

Lipase et colipase de la truite arc-en-ciel. Quelques résultats récents.

par C. LÉGER, V. DUCRUET, J. FLANZY

Station de Recherches de Nutrition, I.N.R.A.,
78350 Jouy en Josas, France.

Summary. *Lipase and colipase in the rainbow trout : some recent results.*

A previous paper (Léger, Bauchart and Flanz, 1977) suggested that trout might possess a lipase cofactor displaying a similar role as that of mammal colipase. Further proofs for the existence of this cofactor and the first molecular data concerning the lipase-colipase system in fish are given in this paper.

Intercaecal tissue containing pancreatic cells was treated as previously described (Léger, 1972). A defatted powder (powder E) was obtained and used as a starting material for the three preparations (summarized in figs. 1, 3 and 5). Lipase activity assays were performed at pH 8.7 with 10 mM Tris buffer, 10 mM bile salts, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ and 130 mM tributyrin as substrate.

Total lipase activity was assessed in the presence of an excess of porcine colipase prepared from porcine pancreatic juice. Direct lipase activity was measured in the absence of added colipase.

Trout lipase did not pass through a PM 30 membrane (Amicon), whereas a colipase-like cofactor did. This trout cofactor was retained by a UM2 membrane (Amicon). It could also be replaced by porcine colipase (fig. 2), which activated trout lipase. Owing to this analogy, we proposed to call colipase the colipase-like trout cofactor. This was a meaningful example of an interspecific colipase effect, despite the considerable phylogenetic distance separating trout and pig. This interspecific effect, however, was limited as demonstrated by Canioni *et al.* (1977).

PAG electrophoresis of deoxycholate (DOC)-treated lipase (fig. 4) showed that the trout fast lipase was constituted of lipid and protein fraction. After DOC treatment, the lipid fractions migrated independently of the protein fraction.

SDS-mercaptoethanol-PAG electrophoresis, with or without 2M urea, suggested the presence of two proteins with molecular weights of about 57.000 and 11 000 daltons ; the second one was not easy to distinguish. When these results were compared with those obtained by ultrafiltrations, the two proteins seemed to represent trout lipase and colipase.

Introduction.

Des travaux antérieurs (Léger, Bauchart et Flanz, 1977) ont permis de suggérer que la Truite pourrait posséder un cofacteur de la lipase jouant un rôle analogue à celui que joue la colipase chez les mammifères étudiés jusqu'à ce jour. Nous présentons dans cette communication plusieurs expériences fournissant de nouvelles preuves de l'existence de ce cofacteur chez la Truite et quelques renseignements complémentaires sur le système lipase-colipase de ce poisson.

Matériel et techniques.

Les truites, pesant environ 200 g, proviennent d'une pisciculture de Seine-Maritime. Lorsque les animaux sont sacrifiés, l'eau est à une température de 12°-13 °C.

Le tissu intercaecal contenant les cellules pancréatiques subit les traitements précédemment décrits (Léger, 1972). La « poudre délipidée » obtenue ⁽¹⁾ (poudre E) sert de point de départ aux préparations décrites plus loin.

Les activités lipasiques sont mesurées dans 10 ml de milieu à pH 8,7 contenant 130 mM de substrat tributyrine, 10 mM de tampon Tris-HCl, des sels biliaires (10 mM), NaCl (0,15 M) et CaCl₂ (4 mM). L'activité lipasique directe est mesurée sans adjonction de colipase. L'activité lipasique totale est obtenue en ajoutant au milieu un excès de colipase de Porc obtenue par passage de 10 ml de suc pancréatique frais sur une colonne de Sephadex G100. Le suc pancréatique est prélevé sur un Porc muni d'une fistule pancréatique (Corring, Aumaître et Rérat, 1972).

Les détails concernant les différents traitements et les conditions des migrations électrophorétiques seront fournis dans le chapitre suivant.

Résultats et discussion.

1. Dix grammes de poudre E sont mis en suspension dans 200 ml de tampon bicarbonate 50 mM (pH 8,0), contenant 0,4 M NaCl et 1 mM benzamidine. Après centrifuga-

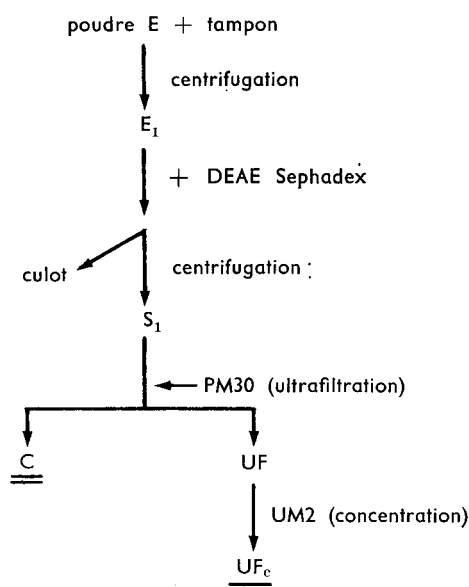


FIG. 1. — Les différents stades de la préparation (voir 1, dans résultats et discussion).

(1) Le tissu intercaecal contient environ 50 p. 100 de lipides. Après les différentes étapes de délipidation, la poudre E ne contient plus en moyenne que 1 p. 100 de lipides (quantités variant de 0,5 à 2 p. 100 suivant les préparations).

tion, on obtient un surnageant E_1 . Celui-ci est agité en présence de DEAE Sephadex (30 g), préalablement équilibré dans le même tampon que précédemment (270 ml), afin d'éliminer les acides nucléiques qui peuvent gêner l'étape de filtration. Après centrifugation, le surnageant S_1 est filtré sur membrane PM30 ⁽¹⁾. Les activités lipasiques de S_1 , du concentrat C et de l'ultrafiltrat UF concentré (dénommé UF_c) sur membrane UM2 ⁽¹⁾ sont mesurées en présence et en l'absence de colipase de Porc. Les différents stades de la préparation sont résumés dans le schéma de la figure 1. Les activités directes et totales de S_1 sont identiques. L'addition de colipase de Porc ne présente donc aucun effet sur l'activité lipasique de S_1 en présence de sels biliaries. Par contre, la figure 2

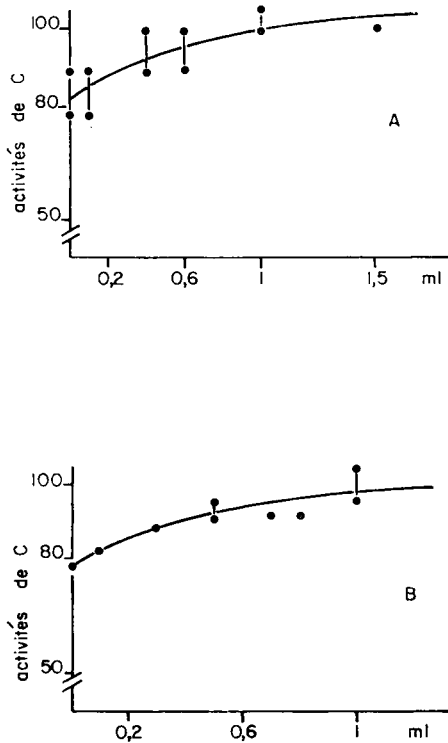


FIG. 2. — *Activité du concentrat C en fonction des quantités de colipase de Porc ajoutées dans le milieu en présence de sels biliaries 5 mM (fig. 2A) et en fonction des quantités d'ultrafiltrat UF_c ajouté dans le milieu en présence de 10 mM sels biliaries (fig. 2B). Les activités sont rapportées à la valeur 100 obtenue pour la lipase de Truite présente dans S_1 avant filtration sur PM 30 (voir 1, dans résultats et discussion).*

montre qu'après filtration l'activité du concentrat C est augmentée soit par l'addition de colipase de Porc soit par l'addition de UF_c (l'activité n'est pas augmentée par le filtrat de UM2). Par ailleurs, UF_c ne présente aucune activité lipasique. Ceci montre qu'un cofacteur présentant une action identique à celle de la colipase de Porc était

⁽¹⁾ Membranes ultrafiltrantes Amicon.

présent dans S_1 et qu'il est partiellement isolé dans l'ultrafiltrat UF_6 . Il passe à travers une membrane PM30, contrairement à la lipase, tandis qu'il est retenu par une membrane UM2.

2. Dix mg d'un lyophilisat de lipase rapide L_R dialysée 24 h contre l'eau sont dissous dans le tampon TRIS-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 10 mM NaCl, 4 mM $CaCl_2$ et 1 mM benzamidine, puis placés sur une colonne de DEAE Sephadex A25 ($1,5 \times 25$ cm) préalablement équilibrée dans le même tampon. Le pic cationique est concentré sur membrane UM2. Les différents stades de la préparation sont schématisés sur la figure 3. La solution ainsi préparée est soumise à des électrophorèses sur gel de poly-

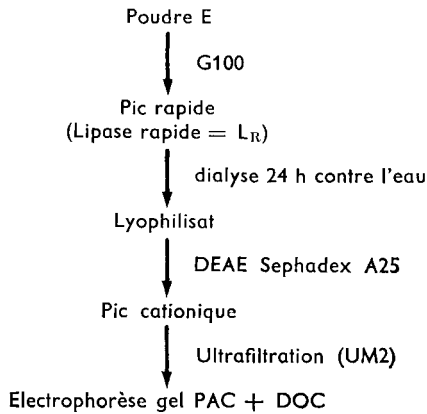


FIG. 3. — Préparation en vue du passage de L_R traité au DOC en électrophorèse PAC (voir 2, dans résultats et discussion).

acrylamide ($T = 10$ p. 100) (Salton et Schmitt, 1967) en présence de 0,6, 6 et 12 mM désoxycholate (DOC). Après migration électrophorétique, les lipides et les protéines sont révélés respectivement par une précoloration au Noir Soudan B ⁽¹⁾ et par une coloration à l'Amido Schwartz suivie d'une décoloration. Les bandes colorées obtenues sont portées sur le schéma de la figure 4. Quelle que soit la concentration en DOC, on observe toujours deux bandes de protéines de R_f 0,09 et 0,11, tandis que la partie la plus importante de la coloration reste à la limite du gel de concentration et du gel de séparation. La coloration des lipides des tubes témoins (sans L_R) migre totalement avec le DOC 6 mM et 12 mM. Les micelles de DOC obtenues à ces deux concentrations représentent un milieu favorable à la dissolution du Noir Soudan B, ce qui explique la migration de la coloration. Par contre, à 0,6 mM de DOC (concentration inférieure à la concentration micellaire critique), la migration n'a pas lieu. Avec L_R , la migration du colorant des lipides augmente aux concentrations 6 et 12 mM DOC, tandis qu'une bande colorée apparaît avec DOC 0,6 mM au même niveau que pour les témoins

(1) Selon la méthode de Ressler, Springgate et Kaufman (1961) ; l'excès de coloration reste à l'emplacement du dépôt de l'échantillon, c'est-à-dire au sommet du gel.

DOC 6 et 12 mM. Sans DOC, il est important de noter qu'il n'existe aucune migration du Noir Soudan B en présence de L_R .

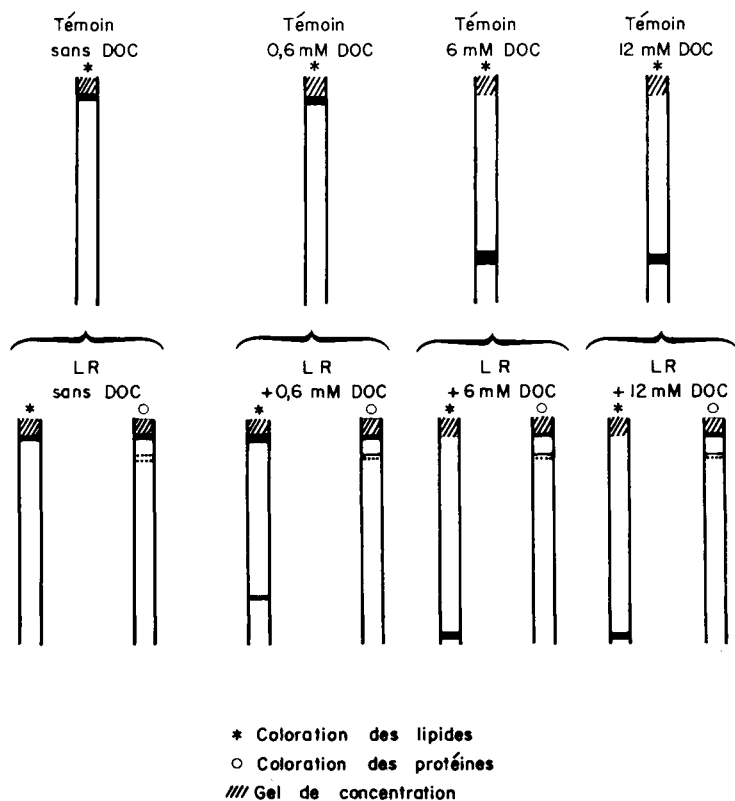


FIG. 4. — Résultats obtenus en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 p. 100 après traitement de L_R par le désoxycholate de Na (DOC).

En résumé, le DOC, aux trois concentrations, permet de décrocher des lipides de L_R , mais cette action est plus importante et détermine une migration plus rapide avec les deux concentrations supérieures. A 6 et 12 mM DOC nous sommes certainement en présence de micelles mixtes dont la charge négative est supérieure à celle des lipides de L_R + 0,6 mM DOC. Le DOC est par contre sans effet apparent sur les protéines de L_R .

3. Un gramme de poudre E est mis en suspension dans 30 ml de tampon TRIS-HCl 100 mM (pH 8,0) contenant NaCl 10 mM et benzamidine 1 mM et est agité en présence de DEAE Sephadex (3 g). Le gel est égoutté dans une colonne de large diamètre. Le gel est ensuite lavé par 50 ml du même tampon. La solution éluée est centrifugée. Le surnageant est précipité par le sulfate d'ammonium à 60 p. 100 de la saturation (Léger, 1972). Le précipité est repris, après centrifugation, dans 5 ml NaCl 0,4 M. Ceux-ci sont placés sur colonne G100. Les deux premiers tiers du pic rapide (L_R) sont collectés et dialysés contre l'eau pendant 20 h, puis lyophilisés dans des flacons de 2 ml, de telle sorte que

chaque flacon renferme une quantité connue de L_R . Le schéma de la figure 5 résume les principaux stades de la préparation.

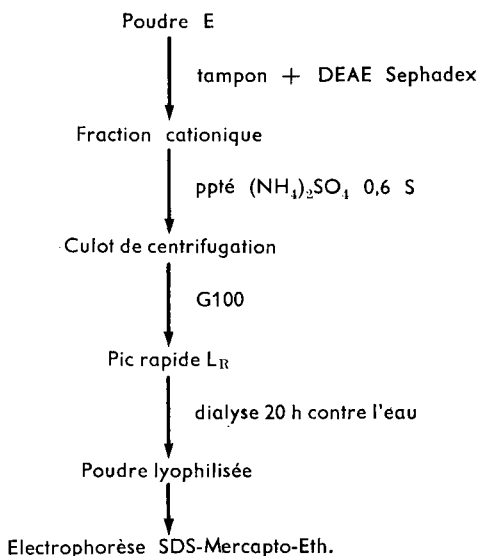


FIG. 5. — Préparation en vue du passage de L_R en électrophorèse PAC-SDS 0,1 p. 100 — Mercaptoéthanol 0,1 p. 100 (voir 3, dans résultats et discussion).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS a été effectuée selon la méthode de Shapiro, Vinuela et Maizel (1967). Quelques modifications ont été apportées. Les échantillons (protéines étalons : 30 μg ; L_R : entre 160 et 240 μg) sont traités 5 mn au bain-marie bouillant dans le tampon phosphate 0,01 M contenant 0,1 p. 100 de SDS et 0,1 p. 100 de mercaptoéthanol. On ajoute 20 mg de saccharose. Le volume total déposé sur un gel n'excède pas 100 μl . Deux types de gel sont utilisés : T = 5 p. 100 et 6,9 p. 100. Avec 9 mA/tube, la durée de la migration dans le gel ($0,6 \times 6$ cm) est de 5 à 6 h. La fixation des protéines est effectuée dans le mélange acide acétique 30 p. 100/méthanol (50/50 : v/v).

Les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie 1 p. 100/acide trichloracétique 20 p. 100 (1/9 : v/v), puis décolorées dans l'acide trichloracétique 10 p. 100 (méthode de Chrambac *et al.*, 1967).

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 6,9 p. 100 ont également été effectuées dans le milieu précédent auquel était ajouté de l'urée à la concentration finale de 2 M.

Avec ou sans urée, les gels permettent de détecter une protéine de poids moléculaire aux environs de 57 000 daltons. Il a été également possible de révéler la présence d'une protéine de faible poids moléculaire sur certains gels. Son poids moléculaire serait de l'ordre de 11 000 daltons (tabl. 1).

L'ensemble de ces résultats permet de tirer les enseignements suivants. La lipase de Truite ne filtre pas à travers une membrane Amicon PM 30, tandis qu'un cofacteur

de la lipase traverse la membrane et présente donc un poids moléculaire faible. Ce cofacteur est cependant retenu sur membrane Amicon UM2.

TABLEAU 1

Poids moléculaire de la lipase et de la colipase ⁽¹⁾ de Truite sur gel PAC

	T (p. 100)	Milieux	P.M.	
Bande lente : lipase	{	5,0	SDS-Merc. E	59 000 ± 2 000
		6,9	SDS-Merc. E	55 000 ± 2 000
		6,9	SDS-Merc. E + urée 2 M	55 000 ± 1 200
		6,9	SDS-Merc. E + urée 2 M	58 000 ± 1 000
Bande rapide : colipase	6,9	SDS-Merc. E + urée 2 M	11 000 ± 500	
Lipase de porc		Différents milieux	55 000 ± 3 000	
Protéines étalons	{	albumine bovine ovalbumine cytochrome		

⁽¹⁾ Pour la dénomination de cette protéine, voir texte.

La colipase de Porc et le cofacteur présentent un effet analogue sur la lipase de Truite. En vertu de cette analogie, nous appellerons dorénavant colipase le cofacteur dont nous révélons la présence chez le Poisson. Il faut remarquer que cette expérience permet de montrer un intéressant exemple d'action interspécifique de la colipase entre deux espèces séparées par une distance phylogénétique considérable. Cette interspécificité présente cependant des limites comme l'ont montré Canioni *et al.* (1977) à l'aide de lipase de champignons, *Rhizopus arrhizus* et *Geotrichum candidum*.

Les électrophorèses en présence de DOC montrent que la lipase rapide est bien constituée d'une fraction protéique et d'une fraction lipidique. Dans notre cas, la fraction protéique ayant migré présente deux bandes très voisines qui pourraient représenter deux formes moléculaires de la lipase. Une partie importante de la fraction protéique ne pénètre pas dans le gel de polyacrylamide. Cependant, nos séparations en gel de polyacrylamide-SDS-mercaptoéthanol avec ou sans urée 2 M permettent d'avancer que la fraction protéique contient deux protéines, l'une constamment visible avec un PM de 57 000 daltons environ, l'autre plus difficilement détectable avec un PM de l'ordre de 11 000 daltons. Si nous comparons ces résultats à ceux qui ont été obtenus lors des filtrations sur membrane, il est raisonnable de penser que la première bande représente la lipase de Truite, la deuxième la colipase. Dans des conditions expérimentales analogues, notons que la lipase de Porc * présente un PM de 55 000 daltons.

Commission CNERNA Digestion-Absorption/Association
des Physiologistes, Paris 5-6 octobre 1978.

* Don de M. Charles, CBBM du CNRS, 31, chemin Joseph-Aiguier, Marseille 13009.

Références

- CANIONI P., JULIEN R., RATHELOT J., SARDA L., 1977. Pancreatic and microbial lipases : a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids*, **12**, 393-397.
- CHRAMBAC A., REISFELD R. A. WYCKOFF M., ZACCARI J., 1967. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **20**, 150-154.
- CORRING T., AUMAITRE A., RÉRAT A., 1972. Fistulation permanente du pancréas exocrine chez le Porc. Application : réponse de la sécrétion pancréatique au repas. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 109-124.
- LÉGER C., 1972. Essai de purification de la lipase du tissu intercaecal de la Truite (*Salmo gairdneri* Rich). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 341-345.
- LÉGER C., BAUCHART D., FLANZY J., 1977. Some properties of pancreatic lipase in *Salmo gairdneri* Rich : Km, effects of bile salts and Ca⁺⁺, gel filtrations. *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**, 359-363.
- RESSLER N., SPRINGGATE R., KAUFMAN J., 1961. A method of lipoprotein electrophoresis. *J. Chromatog.*, **6**, 409-415.
- SALTON M. R. J., SCHMITT M. D., 1967. Separation of lipids from proteins and cell membranes by disc electrophoresis. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **27**, 529-534.
- SHAPIRO A. L., VINUELA E., MAIZEL J. V., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **28**, 815-820.
-