

QUELQUES DONNÉES NOUVELLES SUR LE DOSAGE DE CERTAINS ENZYMES DU PANCRÉAS

P. DESNUELLE, J. P. REBOUD et A. BEN ABDELJLIL

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
Marseille, France*

INTRODUCTION

La détermination quantitative des enzymes est une opération importante en biochimie classique et en biochimie clinique. Or, en chimie tout court, quand on veut définir une quantité de substance, on dit qu'il y en a un certain nombre de grammes ou un certain nombre de moles par unité de volume ou de poids. Ce mode d'expression sera vraisemblablement utilisé dans le futur en enzymologie, quand tous les enzymes auront été obtenus à l'état pur et que leurs constantes physiques auront été déterminées. Il est d'ailleurs déjà utilisé pour quelques enzymes particulièrement bien connus. Quand on hydrolyse une protéine par la trypsine ou la chymotrypsine, on dit, par exemple, que tant de grammes de substrat ont été traités par tant de milligrammes d'enzyme. Mais, dans le cas général, les enzymes ne sont pas encore connus sur le plan moléculaire. On ne peut les saisir qu'au travers de leur activité catalytique et c'est cette activité qui doit leur servir de mesure. En d'autres termes, la Commission des Enzymes de l'International Union of Biochemistry recommande de définir un enzyme par l'intermédiaire de la réaction qu'il catalyse. Une connaissance approfondie de la réaction et des conditions dans lesquelles une activité catalytique doit être mesurée est donc indispensable.

La méconnaissance de certaines règles peut provoquer des erreurs considérables, et l'on doit toujours se dire qu'un nombre n'a jamais à lui seul aucune signification. La chose importante est de savoir comment ce nombre a été obtenu et ce qu'il représente réellement. Pour le savoir dans le cas du dosage des enzymes, il faut être sûr que le substrat choisi pour l'enzyme est bien le bon et que les conditions dans lesquelles la mesure est effectuée sont correctes. Ces conditions dépendent étroitement de la cinétique de la réaction catalysée par l'enzyme.

Nous allons, dans le présent rapport, essayer d'illustrer ces notions simples par quelques exemples concrets tirés d'études récentes sur les enzymes de la sécrétion externe du pancréas. On sait que cette glande réunit dans sa sécrétion externe une série d'hydrolases dont le rôle est d'hydrolyser dans l'intestin les substances alimentaires en provenance de l'estomac. À chaque grande classe de substances alimentaires correspond un ou plusieurs enzymes pancréatiques: une α -amylase pour les polysaccharides; une lipase, une phospholipase et une cholestérol estérase pour les lipides; une ribonucléase et une désoxyribonucléase pour les acides nucléiques; et, enfin, un bloc d'enzymes protéolytiques (chymotrypsinogènes, trypsinogène, carboxypep-

tidases A et B, *etc.*) pour les protéines. Ces enzymes jouent un rôle décisif dans les phénomènes de digestion. Il est donc essentiel de savoir les doser correctement dans le pancréas lui-même, le suc pancréatique ou le suc duodénal afin de résoudre des problèmes importants d'enzymologie pure ou de clinique.

α -AMYLASE

L'exemple de l' α -amylase du pancréas va nous permettre de discuter certaines notions concernant la cinétique de la réaction catalysée par l'enzyme.

On sait que les réactions d'hydrolyse sont généralement pseudo-monomoléculaires, par suite de l'abondance des molécules d'eau participant à la

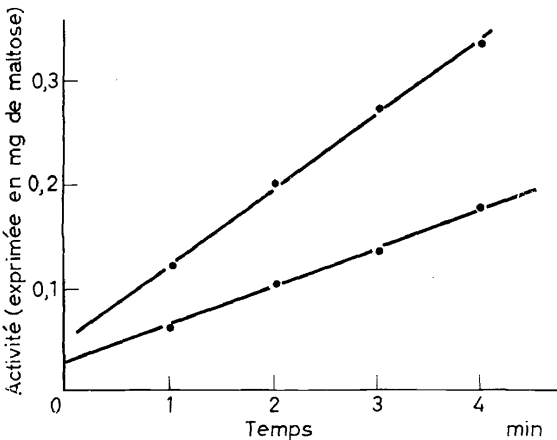


Figure 1. Dosage de l' α -amylase pancréatique par la technique à l'acide 3,5-dinitrosalicylique¹. Les résultats du dosage colorimétrique sont exprimés en mg de maltose. Un essai à blanc réalisé avec la même quantité d'acide, mais sans amylase, est retranché de chaque essai réel

réaction. La première idée est donc de définir la quantité d'enzyme par l'intermédiaire de la constante de la réaction monomoléculaire. Malheureusement, la détermination de cette constante exige que l'on effectue une série d'expériences et elle nécessite un calcul que beaucoup trouvent rebutant. On a donc tendance à se placer dans des conditions où la réaction est d'ordre zéro, c'est-à-dire où la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration du substrat, et où, par conséquent, la courbe de cinétique est rectiligne. La quantité d'enzyme doit alors, en principe tout au moins, être donnée par la pente de la droite.

Dans la meilleure hypothèse donc, la courbe de cinétique est rectiligne. Il faut alors vérifier que les essais sont reproductibles, c'est-à-dire qu'une même quantité d'enzyme donne le même résultat au cours de plusieurs expériences successives, et que la pente des droites est proportionnelle aux quantités d'enzyme en jeu. Ceci n'est vrai, dans le cas le plus favorable, qu'entre certaines limites précises qu'il convient de déterminer.

LE DOSAGE DE CERTAINS ENZYMES DU PANCRÉAS

Enfin, un autre obstacle se présente quand les droites, pour une raison quelconque, ne passent pas par l'origine. C'est ce qui arrive pendant le dosage de l' α -amylase par la technique classique¹ consistant à déterminer colorimétriquement, à l'aide de l'acide 3,5-dinitrosalicylique, le nombre de fonctions réductrices apparaissant au cours de l'hydrolyse de l'amidon. La *Figure 1* indique que les courbes de cinétique sont bien rectilignes dans les conditions de l'essai. Les pentes des droites d'autre part sont bien proportionnelles aux quantités d'enzymes. Mais les droites ne passent pas par l'origine. Il en résulte que l'on n'a pas le droit de déterminer la quantité d'enzyme, comme on a l'habitude de le faire, par une expérience unique. Chaque ordonnée particulière est en effet la somme de l'ordonnée à l'origine plus ce qui est dû à la réaction enzymatique. Elle n'est donc pas proportionnelle à la quantité d'enzyme. Pour bien faire, il est indispensable de tracer dans chaque cas la droite de cinétique et de mesurer sa pente.

La morale à tirer de ce premier exemple est qu'il est dangereux d'utiliser aveuglement une technique dans la forme où elle est décrite par ses auteurs. Il est souvent fort instructif de tracer pour son propre compte des courbes de cinétique et d'en tirer les conclusions qui s'imposent.

ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

Il est encore courant de déterminer l'activité protéolytique d'un liquide biologique ou d'un tissu en les faisant agir sur une protéine (caséine), et en mesurant, par exemple, la quantité de tyrosine qui devient soluble dans l'acide trichloracétique (technique d'Anson). Cette technique est évidemment fort grossière pour plusieurs raisons. En premier lieu, nous ignorons quelle est la cinétique de la réaction. Si elle n'est pas rectiligne, les résultats sont certainement incorrects. D'autre part, l'emploi de la caséine ne permet pas de différencier l'action des nombreux enzymes protéolytiques qui se trouvent ordinairement associés dans les produits étudiés. Enfin, la véritable définition de l'activité protéolytique doit être basée sur le nombre de liaisons rompues par minute, ce que la technique à la tyrosine est bien incapable de nous donner. Nous disposons à l'heure actuelle de substrats spécifiques pour chaque enzyme protéolytique du pancréas²: acétyl-L-tyrosine éthylester pour la chymotrypsine, benzoyl-L-arginine éthylester pour la trypsine, carbobenzoxylglycyl-L-phénylalanine pour la carboxypeptidase-A, et benzoylglycyl-L-arginine pour la carboxypeptidase-B. La mise en oeuvre de ces substrats est relativement simple. Il convient donc de les utiliser toutes les fois que l'on a intérêt à étudier individuellement chaque enzyme, ce qui représente le cas le plus fréquent.

En outre, un problème fort important se pose pour les enzymes protéolytiques du pancréas, celui de l'activation préalable des précurseurs. On sait en effet que, pour des raisons de sécurité, les cellules acinaires du pancréas, chargées de l'élaboration des enzymes de la sécrétion externe, ne synthétisent pas les enzymes protéolytiques sous une forme directement active. Elles forment des précurseurs inactifs qui ne sont activés qu'après leur arrivée dans le duodénum. Il ne servirait à rien d'utiliser des techniques précises et rationnelles pour le dosage des activités si l'étape d'activation n'était pas soigneusement contrôlée.

La *Figure 2* reproduit des courbes de cinétique d'activation des chymotrypsinogènes dans un homogénat de pancréas de rat (A) et du trypsinogène dans du suc pancréatique de porc (B). Dans le premier cas, un homogénat dilué 1 : 10 de pancréas de rat était incubé à pH 7,9 avec de la trypsine. L'incubation se faisait à 35° pour la courbe supérieure et à 0° pour la courbe inférieure.

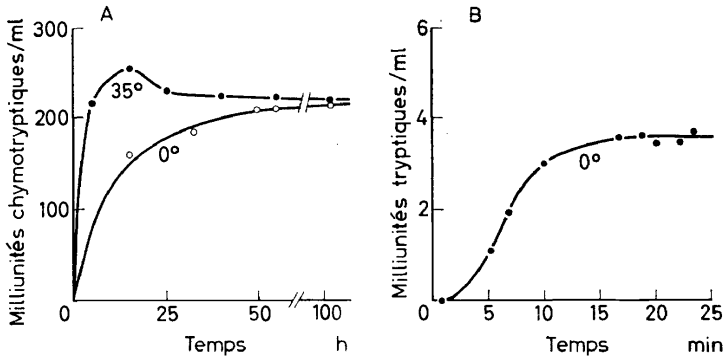


Figure 2. Activation des chymotrypsinogènes et du trypsinogène dans le suc pancréatique et les homogénats de pancréas³. Les ordonnées de gauche (A) montrent milliunités chymotryptiques/ml de l'homogénat dilué 1 : 10; les ordonnées de droite (B) montrent milliunités tryptiques/ml d'une solution de suc contenant 250 µg protéines/ml

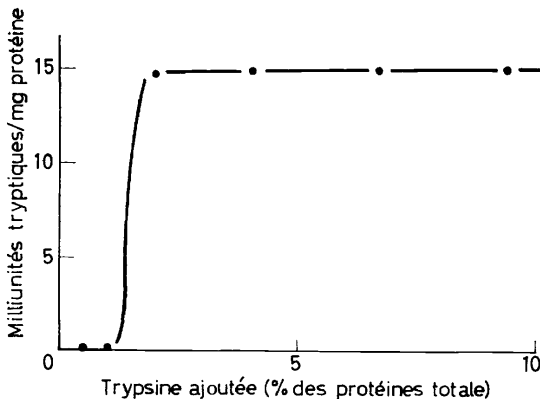


Figure 3. Activation du trypsinogène du suc pancréatique de porc en fonction des quantités de trypsine ajoutées³. Le graphique montre la relation entre les milliunités tryptiques/mg de protéines (obtenues après une incubation de 18 h à 0° avec des quantités variables de trypsine servant à l'activation) et les quantités ajoutées de trypsine (en pour cent des protéines totales du suc)

inférieure. Après des temps déterminés, on prélevait une partie aliquote des échantillons et on y dose l'activité chymotryptique à l'aide d'acétyl-L-tyrosine éthylester. Dans le deuxième cas, un échantillon de suc pancréatique de rat était traité à pH 7,9 et à 0° par de la trypsine. L'activité tryptique était déterminée à l'aide de benzoyl-L-arginine éthylester après des durées différentes d'incubation. On voit que, dans chaque cas, des

LE DOSAGE DE CERTAINS ENZYMES DU PANCRÉAS

conditions ont été trouvées³ permettant d'obtenir un plateau bien défini. La hauteur de ces plateaux est reproductible et proportionnelle à la quantité d'enzyme. Elle donne donc une expression valable de cette dernière.

La *Figure 3* d'autre part permet de se rendre compte de l'influence de la quantité de trypsine sur l'activation en 18 h du trypsinogène contenu dans le suc pancréatique de rat. On voit que l'activation de ce trypsinogène ne se déclenche pas si la quantité ajoutée de trypsine est inférieure à une certaine limite. Puis, elle atteint brusquement sa limite supérieure. Le phénomène est vraisemblablement lié à l'existence dans le suc d'inhibiteurs de trypsine dont il faut surmonter la résistance. Il démontre que l'étape d'activation ne doit pas être réalisée dans n'importe quelle condition. Il suggère également un moyen commode pour évaluer la stabilité du suc. On peut penser que certains états pathologiques du pancréas sont provoqués par un abaissement fortuit de la stabilité du suc (ou des grains de zymogène) déclenchant l'activation prématurée de la trypsine et, par voie de conséquence, de tous les autres précurseurs protéolytiques du pancréas.

LIPASE

L'étude précise de la lipase pancréatique fournit de nombreux exemples des erreurs que l'on peut commettre pendant la détermination de l'activité d'un enzyme.

Choix du substrat

Lorsqu'un enzyme est rigoureusement spécifique, c'est-à-dire lorsqu'il n'agit que sur un seul substrat, sa définition par l'intermédiaire de son substrat n'est pas équivoque. Dans le cas contraire, un choix embarrassant entre plusieurs substrats possibles doit être fait. Il est alors prudent de sélectionner le substrat le plus "physiologique", c'est-à-dire celui qui correspond directement au rôle dévolu à l'enzyme *in vivo*.

La lipase pancréatique est déversée dans le duodénum afin d'y hydrolyser les triglycérides alimentaires dont la solubilité dans l'eau est nulle. La première idée est donc d'utiliser ces triglycérides insolubles quand une activité lipolytique doit être mesurée. C'est bien d'ailleurs ce qu'avait fait Willstätter au cours de ses travaux fondamentaux sur la lipase. Mais les enzymologistes sont habitués à opérer au sein d'une phase aqueuse dans laquelle l'enzyme et le substrat se trouvent dissous et d'appliquer sans hésitation à une telle phase les lois classiques de la physico-chimie. Une émulsion de substances insolubles représente *a priori* un système beaucoup plus compliqué. Aussi, on prit l'habitude de substituer aux triglycérides des esters solubles, comme le Tween-20, l'acétate de *p*-nitrophénol ou le butyrate de méthyle. Il est remarquable qu'un traité classique et récent⁴ mentionne pour la lipase deux techniques de dosage qui préconisent l'emploi d'esters dissous.

Or, la *Figure 4* indique au contraire que la lipase agit exclusivement sur les esters émulsifiés⁵. Les expériences de la *Figure 4* sont réalisées avec des esters solubles dans l'eau, la triacétine (A) et le butyrate de méthyle (B). Dans les deux cas, on porte en ordonnées l'activité déployée par une préparation de lipase partiellement purifiée (cercles blancs) ou une préparation

pure (triangles noirs). En abscisses, on porte la concentration du substrat. La droite verticale en pointillé matérialise dans les deux diagrammes l'instant où la solution est saturée, c'est-à-dire où les molécules de substrat commencent à apparaître à l'état émulsifié. En d'autres termes, on trace des courbes de Michaelis. Quand la concentration est faible, toutes les molécules de substrat sont en solution. La lipase agit très peu ou pas du tout. En augmentant la concentration, il arrive un moment où la saturation de la solution est atteinte. Au-delà, toutes les molécules ne peuvent pas se dissoudre. Une partie reste à l'état émulsifié. On voit qu'à cet instant, une large activité lipolytique se développe. L'estérase du foie, au contraire, agit très bien sur le butyrate de méthyle en solution et son activité n'est pas augmentée au moment où la saturation est franchie⁵. En d'autres termes, la frontière entre l'activité lipolytique et l'activité estérolitique est donnée par l'état physique du substrat. La lipase agit sur les esters émulsifiés et

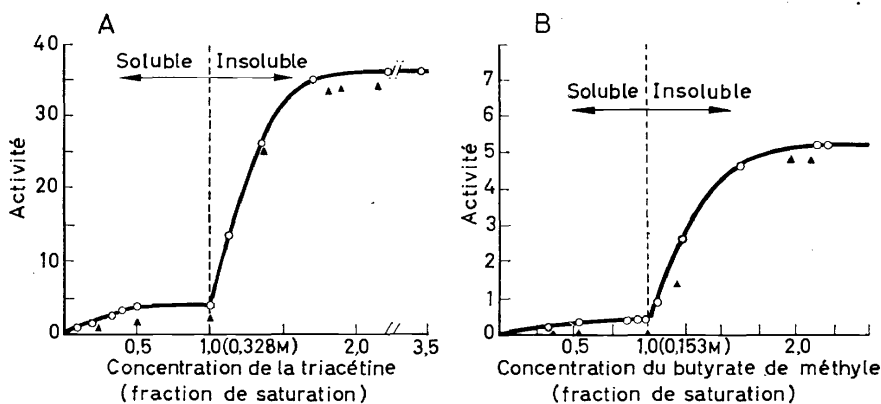


Figure 4. Action exclusive de la lipase pancréatique sur les esters émulsifiés⁵

n'agit pas sur les esters dissous. L'estérase au contraire agit sur les esters dissous et elle est incapable d'attaquer les esters émulsifiés.

La leçon à tirer des expériences de la Figure 4 est que l'activité de la lipase doit être mesurée à l'aide d'émulsions, faute de quoi c'est l'activité d'un autre enzyme que l'on mesure.

“ Concentration ” de l'émulsion

Pour que la cinétique d'une réaction enzymatique ait une chance d'être d'ordre zéro, il faut que la concentration du substrat soit suffisante pour que le substrat sature l'enzyme. C'est là d'ailleurs l'une des recommandations de la Commission des Enzymes de l'International Union of Biochemistry. Or, quand un substrat est insoluble, comme le sont les substrats naturels de la lipase, quelle est la signification de la “ concentration ” du substrat ?

Des études récentes, qu'il serait trop long de décrire ici, ont montré que la lipase agit à l'interface des globules émulsifiés. Les molécules de substrat accessibles à l'enzyme sont donc celles situées à l'interface, et l'aire de l'interface peut servir à définir la “ concentration ” de l'émulsion. Cette

LE DOSAGE DE CERTAINS ENZYMES DU PANCRÉAS

convention permet alors de tracer des courbes de Michaelis pour la lipase agissant sur un substrat insoluble tel que la trioléine, et de s'apercevoir que, comme les courbes classiques, ces courbes comportent un plateau. En d'autres termes, pour qu'un test de lipase soit correct, il ne suffit pas d'utiliser une émulsion d'ester, de préférence une émulsion de triglycérides; il faut aussi que l'émulsion ait une interface assez grande pour que le plateau de Michaelis soit atteint, c'est-à-dire pour que toute la lipase disponible soit adsorbée à l'interface. À ce moment, contrairement à ce que l'on affirme parfois, il est inutile d'agiter. La réaction de lipolyse s'effectue selon une réaction d'ordre zéro à sa vitesse maximum.

Réalisation du test

Le test proposé pour la lipase⁶ est un dosage potentiométrique à pH constant. La Figure 5 montre les résultats d'une série de telles expériences,

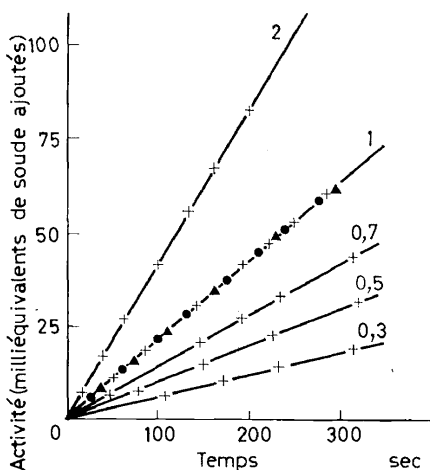


Figure 5. Dosage potentiométrique à pH constant pour la lipase pancréatique (technique manuelle). Les croix, ronds et triangles le long de la courbe (1) correspondent à plusieurs expériences réalisées avec la même quantité de lipase. Les nombres à côté de chaque courbe indiquent les proportions de lipase utilisées dans les autres expériences

réalisées dans la manière suivante. 10 ml d'une émulsion préparée en agitant pendant 10 min, 165 ml d'une solution de gomme arabique à 10 pour cent, 15 g de glace pilée et 20 ml de trioléine, ou plus simplement d'huile d'olive neutre, étaient placés dans un bécher de 50 ml avec 0,3 ml d'une solution à 20 pour cent de taurocholate de sodium (ou d'un mélange de sels biliaires préparé à partir de bile de boeuf) pour accélérer la réaction, et assez d'eau pour amener le volume total à 30 ml. Le bécher était placé dans un thermostat à 37°. Son contenu était agité doucement. On y plongeait les électrodes d'un pH-mètre, amenait le pH à 9,0-9,1 et ajoutait la solution contenant la lipase. Le pH était maintenu à 9,0 par addition de soude 0,1 N. On mesurait, en fonction du temps, la quantité de soude

nécessaire au maintien du pH à sa valeur initiale. La *Figure 5* indique que le test est reproductible et que la pente des droites est rigoureusement proportionnelle à la quantité de lipase en jeu. Une détermination prend environ 5 minutes.

La *Figure 6* enfin reproduit les courbes obtenues automatiquement par emploi d'un pH-stat enregistreur Radiometer. Dans cette *Figure 6*, la pente de les droites, représentant les tangents à l'origine, est rigoureusement proportionnelle à la quantité de lipase. L'usage de cet appareil est particulièrement commode car, en plus de son caractère automatique supprimant toute observation subjective, il permet d'abaisser le volume de l'émulsion à 3 ml et de réduire, par conséquent, la quantité de lipase dosée.

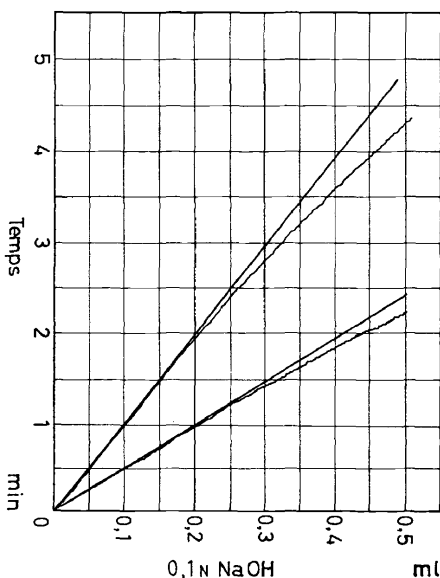


Figure 6. Dosage potentiométrique à pH constant de la lipase pancréatique (technique automatique). Les courbes inférieures légèrement incurvées vers le bas sont tracées automatiquement par un pH-stat enregistreur Radiometer chargé avec de la soude 0,1N. Les droites représentent les tangentes à l'origine

EXEMPLE D'APPLICATION DE CES TECHNIQUES

La *Figure 7* indique les variations de la composition en enzymes du suc pancréatique de rat, en fonction de la durée de la collection. Sur un rat male de souche Wistar, nourri avec un régime équilibré, on placeait une fistule permettant de recueillir de façon continue du suc pancréatique pur. Le tube entouré de glace dans lequel s'écoule le suc était chargé toutes les 12 h. On dosait dans les échantillons, l'amylase (cercles noirs), la lipase (croix) et le chymotrypsinogène (cercles blancs). La baisse de l'amylase est seule significative, car elle entraîne une élévation apparente du taux des autres enzymes. L'interprétation précise du phénomène sortirait du cadre de cet exposé.

LE DOSAGE DE CERTAINS ENZYMES DU PANCRÉAS

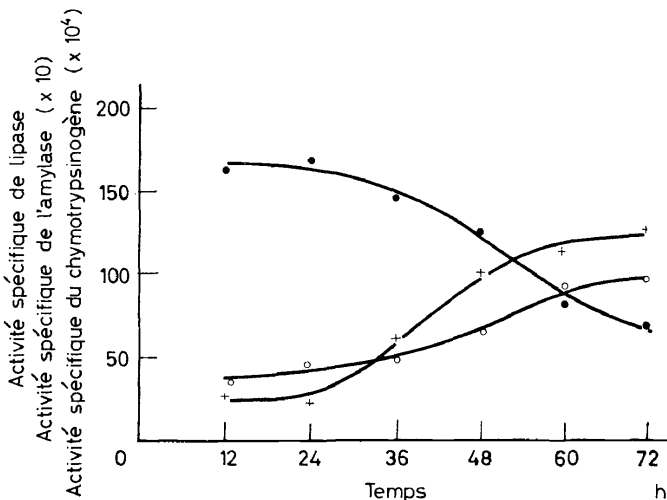


Figure 7. Variation de composition du suc pancréatique de rat en fonction de la durée de la collection. L'activité spécifique de l'amylose est donnée par les cercles noirs, celle de la lipase par les croix, et celle du chymotrypsinogène par les cercles blancs

CONCLUSIONS

L'objet essentiel de ce rapport est d'indiquer qu'il est beaucoup plus difficile de doser correctement un enzyme que d'en déterminer qualitativement la présence ou l'absence. Or, il est vraisemblable que certains états pathologiques déterminent des variations certes sensibles, mais relativement peu importantes, de la teneur en enzymes de tel ou tel tissu. Les techniques de dosage doivent donc être, non seulement sensibles et commodes, mais aussi correctes. Lorsqu'on obtient un résultat expérimental, il convient de se demander dans quelles conditions ce résultat a été obtenu et quelle est sa signification. Le tracé des courbes de cinétique fournit souvent à ce sujet des renseignements intéressants. Le choix du substrat est également fort important. La littérature biochimique et médical est encombrée d'articles dépourvus de signification, par le simple fait que la lipase a été mesurée à l'aide d'esters en solution.

Références

- ¹ P. Bernfeld. In *Methods in Enzymology* (éds. S. P. Colowick et N. O. Kaplan), Vol. 1, p. 149, Academic Press, New York (1955)
- ² N. M. Green et H. Neurath. In *The Proteins* (éds. H. Neurath et K. Bailey) Vol. 2, Part II, p. 1657, Academic Press, New York (1954)
- ³ J. P. Reboud, A. Ben Abdeljlil et P. Desnuelle. Expériences inédites
- ⁴ M. Bier. In *Methods of Enzymology* (éds. S. P. Colowick et N. O. Kaplan), Vol. 1, p. 627 Academic Press, New York (1955)
- ⁵ L. Sarda et P. Desnuelle. *Biochim. et Biophys. Acta*, **30**, 513 (1958)
- ⁶ G. Marchis-Mouren, L. Sarda et P. Desnuelle. *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 309 (1959)