

210. Estérases II<sup>1</sup>).

## Purification partielle de la lipase de pancréas de porc

par R. A. Boissonnas.

(30 VII 48)

Alors que plusieurs enzymes ou zymogènes pancréatiques ont déjà été obtenus à l'état pur et cristallin (trypsine, trypsinogène, chymotrypsine, chymotrypsinogène, carboxypeptidase, ribonucléase, désoxyribonucléase,  $\alpha$ -amylase), la purification de la lipase de pancréas n'a été que peu étudiée.

Willstätter et Waldschmidt-Leitz<sup>2</sup>) expriment l'activité de leur produit, enrichi au moyen d'absorptions fractionnées, par rapport au poids sec après dialyse. Or nous savons actuellement que cette manière de procéder conduit à des résultats tout à fait erronés<sup>3</sup>).

Glick et King<sup>3</sup>) effectuent des précipitations salines, mais ils ne tiennent pas compte de l'effet activateur de certains sels dans leur méthode de dosage.

Bamann et Laeverenz<sup>4</sup>) ont annoncé avoir obtenu des cristaux à activité lipatique à partir d'un extrait brut de pancréas. L'expérience n'a jamais été reproduite par ces auteurs. Il s'agit probablement de l'occlusion de lipase dans les cristaux d'une autre substance.

D'autre part les méthodes employées jusqu'ici pour l'extraction de la glande<sup>2-5</sup>) produisent une forte désactivation de la lipase.

Nous avons donc repris le problème dès le début et étudié tout d'abord les conditions d'extraction les plus favorables en variant le temps, la température, le  $p_H$ , la nature et la concentration des sels, ainsi que la vitesse d'agitation. Nous sommes parti de la poudre sèche de pancréas de porc<sup>6</sup>), le porc étant l'animal dont le pancréas est le plus riche en lipase<sup>7</sup>). Le dosage d'activité a été effectué avec le Tween 20 comme substrat selon le procédé décrit précédemment<sup>8</sup>). La richesse est exprimée en unités d'activité Tween par mggr. d'azote Kjeldahl. Pour des dosages rapides d'orientation sur la concentration en protéines, nous nous sommes servi de la mesure de l'absorption

<sup>1</sup>) Estérases I. R. A. Boissonnas, *Helv.* **31**, 1571 (1948).

<sup>2</sup>) R. Willstätter et E. Waldschmidt-Leitz, *Z. physiol. Ch.* **125**, 132 (1923).

<sup>3</sup>) D. Glick et C. G. King, *Am. Soc.* **55**, 2445 (1933).

<sup>4</sup>) E. Bamann et P. Laeverenz, *Z. physiol. Ch.* **223**, 19 (1934).

<sup>5</sup>) E. Bamann et Ch. Feichtner, *Bioch. Z.* **288**, 295 (1936).

<sup>6</sup>) Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 75 (1947).

<sup>7</sup>) O. Koref et M. Munoz, *Rev. med. y alimentation (Santiago)* **5**, 298 (1942-43).

Chem. Abstr. **1945** 316/5.

<sup>8</sup>) R. A. Boissonnas, *Helv.* **31**, 1571 (1948).

lumineuse à 2600 Å avec le spectrophotomètre de quartz DU de *Beckmann*.

L'extraction à la glycérine complique la purification ultérieure. L'extraction à une température supérieure à 5° ou à un  $p_H$  supérieur à 6,5 provoque la destruction d'une partie de la lipase. Le  $p_H$  de 5,5 présente le compromis le plus favorable entre la stabilité de l'extrait (maximum à  $p_H$  5) et la solubilité de l'enzyme (minimum à  $p_H$  4,5). C'est en outre le  $p_H$  où l'extrait se tamponne de lui-même, ce qui évite l'emploi de tampons salins.

Le sulfate de magnésium 0,1-m. donne le compromis le plus favorable entre le pouvoir solubilisant vis-à-vis de la lipase (force ionique), et la concentration en sels compatible avec les procédés de purification.

Nous avons ensuite étudié la purification de l'extrait brut.

Les méthodes essayées ont été les précipitations par des solvants organiques (acétone, méthanol, éthanol, dioxane) et par des sels (sulfates de magnésium, de sodium, d'ammonium, chlorure de sodium), ainsi que les précipitations à l'acide picrique et les précipitations par abaissement de la force ionique (dilution).

Nous avons finalement mis au point une méthode de purification partielle dont le schéma est donné dans le tableau I. Elle consiste en une précipitation acétonique, suivie d'une solubilisation fractionnée du précipité. La solution obtenue est précipitée par dilution fractionnée au point isoélectrique. On obtient ainsi un enrichissement de 17,2 fois avec un rendement de 21,5 %, calculés tous deux par rapport à l'extrait au sulfate de magnésium 0,1-m.

Le produit final ainsi obtenu est très sensible à l'élévation de température et à des variations brusques de  $p_H$ . Soumis à l'électrophorèse, il a montré qu'il contenait au moins 8 protéines différentes dont la plus importante représente moins des 20 % du total. Il faudrait donc encore un enrichissement d'au moins cinq fois pour obtenir de la lipase pure, c'est-à-dire un enrichissement d'au moins 86 fois par rapport à l'extrait brut. Il en résulte que la teneur en lipase du pancréas de porc est nettement inférieure à sa teneur en  $\alpha$ -amylase ou en trypsine. D'autre part, la purification ultérieure du mélange d'euglobulines<sup>1)</sup> contenant la lipase est difficile à effectuer avec des rendements satisfaisants par suite de la tendance à la coprécipitation de ces euglobulines.

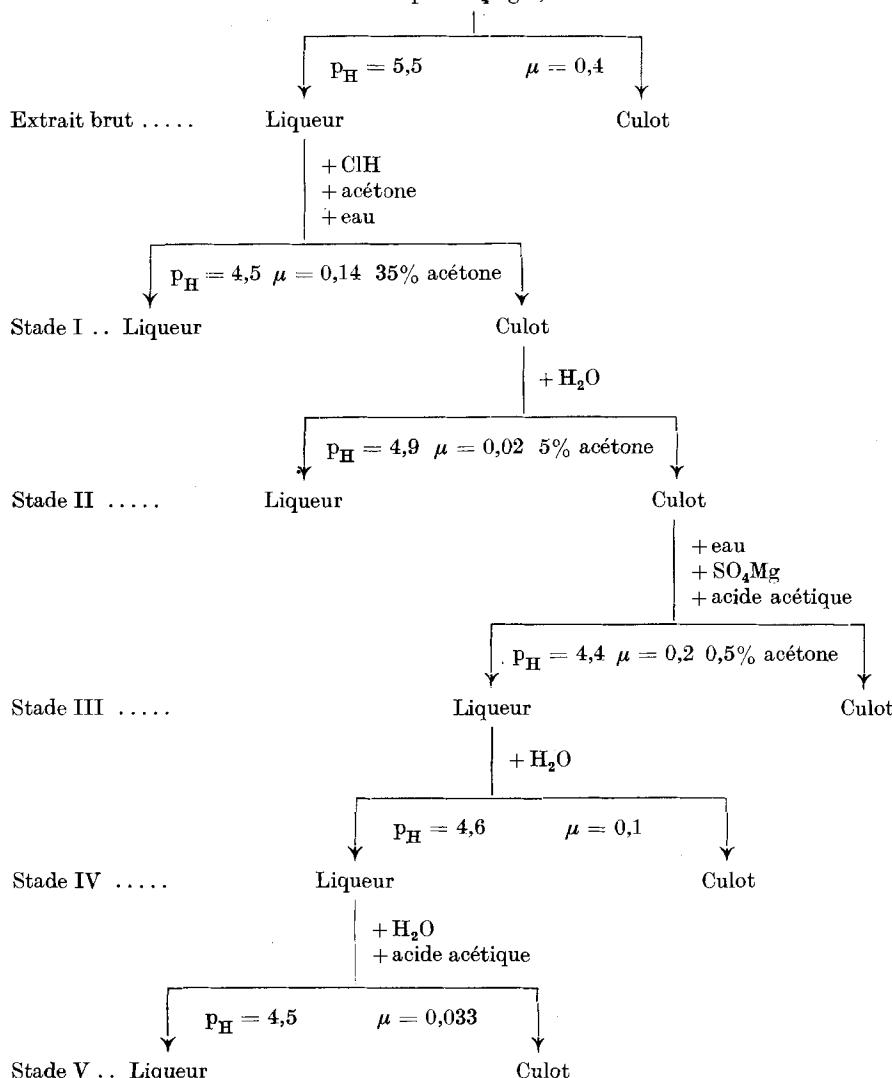
Afin de diminuer la proportion de protéines étrangères, il serait donc préférable de partir non pas de la glande totale, mais de jus de pancréas fistulé sur l'animal vivant.

<sup>1)</sup> Nous entendons par euglobulines les protéines dont la solubilité est fortement diminuée par dilution de leurs solutions salines au point isoélectrique; cf. *J. T. Edsall, Advances in Protein Chemistry III*, p. 429.

## Tableau I.

## Schéma de la purification

Pancréas de porc dégraissé  
Extrait par  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,1-m.



Nous avons en outre étudié un autre problème, qui est celui de la présence de plusieurs estérases dans le pancréas de porc. On peut en effet se demander si, à côté de la cholinestérase, de la cholestérol-estérase, des lécithinases et de la lipase, il n'existe pas encore une autre estérase.

Tableau II.

Stade	Activité par mgr. N	Enrichissement par rapport		Rendement par rapport	
		au stade précédent	à l'extrait brut	au stade précédent	à l'extrait brut
Extrait brut .	145	—	—	—	—
I (culot) . . .	568	3,9	3,9	63%	63%
II (culot) . . .	810	1,4	5,6	81%	51%
III (liqueur) .	1140	1,4	7,9	61%	31%
IV (liqueur) .	1160	1,0	8,0	73%	22,5%
V (culot) . . .	2500	2,2	17,2	95%	21,5%

Activité en unités d'activité Tween<sup>1)</sup>. Azote déterminé par Micro-Kjeldahl.

*P. I. Fodor*<sup>2)</sup> a étudié l'action du jus pancréatique de bœuf sur l'huile d'olive, la monobutyryne, les butyrate de méthyle et d'éthyle et le propionate d'éthyle. Il a trouvé que la présence de gomme arabique augmentait l'activité vis-à-vis de l'huile d'olive, ne la modifiait pas vis-à-vis de la monobutyryne et la diminuait vis-à-vis des trois autres substrats. Il conclut donc à la présence de deux estérases différentes dont l'une est inhibée par la gomme arabique. Cependant cette conclusion n'est pas très rigoureuse, car il effectue ses dosages en milieu hétérogène et ne tient pas compte de la variation de la tension superficielle provoquée par la gomme arabique et modifiant la grosseur des particules en suspension.

Nous avons donc étudié l'action sur le Tween 20, la triacétine, l'acétate d'éthyle et le butyrate d'éthyle, de la lipase de pancréas de porc plus ou moins enrichie (par rapport au Tween 20). Les essais ont été effectués sur l'extrait brut et les stades III et V, en milieu homogène et avec des concentrations d'enzyme égales vis-à-vis du Tween.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III, et montrent que, à activité Tween égale, l'activité triacétine diminue au cours de l'enrichissement, l'activité butyrate d'éthyle reste inchangée, et l'activité acétate d'éthyle est toujours négligeable.

Tableau III.

Substrat acétate de Na 0,08-n. contenant en volume	$10^{-6}$ mol.-gr./cm <sup>3</sup>	em <sup>3</sup> NaOH 0,02-n.			% hydrolyse		
		Extr. brut	Stade III	Stade V	Extr. brut	Stade III	Stade V
20% Tween 20 . . . .	1,8	1,00	1,00	1,00	2,2	2,2	2,2
0,7% Butyrate d'éthyle .	0,5	0,18	0,19	0,18	1,4	1,5	1,4
5% Triacétine . . . .	2,7	1,25	0,35	0,27	0,62	0,17	0,13
5% Acétate d'éthyle . .	5,2	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02

<sup>1)</sup> *R. A. Boissonnas*, Helv. **31**, 1571 (1948).

<sup>2)</sup> *P. I. Fodor*, Nature **158**, 375 (1946) et Exptl. Med. Surg. **5**, 140 (1947), (Chem. Abstr. **1948**, 3010).

L'extrait brut, la liqueur stade II et le culot stade V ont été dilués par le sulfate de magnésium 0,05-m. de façon à obtenir des concentrations en enzyme égales vis-à-vis du Tween 20. 1 cm<sup>3</sup> de solution d'enzyme est additionné de 5 cm<sup>3</sup> de substrat et laissé 10 minutes à 20°. Le  $p_H$  pendant la réaction enzymatique est de 7,0  $\pm$  0,3<sup>1)</sup>.

Ces résultats peuvent être expliqués de deux manières: soit par le départ, au cours de l'enrichissement, d'un corps augmentant l'activité de la lipase vis-à-vis de la triacétine, soit par la présence de deux (ou plus) enzymes différents à activité lipatique<sup>2)</sup>. C'est la seconde de ces deux interprétations que nous considérons comme la plus probable.

En conclusion nous pouvons dire que le pancréas de porc est beaucoup moins riche en lipase qu'en  $\alpha$ -amylase ou en trypsine. La purification est rendue difficile par suite de la tendance à la coprécipitation des euglobulines contenant la lipase, de la faible stabilité de la lipase enrichie, et de la présence probable de plusieurs enzymes à activité lipatique dans le pancréas.

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

### Dosage d'activité.

Il est exécuté selon la méthode décrite précédemment<sup>3)</sup>, utilisant le Tween 20 comme substrat.

### Dosage d'azote.

Il est effectué par micro-*Kjeldahl*. Pour des essais d'orientation nous avons mesuré l'adsorption de la solution de protéines, convenablement diluée par SO<sub>4</sub>Mg 0,05-m. à 2600 Å (maximum d'adsorption) au  $p_H$  5,5 à 16°  $\pm$  2 en cuve de 10 mm. contre de l'eau pure au spectrophotomètre de quartz DU de *Beckmann*. Dans ces conditions, 0,02 mgr. N par cm<sup>3</sup> correspondent à une extinction de 0,600  $\pm$  0,050. Il faut tenir compte, dans le dosage, de la présence éventuelle d'acétone, celle-ci ayant dans les mêmes conditions que ci-dessus une extinction de 0,630 à une concentration de 0,3%.

### Richesse.

Elle est exprimée en unité d'activité Tween (UA)<sup>3)</sup> par mgr. d'azote *Kjeldahl*.

### Extraction.

60 gr. de poudre sèche de pancréas de porc<sup>4)</sup> sont suspendus dans 840 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>Mg 0,1-m. ( $\mu$  = 0,4), additionnées de 1 cm<sup>3</sup> de toluène et de 2 gouttes d'alcool décylique, et secoués à 4° pendant 36 heures horizontalement en flacon fermé de 1 litre. L'agitation

<sup>1)</sup> Pour les détails du dosage cf. *R. A. Boissonnas*, *Helv.* **31**, 1571 (1948).

<sup>2)</sup> Par son activité plus grande sur la triacétine que sur l'acétate d'éthyle, cet second enzyme se rapprocherait en effet plus des lipases que des estérases simples.

<sup>3)</sup> *R. A. Boissonnas*, *Helv.* **31**, 1571 (1948).

<sup>4)</sup> *Kurt H. Meyer*, *Ed. H. Fischer et P. Bernfeld*, *Helv.* **30**, 75 (1947).

ne doit pas provoquer la prise en masse caoutchouteuse de la suspension (15 périodes par minute). Le  $p_H$  se maintient de lui-même à 5,5 pendant toute l'opération. La suspension est ensuite centrifugée 30 minutes à 3000 tours/min.  $4^{\circ}$ . On à enlève à la spatule d'éventuels débris surnageants et l'on rejette le culot. La liqueur constitue l'extrait brut:  $620 \text{ cm}^3$ ,  $1140 \text{ UA/cm}^3$ ,  $7,85 \text{ mgr. N/cm}^3$ ,  $145 \text{ UA/mgr. N}$ ,  $p_H$  5,5. Cet extrait perd 20% de son activité en 2 jours à  $0^{\circ}$ . A un  $p_H$  supérieur à 6,5 ou inférieur à 4, la désactivation est sensiblement plus rapide. L'extrait se désactive par dialyse.

Une durée d'extraction supérieure à 36 h. n'augmente pas le rendement en activité. Une durée d'extraction de 20 h. abaisse ce rendement de 10%.

L'emploi de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,5-m. ( $\mu = 2$ ;  $p_H$  5,5;  $4^{\circ}$ ) pour l'extraction augmente de 10% le rendement en activité, mais complique la purification ultérieure par suite de la forte concentration en sels. L'extraction par l'acétate de 0,5-m. ( $\mu = 0,5$ ;  $p_H$  5,5;  $4^{\circ}$ ) donne les mêmes résultats que l'extraction par  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,1-m. mais rend plus difficile la variation du  $p_H$  du côté acide pour la purification. A  $4^{\circ}$  et au  $p_H$  5,5 également, le  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,05-m., le  $\text{ClNa}$  1,7-m., l'acétate de  $\text{Na}$  0,05-m. et l'eau pure donnent des résultats de 10 à 20% inférieurs. L'emploi d'un  $p_H$  inférieur à 4,5 ou supérieur à 6,5, ou d'une température supérieure à  $4^{\circ}$  provoque la désactivation d'une partie de la lipase. L'extraction par  $\text{ClNa}$  10% à  $37^{\circ}$  pendant 3 h. préconisée par *Glick et King*<sup>1)</sup> provoque la destruction des 80% de l'enzyme.

#### Purification.

Pendant toute la purification, la température est maintenue à  $0^{\circ} \pm 2$ . Tous les réactifs sont préalablement refroidis à cette température. Les centrifugations se font également à froid et à 3000 tours/min. Une élévation de la température provoque une perte d'activité de l'enzyme.

Les différentes opérations doivent se suivre sans interruption. La durée totale de la purification est de cinq heures.

Le  $p_H$ , la force ionique ( $\mu$ ) et la concentration en acétone au moment de chaque centrifugation sont indiqués dans le tableau I. La richesse, le rendement en activité et l'enrichissement des culots ou liqueurs servant à une opération ultérieure sont résumés dans le tableau II. Nous indiquons ci-dessous entre parenthèses après chaque culot ou liqueur: le volume, le rendement en activité et le rendement en azote *Kjeldahl*, calculés à partir de l'extrait brut.

*Stade I.*  $600 \text{ cm}^3$  d'extrait frais sont additionnés en 15 min., goutte à goutte, sous agitation lente, de  $120 \text{ cm}^3$   $\text{ClH}$  0,1-n. Le  $p_H$  descend à 4,5. Il n'y a aucune perte d'activité. On ajoute alors en une fois  $1000 \text{ cm}^3$  d'un mélange eau-acétone contenant 60% d'acétone en volume et préalablement refroidi à  $-20^{\circ}$ . La température finale est de  $0^{\circ}$ . Dans les purifications à petite échelle, l'acétone 60% peut être indifféremment ajoutée goutte à goutte à  $0^{\circ}$ , ou en une fois si elle est refroidie à  $-20^{\circ}$ . Dans les purifications en grand, le second procédé est préférable; en effet le refroidissement extérieur n'est alors pas suffisant pour soutirer rapidement la chaleur produite par la dilution de l'acétone, ce qui provoque une perte d'activité.

Après 20 min. d'agitation lente, on centrifuge 10 min. On écarte la liqueur claire ( $1600 \text{ cm}^3$ ; 9,3% activité; 83,9% N). Le culot constitue le stade I ( $120 \text{ cm}^3$ ; 63% act.; 16,1% N). La perte d'activité de 28% observée n'a pas pu être réduite.

*Stade II.* Le culot précédent est tritiqué en ajoutant peu à peu  $730 \text{ cm}^3$  d'eau glacée. Après 10 min. d'agitation lente, la suspension est centrifugée 10 min. On écarte la liqueur légèrement trouble ( $750 \text{ cm}^3$ ; 11% act.; 7,0% N). Le culot constitue le stade II ( $100 \text{ cm}^3$ ; 51% act.; 9,1% N).

<sup>1)</sup> *D. Glick et C. G. King, Am. Soc.* **55**, 2445 (1933).

*Stade III.* Le culot est trituré avec 40 cm<sup>3</sup> de sulfate de magnésium 0,5-m. On ajoute alors en remuant un mélange de 320 cm<sup>3</sup> d'eau et de 12 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 0,2-n. Après 10 min. d'agitation lente, la suspension est centrifugée 15 min. Le culot (40 cm<sup>3</sup>; 18% act.; 5,1% N) est écarté. La liqueur trouble (360 cm<sup>3</sup>; 31% act.; 4,0% N) constitue le stade III. Elle contient 576 UA/cm<sup>3</sup> et 0,505 mgr. N/cm<sup>3</sup>, et perd 10% de son activité en 2 jours à 0°.

Si l'on augmente le  $p_H$ , le rendement en activité de la liqueur augmente, mais l'enrichissement diminue. Le trouble qui apparaît dans la liqueur ne peut être diminué ni par modification des conditions de solubilisation, ni par filtration. Il n'a pu être écarté que par précipitation d'une partie des protéines à activité lipatique qui l'éloignent par entraînement. C'est le but du stade suivant qui n'amène aucun enrichissement par lui-même, mais permet le fort enrichissement du stade V.

*Stade IV.* La liqueur du stade précédent est additionnée de son volume d'eau sous agitation lente. Après 10 min., on centrifuge 15 min. On écarte le culot (20 cm<sup>3</sup>; 8,0% act.; 1,2% N). La liqueur, qui constitue le stade IV, est parfaitement claire (700 cm<sup>3</sup>; 22,5% act.; 2,8% N).

*Stade V.* La liqueur précédente est additionnée de 1400 cm<sup>3</sup> d'eau contenant 12 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 0,2-n. Il se forme un léger trouble blanc. Après 15 min. d'agitation on centrifuge 5 min. On écarte la liqueur (2080 cm<sup>3</sup>; 1% act.; 1,55% N). Les culots sont réunis et suspendus dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau afin de laver le précipité de la liqueur incluse. Après centrifugation de 5 min. on obtient le culot stade V qui contient les 21,5% de l'activité et les 1,25% de l'azote de l'extrait brut. L'enrichissement est donc de 17,2 fois. Suspendu dans son volume d'eau, le produit perd 15% de son activité en 2 jours à 0°.

#### *Electrophorèse.*

Elle est effectuée sur le stade V dans un tampon au véronal de  $p_H$  7,2 et de force ionique 0,1, avec une concentration en protéines correspondant à 0,16 mgr. N/cm<sup>3</sup> (soit environ 1,2% en protéines). Le remplissage des cuves doit se faire à 0° afin d'éviter une prise en gel de la solution de protéines, qui se produit au dessus de 10°. Après 4 heures sous 193 volts et 20 mA, il apparaît 8 composantes dont la principale représente moins des 20% du total. La pureté de l'enzyme est donc certainement inférieure à 20%.

#### RÉSUMÉ.

1<sup>o</sup> Les meilleures conditions pour l'extraction de la lipase de pancréas de porc à partir de la glande sèche ont été établies.

2<sup>o</sup> La lipase a été enrichie 17,2 fois à partir d'un extrait salin.

3<sup>o</sup> La présence probable de plusieurs enzymes à activité lipatique dans le pancréas de porc a été mise en évidence.

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