

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

OPTIMISATION DE MÉTHODES CHROMOGÉNIQUES POUR L'ÉVALUATION D'ENZYMES
PANCRÉATIQUES EN MILIEU PHARMACEUTIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
DOMINIQUE DEMERS

JANVIER 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, le docteur Mircea Alexandru Mateescu, pour m'avoir accepté dans son laboratoire pour le stage de fin d'études du baccalauréat à l'été 2007 et par la suite, de m'avoir intégré comme étudiante à la maîtrise avec tout le support nécessaire à l'accomplissement de mes études de deuxième cycle.

Je désire également remercier le Dr. Janine Mauzeroll ainsi que M. Gwenaël Chamoulaud pour l'accès et le support technique pour le spectrofluorimètre.

Je souhaite remercier le Dr. Pompilia Ispas-Szabo, professeure associée à l'UQAM, qui m'a soutenue tout au long de mes divers projets en tant que superviseure en milieu de pratique pour la compagnie Axcan Pharma. Je souhaite également remercier le personnel professionnel d'Axcan Pharma qui m'a soutenu et encadré tout au long de mon partenariat avec cette société, soit M. Érick Tessier, M.Sc. et M. Yves Dumoulin, Ph. D.

J'adresse également tous mes remerciements envers les divers membres de mon laboratoire pour leurs collaborations, mais plus particulièrement Mme Francine Hamel, Ph.D. et M. Marc Lemieux, M.Sc. pour le temps et les connaissances investies dans mon projet ainsi que dans mon perfectionnement académique.

Tables des matières

REMERCIEMENTS.....	i
TABLES DES MATIÈRES	ii
Liste des figures	iv
Liste des abréviations, sigles et acronymes.....	vii
Liste des symboles	ix
CONTRIBUTIONS À LA RECHERCHE RÉALISÉES AU COURS DE LA MAÎTRISE.....	xi
RÉSUMÉ.....	xii
PARTIE I - INTRODUCTION.....	I
CHAPITRE I	
LE PANCRÉAS ET L'INSUFFISANCE PANCRÉATIQUE EXOCRINE.....	2
1.1 Le pancréas.....	2
1.1.1 Historique et structures anatomiques.....	2
1.1.2 Fonctions	3
1.2 L'insuffisance pancréatique exocrine.....	6
1.2.1 Description et symptômes	6
1.2.2 Causes.....	9
1.2.3 Traitements.....	13
CHAPITRE II	
LES ENZYMES PANCRÉATIQUES.....	16
2.1 Les enzymes – aspects généraux	16
2.1.1 Définition, structure et fonctions.....	17
2.1.2 Réactions catalytiques	18
2.1.3 Aspects de la cinétique enzymatique.....	19
2.1.4 Conditions des réactions enzymatiques.....	24
2.2 Les enzymes pancréatiques	29
2.2.1 La lipase pancréatique	29

2.2.2 L'amylase pancréatique.....	33
2.2.3 Les protéases pancréatiques.....	36
CHAPITRE III	
MÉTHODES DE DOSAGE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES	41
3.1 Méthodes actuelles USP	42
3.1.1 La lipase.....	42
3.1.2 L'alpha-amylase	45
3.1.3 Les protéases	46
3.2 Méthodes alternatives.....	47
3.2.1 Méthodes chromogéniques.....	48
CHAPITRE IV	
PRÉSENTATION DU PROJET.....	54
PARTIE II - PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	
57	
CHAPITRE V	
ARTICLE SOUMIS À «JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS»	58
CHAPITRE VI	
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	86
APPENDICE A	
AFFICHE SOUMIS À L' AAPS ANNUAL MEETING 2009	94
BIBLIOGRAPHIE	96

Liste des figures

Partie I - Introduction

Figure 2.1 : Représentation schématique des énergies libres d'une réaction sans et avec catalyse enzymatique.....	19
Figure 2.2 : Représentation des étapes réactionnelles d'une réaction catalytique enzymatique avec un seul substrat.....	19
Figure 2.3 : Représentation graphique de la courbe de saturation de Michaelis-Menten..	22
Figure 2.4 : Représentation graphique de la double réciproque de Lineweaver-Burk.....	24
Figure 2.5 : Représentation schématique de l'influence du pH sur l'activité enzymatique.....	25
Figure 2.6 : Représentation schématique de l'influence de la température sur l'activité enzymatique.....	26
Figure 2.7 : Représentation tridimensionnelle de la lipase pancréatique (d'après Chen <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figure 2.8 : Représentation graphique de l'interaction entre la lipase pancréatique humaine, les triglycérides et la colipase (d'après Van Tilbeurgh <i>et al.</i> , 1999).....	32
Figure 2.9 : Représentation tridimensionnelle de l'alpha-amylase (d'après Chen <i>et al.</i> , 2003).....	35
Figure 2.10 : Représentation graphique de l'action amylolytique (\rightarrow) sur l'amylose (A) et l'amylopectine (B).....	36
Figure 2.11 : Représentation tridimensionnelle de la trypsine pancréatique (d'après Protein DataBank).....	38

Figure 2.12 : Représentation tridimensionnelle de la trypsine pancréatique (d'après Protein DataBank).....	40
--	----

Figure 3.1 : Représentation schématique de l'action enzymatique sur un substrat couplé au chromophore fluorescent BODIPY (d'après www.invitrogen.com).....	53
--	----

Figure 4.1 : Présentation schématique des différentes étapes associées à chacune des trois enzymes pancréatiques étudiées dans le projet.....	57
---	----

Partie II - Partie expérimentale

Figure 5.1 : Influence of cofactors on pancreatic enzyme activity. Effect of magnesium (◇) and calcium ions (◆) (A) and of bile salts (B) on the activity of lipase. Effect of calcium ions on the activity of amylase (C) and of proteases (D).....	81
--	----

Figure 5.2 : Influence of the temperature from 25 to 40 °C on activities of lipase (A), amylase (B) and proteases (C).....	82
--	----

Figure 5.3 : Substrate concentration and kinetic curves for lipase (A), amylase (B) and proteases (C) with corresponding Lineweaver-Burk double reciprocal plots inserted (◇ activity and ◆ linearity range).....	83
---	----

Figure 5.4 : Dependency of the reaction rate in function of the concentration of lipase (A), amylase (B) and proteases (C) (◇ activity and ◆ linearity range).....	84
--	----

Figure 5.5 : Establishment of the reaction time for kinetic measurements of lipase (A), amylase (B) and proteases (C) activities (◇ activity and ◆ linearity range).....	85
--	----

Liste des tableaux

Partie I - Introduction

Tableau 1.1 : Fonctions de certaines enzymes digestives secrétées pat le système digestif des mammifères (d'après Eckert <i>et al.</i> 1999).....	5
Tableau 1.2 : Affections causant une insuffisance pancréatite exocrine (adapté de Frossard et Nicolet, 2007).....	9

Partie II - Partie expérimentale

Tableau 5.1 : Optimized buffer characteristics (type, concentration and pH) for the determination of each pancreatic enzyme by chromogenic assays (assays in triplicate as described section 2).....	863
Tableau 5.2 : Kinetic parameters of lipase, alpha-amylase and proteases activities with the specific chromogenic substrate for each enzyme.....	87
Tableau 5.3 : Comparative studies between the USP and the chromogenic methods and the determination of the eventual influence of excipients for the pancreatic extracts PEC A and PEC B formulations (assays in triplicate as described in section 2).....	88

Liste des abréviations, sigles et acronymes

Ala	alanine
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
Asn	asparagine
Asp	aspartate
ATP	Adenosine triphosphate
BODIPY	« Boron dipyrromethene difluoride »
C ₁₄	chaîne alkyle de 14 carbones
C ₂₂	chaîne alkyle de 22 carbones
CFTR	« cystic fibrosis transmembrane regulator »
Cys	cystéine
Da	Dalton
E	enzyme
EI	complexe enzyme-inhibiteur
ES	complexe enzyme-substrat
ESI	complexe enzyme-substrat-inhibiteur
FAD	flavine adenine dinucleotide
Gln	glutamine
Glu	glutamate
His	histidine
HPL	« human pancreatic lipase »
Ile	isoleucine
IPE	insuffisance pancréatique exocrine
IUPAC	« International Union of Pure and Applied Chemistry »

J.C.	Jésus Christ
Leu	leucine
Met	méthionine
MOPS	« 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid »
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
P	produit
Phe	phénylalanine
PNLIP	« pancreatic lipase gene »
Pont S-S	pont disulfure
RSD	écart-type standard (« relative standard deviation »)
Ser	serine
SKB	Sandstedt, Kneen et Blish
SPINK-1	« Serine Peptidase inhibitor Kazal, type 1 »
Sr ²⁺	ion divalent strontium
TCA	trichloroacétique
TIGAR-O	classification étiologique des causes de la pancréatite chronique : Toxique/métabolique, Idiopathique, Génétique, pancréatite Aigue, pancréatite Récurrente, Obstructive
TRIS	« tris (hydroxymethyl) aminomethane »
Trp	tryptophane
Tyr	tyrosine
USP	« United States Pharmacopeia »
USP-NF	« United States Pharmacopeia-National Formulary »
UV	ultraviolet
vs	versus

Liste des symboles

[S]	concentration de substrat
ΔG	variation d'énergie libre
ΔG^\ddagger	énergie d'activation
μEq	micro équivalent
μmoles	micro moles
CO_2	dioxyde de carbone
G	énergie libre (énergie de Gibbs)
H_2	hydrogène
k_{-1}	constante de vitesse de dissociation de ES
k_1	constante de vitesse de formation de ES
k_2	constante de vitesse de formation du produit
k_{cat}	constante catalytique
kDa	kilo Dalton
K_i	constante d'inhibition
$K_{m \text{ app}}$	constante d'affinité apparente
K_m	constante de Michaelis ou constante d'affinité
mEq	milliéquivalent
Mg^{2+}	ion divalent magnésium
mM	milli molaire
U	unité enzymatique
V_{max}	vélocité maximale
α	alpha
β	bêta
γ	gamma

ΔH^\ddagger enthalpie d'activation

v vitesse

Contributions à la recherche réalisée au cours de la maîtrise

Article avec comité de lecture

Dominique Demers, Francine Hamel, Erick Tessier, Pompilia Ispas-Szabo et Mircea Alexandru Mateescu. Chromogenic methods optimized for the evaluation of pancreatic enzymes in pharmaceutical applications. Article soumis pour publication dans : Analytical Method.

Conférences avec arbitrage (abrégé publié)

Dominique Demers, Francine Hamel, Erick Tessier, Pompilia Ispas-Szabo et Mircea Alexandru Mateescu. Développement de méthodes analytiques en fluorescence pour le dosage des enzymes pancréatiques dans des formulations pharmaceutiques. Le XII Colloque annuel des étudiants chercheurs en chimie et en biochimie de l'UQAM, 2009. #V5, Montréal (Qc), Canada.

Dominique Demers, Francine Hamel, Erick Tessier, Pompilia Ispas-Szabo et Mircea Alexandru Mateescu. «Chromogenic methods optimised for evaluation of pancreatic enzymes in pharmaceutical applications » AAPS Annual Meeting 2009, Los Angeles (CA), USA.

RÉSUMÉ

L'insuffisance pancréatique se définit comme un déficit de production d'enzymes pancréatiques par le pancréas. Ceci entraîne une mauvaise digestion des aliments et des vitamines liposolubles, mais peut rarement entraîner la mort. Plusieurs affections du pancréas peuvent entraîner un tel déficit, mais il est généralement engendré par la pancréatite chronique et la mucoviscidose. L'insuffisance elle-même peut être contrée en donnant aux malades un produit pharmaceutique composé d'extraits pancréatiques. Généralement issu de pancréas porcin, cet extrait pancréatique doit être apte à résister à l'environnement gastrique pour pouvoir se répandre promptement dans le duodénum en gardant des hauts taux d'activité enzymatique.

Plusieurs méthodes de dosage existent pour permettre d'évaluer l'activité enzymatique des enzymes pancréatiques comme agents actifs, dont celles recommandées par la Pharmacopée américaine. Vu les désavantages reliés à l'utilisation de ces méthodes (longues et laborieuses), ce projet a été mené pour déterminer si des méthodes alternatives pourraient être équivalentes tout en éliminant ces désavantages. Suite à des recherches préliminaires, des méthodes chromogéniques en fluorescence ont été sélectionnées pour évaluer leur potentiel d'utilisation pour le dosage de l'activité de la pancrélipase vu leurs avantages comme la rapidité et la sensibilité. L'objectif de ce projet a donc été de développer et d'optimiser des méthodes chromogéniques en fluorescence pour l'évaluation des enzymes pancréatiques en formulation pharmaceutique.

Les paramètres réactionnels furent étudiés, optimisés et harmonisés. Le type et la concentration du tampon, le pH, la température et les cofacteurs enzymatiques ont été déterminés, car ce sont des paramètres pouvant fortement influencer l'activité enzymatique de la lipase, de l'amylase et des protéases. Les paramètres cinétiques ont également été déterminés et les valeurs trouvées ont été respectivement 2,63, 11,56 et 15,46 $\mu\text{g/mL}$ pour les K_m et de 666,67, 138,89 et de 135,14 RFU/min pour les V_{\max} de la lipase, de l'alpha-amylase et des protéases. Les plages de concentration des enzymes ainsi que le temps de réaction permettant une évaluation précise ont été déterminés : 0,01 à 1 mU et 10 min de réaction cinétique de la lipase, 0,04 mU à 6 mU et 20 min de cinétique pour l'alpha-amylase et de 4 à 24 mU et 40 min de cinétique pour les protéases. Les enzymes pancréatiques des deux principes actifs « Pancreatic Enzymes Concentrate »), PEC A et B, ont été dosées en présence et en absence des excipients de leur formulation respective. La précision et l'exactitude des méthodes chromogéniques ont été évaluées et comparées aux valeurs trouvées par les méthodes USP de la Pharmacopée américaine. Elles ont été trouvées équivalentes pour les deux méthodes et aucune interférence significative n'a été trouvée entre l'enzyme et les divers excipients (désintégrant, lubrifiant, liant, enrobant, etc.). En conclusion, ces méthodes chromogéniques en fluorescence peuvent être considérées adéquates pour l'évaluation de la pancréatine et de la pancrélipase. Leurs avantages pour les analyses de formulations pharmaceutiques justifient l'intérêt à les prendre en considération comme méthodes rapides de dosages enzymatiques.

Mots clés : méthode chromogénique fluorescente, méthode USP, lipase, alpha-amylase, protéases, pancrélipase

PARTIE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LE PANCRÉAS ET L'INSUFFISANCE PANCRÉATIQUE EXOCRINE

1.1 Le pancréas

1.1.1 Historique et structures anatomiques

L'existence du pancréas est connue depuis très longtemps. Le philosophe et médecin grec Hippocrate, 460 à 370 av. J.C., avait déjà pris conscience de l'existence de cet organe, mais ce n'est que plusieurs années plus tard, que le chirurgien et anatomiste grec Herophilos fut le premier à le décrire et l'observer (Howard et Hess, 2002). Né en 335 av. J.C., il était le fondateur de la grande école de médecine d'Alexandrie ainsi que l'un des premiers fondateurs de la méthode scientifique. Ce n'est, par contre, que 400 ans plus tard qu'un nom fut attribué à cet organe par un autre anatomiste grec, Ruphos. Il nomma celui-ci le pancréas qui est étymologiquement dérivé du grec par les termes « pan » et « creas » signifiant respectivement tout et viande (Slack, 1995).

Cet organe est issu de l'endoblaste dans la région du duodénum. C'est au stade de la quatrième semaine que des bourgeonnements se forment sur la face ventrale et dorsale de l'intestin primitif antérieur, sous l'ébauche hépatique (Cotton, 1985; Pearse, Polak et Bloom, 1977). Par la suite, le bourgeon ventral grossit et migre lentement pour fusionner avec celui situé sur la face dorsale, aux environs de la septième semaine de gestation (Norton, 2008). À l'âge adulte, le pancréas humain est une glande oblongue pesant en moyenne de 70 à 150 g et mesurant approximativement 12,5 cm de longueur pour 4 cm de largeur et 2,5 cm d'épaisseur (Tortora et Grabowski, 1996). Il se retrouve derrière l'estomac et le côlon transverse, mais devant l'aorte et les veines caves et rénales. Deux canaux sont responsables du transport des différentes sécrétions du pancréas vers l'intestin grêle : le canal pancréatique (canal de Wirsung) et le canal pancréatique accessoire (canal de Santorini) (Tortora et Grabowski,

1996). Le plus gros des deux canaux, le canal de Wirsung, rejoint le canal cholédoque sur la face interne du duodénum dans sa concavité. L'autre canal est responsable du transport des sels biliaires en provenance de la vésicule biliaire et du foie. L'ampoule hépatopancréatique, ampoule de Vater, est formée à la jonction de ses deux canaux et va s'ouvrir dans la papille duodénale majeure sur la paroi intestinale (Snell, 2007). Le canal de Santorini débouche, dans le duodénum pour former la papille duodénale mineure située à 2,5 cm au-dessus de la papille duodénale majeure.

1.1.2 Fonctions

Après le foie, le pancréas est la deuxième plus grosse glande du corps humain en terme de volume. Le parenchyme pancréatique correspond à l'ensemble des tissus fonctionnels du pancréas. Il est divisé en lobules qui sont créés par des cloisons provenant du tissu conjonctif le recouvrant. Le pancréas comporte deux parties distinctes tant au niveau anatomique que fonctionnel : une partie exocrine et une partie endocrine. La partie endocrine est formée des amas de cellules épithéliales glandulaires nommés îlots de Langerhans. Ces masses cellulaires de formes arrondies sont extrêmement vascularisées et disséminées dans tout le pancréas. Les îlots de Langerhans représentent seulement 1 % des cellules pancréatiques pour un volume correspondant de 1,8 % (Stein et Eisenberg, 1998). La majorité des cellules restantes (plus de 98 %) sont des cellules acineuses qui forment des amas appelés acini et qui constituent la portion exocrine du pancréas correspondant à 82 % de son volume (Brody, 1999). Les acini sont formés de 5 à 8 cellules pyramidales et renferment de nombreux grains de zymogène. Ceux-ci sont relargués par exocytose dans le réseau de canaux qui pénètre à l'intérieur même de l'acinus. Ces canaux d'abord intercalaires deviennent intralobulaires et enfin interlobulaires jusqu'au canal de Wirsung.

1.1.2.1 Fonctions endocrines

La partie endocrine, soit les îlots de Langerhans, est composée de quatre types cellulaires qui sont différenciés par le contenu de leur sécrétion. Les cellules A sécrètent du glucagon

(hormone hyperglycémiant) tandis que les cellules B sécrètent de l'insuline (hormone hypoglycémiant), deux hormones nécessaires pour réguler la glycémie sanguine (Marshall et Bangert, 2005). Les cellules D produisent de la somatostatine qui inhibe la sécrétion des hormones gastro-intestinales et pancréatiques. Enfin, les cellules F, appelées également PP, sécrètent le polypeptide pancréatique dont la fonction est méconnue à ce jour, mais que l'on soupçonne, entre autres, de jouer un rôle dans la régulation de l'apport calorique et de l'appétit ainsi que d'inhiber la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Hameed, Dhillo et Bloom, 2009).

1.1.2.2 Fonctions exocrines

La partie exocrine du pancréas a pour fonction de sécréter, par le canal de Wirsung, du suc pancréatique dans le duodénum lors de la digestion du bol alimentaire. Le suc pancréatique est un liquide clair et incolore formé d'eau, de quelques sels, de bicarbonate de calcium (environ 150 mEq/L) et également de proenzymes et d'enzymes digestives (Tableau 1) biosynthétisées par les cellules acineuses (Ganong, 2005). Environ 1,5 à 3,0 L de ce fluide est produit chaque jour par le pancréas, bien au dessus de la quantité nécessaire pour une digestion adéquate. La teneur en bicarbonate de sodium, produite par les cellules centroacineuses, rend ce fluide légèrement alcalin, soit d'un pH de 7,1 à 8,2 (Tortora et Grabowski, 1996). Ceci permet de tamponner l'acidité du suc gastrique du chyme stomacal pour ainsi interrompre l'activité de la pepsine, mais surtout pour empêcher la dénaturation des enzymes digestives. Le suc pancréatique contient des enzymes de quatre classes distinctes, divisées selon ce qu'elles digèrent : amylolytiques pour la digestion des glucides, protéolytiques pour l'hydrolyse des protéines, lipolytiques pour le clivage des triglycérides en acide gras (lipides) et également nucléolytiques pour la digestion des acides nucléiques. L'amylase, la lipase et les nucléases sont toutes sécrétées sous forme active tandis que les protéases pancréatiques sont sécrétées sous forme de proenzymes inactives (trypsinogène, chymotrypsinogène, procarboxypeptidase, etc.) pour éviter l'autodigestion du pancréas par celles-ci (Eckert *et al.*, 1999). La transformation en forme active de ces enzymes sera réalisée par différentes enzymes, dont l'entérokinase, une enzyme produite par la muqueuse intestinale lors du passage du bol alimentaire (Brody, 1999).

Tableau 1.1 : Fonction de certaines enzymes digestives sécrétées par le système digestif des mammifères (d'après Eckert *et al.* 1999)

Organe	Enzyme	Lieu d'action	Substrat	Produits obtenus
Glandes salivaires	Alpha-amylase salivaire	Cavité orale	Amidon	Disaccharides, dextrines
Estomac	Lipase gastrique	Estomac	Triglycérides	Monoglycérides, acides gras, glycérol
	Pepsinogène (pepsine)	Estomac	Protéines	Longs peptides
Pancréas	Aminopeptidases	Intestin grêle	Longs peptides	Oligopeptides, acides aminés
	Alpha-amylase	Intestin grêle	Amidon, dextrines	Maltose, Maltriose, dextrines
	Carboxypeptidases	Intestin grêle	Longs peptides	Oligopeptides, acides aminés
	Chymotrypsinogène (chymotrypsine)	Intestin grêle	Protéines	Longs peptides
	Élastase	Intestin grêle	Élastine	Longs peptides
	Lipase	Intestin grêle	Triglycérides	Monoglycérides, acides gras, glycérol
	Nucléases	Intestin grêle	Acides nucléiques	Nucléotides
	Trypsinogène (trypsine)	Intestin grêle	Protéines	Longs peptides
Intestin grêle	Disaccharidases	Intestin grêle	Disaccharides	Monosaccharides
	Entérokinase	Intestin grêle *	Trypsinogène	Trypsine
	Peptidases	Intestin grêle *	Oligopeptides	Acides aminés
	Nucléosidases	Intestin grêle *	Nucléosides	Nucléosides, acide phosphorique
	Nucléotidase	Intestin grêle *	Nucléotides	Sucres, purines, pyrimidines

* intracellulaire

1.2 L'insuffisance pancréatique exocrine

Vu l'importance des nombreux rôles joués par les hormones et les enzymes sécrétées par le pancréas, les maladies pancréatiques sont nombreuses et parfois fatales. Par contre, plusieurs n'ont aucun effet sur l'action exocrine du pancréas. Par exemple, le diabète, sous toutes ses formes, est causé par une dysfonction endocrine du pancréas, soit à l'incapacité du pancréas à produire suffisamment d'insuline. Cette insuffisance peut, entre autres, être due à des facteurs génétiques ou encore à une maladie auto-immune. Par contre, plusieurs maladies affectant le pancréas provoquent une insuffisance pancréatique exocrine (IPE).

1.2.1 Description et symptômes

Le bon fonctionnement du corps humain nécessite une absorption adéquate des nutriments. Ceci requiert, pour chaque enzyme, une activité enzymatique suffisante dans la lumière du duodénum lors du passage du bol alimentaire. L'insuffisance pancréatique peut impliquer un déficit de production d'enzymes pancréatiques par le pancréas. Ceci entraîne une mauvaise digestion des aliments et des vitamines liposolubles, mais peut rarement entraîner la mort. Pour être considéré comme souffrant d'une IPE significative, il faut avoir perdu plus de 90 % du parenchyme (tissu fonctionnel) pancréatique. Généralement, l'insuffisance en lipase pancréatique entraîne de plus grandes conséquences chez le patient (Layzer et Keller, 1999). En effet, cette enzyme est plus sensible à l'acidité et à l'action dénaturante des enzymes protéolytiques, ce qui lui permet un temps de survie plus court dans la lumière du duodénum. Une insuffisance en protéases pancréatiques est moins importante, car ce manque en protéases est minimalement contré par la pepsine contenue dans le fluide gastrique et les enzymes protéolytiques sécrétées par le petit intestin. Elle demeure tout de même problématique. Le manque d'amylase pancréatique peut également être légèrement contré par l'existence d'amylase sécrétée par les glandes salivaires et celle des nombreuses disaccharidases produites par le petit intestin qui aident à la digestion des carbohydrates.

Plusieurs tests servent à dépister et étudier l'IPE. L'évaluation du contenu en gras lors de l'analyse des matières fécales d'un patient est un des tests généralement appliqués (Best, Taylor et Brobeck, 1979). De plus, des prélèvements d'échantillons de fluide gastrique, de sécrétions duodénales et pancréatiques peuvent également être analysés à la suite d'une injection de sécrétine. Ce test est considéré, de nos jours, comme étant le plus sensible malgré son caractère invasif pour le patient (Frossard et Nicolet, 2007). Ces échantillons prélevés sont, par la suite, analysés selon leur volume, leur pH, leur contenu en bicarbonate de calcium et leurs activités enzymatiques. Selon les résultats obtenus pour ces différentes analyses, la sévérité et la cause de l'IPE peuvent être déterminées (Best, Taylor et Brobeck, 1979). Parfois, des analyses sanguines peuvent également être pratiquées pour dépister cette déficience.

Les conséquences nutritionnelles de l'IPE sont nombreuses, mais mal documentées en raison de plusieurs paramètres. En effet, cette maladie est souvent associée à d'autres affections, dont l'alcoolisme et parfois le diabète, qui entraînent déjà par elles-mêmes des conséquences nutritionnelles. Par contre, plusieurs signes distinctifs sont associés à l'IPE, dont l'apparition d'une stéatorrhée, mais également, à un moindre niveau, une créatorrhée et une azotorrhée. La stéatorrhée est considérée comme étant une augmentation, d'un minimum de 7 g, de la quantité des graisses retrouvées dans les selles pour une période de 24 h. Dans certains cas critiques de stéatorrhée sévère, cette augmentation peut même aller jusqu'à 50 g dans le même délai. La créatorrhée est une augmentation, d'un poids minimal de 2 g, des fibres musculaires non dégradées retrouvées dans les selles (Jian, 2001). L'azotorrhée correspond à une augmentation de matières organiques nitrogénées dans les selles. Normalement, 1 à 3 g de l'azote ingéré se retrouvent dans les fèces ce qui représente 8 % du total. En cas d'IPE, ce pourcentage tend à augmenter et peut parfois atteindre jusqu'à 50 %. L'apparition de tels phénomènes est engendrée par une sécrétion de lipase et de trypsine inférieure à 10 % de la sécrétion normale (DiMagno, Go et Summerskill, 1973). L'apparition de la stéatorrhée est généralement plus observée et représente un problème clinique plus important vu la tendance de la lipase à décroître plus rapidement que la trypsine (Go, 1993).

La malabsorption des lipides à la suite d'une IPE a longtemps fait l'objet de nombreuses recherches vu que les conséquences d'une perte d'activité lipolytique sont plus nombreuses et importantes. Par contre, depuis quelques années, une emphase particulière a été mise sur la maldigestion des glucides. Il a été montré que 15 à 50 % des glucides associés à la farine de riz n'étaient pas digérés par les patients souffrants d'IPE (Levitt, Hirsh et Fetzer, 1987). Ces résultats ont pu être obtenus grâce à l'évolution des techniques de recherche et à l'apparition des tests respiratoires (Kerlin *et al.*, 1984). En effet, ceux-ci permettent de quantifier l'amidon digéré tout au long de son passage dans l'intestin grêle. Les premiers tests utilisés étaient basés sur l'excrétion respiratoire d' H_2 , mais par la suite, le test respiratoire mesurant l'excrétion de CO_2 a permis de faire d'autres avancées dans ce domaine. En effet, l'existence d'une corrélation entre le débit d'amylase du duodénum et la digestion de l'amidon a ainsi pu être démontrée et caractérisée selon une courbe de saturation (Hiele *et al.*, 1989). Cette corrélation a montré que la prise d'extraits pancréatiques corrige la malabsorption d'amidon et rétablit son niveau d'absorption aux valeurs normales attendues chez une personne saine (Nordgaard, Rumessen et Gudmand-Hoyer, 1992). Plus de la moitié des patients atteints d'une IPE causée par une pancréatite chronique ou tumorale souffrent de malabsorption des carbohydrates. Leur quantité non absorbée par rapport à l'ingestion totale est normalement de 1 % en moyenne, mais chez les patients présentant une IPE, ce pourcentage augmente à 11 %. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre la quantité de carbohydrates malabsorbés et la masse des selles.

D'autres conséquences nutritionnelles sont observées chez les patients atteints d'IPE entraînant une stéatorrhée. En effet, ils sont susceptibles de développer une carence en vitamines liposolubles A, D, E et K (Braustein, 1961). Certains travaux ont montré que la prévalence d'une carence en vitamine A et E était respectivement de 38 % et de 83 % chez les personnes atteintes de stéatorrhée (Marotta *et al.*, 1994). Les conséquences associées à une baisse de l'absorption de ces vitamines sont importantes : perte de vision nocturne (vitamine A), faible densité corticale osseuse (vitamine D) et augmentation du temps de prothrombine (vitamine E) (Dutta *et al.*, 1982).

1.2.2 Causes

Plusieurs affections touchant le pancréas peuvent créer une insuffisance pancréatite exocrine. Le tableau 2 montre l'étiologie.

Tableau 1.2 : Affections causant une insuffisance pancréatite exocrine (adapté de Frossard et Nicolet, 2007)

1. Pancréatite chronique
2. Insuffisance sans pancréatite chronique
Mucoviscidose
Tumeur du pancréas
Résection du pancréas
Atrophie sénile
3. Insuffisance secondaire
Maladie de l'intestin grêle
Gastrinome
Billroth II (gastrectomie)
Déficience en entérokinase

1.2.2.1 Pancréatite chronique

La pancréatite chronique est une affection qui se caractérise par une destruction progressive du parenchyme pancréatique, l'apparition d'une fibrose et de calculs canaux calcifiés résultant de dépôts protéiques, et également d'altérations des canaux pancréatiques résultant d'une alternance chronique entre dilatation et sténose (Frossard et Nicolet, 2007). Cette maladie affecte l'entièreté de la fonction pancréatique. En effet, le parenchyme endocrine, quoique plus longtemps préservé que le parenchyme exocrine, est également sensible à cette destruction (Sarles et Sahel, 1973). La pancréatite chronique est la cause

majeure de l'insuffisance pancréatique exocrine et cette affection est elle-même engendrée par plusieurs processus physiopathologiques. En effet, les causes de la pancréatite chronique peuvent être séparées en six catégories : toxique métabolique (T), idiopathique (I), génétique (G), auto-immune (A), pancréatite aiguë récurrente (R) et obstructive (O). L'acronyme TIGAR-O est utilisé pour simplifier celles-ci (Etemad et Whitcomb, 2001).

De nos jours, environ 70 % des pancréatites chroniques sont dues à l'alcoolisme chronique. En effet, il existe une relation linéaire entre la consommation d'alcool et la survenue d'une pancréatite chronique. Les symptômes aigus reliés à la pancréatite chronique alcoolique durent en moyenne de 10 à 15 ans. En premier lieu, ce sont surtout manifestations douloureuses, telles la pancréatite aiguë ou des pseudokystes, qui peuvent entraîner la nécessité d'interventions chirurgicales. Par la suite, d'autres symptômes plus importants peuvent survenir, tels une compression de la voie biliaire et du duodénum (Ammann *et al.*, 1984), avant que les complications dégénératives surviennent. L'insuffisance pancréatique exocrine et endocrine ainsi que les calcifications pancréatiques en sont quelques exemples. Il faut en général 4 ans pour que l'IPE apparaisse à la suite d'un diagnostic de pancréatite chronique alcoolique; celle-ci survient en général parallèlement au diabète et aux calcifications. En effet, il a été démontré qu'une corrélation existait entre la sécrétion d'insuline et les réserves fonctionnelles sécrétoires de la lipase (Cavallini *et al.*, 1992).

Les autres pancréatites chroniques évoluent de façon plus lente, environ de 5 à 8 années supplémentaires (Dancour *et al.*, 1993). En effet, l'IPE ne survient que 8 à 10 ans suivant le diagnostic de pancréatite chronique non alcoolique. De plus, 39 % des diagnostics ne sont posés qu'après l'apparition de l'IPE, contrairement à la pancréatite alcoolique (Ammann *et al.*, 1987). Plusieurs causes sont associées à la pancréatite chronique en dehors de l'alcoolisme. En effet, il a été montré que la prise de tabac augmentait de 7 à 17 fois le risque de pancréatite chronique et de plus, que des mutations sur les gènes de la mucoviscidose ou du trypsinogène cationique augmentaient la sensibilité d'un individu envers des agents toxiques/métaboliques affectant le pancréas (Frossard et Nicolet, 2007). D'autres mutations génétiques, telles celles affectant le gène « Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1 » (SPINK-1), sont responsables de l'apparition de pancréatite. Certaines

maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn) et auto-immunes (syndrome de Sjogren) peuvent également en être la cause (Etemad et Whitcomb, 2001).

La douleur n'est pas associée au processus de l'IPE, mais plutôt à celui de la pancréatite chronique. Par contre, il existe une relation linéaire entre la douleur et l'IPE. Les patients souffrants de pancréatite chronique et ressentant encore de la douleur associée à celle-ci sont moins sujets à l'IPE sévère par rapport à ceux ne ressentant plus aucune douleur (40 % versus 55 %) (Lankisch *et al.*, 1993). Une autre corrélation a été faite entre le degré de l'IPE, soit légère, modéré ou sévère, et la présence de calcifications pancréatiques et de stéatorrhée (Lankisch *et al.*, 1986).

1.2.2.2 Mucoviscidose

La fibrose kystique, appelée également mucoviscidose, est une maladie génétique héréditaire autosomale récessive. Environ une personne sur 2000-3000 de descendance européenne en souffre (Büchler *et al.*, 2004). Elle affecte les épithéliums glandulaires modifiant ainsi le bon fonctionnement du corps et entraînant la mort. Cette maladie résulte de la mutation du gène régulateur de la conductance transmembranaire (CFTR) et plus de 300 mutations ont été recensées (Büchler *et al.*, 2004). Ces mutations vont entraîner une altération de la protéine codée par ce gène, la CFTR, qui est en fait un canal ionique transmembranaire dont la fonction est de réguler le transport de l'ion chlorure selon un gradient électrochimique, c'est-à-dire selon la différence entre le potentiel de la membrane et le potentiel d'équilibre de l'ion. Son dysfonctionnement engendre un déficit de l'ion chlorure extracellulaire responsable de l'hydratation du mucus et des sécrétions épithéliales, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité de ces éléments. Ce mucus visqueux obstrue les canaux des voies respiratoires et digestives, soient les canaux pancréatiques, biliaires et intestinaux (Kierszenbaum, 2006). La maladie touche ainsi de nombreux organes, mais ce sont les dommages aux voies respiratoires qui sont prédominants et qui entraînent la mortalité chez l'homme. De plus, l'IPE est également une manifestation importante et nocive associée à la fibrose kystique, car l'obstruction des canaux pancréatiques par le mucus entraîne une

augmentation de l'activité pancréatique à l'intérieur du pancréas menant à une autodigestion de celui-ci et par la suite, à une pancréatite (Büchler *et al.*, 2004). En effet, la mucoviscidose est la première cause d'IPE pour les patients de moins de trente ans quoique de 10 à 15 % d'entre eux possèdent une fonction pancréatique suffisante (Park et Grand, 1981). En plus des conséquences aux niveaux nutritionnelles, ce déficit pancréatique peut également contribuer à augmenter les troubles respiratoires des patients (Gaskin, Durie et Lee, 1984).

Bien que cette maladie évolue de manière chronique sur de nombreuses années, elle s'exprime souvent très tôt, mais peut, dans certains cas, n'être diagnostiquée que tardivement, à l'âge adulte. L'IPE est détectable au niveau prénatal, car la présence d'enzymes pancréatiques dans le liquide amniotique est déjà inférieure à celle attendue (Carrere *et al.*, 1992). À la naissance, il existe dès lors une obstruction des canaux pancréatiques et également un déficit dans le développement des cellules acineuses (Imrie, Fagan et Sturgess, 1979). Par contre, le taux de sécrétion pancréatique de 50 % des enfants souffrant de la mucoviscidose, sera normal pour les quatre premiers mois de vie (Waters *et al.*, 1990), mais après une année, plus de 90 % souffriront déjà d'une IPE, soit une perte de plus de 90 % des fonctions exocrine du pancréas (FitzSimmons, 1993). De ce nombre, 30 % à 50 % auront également une insuffisance endocrine (Park et Grand, 1981).

1.2.2.2 Autres conditions pathologiques

D'autres facteurs peuvent entraîner l'apparition d'une insuffisance pancréatique exocrine, dont les actes chirurgicaux. En effet, l'exérèse pancréatique (résection partielle ou complète du tissu pancréatique) peut mener éventuellement à une IPE (Lévy, 2002). Des chirurgies telles la duodéno pancréatectomie céphalique et l'anastomose pancréaticogastrique montrent une augmentation de la concentration en graisse des selles chez 94 % des malades (Lemaire *et al.*, 2000). En effet, plus de deux tiers des patients lors d'une duodéno pancréatectomie céphalique doivent prendre par la suite un supplément d'extrait pancréatique pour contrer l'IPE engendrée (Vayre, 2003). Les chirurgies gastriques telle la gastrectomie Billroth II peuvent également entraîner des IPE sévères chez les patients, car les

taux de sécrétion pancréatique peuvent varier de 75 à 90 % chez les patients ayant subi une gastrectomie totale (Friess *et al.*, 1996). La diminution de la stimulation d'origine gastrique de la sécrétion pancréatique et l'asynchronisme sont quelques exemples des mécanismes qui peuvent engendrer cette variation (Lévy, 2002).

Même non causée par la mucoviscidose, une obstruction des canaux pancréatiques, canal de Wirsung ou autres, engendre une IPE. Une relation quantitative a été établie entre la longueur de canal obstruée et les capacités sécrétoires du pancréas. L'insuffisance pancréatique n'est observée que si plus de 40 % de la longueur du canal est bloquée (Dimagno, Malagelada et Go, 1979). Ces obstructions sont souvent observées lors de cancer du pancréas. En effet, 75 % des malades ayant un adénocarcinome ainsi que 12 à 47 % des patients atteints de tumeurs mucineuses et intracanalaires souffrent d'IPE (Loftus Jr *et al.*, 1996; Perez, Newcomer et Moertel, 1983).

Le syndrome de Zollinger-Ellison peut également engendrer une IPE. Cette affection est caractérisée par une sécrétion accrue de gastrine par le pancréas menant à une augmentation de la sécrétion gastrique acide. Ceci entraîne une diminution du pH duodéal provoquant ainsi la dénaturation des enzymes pancréatiques (Go *et al.*, 1970). Les maladies affectant l'intestin grêle telles la maladie de Crohn, la maladie de Whipple, la tuberculose et la résection de l'intestin grêle peuvent également mener à des insuffisances secondaires (Frossard et Nicolet, 2007).

1.2.3 Traitements

Plusieurs symptômes peuvent devoir être traités lors de l'IPE, car elle est généralement associée à d'autres maladies telles la pancréatite chronique qui engendre des traitements contre la douleur et l'insuffisance elle-même. Le degré de douleur est différent pour chaque patient. En effet, environ 15 % ne présentent aucun symptôme douloureux (Frossard et Nicolet, 2007). Le traitement médicamenteux composé d'acétaminophène

(Tylenol®) ou d'acide acétylsalicylique (Aspirine®) est prescrit dans le cas de douleurs légères, mais une chirurgie d'exérèse peut s'avérer nécessaire lors de douleurs intenses.

Lors de pancréatite chronique alcoolique, un arrêt de la consommation d'alcool peut entraîner une amélioration de la fonction exocrine du pancréas (Begley et Roberts-Thomson, 1985) ou un ralentissement de la détérioration (Gullo, Barbara et Labo, 1988). Les dérivations Wirsung digestives consistent à implanter chirurgicalement un canal artificiel à la hauteur du blocage qui empêche l'écoulement du fluide pancréatique et permet ainsi de rétablir le passage du liquide. Ces dérivations permettent une stabilisation ou un ralentissement de l'évolution de la maladie (Nealon *et al.*, 1993). L'ensemble de ces travaux suggère que la fonction pancréatique exocrine peut être au mieux améliorée, au pire conservée, soit par l'abstinence vis-à-vis de l'alcool, soit par la dérivation Wirsung jéjunale.

Par contre, l'insuffisance elle-même doit être contrée en donnant aux malades un produit pharmaceutique composé d'extraits pancréatiques. Depuis plusieurs décennies, ce traitement fournit un apport supplémentaire en enzymes pancréatiques aux patients et leur permet d'obtenir ainsi une absorption suffisante des nutriments et vitamines (Roberts, 1989). De convenance, un apport en lipase adéquat d'environ 25 000 à 40 000 unités enzymatique (U) par repas (Layer *et al.*, 1992) est nécessaire pour contrer la stéatorrhée. Dans le cas des protéases, il est considéré que 10 000 unités de trypsine peuvent contrer l'azotorrhée (Lankisch *et al.*, 1986). En fait, la posologie finale dépend non seulement du degré de l'insuffisance pancréatique, mais également de la quantité d'aliments pris par le patient et de leur teneur en lipides et protéines.

Les formulations pharmaceutiques à base d'extraits pancréatiques, généralement issus de pancréas porcine (DiMagno, 1982), doivent être aptes à résister à l'environnement gastrique pour pouvoir se répandre promptement dans le duodénum en gardant des hauts taux d'activité enzymatique (Aloulou *et al.*, 2008). La forme galénique de ce médicament est donc un facteur important, car les enzymes pancréatiques sont sensibles à l'acidité, particulièrement la lipase. En effet, une formulation à protection gastro-entérique est

préférentiellement choisie due à son habileté à libérer le principe actif seulement dans un milieu dont le pH est supérieur à 5 (Frossard et Nicolet, 2007). Par contre, l'utilisation d'un antiacide, bloqueur de pompe à proton (Losec®, Prevacid®, Pantoloc®), peut être également recommandée pour prévenir la dégradation du contenu enzymatique s'il n'y a pas d'enrobage entérique dans la formulation (Regan, Malagelada et DiMagno, 1977). De plus, la prise de ce supplément devrait être faite quelques instants après l'ingestion des premiers aliments, car le pouvoir tamponnant des aliments peut aider celui-ci à résister au passage gastrique (Sarner, 2003). Cependant, la digestion des lipides ne peut être complètement normalisée chez la plupart des patients en utilisant cette thérapie (Layer et Keller, 1999). Entre autres, chez les malades souffrants d'IPE sévère (sécrétion très faible ou nulle), un apport exogène d'extraits pancréatiques ne rétablit qu'une concentration duodénale égale à 5 % de la normale (Go, 1993).

CHAPITRE II

LES ENZYMES PANCRÉATIQUES

2.1 Les enzymes – aspects généraux

La survie du corps humain nécessite l'implication d'une multitude de réactions chimiques qui se déroulent dans un environnement où les conditions ne leur permettent pas nécessairement de se dérouler à une vitesse adéquate. Les enzymes, catalyseurs biologiques, permettent aux diverses réactions de se produire adéquatement tout en préservant l'environnement nécessaire. Elles créent une accélération de la fréquence de collisions, un abaissement de l'énergie d'activation et/ou une orientation adéquate chez les molécules devant entrer en collision durant les réactions. Ces phénomènes se produisent sans changer l'équilibre, mais ils permettent d'augmenter la vitesse de réaction selon un facteur pouvant aller jusqu'à 10^{12} (Price et Stevens, 1999).

Les enzymes sont généralement reconnues pour être spécifiques envers leurs substrats et les réactions qu'elles catalysent. Cette spécificité de l'enzyme pour le substrat est engendrée par une complémentarité structurale, une compatibilité de charge ainsi que par des propriétés hydrophobes/hydrophiles (Voet et Voet, 2005). Certaines enzymes présentent une haute spécificité ou une spécificité absolue (il n'existe qu'un seul substrat pour cette enzyme, ex. : uréase). D'autres enzymes présentent une certaine spécificité (relative de groupe, ex. : lipase). Un certain niveau de stéréospécificité et de régiosélectivité peut également être retrouvé chez certaines enzymes. Cette spécificité a d'abord été présentée par le modèle « clé-serrure » décrit par Emil Fischer en 1894 pour expliquer le fonctionnement d'une enzyme (Murray *et al.*, 2002). Ce modèle suggérait qu'il existait une complémentarité spatiale unique entre le substrat et l'enzyme qui pouvait être représentée comme celle d'une clé et d'une serrure. Cette théorie, tout en expliquant la spécificité de l'enzyme, n'était pas en mesure d'expliquer le changement d'énergie d'activation. Le modèle de « conformation

induite » suggéré en 1958 par Daniel Koshland parvenait à expliquer le fonctionnement des enzymes (Davis et Davis, 2003). En effet, ce modèle concédait à l'enzyme une structure flexible qui confère au site actif la propriété de pouvoir se remodeler grâce aux interactions avec le substrat et ainsi permettre son activité catalytique.

2.1.1 Définition, structure et fonctions

Les enzymes sont généralement des protéines globulaires d'une taille allant de 62 à 2500 acides aminés (Price et Stevens, 1999). Elles peuvent être composées d'une seule entité protéique, apoenzyme, mais également de plusieurs parties non protéiques organiques (ex. : vitamine) ou inorganiques (ex. : ion métallique) qui sont appelées cofacteurs. Les cofacteurs sont donc des molécules liés d'une façon covalente ou non à l'enzyme. Ces dernières sont nécessaires à l'enzyme pour accomplir son activité catalytique. Le regroupement de ses deux portions est appelé holoenzyme (Copeland, 2000; Tortora et Grabowski, 1996). Généralement, les molécules liées de façon non covalente sont appelés des coenzymes (ex. : NAD, ATP) tandis que les groupements liés d'une façon covalente sont appelés des groupements prosthétiques (ex. : hème, FAD) (Sauke, Metzler et Metzler, 1977). Par contre, les groupements inorganiques sont également souvent appelés simplement cofacteurs.

La fonction enzymatique de l'enzyme est déterminée par sa structure tridimensionnelle. La conformation spatiale de l'enzyme crée un site particulier où le substrat va venir se lier grâce à une ou plusieurs liaisons covalentes, ou non, et par la suite être transformé. Cet endroit composé de 3 à 4 acides aminés est le site actif. Il permet de lier un substrat spécifique à l'enzyme dû à la reconnaissance de complémentarité de forme et de produire l'activité catalytique (Garrett et Grisham, 2000). Les fonctions des enzymes sont nombreuses et variées chez les organismes vivants. Par exemple, la régulation cellulaire ainsi que la transduction des signaux impliquent des enzymes, généralement des phosphatases et des kinases, qui sont indispensables. D'autres exemples de fonctions biologiques nécessitant la contribution des enzymes sont la mobilité cellulaire, la production d'une contraction musculaire, l'élaboration du cytosquelette et le transport transmembranaire. Plusieurs

enzymes travaillent également de concert pour créer des cascades de voies métaboliques (Garrett et Grisham, 2000). Les enzymes, dans les processus métaboliques, déterminent la présence d'une réaction par rapport à une autre, la régulation et la capacité de la réaction à évoluer à une vitesse adéquate pour le bon fonctionnement de la cellule. Cinq niveaux de contrôle permettent à l'organisme de réguler l'activité de ces catalyseurs biologiques : leur production, leur compartimentation, les effets des inhibiteurs et des activateurs, leurs modifications post traductionnelles et leur activation par changement d'environnement (Stenesh, 1998).

2.1.2 Réactions catalytiques

Le pouvoir catalytique des enzymes s'explique par le fait qu'elles permettent d'abaisser le niveau d'énergie d'activation d'une réaction chimique et ainsi d'augmenter sa vitesse. Chaque molécule possède une énergie libre de Gibbs (G) qui lui est propre. Lors d'une réaction, l'enthalpie du substrat n'est pas la même que celle du produit et cette différence d'énergie est la variation d'énergie libre, ΔG (Stenesh, 1998). La transformation du substrat en produit passe par des états intermédiaires de transition, et la différence d'enthalpie entre ces états et l'état initial de substrat est alors appelée énergie d'activation (ΔG^\ddagger) (Bugg, 1997). L'enzyme peut agir de plusieurs façons pour diminuer celle-ci. Premièrement, elle peut créer un environnement dans lequel l'état transitionnel est stabilisé par modification de la conformation spatiale ou encore en posséder une distribution de charge opposée. Deuxièmement, elle réagit temporairement avec le substrat pour former un complexe intermédiaire. Enfin, elle peut réduire l'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) en conférant aux substrats l'orientation adéquate pour favoriser la réaction (Tortora et Grabowski, 1996).

Dans une réaction sans enzyme, une grande quantité d'énergie est requise par le substrat pour atteindre l'état transitoire avant de se transformer en produit (Fig. 2.1). En passant par un complexe enzyme-substrat, l'énergie nécessaire pour atteindre cet état est moindre et donc, l'énergie nécessaire pour la formation du produit est abaissée. La réaction

enzymatique ne permet pas de changer l'équilibre de la réaction et la direction de la réaction sera donc la même, mais celle-ci se déroulera à une vitesse accrue.

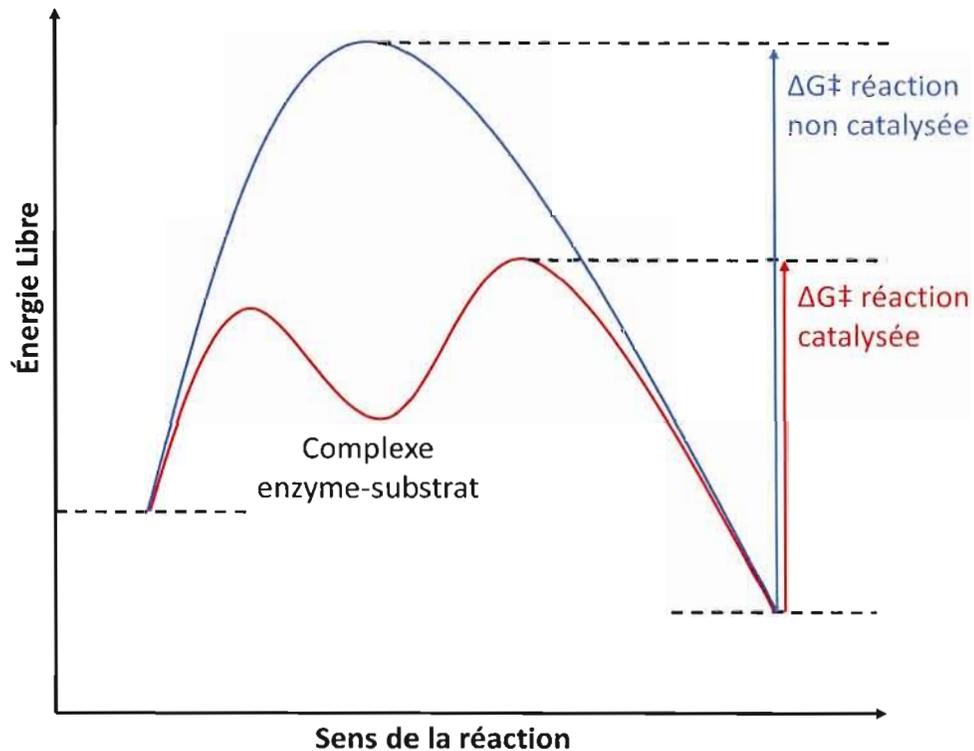


Figure 2.1 : Représentation schématisée des énergies libres d'une réaction sans et avec catalyse enzymatique

2.1.3 Aspects de la cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques catalysées par les enzymes en étudiant leur vitesse. En partant des enzymes isolées et en allant vers les systèmes métaboliques organisés et intégrés, la cinétique enzymatique permet de décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes mis en place pour leur régulation.

2.1.3.1 Équation de Michaelis-Menten

En 1913, le chimiste allemand Leonor Michaelis ainsi que la canadienne Maud Leonora Menten proposèrent une théorie de la cinétique enzymatique encore utilisée de nos jours, la cinétique de Michaelis-Menten (Vignais, 2001). Ce modèle est développé autour du principe qu'il existe deux stades à une réaction catalysée par une enzyme (Fig. 2.2) lorsqu'il n'y a qu'un seul substrat (Champe, Harvey et Ferrier, 2008). Le premier correspond à la réaction rapide et réversible de la formation du complexe enzyme-substrat (ES). Le second correspond à la réaction lente et quasi irréversible de l'action catalytique de l'enzyme et du relâchement du produit. Lors de cette réaction enzymatique, les constantes k_1 (formation du complexe), k_{-1} (dissociation du complexe), k_2 (formation du produit) correspondent chacune à la constante de vitesse de leur étape réactionnelle associée.

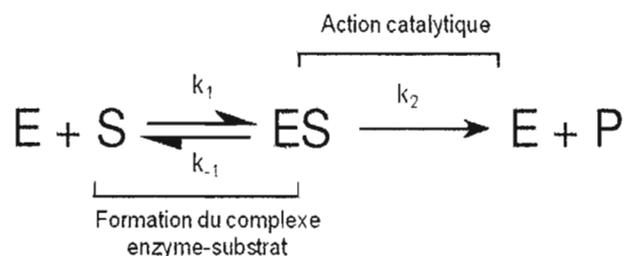


Figure 2.2 : Représentation des étapes réactionnelles d'une réaction catalytique enzymatique avec un seul substrat

L'équipe Michaelis-Menten a alors proposé une équation montrant que la vitesse de réaction était dépendante de la position de l'équilibre et de la constante de vitesse k_2 correspondant à l'étape limitante de la réaction (Leskovac, 2003). Elle est mathématiquement simplifiée et connue comme :

1) Équation de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Plusieurs constantes ont été développées à partir de cette équation, dont K_m et V_{max} . La constante de Michaelis, K_m , est définie comme la concentration de substrat qui correspond à une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maximale. Elle est exprimée en unités de concentration, généralement en millimolaire (mM), et correspond à l'affinité de l'enzyme pour le substrat (Eckert *et al.*, 1999). De plus, lorsque la vitesse de formation du produit est très inférieure à la vitesse de dissociation du complexe ($k_2 \ll k_{-1}$), le K_m correspond également à la constante de dissociation réversible du complexe enzyme-substrat (ES), mais ce phénomène est relativement rare (Branden *et al.*, 1996).

La constante V_{max} correspond à la vitesse maximale lorsque la concentration de substrat est d'une grandeur infinie, en excès (Lodish, 1997). À ce point, la vitesse ne dépend donc plus de la concentration de substrat. Selon la nomenclature de l'«International Union of Pure and Applied Chemistry» (IUPAC), l'utilisation du terme V_{max} est reconnue et adéquate, mais l'emploi de V (vitesse limite) est mathématiquement plus approprié. En effet, V_{max} correspond à la vitesse pour une concentration infinie de substrat. Cette concentration infinie ne pouvant être qu'approchée et non atteinte, aucun maximum mathématique n'existe. L'utilisation de ce terme est donc non appropriée, mais consensuellement utilisée. Expérimentalement, cette vitesse est approchée par des mesures analytiques en présence de concentration de substrat très supérieure à la valeur de K_m . Cette constante est exprimée en unité de produit formé sur le temps. (ex. : $\mu\text{moles}/\text{min}$) et dépend de la concentration d'enzyme. Cependant, si l'enzyme est pure, cette constante peut être rapporté sur la quantité d'enzyme et nous fournir l'activité spécifique qui ne dépend pas de la concentration d'enzyme (ex. : $\text{mM}/(\text{min}\cdot\mu\text{g})$) (Gilbert, 2000)

Ces constantes peuvent être facilement représentées et extraites de l'analyse de l'hyperbole obtenue lors de l'évaluation de la vitesse en fonction de la concentration de substrat ($[S]$). Cette courbe démontre la relation existant entre le substrat (S) et la vitesse de la réaction (Fig. 2.3). En effet, à faible concentration de S, l'enzyme (E) est en équilibre entre sa forme libre et sa forme complexée. En augmentant la quantité de S, la concentration de ES tend à augmenter et à déplacer l'équilibre de la réaction vers la droite. Donc, à une très haute teneur en substrat, E est complètement sous forme ES et est dite saturée. Cette hyperbole est

donc nommée courbe de saturation. L'asymptote de la courbe de saturation correspond au V_{\max} , la vitesse maximale de la réaction enzymatique, et donc, le K_m peut être déterminé pour une valeur représentant la moitié du V_{\max} . Cette dernière valeur est importante, car elle permet d'évaluer la quantité de substrat nécessaire pour quantifier la vitesse de réaction enzymatique expérimentalement. Cette constante est également une caractéristique spécifique enzyme-substrat, car chaque enzyme possède un K_m différent selon le substrat. Elle indique le degré de la force de liaison qui existe entre un substrat spécifique et l'enzyme. C'est la constante d'affinité qui correspond à la valeur de K_m^{-1} .

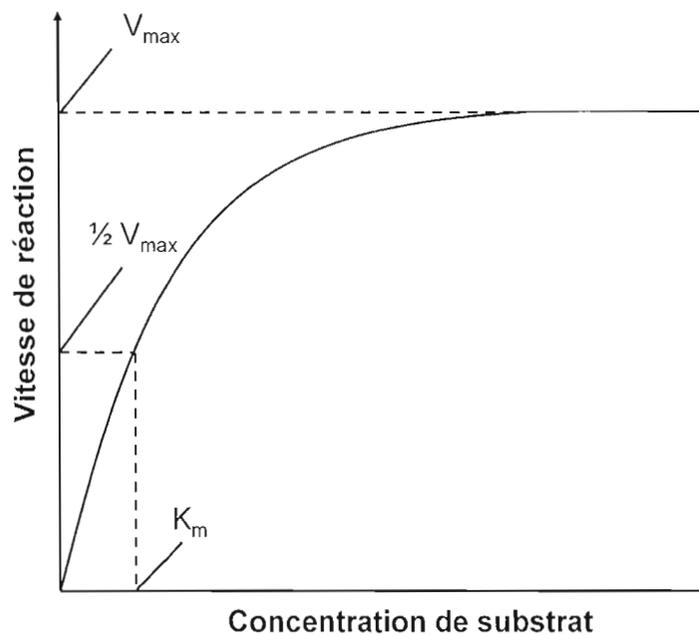


Figure 2.3 : Représentation graphique de la courbe de saturation de Michaelis -Menten

Une autre constante importante en cinétique est la constante catalytique, k_{cat} , ou nombre « turnover », qui correspond au nombre de molécules de substrat transformées par seconde pour un seul site actif d'une enzyme en condition de saturation par le substrat (Karp et Wissocq, 2004). Cette constante est donc donnée en sec^{-1} . Lors d'une réaction michaelienne, c'est-à-dire une réaction où il y a un seul complexe enzyme-substrat formé,

elle correspond à la constante k_2 de formation de produit. Par contre, le substrat est rarement saturant dans les conditions physiologiques, donc la constante de spécificité est également importante en enzymologie pour évaluer l'efficacité d'une enzyme. Elle correspond au rapport k_{cat}/K_m et de façon courante V_{max}/K_m (Bolsover, 2004). Elle est très utilisée pour comparer les différentes enzymes ou entre divers substrats pour une enzyme, vu qu'elle tient compte autant de l'affinité pour le substrat (K_m^{-1}) que de la capacité catalytique de l'enzyme.

2.1.3.2 Équation de Lineweaver-Burk

La courbe de saturation étant non linéaire, il peut être difficile d'évaluer précisément les valeurs de K_m et V_{max} . Plusieurs chercheurs ont donc développé différents traitements mathématiques pour rendre linéaire l'équation de Michaelis-Menten. Les plus connues sont le diagramme de Eadie-Hofstee, le graphique de Hanes-Woolf ainsi que la représentation graphique de Lineweaver-Burk surnommée également le graphique de la double réciproque (Murray *et al.*, 2002). Toutes ces techniques permettent des représentations linéaires. Le développement informatique actuel permet d'obtenir les valeurs des différentes constantes directement par l'équation de Michaelis-Menten grâce à la technique de régression non linéaire (Bisswanger, 2008). L'équation de Lineweaver-Burk est mathématiquement exprimée comme :

$$2) \quad \text{Équation de Lineweaver-Burk} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

La représentation graphique tirée de cette équation permet d'obtenir une droite linéaire (Fig. 2.4). Les interceptions axiales correspondent à $1/V_{max}$ à l'ordonnée et $-1/K_m$ à l'abscisse. Expérimentalement, il est impossible d'obtenir des valeurs négatives pour $1/[S]$ donc, l'interception à l'abscisse correspond à une extrapolation des valeurs obtenues à des concentrations positives de substrat.

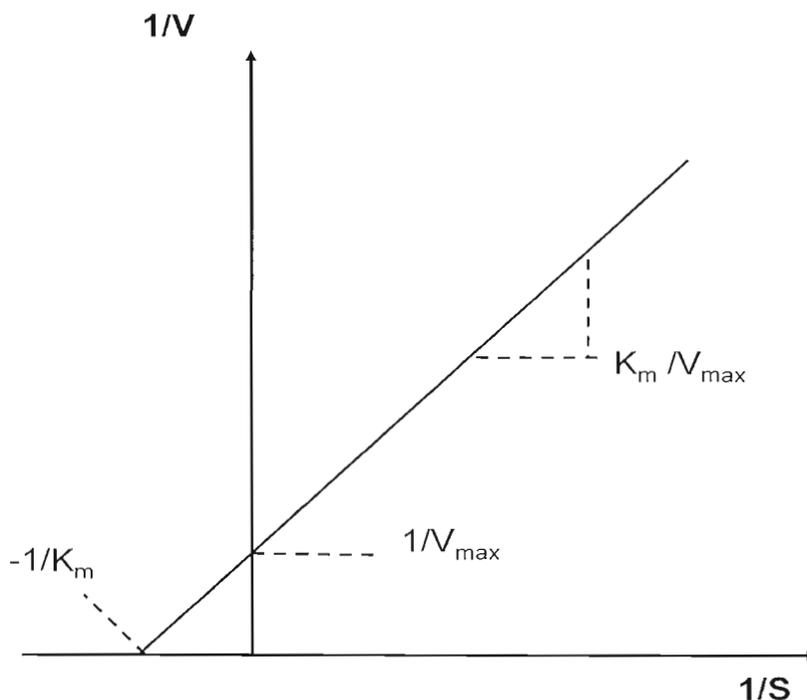


Figure 2.4 : Représentation graphique de la double réciproque de Lineweaver-Burk

2.1.4 Conditions des réactions enzymatiques

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité de l'enzyme. En plus de la concentration de substrat, le pH et la température sont deux des principaux facteurs environnementaux qui influencent l'activité enzymatique. La force ionique peut également influencer significativement l'activité enzymatique quoiqu'elle soit souvent négligée lors de l'évaluation cinétique d'une enzyme. Cependant, il est considéré qu'à des valeurs dépassant 100 mM, la force ionique affecte le comportement de l'enzyme (Dale et White, 1983). Les enzymes étant des protéines, elles sont composées de résidus d'acides aminés pouvant être chargés, mais les molécules de substrat peuvent également l'être. La force ionique peut modifier les forces stabilisant la structure tridimensionnelle de l'enzyme ou du substrat (Anderson et Cockayne, 2003).

Le pH de l'environnement de l'enzyme influence sa structure et son activité. En effet, le pH affecte, entre autres, l'état d'ionisation des acides aminés de l'enzyme (Pelmont, 1995). Ceci entraîne un changement dans les liens ioniques et les ponts hydrogène de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. La conformation spatiale n'étant plus identique, le site actif peut se retrouver empêché de pouvoir soit se lier au substrat ou participer à l'action catalytique. De plus, la structure du substrat peut également changer par les mêmes mécanismes et ainsi rendre difficile sa liaison au site actif. Chaque enzyme possède donc un pH optimal qui peut varier selon le substrat utilisé. En augmentant ou diminuant le pH, la condition acide ou basique modifie la structure de l'enzyme et commence à dénaturer celui-ci et ainsi abaisser lentement son pouvoir catalytique (Fig.2.5).

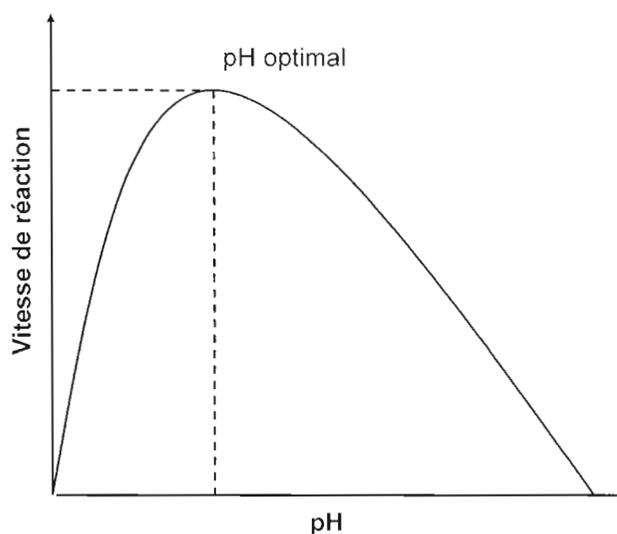


Figure 2.5 : Représentation schématique de l'influence du pH sur l'activité enzymatique

La température peut également modifier l'activité enzymatique. L'augmentation de température amène les molécules réactives à avoir de plus en plus d'énergie cinétique et donc, d'augmenter la fréquence de collision (Anderson et Cockayne, 2003). À de faibles températures, le nombre de collisions est insuffisant et l'activité enzymatique est alors faible

ou inexistante. Leur nombre augmente avec la température jusqu'à l'obtention d'une température optimale. Au-delà de celle-ci, les liens intra et intermoléculaires de la structure de l'enzyme commencent à se rompre et elle commence à se dénaturer (Fig. 2.6).

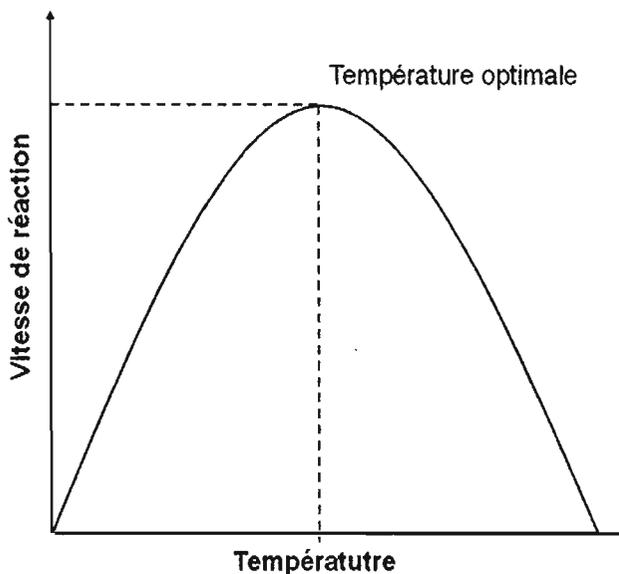


Figure 2.6 : Représentation schématique de l'influence de la température sur l'activité enzymatique

Une équation mathématique évaluant l'influence de la température sur les réactions a d'abord été proposée par le chimiste allemand Jacobus Henricus Van't Hoff en 1884 et par la suite, en 1889, elle a été interprétée et validée par le chimiste suédois Svante Arrhénius (Bezkorovainy, Rafelson et NetLibrary, 1996). Elle permet d'évaluer la tendance de la vitesse de réaction à varier selon la température et l'énergie d'activation des composés. Elle est mathématiquement exprimée comme suit où k est la constante de la vitesse de réaction, A est un facteur préexponentiel, E est l'énergie d'activation, R est la constante des gaz parfaits et T est la température (degrés Kelvin):

3) Équation d'Arrhénius
$$k = Ae^{-E/RT}$$

De cette équation est également dérivé le terme Q_{10} , le coefficient de température. Il correspond au facteur par lequel augmente la vitesse de la réaction enzymatique lorsque la température augmente de 10 °C. Dans les systèmes biologiques, il est reconnu que le Q_{10} varie entre 1 et 4 avec une tendance moyenne à se situer autour de $Q_{10} \cong 2$ (Bezkorovainy, Rafelson et NetLibrary, 1996). Il est exprimé mathématiquement comme suit :

4) Équation du coefficient de température
$$Q_{10} = \left(R_2 / R_1 \right)^{\left(10 / T_2 - T_1 \right)}$$

R_1 = Vitesse de la réaction 1

R_2 = Vitesse de la réaction 2

T_2 = Température de la réaction 1

T_1 = Température de la réaction 2

2.1.5 Inhibition et inhibiteurs

La régulation de l'activité enzymatique peut être assurée par des composés appelés effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) qui sont généralement de faible masse moléculaire. Ils agissent directement ou indirectement sur le site actif de l'enzyme. Les effecteurs positifs (activateurs) stabilisent la configuration catalytique active de l'enzyme et accroissent ainsi son activité. Les effecteurs négatifs (inhibiteurs) agissent au contraire en se liant à l'enzyme pour diminuer son activité catalytique (Karp et Wissocq, 2004). Cette liaison peut, entre autres, empêcher le substrat d'entrer dans le site actif ou encore bloquer l'activation de l'enzyme. Les inhibiteurs peuvent agir de manière réversible, mais également irréversible. Les inhibiteurs irréversibles réagissent généralement avec l'enzyme et ainsi le modifient de manière permanente. Ces changements ont lieu au niveau des acides aminés clés de l'activité enzymatique. Les inhibiteurs réversibles agissent au contraire en se liant de manière non covalente à l'enzyme, au substrat ou au complexe enzyme-substrat. Il existe donc plusieurs types d'inhibiteurs réversibles. L'affinité d'un inhibiteur déterminé par sa constante de dissociation de l'enzyme, peu importe le type, est donnée par la constante d'inhibition K_i (mol/L) qui représente la concentration d'inhibiteur pour laquelle la moitié des sites

enzymatiques sont occupés (Garrett et Grisham, 2000). Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le K_i est petit. Cette constante d'inhibition correspond également à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

Les inhibiteurs compétitifs sont généralement des analogues du substrat de l'enzyme. Ils peuvent ainsi entrer en compétition avec celui-ci pour se lier au site actif de l'enzyme ou encore se lier à un autre site qui va engendrer un changement de structure au niveau du site actif (Moussard, 2002). L'inhibiteur, lorsqu'il se lie à l'enzyme, forme un complexe enzyme-inhibiteur (EI) qui empêche alors la liaison du substrat. La quantité d'enzyme libre est alors moindre et l'activité enzymatique va se retrouver diminuée. Par contre, lorsque le substrat forme un complexe avec l'enzyme, l'inhibiteur ne peut plus agir sur celle-ci et l'action catalytique peut avoir lieu. C'est pourquoi, malgré la présence d'inhibiteur, il y aura toujours une activité enzymatique. Dans ce type d'inhibition, la vitesse maximale de la réaction se retrouve inchangée, mais la quantité de substrat nécessaire est augmentée, engendrant un K_m apparent plus grand ($K_{m\text{app}}$).

Les inhibiteurs non compétitifs peuvent se lier à l'enzyme seule autant qu'au complexe enzyme-substrat vu que leur site de liaison ne se retrouve pas dans le site actif de l'enzyme (Murray *et al.*, 2002). Les deux complexes pouvant être formés, EI ou enzyme-substrat-inhibiteur (ESI), inactivent la réaction enzymatique. La vitesse maximale de la réaction enzymatique va donc diminuer, car l'inhibition ne peut être contrecarrée par une augmentation de la quantité de substrat. Par contre, le substrat étant toujours apte à se lier à l'enzyme, le K_m ne variera point.

Les inhibiteurs incompetitifs ne peuvent se lier à l'enzyme seule, mais seulement au complexe enzyme-substrat. Il y a donc création d'un complexe ESI qui empêche l'activité enzymatique. Ce type d'inhibition est peu fréquent, mais survient quelquefois avec des enzymes multimériques. Dans ces cas, les valeurs de K_m et de V_{max} se retrouveront les deux diminuées (Borel, 1997).

2.2 Les enzymes pancréatiques

Les enzymes contribuent de plusieurs façons au maintien de la vie chez les mammifères, incluant leurs rôles importants lors du processus de digestion. Les enzymes pancréatiques, telles l'alpha-amylase, la lipase et les protéases clivent les grosses molécules du bol alimentaire, c'est-à-dire l'amidon, les lipides et les protéines respectivement, pour former des petites molécules qui pourront se faire absorber dans les intestins.

2.2.1 La lipase pancréatique

La lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) est une glycoprotéine digestive hydrosoluble qui est issue du gène PNLIP se retrouvant sur le chromosome 10 chez l'humain (Tietz et Shuey, 1993). Cette enzyme est également nommée triacylglycerol acyl hydrolase ou lipase pancréatique colipase dépendante. Beaucoup d'études ont été réalisées sur la lipase pancréatique humaine (HPL). Selon les diverses publications, son poids moléculaire varie de 46 000 à 56 000 Da (Davis *et al.*, 1991; Vandermeers *et al.*, 1974). Des points isoélectriques de 5,8, 6,0, 6,4, 7,0 et 7,4 lui ont été attribués, mais des recherches ont montré que, entre autres, les différents isoformes de cette enzyme en étaient responsables (Canalias *et al.*, 1994). La HPL est composée d'une seule chaîne peptidique de 465 acides aminés dont 16 correspondent au peptide signal. À maturation, cette enzyme est donc composée de 449 acides aminés (De Caro, Figarella et Amic, 1977). Son pH optimal se situe entre 6,5 et 9,0 selon le substrat et le milieu réactionnel utilisés lors de l'évaluation (Embleton et Pouton, 1997). Le calcium est un effecteur de la HPL et contribue de manière significative à l'augmentation de son activité catalytique quoiqu'il ne soit pas un cofacteur absolu de celle-ci, c'est-à-dire qu'il n'est pas nécessaire à son activation (Borgstrom et Brockman, 1984). En effet, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle du calcium pouvant augmenter la lipolyse de plus de 87 % (Scow, 1988). Il a été aussi montré que le calcium permettrait la diminution de la phase latente de l'activité enzymatique ainsi qu'il faciliterait l'adsorption de la HPL aux micelles formées de triglycérides et des sels biliaires (Brown,

Belmonte et Melius, 1977). D'autres ions tels le Sr^{2+} et le Mg^{2+} sont également aptes à activer l'enzyme, mais d'une manière moins efficace.

Par cristallographie aux rayons X, il a été possible d'observer la structure tridimensionnelle de la lipase humaine (Van Tilbeurgh *et al.*, 1992; Winkler, D'Arcy et Hunziker, 1990) ainsi que les interactions du complexe lipase humaine/colipase porcine (Van Tilbeurgh *et al.*, 1992). La HPL possède deux domaines structuraux : le domaine N-terminal comportant les résidus 1 à 336 et le domaine C-terminal du résidu 337 à 449 (Lowe, 2002).

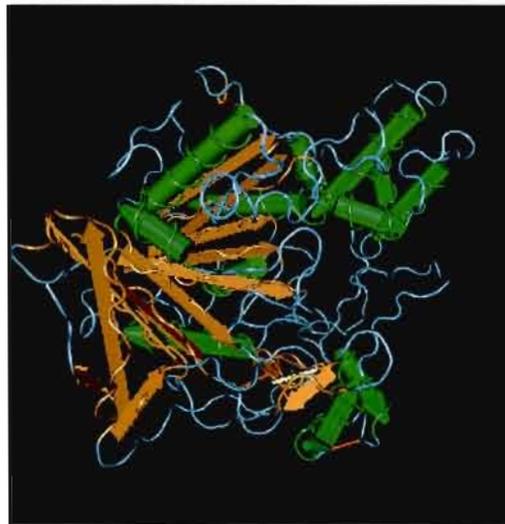


Figure 2.7 : Représentation tridimensionnelle de la lipase pancréatique (d'après Chen *et al.*, 2003).

Le domaine N-terminal est construit sur un repli alpha/beta comportant un feuillet β parallèle central. La HPL utilise un mécanisme d'action proche de celui des sérines protéases : une triade catalytique. Celle-ci est composée des résidus sérine (Ser) 153 comme nucléophile, aspartate (Asp) 177 et histidine (His) 263. Cette triade est partie prenante du site actif de l'enzyme et se retrouve dans le domaine N-terminal. Dans cette section, il se retrouve

également une boucle composée d'un pont disulfure entre les cystéines (Cys) 238 et 262 qui recouvre le site catalytique de l'enzyme et forme des liens Van der Waals avec les boucles $\beta 5$ (résidus 76-85) et $\beta 9$ (résidus 204-224) du même domaine. Cette boucle est nommée le domaine Lid et bloque l'accès du site actif au substrat, inactivant l'enzyme (Lowe, 1992). Lors de la présence de micelles de sels biliaires, l'interface huile-eau entraîne un changement de la conformation de l'enzyme, éloignant le domaine Lid et la boucle $\beta 5$ permettant ainsi l'accès au site actif et activant l'enzyme (Fig. 2.8) (Van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Ce changement de conformation crée également un plateau hydrophobique à la surface de l'enzyme, ce qui engendre la création d'une région propice à l'interaction avec le substrat hydrophobe. Il est également soupçonné que le domaine Lid jouerait un rôle dans la sélectivité de l'enzyme pour le substrat (Carrière *et al.*, 1997).

Le domaine C-terminal possède une structure en β -sandwich et constitue essentiellement le site de liaison du cofacteur colipase. En effet, grâce à des interactions polaires, à un pont salin et aux liens hydrogène, la colipase va s'attacher à la partie C-terminale de la lipase par deux de ses boucles en épingle composées des doigts 2 et 3 (résidus 44 à 46), ainsi que 3 et 4 (résidus 65 à 87), en plus de l'Asp 89 (Egloff *et al.*, 1995). La partie C-terminale de la HPL joue également un rôle au niveau des interactions entre le substrat et la HPL. Les résidus 405 à 414 forment une boucle, la $\beta 5'$, qui possède de larges régions hydrophobes (Lowe, 2002). Cette région se retrouve dans l'axe du plateau hydrophobique du domaine Lid ouvert. Ensemble, ces deux régions vont permettre la liaison de l'enzyme aux lipides.

La lipase pancréatique donne au fluide pancréatique sa capacité à hydrolyser les gras. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse à la position alpha des diglycérides et des triglycérides, possédant différentes longueurs de chaînes acyl (Borgstrom et Brockman, 1984). Par contre, la vitesse d'hydrolyse varie sensiblement entre les chaînes C_{14} et C_{22} et peut atteindre une différence de plus de 6 fois (Yang, Kuksis et Myher, 1990). Cette différence de vitesse est contrée par la grande quantité de lipase sécrétée par le pancréas, ce qui permet à l'action catalytique d'avoir lieu sur toutes les chaînes. Il a été également démontré que la HPL

pouvait hydrolyser les rétinyl esters *in vitro* et des études se poursuivent quant à son efficacité *in vivo* (Van Bennekum *et al.*, 2000).

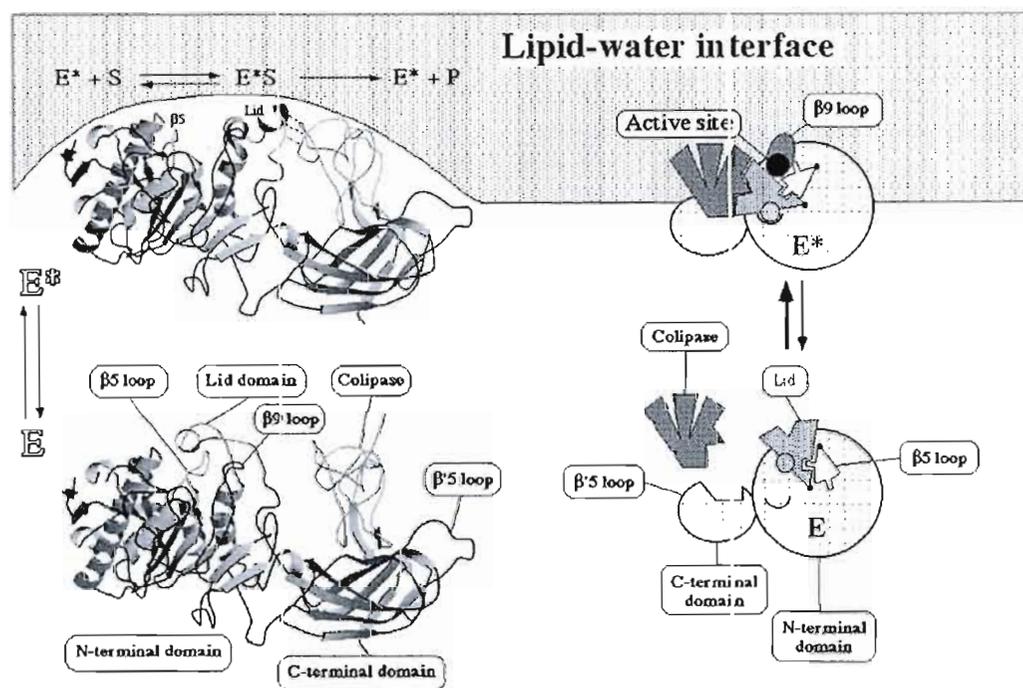


Figure 2.8 : Représentation graphique de l'interaction entre la lipase pancréatique humaine, les triglycérides et la colipase (d'après Van Tilbeurgh *et al.*, 1999).

Par contre, la HPL ne peut accomplir au niveau optimal son activité catalytique sans l'aide de ses cofacteurs : les sels biliaires et la colipase (Fig. 2.8). En effet, les sels biliaires contribuent à l'émulsification et la solubilisation des lipides pour permettre leur dégradation par la HPL. Une autre de leurs fonctions est de désorber les protéines ayant adhéré à l'interface huile/eau par des liaisons hydrophobes non spécifiques. Ce mécanisme est non spécifique et engendre la désorption de la HPL de son substrat également. Donc, malgré le rôle nécessaire des sels biliaires à l'action de la lipase, un autre cofacteur est nécessaire pour contrer le rôle inhibiteur de ceux-ci : la colipase.

La colipase est un coenzyme protéique de la HPL issu du chromosome 6, plus précisément de la région 6p21.1-pter (Davis *et al.*, 1991). Cette protéine hydrosoluble riche en cystéine est sécrétée par le pancréas sous forme de procolipase dans une concentration équivalente à celle de la lipase (Werner, 1982). Elle est activée par clivage d'un oligopeptide de sa partie N-terminale par la trypsine. D'un poids moléculaire d'environ 10 kDa, elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique de 84 acides aminés possédant 5 ponts disulfure (Erlanson-Albertsson, 1983). La colipase, liée à la HPL par ses doigts 2, 3 et 4, interagit avec les micelles de sels biliaires/triglycérides par une de ces boucles qui contient les résidus 70 à 85 (Van Tilbeurgh *et al.*, 1993; Van Tilbeurgh *et al.*, 1992). Elle sert donc d'ancrage à la HPL pour se lier à son substrat. Un autre rôle lui est également attribué, soit celui de stabilisateur de forme active de la HPL en contribuant à garder le domaine Lid ouvert (Van Tilbeurgh *et al.*, 1999).

2.2.2 L'amylase pancréatique

L'amylase est également connue sous plusieurs autres appellations, dont saccharidase et diastase. En effet, en 1833, Anselme Payen et Jean-François Persoz furent les premiers à isoler une enzyme et ce fut l'amylase (Fruton, 1999). Ils lui confèrent alors le nom de diastase. Plusieurs types d'amylase existent : alpha (3.2.1.1), bêta (3.2.1.2) et gamma (3.2.1.3) (Yamamoto, 1995). La bêta-amylase et la gamma-amylase (glucoamylase) sont généralement d'origine végétale ou microbienne quoique la glucoamylase a été retrouvée chez certains mammifères ou espèces aquatiques (Shetty, 2006). L'amylase humaine est une alpha-amylase (EC 3.2.1.1) qui existe sous deux isoformes selon qu'elle est sécrétée par le pancréas, amylase pancréatique, ou par la glande parotide, amylase salivaire et ayant 97 % d'homologie entre elles (Mayer et Larner, 1959). La régulation des gènes est responsable de l'existence de ces différentes enzymes. Elles sont donc issues de différents tissus et n'ont pas le même schéma de clivage de l'amidon. De plus, elles possèdent également des points isoélectriques légèrement différents soit de 6.5 pour l'amylase salivaire et de 7.0 pour l'amylase pancréatique (Takeuchi, Matsushima et Sugimura, 1975). Le pH optimal pour l'amylase pancréatique varie selon les auteurs, mais une majorité convient qu'il se situe

autour de 6,9 avec une variation pouvant s'échelonner de 6,5 et 7,2 en fonction de la quantité d'ions présente dans la solution saline neutre (Ishikawa *et al.*, 1993).

L'amylase pancréatique est codée par le gène AMY 2 situé sur le chromosome 1p21 (Zabel *et al.*, 1983). C'est une protéine composée d'une seule chaîne polypeptidique de 512 acides aminés possédant un poids moléculaire de 57.6 kDa (Abrams, Hamosh et Dutta, 1987). Trois domaines structuraux ont été recensés chez l'amylase : A, B, C (Roulet, Weber et Paradis, 1980). Le domaine A, formé d'un cylindre concentrique d'hélice alpha contenant 8 feuillets bêta parallèles, possède la plus grande taille. Il est composé des résidus 1 à 99 et 169 à 404 (Brayer, Luo et Withers, 1995). Dans ce domaine se retrouve le site actif contenant l'Asp 197, le glutamate (Glu) 233 et l'Asp 300, trois acides aminés clé de l'action catalytique de l'enzyme ainsi que le site de liaison de l'ion chlorure (Whitcomb et Lowe, 2007). En effet, un ion chlore, activateur allostérique de l'amylase, forme des interactions avec l'arginine (Arg) 195, l'asparagine (Asn) 298 et l'Arg 337. Le plus petit domaine, B, comprend les résidus d'acides aminés 100 à 168 et est construit sous la forme d'une poche. Il est adjacent à la structure cylindrique du domaine A et est principalement composé de feuillets bêta. Un site de liaison de l'ion calcium, comprenant les résidus Asn 100, Arg 158, Asp 167 et His 201, se retrouve dans cette cavité. À l'opposé du domaine B se trouve le domaine structural C composé des résidus 405 à 496. Il est rassemblé en plusieurs feuillets bêta antiparallèles et les différences d'homologie selon les différentes espèces d'origine de l'alpha-amylase se retrouvent généralement dans cette partie (MacGregor, 1988). Une des particularités de l'amylase humaine se situe à la partie N-terminale de la chaîne polypeptidique et est constituée d'une modification post traductionnelle du résidu glutamine (Gln) N-terminal pour former un dérivé pyrrolidone. Il est soupçonné que cette modification pourrait fournir une protection contre l'action des aminopeptidases et d'autres enzymes digestives (Brayer, Luo et Withers, 1995).

L'alpha-amylase est une métalloenzyme calcique dont l'absence de calcium entraîne l'inactivation. Cet ion divalent va se lier à son site et ainsi stabiliser la structure de l'enzyme, mais il contribue également à son activité catalytique (Hsiu, Fischer et Stein, 1964). De plus,

la présence de l'ion chlorure ou d'autres anions contribuent également à activer cette enzyme, mais l'ion chlorure le fait d'une manière plus importante (Buisson *et al.*, 1987).

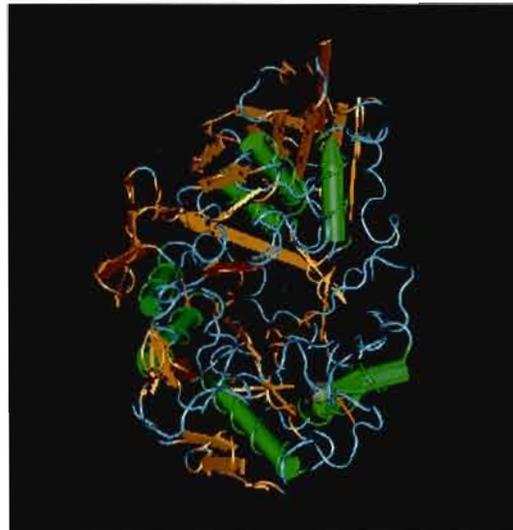


Figure 2.9 : Représentation tridimensionnelle de l'alpha-amylase (d'après Chen *et al.*, 2003)

L'amylase pancréatique est responsable de la dégradation de l'amidon. L'amidon est composé d'amylose et d'amylopectine. L'amylose est constituée d'une chaîne de 25 à 2000 unités D-glucose liées entre elles par des liens α -1,4 et possédant une structure non ramifiée (Buléon *et al.*, 1998). Par contre, l'amylopectine est très branchée. Elle est composée des mêmes chaînes d'unités de D-glucose liées par des liens α -1,4, mais celles-ci sont reliées entre elles par des liens α -1,6 à toutes les 20 à 25 unités de glucose (Stevens, 1990). L'amylase clive les carbohydrates au lien α -1,4 glycosidique. En effet, elle ne peut cliver les liens α -1,6. Lors du clivage de l'amylopectine, les produits formés sont appelés dextrans et dextrans beta-limitantes, des oligosaccharides branchés de 6-8 unités de glucose reliées par des liens α -1,4 et α -1,6 (Whitcomb et Lowe, 2007). Le site de liaison du substrat de l'amylase contient 5 sous-sites et où le site catalytique se retrouve en troisième position

(Stiefel et Keller, 1973). Selon que le substrat s'ancre au site de liaison avec la première unité de glucose en position 1 ou 2 des sous-sites, l'amylase va cliver la chaîne de glucose après la première ou la seconde unité de glucose et former ainsi des unités maltose, maltotriose ou dextrines (Robyt et French, 1970a; Robyt et French, 1970b).

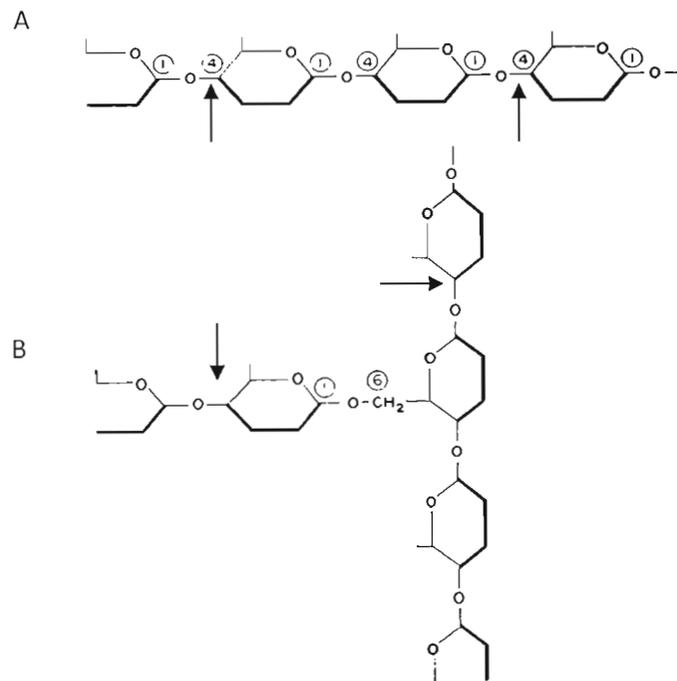


Figure 2.10 : Représentation graphique de l'action amylolytique (\rightarrow) sur l'amylose (A) et l'amylopectine (B).

2.2.3 Les protéases pancréatiques

Plusieurs protéases sont synthétisées et sécrétées par le pancréas dans la lumière intestinale dont les deux protéases majeures, la trypsine et la chymotrypsine, l'élastase et les carboxypeptidases A et B. Leur activité protéolytique accélère la dégradation des protéines en acides aminés ou petits peptides lors de la digestion. La plupart des protéases pancréatiques

sont sécrétées sous forme de zymogène inactif. En effet, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les protéines d'une manière non sélective et elles pourraient donc dégrader les membranes cellulaires ou les tissus environnants (Das, 1978). La sécrétion sous forme de proenzyme est donc un mécanisme de régulation qui consiste en un blocage de l'accès au site de liaison du substrat au site actif par une partie de la chaîne peptidique du proenzyme. Ce n'est que lors du clivage de cette région que, par un changement de conformation, la cavité du site actif se retrouve libre (Whitcomb et Lowe, 2007).

La trypsine, la chymotrypsine et l'élastase sont toutes trois des endopeptidases, plus précisément des sérines protéases de la famille PA (Page et Di Cera, 2008). Les familles de peptidases sont définies par le système MEROPS. À l'origine, la famille PA était nommée SA dont la première lettre représentait le nucléophile catalytique (dans notre cas : S pour « Sérine » protéases) et la deuxième lettre était simplement une suite alphanumérique (dans notre cas : A). Par contre, lors de la découverte que la picornaïne possédant une cystéine comme nucléophile catalytique (virus de l'hépatite A) avait la même origine que les protéases SA, le système MEROPS a uni les familles SA et CB sous l'appellation PA (Rawling et Barnett, 1993).

Les enzymes de la famille PA comportent un seul peptide réparti en deux domaines structuraux globulaires (Whitcomb et Lowe, 2007). Ce sont des enzymes qui clivent les liens peptidiques à l'intérieur de la chaîne en passant par un mécanisme d'action impliquant une triade catalytique (Whitcomb, 2000). Cette triade est constituée de trois acides aminés soit la Ser-195, l'His-57 et l'Asp-102. Le groupe hydroxyle de Ser-195 fonctionne comme attaquant nucléophile durant les premières phases de la catalyse. Dans une réaction enzymatique, l'His-57 fonctionne comme une base (contrairement à sa neutralité dans l'enzyme native) et cette basicité augmente la réactivité de Ser-195. L'Asp-102 joue deux rôles importants : le premier étant de stabiliser l'His-57 protonée (l'intermédiaire ionique formé durant l'acylation) et le second étant de fixer la configuration autour du site actif pour promouvoir le processus catalytique (Page et Di Cera, 2008). Un mécanisme de régulation est important pour pouvoir réguler l'action de ces protéases une fois activées, et c'est pourquoi les sérines protéases possèdent une boucle d'autolyse. Celle-ci relie les deux domaines globulaires et permet de

stabiliser la forme tridimensionnelle active (Whitcomb et Lowe, 2007). Lors de la scission de cette chaîne, l'enzyme perd sa conformation et devient inactive.

La trypsine (EC 3.4.21.4) est, comme la plupart des protéases pancréatiques, sécrétées par le pancréas sous forme de zymogène inactif, le trypsinogène. Constituée de 229 acides aminés, elle possède une masse moléculaire de 24 kDa et un point isoélectrique de 9,3. Sous l'action de l'entérokinase, une enzyme protéolytique sécrétée au niveau de la membrane plasmique apicale de l'épithélium intestinal, le lien peptidique du trypsinogène est clivé entre la lysine (Lys) 23 et l'isoleucine (Ile) 24 libérant alors le peptide d'activation composé de 8 acides aminés ainsi que la trypsine, enzyme active. La trypsine (Fig. 2.11) possède quatre ponts disulfure et une masse moléculaire de 23,8 kDa pour 221 acides aminés (Cunningham, 1954). Le pH optimal pour cette enzyme se situe autour de 7,8 (Beck, 1973). Elle est inactivée réversiblement par la chaleur lorsqu'elle est dans un milieu acide, mais se décompose lentement dans un milieu alcalin (Best, Taylor et Brobeck, 1979). Plusieurs isoformes de la trypsine sont formées à la suite de différentes autolyses et coexistent chez l'humain (Rinderknecht, Renner et Carmack, 1979). La trypsine est responsable de l'hydrolyse des liens peptidiques du côté du groupement acyle au niveau des acides aminés possédant une charge positive dans leur chaîne latérale, soit le Lys et l'Arg. Elle peut également briser les liens esters et amides de ces mêmes deux acides aminés. La trypsine est également reconnue comme une enzyme protéolytique qui active les autres zymogènes pancréatiques (Fingerman, 2001). La trypsine s'autolyse par clivage de l'Arg 122 au niveau de sa boucle d'autolyse composée des résidus d'acides aminés 117 à 128 (Kukor *et al.*, 2002).

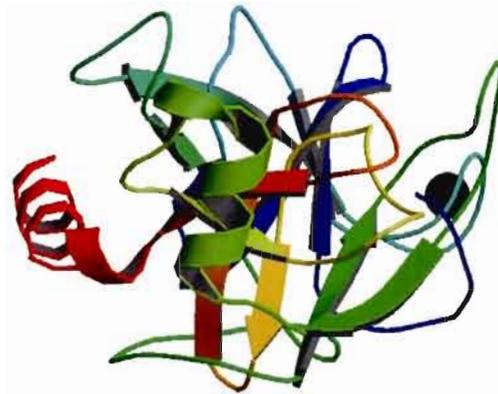


Figure 2.11 : Représentation tridimensionnelle de la trypsine pancréatique (d'après Protein DataBank)

La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) est également une sérine protéase dont il existe plusieurs isoformes : alpha, bêta et gamma. La forme α ou chymotrypsine A (Fig. 2.12) est la plus spécifique et la plus abondante chez l'humain (Neurath et Bailey, 1954). Elle possède une masse moléculaire de 25 kDa et un point isoélectrique de 9,1 (Uhlig et Linsmaier-Bednar, 1998). Son pH optimal se situe entre 8,0 et 9,0. La chymotrypsine A possède une structure globulaire compacte constituée de 3 chaînes polypeptidiques reliées par 2 ponts disulfure et repliées en 2 domaines de 120 acides aminés (Schaller, 2008). Elle est sécrétée par le pancréas sous forme inactive, le chymotrypsinogène. Lors de son largage dans la lumière intestinale, la trypsine va cliver celui-ci entre l'Arg 33 et l'Ile 16, et ainsi activer l'enzyme. Les deux fragments protéolytiques restent liés grâce au pont S-S, contrairement à la trypsine. La chymotrypsine a pour fonction de cliver les liens peptidiques du côté acyle des acides aminés aromatiques peu solubles possédant un noyau phényle, c'est-à-dire la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp) et la phénylalanine (Phe). La chymotrypsine A clive exclusivement au niveau de ces acides aminés aromatiques. En plus de cliver les acides aminés aromatiques, la chymotrypsine B clive au niveau de la Leu tandis que la chymotrypsine γ (C) peut cliver au niveau du Glu et la méthionine (Met). Certaines études ont démontré qu'elle hydrolysait également les liens amides et esters de ces mêmes acides

aminés (Beck, 1973). La boucle d'autolyse, composée des résidus 142 à 153, est attaquée par une autre chymotrypsine au niveau de la Tyr146 ou l'Asp 148 par la trypsine pour désactiver l'enzyme (Rovero, 1988).

L'élastase est la protéase pancréatique responsable de la scission de l'élastine, une protéine hautement insoluble et riche en proline (Pro) et glycine (Gly). Cette protéine est responsable de l'élasticité des fibres tissulaires. Cette sérine protéase va briser les liens peptidiques du côté acyle des résidus d'acides aminés d'alanine (Ala), Gly et Ser (Rosenbloom, 1984).

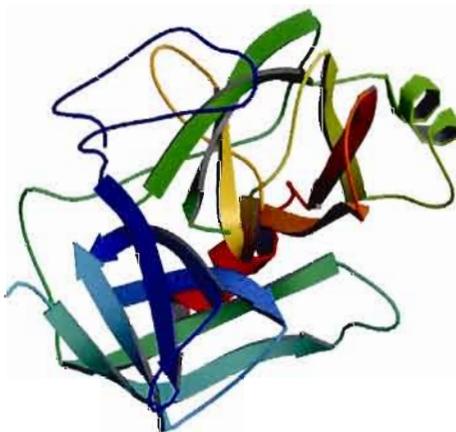


Figure 2.12 : Représentation tridimensionnelle de la chymotrypsine pancréatique (d'après Protein DataBank)

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases agissant en clivant les acides aminés carboxyterminaux. Ce sont des métalloprotéinases qui contiennent un noyau de zinc (Vallee et Neurath, 1954). La carboxypeptidase A clive préférentiellement les acides aminés terminaux aromatiques ou possédant une chaîne latérale aliphatique telles la Leu, l'Ala et l'Ile. La carboxypeptidase B clive les acides aminés terminaux chargés positivement, soit la Lys et l'Arg (Boyer, Lardy et Myrbäck, 1960).

CHAPITRE III

MÉTHODES DE DOSAGE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

Plusieurs domaines scientifiques s'intéressent à l'étude des enzymes. Les industries pharmaceutiques et biomédicales ainsi que la recherche fondamentale en sont quelques-uns. Il est donc primordial d'avoir des méthodes de détection et de dosage pour ces enzymes. Elles permettent de quantifier ou encore d'étudier les paramètres physicochimiques des enzymes. Une méthode de dosage de l'activité enzymatique consiste à mesurer l'activité enzymatique en évaluant la variation de la quantité de substrat ou de produits formés sur une période de temps. Les biochimistes ont utilisé plusieurs techniques pour étudier les réactions enzymatiques, mais de nos jours, la méthode de la vitesse initiale est la plus commune et la plus facile d'utilisation (Xie et Lu, 1999). Ce type de méthodes consiste à mesurer la vitesse initiale (la vitesse à laquelle l'enzyme catalyse la réaction avec un très large excès de substrat). Il existe deux grandes approches de base pour mesurer l'activité enzymatique : méthodes à temps fixe et méthodes en cinétique.

Le dosage d'une enzyme en cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé choisi, soit la disparition de substrat ou la formation du produit. Les méthodes radiométriques, spectrométriques (colorimétrie, spectrophotométrie, spectrofluorométrie, etc.), électrochimiques (ampérométrie, potentiométrie, etc.) sont souvent employées (Beisson *et al.*, 2000). En effet, elles peuvent fournir des valeurs en continu. Les approches cinétiques peuvent également être réalisées en prélevant des échantillons d'une réaction à des intervalles de temps relativement courts (normalement inférieurs à une ou deux minutes). Par la suite, les changements de concentration du produit choisi sont dosés, soit par spectrophotométrie, radiométrie ou autres. Les méthodes en cinétique sont préférentiellement utilisées si les conditions le permettent, car elles permettent de s'assurer que la réaction se déroule dans la partie linéaire initiale.

Une autre approche souvent utilisée est celle du dosage à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composantes de la réaction et ensuite à les incuber durant un certain temps de réaction. À la fin de cette incubation pour un temps déterminé, la quantité de substrat restant ou de produit formé est mesurée. Le dosage du composé choisi peut se faire par des méthodes spectroscopiques, radio-isotopiques ou autres. La principale faiblesse de cette approche est qu'elle ne permet pas de savoir avec certitude si le prélèvement des échantillons est réalisé à un point où la réaction se trouve dans la portion linéaire initiale.

3.1 Méthodes actuelles USP

« United States Pharmacopeia-National Formulary » (USP-NF) est un recueil de normes de pharmaceutiques édité par la Pharmacopée américaine (USP). Il contient les différentes normes établies pour les médicaments, les formes posologiques, les substances médicamenteuses, les dosages pharmaceutiques, les appareils médicaux et les compléments alimentaires. L'Agence Fédérale Américaine sur les aliments, les médicaments et les cosmétiques (FDA) désigne USP-NF comme recueil officiel pour les médicaments mis sur le marché aux États-Unis, mais ces normes sont reconnues dans plus de 130 pays. C'est pourquoi les fabricants souhaitant mettre des produits thérapeutiques sur le marché à l'échelle mondiale se basent sur l'USP-NF pour gérer leurs produits pharmaceutiques. Le fait d'être conforme aux normes USP-NF est accepté à l'échelle internationale comme une assurance de qualité. Ce recueil comporte une section regroupant les différentes monographies, dont celles concernant la pancréatine et la pancrélipase (pancréatine enrichie en lipase), deux principes actifs d'extraits pancréatiques porcins. Ces monographies contiennent, entre autres, des notices techniques contenant les méthodes de dosages recommandées (United States Pharmacopeial Convention, 2000)

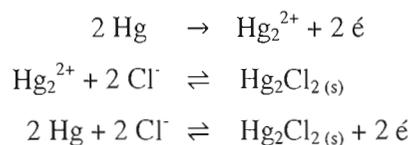
3.1.1 La lipase

Mesurer les acides gras libérés sous l'action hydrolytique de la lipase est une technique simple et efficace pour évaluer l'activité enzymatique de lipase. La Pharmacopée

américaine se base donc sur ce principe pour établir une méthode de référence pour le dosage de la lipase pancréatique. En effet, elle recommande l'utilisation d'une méthode potentiométrique basée sur le changement de pH (Cherry et Crandall Jr., 1932). Ce titrage acide-base serait difficile à réaliser à l'aide d'un indicateur coloré vu la turbidité et l'opacité du substrat utilisé (huile d'olive/gomme arabique). La détection potentiométrique du point de virage est donc avantageuse.

Lorsqu'un titrage potentiométrique est exécuté, les changements observés, dans un échantillon inconnu, lors de l'ajout d'un titrant de concentration connue sont mesurés par une cellule électrolytique. Cette méthode peut être appliquée à toutes les réactions titrimétrique à condition que la concentration d'au moins une des substances en cause peut être suivi au moyen d'une électrode. La courbe de titrage peut être suivi point par point en traçant une courbe du pH en fonction du volume correspondant de titrant ajouté.

Lors du titrage potentiométrique pour le dosage de la lipase, une électrode au calomel (chlorure mercureux) saturée en chlorure de potassium est utilisée. Cette électrode est basée sur le couple redox $\text{Hg}_2\text{Cl}_{2(s)}/\text{Hg}$ et l'équilibre suivant (Sarrazin et Verdaguer, 1991) :



Le potentiel pris par cette électrode dépend uniquement de la concentration en ions chlorures. Le potentiel de l'électrode au calomel est donc fixé par la concentration de la solution de KCl dans laquelle elle baigne: concentration molaire, décimolaire, ou saturée (Sarrazin et Verdaguer, 1991). Lors d'une variation de la concentration en ion H^+ dans une solution, un changement dans la composition de la membrane de verre se produit due à un processus d'échange d'ions impliquant la solution et la membrane. Un changement correspondant dans la membrane de potentiel, proportionnel au pH, est ce qui est mesuré. Chaque électrode de verre étant différente due à la difficulté de reproduire la membrane de

verre, il est nécessaire d'uniformiser le pH mètre et l'électrode contre au moins deux solutions de pH connu avec précision.

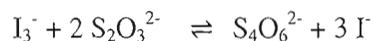
Ce dosage de la lipase nécessite également l'utilisation d'un substrat composé d'une émulsion de triglycérides d'acides gras à chaîne longue. Cette émulsion, réalisée à partir de l'huile d'olive, a également besoin d'être stabilisée par un agent émulsifiant. L'utilisation de gomme arabique est donc suggérée dans la préparation de ce substrat. La grandeur de la surface de l'interface huile/eau est également un aspect important dans l'évaluation de l'activité enzymatique de la lipase et donc, l'impact de l'aire des gouttelettes de substrat devient un facteur à prendre en compte et à standardiser. La grosseur de ces gouttelettes doit pouvoir être réalisée de manière reproductible et bien caractérisée. Plusieurs appareils tels le sonicateur ou le mélangeur à lame peuvent être employés pour obtenir un substrat correspondant au standard pour l'émulsion de substrat (90% de moins de 2 μm).

Les acides gras libérés sous l'action lipolytique sont mesurés par dosage titrimétrique, soit la quantité de NaOH nécessaire pour garder le pH constant. Ce NaOH vient neutraliser la charge acide causée par la libération d'acides gras dans le milieu réactionnel. L'unité enzymatique d'activité de la lipase définie par la Pharmacopée américaine correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 μEq d'acides gras par min à pH 9.0 et 37 °C.

Quoique cette méthode soit précise et simple, elle demande une grande quantité de matériels et de temps (exemple : 5 h de préparation de substrat). De plus, plusieurs méthodes ont des sensibilités beaucoup plus importantes que la méthode titrimétrique. Une méthode chromogénique, connue pour sa grande sensibilité, offrirait également plusieurs avantages tels le fait que le substrat soit commercial et déjà préparé, que les équipements nécessaires se résument principalement à un spectrofluorimètre, etc.

3.1.2 L'alpha-amylase

En 1908, Wohlegemuth introduit le principe de la méthode iodométrique (Umbreit, 2002) que Somogyi caractérisa en 1938 en établissant une manière de standardiser l'iode et l'amidon. La méthode de la Pharmacopée américaine pour le dosage de l'amylase est dérivée de cette méthode amyloclastique. Elle est basée sur la propriété de l'iode à former des complexes d'inclusion « clathrates » avec l'amidon qui engendrent une coloration bleu foncé dont l'intensité est dépendante de la concentration et de la longueur de la chaîne (Somogyi, 1938). En effet, en présence d'iode (I_2) et d'iodure de potassium (KI), il y a formation d'un ion triiode qui est soluble en milieu aqueux contrairement au diiode (I_2) (Skoog *et al.*, 1997). Ce triiode se glisse à l'intérieur des hélices d'amylose et se fixe à celle-ci pour former des « clathrates » à raison d'une molécule par tour d'hélice soit six résidus glucose (Kearsley et Dziedzic, 1995). Donc, lors d'une digestion enzymatique d'amidon par l' α -amylase, la quantité d'amidon non hydrolysé va réagir avec l'iode ajouté. L'excès d'iode n'ayant pas réagi subira une titration réductrice au thiosulfate de sodium selon l'équation stœchiométrique suivante :



La détection de la neutralisation se fait par titrage colorimétrique. En effet, la coloration bleu foncé disparaîtra à mesure de la neutralisation de l'iode par le thiosulfate et la disparition complète de coloration correspondra au point de virage. L'activité enzymatique de l'amylase peut donc être déduite selon la quantité de titrant utilisée et la quantité de substrat initiale (Ehrhardt, Grasshoff et Kremling, 1998).

L'unité enzymatique de l'amylase définie par la Pharmacopée américaine correspond à la quantité d'enzyme qui est nécessaire pour décomposer l'amidon à la vitesse initiale où 0,16 μ Eq de lien glycosidique est hydrolysé par minute. La quantité de liens glycosidiques hydrolysés par minute (0,16) correspond à l'hydrolyse du lien d'une des six molécules (1/6) de glucose par tour d'hélice se liant à l'iode.

Plusieurs désavantages sont associés à l'utilisation de cette méthode, dont le manque de stabilité de la coloration formée par le complexe amidon-iodé causé entre autres par la température (Chapin *et al.*, 1944) entraînant une reproductibilité et une répétitivité moins adéquates. Le temps requis pour la réaction et la préparation des réactifs (plusieurs heures) est également un facteur non négligeable.

3.1.3 Les protéases

La méthode de dosage de l'activité protéolytique recommandée par la Pharmacopée américaine est une modification du protocole établi par Kunitz (1947). Celui-ci comporte plusieurs étapes : une action protéolytique sur le substrat, une précipitation des protéines non clivées par l'acide trichloroacétique (TCA) et une détection des acides aminés aromatiques des peptides clivés par une lecture en spectrophotométrie à 280 nm.

L'activité des protéases est déterminée sur un substrat protéique, la caséine. Cette protéine issue du lait est utilisée pour sa grande disponibilité et également pour sa sensibilité à la protéolyse sans la nécessité d'une dénaturation préalable (McKellar, 1989). Par la suite, après l'arrêt de la réaction enzymatique, les peptides non clivés sont enlevés du milieu par l'action précipitante du TCA. Celui-ci est un agent précipitant très efficace en présence de solution diluée et fonctionne selon un mécanisme d'agrégation hydrophobique (Xu, Xie et Zhou, 2003). Premièrement, il a été découvert que la présence des groupements chloro était capitale et que leur remplacement ou l'absence d'un seul groupement diminuait le pouvoir de précipitation de cette solution (Sivaraman *et al.*, 1997) et que le TCA engendrait chez les protéines un état intermédiaire dit « état A » où les protéines dénaturées ne présentant que des structures secondaires se regroupaient par associations réversibles. Ces regroupements sont prompts à l'agrégation et par la suite, ils entraînent la précipitation (Sivaraman *et al.*, 1997).

La solution ne contient donc, par la suite, que les fragments peptidiques clivés par les protéases qui pourront être détectés par la lecture de l'absorbance en ultraviolet (UV) vu que leur quantité sera proportionnelle à l'activité enzymatique opérée. En effet, les acides aminés

aromatiques, surtout la tyrosine et le tryptophane, absorbent la lumière UV avec une absorbance maximale à 280 nm (Gore, 2000). L'unité enzymatique conventionnelle de l'USP pour des protéases est donc définie comme la quantité d'enzyme permettant l'hydrolyse de la caséine à une vitesse initiale libérant par minute une quantité de peptides, non précipités par le TCA, donnant la même absorbance à 280 nm que 15 nmol de tyrosine, soit un changement de densité optique ($\Delta A/\text{min}$) de 0.001.

Il existe plusieurs désavantages liés à ce protocole, dont le temps requis pour sa réalisation (plusieurs heures), le nombre élevé d'étapes et de manipulations nécessaires (réaction enzymatique de 45 minutes, précipitation au TCA et détection spectrophotométrique), et de plus, cette méthode est considérée comme étant peu sensible (Bisswanger, 2007). En effet, la détection spectrophotométrique à 280 nm a une sensibilité minimale de 20 $\mu\text{g/mL}$ de BSA (Hockfield *et al.*, 1993).

3.2 Méthodes alternatives

Plusieurs méthodes alternatives à celles recommandées par la Pharmacopée américaine existent. Cependant, l'objectif étant de doser l'activité enzymatique et non la présence de l'enzyme, des méthodes chromatographiques telles la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), souvent utilisées dans l'industrie pharmaceutique, ne sont pas nécessairement des alternatives adéquates.

Les méthodes radiométriques pour le dosage enzymatique existent pour chacune des enzymes pancréatiques et pourraient être d'emblée de bonnes candidates comme solution alternative à l'utilisation des méthodes USP-NF. Elles se basent sur l'association covalente d'un isotope radioactif à une molécule de substrat spécifique à chacune des enzymes, par exemple la [^3H] trioléine pour la HPL, la [^{125}I] T-Chloramine-amidon pour l'amylase et la [^{14}C] caséine pour les protéases (Aw, 1974; Christen, 1987; Doolittle et Reue, 1999). Sous l'action enzymatique, le substrat sera transformé en un produit qui sera quantifié par son émission dans un compteur à scintillation. Cette méthode peut être très sensible et spécifique

selon la méthode de détection et l'isotope utilisé. Par contre, elles nécessitent une étape supplémentaire qui consiste en la séparation du produit engendré et du substrat radiomarqué dans le but de bien séparer les isotopes associés à chacune de ces molécules. Ceci peut être fait par chromatographie (ex : chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide à haute performance), extraction au solvant, centrifugation ou autres (Gul, Sreedharan et Brocklehurst, 1998). En plus des problématiques associées à la réalisation d'une séparation adéquate, les substrats peuvent être très dispendieux et l'utilisation de la radioactivité engendre également plusieurs désavantages : personnel hautement qualifié nécessaire, possession de l'ultrastructure et d'un système de gestion des déchets radioactifs, de formations continues du personnel (Borel, 1997).

D'autres méthodes immunologiques, potentiométriques ou autres existent pour une ou plusieurs des enzymes pancréatiques. Par contre, les méthodes en spectrophotométrie ou en spectrofluorométrie sont souvent utilisées pour leur grande disponibilité, leur facilité d'utilisation, leur sensibilité et leurs mécanismes très connus (Hui, 2006). En effet, une méthode analytique de dosage des activités enzymatiques doit posséder le plus grand nombre des qualités suivantes : sensibilité, reproductibilité, flexibilité, simplicité et disponibilité (Illanes, 2008). La spectrophotométrie et la spectrofluorométrie correspondent donc, à la majorité de ces critères.

3.2.1 Méthodes chromogéniques

Un chromophore est le terme utilisé pour désigner une molécule (ou une partie de molécule) colorée. En fait, c'est un groupement d'atomes qui compose cette molécule qui engendre sa couleur en absorbant l'énergie des photons. Certains chromophores servent de substrats pour les dosages d'activité enzymatiques. Ils peuvent correspondre simplement aux molécules de substrats ou de produits, mais ils peuvent également être des molécules couplées de façon covalente aux substrats ou produits. Deux types de substrats chromogéniques existent pour doser les enzymes :

1. les substrats chromogéniques dont le mécanisme passe par la libération de fragments lors du clivage hydrolytique par l'enzyme. Les chromophores sont reliés à ces fragments. Souvent macromoléculaire, ce type de substrat est généralement peu soluble tandis que les fragments libérés sont solubles et génèrent une augmentation du signal de détection proportionnel à l'activité enzymatique.
2. les substrats chromogéniques dont leur état initial est non coloré (forme « leuco »). Ce sont généralement de petites molécules solubles qui, sous l'action enzymatique, libèreront un produit d'hydrolyse coloré causé par un réarrangement électronique du chromophore. Ce produit va augmenter l'intensité du signal de détection et celui-ci sera proportionnel à l'activité enzymatique.

3.2.1.1 Méthodes chromogéniques en spectrophotométrie

Pour la lipase, plusieurs méthodes en spectrophotométrie existent et utilisent une variété de substrat tels les résorufin esters, des analogues de triacyl thioglycérides et des dérivés 4-nitrophényl de dialkylglycérol (Ciuffreda *et al.*, 2001; Santaniello *et al.*, 2006; Yamada et Fujita, 2007). Un substrat chromogénique comme le nitrophenylester ayant des chaînes alkyles de longueurs variées peut être utilisé dans une microémulsion eau/huile (Fletcher *et al.*, 1985) Cette méthode n'est pas cependant très appropriée puisque la présence de détergent, souvent utilisé dans les dosages de la lipase, déstabilise la microémulsion. Une variante de la méthode de Fletcher est compatible avec les détergents et utilise, par exemple, le 4-nitrophenyl butyrate dont l'absorbance est lue à 346 nm (Zhong et Glatz, 2006).

L'alpha-amylase peut également être dosée par plusieurs méthodes en spectrophotométrie (Dupuy, Hilaire et Aubry, 1987; Fenton *et al.*, 1982; Klein et Foreman, 1980). Par exemple, le 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-maltrioside dont la libération de nitrophénol peut être directement observé à 400 nm (Gella *et al.*, 1997). Il existe aussi des substrats à base d'amidon, dont le « Blue-Starch » qui est en fait un couplage covalent entre le chromophore Cibachron blue et l'amidon réticulé. Le fragment soluble libéré par l'action

hydrolytique de l'amylase sera détecté à 595 nm. Le p-nitrophenyl-alpha-D-maltoheptaoside (forme « leuco ») est également un substrat chromogénique dont l'action de l'amylase libèrera le p-nitrophenol (coloration jaune) dont la détection se fait à 490 nm.

Les méthodes chromogéniques permettant de doser les peptidases pancréatiques sont peu nombreuses. Par contre, deux substrats chromogéniques en spectrophotométrie sont régulièrement utilisés : le Benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) pour la fonction estérase et également le Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) pour la fonction amidase (Venkatesh et Sundaram, 1998). Cependant, ces substrats sont peu précis pour évaluer l'entièreté du contenu en protéases pancréatiques. En effet, ils permettent de doser l'action catalytique de la trypsine de cliver de côté du groupement acyle de l'arginine. Quoique le contenu pancréatique en protéases soit majoritairement de la trypsine (Whitcomb et Lowe, 2007), ces substrats ne sont donc pas adéquats pour doser l'entièreté des protéases tout comme les autres substrats spécifiques à d'autres protéases tels le Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) pour la chymotrypsine (Kang et Fuchs, 1973). Par contre, une méthode faisant appel à la caséine couplée au résorufin activé (N-(résorufin-4-carbonyl) piperidine-4-acide carboxylique-N'-hydroxysuccinimide-ester) pourrait remplir le rôle de doser l'activité protéolytique totale en spectrophotométrie (Schickaneder *et al.*, 1988) de façon plus proche aux méthodes USP.

3.2.1.2 Méthodes chromogéniques en spectrofluorométrie

La fluorescence est un phénomène d'émission, c'est à dire que l'énergie de transition de la molécule (entre un état de plus haute et de plus basse énergie) est mesurée par la détection d'une radiation émise plutôt que par l'absorption (Wilson et Walker, 2000). En effet, une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente émise.

À son état fondamental S_0 , le fluorophore absorbe l'énergie du photon et la molécule se retrouve alors dans un état électroniquement excité, souvent un état singulet, nommé généralement S_1 ou S_0^* (Wilson et Walker, 2000). Le retour à l'état fondamental peut alors se faire soit par fluorescence, soit par phosphorescence. La fluorescence est caractérisée par l'émission d'un photon de manière très rapide qui s'explique par le fait que l'émission respecte la règle quantique $\Delta S=0$, ce qui signifie que la molécule reste dans un état singulet. La lumière émise (λ_{em}) peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande ou plus petite que la longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) (Gore, 2000).

En pratique, la spectrofluorométrie est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Deux types d'appareils prédominent et sont définis par leur processus d'isolation de la lumière (fluorescente ou incidente) : spectrofluorimètres à filtres et spectrofluorimètres à monochromateur de diffraction optique. Par contre les deux types utilisent le mode de fonctionnement général suivant : une source d'excitation (exemple : laser, lampes, etc.) émet de la lumière qui va passer par un filtre ou un monochromateur, puis dans l'échantillon (Permyakov, 1993). Une partie de cette lumière peut alors être absorbée, induisant l'émission de la fluorescence de certaines molécules dans l'échantillon. Une partie de cette émission est ensuite concentrée sur un filtre ou un monochromateur, puis captée par un détecteur.

Entre 1995 et 2000, plus de 60 000 articles ont traité de la spectrofluorométrie, ce qui en fait une technique de mesure analytique très utilisée (Gore, 2000). La spectrofluorométrie est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon. Cette technique utilise une source de lumière, généralement de l'ultra-violet, pour exciter les molécules et engendrer une émission de lumière de basse énergie, souvent dans le domaine du visible. Les méthodes spectrofluorométriques de dosage des enzymes utilisant la spectrofluorométrie impliquent généralement une émission de fluorescence de la part d'un chromophore couplé de façon covalente au substrat à un endroit spécifique. Dans certains cas, un cofacteur enzymatique peut servir de chromophore fluorescent. Par exemple, le FAD (flavine adenine dinucleotide) est naturellement fluorescent dans sa forme oxydée, mais il ne

l'est pas dans sa forme réduite. Il est, entre autres, un cofacteur de nombreuses enzymes de type oxydase (cholestérol oxydase, glucose oxydase, etc.) (Xie et Lu, 1999).

Au cours des dernières décennies, plusieurs méthodes ont été développées pour doser les enzymes pancréatiques en utilisant des méthodes en fluorescence. Des substrats tels le N-méthyl-indoxyl myristate et le dilaurate de fluorescéine (Guilbault et Hieserman, 1969; Meyer-Bertenrath et Kaffarnik, 1968) ont été développés pour le dosage de la lipase. Les substrats fluorogéniques pour le dosage de l'alpha-amylase sont plus rares, mais par exemple, des dérivés p-nitrophenyl- α -maltopentaoside ont été synthétisés dans ce but (Omichi et Ikenaka, 1984). Les protéases pancréatiques ont été l'objet de plusieurs études sur de multiples substrats chromogéniques protéiques tels la β -caséine couplée au N-(7-diméthylamino-4-méthylcoumarinyl)-maléimide (DACM) et à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Farmer et Yuan, 1991) ou non protéiques tels le 6-aminoquinoline (Brynes, Andrade et Gordon, 1982).

Une méthode a été développée utilisant un dérivé 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) couplé à la caséine (Fig. 3.1), substrat naturel des protéases, pour évaluer l'activité protéolytique (Jones *et al.*, 1997). Ce chromophore ne présente aucun déplacement de fluorescence, même à un faible degré de couplage, et il peut être synthétisé pour une fluorescence verte comme la fluorescéine ou rouge comme le Texas Red. L'avantage de cette méthode est qu'elle a été développée pour être utilisée de manière continue, en cinétique, vu qu'elle ne nécessite pas d'étape de séparation du produit de la réaction catalytique et le substrat de départ (Fig. 3.1). Cette condition est avantageuse pour réaliser des méthodes rapides, efficaces et facilement applicables de manière automatisée en industrie. De plus, le substrat fluorogénique BODIPY a également fait l'objet d'une autre étude démontrant son application à de grands nombres d'échantillons et à faible volume, soit en microplaque (Menges *et al.*, 1997). Précédemment, des méthodes de dosage en fluorescence de la lipase, phospholipase et autre enzymes lipolytiques ont été décrites (Hendrickson, 1994). Entre autres, l'utilisation du chromophore BODIPY en fluorescence verte a été présentée pour le dosage d'activité enzymatique en continu pour ces enzymes. L'utilisation du même chromophore pour doser les enzymes pancréatiques serait un avantage

intéressant au niveau de la validation de méthodes et au niveau des coûts pour l'industrie. En 2005, l'utilisation d'un substrat chromogénique en fluorescence utilisant le composé BODIPY pour le dosage de l'amylase sanguine fut rapportée (Winston *et al.*, 2005). Le composé émettant en fluorescence verte, BODIPY-FL, a été couplé à trois substrats spécifiques à chacune des enzymes pancréatiques : aux triglycérides pour la lipase, à l'amidon de maïs soluble pour l'amylase et à la caséine pour les protéases.

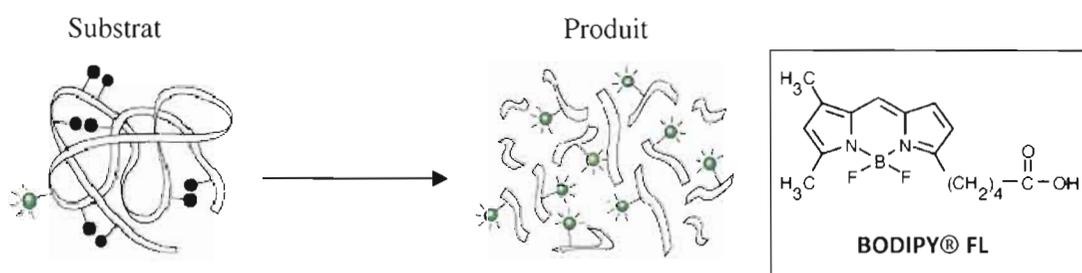


Figure 3.1 : Représentation schématique de l'action enzymatique sur un substrat couplé au chromophore fluorescent BODIPY (d'après www.invitrogen.com) où les molécules () sont séparés pour émettre la fluorescence ()

Les avantages reliés à ces composés, soit la possibilité de lecture en cinétique et la sensibilité des méthodes en fluorescence, ainsi que les avantages industriels et au niveau validation, suscitent l'intérêt pour ces substrats comme méthode alternative à celles recommandées par la Pharmacopée américaine, mais il faut au préalable évaluer leur capacité par rapport aux méthodes USP. L'objectif de ce projet de maîtrise a été de développer des méthodes de dosage des enzymes pancréatiques à partir des substrats commerciaux couplés au chromophore BODIPY en déterminant les conditions réactionnelles optimales ainsi que les paramètres cinétiques.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

L'objectif principal de ce projet a été d'optimiser des méthodes chromogéniques avec des substrats d'origine commerciale pour l'évaluation de l'activité enzymatique de chacune des enzymes pancréatiques pour des applications pharmaceutiques, dans le but d'obtenir une alternative adéquate à l'utilisation des méthodes de dosage recommandées par la Pharmacopée américaine (USP). Un autre objectif majeur a été d'établir les conditions expérimentales pour assurer un certain degré d'harmonisation des dosages pour les trois enzymes pancréatiques.

Des essais préliminaires ont été réalisés sur différentes méthodes pour chacune des enzymes pancréatiques et les méthodes utilisant des substrats chromogéniques avec le chromophore fluorescent BODIPY ont été sélectionnées pour leur performance et leurs avantages.

Par la suite, plusieurs objectifs spécifiques ont été déterminés pour le processus d'optimisation des ces méthodes :

- 1) Optimiser les différents paramètres réactionnels :
 - i) Sélection du tampon
 - ii) Concentration de ce tampon
 - iii) Présence de cofacteurs
 - iv) pH du milieu réactionnel
 - v) Température de la réaction

- 2) Déterminer les paramètres cinétiques :
 - i) Concentration optimale de substrat (courbe de saturation de Michaelis-Menten),
 - ii) Évaluation des constantes K_m , et V_{max} (double réciproque de Lineweaver-Burk)
 - iii) Concentration d'enzyme pour une réponse linéaire
 - iv) Temps de réaction

Suite à l'optimisation de chacune des méthodes associées aux enzymes pancréatiques, il était nécessaire d'évaluer leur potentiel d'utilisation comme remplacement des méthodes USP. Cette étude a été réalisée sur des échantillons de principes actifs d'extraits pancréatiques concentrés (PEC) dont les valeurs en activité enzymatique de chacune des enzymes ont été comparées en termes d'erreur relative (USP vs chromogéniques) et d'écart type relatif pour chaque méthode.

Une formulation pharmaceutique contient plus que le principe actif et c'est pourquoi l'évaluation de l'impact de la présence d'excipients dans les diverses formulations pharmaceutiques a été également réalisée par les deux méthodes en terme d'erreur relative (sans vs avec excipients). Les excipients évalués étaient ceux contenus dans deux formulations commerciales originales et communs pour l'industrie pharmaceutiques (désintégrants, liants, enrobants, etc.).

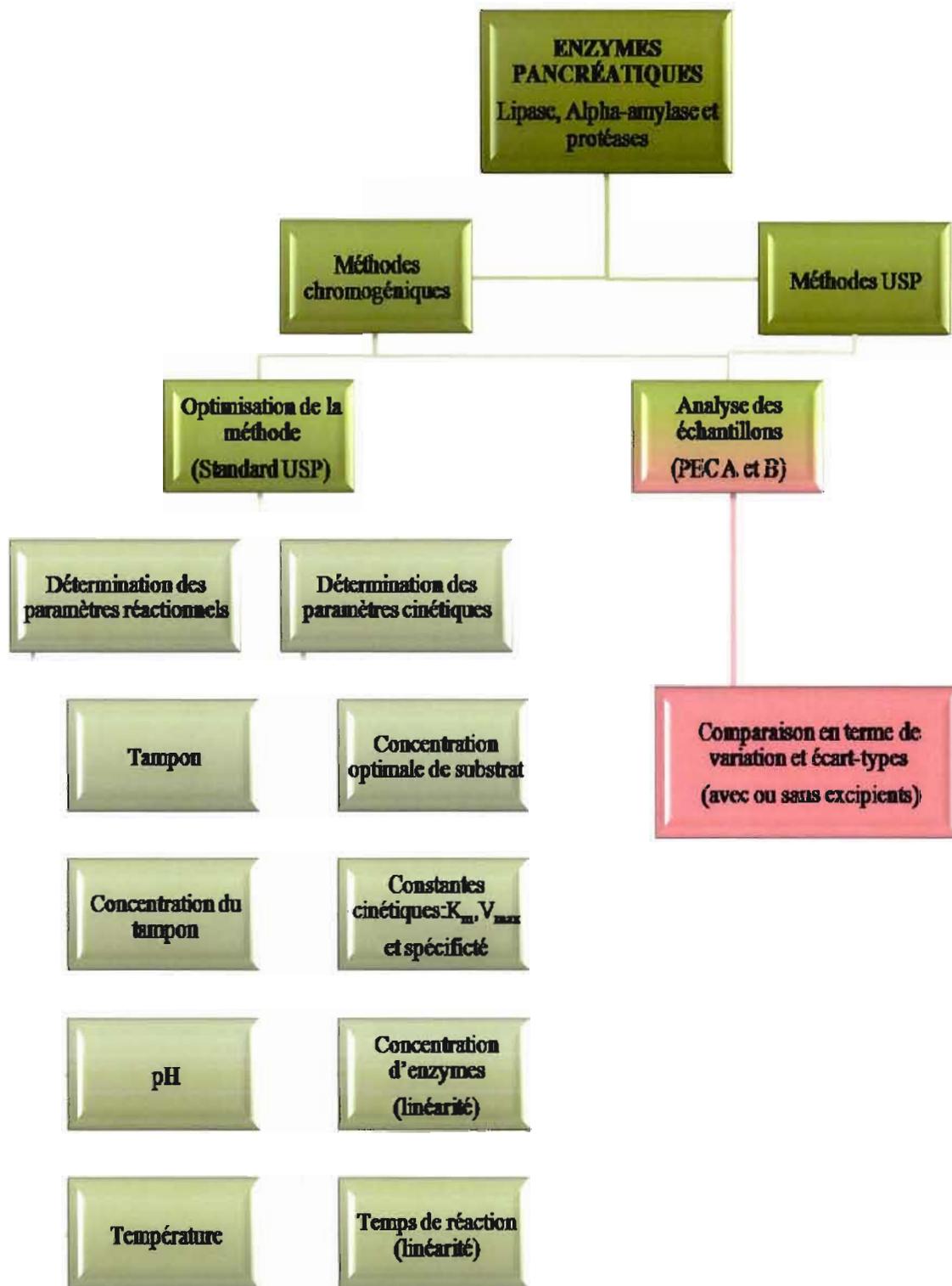


Figure 4 : Présentation schématique et de façon harmonisée des différentes étapes associées à chacune des trois enzymes pancréatiques étudiées dans le projet.

PARTIE II
PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

ARTICLE soumis à «Analytical method»

L'optimisation et l'harmonisation de méthodes chromogéniques pour l'évaluation des enzymes pancréatiques pour des applications pharmaceutiques

Dominique Demers¹, Francine Hamel², Erick Tessier², Pompilia Ispas Szabo^{1,2} et Mircea Alexandru Mateescu¹.

¹ Département de chimie et Centre BioMed, UQAM, Montreal, Canada

² Axcan Pharma, Mont-St-Hilaire, Canada.

Les enzymes pancréatiques sont utilisées comme supplément pour les patients souffrant d'insuffisance pancréatique exocrine. Cette étude montre le potentiel d'utilisation des méthodes chromogéniques en fluorescence pour le dosage de l'activité de la pancrélipase, vu leurs avantages. Les paramètres réactionnels tels que le type et la concentration du tampon, le pH, la température et les cofacteurs enzymatiques furent étudiés et optimisés, car ce sont des paramètres pouvant fortement influencer l'activité enzymatique de la lipase, de l'alpha-amylase et des protéases. Chaque méthode spécifique à une enzyme a été optimisée pour ces facteurs. Les paramètres cinétiques ont également été déterminés et les valeurs trouvées ont été respectivement 2,63, 11,56 et 15,46 $\mu\text{g/mL}$ pour les K_m et de 476,19, 138,89 et de 135,14 RFU/min pour les V_{\max} de la lipase, de l'alpha-amylase et des protéases. Les plages de concentration des enzymes ainsi que le temps de réaction permettant une évaluation précise ont été déterminés : 0.01 à 1 mU et 10 min de réaction cinétique de la lipase, 0.04 mU à 6 mU et 5-20 min de cinétique pour l'alpha-amylase et de 4 à 24 mU et 20-40 min de cinétique pour les protéases. Les écarts-types relatifs ainsi que les erreurs relatives des méthodes chromogéniques ont été évaluées et comparées aux valeurs trouvées par les méthodes de l'United States Pharmacopeia (USP). Elles ont été trouvées équivalentes pour les deux méthodes et aucune interférence significative n'a été trouvée entre l'enzyme et divers excipients communs (désintégrant, lubrifiants, liants, enrobant, etc.). En conclusion, ces méthodes chromogéniques en fluorescence peuvent être considérées adéquates pour l'évaluation de la pancrélipase, un principe actif pharmaceutique, et leurs avantages pour les analyses de dosages pharmaceutiques, tels la grande sensibilité, la rapidité et la simplicité d'utilisation, sont importants et d'intérêt à prendre en considération.

Chromogenic methods optimized for the evaluation of pancreatic enzymes in pharmaceutical applications

Dominique Demers¹, Francine Hamel^{1,2}, Érick Tessier², Pompilia Ispas-Szabo^{1,2} and
Mircea Alexandru Mateescu^{1*}

¹ Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Branch Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8

² Axcan Pharma Inc.,
597 Laurier Boulevard, Mont Saint-Hilaire (Québec) Canada, J3H 6C4

* Corresponding author

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

Chromogenic assays with fluorescent substrates were adapted for the harmonized evaluation of pancreatic enzymes in pharmaceutical preparations. Factors as buffer concentration, pH, temperature and cofactors were evaluated and found to have an impact on the enzymatic activity of lipase, amylase and proteases. The mentioned parameters were optimized for each standard of pancreatic enzyme. Kinetic constants were calculated for each enzyme and were respectively 2.63, 11.56 and 15.46 $\mu\text{g/mL}$ for the K_m and 476.19, 138.89 and 135.14 RFU/min for the V_{\max} of lipase, alpha-amylase and proteases. The ranges of application for the optimized chromogenic methods were found from 0.1 to 10 mU/mL of lipase kinetic assay for 10 min; from 0.4 mU to 60 mU/mL of alpha-amylase kinetic assay from 5 to 20 min and from 40 to 240 mU/mL for proteases kinetic assay from 20 to 40 min. Relative standard deviation for each assay as well as relative error between the chromogenic methods and the United States Pharmacopeia methods were evaluated with pancrealipase, and both statistical evaluations were found in limits acceptable in the pharmaceutical industry. No significant interferences with some common excipients were found with United States Pharmacopeia methods, nor with the chromogenic methods. In conclusion, the proposed chromogenic assays were considered adequate to pancrelipase evaluation for pharmaceutical dosages. Their advantages consist in high sensitivity, rapidity and user friendly.

Keywords: Chromogenic fluorescent assay, USP assays, lipase, alpha-amylase, proteases, pancrelipase

Introduction

The pancreatic juice containing pancreatic lipase, alpha-amylase and proteases, water, salts and sodium bicarbonate helps to degrade the alimentary bolus. The lipase (EC 3.1.1.3) catalyses the hydrolysis of triacylglycerols and other esters into free fatty acids ready to be absorbed. The alpha-amylase (EC 3.2.1.1) activity consists in the cleavage of the α -endo-1-4 glycosidic bonds of ingested polysaccharides to produce dextrin and maltose units. The pancreatic proteases, mainly trypsin (EC 3.4.21.4) and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) but also aminopeptidases, elastase and carboxypeptidase A and B, cleave the polypeptidic chain of the proteins at level of various amino acids specific to each protease [1].

Some diseases such as chronic pancreatitis, mucoviscidosis (cystic fibrosis) or pancreatic tumours may impede the pancreas to produce these enzymes, leading to an exocrine pancreatic insufficiency. Many clinical symptoms may occur, mainly loss of weight and steatorrhea. Indeed, lipase malfunction leads to malabsorption of fat and then of liposoluble vitamins A, D, E and K, associated with steatorrhea [2, 3].

This pancreatic insufficiency is primarily treated by supplements with enzymes. The enzymes of various sources (different species of bacteria, plants or animals) were used as active pharmaceutical ingredient (API)¹ in drugs. Pancreatic enzyme concentrates (PEC) extracted from pig's pancreas are used as replacement of the deficient digestive enzymes production. This therapy is aimed to provide an adequate amount of enzymes in the duodenal lumen of the patient. Orally administered enzymes (sensitive to gastric acidity), need to be protected by adequate gastro-resistant formulations [4, 5].

There is a continuously growing need of more efficient and safer drugs. USP monographs of pancreatin and pancrelipase describe in details the methods recommended to evaluate the composition of these pancreatic products containing lipase, amylase and proteases. The reference USP assay for lipase is a titrimetric method, requiring various equipments [6]. The USP amylase assay is based on Willstätter-Schubel procedure, a starch-iodine reaction [6, 7]. For proteases, USP assay recommends a spectrophotometric method using casein substrate followed by trichloroacetic acid (TCA) precipitation [6].

¹ Abbreviations used: Active pharmaceutical ingredient (API), pancreatic enzymes concentrate (PEC), United States Pharmacopeia (USP), trichloroacetic acid (TCA), Boron Dipyrromethene difluoride (BODIPY), sodium hydroxide and dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS), temperature coefficient (Q_{10}), United States Pharmacopeia National Formulary (USP-NF), relative standard deviation (RSD) and relative error (Δ).

Due to the fact that USP procedures are quite complicated and time consuming, it appeared of interest to investigate the use of chromogenic methods to evaluate the activity of pancreatic enzymes for a pharmaceutical purpose and compare the two approaches in terms of sensitivity of methods, duration of assays and required equipment.

Presently, several chromogenic substrates are commercially available for each of the three major pancreatic enzymes. They have been developed for clinical or research utilisation [8-11]. In these applications, the chromogenic methods demonstrated a good sensitivity and reproducibility [12, 13]. Fluorescent assays combine the accuracy of a kinetic assay, the sensitivity of fluorescence, and the ease of handling for each of the pancreatic enzyme assay. The chromogenic substrates were selected based on the affinity of the enzyme for a specific substrate (i.e. triacylglycerol for lipase, corn starch for amylase and casein for proteases) derivatized with the quenched fluorophore BODIPY-FL (Boron Dipyrromethene Difluoride) [13].

The aim of this study was to evaluate and to optimise the chromogenic methods based on the BODIPY-FL substrates for the three pancreatic enzymes: lipase, amylase and proteases. The critical conditions and kinetic parameters of the enzymatic reactions, as well as the potential impact of some common pharmaceutical excipients on the enzymatic activity assay were investigated. The optimized chromogenic methods were compared to the USP methods in terms of relative error (Δ) and relative standard deviation (RSD).

Materials and methods

USP standard of lipase (21.2 U/mg), USP standard of amylase and proteases (174 U/mg and 124 U/mg respectively) were purchased from USP (Rockville, MD, USA); Casein from bovine milk (C-5890), starch from potato (S2630), 0.1 N Iodine (35090), acacia (51201), olive oil (75343), bile salts (48305) and 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (M3183) were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). The trichloroacetic acid (TCA) (93610-340) and sodium thiosulfate (74888-380) from Anachemia (Montreal, QC, Canada); 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) from Bioshop (Burlington, ON, Canada); sodium hydroxide and dimethyl sulfoxide (DMSO) from EMD (Gibbstown, NJ, USA); magnesium chloride from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada) and calcium chloride from BDH Laboratory supplies (Dorset, UK) were reagent grade and used without further purification. Enzcheck lipase green fluorescent substrate (E33955), Enzcheck Ultra Amylase assay kit containing sodium acetate (E33651) and Enzcheck Ultra Protease assay kit (E6638) were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Common excipients (microcrystalline cellulose PH-101, crosscarmellose sodium type A, Lactose monohydrate, castor oil hydrogenated, colloidal silicon dioxide, talc, magnesium

stearate, stearic acid, triethyl citrate and hydroxypropyl methylcellulose phthalate) were provided by Axcan Pharma, as well as pancreatic enzymes concentrate PEC A (52.5 U/mg of lipase, 329 U/mg of amylase, 286 U/mg of proteases) and PEC B (89.0 U/mg of lipase, 336 U/mg of amylase 342 U/mg of proteases).

The fluorimetric assays were carried out using a Tecan Infinite M-200 (Tecan, Durham, DC, USA).

Chromogenic methods

Lipase assay. The Enzcheck lipase green fluorescent substrate (E33955) was dissolved, following the manufacturer instructions, in DMSO to 100 $\mu\text{g/mL}$ and subsequently diluted to 3.85 $\mu\text{g/mL}$ in Tris buffer solution (100 mM, pH 8.0) containing CaCl_2 (1 mM). It was then mixed to a 1:1 ratio with the enzymatic solution in the well of a 96 well plate and read in kinetic conditions (RFU/min) with the Tecan infinite M-200 spectrofluorimeter at 485 nm (excitation) and at 538 nm (emission) for 10 min at 36 ± 0.5 °C. Calculations were made on results observed between 5 and 10 min of reaction.

Amylase assay. The Enzcheck DQ starch amylase substrate contained in the Enzcheck Ultra Amylase assay kit (E33651) was dissolved, as suggested by the manufacturer, in a minimal volume of sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.0) and then, diluted to 1 mg/mL with MOPS buffer solution (50 mM, pH 7.4) containing CaCl_2 (2.5 mM). The substrate solution was diluted to a working concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ in the same buffer. It was then mixed to a 1:1 ratio with the enzymatic solution in the well of a 96 well plate and read in kinetic conditions (RFU/min) with the Tecan Infinite M-200 spectrofluorimeter at 485 nm (excitation) and at 538 nm (emission) for 20 min at 36 ± 0.5 °C. Calculations were made on results observed between 10 and 20 min of reaction.

Proteases assay. The Enzcheck casein chromogenic substrate contained in the Ultra Protease assay kit (E6638) working solution (30 $\mu\text{g/mL}$) was prepared, as indicated by the manufacturer, by diluting the stock solution 200 $\mu\text{g/mL}$ in the same Tris buffer solution (100 mM, pH 8.0). It was then mixed in a 1:1 ratio with the enzymatic solution in the well of a 96 well plate and read in kinetic conditions (RFU/min) with the Tecan Infinite M-200 spectrofluorimeter at 485 nm (excitation) and at 538 nm (emission) for 40 min at 36 ± 0.5 °C. Calculations were made on results observed between 20 and 40 min of reaction.

The optimization assays were done with USP standard enzymes as described previously except for some modifications as follows. An optimized parameter once established was kept for the subsequent analyses.

Optimization of the buffer concentration

Lipase assay. Lipase activity of 0.2 mU USP was assayed in Tris buffer (pH 7.8) at various concentrations ranging from 10 to 100 mM, with 5 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic Enzcheck substrate following manufacturer instructions at 25 ± 0.5 °C.

Amylase assay. Alpha-amylase activity of 3 mU USP was evaluated in MOPS buffer (pH 6.9) at concentration ranging from 10 to 100 mM, with 200 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic Enzcheck substrate at 25 ± 0.5 °C.

Proteases assay. Protease activity of 8 mU USP was evaluated in Tris buffer (pH 7.8) at concentrations in the range of 10 to 200 mM, with 10 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic Enzcheck substrate 25 ± 0.5 °C.

Optimization of the influence of effectors

Lipase assay. Lipase activity of 0.2 mU USP was evaluated as described in section 2.1 in the absence or in presence of 0.25 to 30 mM of CaCl_2 or MgCl_2 in the Tris buffer solution (pH 7.8). The assay was carried out with 5 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (Enzcheck E33995) at 25 ± 0.5 °C.

The influence of 0.1 to 1% of bile salts added to the lipase enzymatic solution was evaluated keeping constant the other assay parameters.

Amylase assay. Various amounts of CaCl_2 (to get concentrations of 0.25 to 5 mM) were added to MOPS buffer solution (pH 6.9) containing 3 mU USP of alpha-amylase. The assay was carried out as described in section 2.1 with 200 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (Enzcheck E33651) at 25 ± 0.5 °C.

Assay of Proteases. Proteolytic activity of 8 mU USP was evaluated as described in section 2.1 in Tris buffer solution (pH 7.8) containing various concentrations (0.25 to 30 mM) of CaCl_2 and 10 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (Enzcheck E6638) at 25 ± 0.5 °C.

Optimal temperature determination

Lipase assay. Lipase activity of 0.2 mU USP in lipase buffer (pH 7.8) in presence of chromogenic lipase (E33995) substrate concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ was conducted as described in section 2.1 at various temperatures from 25 ± 0.5 °C to 40 ± 0.5 °C.

Amylase assay. Alpha-amylase activity of 3 mU USP in amylase buffer solution (pH 6.9) with 200 $\mu\text{g/mL}$ of substrate (E33651) was evaluated as described in section 2.1 at temperatures varying from $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ to $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Assay of Proteases. Proteolytic activity of 8 mU USP in protease buffer solution (pH 7.8) was evaluated as described in section 2.1 at temperatures ranging from $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ to $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The assay was done in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of substrate (E6638).

Optimization of the reaction pH

Lipase assay. Tris buffer solutions prepared at pH ranging from 7.4 to 9.0 and were used to prepare the enzymatic solutions of 0.2 mU USP lipase. The assays were carried out as described in section 2.1 in presence of 5 $\mu\text{g/mL}$ of lipase chromogenic substrate.

Amylase assay. The activity of 3 mU USP alpha-amylase was evaluated in MOPS buffer at different pH between 6.8 and 7.8. The assays were carried out as described in section 2.1 with 200 $\mu\text{g/mL}$ of amylase chromogenic substrate.

Assay of Proteases. The enzymatic activity of 8 mU USP proteases was evaluated as described in section 2.1 in Tris buffer adjusted with NaOH to different pH varying from 7.0 to 8.4 and the assay was done with 10 $\mu\text{g/mL}$ of protease chromogenic substrate.

Determination of optimal substrate concentration and kinetic constants

Michaelis-Menten saturation curves were obtained for each enzyme (USP standard lipase, USP standard amylase and proteases) with the proper substrate. Kinetics curves for lipase were obtained as described in section 2.1 with 0.2 mU USP lipase in presence of the chromogenic substrate (E33995) at concentrations varying from 0.6 to 10 $\mu\text{g/mL}$. For alpha-amylase, the kinetics with 3 mU USP was followed as described in section 2.1 with chromogenic substrate at concentrations in the range of 4 to 400 $\mu\text{g/mL}$. Finally, kinetics with 8 mU USP proteases was followed as described in section 2.1 in presence of 8 to 100 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate. The double reciprocal plots of Lineweaver Burk were traced and kinetic constants K_m , V_{max} as well as the specificity constant (V_{max}/K_m) were determined from the equation:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

The enzyme concentration range and time of measurement for the linearity of the enzymatic assays

Optimized chromogenic assays were performed as described in section 2.1 for the three enzymes at various concentrations: 0.1 to 50 mU USP/mL for lipase, 0.4 to 300 mU USP/mL for alpha-amylase and 4 to 5000 mU USP/mL for proteases.

The enzymatic reactions of 10 mU USP/mL of lipase, 60 mU USP/mL of amylase and 240 mU USP/mL of proteases were each followed as described in section 2.1 with their respective chromogenic substrates for 40 or 60 min.

USP methods

The chromogenic methods for each enzyme were calibrated versus the corresponding USP method described in The United States Pharmacopeia National Formulary (USP-NF) [9]. In the present study they were applied as follows:

Lipase USP assay is a titrimetric procedure. The substrate emulsion was prepared by homogenization of olive oil with arabic gum solution (10% in water) and deionised cold water in a 10:82.5:7.5 ratio (v/v). The substrate was then diluted 10:29 (v/v) in Tris buffer (1.37 mM pH 8.0) containing bile salts (0.55% w/v), warmed to 37 ± 0.1 °C and then, the pH was adjusted to 9.0. An aqueous enzymatic solution in an appropriate concentration range was added to this assay medium. The release of the fatty acid was continuously monitored by titration with NaOH (0.1 M) over a duration of 5 min, keeping the pH 9.0. One lipase USP unit contains the amount of enzyme that liberates 1.0 meq of fatty acids per min at pH 9.0 and 37 °C under the conditions of the assay.

Amylase assay is a back titration of the complex formed by iodine and amylose. The enzyme was dissolved in the adequate concentration range in potassium phosphate buffer (200 mM, pH 6.8) and then added in a ratio 25:36 (v/v) to the substrate solution obtained with dried potato starch (0.7%) and NaCl (5.6 mM) in phosphate buffer (55.5 mM, pH 6.8) and kept at 25 ± 0.1 °C for 10 min. The reaction was then stopped, in order, with HCl (1 M), iodine (0.1 N) and NaOH (0.1 M) and placed in the dark. After 15 min, sulphuric acid (2 N) was added to the reaction solution and then, titrated with thiosulfate (0.1 N). One amylase USP unit contains the amount of enzyme that decomposes starch at an initial rate such as to hydrolyse 0.16 meq of glycosidic linkage per min, under the conditions of the assay.

The assay of proteases assay is based on the fact that tyrosine amino acid can be detected by spectrophotometry. The protease enzyme preparation in the adequate concentration range, dissolved in a

potassium phosphate buffer (5 mM, pH 7.5) and equilibrated to 40 ± 1 °C, was added to the casein substrate (1.25 % in water) in a 3:5 (v/v) ratio and maintained at the same temperature for 1h. The reaction was stopped with TCA (5%), filtered and read at 280 nm. One proteases USP unit contains the amount of enzymes that hydrolyze casein at an initial rate such as to liberate per min an amount of peptides not precipitated by TCA that gives the same absorbance at 280 nm as 15 nmol of tyrosine under the conditions of the assay.

Potential interference between enzymes and pharmaceutical excipients

The different lots of active (PEC A and B) were first evaluated with both USP and chromogenic methods in terms of relative error (variation between enzymatic activity found by USP and by chromogenic methods) and of relative standard deviation (RSD). Secondly, to evaluate the possible interference generated by the pharmaceutical formulations, the PEC A and the PEC B were each mixed with various excipients, in different proportions to obtain two separate blends (PEC A and excipients and PEC B and excipients) that were then determined with the USP and the chromogenic methods and evaluated in terms of relative error (variation between enzymatic activity with and without excipients) and of RSD.

Results and discussion

The Enzcheck Invitrogen chromogenic methods for lipase, amylase and proteases, were optimized using USP standard enzymes for the assay of pancreatic enzymes in pharmaceutical preparations, which, to the best of our knowledge, appears as a novel use. Our approach consisted first in the determination of the critical parameters and of the optimal conditions of the enzymatic reactions with USP standard of each studied pancreatic enzyme. Furthermore, since the kinetic parameters are specific characteristics of enzymes the K_m , V_{max} and K_m/V_{max} were determined for each pancreatic enzyme by the chromogenic methods. Substrate saturation (condition essential to obtain linearity of the enzyme assay), the range of enzyme concentrations and the time of the assay were investigated, optimised and harmonized for the three pancreatic enzymes and allowed to establish the detection limits of the method, the reproducibility, the precision, the accuracy and the repeatability of an enzymatic assay.

Optimization of the buffer concentration

The majority of lipase assays use the Tris as buffer because of its basicity (pKa: 8.06 at 25 °C) and buffering capacity between pH 7.5 and 9.0, adequate for pancreatic lipase. We have evaluated the lipase activity in 10 to 100 mM Tris buffers, as suggested for other chromogenic and USP method [6, 14].

The lipase activity was found stable for this range of concentration (Table 1). The activity of proteases is also known to be effective in Tris buffer [15] whereas other methods recommend the phosphate buffer [16]. Our assay with these two buffers did not show significant differences in the enzyme activity for the same enzyme concentration (Table 1). Therefore, the Tris buffer was selected in order to harmonise the assay for the three enzymes. Optimal activity was found with 90 to 110 mM Tris buffer (Table 1). For lipase and protease assays, a working concentration of 100 mM Tris was retained since it allows the optimal activity of both lipase and proteases. The optimal pH for alpha-amylase is slightly lower, around pH 6.9 [17]. The phosphate buffer is often used due to its buffering capacity ranging from pH 6.0 to 9.0 [18]. MOPS buffer (pKa: 7.20 at 25 °C) with a buffering range from 6.5 to 7.9 is also recommended for the amylase assay as specified by the chromogenic substrate supplier (Invitrogen). Our analysis of amylase activity in both Phosphate and MOPS buffers gave similar results (Table 1). MOPS buffer at concentration from 10 to 100 mM gave similar amylase activity (Table 1). Thus, the MOPS buffer at a concentration of 50 mM (suggested by Invitrogen) was selected for amylase chromogenic assay.

Optimization of the influence of cofactors

Many enzymes cannot tolerate high salt concentrations due to the interference by of external ions with the weak ionic bonds of proteins and to hydration/dehydration phenomena. Enzymes generally are active in salt concentrations of 1-500 mM. Effectors are often essentials for enzymes activity. Several cofactors (such as colipase) and effectors (bile salts and calcium ions) are associated to lipase activity. The presence of calcium ions is important for the lipase activity [19]. Magnesium ions have also been suggested to act the same way, but with lower affinity. In the lipase chromogenic assay, the presence of as low as 0.25 mM calcium ions increased the lipase activity by 1.5 fold, whereas same results was obtained with 4 mM of magnesium ions(Fig. 1A). On the other hand, addition of bile salts interferes with the substrate in concentration of 0.1 to 1% (24mM) with a maximal interference at 0.5% (Fig. 1B). Indeed, below the critical micellar concentration (CMC), bile salts tend to form micelles including the triglycerides based chromogenic substrate. This caused a disruption in the quenching of substrate and the fluorescence increased in the blank sample (a value higher than in the enzyme sample. When CMC is reached (around 0.5%), this interference started to decrease and at 1.0 % of bile salts, lipase activity was fully recovered. Pancreatic alpha-amylase is it is a metalloenzyme [20] that binds the calcium tightly between pH 6.0 and pH 9.0. Therefore, the presence of calcium ions (one per enzyme molecule) is essential for its activity. An optimal alpha-amylase activity was found with 2.5 mM of CaCl₂ (Fig. 1C). Calcium is also known to be a cofactor of trypsin and chymotrypsin as main pancreatic proteases [21, 22]. In our case, an inhibition of proteases activity was observed even at a low concentration (0.25 mM CaCl₂) with the chromogenic method. Further studies are needed to understand this phenomenon.

Determination of the optimal temperature

All enzymes work within a certain range of temperature. Increasing temperature generally leads to increase in reaction rates, up to a limit; then, further increase of temperature leads to a sharp decrease in reaction rates due to the denaturation of protein structure. The optimal temperature for human enzymes is usually between 35 and 40 °C. The influence of the temperature was investigated from ambient temperature (25 °C) to 40 °C. The three pancreatic enzymes were more effective around physiological temperature with a plateau observed between 35 and 37 °C (Fig. 2). This kind of plateau has been observed for other enzymes too [23]. A temperature of 36 ± 0.5 °C within the plateau was selected for each enzyme in order to minimise the influence of the temperature variation on the enzymatic reaction and to thus optimize and harmonize the chromogenic assay.

The temperature coefficient (Q_{10}) has been calculated for each enzyme. Various values were obtained with the chromogenic methods: Q_{10} of 2.08 for proteases and 1.7 for lipase from 25 to 35 °C as well as 1.38 for alpha-amylase between 30 and 40 °C. Same proteases coefficient Q_{10} of 1.7 has been reported [24]. Alpha-amylase Q_{10} of 1.45 appears lower than expected value of 2 and determined of 2.085 in chicken by DeGolier *et al.*[25]. Lipase Q_{10} 2.08 is higher than 1.27 reported by Loiselle [26] for the same temperature range. The enzyme's species or the assay conditions may be responsible for the difference between our obtained Q_{10} and literature values. It is worth to note that proteases Q_{10} value determined with the chromogenic method fits well with the Q_{10} value determined with other methods suggesting that fluorescent substrate give unaltered result in term of Q_{10} . An overall increase in the activity was observed between 37 and 40 °C for each of the three enzymes. Thus, it appears that, above 37 °C, the activity of each enzyme is not linearly dependent of the temperature. Nakonieczny *et al.* already observed this phenomenon for the pancreatic proteases [27]. However, further investigation is still needed to explain this phenomenon for the three enzymes.

Optimization of the reaction pH

Most enzymes are sensitive to pH and have specific ranges of activity. All have an optimal pH. The pH can stop enzyme activity by denaturing the tridimensional shape of the enzyme. Many enzymes function between pH 6 and 8. Variation of the pH affects the enzyme conformation and may also alter the shape or charge properties and interactions with the substrate. Thus, either the substrate cannot bind to the active site nor undergo catalysis. Enzymatic assays can be optimized by determining the optimal pH for the enzymatic reaction. Pancreatic lipase is known to have an optimal pH from 7.5 to 8.9 [28]. The

chromogenic assay revealed a lack of pH sensitivity in this range, as specified by the supplier (Table 1). Alpha-amylase assay showed a plateau of the enzymatic activity between pH 7.0 and 7.6 (Table 1). Thus, a variation of pH in this range will not generate modifications of enzyme activity. The proteolytic activity increased from pH 6.8 to 7.8 and it was then stabilized up to pH 8.2 (Table 1). The optimal pH of proteases corresponds to the literature value around 8.0 [29]. Accordingly, the pH values for our chromogenic assays were chosen in their optimal range recommended as giving more constant results such as pH 7.4 for amylase and pH 8.0 for lipase and protease assays.

Determination of optimal substrate concentration and kinetic constants

Lipase saturation curve (Fig. 3A) showed an increase in fluorescence (RFU/min) rate with the chromogenic substrate concentration up to 3.7 $\mu\text{g/mL}$, and followed by a sharp decrease starting at 3.9 $\mu\text{g/mL}$. The double reciprocal Lineweaver-Burk plotting obtained from these results (insert Fig. 3A) graphically suggested a substrate inhibition. On the other hand, this may be caused by quenching known to occur in fluorescence assays at high fluorogenic substrate concentrations, in addition or not to a real inhibition by substrate interaction [30, 31]. Similar saturation curve was observed for the alpha-amylase (Fig. 3B) for a chromogenic substrate concentration up to 24 $\mu\text{g/mL}$ followed by a similar decrease in fluorescence rate at 32 $\mu\text{g/mL}$, as observed for lipase. Saturation curve for proteases also revealed this decrease after the plateau of saturation observed from 28 to 50 $\mu\text{g/mL}$. Lineweaver-Burk graph of alpha-amylase (insert in Fig. 3B) and for proteases (insert in Fig. 3C) showed graphs suggesting an apparent inhibition by substrate, similar to lipase. Given these similar profiles for each enzyme, it is likely that the apparent decrease of fluorescent rate was due to a fluorescence quenching. It was therefore important to select a substrate concentration that saturates the enzyme, while minimizing the fluorescence quenching. Thus, a chromogenic substrate concentration of 3.85 $\mu\text{g/mL}$ was selected for lipase and 30 $\mu\text{g/mL}$ for alpha-amylase and proteases. Table 2 gives the kinetic parameters found for the three pancreatic enzymes by the chromogenic methods and calculated from the Lineweaver-Burk graphs. Michaelis constants (K_m) obtained were 2.63 $\mu\text{g/mL}$ for lipase, 11.56 $\mu\text{g/mL}$ for alpha-amylase and 15.46 $\mu\text{g/mL}$ for proteases. The maximal velocity (V_{max}), a steady state when all the active site is bound with substrate were 476.19 RFU/min/mU for lipase, 138.89 RFU/min/mU for alpha-amylase and 135.14 RFU/min/mU for proteases. Again, it is worth to mention that the kinetic constants for proteases are representative for a proteolytic activity rather than for a particular trypsin or chymotrypsin. Although in case of

proteases, the K_m value is rather apparent (given for two enzymes) its evaluation is useful, particularly for pharmaceutical formulations where proteolytic enzymes are not separated.

The enzyme concentration range and time of measurement for the linearity of the enzymatic assays

The velocity of the enzymatic reaction is expected to be directly dependent on the enzyme concentration, provided the substrate saturating conditions. At optimal substrate concentration, lipase has a high affinity for its chromogenic substrate (Table 1). The range of enzyme concentration giving a linear answer ($R^2 = 0.998$) in the lipase assay was relatively short and low, ranging from 0.1 to 10 mU/mL (Fig. 4A). Alpha-amylase presented a linear rate for enzyme concentrations from 0.4 to 60 mU/mL with a coefficient of correlation $R^2 = 0.997$ (Fig. 4B). Finally, proteases concentration giving a linear response ($R^2 = 0.993$) was from 40 to 240 mU/mL of enzyme (Fig. 4C).

The optimized chromogenic assays can be applied as kinetic methods or as end-point if the evaluation occurs in the linear range of enzyme concentration and time of reaction. Lipase demonstrated a good linearity of reaction ($R^2 = 0.999$) for the first 10 min of reaction for an enzyme amount of 0.1 up to 1 mU/mL (Fig. 5A). Alpha-amylase activity showed a kind of short lag phase in the first min followed by a linear response between 5 and 20 min (Fig. 5B). The protease pattern is slightly different. Although, an overall close to linear time dependency was found over one hour, the reaction time course with this chromogenic substrate can be observed in three separated phases: one from 0 to 20 min, a second from 20 to 40 min and the third between 40 and 60 min (Fig. 5C). Therefore, proteases presented three reaction rates for an equal duration. The second phase of reaction was retained as ensuring precision (lower standard deviation) and easy handling (the method remains faster, measuring RFU/min for about 5 min), but any of those linearity ranges may be chosen.

Comparative studies between Chromogenic and USP methods

To evaluate these chromogenic assays, PECs as active pharmaceutical ingredients (API) present in pancreatic enzymes commercial formulations were quantified with both Chromogenic and USP methods. Values were compared in terms of variation (difference between the two results) and standard deviation. The relative error between chromogenic and USP methods were less than 4.32 % for amylase and for lipase with the two different PECs. On the other hand, in the case of proteases determined by the two methods, PEC B gave similar results with a relative error of 0.55% whereas the relative error in the case of the PEC A was 5.19% (Table 3). Relative standard deviations for all the assays with both methods were contained within the industrial currently acceptable range of 5 % for lipase and 7% for amylase and

proteases (Table 3). All these results seem to indicate that the chromogenic assays, optimized as hereto described may be applicable for the pancreatic enzyme evaluation with the same precision as the current USP methods. Complete validation will be further realized as a next project.

Potential interference between enzyme and pharmaceutical excipients

Pharmaceutical formulations are essential to ensure the API delivery at the right place in an active form. Therefore, it is important to verify if the excipients present in such formulations would interfere or not with the new chromogenic substrates. Two model formulations containing common pharmaceutical excipients previously mentioned (Material and methods section 2.1), were reconstituted in blends with respective PECs and the enzymatic activities were then evaluated. The results were compared with the initial enzyme units content for each enzyme in the respective PEC grade by using the same method and the relative errors were determined. Again, all the RSD values were contained within the frame of acceptable range indicating that, even in the presence of excipients, the precision of the both chromogenic and USP methods seem to be equivalent (Table 3). The enzymatic activities evaluated in the both model reconstituted formulations with excipients were very close (relative error between 4.87 % and 0.19 %) to the values found with the active (PEC A and B) dosed without excipients. Even if some relative errors were slightly higher with USP method, they were not significantly different and all values were contained in the acceptable range of precision of the methods (RSD from 5 to 7 %) showing no significant interferences between enzymes and excipients of the two model formulations when the both chromogenic and USP methods were used.

Conclusion

This analytical study shows the potential and the limits of the chromogenic methods with the fluorescent BODIPY specific substrates for the pancreatic enzymes. In our optimized conditions, variation and standard deviation obtained with the chromogenic assays were equivalent to those of the USP methods for the evaluation of pancreatic lipase, amylase and proteases in pharmaceutical formulation. The fluorescent chromogenic methods presented, when compared to the USP assays, several advantages such as simplicity and easy handling, rapidity of execution and lower number of steps. These methods were found useful to quantify the enzymes as API and in the presence of common excipients generally used in preparation of finished pharmaceutical products.

Acknowledgments

The author thanks Axcan Pharma Inc for its financial support and Dr. Yves Dumoulin for his interest and implication in the research project. The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Quebecois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) are gratefully acknowledged for scholarship awarded to Dominique Demers. Collaboration of Marc Lemieux and members of Dr. Mateescu's laboratory was greatly appreciated.

References

- [1] D.J. Randall, W.W. Burggren, K. French and R. Eckert in *Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations*. W.H. Freeman and Co., New York, 1997.
- [2] M. Ferrone, M. Raimondo and J.S. Scolapio, *Pharmacotherapy*, 2007, 27, 910-920.
- [3] J.L. Frossard, T. Nicolet, *Forum Med Suisse*, 2007,7, 75-80.
- [4] A. Aloulou, D. Puccinelli, J. Sarles, R. Laugier, Y. Leblond and F. Carrière, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2008, 27, 283-292.
- [5] E. Lebenthal, D.D.K. Rolston and D.S. Holsclaw Jr, *Pancreas*, 1994, 9, 1-12.
- [6] United States Pharmacopeial Convention, *Pancreatin. Pancrelipase*, in USP-NF. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Md., 2000.
- [7] J.R. Ross and M.M. Shaw, *J. Biol. Chem.*, 104 (1934): 131-139.
- [8] J. Fenton, R. Foery, L. Piatt and K. Geschwindt, *Clin. Chem.*, 1982, 28, 704-706.
- [9] V.M. Gabert and M.S. Jensen, *Pancreas*, 1997, 15, 183-190.
- [10] H.S. Hendrickson, *Anal. Biochem.*, 1994, 219, 1-8.
- [11] D.A. Menges, D.L. Ternullo, A.L. Tan-Wilson and S. Gal, *Anal. Biochem.*, 1997, 254, 144-147.
- [12] F. Beisson, A. Tiss, C. Rivière and R. Verger, *Eur. J. Lipid Sci. and Technol.*, 2000, 102, 133-153.
- [13] L.J. Jones, R.H. Upson, R.P. Haugland, N. Panchuk-Voloshina and M. Zhou, *Anal. Biochem.*, 1997, 251, 144-152.
- [14] S. Kurooka, S. Okamoto and M. Hashimoto, *J. Biochem.*, 1977, 81, 361-369.
- [15] S.S. Twining, *Anal. Biochem.*, 1984, 143, 30-34.
- [16] S. Naz, R. Siddiqi and S.A. Sayeed, *Food Chem.*, 2001, 73, 381-384.
- [17] K. Ishikawa, I. Matsui, S. Kobayashi, H. Nakatani, and K. Honda, *Biochemistry*, 1993, 32, 6259-6265.
- [18] E. Fuguet, M. Reta, C. Gibert, M. Rosés, E. Bosch and C. Ràfols, *Electrophoresis*, 29, 2841-2851.
- [19] H. Kimura, Y. Futami, S. Tarui and T. Shinomiya, *J. Biochem.*, 1982, 92, 243-251.
- [20] G. Buisson, E. Duée, R. Haser and F. Payan, *EMBO J.*, 1987, 6, 3909-3916.
- [21] R. Balti, A. Barkia, A. Bougatef, N. Ktari and M. Nasri, *Food Chem.*, 2009, 113, 146-154.
- [22] M. Castaneda-Agullo, L.M. del Castillo, J.R. Whitaker and A.L. Tappel, *J. Gen. Physiol.*, 1961, 44, 1103-1120.

- [23] Befani, O., S. Sabatini, M. A. Mateescu and B. Mondovi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163, 1168-1174.
- [24] M.G. El-Shemy and R.E. Levin, *Journal of Food Biochemistry*, 1997, 21, 163-175.
- [25] T.F. DeGolier, A.R. Place, G.E. Duke and R.E. Carraway, *J. Exp. Zool.*, 1999, 283, 455-462.
- [26] D.S. Loiselle, *Eur. J. Physiol.*, 1985, 405, 163-169.
- [27] M. Nakonieczny, K. Michalczyk and A. Kedziorowski, *C. R. Biol.*, 2007, 330, 126-134.
- [28] F. Kartal, A. Akkaya and A. Kilinc, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, 55-61
- [29] H. Kishimura, K. Hayashi, Y. Miyashita and Y. Nonami, *Food Chem.*, 2006, 97, 65-70.
- [30] M. Nishikata, K. Suzuki, Y. Yoshimura, Y. Deyama and A. Matsumoto, *Biochem. J.*, 1999, 343, 385-391.
- [31] S.B. Peng, F. Zheng, E.L. Angleton, D. Smiley, J. Carpenter and J.E. Scott, *Anal. Biochem.*, 2001, 293, 88-95.

Figures captions

Figure 1: Influence of cofactors on pancreatic enzyme activity. Effect of magnesium (\diamond) and calcium ions (\blacklozenge) (A) and of bile salts (B) on lipase activity. Effect of calcium ions on the activity of amylase (C) and of proteases (D). Assays have been carried out with 5 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E33995) for 0.2 mU of lipase (100mM Tris pH7.8), 200 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E33651) for 3 mU of amylase (50mM MOPS pH 6.9) and 10 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E6638) for 8 mU of proteases (100mM Tris pH 7.8) in a final volume of 100 μL at 25 ± 0.5 °C. The increase in fluorescence was monitored continuously at 538 nm for 10, 20 and 40 min for lipase, amylase and proteases respectively. All assays were realized in triplicate for each point.

Figure 2: Influence of the temperature from 25 to 40 °C on the activities of lipase (A), amylase (B) and proteases (C). Assays have been carried out with 5 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E33995) for 0.2 mU of lipase (100 mM Tris pH 7.8 containing 1mM CaCl_2), 200 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E33651) for 3 mU of amylase (50 mM MOPS pH 6.9 containing 2.5 mM CaCl_2) and 10 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E6638) for 8 mU of proteases (100 mM Tris pH 7.8) in a final volume of 100 μL . The increase in fluorescence was monitored continuously at 538 nm for 10, 20 and 40 min for lipase, amylase and proteases respectively. All assays were realized in triplicate for each point.

Figure 3: Substrate concentration and kinetic curves for lipase (A), amylase (B) and proteases (C) with corresponding Lineweaver-Burk double reciprocal plots inserted (\diamond activity and \blacklozenge linearity range). Assays have been carried out with 0.2 mU of lipase (100 mM Tris pH 7.8 containing 1mM CaCl_2), 3 mU of amylase (50 mM MOPS pH 6.9 containing 2.5 mM CaCl_2) and 8 mU of proteases (100 mM Tris pH 7.8) in a final volume of 100 μL at 37 ± 0.5 °C. The increase in fluorescence was monitored continuously at 538 nm for 10, 20 and 40 min for lipase, amylase and proteases respectively. All assays were realized in triplicate for each point.

Figure 4: Dependency of the reaction rate in function of the concentration of lipase (A), amylase (B) and proteases (C) (\diamond activity and \blacklozenge linearity range). Assays have been carried out with 3.85 $\mu\text{g/mL}$ of chromogenic substrate (E33995) for lipase (100 mM Tris pH

7.8 containing 1mM CaCl₂), 30 µg/mL of chromogenic substrate (E33651) for amylase (50 mM MOPS pH 6.9 containing 2.5 mM CaCl₂) and 30 µg/mL of chromogenic substrate (E6638) of proteases (100 mM Tris pH 7.8) in a final volume of 100 µL at 36 ± 0.5 °C. The increase in fluorescence was monitored continuously at 538 nm for 10, 20 and 40 min for lipase, amylase and proteases respectively. All assays were realized in triplicate for each point.

Figure 5: Establishment of the reaction time for kinetic measurements of lipase (A), amylase (B) and proteases (C) activities (◇ activity and ◆ linearity range). Assays have been carried out with 3.85 µg/mL of chromogenic substrate (E33995) for 2 mU/mL of lipase (100 mM Tris pH 7.8 containing 1mM CaCl₂), 30 µg/mL of chromogenic substrate (E33651) for 30 mU/mL of amylase (50 mM MOPS pH 6.9 containing 2.5 mM CaCl₂) and 30 µg/mL of chromogenic substrate (E6638) for 80 mU/mL of proteases (100 mM Tris pH 7.8) in a final volume of 100 µL at 36 ± 0.5 °C. The increase in fluorescence was monitored continuously at 538 nm. All assays were realized in triplicate for each point.

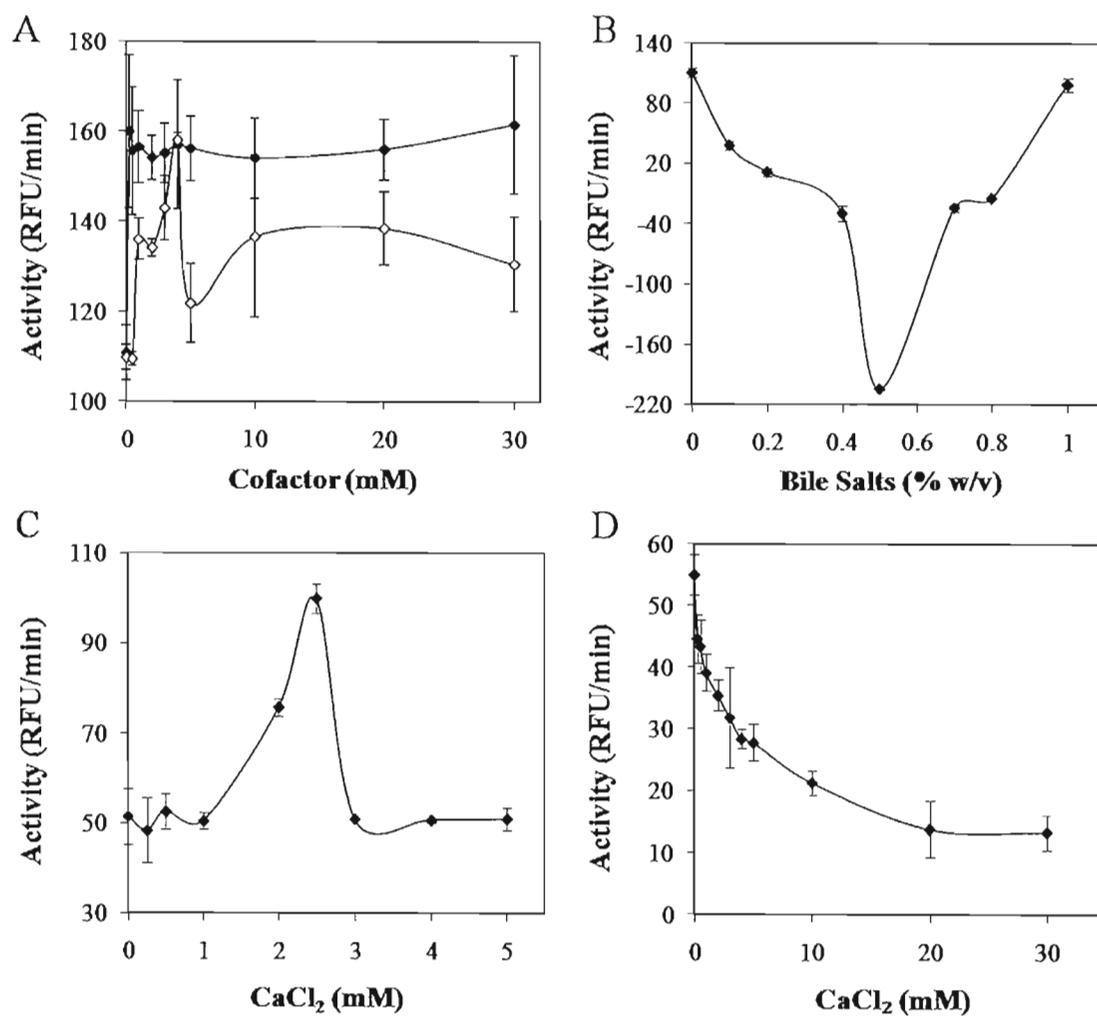


Figure 5.1

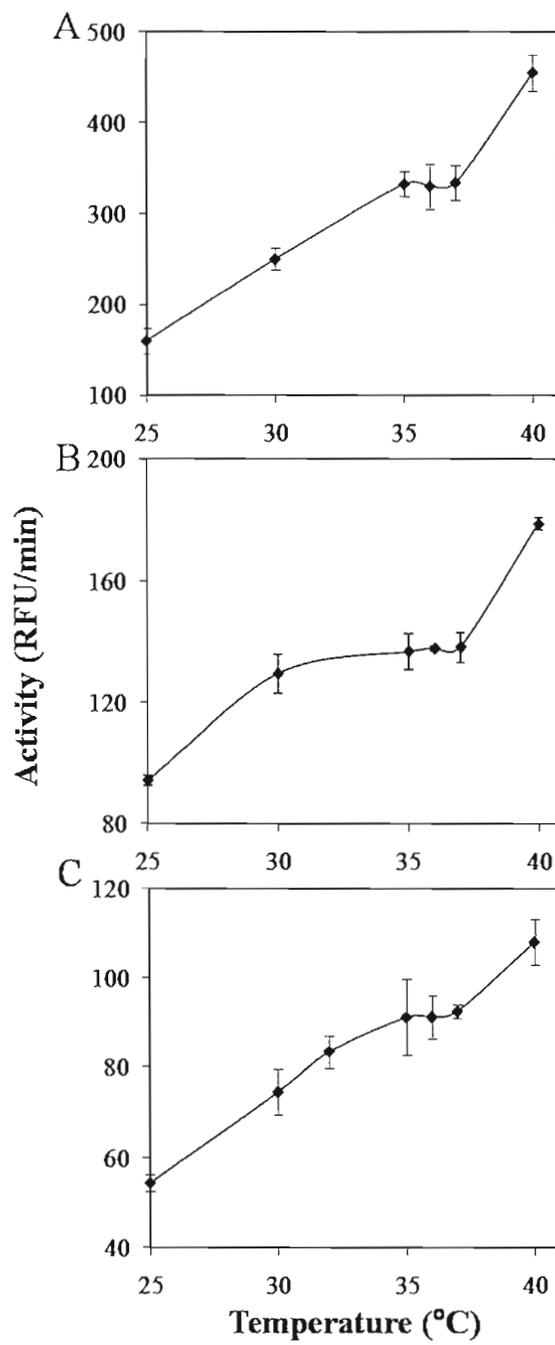


Figure 5.2

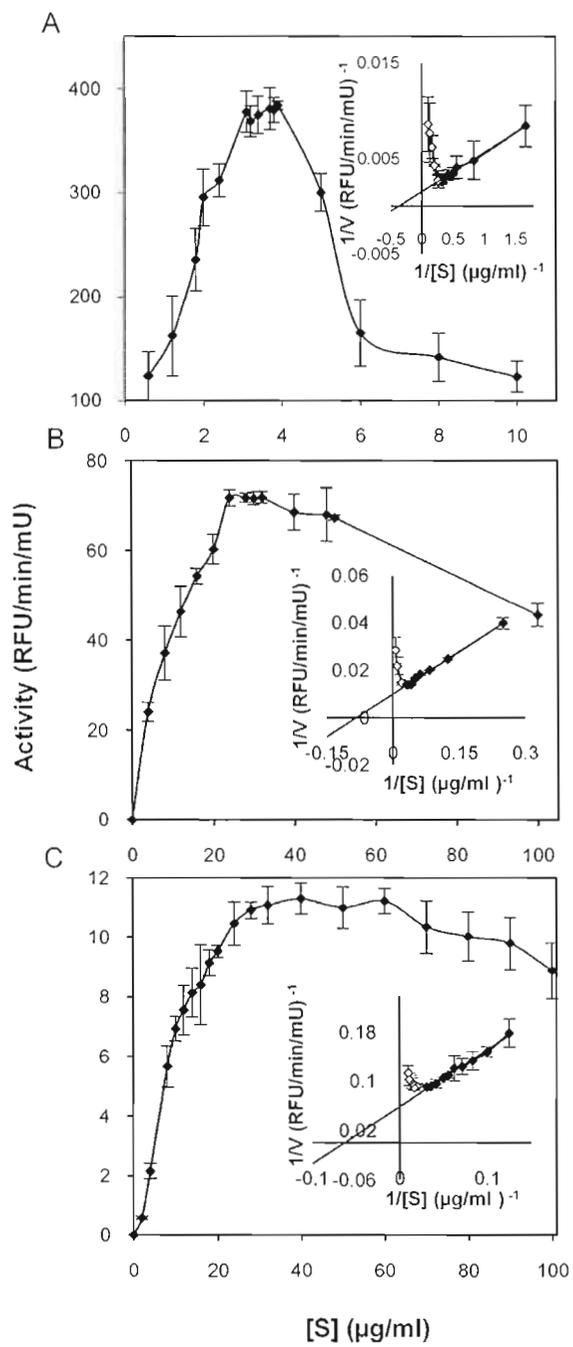


Figure 5.3

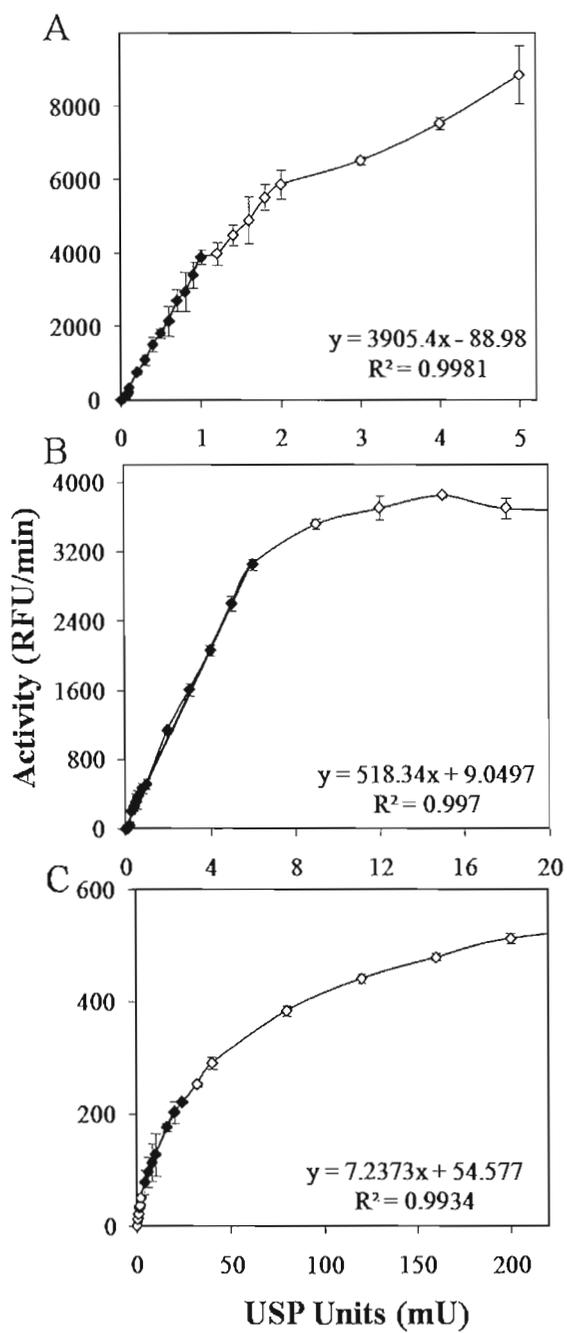


Figure 5.4

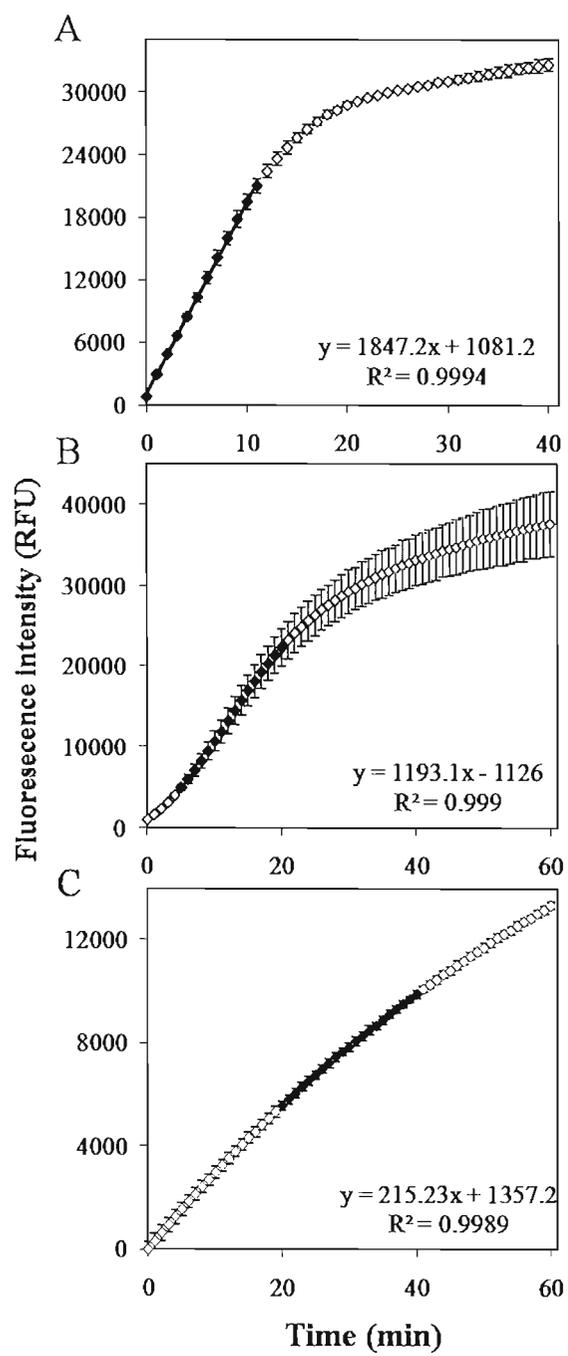


Figure 5.5

Table 5.1: Optimized buffer characteristics (type, concentration and pH) for each pancreatic enzyme by chromogenic methods (assays in triplicate as described in section 2).

Enzymes	Lipase	Alpha-amylase	Proteases
Buffer	Tris	Sodium phosphate and MOPS were equivalent	Sodium phosphate and Tris were equivalent
Buffer concentration	Stable from 10 to 100 mM	Stable from 10 to 100 mM	Optimal from 90 to 110 mM
pH	Stable from pH 7.4 to 9.0	Stable from pH 7.1 to 7.6	Stable from pH 7.8 to 8.2

Table 5.2: Kinetic parameters of lipase, alpha-amylase and proteases activities with the specific chromogenic substrate for each enzyme.

Constants	K_m ($\mu\text{g/mL}$)	V_{max} (RFU/min)
Lipase	2.63	476.19
Alpha-amylase	11.56	138.89
Proteases	15.46	135.14

Table 5.3: Comparative studies between the USP and the chromogenic methods and the determination of the eventual influence of excipients for the pancreatic extracts PEC A and PEC B formulations (assays in triplicate as describes in section 2).

	Lipase			Alpha-Amylase			Proteases		
	USP (U/mg)	Chromogenic (U/mg)	Δ (%)	USP (U/mg)	Chromogenic (U/mg)	Δ (%)	USP (U/mg)	Chromogenic (U/mg)	Δ (%)
PEC A	54.0 \pm 1.3	53.7 \pm 1.9	0.56	324 \pm 11	338 \pm 3	4.32	308 \pm 3	292 \pm 3	5.19
PEC A formulated	52.4 \pm 1.9	53.8 \pm 1.7	2.67	311 \pm 6	330 \pm 14	6.11	293 \pm 5	285 \pm 3	2.63
Relative error (%)	2.96	0.19	—	4.01	2.37	—	4.87	2.4	—
PEC B	88.4 \pm 2.2	88.5 \pm 3.0	0.11	493 \pm 8	485 \pm 13	1.62	362 \pm 6	364 \pm 2	0.55
PEC B formulated	89.5 \pm 2.2	86.3 \pm 1.6	3.58	479 \pm 8	477 \pm 6	0.42	354 \pm 8	361 \pm 4	1.98
Relative error (%)	1.24	2.49	—	2.84	1.65	—	2.21	0.82	—

CHAPITRE VI

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Les méthodes chromogéniques à base des substrats Enzcheck pour les enzymes pancréatiques lipase, amylase et protéases, ont été étudiées et optimisées pour évaluer leur potentiel, par rapport aux méthodes recommandées par l'USP, dans des applications pharmaceutiques. En premier lieu, notre approche a consisté à déterminer les conditions critiques de la réaction catalytique de chacune des enzymes à l'aide de standard USP. Ensuite, les paramètres cinétiques ont été évalués pour ces mêmes standards, car ceux-ci sont des caractéristiques spécifiques à chaque enzyme et peuvent servir à comparer les différentes méthodes. Optimiser la concentration de substrat nécessaire pour obtenir des conditions saturantes est également un facteur important à évaluer, car ceci va permettre d'obtenir le domaine de concentration d'enzyme correspondant à la linéarité de l'activité enzymatique et le temps de réaction et ainsi déterminer les paramètres d'utilisation de la méthode. Toutes ces conditions sont importantes et il est nécessaire de les déterminer parce qu'elles influencent la vitesse, la reproductibilité, la précision, l'exactitude et la répétabilité d'une méthode. Ces paramètres doivent être déterminés dans le cadre d'une validation de méthode analytique qui correspondrait à la prochaine étape de ce projet

Sélection du tampon et optimisation de sa concentration

La sélection du type de tampon et de sa concentration a souvent une influence limitée sur l'activité enzymatique. Dans cette étude, ceci a été montré dans le cas de la lipase et de l'amylase (Tableau 5.1). Dans le cas de la lipase, l'impact de la concentration de tampon Tris a été identique entre 10 et 100 mM de tampon Tris. Aucune différence significative d'activité de l'amylase n'a été observée avec les tampons phosphate de sodium ou MOPS. Lors de l'évaluation de l'influence de la force ionique, la différence d'activité enzymatique de l'amylase fut minimale entre 10 et 100 mM de tampon MOPS. Cependant, lors de

l'évaluation de ces mêmes paramètres pour l'activité enzymatique des protéases pancréatiques, le résultat ne fut pas entièrement similaire (Tableau 5.1). En effet, l'activité enzymatique fut équivalente en présence de tampon Tris et de tampon phosphate de sodium. Par contre, l'influence de la force ionique était marquante en trouvant son optimum entre 90 et 100 mM Tris.

Optimisation de la présence de cofacteurs

Les ions calcium sont connus pour être des activateurs de la lipase et de la trypsine et également comme cofacteurs de l'amylase. En effet, lors du dosage de l'amylase avec les substrats chromogéniques en présence de 2,5 mM de chlorure de calcium, l'activité enzymatique a doublé et dans le cas de la lipase, une présence minimale de 0,25 mM CaCl_2 l'augmentait de 1,5 fois. Cette même augmentation de l'activité lipolytique a été observée avec un autre activateur connu de la lipase, les ions magnésium, mais pour une valeur de 4 mM de chlorure de magnésium. Contre toute attente, l'activité protéolytique fut inhibée à un maximum de 70 % pour 30 mM de chlorure de calcium (Fig. 5.1). Une étude plus approfondie devrait être réalisée pour comprendre la cause de ce phénomène ainsi que son mécanisme.

L'évaluation de l'impact des sels biliaires sur le dosage de l'activité de la lipase par la méthode chromogénique n'a pas été concluante. En effet, une interférence entre les sels biliaires et le substrat chromogénique a été observée en absence de l'enzyme. Il est donc difficile de déterminer la juste part de l'influence des sels biliaires sur la lipase et leurs interférences avec le substrat. Par contre, il est clair qu'à des concentrations de 1 % (p/v), largement supérieures à la CMC, aucune interférence et influence de la part des sels biliaires n'étaient observée sur le dosage de la lipase par la méthode chromogénique (Fig. 5.1).

Détermination de la température optimale

Une majorité d'enzymes possède une température optimale entre 35 et 40 °C chez l'humain. En effet, l'activité enzymatique de chacune des trois enzymes a augmenté entre 25 et 40 °C, mais aucun résultat n'est disponible à des températures supérieures, dû aux limites de l'appareillage. Par contre, d'une façon inattendue (Fig. 5.2) une stabilisation (plateau) de l'activité enzymatique entre des températures de 35 et 37 °C a été observée pour chacune des enzymes et c'est pourquoi une température de 36 ± 0.5 °C a été sélectionnée comme optimale pour chacune des méthodes chromogéniques, car elle permet d'assurer une activité adéquate tout en minimisant l'impact d'une variation de température sur les résultats. Ce type de dépendance de l'activité enzymatique avec un mini plateau pour un certain intervalle de température a été observé pour d'autres enzymes (ex. : l'amine oxydase sérique bovine) (Befani *et al.*, 1989). De plus, il n'est pas exclu qu'un réarrangement structural se produise aux températures mentionnées en présence du substrat chromogénique.

Généralement, les valeurs de Q_{10} se rapprochent le plus de 2, mais peuvent se retrouver dans l'écart entre 1 et 3. Les valeurs de coefficient de température Q_{10} ont été calculées pour les trois enzymes : 2,08 et 1,68 de 25 à 35 °C pour le Q_{10} de la lipase et des protéases respectivement et de 1,38 pour l'alpha-amylase entre 30 et 40 °C. Quoique le Q_{10} des protéases fût similaire à la valeur retrouvée dans la littérature, les Q_{10} de l'alpha-amylase et de la lipase se sont avérés différents. Ces différences peuvent être expliquées par la nature de l'enzyme (exemple : source animale ou végétale) et/ou du substrat (exemple : fluorescent BODIPY versus amidon et huile d'olive) ainsi que les diverses conditions utilisées telles le milieu réactionnel et le temps d'incubation dans les différentes méthodes de dosage.

Optimisation du pH réactionnel

Plusieurs enzymes possèdent un pH optimal autour du pH neutre, soit entre pH 6,0 et 8,0. Les enzymes pancréatiques déterminées avec les substrats chromogéniques utilisés ne font pas exception. L'activité de la lipase pancréatique n'a montré aucune variation entre un

pH de 7,5 et 9,0. Cependant, l'alpha-amylase et les protéases ont présenté une activité optimale à un pH donné, mais par contre, une plage de pH combinant une activité enzymatique adéquate et constante (une variation nulle avec le pH) a été observée, un point important pour optimiser des méthodes de dosage. C'est pourquoi des valeurs de pH ont été choisies dans ces zones qui correspondent également aux valeurs trouvées dans la littérature, soit 7,4 pour l'alpha-amylase et 8,0 pour les protéases et la lipase (Tableau 5.1).

Détermination de la concentration optimale de substrat et des constantes cinétiques

Après établissement de la courbe de saturation pour chacune des enzymes pancréatiques, un phénomène général a pu être observé pour les trois méthodes chromogéniques (Figure 5.3). En effet, après que la saturation ait été atteinte, une diminution du signal de fluorescence est observée. Ce phénomène de « quenching » est connu et observé dans les méthodes en fluorescence à des hautes concentrations de substrats avec des chromophores fluorescents. Il est donc important de déterminer une valeur de concentration de substrat se trouvant dans la zone saturante, mais évitant ce phénomène. C'est pourquoi des valeurs de 3,85 µg/mL pour la lipase et de 30 µg/mL pour l'alpha-amylase et les protéases ont été sélectionnées pour l'utilisation des substrats chromogéniques dans le dosage des enzymes pancréatiques (Tableau 5.2).

L'utilisation des constantes cinétiques comme outil de comparaison entre les diverses méthodes est largement acceptée et la détermination de celles-ci est donc importante. Avec les substrats chromogéniques fluorescent utilisés et à l'aide de standards USP pour chacune des enzymes pancréatiques, des valeurs de constante de Michaelis (K_m) de 2,63 µg/mL pour la lipase, 11,56 µg/mL pour l'alpha-amylase et 15,46 µg/mL pour les protéases ont été obtenues des doubles réciproques de Lineweaver-Burk. Les valeurs de la vélocité maximale (V_{max}) ont été déterminées à 666,67 RFU/min pour la lipase, 138,89 RFU/min pour l'alpha-amylase et 135,14 RFU/min pour les protéases (Tableau 5.2). Cependant, la comparaison de ces valeurs avec celles d'autres méthodes nécessiterait que la concentration de substrat soit exprimée en molaire et non en µg/mL. Il serait donc intéressant d'obtenir les poids

moléculaires des différents substrats chromogéniques utilisés pour transposer ces valeurs dans les constantes cinétiques et par la suite, les comparer avec d'autres. Cependant, l'information disponible auprès du fabricant (Invitrogen) ne donne pas les masses moléculaires précises.

Détermination du domaine de concentration d'enzymes et du temps de réaction pour la linéarité d'activité enzymatique

Pour obtenir une évaluation de l'activité enzymatique selon la vitesse initiale, plusieurs conditions doivent être combinées : concentration de substrat saturante (tout en tenant compte du phénomène d'étouffement de la fluorescence) ainsi qu'une concentration d'enzyme et un temps de réaction permettant une activité enzymatique comprise dans le domaine linéaire de la réaction. La concentration d'enzyme (en termes d'unités enzymatiques) et les temps de réaction ont été déterminés pour chaque enzyme et se sont avérés grandement différents. En effet, à des conditions saturantes en substrat, la plage de concentration de la lipase s'étend de 0.01 à 1 mU USP pour la lipase ($R^2=0.998$), de 0.04 à 6 mU USP pour l'alpha-amylase ($R^2=0.997$) et de 4 à 24 mU USP pour les protéases ($R^2=0.993$) (Fig. 5.4). Au niveau des temps de réaction, la lipase peut être évaluée dans les 11 premières minutes de la réaction. L'amylase par contre, exhibe une phase latente au début et son évaluation ne peut donc être faite qu'entre 5 et 20 minutes. Enfin, les protéases ont montré la linéarité engendrant des écarts types minimaux (entre 20 et 40 minutes réactionnelles) (Fig. 5.5).

Étude comparative de principes actifs PEC utilisant les méthodes USP et les méthodes chromogéniques optimisées

Les méthodes chromogéniques optimisées ont dû être testées pour vérifier leur potentiel d'application à des échantillons de principes actifs d'extraits pancréatiques (PEC) avec les trois enzymes, une en présence des autres. Il était également nécessaire de comparer les valeurs d'activité enzymatique obtenues avec celles déterminées par les méthodes USP

pour pouvoir calculer l'erreur relative et ainsi avoir un aperçu de leur exactitude et de leur précision selon leur écart-type relatif dans le but de déterminer si les méthodes chromogéniques offraient une bonne alternative.

Les valeurs d'écart-type standard (RSD) générés à l'évaluation de deux PEC, A et B, par les méthodes chromogéniques sur un minimum de trois échantillons distincts étaient tous compris dans la zone considérée acceptable par l'industrie pharmaceutique, soit de 5 % pour la lipase et de 7 % pour l'amylase et les protéases. La variation entre les résultats obtenus par les méthodes chromogéniques et la méthode USP, lors du dosage des deux principes actifs, s'est trouvée inférieure à 6 % dans tous les cas, ce qui est adéquat (Tableau 5.3).

Selon les résultats obtenus, les méthodes chromogéniques semblent être des candidates adéquates pour servir d'alternative à l'évaluation d'enzymes pancréatiques en formulation pharmaceutique par les méthodes recommandées par la Pharmacopée américaine.

Détermination des interférences potentielles entre les excipients pharmaceutiques et les enzymes pancréatiques lors du dosage enzymatique

Plusieurs composés sont nécessaires pour permettre au principe actif d'être délivré à l'endroit et au moment souhaités. Le regroupement de tous ces excipients ainsi que des agents actifs est appelé formulation. Aucune interférence non désirée entre les excipients et le principe actif ne doit exister dans le médicament. De plus, il est nécessaire que la méthode de dosage utilisée soit adéquate, soit aucune interférence entre les excipients ou l'agent actif. Des simulations de formulations ont été réalisées en ajoutant aux principes actifs, PEC A et B les excipients contenus dans leur formulation respective et par la suite, les dosages de ces deux mélanges ont été réalisés pour vérifier s'il y avait des interférences ou non.

Les variations d'activité enzymatique en présence ou en absence de la formulation étaient moins grandes pour les deux PEC lors de l'utilisation des méthodes chromogéniques.

Cependant, toutes les variations, sans égard pour le PEC ou la méthode, se retrouvent dans les normes de RSD de la méthode définies par l'industrie pharmaceutique, soit 5 % pour la lipase et 7 % pour l'amylase et les protéases (Tableau 5.3).

Un test t de Student a été réalisé entre les moyennes d'activité enzymatique obtenue en absence et en présence d'excipients. Ce test permet, en outre, de déterminer si la différence entre deux moyennes (appariées ou non) est significative. Le résultat de ce test nous indique que les différences observées entre les activités enzymatiques avec ou sans excipients sont majoritairement significatives pour les trois enzymes. Par contre, quoique les différences sont statistiquement significatives, il est important de se rappeler que l'écart observé dans le cas de la lipase (moins de 2%) est inférieur à la variabilité de la méthode acceptée (5%) ainsi que dans le cas de l'amylase (moins de 3% d'écart observé pour une variabilité de 7%) et des protéases (moins de 5% d'écart versus 7% de variabilité). Ces variations ne peuvent donc être considérées comme significatives selon les critères d'acceptation déterminés par l'industrie pharmaceutique.

Aucune des variations en présence ou en absence des excipients n'étant considérée comme significative, la conclusion préliminaire est qu'aucune interférence n'est observée par la méthode ou par les excipients des diverses formulations testées. De plus, lors de ces évaluations, les erreurs relatives pour chaque échantillon correspondaient aux valeurs obtenues lors de l'évaluation du PEC seul.

Perspectives

L'optimisation des méthodes chromogéniques a été complétée et par la suite, celles-ci ont été testées pour leur potentiel d'utilisation en milieu pharmaceutique avec deux principes actifs d'enzymes pancréatiques (PEC A et B).

Cependant, une méthode se doit d'être évaluée selon différents aspects pour s'assurer de ses performances dans son contexte et d'obtenir la preuve de son efficacité. Ces aspects sont

regroupés dans le processus de validation et sont énumérés comme suit : l'exactitude, la précision, la spécificité, les limites de détection et de quantification, la linéarité, l'étendue et la robustesse. La continuité de ce projet va donc comprendre une validation complète des différentes méthodes chromogéniques optimisées et éventuellement des études plus poussées sur les phénomènes d'inhibition des protéases par le calcium ainsi que l'effet réel des sels biliaires sur le substrat chromogénique de la lipase.

APPENDICE A

Affiche soumise à l'AAPS Annual Meeting 2009

Chromogenic methods optimized for pancreatic enzymes evaluation in pharmaceutical applications



Dominique Demers¹, Francine Hamel², Erick Tessier², Pompilia Ispas-Szabo^{1,2} and Mircea Alexandru Mateescu^{1*}
 (1) Université du Québec à Montréal, Département de Chimie, C.F. 8583, Succ. A, Montréal, Québec (Canada), H3C 3P8
 (2) Axcan Pharma Inc., 597, Laurier Boulevard, Mont Saint-Hilaire (Québec) Canada, J3H 6C4



ABSTRACT

Chromogenic assays were adapted for evaluation of pancreatic enzymes in pharmaceutical formulations. Factors such as buffer concentration, pH, temperature and cofactors were evaluated and determined to have an impact on the enzyme activity of lipase, amylase and proteases. The optimized parameters were determined for each enzyme and kinetic parameters were also calculated. The results on the different pancreatic products were compared with the USP assays and found to be equivalent. No significant interferences with some common excipients were found with USP nor with chromogenic methods. In conclusion, these assays were considered a feasible to pancreatic evaluation and their advantages for pharmaceutical dosages testing must be considered.

INTRODUCTION

There is a need of efficient and safe drugs. USP monographs of pancreatin and pancrelipase describe in details the methods recommended to evaluate the composition of these pancreatic products containing lipase, amylase and proteases [1-2].

Due to the fact that USP procedures are quite complicated and time consuming, it becomes interesting to investigate the use of chromogenic methods to evaluate the activity of pancreatic enzymes for a pharmaceutical purpose and compare the two approaches in terms of methods sensitivity, time of experiments and required equipment.

Presently, many chromogenic substrates are commercially available for each of the three major classes of pancreatic enzymes and they have been developed for clinical or research utilization. In these applications, the chromogenic methods demonstrated a good sensitivity and reproducibility [3-5]. The variety of fluorescent HRPc (horseradish peroxidase) for example combine the accuracy of a colorimetric assay, the sensitivity of fluorescence and the easy handling for each of pancreatic enzyme. These substrates were selected based on the affinity of the enzyme for a specific substrate, i.e. 1-acylglycerol for lipase, corn starch for amylase and casein for proteases (derived on the quenched fluorophore BODIPY-FL).

OBJECTIVES

- Optimize the fluorimetric methods based on the substrates BODIPY-FL for the three pancreatic enzymes (lipase, alpha-amylase and proteases).
- Determine the kinetic parameters of the enzymatic reactions with these optimized methods.
- Evaluate the potential impact of some common pharmaceutical excipients on the enzymatic activity.
- Evaluate variability and standard deviation of these optimized chromogenic methods and compare them to USP methods.

RESULTS

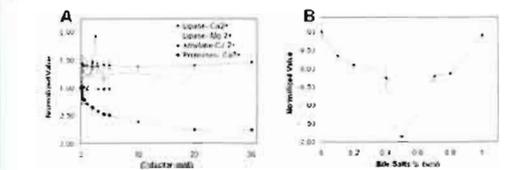


Figure 1. Effect of magnesium and calcium ions (A) on the activity of 0.2 mU/LSP of lipase, 3 mU USP of alpha-amylase and a mU USP of proteases as well as of bile salts (B) on lipase activity.

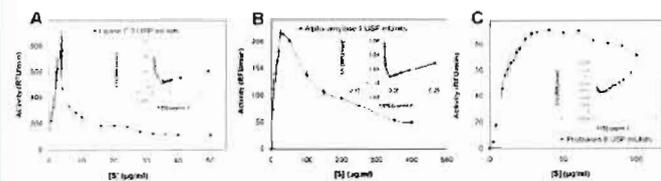


Figure 2. Saturation curves and double reciprocal plots of lipase (A) alpha-amylase (B) and proteases (C).

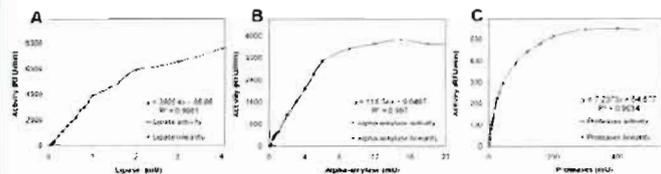


Figure 3. The kinetic curves of the reaction in function of the concentration of lipase (A) alpha-amylase (B) and proteases (C).

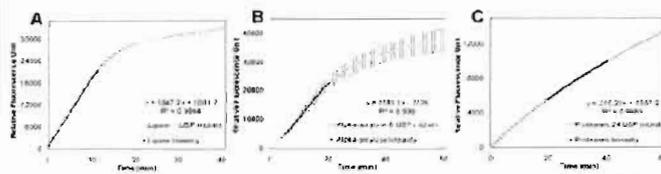


Figure 4. Establishment of the reaction time for kinetic measurements of lipase (A) alpha-amylase (B) and proteases (C).

Table 1. Comparative studies between the USP and the chromogenic methods and the determination of the potential influence of pharmaceutical excipients for the pancreatic extracts PEC A and PEC B formulations.

	Lipase			Amylase			Proteases		
	USP (U/ml)	Chromogenic (%)	r	USP (U/ml)	Chromogenic (%)	r	USP (U/ml)	Chromogenic (%)	r
PEC A	46 ± 1.3	43.7 ± 1.9	0.98	174 ± 11	174 ± 5	1.00	104 ± 5	230 ± 5	0.99
PEC A for related (%)	92 ± 1.9	93.6 ± 1.7	0.97	311 ± 0	330 ± 14	0.11	283 ± 3	230 ± 3	0.73
1 (%)	2.96	3.16	—	4.01	2.37	—	4.87	2.4	—
PEC D	66 ± 2.2	68.5 ± 3.3	0.11	492 ± 6	455 ± 13	1.32	352 ± 6	354 ± 2	0.93
PEC E for related (%)	89.5 ± 2.2	83.3 ± 1.5	0.68	470 ± 8	477 ± 6	0.42	354 ± 3	331 ± 4	1.68
1 (%)	1.24	2.40	—	2.84	1.66	—	2.21	0.92	—

Table 2. Summary of results observed in the evaluation of the critical condition parameters: buffer type and buffer ionic pH and temperature.

	Lipase	Amylase	Proteases
Buffer	T 15	Sodium phosphate and NaOPS were equivalent	Sodium phosphate and Tris were equivalent
Buffer concentration	Stable from 10 to 100 mM	Stable from 10 to 100 mM	Optimal from 50 to 110 mM
pH	Stable from pH 7 to 9.0	Stable from pH 7.1 to 7.6	Stable from pH 7.0 to 8.2
Temperature (°C)	36 ± 0.5	36 ± 0.5	36 ± 0.5

CONCLUSIONS

- Factors such as buffer type and concentration, pH, temperature and cofactors were optimized for each of the pancreatic enzymes.
- Kinetic parameters were respectively 2.83, 11.56 and 15.46 µg/ml for the K of lipase, alpha-amylase and proteases as well as 470, 19, 130, 39 and 100, 14, 35 U/min for the V.
- Reaction parameters ranged from 0.01 to 1 mU for 10 min of lipase reaction, from 0.04 ml to 6 ml for 20 min of alpha-amylase reaction and from 4 to 24 mU for 40 minutes of proteases reaction.

RÉFÉRENCES

1. USP Monographs, 2007, 30, 111-112, 113-114, 115-116, 117-118, 119-120, 121-122, 123-124, 125-126, 127-128, 129-130, 131-132, 133-134, 135-136, 137-138, 139-140, 141-142, 143-144, 145-146, 147-148, 149-150, 151-152, 153-154, 155-156, 157-158, 159-160, 161-162, 163-164, 165-166, 167-168, 169-170, 171-172, 173-174, 175-176, 177-178, 179-180, 181-182, 183-184, 185-186, 187-188, 189-190, 191-192, 193-194, 195-196, 197-198, 199-200, 201-202, 203-204, 205-206, 207-208, 209-210, 211-212, 213-214, 215-216, 217-218, 219-220, 221-222, 223-224, 225-226, 227-228, 229-230, 231-232, 233-234, 235-236, 237-238, 239-240, 241-242, 243-244, 245-246, 247-248, 249-250, 251-252, 253-254, 255-256, 257-258, 259-260, 261-262, 263-264, 265-266, 267-268, 269-270, 271-272, 273-274, 275-276, 277-278, 279-280, 281-282, 283-284, 285-286, 287-288, 289-290, 291-292, 293-294, 295-296, 297-298, 299-300, 301-302, 303-304, 305-306, 307-308, 309-310, 311-312, 313-314, 315-316, 317-318, 319-320, 321-322, 323-324, 325-326, 327-328, 329-330, 331-332, 333-334, 335-336, 337-338, 339-340, 341-342, 343-344, 345-346, 347-348, 349-350, 351-352, 353-354, 355-356, 357-358, 359-360, 361-362, 363-364, 365-366, 367-368, 369-370, 371-372, 373-374, 375-376, 377-378, 379-380, 381-382, 383-384, 385-386, 387-388, 389-390, 391-392, 393-394, 395-396, 397-398, 399-400, 401-402, 403-404, 405-406, 407-408, 409-410, 411-412, 413-414, 415-416, 417-418, 419-420, 421-422, 423-424, 425-426, 427-428, 429-430, 431-432, 433-434, 435-436, 437-438, 439-440, 441-442, 443-444, 445-446, 447-448, 449-450, 451-452, 453-454, 455-456, 457-458, 459-460, 461-462, 463-464, 465-466, 467-468, 469-470, 471-472, 473-474, 475-476, 477-478, 479-480, 481-482, 483-484, 485-486, 487-488, 489-490, 491-492, 493-494, 495-496, 497-498, 499-500, 501-502, 503-504, 505-506, 507-508, 509-510, 511-512, 513-514, 515-516, 517-518, 519-520, 521-522, 523-524, 525-526, 527-528, 529-530, 531-532, 533-534, 535-536, 537-538, 539-540, 541-542, 543-544, 545-546, 547-548, 549-550, 551-552, 553-554, 555-556, 557-558, 559-560, 561-562, 563-564, 565-566, 567-568, 569-570, 571-572, 573-574, 575-576, 577-578, 579-580, 581-582, 583-584, 585-586, 587-588, 589-590, 591-592, 593-594, 595-596, 597-598, 599-600, 601-602, 603-604, 605-606, 607-608, 609-610, 611-612, 613-614, 615-616, 617-618, 619-620, 621-622, 623-624, 625-626, 627-628, 629-630, 631-632, 633-634, 635-636, 637-638, 639-640, 641-642, 643-644, 645-646, 647-648, 649-650, 651-652, 653-654, 655-656, 657-658, 659-660, 661-662, 663-664, 665-666, 667-668, 669-670, 671-672, 673-674, 675-676, 677-678, 679-680, 681-682, 683-684, 685-686, 687-688, 689-690, 691-692, 693-694, 695-696, 697-698, 699-700, 701-702, 703-704, 705-706, 707-708, 709-710, 711-712, 713-714, 715-716, 717-718, 719-720, 721-722, 723-724, 725-726, 727-728, 729-730, 731-732, 733-734, 735-736, 737-738, 739-740, 741-742, 743-744, 745-746, 747-748, 749-750, 751-752, 753-754, 755-756, 757-758, 759-760, 761-762, 763-764, 765-766, 767-768, 769-770, 771-772, 773-774, 775-776, 777-778, 779-780, 781-782, 783-784, 785-786, 787-788, 789-790, 791-792, 793-794, 795-796, 797-798, 799-800, 801-802, 803-804, 805-806, 807-808, 809-810, 811-812, 813-814, 815-816, 817-818, 819-820, 821-822, 823-824, 825-826, 827-828, 829-830, 831-832, 833-834, 835-836, 837-838, 839-840, 841-842, 843-844, 845-846, 847-848, 849-850, 851-852, 853-854, 855-856, 857-858, 859-860, 861-862, 863-864, 865-866, 867-868, 869-870, 871-872, 873-874, 875-876, 877-878, 879-880, 881-882, 883-884, 885-886, 887-888, 889-890, 891-892, 893-894, 895-896, 897-898, 899-900, 901-902, 903-904, 905-906, 907-908, 909-910, 911-912, 913-914, 915-916, 917-918, 919-920, 921-922, 923-924, 925-926, 927-928, 929-930, 931-932, 933-934, 935-936, 937-938, 939-940, 941-942, 943-944, 945-946, 947-948, 949-950, 951-952, 953-954, 955-956, 957-958, 959-960, 961-962, 963-964, 965-966, 967-968, 969-970, 971-972, 973-974, 975-976, 977-978, 979-980, 981-982, 983-984, 985-986, 987-988, 989-990, 991-992, 993-994, 995-996, 997-998, 999-1000, 1001-1002, 1003-1004, 1005-1006, 1007-1008, 1009-1010, 1011-1012, 1013-1014, 1015-1016, 1017-1018, 1019-1020, 1021-1022, 1023-1024, 1025-1026, 1027-1028, 1029-1030, 1031-1032, 1033-1034, 1035-1036, 1037-1038, 1039-1040, 1041-1042, 1043-1044, 1045-1046, 1047-1048, 1049-1050, 1051-1052, 1053-1054, 1055-1056, 1057-1058, 1059-1060, 1061-1062, 1063-1064, 1065-1066, 1067-1068, 1069-1070, 1071-1072, 1073-1074, 1075-1076, 1077-1078, 1079-1080, 1081-1082, 1083-1084, 1085-1086, 1087-1088, 1089-1090, 1091-1092, 1093-1094, 1095-1096, 1097-1098, 1099-1100, 1101-1102, 1103-1104, 1105-1106, 1107-1108, 1109-1110, 1111-1112, 1113-1114, 1115-1116, 1117-1118, 1119-1120, 1121-1122, 1123-1124, 1125-1126, 1127-1128, 1129-1130, 1131-1132, 1133-1134, 1135-1136, 1137-1138, 1139-1140, 1141-1142, 1143-1144, 1145-1146, 1147-1148, 1149-1150, 1151-1152, 1153-1154, 1155-1156, 1157-1158, 1159-1160, 1161-1162, 1163-1164, 1165-1166, 1167-1168, 1169-1170, 1171-1172, 1173-1174, 1175-1176, 1177-1178, 1179-1180, 1181-1182, 1183-1184, 1185-1186, 1187-1188, 1189-1190, 1191-1192, 1193-1194, 1195-1196, 1197-1198, 1199-1200, 1201-1202, 1203-1204, 1205-1206, 1207-1208, 1209-1210, 1211-1212, 1213-1214, 1215-1216, 1217-1218, 1219-1220, 1221-1222, 1223-1224, 1225-1226, 1227-1228, 1229-1230, 1231-1232, 1233-1234, 1235-1236, 1237-1238, 1239-1240, 1241-1242, 1243-1244, 1245-1246, 1247-1248, 1249-1250, 1251-1252, 1253-1254, 1255-1256, 1257-1258, 1259-1260, 1261-1262, 1263-1264, 1265-1266, 1267-1268, 1269-1270, 1271-1272, 1273-1274, 1275-1276, 1277-1278, 1279-1280, 1281-1282, 1283-1284, 1285-1286, 1287-1288, 1289-1290, 1291-1292, 1293-1294, 1295-1296, 1297-1298, 1299-1300, 1301-1302, 1303-1304, 1305-1306, 1307-1308, 1309-1310, 1311-1312, 1313-1314, 1315-1316, 1317-1318, 1319-1320, 1321-1322, 1323-1324, 1325-1326, 1327-1328, 1329-1330, 1331-1332, 1333-1334, 1335-1336, 1337-1338, 1339-1340, 1341-1342, 1343-1344, 1345-1346, 1347-1348, 1349-1350, 1351-1352, 1353-1354, 1355-1356, 1357-1358, 1359-1360, 1361-1362, 1363-1364, 1365-1366, 1367-1368, 1369-1370, 1371-1372, 1373-1374, 1375-1376, 1377-1378, 1379-1380, 1381-1382, 1383-1384, 1385-1386, 1387-1388, 1389-1390, 1391-1392, 1393-1394, 1395-1396, 1397-1398, 1399-1400, 1401-1402, 1403-1404, 1405-1406, 1407-1408, 1409-1410, 1411-1412, 1413-1414, 1415-1416, 1417-1418, 1419-1420, 1421-1422, 1423-1424, 1425-1426, 1427-1428, 1429-1430, 1431-1432, 1433-1434, 1435-1436, 1437-1438, 1439-1440, 1441-1442, 1443-1444, 1445-1446, 1447-1448, 1449-1450, 1451-1452, 1453-1454, 1455-1456, 1457-1458, 1459-1460, 1461-1462, 1463-1464, 1465-1466, 1467-1468, 1469-1470, 1471-1472, 1473-1474, 1475-1476, 1477-1478, 1479-1480, 1481-1482, 1483-1484, 1485-1486, 1487-1488, 1489-1490, 1491-1492, 1493-1494, 1495-1496, 1497-1498, 1499-1500, 1501-1502, 1503-1504, 1505-1506, 1507-1508, 1509-1510, 1511-1512, 1513-1514, 1515-1516, 1517-1518, 1519-1520, 1521-1522, 1523-1524, 1525-1526, 1527-1528, 1529-1530, 1531-1532, 1533-1534, 1535-1536, 1537-1538, 1539-1540, 1541-1542, 1543-1544, 1545-1546, 1547-1548, 1549-1550, 1551-1552, 1553-1554, 1555-1556, 1557-1558, 1559-1560, 1561-1562, 1563-1564, 1565-1566, 1567-1568, 1569-1570, 1571-1572, 1573-1574, 1575-1576, 1577-1578, 1579-1580, 1581-1582, 1583-1584, 1585-1586, 1587-1588, 1589-1590, 1591-1592, 1593-1594, 1595-1596, 1597-1598, 1599-1600, 1601-1602, 1603-1604, 1605-1606, 1607-1608, 1609-1610, 1611-1612, 1613-1614, 1615-1616, 1617-1618, 1619-1620, 1621-1622, 1623-1624, 1625-1626, 1627-1628, 1629-1630, 1631-1632, 1633-1634, 1635-1636, 1637-1638, 1639-1640, 1641-1642, 1643-1644, 1645-1646, 1647-1648, 1649-1650, 1651-1652, 1653-1654, 1655-1656, 1657-1658, 1659-1660, 1661-1662, 1663-1664, 1665-1666, 1667-1668, 1669-1670, 1671-1672, 1673-1674, 1675-1676, 1677-1678, 1679-1680, 1681-1682, 1683-1684, 1685-1686, 1687-1688, 1689-1690, 1691-1692, 1693-1694, 1695-1696, 1697-1698, 1699-1700, 1701-1702, 1703-1704, 1705-1706, 1707-1708, 1709-1710, 1711-1712, 1713-1714, 1715-1716, 1717-1718, 1719-1720, 1721-1722, 1723-1724, 1725-1726, 1727-1728, 1729-1730, 1731-1732, 1733-1734, 1735-1736, 1737-1738, 1739-1740, 1741-1742, 1743-1744, 1745-1746, 1747-1748, 1749-1750, 1751-1752, 1753-1754, 1755-1756, 1757-1758, 1759-1760, 1761-1762, 1763-1764, 1765-1766, 1767-1768, 1769-1770, 1771-1772, 1773-1774, 1775-1776, 1777-1778, 1779-1780, 1781-1782, 1783-1784, 1785-1786, 1787-1788, 1789-1790, 1791-1792, 1793-1794, 1795-1796, 1797-1798, 1799-1800, 1801-1802, 1803-1804, 1805-1806, 1807-1808, 1809-1810, 1811-1812, 1813-1814, 1815-1816, 1817-1818, 1819-1820, 1821-1822, 1823-1824, 1825-1826, 1827-1828, 1829-1830, 1831-1832, 1833-1834, 1835-1836, 1837-1838, 1839-1840, 1841-1842, 1843-1844, 1845-1846, 1847-1848, 1849-1850, 1851-1852, 1853-1854, 1855-1856, 1857-1858, 1859-1860, 1861-1862, 1863-1864, 1865-1866, 1867-1868, 1869-1870, 1871-

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, C. K., M. Hamosh et S. K. Dutta. 1987. "Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency". *Gastroenterology*, 92, p. 125-129.
- Aloulou, A., D. Puccinelli, J. Sarles, R. Laugier, Y. Leblond et F. Carrière. 2008. "In vitro comparative study of three pancreatic enzyme preparations: Dissolution profiles, active enzyme release and acid stability". *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27, p. 283-292.
- Ammann, R. W., A. Akovbiantz, F. Largiader et G. Schueler. 1984. "Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients". *Gastroenterology*, 86, p. 820-828.
- Ammann, R. W., H. Buehler, R. Muench, A. W. Freiburghaus et W. Siegenthaler. 1987. "Differences in the natural history of idiopathic (nonalcoholic) and alcoholic chronic pancreatitis. A comparative long-term study of 287 patients". *Pancreas*, 2, p. 368-377.
- Anderson, S. C. et S. Cockayne. 2003. *Clinical chemistry : concepts and applications*. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 723 p.
- Aw, S. E. 1974. "The radiometric assay of [alpha]-amylase activity". *Clinica Chimica Acta*, 56, p. 291-295.
- Balti, R., A. Barkia, A. Bougatef, N. Ktari et M. Nasri. 2009. "A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation". *Food Chem.*, 113, p. 146-154.
- Beck, I. T. 1973. "The role of pancreatic enzymes in digestion". *American Journal of Clinical Nutrition.*, 26, p. 311-325.
- Befani, O., S. Sabatini, M. A. Mateescu et B. Mondovi. 1989. "Peculiar effects of temperature and polyvinylalcohol on the activity of bovine serum amine oxidase". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163, p. 1168-1174.
- Begley, C. G. et I. C. Roberts-Thomson. 1985. "Spontaneous improvement in pancreatic function in chronic pancreatitis". *Digestive Diseases and Sciences*, 30, p. 1117-1120.
- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière et R. Verger. 2000. "Methods for lipase detection and assay: A critical review". *European Journal of Lipid Sciences and Technology*, 102, p. 133-153.
- Best, C. H., N. B. Taylor et J. R. Brobeck. 1979. "Pancreatic secretion". In *Best & Taylor's Physiological basis of medical practice*, 10 éd. Baltimore: Williams & Wilkins Co., p. 256-266.

- Bezkorovainy, A., M. E. Rafelson et I. NetLibrary. 1996. *Concise biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 636 p.
- Bisswanger, H. 2007. *Practical enzymology*. Weinheim: Wiley-VCH, 255 p.
- Bisswanger, H. 2008. *Enzyme kinetics: principles and methods*. Weinheim: Wiley-VCH, 301 p.
- Bolsover, S. R. 2004. *Cell biology: a short course*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 531 p.
- Borel, J. P. 1997. *Biochimie dynamique*. Bruxelles: DeBoeck Université, 938 p.
- Borgstrom, B. et H. L. Brockman. 1984. "Pancreatic lipase". In *Lipases*, 1 ed. Amsterdam, New York: Elsevier, p. 84-150.
- Boyer, P. D., H. A. Lardy et K. Myrbäck. 1960. *The enzymes*. New York: Academic Press, 785 p.
- Branden, C., J. Tooze, B. Lubochinsky et J. Janin. 1996. *Introduction à la structure des protéines*. Paris; Bruxelles: De Boeck Université, 302 p.
- Braustein, H. 1961. "Tocopherol deficiency in adults with chronic pancreatitis". *Gastroenterology*, 40, p. 224-231.
- Brayer, G. D., Y. Luo et S. G. Withers. 1995. "The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes". *Protein Science*, 4, p. 1730-1742.
- Brody, T. 1999. *Nutritional biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1006 p.
- Brown, W. J., A. A. Belmonte et P. Melius. 1977. "Effects of divalent cations and sodium taurocholate on pancreatic lipase activity with gum arabic emulsified tributyrilglycerol substrates". *Biochimica Biophysica Acta*, 486, p. 313-321.
- Brynes, P. J., P. Andrade et D. Gordon. 1982. "Sensitive fluorogenic substrates for the detection of trypsinlike proteases and pancreatic elastase". *Analytical Biochemistry*, 126, p. 447-455.
- Büchler, M. W., S. Büchler Uhl Malfertheiner, P. Malfertheiner, M. G. Sarr et W. Uhl. 2004. *Diseases of the pancreas : acute pancreatitis, chronic pancreatitis, neoplasms of the pancreas*. Basel: Karger, 212 p.
- Bugg, T. 1997. *An introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. Oxford: Blackwell Science, 247 p.

Buisson, G., E. Duée, R. Haser et F. Payan. 1987. "Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity". *EMBO Journal*, 6, p. 3909-3916.

Buléon, A., P. Colonna, V. Planchot et S. Ball. 1998. "Starch granules: Structure and biosynthesis". *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, p. 85-112.

Canalias, F., A. Visvikis, C. Thioudellet et G. Siest. 1994. "Stable expression of enzymatically active human pancreatic lipase in V79 cells: Purification and characterization of the recombinant enzyme". *Clinical Chemistry*, 40, p. 1251-1257.

Carrere, J., F. Muller, A. Boue, O. Guy-Crotte et C. Figarella. 1992. "Levels and molecular forms of immunoreactive trypsin and chymotrypsin in amniotic fluids from normal and cystic fibrosis fetus: Evidence for a lack of activation of proteolytic zymogens in cystic fibrosis fetus". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14, p. 198-203.

Carrière, F., K. Thirstrup, S. Hjorth, F. Ferrato, P. F. Nielsen, C. Withers-Martinez, C. Cambillau, E. Boel, L. Thim et R. Verger. 1997. "Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange". *Biochemistry*, 36, p. 239-248.

Castaneda-Agullo, M., L. M. del Castillo, J. R. Whitaker et A. L. Tappel. 1961. "Effect of Ionic Strength on the Kinetics of Trypsin and Alpha Chymotrypsin". *J. Gen. Physiol.*, 44, p. 1103-1120.

Cavallini, G., P. Bovo, M. Zamboni, O. Bosello, M. Filippini, A. Riela, G. Brocco, L. Rossi, C. Pelle, A. Chiavenato et L. A. Scuro. 1992. "Exocrine and endocrine functional reserve in the course of chronic pancreatitis as studied by maximal stimulation tests". *Digestive Diseases and Sciences*, 37, p. 93-96.

Champe, P. C., R. A. Harvey et D. R. Ferrier. 2008. *Biochemistry*, 4 éd. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins, 520 p.

Chapin W.H., W.H. Bromund et L.E. Steiner. 1944. *Exercises in second year chemistry: a laboratory manual of elementary physical-chemical experiments and quantitative analytical procedures*, 4 éd. New York : J. Wiley and Sons; London : Chapman and Hall, 216 p.

Chen, J., J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, R. A. Marchler-Baue, G. H. Marchler, R. Mazumber, A. N. Nikolskay, B. S. Rao, A. R. Pancheko, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin et S. H. Br Yant. 2003. "MMDB: Entrez's 3D-structure database". *Nucleic Acids Research*, 31, p. 474-477.

Cherry, I. S. et L. A. Crandall Jr. 1932. "The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury". *American Journal of Physiology*, 100, p. 266-273.

Christen, G. L. 1987. "A Rapid Method for Measuring Protease Activity in Milk Using Radiolabeled Casein". *Journal of dairy science*, 70, p. 1807-1814.

Ciuffreda, P., A. Loseto, A. Manzocchi et E. Santaniello. 2001. "Lipolytic activity of porcine pancreas lipase on fatty acid esters of dialkylglycerols: A structural basis for the design of new substrates for the assay of pancreatic lipases activity". *Chemistry and Physics of Lipids*, 111, p. 105-110.

Copeland, R. A. 2000. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. New York: Wiley-VCH, 397 p.

Cotton, P. B. 1985. "Pancreas divisum. Curiosity or culprit?". *Gastroenterology*, 89, p. 1431-1435.

Cunningham, L. W., Jr. 1954. "Molecular-kinetic properties of crystalline diisopropyl phosphoryl trypsin". *Journal of Biological Chemistry*, 211, p. 13-19.

Dale, B. E. et D. H. White. 1983. "Ionic strength: A neglected variable in enzyme technology". *Enzyme and Microbial Technology*, 5, p. 227-229.

Dancour, A., P. Levy, C. Milan et P. Bernades. 1993. "Natural history of non-alcoholic chronic pancreatitis: A study of 37 cases and a comparison with 319 cases of alcoholic chronic pancreatitis". *Gastroenterology Clinical Biology*, 17, p. 915-924.

Das, D. 1978. *Biochemistry*. Calcutta: Academic Publishers, 634 p.

Davis, M. E. et R. J. Davis. 2003. *Fundamentals of chemical reaction engineering*. Boston: McGraw-Hill, 368 p.

Davis, R. C., A. Diep, W. Hunziker, I. Klisak, T. Mohandas, M. C. Schotz, R. S. Sparkes et A. J. Lusic. 1991. "Assignment of human pancreatic lipase gene (PNLIP) to chromosome 10q24-q26". *Genomics*, 11, p. 1164-1166.

Davis, R. C., Y. Xia, T. Mohandas, M. C. Schotz et A. J. Lusic. 1991. "Assignment of the human pancreatic colipase gene to chromosome 6p21.1 to pter". *Genomics*, 10, p. 262-265.

De Caro, A., C. Figarella et J. Amic. 1977. "Human pancreatic lipase: a glycoprotein". *Biochimica et Biophysica Acta*, 490, p. 411-419.

DeGolier, T. F., A. R. Place, G. E. Duke et R. E. Carraway. 1999. "Neurotensin modulates the composition of pancreatic exocrine secretions in chickens". *Journal of Experimental Zoology*, 283, p. 455-462.

DiMagno, E. P. 1982. "Controversies in the treatment of exocrine pancreatic insufficiency". *Digestive Diseases and Sciences*, 27, p. 481-484.

- DiMagno, E. P., V. L. Go et W. H. Summerskill. 1973. "Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency". *New England Journal of Medicine*, 288, p. 813-815.
- Dimagno, E. P., J. R. Malagelada et V. L. W. Go. 1979. "The relationships between pancreatic ductal obstruction and pancreatic secretion in man". *Mayo Clinic Proceedings*, 54, p. 157-162.
- Doolittle, M. H. et K. Reue. 1999. *Lipase and phospholipase protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 362 p.
- Dupuy, G., G. Hilaire et C. Aubry. 1987. "Rapid determination of alpha-amylase activity by use of a new chromogenic substrate". *Clinical Chemistry*, 33, p. 524-528.
- Dutta, S. K., M. P. Bustin, R. M. Russell et B. S. Costa. 1982. "Deficiency of fat-soluble vitamins in treated patients with pancreatic insufficiency". *Annals of Internal Medicine*, 97, p. 549-552.
- Eckert, R., D. Randall, W. W. Burggren, K. French, F. O. Math, A. Propper et L. Henquell. 1999. "Acquisition de l'énergie : nutrition, digestion et métabolisme". In *Physiologie animale: mécanismes et adaptations*. Paris; Bruxelles: De Boeck Université, p. 627-664.
- Egloff, M.-P., L. Sarda, R. Verger, C. Cambillau et H. Van Tilbeurgh. 1995. "Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase". *Protein Science*, 4, p. 44-57.
- Ehrhardt, M., K. Grasshoff et K. Kremling. 1998. *Methods of seawater analysis*. Weinheim: Wiley-VCH, 650 p.
- Eisinger, J et J Flores. 1979. "Front-face fluorometry of liquid samples". *Analytical Biochemistry*, 94, p. 15-21.
- El-Shemy, M. G. et R. E. Levin. 1997. "Characterization of affinity-purified trypsin from hybrid tilapia (*Tilapia Nilotica/Aurea*)". *Journal of Food Biochemistry*, 21, p. 163-175.
- Embleton, J. K. et C. W. Pouton. 1997. "Structure and function of gastro-intestinal lipases". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25, p. 15-32.
- Erlanson-Albertsson, C. 1983. "The interaction between pancreatic lipase and colipase: a protein-protein interaction regulated by a lipid". *FEBS Letters*, 162, p. 225-229.
- Etemad, B. et D. C. Whitcomb. 2001. "Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments". *Gastroenterology*, 120, p. 682-707.
- Farmer, W. H. et Z. Yuan. 1991. "A continuous fluorescent assay for measuring protease activity using natural protein substrate". *Analytical Biochemistry*, 197, p. 347-352.

Fenton, J., R. Foery, L. Piatt et K. Geschwindt. 1982. "A new chromogenic amylase method compared with two established methods". *Clinical Chemistry*, 28, p. 704-706.

Ferrone, M., M. Raimondo et J. S. Scolapio. 2007. "Pancreatic enzyme pharmacotherapy". *Pharmacotherapy*, 27, p. 910-920.

Fingerman, M. 2001. "Proteinases from marine organisms". In *Bio-organic compounds: chemistry and biomedical applications*. Enfield, NH: Science Publ., p. 209-238.

FitzSimmons, S. C. 1993. "The changing epidemiology of cystic fibrosis". *Journal of Pediatrics*, 122, p. 1-9.

Fletcher, P. D. I., B. H. Robinson, R. B. Freedman et C. Oldfield. 1985. "Activity of lipase in water-in-oil microemulsions". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 81, p. 2667-2679.

Friess, H., J. Böhm, M. W. Müller, B. Glasbrenner, R. L. Riepl, P. Malfertheiner et M. W. Büchler. 1996. "Maldigestion after total gastrectomy is associated with pancreatic insufficiency". *American Journal of Gastroenterology*, 91, p. 341-347.

Frossard, J. L. et T. Nicolet. 2007. "Pancréatite chronique et insuffisance pancréatique : De l'origine à son traitement". *Forum Med. Suisse*, 3, p. 75-80.

Fruton, J. S. 1999. *Proteins, enzymes, genes : the interplay of chemistry and biology*. New Haven: Yale Univ. Pressp.

Fuguet, E., M. Reta, C. Gibert, M. Rosés, E. Bosch et C. Ràfols. 2008. "Critical evaluation of buffering solutions for pKa determination by capillary electrophoresis". *Electrophoresis*, 29, p. 2841-2851.

Gabert, V. M. et M. S. Jensen. 1997. "A comparison of two methods to measure amylase, lipase, trypsin, and chymotrypsin activity and the effect of freezing and thawing on enzyme activities in pancreatic juice". *Pancreas*, 15, p. 183-190.

Ganong, W. F. 2005. *Review of medical physiology*. New York: McGraw-Hill Medical, 912 p.

Garrett, R. H. et C. M. Grisham. 2000. *Biochimie*. Paris: De Boeck Université, 1292 p.

Gaskin, K. J., P. R. Durie et L. Lee. 1984. "Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. Delineation of patients with steatorrhea secondary to relative colipase deficiency". *Gastroenterology*, 86, p. 1-7.

Gella, F. J., G. Gubern, R. Vidal et F. Canalias. 1997. "Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriosid as substrate". *Clinica Chimica Acta*, 259, p. 147-160.

- Gilbert, H.F. 2000. *Basic Concept in Biochemistry - A student's survival guide*, 2 éd. New-York: McGraw-Hill, 331 p.
- Go, V. L., J. R. Poley, A. F. Hofmann et W. H. Summerskill. 1970. "Disturbances in fat digestion induced by acidic jejunal pH due to gastric hypersecretion in man". *Gastroenterology*, 58, p. 638-646.
- Go, V. L. W. 1993. *The Pancreas : biology, pathobiology, and disease*, 2 éd. New York: Raven Press, 1176 p.
- Gore, M. G. 2000. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. Oxford; New York: Oxford University Press, 368 p.
- Guilbault, G. G. et J. Hieserman. 1969. "Fluorometric substrate for sulfatase and lipase". *Analytical Chemistry*, 41, p. 2006-2009.
- Gul, S., S. K. Sreedharan et K. Brocklehurst. 1998. *Enzyme assays : essential data*. Chichester; New York: John Wiley, 118 p.
- Gullo, L., L. Barbara et G. Labo. 1988. "Effect of cessation of alcohol use on the course of pancreatic dysfunction in alcoholic pancreatitis". *Gastroenterology*, 95, p. 1063-1068.
- Hameed, S., W. S. Dhillon et S. R. Bloom. 2009. "Gut hormones and appetite control". *Oral Diseases*, 15, p. 18-26.
- Hendrickson, H. S. 1994. "Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes". *Analytical Biochemistry*, 219, p. 1-8.
- Hiele, M., Y. Ghos, P. Rutgeerts et G. Vantrappen. 1989. "Starch digestion in normal subjects and patients with pancreatic disease, using a $^{13}\text{CO}_2$ breath test". *Gastroenterology*, 96, p. 503-509.
- Hockfield, S., S. Carlson, C. Evans, P. Levitt, J. Pintar et L. Siberstein. 1993. *Selected methods for antibody and nucleic acid probes*. Plainview, New-York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 679 p.
- Howard, J. M. et W. Hess. 2002. *History of the pancreas : mysteries of a hidden organ*. New York: Kluwer Acad., Plenum Publ., 729 p.
- Hsiu, J., E. H. Fischer et E. A. Stein. 1964. "Alpha-Amylases as Calcium-Metalloenzymes. II. Calcium and the Catalytic Activity*". *Biochemistry*, 3, p. 61-66.
- Hui, Y. H. 2006. *Food biochemistry and food processing*. Ames, Iowa: Blackwell Pub. Professional, 769 p.

- Illanes, A. 2008. *Enzyme biocatalysis principles and applications*. Dordrecht; London: Springer, 391 p.
- Imrie, J. R., D. G. Fagan et J. M. Sturgess. 1979. "Quantitative evaluation of the development of the exocrine pancreas in cystic fibrosis and control infants". *American Journal of Pathology*, 95, p. 697-707.
- Ishikawa, K., I. Matsui, S. Kobayashi, H. Nakatani et K. Honda. 1993. "Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylases". *Biochemistry*, 32, p. 6259-6265.
- Jian, R. 2001. *Hépatogastro-entérologie*. Paris: Ellipses, 460 p.
- Jones, L. J., R. H. Upson, R. P. Haugland, N. Panchuk-Voloshina et M. Zhou. 1997. "Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement". *Analytical Biochemistry*, 251, p. 144-152.
- Kang, S.-H. et M. S. Fuchs. 1973. "An improvement in the hummel chymotrypsin assay". *Analytical Biochemistry*, 54, p. 262-265.
- Karp, G. et J.-C. Wissocq. 2004. *Biologie cellulaire & moléculaire*. Bruxelles: De Boeck, 850 p.
- Kartal, F., A. Akkaya et A. Kilinc. 2008. "Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted polyvinylalcohol". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics*
- Kearsley, M. W. et S. Z. Dziedzic. 1995. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*. London; New York: Blackie Academic & Professional, 275 p.
- Kerlin, P., L. Wong, B. Harris et S. Capra. 1984. "Rice flour, breath hydrogen, and malabsorption". *Gastroenterology*, 87, p. 578-585.
- Kierszenbaum, A. L. 2006. *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*. Bruxelles: De Boeck, 638 p.
- Kimura, H., Y. Futami, S. Tarui et T. Shinomiya. 1982. "Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts". *Journal of Biochemistry*, 92, p. 243-251.
- Kishimura, H., K. Hayashi, Y. Miyashita et Y. Nonami. 2006. "Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*)". *Food Chemistry*, 97, p. 65-70.
- Klein, B. et J. A. Foreman. 1980. "Amylolysis of a chromogenic substrate, Cibachron Blue F3GA-amylose: Kinetics and mechanism". *Clinical Chemistry*, 26, p. 250-253.

- Kukor, Z., M. Toth, G. Pal et M. Sahin-Toth. 2002. "Human Cationic Trypsinogen Arg117 is the reactive site of an inhibitor surface loop that controls spontaneous zymogen activation". *Journal of Biological Chemistry*, 277, p. 6111-6117.
- Kunitz, M. 1947. "Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties". *Journal of General Physiology*, 30, p. 291-310.
- Kurooka, S., S. Okamoto et M. Hashimoto. 1977. "A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase". *Journal of Biochemistry*, 81, p. 361-369.
- Lankisch, P. G., B. Lembcke, G. Wemken et W. Creutzfeldt. 1986. "Functional reserve capacity of the exocrine pancreas". *Digestion*, 35, p. 175-181.
- Lankisch, P. G., A. Lohr-Happe, J. Otto et W. Creutzfeldt. 1993. "Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease". *Digestion*, 54, p. 148-155.
- Lankisch, P. G., J. Otto, I. Erkelenz et B. Lembcke. 1986. "Pancreatic calcifications: No indicator of severe exocrine pancreatic insufficiency". *Gastroenterology*, 90, p. 617-621.
- Layer, P. et J. Keller. 1999. "Pancreatic Enzymes: Secretion and Luminal Nutrient Digestion in Health and Disease". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 28, p. 3-10.
- Layer, P., M. Von Der Ohe, G. Gröger, D. Dicke et H. Goebell. 1992. "Luminal availability and digestive efficacy of substituted enzymes in pancreatic insufficiency". *Pancreas*, 7, p. 745-749.
- Lebenthal, E., D. D. K. Rolston et D. S. Holsclaw Jr. 1994. "Enzyme therapy for pancreatic insufficiency: Present status and future needs". *Pancreas*, 9, p. 1-12.
- Lemaire, E., D. O'Toole, A. Sauvanet, P. Hammel, J. Belghiti et P. Ruzsniwski. 2000. "Functional and morphological changes in the pancreatic remnant following pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastric anastomosis". *British Journal of Surgery*, 87, p. 434-438.
- Leskovic, V. 2003. *Comprehensive enzyme kinetics*. New York: Kluwer Academic, Plenum Pub., 438 p.
- Levitt, M. D., P. Hirsh et C. A. Fetzer. 1987. "H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates". *Gastroenterology*, 92, p. 383-389.
- Lévy, P. 2002. "Natural history of exocrine pancreatic insufficiency". *Hépto-Gastro*, 9, p. 115-122.
- Lodish, H. F. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*. Bruxelles: De Boeck Université, 1344 p.

- Loftus Jr, E. V., B. A. Olivares-Pakzad, K. P. Batts, M. C. Adkins, D. H. Stephens, M. G. Sarr et E. P. DiMugno. 1996. "Intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas: Clinicopathologic features, outcome, and nomenclature". *Gastroenterology*, 110, p. 1909-1918.
- Loiselle, D. S. 1985. "The effect of temperature on the basal metabolism of cardiac muscle". *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 405, p. 163-169.
- Lowe, M. E. 1992. "The catalytic site residues and interfacial binding of human pancreatic lipase". *Journal of Biological Chemistry*, 267, p. 17069-17073.
- Lowe, M. E. 2002. "The triglyceride lipases of the pancreas". *Journal of Lipid Research*, 43, p. 2007-2016.
- MacGregor, E. A. 1988. "Alpha-Amylase structure and activity". *Journal of Protein Chemistry*, 7, p. 399-415.
- Marotta, F., D. Labadarios, L. Frazer, A. Girdwood et I. N. Marks. 1994. "Fat-soluble vitamin concentration in chronic alcohol-induced pancreatitis: Relationship with steatorrhea". *Digestive Diseases and Sciences*, 39, p. 993-998.
- Marshall, W. J. et S. K. Bangert. 2005. *Clinical chemistry*. Edinburgh: Mosby, 422 p.
- Mayer, F. C. et J. Larner. 1959. "Substrate cleavage point of the alpha- and beta-amylases". *Journal of the American Chemical Society*, 81, p. 188-193.
- McKellar, R. C. 1989. *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Boca Raton: CRC Press, 310 p.
- Menges, D. A., D. L. Ternullo, A. L. Tan-Wilson et S. Gal. 1997. "Continuous assay of proteases using a microtiter plate fluorescence reader". *Analytical Biochemistry*, 254, p. 144-147.
- Meyer-Bertenrath, J. G. et H. Kaffarnik. 1968. "A simple method for the determination of lipase activities". *Hoppe Seylers Z Physiology Chemistry*, 349, p. 1071-1072.
- Moussard, C. 2002. *Biochimie structurale et métabolique : médecine, pharmacie, sciences*. Bruxelles: De Boeck Université, 324 p.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes et V. W. Rodwell. 2002. *Biochimie de Harper*, 25 éd. Sainte-Foy, Québec: De Boeck Université, Presses de l'Université Laval, 933 p.
- Nakonieczny, M., K. Michalczyk et A. Kedziorski. 2007. "Midgut protease activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*". *Comptes - Rendus Biologies.*, 330, p. 126-134.

- Naz, S., R. Siddiqi et S. A. Sayeed. 2001. "In vitro study of the inhibitory effect of Fe(II), Fe(III) and Zn(II) ions on the activity of trypsin". *Food Chem.*, 73, p. 381-384.
- Nealon, W. H., J. C. Thompson, J. E. Fischer et D. Andersen. 1993. "Progressive loss of pancreatic function in chronic pancreatitis is delayed by main pancreatic duct decompression: A longitudinal prospective analysis of the modified puestow procedure". *Annals of Surgery*, 217, p. 458-468.
- Neurath, H. et K. Bailey. 1954. "Proteolytic enzymes". In *The Proteins, vol. 2 parts B*. New York: Academic Press, p. 1157-1198.
- Nishikata, M., K. Suzuki, Y. Yoshimura, Y. Deyama et A. Matsumoto. 1999. "A phosphotyrosine-containing quenched fluorogenic peptide as a novel substrate for protein tyrosine phosphatases". *Biochemical Journal*, 343, p. 385-391.
- Nordgaard, I., J. J. Rumessen et E. Gudmand-Hoyer. 1992. "Assimilation of wheat starch in patients with chronic pancreatitis. Positive effect of enzyme replacement". *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27, p. 412-416.
- Norton, J. A. 2008. "Pancreas". In *Surgery : basic science and clinical evidence*. New York, NY: Springer, p. 875-910.
- Omichi, K. et T. Ikenaka. 1984. "Differential assay of human pancreatic and salivary α -amylases in serum using a new fluorogenic substrate". *Clinica Chimica Acta*, 138, p. 197-203.
- Page, M. J. et E. Di Cera. 2008. "Serine peptidases: Classification, structure and function". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, p. 1220-1236.
- Park, R. W. et R. J. Grand. 1981. "Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: A review". *Gastroenterology*, 81, p. 1143-1161.
- Pearse, A. G. E., J. M. Polak et S. R. Bloom. 1977. "The newer gut hormones. Cellular sources, physiology, pathology, and clinical aspects". *Gastroenterology*, 72, p. 746-761.
- Pelmont, J. 1995. *Enzymes: catalyseurs du monde vivant*. Grenoble, Isère: Presses universitaires de Grenoble, 1039 p.
- Peng, S. B., F. Zheng, E. L. Angleton, D. Smiley, J. Carpenter et J. E. Scott. 2001. "Development of an internally quenched fluorescent substrate and a continuous fluorimetric assay for Streptococcus pneumoniae signal peptidase I". *Analytical Biochemistry*, 293, p. 88-95.
- Perez, M. M., A. D. Newcomer et C. G. Moertel. 1983. "Assessment of weight loss, food intake, fat metabolism, malabsorption, and treatment of pancreatic insufficiency in pancreatic cancer". *Cancer*, 52, p. 346-352.

- Permyakov, E.A. 1993. *Luminescent spectroscopy of proteins*. Boca Raton: CRC Press, 164p.
- Price, N. C. et L. Stevens. 1999. *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins*, 3 éd. Oxford; New York: Oxford University Press, 478 p.
- Randall, D. J., W. W. Burggren, K. French et R. Eckert. 1997. *Eckert animal physiology : mechanisms and adaptations*. New York: W.H. Freeman and Co.p.
- Rawling, N.D. et A.J. Barnett. 1993. "Evolutionary families of peptidases". *Biochemistry Journal*, 290, p.205-218.
- Regan, P. T., J. R. Malagelada et E. P. DiMagno. 1977. "Comparative effects of antacids, cimetidine and enteric coating on the therapeutic response to oral enzymes in severe pancreatic insufficiency". *New England Journal of Medicine*, 297, p. 854-858.
- Rinderknecht, H., I. G. Renner et C. Carmack. 1979. "Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas". *Gut*, 20, p. 886-891.
- Roberts, I. M. 1989. "Enzyme therapy for malabsorption in exocrine pancreatic insufficiency". *Pancreas*, 4, p. 496-503.
- Roby, J. F. et D. French. 1970a. "The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme". *Journal of Biological Chemistry*, 245, p. 3917-3927.
- Roby, J. F. et D. French. 1970b. "Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic alpha-amylase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 138, p. 662-670.
- Rosenbloom, J. 1984. "Elastin: Relation of protein and gene structure to disease". *Laboratory Investigation*, 51, p. 605-623.
- Ross, J. R. et M. M. Shaw. 1934. "The effect of dehydration on the pancreatic and intestinal enzymes". *Journal of Biological Chemistry*, 104, p. 131-139.
- Roulet, M., A. M. Weber et Y. Paradis. 1980. "Gastric emptying and lingual lipase activity in cystic fibrosis". *Pediatric Research*, 14, p. 1360-1362.
- Rovero, M. 1988. "Limited proteolyses in pancreatic chymotrypsinogens and trypsinogens". *Biochimie*, 70, p. 1131-1135.
- Santaniello, E., P. Ciuffreda, S. Casati et H. E. Sayed. 2006. "Design of new chromogenic substrates for the spectrophotometric assay of lipolytic activity of lipases". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, p. 76-80.

- Sarles, H. et J. Sahel. 1973. "Definition. 1. Acute pancreatitis, chronic pancreatitis, recurrent pancreatitis". *Acta Gastroenterologica Belgica*, 36, p. 173-199.
- Sarner, M. 2003. "Treatment of Pancreatic Exocrine Deficiency". *World Journal of Surgery*, 27, p. 1192-1195.
- Sarrazin, J. et M. Verdaguer. 1991. *L'oxydoréduction, Concepts et expériences*. Paris: Ellipses, 320 p.
- Sauke, D.J., D.E. Metzler, C.M. Metzler. 1977. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. New-York: Academic Press, 1129 p.
- Schaller, J. 2008. *Human blood plasma proteins : structure and function*. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 526 p.
- Schickaneder, E., W. Hosel, V. H. d.Eltz et U. Geuss. 1988. "Casein-resorufin, a new substrate for a highly sensitive protease assay". *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 330, p. 360.
- Scow, R. O. 1988. "Effect of sodium taurodeoxycholate, CaCl₂ and albumin on the action of pancreatic lipase on droplets of trioleoylglycerol and the release of lipolytic products into aqueous media". *Biochimie*, 70, p. 1251-1261.
- Shetty, K. 2006. *Food biotechnology*. New York: CRC Press, Taylor & Francis, 1982 p.
- Sivaraman, T., T. K. S. Kumar, G. Jayaraman et C. Yu. 1997. "The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation". *Journal of Protein Chemistry*, 16, p. 291-297.
- Skoog, D. M. West, Holler, C. Buess-Herman, J. Dauchot-Weymeers et F. Dumont. 1997. *Chimie analytique*. Paris; Bruxelles: De Boeck Université, 870 p.
- Slack, J. M. W. 1995. "Developmental biology of the pancreas". *Development*, 121, p. 1569-1580.
- Snell, R. S. 2007. *Clinical anatomy by regions*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 926 p.
- Somogyi, M. 1938. "Micromethods for the estimation of diastase". *Journal of Biological Chemistry*, 29, p. 399-414.
- Stein, J. H. et J. M. Eisenberg. 1998. "Pancreatic secretion". In *Internal medicine*. St. Louis: Mosby, p. 2129-2134.
- Stenesh, J. 1998. *Biochemistry*. New York: Plenum, 568 p.

- Stevens, M. P. 1990. "Natural polymers". In *Polymer chemistry : an introduction*. New York: Oxford University Press, p. 533-571.
- Stiefel, D. J. et P. J. Keller. 1973. "Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase". *BBA - Enzymology*, 302, p. 345-361.
- Takeuchi, T., T. Matsushima et T. Sugimura. 1975. "Separation of human [alpha]-amylase isozymes by electro-focusing and their immunological properties". *Clinica Chimica Acta*, 60, p. 207-213.
- Tietz, N. W. et D. F. Shuey. 1993. "Lipase in serum - The elusive enzyme: An overview". *Clinical Chemistry*, 39, p. 746-756.
- Tortora, G. J. et S. R. Grabowski. 1996. *Principles of anatomy and physiology*, 8 éd. New York: Harper Collins, 1152 p.
- Twining, S. S. 1984. "Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes". *Analytical Biochemistry*, 143, p. 30-34.
- Uhlig, H. et E. M. Linsmaier-Bednar. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. New York: Wiley, 454 p.
- Umbreit, W. W. 2002. "Microbial amylases". In *Advances in applied microbiology. Volume 7*. New York: Academic Press, p. 273-304.
- United States Pharmacopeial Convention. 2000. "Pancreatin. Pancrelipase". In *USP-NF*. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, p. 1254-1258.
- Vallee, B. L. et H. Neurath. 1954. "Carboxypeptidase, a zinc metalloprotein". *Journal of the American Chemical Society*, 76, p. 5006-5007.
- Van Bennekum, A. M., E. A. Fisher, W. S. Blamer et E. H. Harrison. 2000. "Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase". *Biochemistry*, 39, p. 4900-4906.
- Van Tilbeurgh, H., S. Bezzine, C. Cambillau, R. Verger et F. Carrière. 1999. "Colipase: Structure and interaction with pancreatic lipase". *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441, p. 173-184.
- Van Tilbeurgh, H., M. P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger et C. Cambillau. 1993. "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography". *Nature*, 362, p. 814-820.
- Van Tilbeurgh, H., L. Sarda, R. Verger et C. Cambillau. 1992. "Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex". *Nature*, 359, p. 159-162.

- Vandermeers, A., M. C. Vandermeers Piret, J. Rathe et J. Christophe. 1974. "On human pancreatic triacylglycerol lipase: isolation and some properties". *Biochimica et Biophysica Acta*, 370, p. 257-268.
- Vayre, P. 2003. *Le risque annoncé de la pratique chirurgicale : complications - dommages - responsabilité - indemnisation*. Paris; Berlin: Springer, 893 p.
- Venkatesh, R. et P. Sundaram. 1998. "Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers". *Protein Engineering*, 11, p. 691-698.
- Vignais, P. 2001. *La biologie, des origines à nos jours: une histoire des idées et des hommes*. Les Ullis: EDP sciences, 478 p.
- Voet, D. et J. G. Voet. 2005. *Biochimie*, 2 éd. Bruxelles: De Boeck Université, 1600 p.
- Waters, D. L., S. F. A. Dorney, K. J. Gaskin, M. A. Gruca, M. O'Halloran et B. Wilcken. 1990. "Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program". *New England Journal of Medicine*, 322, p. 303-308.
- Werner, M. 1982. "Lipase". In *CRC handbook of clinical chemistry*. Boca Raton: CRC Press. 5, p. 85-88.
- Whitcomb, D. C. 2000. "Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis". *Medical Clinics of North America*, 84, p. 531-547.
- Whitcomb, D. C. et M. E. Lowe. 2007. "Human pancreatic digestive enzymes". *Digestive Diseases and Sciences*, 52, p. 1-17.
- Wilson, K. et J. M. Walker. 2000. *Principles and techniques of practical biochemistry*, 5 éd. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 784 p.
- Winkler, F. K., A. D'Arcy et W. Hunziker. 1990. "Structure of human pancreatic lipase". *Nature*, 343, p. 771-774.
- Winston, J. H., Z.-J. He, M. Shenoy, S.-Y. Xiao et P. J. Pasricha. 2005. "Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain". *Pain*, 117, p. 214-222.
- Xie, X. S. et H. P. Lu. 1999. "Single-molecule enzymology". *Journal of Biological Chemistry*, 274, p. 15967-15970.
- Xu, Z., Q. Xie et H.-M. Zhou. 2003. "Trichloroacetic Acid-Induced Molten Globule State of Aminoacylase from Pig Kidney". *Journal of Protein Chemistry*, 22, p. 669-675.

Yamada, M. et T. Fujita. 2007. "New procedure for the measurement of pancreatic lipase activity in human serum using a thioester substrate". *Clinica Chimica Acta*, 383, p. 85-90.

Yamamoto, T. 1995. *Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes*. Boca Raton: CRC Press, 206 p.

Yang, L. Y., A. Kuksis et J. J. Myher. 1990. "Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: A reexamination". *Journal of Lipid Research*, 31, p. 137-148.

Zabel, B. U., S. L. Naylor, A. Y. Sakaguchi, G. I. Bell et T. B. Shows. 1983. "High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, p. 6932-6936.

Zhong, Q. et C. E. Glatz. 2006. "Enzymatic assay method for evaluating the lipase activity in complex extracts from transgenic corn seed". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, p. 3181-3185.