$.

Bombe d'azote. L'azote commercial étant exempt de CO_2 n'a pas besoin d'être lavé.

Burette à remplissage automatique de 2 cm^3 , graduée en centièmes de cm^3 , contenant NaOH 0,02-n. Le bec de la burette (a) est prolongé par un tube (d) de verre épais étiré ayant 0,2 mm. de diamètre intérieur à la base. Ce tube est fixé verre contre verre au bec de la burette par un caoutchouc (b). Ce dispositif est moins délicat qu'un bec étiré en une seule pièce et n'affecte pas la précision des mesures. Les 2 cm^3 de NaOH 0,02-n. doivent pouvoir s'écouler en 10 secondes. Un bouchon de caoutchouc (c) est traversé par ce tube (d) ainsi que par un autre tube (e) ayant 1 mm. de diamètre interne à la base. Ce second tube sert à faire barboter l'azote assurant l'agitation et l'absence de CO_2 . L'éprouvette (b) contenant la solution à doser est fixée par une pince (g) de façon à plaquer contre la base du bouchon de caoutchouc (c).

Réactifs.

- A) Acétate de Na 0,2-n.
- B) Tween 20¹⁾.
- C) Solution aqueuse de rouge de phényle (phénolsulfonephthaléine) à 0,02%.
- D) Eau distillée (p_H 6—7), exempte de traces de métaux lourds.
- E) NaOH 0,02-n.
- F) Alcool décylique.

¹⁾ *Atlas Powder Company*, Wilmington, Delaware, USA., livré par *Walter Moesch & Co.*, Zürich.

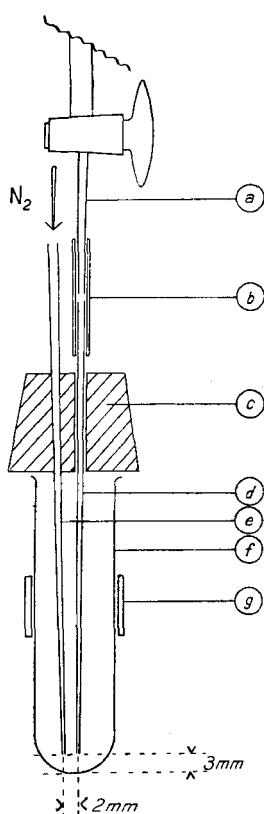


Fig. 2.

Substrat. On mélange dans un cylindre gradué de 250 cm³: 100 cm³ de A, 50 cm³ de B, 10 cm³ de C et 90 cm³ de D. Le mélange est placé dans une bouteille située dans un thermostat à 20°. Il se conserve facilement une semaine à cette température. 5 cm³ ont une valeur à blanc de 0,30 cm³ de NaOH 0,02-n. aussitôt après préparation (p_{H} 7,2), de 0,45 cm³ après une semaine (p_{H} 7,1) et de 0,65 cm³ après trois semaines (p_{H} 7,0).

Dosage.

1^o *Blanc du substrat:* 5 cm³ de substrat additionnés de 1 goutte d'alcool décylique sont placés dans une éprouvette et titrés en courant d'azote par NaOH 0,02-n. jusqu'à ce que la teinte, jaune au début, passe du rose au rouge violacé (p_{H} 8,3). Un mélange de rouge phénol et de méthylorange dans un tampon au carbonate de p_{H} 9,5 permet d'obtenir un témoin de coloration stable. Il suffit d'effectuer un blanc de substrat toutes les 6 heures.

2^o *Blanc d'enzyme:* 1 cm³ de la solution d'enzyme à doser (diluée si nécessaire), environ 5 cm³ d'eau (D), 1 goutte d'alcool décylique (F) et deux gouttes d'indicateur (C) sont placés dans une éprouvette et titrés de même. (Si la valeur trouvée n'est pas inférieure à 0,10 cm³ de NaOH 0,02-n., l'enzyme est dilué par une solution légèrement acide ou alcaline.)

3^o *Essai:* 1 cm³ de la même solution d'enzyme que ci-dessus et 5 cm³ de substrat sont placés dans une éprouvette qui est aussitôt bouchée et mise dans le thermostat à 20°. Après 9 minutes l'éprouvette est sortie du thermostat; on ajoute 1 goutte d'alcool décylique, puis titre comme ci-dessus de façon à obtenir le virage à la 10ème minute \pm 5 secondes. La quantité de soude trouvée, moins la somme des deux blanches donne l'activité de l'enzyme. Un cm³ de NaOH 0,02-n. correspond à 100 unités d'activité. Pour une consommation de soude inférieure à 3 cm³, il y a proportionnalité directe entre la quantité de soude et la concentration d'enzyme.

Pour un dosage en série, on fait partir les essais aux minutes 0, 2, 4, 6 et 8 et on effectue les blancs d'enzyme dans les intervalles. On peut ainsi effectuer 5 dosages en 19 minutes.

La précision est de \pm 2% pour une consommation de soude de 1 cm³.

Influence de corps étrangers sur le dosage.

La présence des corps suivants dans la solution d'enzyme à doser n'a pas d'influence perceptible sur l'activité de l'enzyme dans les conditions du dosage: méthanol, éthanol, acétone, dioxane, CINa, SO₄Mg, SO₄Na₂. Les concentrations maximum essayées ont été de 10% en poids.

La présence d'alcool décylique n'a aucun effet inhibiteur. Les auteurs¹⁾ qui attribuaient un effet inhibiteur aux alcools supérieurs faisaient leur dosage d'activité en milieu hétérogène. Les alcools supérieurs ne faisaient donc que gêner l'émulsion des substrats.

Si la solution d'enzyme à doser contient des quantités appréciables d'ions NH₄⁺ (0,1 à 0,3-m.), il est impossible d'obtenir un virage net avec le rouge de phénol (p_{H} 8,3). Il convient dans ce cas de prendre comme indicateur soit l'alizarine (passage de la teinte du rose au rouge violacé) soit le pourpre de bromocrésol (passage de la teinte du rouge au violet et de la fluorescence du vert au bleu). Le virage est ainsi au p_{H} 7,3. La précision est alors légèrement réduite et est de \pm 4% pour une consommation de soude de 1 cm³.

RÉSUMÉ.

Une nouvelle méthode alcali-acidimétrique pour le dosage d'activité de la lipase de pancréas de porc est décrite. La méthode est sensible, précise et rapide, et utilise le Tween 20 (laurate de polyhydroxyéthylène-sorbitane) comme substrat.

Laboratoires de Chimie organique et inorganique
de l'Université de Genève.

¹⁾ D. Glick et C.G. King, J. Biol. Chem. 94, 497 (1931—32).