

Intérêt de l'électrofocalisation pour purifier la lipoprotéine lipase (LPL) et préparer des anticorps anti-LPL

Lydie NOÉ, Jacqueline ETIENNE (*), J. DEBRAY

Centre hospitalo-universitaire St-Antoine, Paris.

La lipoprotéine lipase (LPL) fait partie des principaux enzymes impliqués dans le développement, puisque son action précède le stockage des acides gras (sous forme de triglycérides) dans les adipocytes. Elle permet en effet que soient captés les acides gras à partir des triglycérides circulants (chylomicrons et VLDL) (Etienne, 1984). Des anticorps anti-LPL sont utiles pour des études métaboliques sur la LPL. Comme le lait de vache est la source la plus riche en LPL, il a été tout d'abord utilisé pour préparer des anticorps anti-LPL. Mais ces anticorps n'inhibent que partiellement la LPL humaine. Ils inhibent totalement la LPL du lait, du tissu adipeux, du plasma post-héparine de vache et trouvent ainsi une application intéressante dans l'étude de la LPL d'origine bovine. Nous avons préparé de tels anticorps chez le lapin à partir de LPL hautement purifiée par chromatographie d'affinité puis iso-électrofocalisation (IEF) préparative (Noé *et al.*, 1982). L'attention sera centrée ici sur l'intérêt de l'IEF pour purifier la LPL.

Préparation de LPL hautement purifiée.

Dans une première étape, la LPL est tout d'abord partiellement purifiée par chromatographie d'affinité sur Sépharose-héparine. Des impuretés protéiques ayant une affinité pour l'héparine sont cependant co-éluées avec la LPL. Celles-ci sont alors éliminées par IEF sur plaque d'Ultrodex. La séparation de la LPL des impuretés protéiques n'est pas uniquement fonction des pH isoélectriques. En effet, la LPL migre très peu depuis son point d'application à pH voisin de 7,7. D'autre part, dès essais préliminaires nous ont montré que lorsque la LPL partiellement purifiée est déposée en zone acide elle ne se déplace pas non plus. Ceci aurait pu être interprété comme une dénaturation de la LPL qui n'était plus capable de migrer ou comme le résultat d'une forte affinité de la LPL pour la matrice d'Ultrodex. C'est pourquoi l'expérience suivante d'électrophorèse sur

(*) A qui adresser la correspondance et les demandes de tirés à part : Biochimie, Faculté de Médecine, 27, rue Chaligny, 75012 Paris.

Ultradox en l'absence d'ampholytes a été entreprise. Les résultats ici mentionnés (voir fig. 1) ont été obtenus à partir de plasma post-héparine. La démonstration est plus spectaculaire qu'avec le lait car le plasma post-héparine contient plus d'impurétés protéiques, mais l'interprétation reste la même.

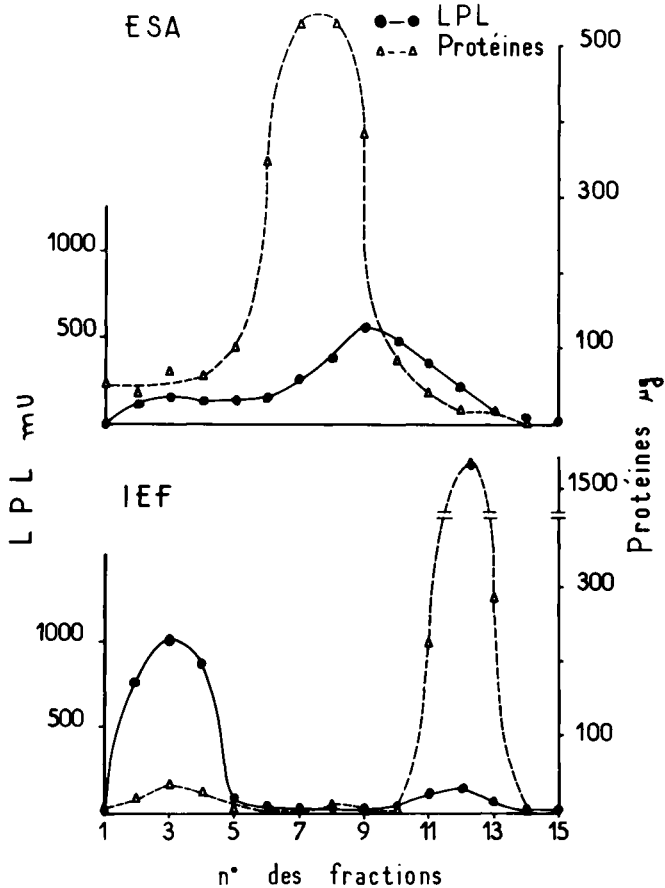


FIG. 1. — Effet des ampholytes sur la mobilité de la LPL.

ESA : Electrophorèse (sans ampholytes) de la LPL sur Ultradox ;
IEF ; Iso-électrofocalisation préparative sur Ultradox (IEF).

Une partie aliquote de LPL partiellement purifiée (par chromatographie d'affinité sur colonne de Sépharose-héparine) est appliquée sur une plaque d'Ultradox, 1° ne contenant pas d'ampholytes (= simple électrophorèse, à pH 9) (ESA), 2° contenant des ampholytes (= iso-électrofocalisation, gradient pH : 9→5 (fractions 1→15)) (IEF). ESA et IEF sont effectuées à 0-1 °C durant 14-16 h. (Le plasma post-héparine de vache a été obtenu 10 min après injection de 100 UI d'héparine par kg).

●—● : Activité LPL, en mU/fraction (U = µmol d'acides gras libérés/min) ; △---△ : Protéines, en µg/fraction.

(Volume des fractions : 4 ml).

Résultats.

En simple électrophorèse sur Ultrodex. — La LPL est capable de migrer depuis son point d'application, ce qui prouve qu'elle n'est ni dénaturée, ni liée à l'Ultrodex. Mais dans ce cas, elle co-migre avec les impuretés protéiques. La LPL ne peut donc pas être purifiée par ce procédé.

En iso-électrofocalisation. — On note une très nette séparation de la LPL et des impuretés protéiques. Il semble donc que la LPL ait une plus grande affinité pour les ampholytes que pour les impuretés protéiques co-éluées avec elle lors de la chromatographie d'affinité. Bengtsson & Olivecrona (1977), à la suite d'IEF sur colonne, où ils obtenaient 1 ou plusieurs pics (à différents pH), avaient déjà émis l'hypothèse que la LPL puisse se lier aux ampholytes en formant des complexes. Il est d'ailleurs très difficile de débarrasser complètement la LPL des ampholytes qu'elle a fixées pendant l'IEF. Mais celles-ci n'étant ni toxiques pour l'animal ni immunogènes, leur présence en faibles quantités ne constitue donc pas un problème lorsque la LPL est purifiée par ce procédé dans le but d'obtenir des anticorps. En fait, on a donc tiré ici avantage de la liaison LPL-ampholytes pour purifier la LPL.

Le rendement en LPL récupérée après IEF est excellent. Cela provient du fait que les pertes par traînées sont évitées (la LPL ne migrant pratiquement pas), et que pendant toute la durée de l'IEF la LPL se trouve à 0°-1°C dans un milieu riche en glycérol qui la protège contre l'inactivation.

Application.

En utilisant des anticorps anti-LPL de vache, préparés à partir de LPL purifiée par ce procédé (d'IEF couplé à une chromatographie d'affinité), nous avons pu montrer (Etienne, Noé *et al.*, 1981) que dans le plasma post-héparine de vache, l'activité lipolytique est essentiellement due à la LPL. La lipase hépatique n'y existe qu'à l'état de traces. Cette particularité se retrouve aussi chez le bœuf et le taureau. Des anticorps anti-LPL de rat ont également été préparés par ce même procédé. Des anticorps contre la LPL humaine sont en cours de préparation.

*10^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Rennes, 9-10 mai 1984.*

Remerciements. — Travail effectué avec l'aide de l'INSERM : Contrat CRL 827002. Nous sommes très reconnaissants au Pr. du Mesnil du Buisson (I.N.R.A.) d'avoir mis des bovins à notre disposition.

Références

- ETIENNE J., 1984. La lipoprotéine lipase. *Ann. Biol. clin.*, **42**, 179-197 (Revue générale).
ETIENNE J., NOÉ L., ROSSIGNOL M., DOSNE A. M., DEBRAY J., 1981. Post-heparin lipolytic activity with no hepatic triacylglycerol lipase involved in a mammalian species. *Biochim. biophys. Acta*, **663**, 516-523.

- NOÉ L., ROSSIGNOL M., ETIENNE J., MILLOT F., AL QUADAN F., KISSEBAH A., 1982. Anti-lipoprotein lipase antisera against lipoprotein lipase purified by affinity chromatography followed by preparative electrofocusing. In *Proc. 6th int. Symp. on Atherosclerosis*. Berlin West, 14-18 June.
- BENGTSSON G., OLIVECRONA T., 1977. Does lipoprotein lipase bind ampholytes ? 189-195. In RADOLA B. J., GRAESSLIN D., *Electrofocusing and isotachopheresis*, de Gruyter, Berlin.
-