

Application de la chromatographie d'affinité haute performance (CAHP) à l'étude des interactions de la colipase avec les isolipases, par Nicole MAHÉ, C. LÉGER, J.-M. ALESSANDRI. *Station de Recherches de Nutrition, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas.*

La technique de chromatographie d'affinité classique appliquée au système lipase/colipase (colipase immobilisée sur un gel de polyacrylamide/agarose) permet d'établir un modèle mathématique définissant les modalités d'interactions entre l'accepteur et le ligand (détermination de la constante de dissociation K_D du complexe lipase-colipase) (Alessandri *et al.*, 1984). Nous avons entrepris d'appliquer ce modèle en chromatographie d'affinité haute performance (CAHP). La colipase est immobilisée sur un gel de « Lichrosorb diol » (Merck) selon la technique décrite ci-après. La lipase pancréatique porcine est purifiée selon Roverly *et al.* (1978). Le mélange d'isoenzymes obtenu ($L_B - L_{A_1} - L_{A_2} - L_C$) contient la lipase B sous forme majoritaire (75 %). Les isolipases diffèrent entre elles par leur partie glycanique fixée sur l'Asn 166 de la molécule et par leur point isoélectrique. Elles sont séparées soit par chromatofocalisation, soit par une colonne anionique. L'étude analytique en CAHP porte d'une part sur le mélange d'isolipases et d'autre part sur les différentes formes isolées.

La lipase B engage des interactions spécifiques avec la colipase fixée sur silice. Le volume d'éluion augmente quand la quantité déposée diminue. Cette iso-enzyme se comporte au travers de la colonne de la même manière que le mélange (tabl. 1). Le maximum d'interactions (\bar{K}_D minimum) entre lipase B et colipase se situe à pH ≈ 5 , valeur proche de celle trouvée en chromatographie d'affinité classique et qui correspond aux points isoélectriques des deux protéines.

TABL. 1. — Variation de la constante de dissociation K_D (en μM) du complexe lipase-colipase en fonction du pH.

pH	7,20	6,90	6,40	5,90	5,10	4,70	4,20
Mélange lipases B, A ₁ , A ₂ , C	1,16	0,97	0,75	0,66	0,45	0,49	0,85
Lipase B	2,60	0,90	0,72	0,71	0,46	0,40	0,59

En revanche, bien que les lipases A₁, A₂ et C soient retardées sur la colonne, leur volume d'éluion varie faiblement avec le pH (pH 7,2 $V_e = 2,15$ ml \rightarrow pH 4,7 $V_e = 1,60$ ml) et reste constant, quelle que soit la dilution de l'échantillon. Nous en déduisons que la valeur de \bar{K}_D , non mesurable dans nos conditions, doit être supérieure à $5 \times 10^{-6} M$ à pH 6,9 pour les 3 isolipases A₁, A₂ et C (la constante de dissociation du complexe lipase B — colipase est égale à $0,9 \cdot 10^{-6} M$ à pH 6,9). Il semble donc que les 3 isolipases A₁, A₂ et C aient moins d'affinité pour la colipase immobilisée que la lipase B, résultat observé en chromatographie d'affinité classique. Les résultats obtenus peuvent aussi s'expliquer par une dénaturation partielle des 3 molécules qui semblent beaucoup plus sensibles que la lipase B aux effets du pH et de la température.

Alessandri J.-M., Léger C., Mahé N., 1984. Further results on lipase-colipase interactions studied by affinity chromatography. *Biochimie*, **66**, 663-672.

Roverly M., Boudouard M., Bianchetta J., 1978. An improved large scale procedure for the purification of porcine pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **525**, 373-379.