50376
1977
132

50376
1977
132

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE

spécialité : biochimie

par

CATHERINE DESREUMAUX

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

NOUVELLES METHODES D'ANALYSE ET DE FRACTIONNEMENT DES LIPOPROTEINES

ETUDE PARTICULIERE DE LA Lp(a) LIPOPROTEINE

membres du Jury :	MM les Professeurs	MONTREUIL	Président
		JAILLARD	Rapporteur
	Mademoiselle	SPIK	Examinateurs
	M le Professeur	FRUCHART	
	M le Docteur	SEZILLE	

Le Janvier 1977

A MES PARENTS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON PRESIDENT DE THESE

A MES JUGES

Monsieur le Professeur MONTREUIL

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude pour la bienveillance que vous avez eue à notre égard en nous laissant une grande liberté dans la conduite de ce travail.

Grâce à vous et à Mademoiselle SPIK que je remercie très vivement de bien vouloir participer à ce jury, j'ai pu suivre un enseignement moderne et critique et apprécier d'éminentes qualités pédagogiques qui m'ont toujours été très utiles.

Monsieur le Professeur JAILLARD

Je vous sais gré de la confiance dont vous m'honorez en m'acceptant comme membre de votre équipe.

Ces années passées dans votre laboratoire m'ont fait découvrir le sens profond de la recherche.

Vous m'avez donné les moyens de la réaliser et je vous en suis profondément reconnaissante.

Monsieur le Docteur SEZILLE

Vous avez inspiré et guidé ce travail.

En m'accueillant dans votre laboratoire, vous m'avez fait bénéficier de votre immense compétence dans le domaine des lipides.

Votre extrême rigueur scientifique et votre remarquable esprit de synthèse resteront toujours pour moi un exemple.

Je vous adresse mes plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur FRUCHART

Vous avez décidé de mon orientation en suggérant ce sujet de recherches.

L'intérêt que vous avez toujours manifesté pour ce travail m'a été d'un grand réconfort.

Vous avez veillé avec patience à sa réalisation, me prodiguant sans cesse votre aide morale et scientifique.

Vos précieux conseils et vos encouragements constants m'ont très souvent aidée.

Je vous dois beaucoup et suis heureuse de pouvoir aujourd'hui vous présenter ce mémoire.

A mes amis du Laboratoire de Physiopathologie des Lipides:

Ce travail est le fruit de l'étroite collaboration et de la précieuse amitié que tous mes amis du laboratoire n'ont cessé de me témoigner. J'en suis profondément touchée et leur adresse à tous un très grand merci.

A Messieurs
BUASSA-BU-TSUMBU
Philippe DEWAILLY
Richard GILLARD
Jacques FREMAUX
André NOUVELOT

A Mesdemoiselles
Elisa CAMPOS
Elisabeth CARPENTIER
Myriam GRATTE
Sylvie MOULIN

A Mesdames
DEDONDER
GLANOWSKI
MONSTERLEET
MULLET
PONTHIEU
PORCHET

et plus particulièrement :

A Madame BERNARD pour la sympathie que j'ai trouvée auprès d'elle ; je l'ai souvent mise à contribution, mais elle m'a toujours aidée avec bonne humeur,

A Madame DEBRAY du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, qui m'a aimablement aidée à la réalisation du dosage des glucides,

A Mademoiselle Marie-Christine UYTTERHAEGHE qui a dactylographié cette thèse avec beaucoup de gentillesse et veillé avec soins à la réalisation pratique de ce travail,

J'adresse mes plus vifs remerciements.

CE TRAVAIL A ETE REALISE DANS LE CADRE DU

LABORATOIRE DE PHYSIOPATHOLOGIE DES LIPIDES

Professeur J. JAILLARD - Docteur G. SEZILLE

Ce travail a fait l'objet des mémoire, publications et communications suivantes :

1 - Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie,
Université des Sciences et Techniques de Lille -
le 8 octobre 1974.

2 - G. SEZILLE, J.C. FRUCHART, J. JAILLARD, P. DEWAILLY et C. DESREUMAUX
Improved serum lipoprotein electrophoresis procedure in polyacrylamide gradient gel.
Biomedecine Express, 1975, 23, 315-317.

3 - J. JAILLARD, C. DESREUMAUX, J.C. FRUCHART, P. DEWAILLY et G. SEZILLE
Etude critique des différentes techniques de lipidogramme, intérêt de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
Communication à la Société Française de Biologie Clinique le 29 mai 1975,
Ann. Biol. Clin., 1975, 33, 391.

4 - J. JAILLARD, G. SEZILLE, J.C. FRUCHART et C. DESREUMAUX
Apport de l'électrophorèse des lipoprotéines en gel de polyacrylamide au typage des hyperlipoprotéinémies.
Cahiers de Nutrition et de Diététique, 1975,
5, 66-69.

5 - J.C. FRUCHART, C. DESREUMAUX, BUASSA-bu-TSUMBU et P. DEWAILLY
Estimation turbidimétrique des lipoprotéines de basse densité et ses applications.
In "Organisation des laboratoires - Biologie Prospective" 3e Colloque de PONT-A-MOUSSON
Ed. Expansion Scientifique Française, 1975, p. 523-527.

6 - J.C. FRUCHART, C. DESREUMAUX, P. DEWAILLY, G. SEZILLE et J. JAILLARD
Quantitative and qualitative analysis of lipoproteins.
Colloque International "of lipoproteins and hyperlipemies", LISBONNE 3 - 6 septembre 1975.

7 - C. DESREUMAUX, BUASSA-bu-TSUMBU, J.C. FRUCHART, P. DEWAILLY, J. JAILLARD et G. SEZILLE
Analyse des lipoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par précipitation fractionnée à l'aide de polyanions et de détergents.
Ann. Biol. Clin., 1976, 34, 309-316.

8 - C. DESREUMAUX, J.C. FRUCHART, Y. MOSCHETTO, P. DEWAILLY, G. SEZILLE et J. JAILLARD
Application de l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide à l'isolement des lipoprotéines sériques.
13ème "Congrès Mondial International pour l'Etude des Corps Gras"
Communication faite à MARSEILLE le 30 août 1976.

9 - C. DESREUMAUX, J.C. FRUCHART, P. DEWAILLY, J. JAILLARD, G. SEZILLE
et Y. MOSCHETTO, A. DELACOURTE
Fractionation of serum lipoproteins by preparative electrophoresis in polyacrylamide gel.
J. Chromatography, 1977, 130, 336-341.

10 - C. DESREUMAUX, J.C. FRUCHART, P. DEWAILLY, J. JAILLARD et G. SEZILLE
Purification et caractérisation de la lipoprotéines Lp(a).
Biochimie, (soumis pour publication).

11 - J.C. FRUCHART, C. DESREUMAUX, BUASSA-bu-TSUMBU et P. DEWAILLY
Dosage enzymatique direct des triglycérides à l'auto-analyseur Technicon AA II. Etude critique de la méthode.
In "Organisation des Laboratoires - Biologie Prospective" 3e Colloque de PONT-A-MOUSSON
Ed. Expansion Scientifique Française, 1975, p. 497-500.

P L A N

INTRODUCTION

REVUE GENERALE

REVUE GENERALE SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES

- Introduction
- Lipides plasmatiques
- Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques
- Principales anomalies de répartition des lipoprotéines

ETUDE CRITIQUE DES PRINCIPALES METHODES D'ETUDE DES LIPOPROTEINES

- Introduction
- Ultracentrifugation
- Electrophorèse
- Précipitations sélectives par voie chimique
- Différenciation immunochimique
- Chromatographie

LA Lp(a) LIPOPROTEINE

- Introduction
- Définition et caractérisation dans le plasma
- Propriétés physiques, structure et composition chimique
- Dosage dans le plasma, métabolisme et incidence pathologique

TRAVAUX PERSONNELS

ANALYSE QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES

ETABLISSEMENT D'UN BILAN LIPIDIQUE

- Introduction
- Electrophorèse en gel de polyacrylamide
- Estimation semi-quantitative des lipoprotéines de basse densité
- Conclusion - Etablissement d'un bilan lipidique

ELECTROPHORESE PREPARATIVE DES LIPOPROTEINES SUR

COLONNE DE GEL DE POLYACRYLAMIDE - APPLICATION A

LA PURIFICATION ET A LA CARACTERISATION DES HDL,

LDL ET Lp(a)

- Introduction
- Matériel et méthodes
- Résultats et applications
- Conclusion

CONCLUSION GENERALE

APPENDICE TECHNIQUE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La fréquence et la gravité des accidents artériopathiques qui surviennent lors de l'évolution des hyperlipoprotéinémies rendent nécessaire leur diagnostic. L'identification précise du trouble lipidique est le guide indispensable du traitement, qu'il soit diététique ou médicamenteux. C'est pourquoi l'exploration biochimique des lipides et des lipoprotéines sériques a suscité ces dernières années de nombreux travaux.

Orienté par un examen clinique minutieux, le diagnostic d'une hyperlipémie est confirmé par un bilan lipidique complet, classiquement fondé sur l'aspect du sérum à jeun, le dosage des constituants lipidiques et surtout le lipoprotéinogramme. Les anomalies qualitatives et quantitatives de répartition des lipoprotéines sériques doivent être détectées pour parvenir à un typage précis de l'hyperlipémie.

La recherche de l'erreur métabolique à l'origine de ces troubles a suscité le développement de plusieurs méthodes d'étude des lipoprotéines. Bien que décrites depuis longtemps, beaucoup d'entre elles posent encore d'importants problèmes et une étude critique s'impose.

Le travail que nous présentons a eu pour but le développement de techniques simples d'exploration des lipoprotéines.

+ Dans le premier chapître, nous rappelons le métabolisme et les méthodes d'analyse usuelles des lipoprotéines. Toutes sont destinées à parvenir à une meilleure connaissance et à un typage plus précis de l'hyperlipémie.
Les données acquises à propos d'une lipoprotéine particulière,

la Lp(a) lipoprotéine, sont ensuite proposées. Présente dans le sang à des concentrations variables selon les individus, la signification pathologique de cette lipoprotéine reste à préciser.

+ Le deuxième chapître rapporte nos travaux personnels.
Ils consistent : - d'une part en l'analyse qualitative et semi-quantitative des lipoprotéines plasmatiques,

- d'autre part en l'isolement à l'état pur de certaines classes de lipoprotéines.

Deux techniques originales d'étude des lipoprotéines sont donc proposées dans une première partie. Elles se révèlent très utiles au dépistage, au typage et à la surveillance des hyperlipémies.
L'une utilise l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient discontinu de pH et de concentration ; l'autre utilise les tests de précipitation sélective des lipoprotéines de basse et très basse densités.

Dans la seconde partie, une autre orientation est donnée à notre travail qui s'intéresse au problème de la purification des lipoprotéines. La mise au point d'une méthode d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide nous permet d'opposer une technologie simple aux très nombreuses méthodes déjà décrites pour la préparation à l'état pur de certaines classes de lipoprotéines. Nous les présentons et rapportons une application de notre technique à l'isolement, à partir d'un plasma d'un sujet dyslipoprotéinémique , de la Lp(a) lipoprotéine.

REVUE GENERALE

REVUE GENERALE SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES

-=-=-=-=-=-=-

La revue générale que nous présentons rappelle brièvement quelques points fondamentaux de la biochimie des lipides et lipoprotéines. Pour la réaliser, nous nous sommes inspirés de l'ouvrage :

" Lipides et Lipoprotéines "
Métabolisme et méthodes d'exploration.
Applications au diagnostic et à la physio-pathologie des hyperlipémies.

Par G. SEZILLE, J.C. FRUCHART, J. JAILLARD et P. DEWAILLY

Première partie : Métabolisme des Lipoprotéines chez l'Homme (G. SEZILLE).

Ed. Crouan et Roques - LILLE 1976 -

-=-=-=-=-

INTRODUCTION

Les lipides plasmatiques forment un groupe hétérogène de composés hydrophobes. Exception faite pour les acides gras non estérifiés, ils sont incorporés dans des complexes lipoprotéiques à caractère hydrophile assurant leur transport et leur distribution.

LES LIPIDES PLASMATIQUES

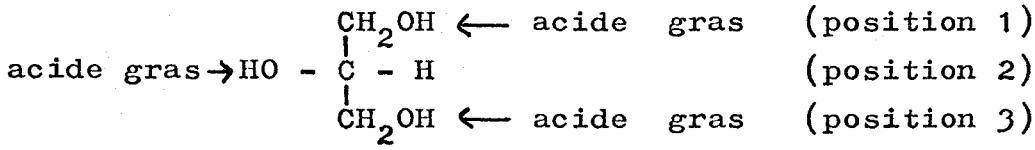
Les complexes lipoprotéiques circulants sont dénaturés par l'addition d'un alcool au plasma et les lipides totaux sont alors extractibles par un solvant approprié. L'extrait global comprend :

+ Des acides gras non estérifiés (ou AGNE)

Transportés par la sérumalbumine et accessoirement par les lipoprotéines, ces acides gras portent souvent le nom d'acides gras libres (AGL). Les principaux représentants sont les acides oléique 18 : 1 (n - 9) (38 %), palmitique 16 : 0 (28 %), stéarique 18 : 0 (15 %) et linoléique 18 : 2 (n - 6) (9 %) ;

+ Des glycérides

Ce sont des esters d'acides gras et de glycérol :

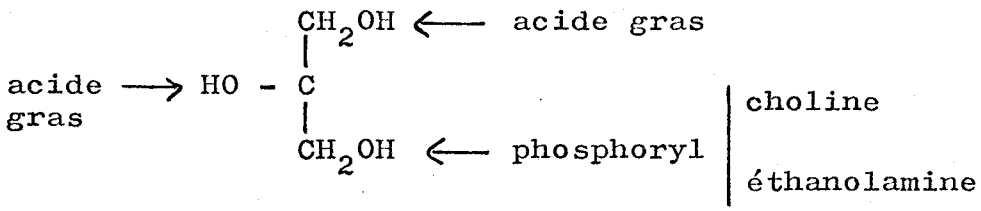


Suivant le cas, il peut s'agir de mono (MG), di (DG) ou triglycérides (TG). Les acides gras y ont perdu leur caractère acide et les TG représentent la forme idéale de transport et de mise en réserve de l'énergie dans la cellule. Les principaux acides gras constitutifs sont les acides oléique, palmitique et linoléique ;

+ Des phospholipides

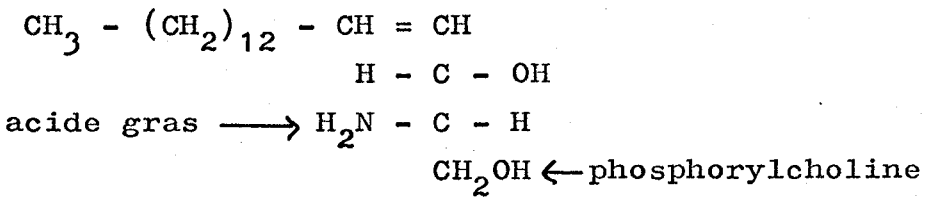
Présents dans toutes les lipoprotéines, ils constituent la fraction polaire et assurent la mise en solution des autres lipides. On les rencontre sous forme de glycérophospholipides ou de sphingophospholipides :

- les glycérophospholipides ont la formule générale suivante :



Le principal représentant est la phosphatidylcholine ou lécithine ; la lysolécithine résulte de la perte d'un acide gras, en général en position 2 où se situent de préférence les acides gras polyinsaturés (18 : 2, 20 : 4).

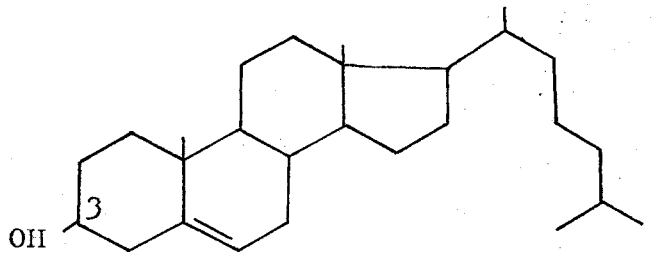
- Les sphingophospholipides ne comportent qu'un acide gras, en général saturé ou très long, n'estérifiant pas une fonction alcool mais engageant une liaison amide avec la fonction amine de la sphingosine. Dans le plasma, le principal représentant est la sphingomyéline, sphingophospholipide à choline :



+ Des stérols

Ce sont des alcools secondaires à structure polycyclique, en général associés aux lipides dont ils possèdent les caractères de solubilité. Dans le règne animal, le principal représentant est le cholestérol dont l'hydroxyle en 3, qui lui confère une certaine polarité, est estérifiable par

un acide gras (souvent l'acide linoléique 18 : 2)



- Quantitativement, pour une lipémie normale (comprise entre 5,5 et 7,5 g/l), les constituants lipidiques plasmatiques se répartissent comme suit :

  - phospholipides 1,5 à 2,8 g/l (dont 70 % de lécithine et 20 % de sphingomyéline),
  - cholestérol 1,5 à 2,8 g/l (dont 70 % estérifié),
  - glycérides 0,7 à 1,6 g/l (dont 85 % de triglycérides),
  - acides gras libres 0,14 à 0,23 g/l

LES CARACTERISTIQUES DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES

A/ DEFINITION DES LIPOPROTEINES

Diverses protéines forment des complexes avec d'autres types de composés parmi lesquels des lipides. Il y a deux types de complexes protéines - lipides : les lipoprotéines et les protéolipides.

Les lipoprotéines ont en général les propriétés de solubilité des protéines : elles sont solubles dans l'eau ou dans des solutions de sels faiblement concentrées. Les protéolipides ont les propriétés de solubilité caractéristiques des lipides : ils sont insolubles dans l'eau et solubles dans certains solvants organiques.

Normalement, les protéolipides sont absents dans le plasma. Cependant, pratiquement tous les lipides plasmatiques sont trouvés dans les lipoprotéines.

Les premières lipoprotéines ont été isolées par MACHEBOEUF en 1929 (128) à partir du sérum de cheval. Par précipitation par le sulfate d'ammonium et l'acide sulfurique 0,2 N, il isole un complexe lipoprotéique contenant plus de 40 % de lipides et 60 % de protéines ; il est soluble dans l'ea à pH neutre ou alcalin.

Le rapport lipide/protéine varie dans les lipoprotéines de 39/1 à 1/99. Il caractérise ainsi différentes classes de lipoprotéines. Cette classification se fonde sur

les différences de densité des complexes, expliquées en partie par la composition lipidique particulière à chacun d'entre eux.

B/ CLASSIFICATION DES LIPOPROTEINES (tableau 1, page 13)

Les phospholipides sont avec les triglycérides et le cholestérol les constituants lipidiques de base des lipoprotéines ; de ce fait, ces macromolécules ont une densité (d) inférieure à celle des autres protéines et flottent en ultracentrifugation dans un milieu de densité intermédiaire.

Plus une lipoprotéine est riche en lipides, spécialement en triglycérides, plus sa densité est faible et plus le diamètre de cette molécule approximativement sphérique est important. On distingue ainsi, par ultracentrifugation dans un milieu de densité convenable, diverses classes de lipoprotéines.

L'ultracentrifugation préparative définit ces classes selon leurs densités respectives, et l'ultracentrifugation analytique selon leurs vitesses de flottation ou Sf déterminées dans un milieu de densité 1,063.

a) les chylomicrons ($d < 0,94$ $Sf > 400$)

Ils sont dissociables par d'autres techniques en particules primaires (chylomicrons natifs) et particules secondaires (chylomicrons modifiés par interaction avec les autres lipoprotéines). On les trouve dans la lymphe ou le sang. Leur taux est déterminé, en période post-prandiale, par la nature de l'alimentation.

Ces grosses molécules (75 à 600 nm de diamètre et plus) sont stabilisées mais non dissoutes dans le plasma.

TABLEAU 1

REPARTITION DES LIPOPROTEINES EN CLASSES

	S_f *	Densité (g/ml)	Diamètre (nm)	P.M. moyen	M.E.
CHYLOS	> 400	< 0,94	100 - 10^2	5 . 10^9	origine
V L D L	20 - 400	0,94 - 1,006	30 - 70	7,5 . 10^6	pré-β
L D L	12 - 20	1,006 - 1,019	15 - 25	2,5 . 10^6	β
	0 - 12	1,019 - 1,063			
H D L 1**	0 - 3	< 1,063			α
H D L 2		< 1,125	6 - 14	3,9 . 10^5	
H D L 3		< 1,21	4 - 10	1,9 . 10^5	
V H D L		< 1,25		1,5 . 10^5	
Alb - AGL		> 1,25		69 . 10^3	Alb
Lp(a)		1,055 - 1,085			pré-β

P.M. : poids moléculaire

M.E. : mobilité électrophorétique (agarose)

* : vitesse de flottation en unités SVEDBERG (10^{-3} cm/sec/dyne/g) à 26° C dans une solution de NaCl à 1,063 g/ml.

** : représente moins de 5 % des LDL isolées par ultracentrifugation.

Elles sont formées à partir des graisses exogènes et sont responsables de la turbidité du sérum en période post-prandiale

b) les Very Low Density Lipoproteins ou VLDL

(0,94 < d < 1,066 Sf 20 - 400)

Elles forment un spectre continu de molécules de plus en plus riches en triglycérides et donc de plus en plus volumineuses. Leur densité diminue par conséquent à mesure qu'elles grossissent. A la limite, elles sont responsables d'une opalescence du sérum et sont appelées lipomicrons.

A l'inverse des chylomicrons dont l'origine est exogène, celle des lipomicrons est endogène. Selon certains auteurs, ils sont présents dans le sérum, même en période de jeûne et ne sont nullement affectés par le régime alimentaire. Seul le nombre relatif est variable, et, dans certaines formes d'hyperlipémies par exemple, il est considérablement accru.

c) les Low Density Lipoproteins ou LDL

(1,006 < d < 1,063 Sf 0 - 20)

Elles comprennent une fraction principale de LDL (1,019 < d < 1,063 Sf 0 - 12) et une fraction mineure (1,006 < d < 1,019 Sf 12 - 20) de composition variable, assurant la jonction avec les VLDL et ne représentant que 15 à 20 % de l'ensemble des LDL.

d) les High Density Lipoproteins ou HDL

(1,063 < d < 1,21)

Elles se subdivisent en 3 groupes :

- HDL_1 : fraction mineure de d < 1,063 et de Sf 0 - 3 formant un épaulement sur le spectre d'ultracentrifugation analytique des LDL ;

- HDL_2 de $d < 1,125$;
- et HDL_3, prépondérante, de $d > 1,21$. EWING et coll.(63) définissent les vitesses de flottation de ces deux dernières sous-classes à la densité 1,20. Elles sont de 0 - 3,5 pour les HDL_3 et 3,5 - 9 pour les HDL_2.

e) les Very High Density Lipoproteins ou VHLD

$(1,21 < d < 1,25)$

Quantitativement peu importantes, elles sédimentent avec les protéines. On ne sait pas encore s'il s'agit de VHLD natives ou d'une altération des HDL_2 ou HDL_3 intervenant lors de l'ultracentrifugation.

f) le "résidu d'ultracentrifugation"

$(d > 1,25)$

Il contient encore quelques lipoprotéines mais essentiellement des complexes formés de sérumalbumine et d'AGL ou plus exactement de sérumalbumine, d'AGL et de lysolécithine.

La figure 1 (page 16) résume la classification des lipoprotéines obtenue par ultracentrifugation analytique ou préparative.

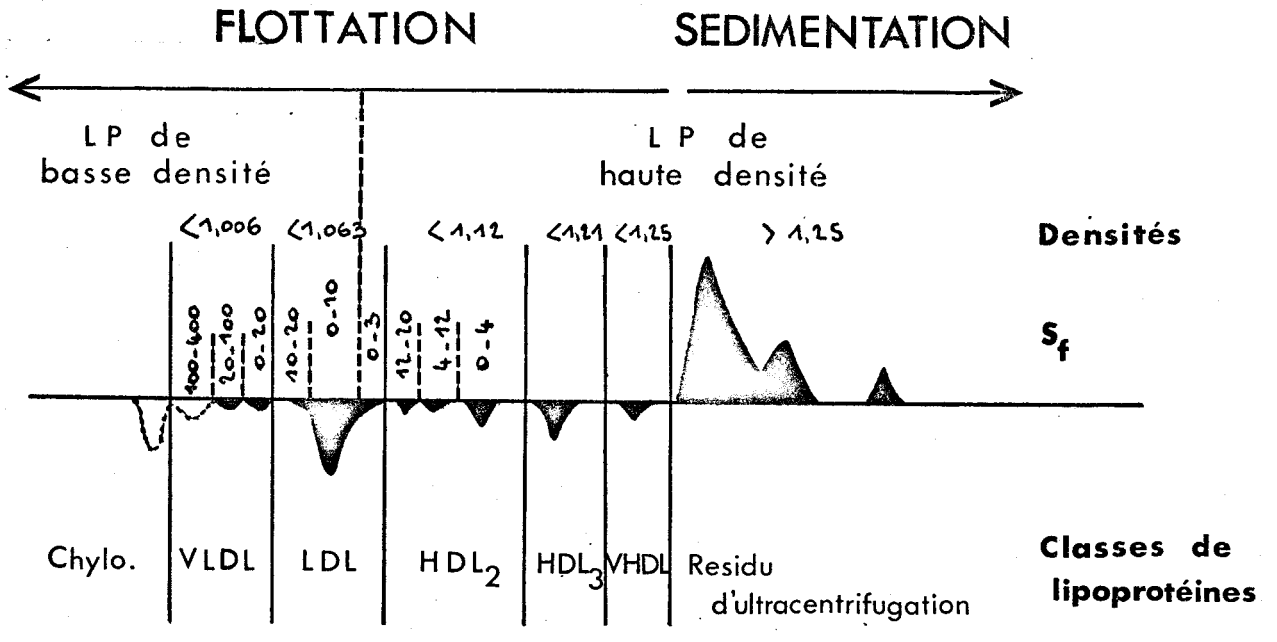
A ces critères de détermination s'ajoutent ceux de l'électrophorèse de zone. Placées dans un champ électrique, les diverses lipoprotéines présentent des mobilités différentes résultant des charges électriques des composants ionisables ; cette propriété permet leur séparation.

Différents supports sont utilisables : papier en tampon albumineux, agarose, acétate de cellulose. A pH 8,6 on met ainsi en évidence par ordre de mobilité croissante :

FIGURE 1

CLASSES ET SOUS-CLASSES DE LIPOPROTEINES

SEPAREES PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE ET PREPARATIVE



BDS LILLE

chylomicrons, bêta-lipoprotéines (LDL), pré-bêta-lipoprotéines (VLDL), alpha-lipoprotéines (HDL). La dénomination se fait en fonction de la migration correspondante des protéines sériques majeures lors de l'électrophorèse associée à une coloration spécifique des protéines :

- les VHDL évoluent parallèlement à la sérumalbumine,
- les alpha-lipoprotéines évoluent parallèlement aux alpha-1-globulines,
- les bêta-lipoprotéines évoluent parallèlement aux bêta-globulines,
- les pré-bêta-lipoprotéines évoluent parallèlement aux $alpha_2$-globulines,
- les chylomicrons évoluent parallèlement aux gamma-globulines.

Outre ces cinq classes majeures de lipoprotéines précédemment décrites, il convient de signaler l'existence de lipoprotéines particulières :

+ la Lp(a) lipoprotéine

Longtemps associée à une marque de polymorphisme génétique, cette lipoprotéine n'a pas encore d'implications pathologiques connues. Elle existe probablement chez tous les individus, mais en quantité très variable. De composition particulière, elle a une densité comprise entre 1,050 et 1,080. Sa mobilité électrophorétique sur agarose est celle des pré-bêta lipoprotéines, mais en ultracentrifugation elle sédimente à la densité 1,006, d'où son nom de "sinking pre-beta-lipoprotein"

+ la lipoprotéine flottante ou " β VLDL"

Normalement présente en petite quantité dans le sérum, on ne la décèle que dans une forme relativement rare d'hyperlipémie primitive. Elle a une mobilité électrophorétique de type bêta, et flotte à la densité 1,006 en ultracentrifugation.

+ la Lp-X

Cette lipoprotéine apparaît dans le sérum de sujets atteints d'ictère par obstruction.

Il s'agit d'une lipoprotéine anormale, riche en cholestérol, et surtout en phospholipides. En ultracentrifugation préparative, on la retrouve dans la fraction de densité $< 1,063$ et son isolement ne peut se faire qu'après immunoprécipitation des LDL avec un immunsérum spécifique anti-LDL. Elle est immunologiquement distincte des LDL et des HDL mais possède un déterminant antigénique commun avec les VLDL.

C/ REPARTITION QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES

Le tableau 2 page 19 fait état de résultats enregistrés chez des sujets normaux âgés de 16 à 65 ans.

Le plasma est surtout riche, chez le sujet à jeun, en HDL et LDL. Les variations individuelles sont importantes, surtout au niveau des VLDL et parfois des LDL, les taux de HDL étant en général stables pour un sujet donné. Le sexe, l'âge, le régime alimentaire, le poids corporel, le degré de sédentarité sont les principaux facteurs de variation. C'est ainsi que les LDL et VLDL sont plus abondantes chez l'homme et que les HDL sont majoritaires chez la femme.

D/ COMPOSITION DES LIPOPROTEINES

Elle permet d'expliquer le comportement différent de ces macromolécules en ultracentrifugation et en électrophorèse puisque chaque classe se caractérise par son rapport lipides/protéines, par la composition de sa fraction lipidique et par celle de sa copule protéique (tableau 3 page 23).

TABLEAU 2

REPARTITION QUANTITATIVE DES PRINCIPALES CLASSES DE LIPOPROTEINES

CHEZ LE SUJET NORMAL A JEUN

	HOMME	FEMME
Chylomicrons	0,11 ± 0,13 g/l	0,03 ± 0,03 g/l
V L D L	1,10 ± 0,50 g/l	0,50 ± 0,30 g/l
L D L	4,10 ± 0,60 g/l	3,20 ± 1,10 g/l
H D L	2,70 ± 0,20 g/l	4,40 ± 0,70 g/l

BIS LILLE

a) composition en lipides

Les variations de la composition lipidique des différentes classes de lipoprotéines précédemment décrites sont quantitatives plutôt que qualitatives. Elles sont déterminées par la fonction physiologique de transport des lipides relatives à chacune d'entre elles, et vraisemblablement par la stabilité exigée par la molécule.

Tous les types de lipides connus dans le plasma entrent dans la composition des quatre classes majeures de lipoprotéines :

Classe de lipides	HDL		LDL	VLDL	Chylo.
Lécithine	73,8				
Sphingomyéline	14,6				
Lysolécithine	2,0				
Phosphatidyl-sérine	1,9	55			
Phosphatidyl-éthanolamine	3,3		28,3	21,0	7,0
Phosphatidyl-inositol	2,4				
Polyglycérol-phosphatides	2,1				
Cholestérol libre	9,0		10-11	8,0	2,0
Esters de cholestérol	28,0		47-55	14,0	5,0
Triglycérides	8,0		8-10	57,0	86,0

(Les chiffres sont donnés en % du poids).

La fraction de densité > 1,21 se caractérise par un taux très faible de lipides (1 à 2 %), le reste étant formé de protéines.

Les VHDL ont une composition lipidique relativement semblable à celle des HDL ; cependant, le résidu d'ultracentrifugation (d > 1,25) contient la plupart des AGL et une quantité importante de lysolécithine (30 à 70 % des phospholipides).

b) Composition en protéines

Le pourcentage de protéines varie en fonction de la lipoprotéine :

- les chylomicrons n'en contiennent au maximum que 2 %. Ils sont enrichis au cours de leur trajet dans la circulation lymphatique ;
- les VLDL en contiennent environ 8 à 10 % ;
- les LDL : 20 à 22 % ;
- les HDL : environ 50 %.

Il existe de nombreuses dénominations concernant les copules protéiques (ou apoprotéines) des lipoprotéines. En fonction de la complexité des procédés utilisés dans la séparation, la liste des diverses apoprotéines (apo) s'allonge. En se fondant sur les travaux de SCANU et ALAUPOVIC (164, 1), la classification suivante peut être admise :

SCANU (164)	acide aminé C terminal	ALAUPOVIC (1)	chylo	VLDL	LDL	HDL
Apo HDL III	Gln Thr	Apo A_1	m		m	M
Apo HDL IV	Gln	Apo A_2				M
Apo LDL	Ser	Apo B	m	M	M	a
Apo VLDL I	Ala	Apo C_1		M	m	m
Apo VLDL II	Ser	Apo C_2	M	M	m	m
Apo VLDL III	Gln	Apo C_3		M		

M = majeur m = mineur a = absent

Trois groupes importants d'apolipoprotéines sont donc décrits selon la nomenclature d'ALAUPOVIC : apo-A, Apo-B, apo-C. Récemment d'autres apolipoprotéines ont été décrites :

- l'apo-D trouvée dans les HDL_3 et les VLDL ;
- l'apo-E trouvée dans les VHDL et les LDL de Sf 12 - 20 ;
- l'apo-Lp(a) associée à l'apo-B et à la sérumalbumine dans la Lp(a).

Ces apolipoprotéines sont intégrées dans des unités lipoprotéiques comprenant des sous-unités structurales stables associées à un nombre variable de sous-unités fonctionnelles impliquées dans le transport des lipides. C'est ainsi que l'apo-B est un élément essentiel de la sous-unité structurale des chylomicrons, des VLDL et des LDL qui comprend en outre du cholestérol et des phospholipides. L'$apo\text{-}A_2$ est de même l'élément protéique de base de la sous-unité structurale des HDL. A l'inverse l'apo-C figure, avec les lipides transportés, dans les sous-unités fonctionnelles.

La répartition des lipoprotéines en classes est essentiellement fondée sur des critères de densité. A l'inverse ALAUPOVIC (1) propose un système de classification uniquement fondé sur les apolipoprotéines comme critère de différenciation de trois familles principales :

Lp-A, Lp-B et Lp-C.

Selon cet auteur, les densités des différentes macromolécules varieraient au sein d'une même famille en fonction des charges lipidiques du moment expliquant la présence de l'apolipoprotéine correspondante à différents endroits du spectre de densité de l'ultracentrifugation.

TABLEAU 3

COMPOSITION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES CLASSES DE LIPOPROTEINES PLASMATIQUES HUMAINES

	PROTEINES* / LIPIDES*	COMPOSITION LIPIDIQUE (en mmole %)				RAPPORT
		PL	TG	CE	CL	CE/CL
CHYLOMICRONS d<0,94	2/98	7	78	8	7 (15)	1,1
V L D L d<1,006	10/90	19	49	18	14 (32)	1,3
L D L d<1,063	24/76	22	9	47	22 (69)	2,1
H D L d<1,21	53/47	44	7	38	11 (49)	3,5
V H D L d>1,21	62/38	83	8	8	1 (9)	8

* : en % du poids de lipoprotéine

PL : phospholipides TG : triglycérides

CE : cholestérol estérifié CL : cholestérol libre

LILLE

La figure 2 (page 25) dresse les corrélations entre les familles de lipoprotéines et les classifications selon les critères d'électrophorèse et de densité.

C/ COMPOSITION EN GLUCIDES

Les lipoprotéines sont en fait des lipoglycoprotéines mais les glucides ne représentent qu'un faible pourcentage, de l'ordre de 1 % en poids.

La composition de la copule glucidique des chylomicrons et des VLDL est incertaine. Les LDL contiennent des hexoses (galactose et mannose) (3,2 g), de la glucosamine (1,2 g), de l'acide sialique (0,2 g). Les HDL renferment une plus faible quantité d'hexoses (galactose, mannose, glucose) (1,5 g) mais une quantité similaire de glucosamine (1,5 g) et d'acide sialique (0,5 g). Ces taux sont exprimés pour 100 g de protéines.

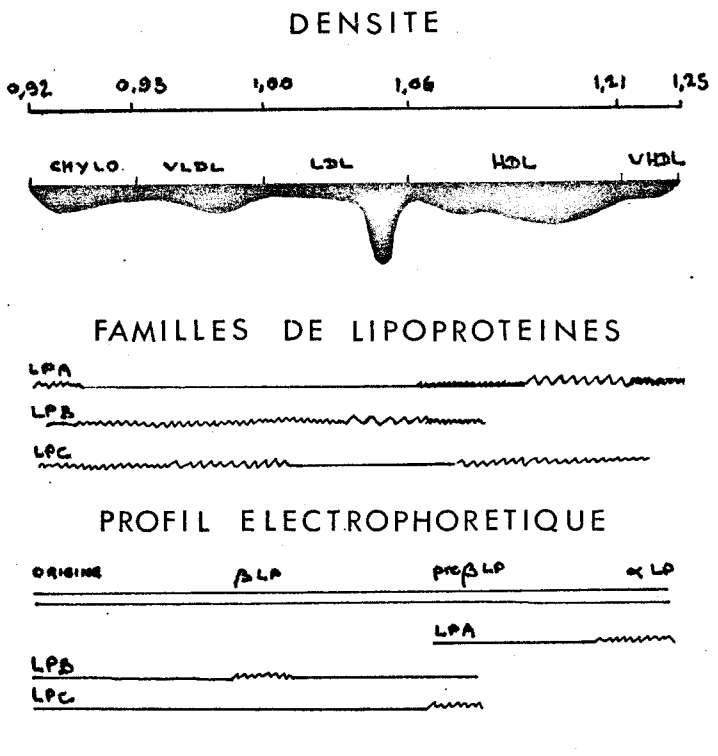
Les modifications pathologiques de ces composants et leur signification sont encore inconnues.

En ne tenant pas compte du faible pourcentage de glucides, on peut résumer la composition lipoprotéique des principales classes de lipoprotéines selon le tableau 3 (page 23).

On observe que les phospholipides varient dans le même sens que les protéines lorsqu'on passe des chylomicrons aux VHDL et que les triglycérides ne figurent en proportion importante que dans les chylomicrons et les VLDL. Ce tableau montre également les proportions importantes de cholestérol total des LDL et HDL et l'augmentation progressive du rapport cholestérol estérifié/cholestérol libre lorsqu'on passe des chylomicrons aux VHDL.

FIGURE 2

CORRELATIONS ENTRE FAMILLES DE LIPOPROTEINES
ET CLASSIFICATIONS SELON LES CRITERES
D'ELECTROPHORESE ET DE DENSITE



~~~ ; amplitude proportionnelle aux concentrations en une famille de lipoprotéines pour un compartiment de densité.

—— ; possibilité de concentrations variables en un type donné d'apoprotéine en fonction de variations individuelles liées à l'état métabolique ou nutritionnel.
~~~

Au niveau de la molécule lipoprotéique, les phospholipides, le cholestérol libre et la copule protéique constituent une fine pellicule autour du noyau central où se trouve la fraction soluble, lipides apolaires que sont les triglycérides et le cholestérol estérifié. Le rôle des phospholipides et du cholestérol libre est de maintenir la structure comme ils le font au niveau des membranes cellulaires avec lesquelles ils sont échangeables.

E/ BIOSYNTHESE ET SECRETION DES LIPOPROTEINES

Deux organes sont impliqués dans ces métabolismes : la muqueuse intestinale et le foie.

La muqueuse intestinale est responsable, en période nutritionnelle, de la biosynthèse des chylomicrons à partir des graisses ingérées, et, en toute période, des VLDL voire des HDL.

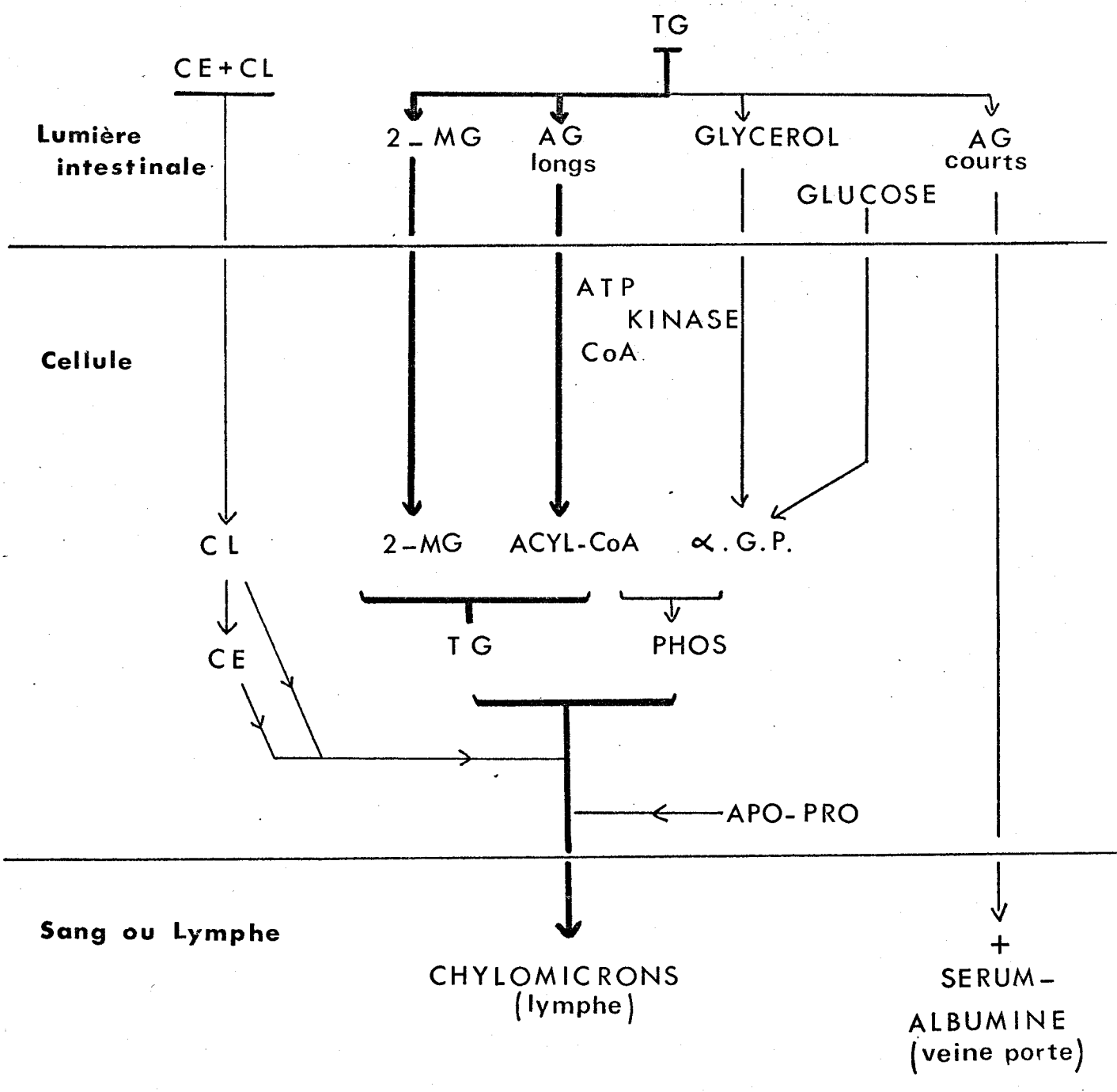
Le foie synthétise et sécrète très activement dans le sang des HDL et des VLDL surtout riches en triglycérides endogènes formés au sein de cet organe.

a) Au niveau de la muqueuse intestinale (fig. 3 page 27).

Dans la lumière intestinale, les lipides alimentaires se mélangent avec la bile qui contient des phospholipides, du cholestérol et des sels biliaires émulsionnant les triglycérides et facilitant leur hydrolyse en acides gras et en 2-monoglycérides par la lipase pancréatique spécifique des positions 1 et 3. Une fraction de ces 2-monoglycérides s'isomérise en 1-monoglycérides également hydrolysés en acides gras et glycérol par la même lipase. Les phospholipides sont hydrolysés par des phospholipases A et les stérides par une cholestérol-estérase. Lysophospholipides,

FIGURE 3

BIOSYNTHESE ET SECRETION DES CHYLOMICRONS



CE : cholestérol estérifié
CL : cholestérol libre
2-MG : 2-monoglycérides
AG : acides gras

TG : triglycérides
PHOS : phospholipides
∝. G. P. : glycéro-phosphate
APO-PRO : apoprotéines

BIUS LILLE

cholestérol et surtout acides gras et 2-monoglycérides sont alors absorbés par la muqueuse. Les acides gras courts ou moyens et une partie du glycérol sont libérés dans le sang de la veine porte à destination du foie ; les acides gras longs (> C 12) rejoignent le "pool" intra-cellulaire qui comprend des acides gras issus de la captation des acides gras libres circulants.

Le cholestérol alimentaire se mélange au cholestérol activement synthétisé "de novo" à partir de l'acétyl-CoA.

Des phospholipides sont synthétisés à partir des lysophospholipides incorporés et à partir du glycérol ou du 3-P-glycérol issu de la glycolyse.

La synthèse la plus importante est cependant celle des triglycérides qui se fait essentiellement à partir des 2-monoglycérides et d'acides gras activés en acyl-CoA.

La synthèse des chylomicrons dans la muqueuse intestinale va donc résulter de l'association d'apolipoprotéines synthétisées au niveau des ribosomes, de phospholipides, de triglycérides, de cholestérol libre et surtout estérifié. Ces chylomicrons natifs sont ensuite libérés dans la lymphe à partir des vésicules sécrétoires et aboutissent à la circulation générale où ils créent, en période post-prandiale, la turbidité du sérum. Ils représentent la forme idéale de transport des lipides exogènes.

b) Au niveau du foie (fig. 4 page 30)

Le foie synthétise activement de nombreux phospholipides, dont la lécithine et les triglycérides à partir du phospho-3-glycérol et d'acides gras activés en acyl-CoA.

Les acyl-CoA peuvent provenir d'une synthèse "de novo" à partir de l'acétyl-CoA issu de la glycolyse. Ils proviennent également des acides gras libres captés proportionnellement au flux sanguin traversant le foie et issus du tissu adipeux.

Le phospho-3-glycérol provient, soit d'une phosphorylation du glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux où il n'est pas réutilisable efficacement, soit d'une réduction de la phospho-dihydroxyacétone issue de la glycolyse hépatique.

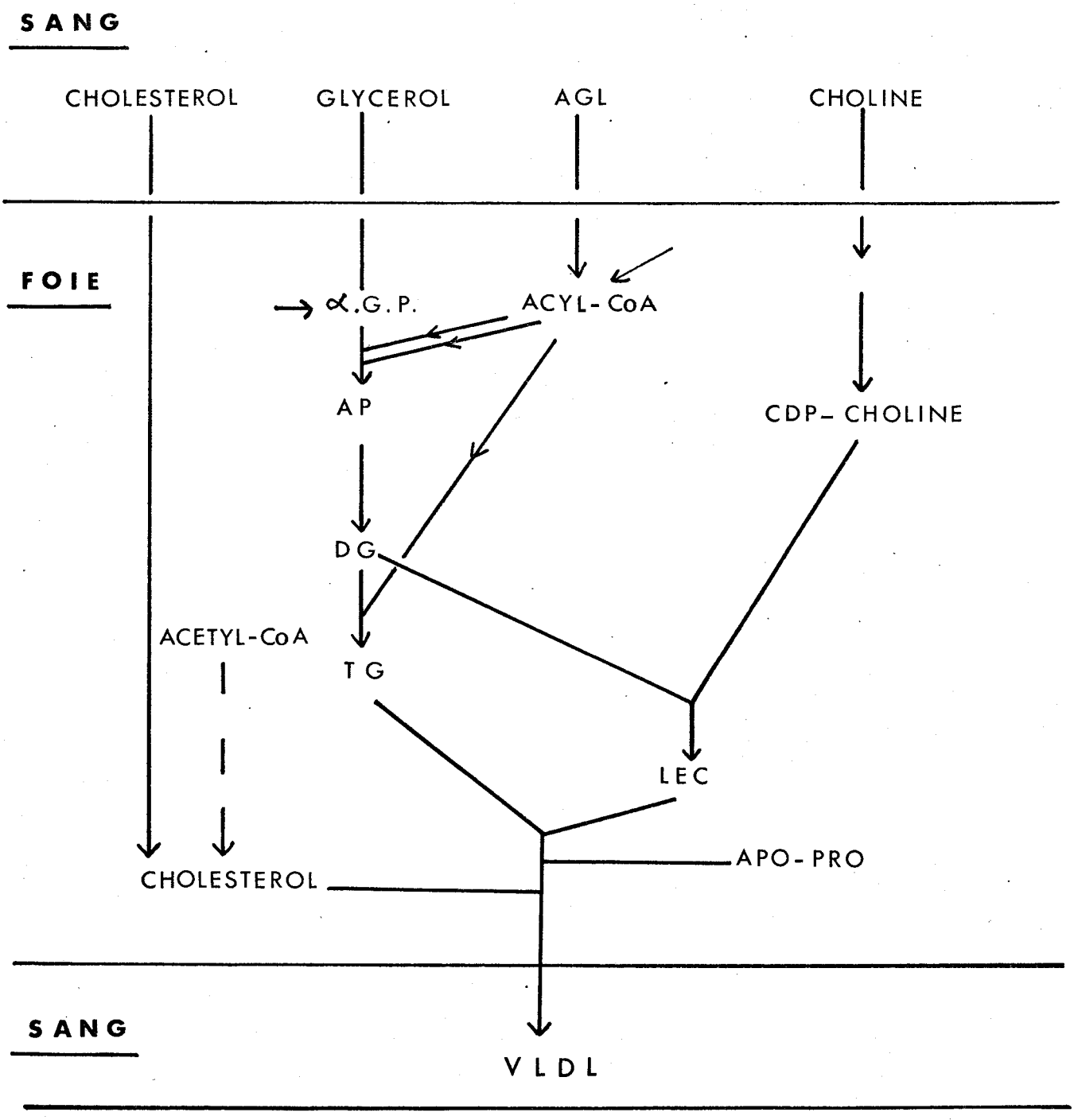
Le foie synthétise, d'autre part, les apolipoprotéines A, B et C au niveau des ribosomes, et le cholestérol à partir de l'acétyl-CoA : cette synthèse hépatique de cholestérol est très active et nous verrons ultérieurement que le foie reçoit en outre l'essentiel du cholestérol d'origine intestinale.

Toutes ces biosynthèses aboutissent à la formation de VLDL et à leur libération dans le sang à partir de vésicules sécrétoires. L'ordre des associations est encore incertain, mais il est probable que la synthèse débute par l'association des apolipoprotéines aux phospholipides et que la fixation des restes osidiques sur les apolipoprotéines joue un rôle important. Ces VLDL natives rejoignent les HDL synthétisées dans le foie et sécrétées indépendamment sur un rythme propre beaucoup plus uniforme.

Les LDL ne sont que des sous-produits du catabolisme intra-vasculaire des VLDL, c'est-à-dire essentiellement du transfert d'acides gras de ces VLDL dans les tissus extra-hépatiques.

FIGURE 4

BIOSYNTHESE ET SECRETION DES V L D L



∝.G.P. : phospho-3-glycérol
A P : acide phosphatidique
D G : 1-2-diglycérides
T G : triglycérides
L E C : lécithines
A G L : acide gras libre
APO-PRO : apoprotéines

F/ DESTINEE DES LIPOPROTEINES CIRCULANTES

Dans le sang, VLDL et surtout chylomicrons natifs se chargent de peptides supplémentaires cédés par les HDL, apo-Gln et apo-Ala en particulier. Cet apport est capital, car l'apo-Gln est un facteur d'activation de la lipoprotéine-lipase (LPL) synthétisée dans divers tissus extra-hépatiques et responsable, en bonne part, de l'épuration plasmatique des TG des chylomicrons et des VLDL : l'apo-Ala inhibitrice pourrait jouer un rôle régulateur.

Cette LPL, largement distribuée dans les tissus de l'organisme, hydrolyse les triglycérides des chylomicrons et des VLDL et libéré les acides gras qui vont alors diffuser dans les cellules :

- du tissu adipeux pour mise en réserve après reconstitution des TG,

- du muscle pour utilisation à des fins énergétiques,

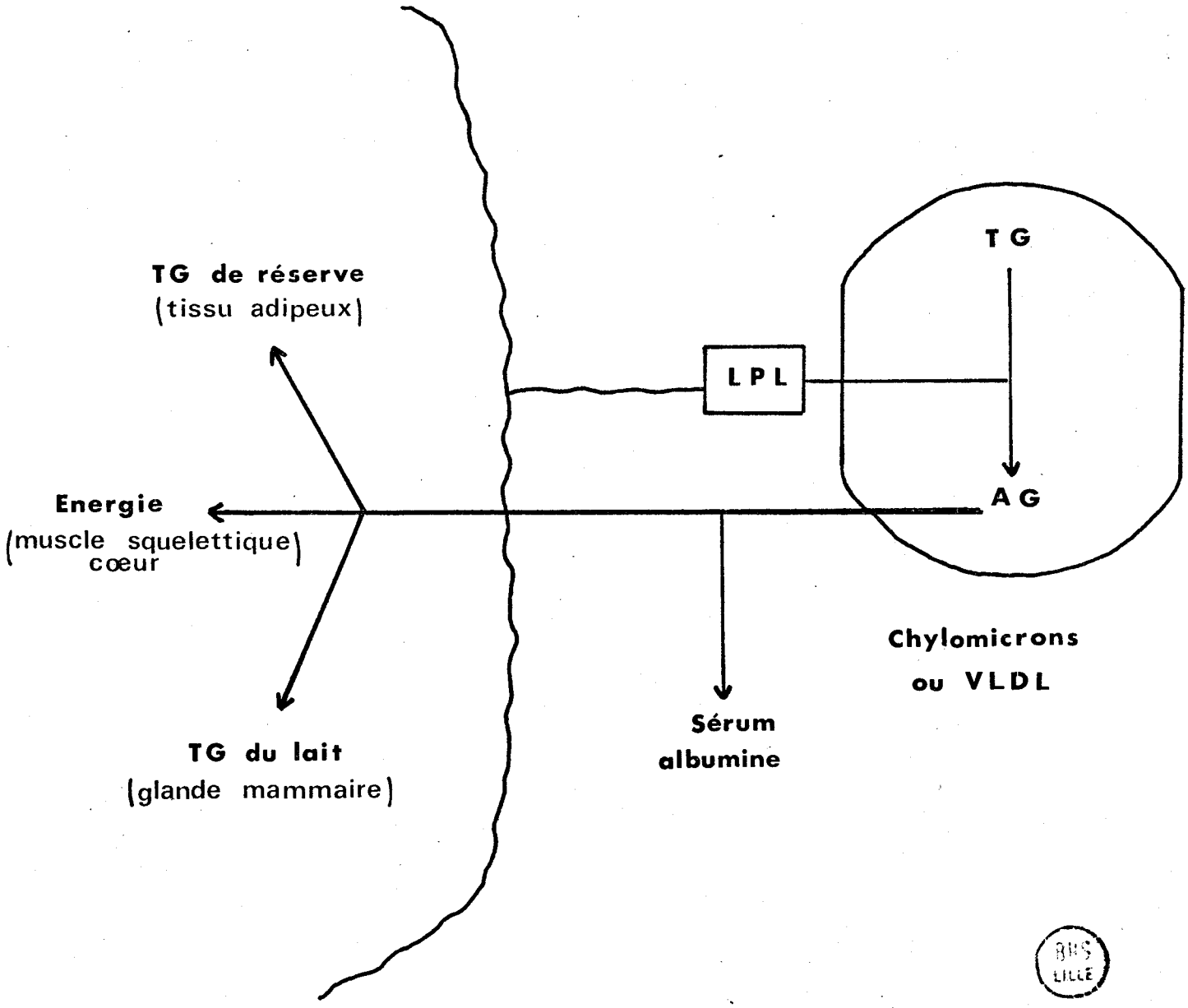
- de la glande mammaire pour synthèse des triglycérides du lait (fig. 5 page 32).

a) Destinée des chylomicrons (fig. 6 page 33)

Porteurs d'apo-Gln issues des HDL, les chylomicrons représentent, du fait de leur taille importante et de leur charge en TG, le meilleur substrat pour la LPL dont l'effet principal se situe au niveau du tissu adipeux. Cette action rapide se traduit par une libération importante d'acides gras dont une grande partie diffuse dans les tissus et dont une autre se fixe sur la sérumalbumine ; de ce fait, en période post-prandiale, le taux des AGL augmente alors même que leur mobilisation à partir du tissu adipeux diminue ; la composi-

FIGURE 5

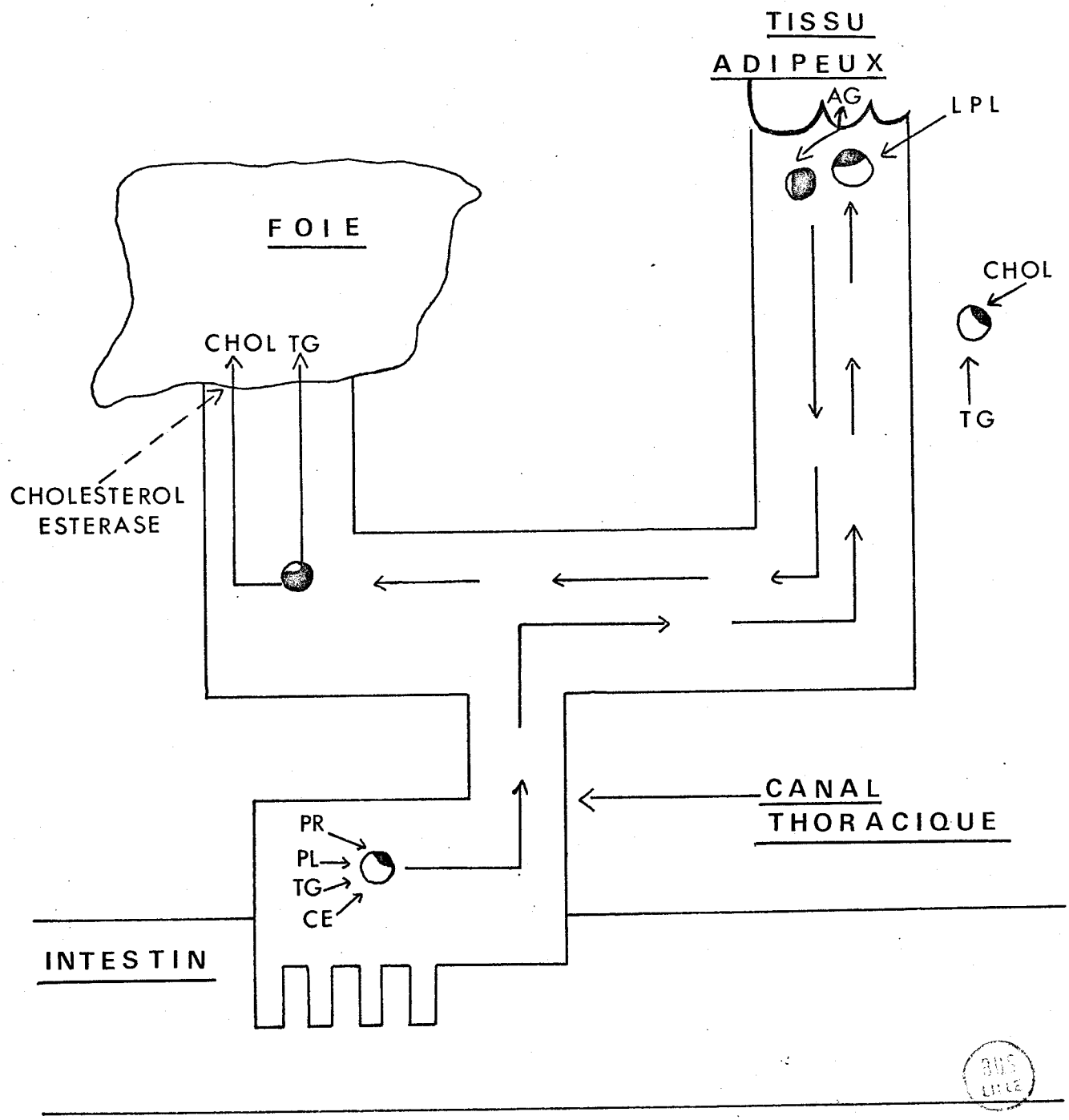
DESTINEE DES ACIDES GRAS LIBERES PAR LA LIPOPROTEINE-LIPASE



BIUS LILLE

FIGURE 6

DESTINEE DES CHYLOMICRONS



PR: APOPROTEINE
PL: PHOSPHOLIPIDES
TG: TRIGLYCERIDES

CE: CHOLESTEROL ESTERIFIE
AG: ACIDES GRAS
LPL: LIPOPROTEINE – LIPASE

tion en acides gras tend donc à refléter celle des TG des chylomicrons, c'est-à-dire celle des graisses ingérées.

Ces chylomicrons perdent ainsi progressivement leurs TG en diminuant de taille. Après un certain nombre de cycles, les particules résiduelles ne contiennent plus qu'un peu de triglycérides, mais la majeure partie des phospholipides et du cholestérol des chylomicrons initiaux. Les particules sont captées par le foie qui dispose d'une cholestérol-estérase et incorpore ainsi sous forme libre plus de 90 % du cholestérol d'origine intestinale : il dispose également d'une triglycéride-lipase qui pourrait jouer le rôle dans la captation de 10 à 20 % des TG résiduels.

Sous l'action conjuguée des tissus extra-hépatiques riches en LPL, puis du foie, la demi-vie des TG des chylomicrons circulants est brève, de l'ordre de 10 minutes, et l'épuration globale après un repas se fait normalement en moins de 6 heures.

b) Destinée des VLDL

Le métabolisme intra-vasculaire des VLDL est plus complexe que celui des chylomicrons et dépend de deux enzymes : la LPL des tissus extra-hépatiques, et la LCAT (lécithine-cholestérol-acyl-transférase) du plasma.

La LPL agit sur les TG des VLDL de la même manière qu'elle agit sur ceux des chylomicrons, mais du fait de la moindre taille des VLDL, cette action est plus lente, et, de ce fait, la durée de vie des TG des VLDL est supérieure à celle des TG des chylomicrons (environ 4 heures).

La perte progressive des triglycérides s'accompagne de remaniements structuraux importants dus en partie à l'action complémentaire de la LCAT qui estérifie dans le plasma le cholestérol libre des lipoprotéines porteuses de l'apo-Gln 1,

c'est-à-dire essentiellement les HDL, et à un degré moindre les VLDL. Cette estérification se fait à partir des acides gras en position 2 des lécithines qui se transforment en lysolécithines ; ceci explique la richesse du cholestérol estérifié plasmatique en acides gras insaturés, puisque ces acides gras se situent en position 2 dans les lécithines. Dans ces remaniements structuraux des VLDL, la LCAT a donc un double effet :

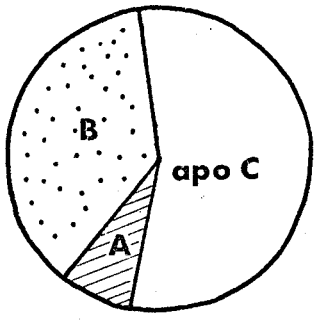
- effet indirect sous la forme d'un transfert (ou échange contre des TG), sur les VLDL, du cholestérol estérifié au niveau des HDL où agit de préférence l'enzyme;

- effet direct par estérification du cholestérol libre qui s'accumule avec les phospholipides à la surface des VLDL du fait de la disparition progressive de TG sous l'action de la LPL. Il s'ensuit également une élimination partielle de phospholipides puisque les lysolécithines résiduelles formées par la LCAT tendent à quitter la molécule pour se fixer sur la fraction albuminique du plasma ou sur les membranes cellulaires, celles des globules rouges en particulier.

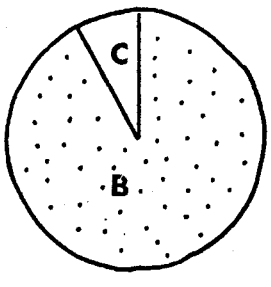
Il en résulte également des pertes d'apo-C qui retournent au foie ou sont captées par les HDL, et l'on passe ainsi progressivement des VLDL aux lipoprotéines intermédiaires ou IDL ($1{,}006 < de < 1{,}019$) déjà riches en cholestérol estérifié, mais contenant encore des proportions appréciables de TG. Ensuite, la LPL ne semble plus intervenir et les échanges se poursuivent ; on aboutit aux LDL de densité comprise entre 1,019 et 1,063, très riches en cholestérol estérifié, ne contenant plus que l'apo-B et dont la demi-vie plasmatique est de l'ordre de 48 heures (fig. 7 page 36). Ces LDL reviennent au foie qui les dégrade, mais cette dégradation implique, en particulier, l'hydrolyse du cholestérol estérifié, le catabolisme du cholestérol libre formé, et l'excrétion biliaire, puisqu'il semble démontré que le cholestérol "usagé" ne se mélange pas au cholestérol "neuf" destiné aux VLDL.

FIGURE 7

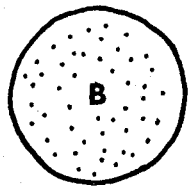
METABOLISME INTRAVASCULAIRE DES VLDL



VLDL
d < 1,006
TG++++
CE+



Lipoproteine intermediaire
1,006 < d < 1,019
TG++
CE++



LDL
1,019 < d < 1,063
TG ±
CE+++

TG : triglycérides

CE : cholestérol estérifié

BIUS LILLE

Le foie peut capter et cataboliser les LDL, mais il a été démontré que l'épuration plasmatique des LDL est accélérée après hépatectomie et qu'il existe au niveau des tissus extra-hépatiques des sites membranaires récepteurs des LDL ; la fixation sur ces sites est suivie d'une hydrolyse rapide de la liaison ester du cholestérol estérifié et d'une protéolyse de l'apo-B. De ce fait, les LDL fournissent un supplément de cholestérol utilisé pour la synthèse des membranes cellulaires.

c) Destinée des HDL (fig. 8 page 38)

Pratiquement tous les tissus de l'organisme sont capables de synthétiser le cholestérol en fonction de leurs besoins. De ce fait, sauf peut-être pour la synthèse des hormones stéroïdiennes, ces tissus ne sont pas tributaires du cholestérol hépatique incorporé dans les VLDL. Par contre, ils se renouvellent et le retour au foie du cholestérol des cellules détruites est nécessaire, puisque cet organe est le seul capable de l'excréter en quantité importante, soit directement, soit après un catabolisme très partiel en acides biliaires qui comportent toujours le noyau stérol. Autrement dit, le foie récupère l'essentiel du cholestérol de structure, initialement incorporé dans les VLDL et le cholestérol des autres tissus et organes dont on sait qu'il peut s'incorporer dans les lipoprotéines circulantes. De ce dernier point de vue, LCAT et HDL pourraient jouer le rôle principal :

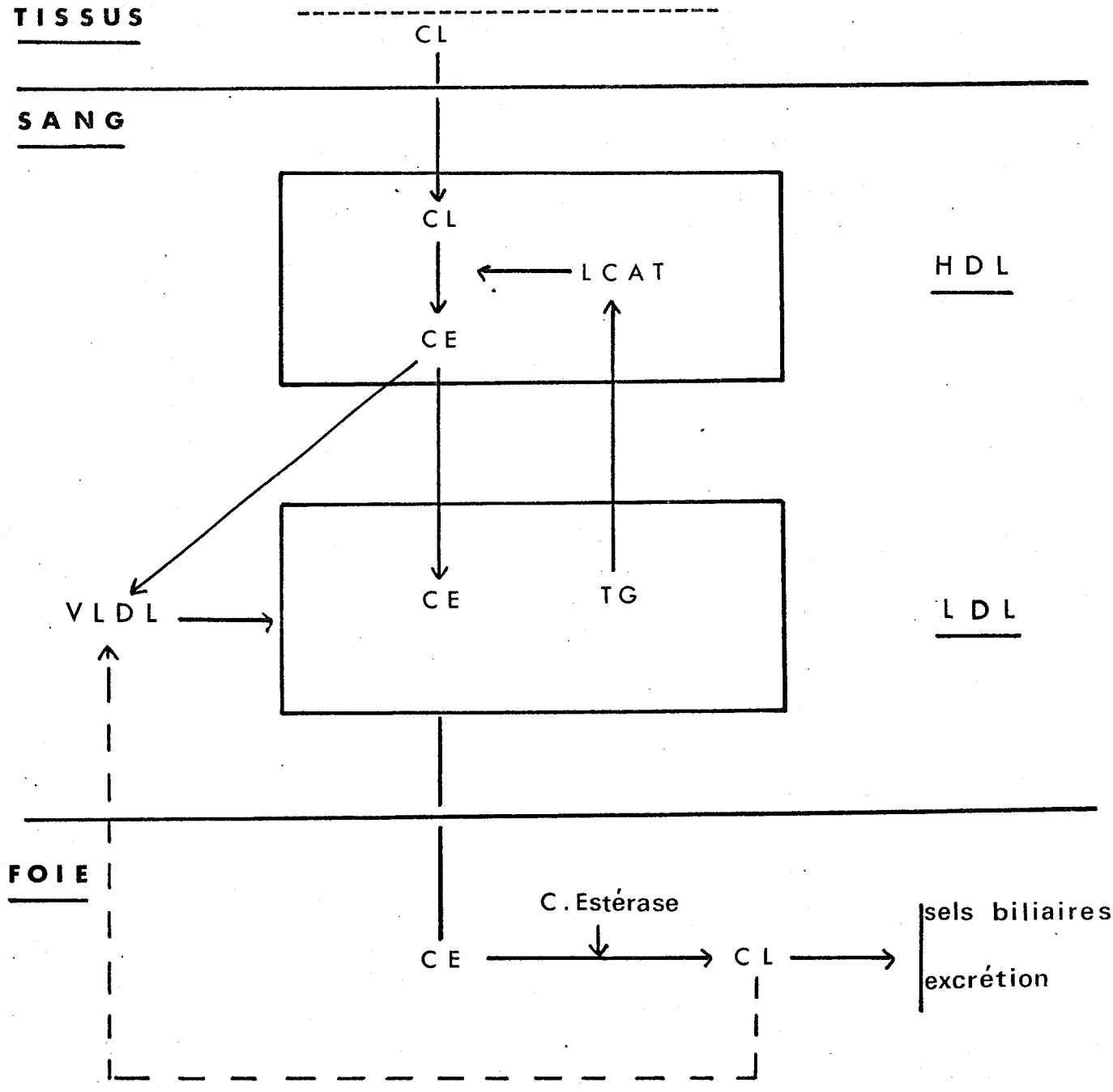
- estérification du cholestérol libre des HDL par la LCAT,

- "dissolution" au sein de la molécule du cholestérol estérifié formé, laissant une place libre en surface pour le transfert du cholestérol libre à partir des membranes cellulaires,

- captation hépatique du cholestérol estérifié des HDL et nouveau cycle ...

FIGURE 8

ROLE DES HDL ET DES LDL DANS LE RETOUR DU CHOLESTEROL VERS LE FOIE



CL : cholestérol libre

CE : cholestérol estérifié

LCAT : lécithine-cholestérol-acyl-transférase

TG : triglycérides

Certains auteurs envisagent des étapes supplémentaires de transfert (ou d'échange) du cholestérol estérifié sur les VLDL et surtout les LDL, ce qui expliquerait la richesse particulière des LDL en cholestérol estérifié soluble et stockable dans la zone centrale de la molécule.

G/ CONCLUSION

Au niveau du plasma, on trouve quatre types majeurs de lipoprotéines d'origine et de rôle déterminés. Les chylomicrons assurent le transport des lipides exogènes, les VLDL celui des lipides élaborés par le foie à partir de composés lipidiques exogènes ou d'autres composés. Les LDL ne sont que des produits du catabolisme intravasculaire des VLDL. Les HDL assurent le retour au foie du cholestérol tissulaire.

Si les acides gras représentent une source d'énergie facilement utilisable par les différents tissus, les TG (VLDL) le sont beaucoup moins. Ils constituent surtout une forme de mise en réserve d'énergie au niveau du tissu adipeux où ils sont élaborés à partir des acides gras exogènes (chylomicrons) et endogènes (VLDL).

L'équilibre de la lipémie dépend autant de la production hépatique et/ou intestinale que de l'épuration, mécanisme mettant en jeu deux enzymes essentielles : LPL et LCAT.

PRINCIPALES ANOMALIES DE REPARTITION DES LIPOPROTEINES

Ces anomalies peuvent correspondre à des diminutions voire des absences d'une ou de plusieurs classes de lipoprotéines ; il s'agit donc d'hypolipoprotéinémies qui sont en fait très rares. Très fréquentes sont par contre les hyperlipoprotéinémies à lipoprotéines normales ou anormales qui, pour la plupart, sont douées d'un pouvoir athérogène notoire lorsqu'elles circulent à des concentrations anormalement élevées. La prévention de la maladie athéroscléreuse passe donc, en cas d'hyperlipémie constatée, par le typage de l'hyperlipoprotéinémie d'où découleront le régime alimentaire et le traitement médicamenteux convenables.

Il n'existe pas de critères absolus de typage et parmi les nombreuses classifications proposées nous citerons celle de FREDRICKSON actuellement la plus admise (71) et celle de DE GENNES (84). Les éléments du diagnostic biochimique comprennent essentiellement, comme nous le verrons ultérieurement, l'aspect du sérum à jeun, les taux de cholestérol, de triglycérides et éventuellement de phospholipides sériques et la répartition électrophorétique des lipoprotéines.

Sur ces bases on peut distinguer 6 types principaux qui se répartissent en 3 catégories correspondant aux hypercholestérolémies essentielles, hypertriglycéridémies majeures et hyperlipémies mixtes. En ne considérant que l'aspect lipoprotéique on distingue :

- Hypercholestérolémie essentielle :

  . Type II_A caractérisé par une augmentation élective des

LDL riches en cholestérol.

- Hyperglycéridémie majeure :

  . Type I dû à une accumulation isolée de chylomicrons transporteurs de triglycérides issus de la digestion intestinale des graisses (rarissime).

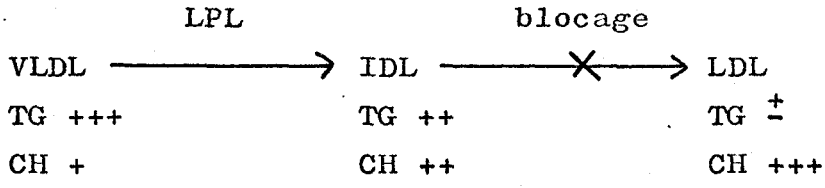
  . Type IV correspondant à une augmentation des concentrations en VLDL qui transportent essentiellement des triglycérides d'origine hépatique.

  . Type V qui sur le plan des anomalies lipoprotéiques correspond à l'association I + IV.

- Hyperlipémies mixtes :

  . Type II_B qui résulte d'une augmentation simultanée des concentrations plasmatiques en LDL riches en cholestérol et VLDL riches en triglycérides.

  . Type III dû à un blocage du catabolisme normal intravasculaire des VLDL en LDL. Il y a donc accumulation dans le sang de lipoprotéines intermédiaires ou IDL.



ETUDE CRITIQUE DES PRINCIPALES METHODES D'ETUDE DES LIPOPROTEINES

-=-=-=-=-

INTRODUCTION

Les propriétés physico-chimiques et immunologiques et les variations physio-pathologiques respectives de chaque classe de lipoprotéines précédemment décrites étant différentes, il est bien évident qu'une exploration détaillée de la composition lipoprotéinique d'un sérum présente un grand intérêt en pathologie. Cette exploration fait appel à de nombreuses techniques en voie de constant perfectionnement. Certaines d'entre elles, exigeant l'emploi d'un appareillage complexe et onéreux, ou la mise en oeuvre de manipulations longues et délicates, sont encore réservées à des laboratoires spécialisés. D'autres, par contre, sont facilement applicables en routine par tout laboratoire de biochimie clinique.

Le fractionnement alcoolique à basse température, décrit par COHN en 1950 (52) propose pour la première fois la précipitation sélective des bêta et des alpha-lipoprotéines. Deux groupes de lipoprotéines sont ainsi mis en évidence :

- les lipoprotéines de poids moléculaire élevé, plus riches en lipides qu'en protides, et en cholestérol qu'en phospholipides. C'est la fraction III_0 ou bêta-lipoprotéine, précipitant à une concentration de 18 pour cent (v/v) d'éthanol et à pH 5,2 ;
- les lipoprotéines de poids moléculaire plus faible, plus riches en protides et en phospholipides. C'est la fraction IV_1 ou alpha-lipoprotéine, précipitant à une concentration de 40 pour cent (v/v) d'éthanol et à pH 5,8.

En 1955, BURSTEIN et SAMAILLE décrivent un procédé de précipitation sélective des bêta-lipoprotéines par l'héparine, en présence de chlorure de calcium (37). Depuis

lors, ces techniques de précipitation sélective ont été largement développées. Elles sont simples mais réclament, pour être sélectives, une très grande rigueur dans le respect des conditions expérimentales.

Réalisés au cours de ces vingt dernières années, les progrès considérables de nos connaissances sur l'exploration fonctionnelle du métabolisme lipidique sont dus à deux équipes de chercheurs :

- d'une part, celle de LINDGREN, NICHOLS et ELLIOT, qui, travaillant sous la direction de GOFMAN, a ouvert dès 1949 la voie à une étude systématique des lipoprotéines grâce à leur analyse exhaustive en ultracentrifugation (87 , 122). Ils distinguent ainsi :
  - . les lipoprotéines de basse densité, inférieure à 1,063 et représentant les bêta-lipoprotéines,
  - . les lipoprotéines de haute densité, comprise entre 1,063 et 1,21, les fractions comprises entre 1,12 et 1,21 représentant alors les alpha-lipoprotéines,
  - . quant aux chylomicrons très pauvres en protéines, on peut les isoler par simple extraction à l'éther ou par une rapide flottation dans un champ d'accélération modéré (9500 g),
- d'autre part, celle de HAVEL, BRAGDON et coll. qui, utilisant encore une technique d'ultracentrifugation, plus simple et bien adaptée aux analyses chimiques, a publié en 1955 les premiers résultats d'ensemble concernant la composition des lipoprotéines dans diverses affections hyperlipidémiques (95).

Les résultats obtenus par la méthode d'ultracentrifugation ont stimulé les recherches concernant la mise au point de méthodes électrophorétiques de fractionnement des lipoprotéines. Déjà en 1941, BLIX et TISELIUS (24) mettent

au point une méthode d'électrophorèse libre permettant la séparation des fractions albumine, alpha, bêta et gamma-globulines, et l'analyse de leur contenu lipidique. Mais en fait, il faut attendre 1951, avec SWAHN (183), pour voir apparaître la méthode du lipoprotéinogramme sur papier appelé plus couramment lipidogramme ; il individualise ainsi en fonction de leur vitesse de migration les deux grandes variétés de lipoprotéines décrites par GOFMAN (87), au niveau desquelles il distingue, et d'autres auteurs après lui, plusieurs sous-fractions. Synthétisant les données fournies par ces diverses techniques, il était déjà possible, en 1965, de dresser le tableau des équivalences suivantes :

Tableau des équivalences d'après FREDRICKSON (71)

Fractions	Sf	Terminologie Electrophorese	Fractions de COHN
Chylomicrons	40 000	----------	----------
LP de très basse densité	10 - 400	----------	----------
LP de basse densité	0 - 10	bêta	III_o
LP de haute densité	---------	alpha	IV_1
AGL	---------	----------	V

La différenciation immunochimique peut également être mise à profit pour des études qualitatives ou quantitatives des lipoprotéines. En première analyse, les lipoprotéines sériques se répartissent en deux grandes catégories immunologiquement distinctes : les alpha-lipoprotéines et les bêta-lipoprotéines. L'identification et le dosage des lipoprotéines se font par tous les procédés classiques pourvu que l'on dispose des immunsérums correspondants préparés à partir de fractions purifiées.

Enfin, certains travaux concernant l'étude des lipoprotéines reposent sur le principe de la chromatographie : chromatographie de tamisage moléculaire, d'adsorption, d'échange d'ions et plus récemment d'affinité. Toutes ces méthodes ne sont que rarement utilisées seules pour explorer la composition lipoprotéinique d'un sérum et servent surtout à parfaire le degré de pureté des fractions séparées par un autre procédé. Elles ont été essentiellement développées dans un but préparatif.

L'ULTRACENTRIFUGATION

A/ PRINCIPE

La présence de lipides dans la molécule confère aux lipoprotéines une densité inférieure à celle des autres protéines du sérum pour lesquelles elle est comprise entre 1,33 et 1,35. C'est ainsi que les lipoprotéines les plus lourdes présentent une densité voisine de 1,20, et que le domaine des densités inférieures à 1,21 appartient aux seules lipoprotéines.

La séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation met à profit les différences entre les densités respectives des diverses catégories de ces macromolécules. Ces différences sont fonction de la richesse respective en lipides de chacune d'entre elles et peuvent paraître relativement faibles. Elles sont considérablement accrues lorsque les molécules sont soumises dans une ultracentrifugeuse à un champ d'accélération très élevé (100.000 à 200.000 g). Dans ces conditions, les molécules de densité inférieure à celle du milieu remontent vers la surface (flottation) alors que celles possédant une densité supérieure se dirigent vers le fond du tube (sédimentation). Le choix de la densité conditionne donc la répartition des lipoprotéines entre les fractions qui flottent et celles qui sédimentent.

En ultracentrifugation, la sédimentation d'une particule dépend de la force centrifuge appliquée et déterminée par la formule suivante :

$$F = m\ \omega^2\ r$$

$$= \frac{W}{g}\ \omega^2\ r$$

où F = force centrifuge exercée sur la particule (en dynes)

m = masse de la particule (en grammes)

ω = vitesse angulaire du rotor (en radians par seconde)

r = distance radiale entre l'axe de rotation et le tube (en centimètres)

W = poids de la particule

g = constante de gravitation (980 cm/sec^2)

Il est très souvent utile de caractériser une molécule par son coefficient de sédimentation dont la valeur numérique dépend de divers facteurs qui lui sont propres tels sa masse moléculaire et sa forme.

C'est ainsi que les protéines sont généralement définies selon leur vitesse de sédimentation (S) exprimée en unités SVEDBERG et déterminée par la formule suivante :

$$S = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r}$$

(t = temps en secondes)

L'unité S est égale à 10^{-13} cm/sec-dyne-g. Pour les lipoprotéines, ce symbole devient Sf, les molécules étant isolées par flottation. Il s'exprime également en unités SVEDBERG et correspond en fait à une sédimentation négative.

L'ultracentrifugation a donc permis l'individualisation des familles de lipoprotéines précédemment décrites ; l'ultracentrifugation analytique les différencie selon les vitesses de flottation ou Sf (87, 120) et l'ultracentrifugation préparative selon les densités (53, 82, 95).

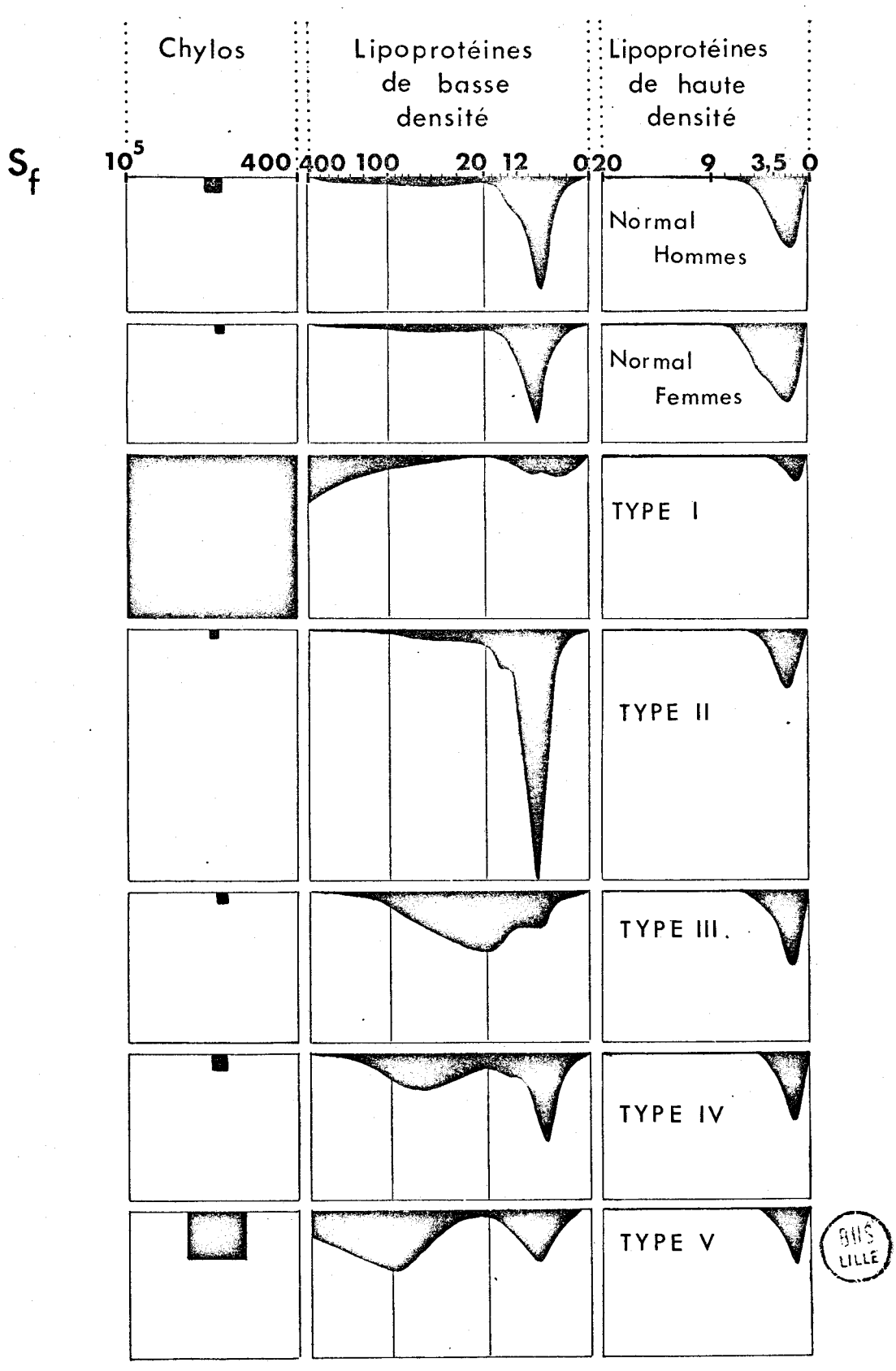
B/ L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Dans l'ultracentrifugation analytique le déplacement des molécules est suivi par un procédé d'enregistrement optique (SCHLIEREN le plus souvent, absorption U.V. ou franges d'interférences). Les différents clichés photographiques pris après des temps de centrifugation déterminés permettent de calculer la vitesse de déplacement caractéristique de chaque famille de lipoprotéines pour des conditions de densité, de température et de viscosité du milieu données. Les concentrations respectives des fractions individualisées peuvent en outre être déduites de la surface des pics apparaissant sur les diagrammes. La figure 9 (page 50) présente des enregistrements d'ultracentrifugation analytique obtenus avec des sérums normaux et hyperlipoprotéinémiques.

En pratique, les vitesses de flottation des lipoprotéines de basse densité (VLDL et LDL) sont mesurées dans un milieu de densité 1,063 et sont simplement désignées par le symbole Sf. Cependant, d'autres auteurs (8 , 9) les déterminent à la densité à laquelle la classe de lipoprotéines est isolée en ultracentrifugation préparative : ainsi $Sf_{1,006}$ signifie que les vitesses de flottation sont mesurées dans une solution de densité 1,006. EWING et coll. (63) suggèrent l'utilisation du symbole F suivi de l'indice de la densité à laquelle l'ultracentrifugation est mesurée lorsque celle-ci est différente de 1,063 ; ainsi l'expression des vitesses de flottation des HDL_2 est la suivante : $F_{1,20}$:3,5-9.

FIGURE 9

SPECTRES D'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE DES LIPOPROTEINES DE SERUMS NORMAUX ET HYPERLIPOPROTEINEMIQUES



SUS LILLE

Parfois, même, la nature du sel utilisé pour ajuster la densité est mentionnée.

C/ L'ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE

L'ultracentrifugation préparative ou ultracentrifugation de flottation permet le fractionnement des différentes classes de lipoprotéines selon leurs densités en vue de les analyser.

La composition lipidique moyenne de chaque classe de lipoprotéines étant connue (8 , 26 , 179), il est en outre possible d'obtenir par cette méthode une mesure indirecte du taux des lipoprotéines correspondantes ; on peut en effet admettre en première approximation l'existence d'une relation déterminée entre le poids moléculaire moyen d'une classe donnée de lipoprotéines et sa teneur en cholestérol par exemple. Cette application quantitative de l'ultracentrifugation nécessite de ce fait une récupération intégrale des fractions séparées.

Les méthodes originales de séparation des différentes lipoprotéines sériques réclament plusieurs ultracentrifugations à des densités progressivement croissantes ajustées intermédiairement par addition de sels minéraux (93 , 95). Chaque séparation doit être poursuivie jusqu'à ce que les lipoprotéines atteignent leur position d'équilibre, ce qui généralement demande 24 heures.

A la densité de 1,006, densité de l'ultrafiltrat plasmatique, et par conséquent densité spontanée du sérum, on recueille par flottation les VLDL. La densité 1,019, plus rarement utilisée, permet de séparer les LDL_1, équivalentes aux lipoprotéines de Sf 12-20. Les LDL_2 sont recueillies par flottation dans un milieu de densité 1,063. Enfin, une dernière

ultracentrifugation, conduite à la densité de 1,21, sépare l'ensemble des HDL. Cette fraction peut éventuellement être subdivisée à la densité intermédiaire de 1,12.

Ainsi, l'ultracentrifugation autorise une séparation particulièrement fine des lipoprotéines. La qualité du fractionnement peut encore être améliorée en mettant en oeuvre un gradient de densité (92 ,121 ,122 , 124). Il s'agit d'une centrifugation isopycnique. Par cette méthode, l'isolement de toutes les fractions de lipoprotéines exige environ une semaine. La préparation d'un gradient de densité préformé permet à certains auteurs de fractionner par ultracentrifugation zonale toutes les lipoprotéines sériques en une seule étape (25 , 98 ,153 , 189 , 190 , 200 , 201 , 202).

Trois types de rotors sont généralement utilisés pour l'ultracentrifugation préparative, et leur choix est conditionné par la méthode de centrifugation mise en oeuvre. Selon HATCH et LEES (93), l'emploi de rotors angulaires présente deux inconvénients majeurs dus à la création de courants de convection d'une part, et à l'adhérence des plus grosses molécules à la paroi des tubes d'autre part. Ces effets sont minimisés dans les rotors à godets mobiles, et totalement supprimés dans les rotors zonaux. Les rotors angulaires sont habituellement utilisés avec succès pour l'application de la centrifugation isopycnique, ils ont une géométrie favorable à une amélioration de la résolution ; en effet, lorsque le tube est remis en position verticale pour collecter les fractions après centrifugation, les distances séparant deux bandes de particules se trouvent augmentées. D'autre part, les rotors angulaires peuvent accueillir en moyenne deux fois plus de tubes que les rotors à godets mobiles. La centrifugation zonale utilise principalement les rotors à godets mobiles ou mieux encore les rotors zonaux offrant l'avantage d'une automatisation possible de la manipulation.

D/ CONCLUSIONS

L'ultracentrifugation, analytique ou préparative, constitue la meilleure méthode pour explorer la composition lipoprotéinique d'un sérum, tant sur un plan qualitatif que quantitatif.

L'ultracentrifugation de flottation offre d'autres avantages : elle permet notamment la récupération des fractions purifiées sur lesquelles peuvent alors être faites des études structurales, chimiques ou immunologique. Cette méthode apporte également de précieux renseignements sur le plan diagnostic et une simple séparation à la densité 1,006 facilite souvent le typage d'une hyperlipémie (72). C'est de plus la seule façon d'établir avec certitude le diagnostic des hyperlipémies caractérisées par la présence de bêta-lipoprotéines flottant à la densité spontanée du plasma.

Cependant, bien que toujours citée comme méthode de référence pour la purification des lipoprotéines, l'ultracentrifugation préparative n'est pas utilisable en routine et reste d'une pratique très limitée, nécessitant un appareillage coûteux et des manipulations longues et délicates. L'ajustement des densités doit en outre se faire avec une extrême précision, de l'ordre de 10^{-3}. Un autre inconvénient majeur de cette technique réside dans la trop longue exposition des macromolécules à isoler à de fortes concentrations salines et à des forces centrifuges très élevées. De ce fait des altérations de structure peuvent apparaître et c'est ainsi que LEVY et FREDRICKSON (118) expliquent l'existence de deux formes de HDL : $\propto LP_A$ et $\propto LP_B$. De même, ALAUPOVIC et coll. (3) caractérisent une nouvelle entité lipoprotéique sédimentant à la densité 1,21 et appelée $VHDL_1$, et SCANU et GRANDA (166) observent la transformation des HDL_2 et HDL_3 durant la centrifugation en VHDL.

L'ELECTROPHORESE

A/ INTRODUCTION

La présence de groupements polaires dans la molécule lipoprotéinique permet à celle-ci de se déplacer sous l'action d'un champ électrique. L'électrophorèse libre, en milieu liquide, selon TISELIUS, n'est guère utilisée que dans le cas de lipoprotéines isolées et purifiées, ce procédé ne permettant pas de différencier les lipoprotéines des autres protéines sériques de même densité. C'est pourquoi l'électrophorèse de zone, autorisant une révélation spécifique des lipides, est utilisée de préférence.

L'électrophorèse étudie le déplacement de substances ionisées soumises à un champ électrique dans un milieu électrolytique. Ces particules possèdent alors des vitesses de migration caractéristiques en fonction de leur charge. On définit ainsi une molécule par sa mobilité électrophorétique ; il s'agit en fait de sa vitesse de migration lorsqu'elle est soumise en solution libre à un champ électrique de 1 volt par cm. Elle s'exprime en cm par seconde et par volt.

La mobilité électrophorétique d'une particule la caractérise à condition de préciser les conditions expérimentales : le pH et la force ionique du tampon, la température, la nature du support.

Certains phénomènes particuliers à l'électrophorèse zonale peuvent être observés et modifier ainsi la résolution :

- le phénomène d'électro-osmose est dû au déplacement du tampon soumis dans un champ électrique en présence d'un support ionisé. Il entraîne de ce fait les molécules dans un flux hydrodynamique et nous verrons par la suite que ce phénomène existe plus ou moins selon le support utilisé;
- dans le phénomène de rhéophorèse, l'entraînement des substances est provoqué par l'évaporation du tampon, due à l'échauffement développé lors du passage du courant. Ce phénomène est généralement rencontré lors d'électrophorèse sur papier dans une cuve en toit ; on peut y remédier en diminuant la force ionique du tampon;
- un élargissement des bandes de migration peut être simplement la conséquence du phénomène de diffusion libre;
- le phénomène d'adsorption est très important lors de l'électrophorèse d'une macromolécule sur papier;
- et enfin, au phénomène d'électrophorèse peut s'ajouter celui de tamisage moléculaire. Ceci s'observe sur certains supports dont la texture définit des pores.
  Nous verrons combien le choix du support est important lors de l'électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques.

Rapide et simple, cette méthode est couramment utilisée pour l'analyse qualitative des lipoprotéines. C'est le procédé standard des laboratoires de biochimie clinique pour la détermination typologique des hyperlipoprotéinémies ; de ce fait, l'utilisation d'un support permettant une séparation aussi nette et complète que possible des différentes classes de lipoprotéines s'avère nécessaire. A cet égard les divers supports utilisés en routine (papier, agarose, acétate de cellulose, gel de polyacrylamide) présentent leurs avantages respectifs mais ne sont pas dénués d'inconvénients et une étude critique s'impose.

Ce procédé d'analyse essentiellement qualitative peut être en outre utilisé pour quantifier les lipoprotéines sériques ; nous verrons même que l'excellente individualisation des principales classes de lipoprotéines obtenue sur certains supports a permis d'en développer l'usage pour la préparation de fractions purifiées.

B/ ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Préconisée par JENCKS en 1956 (105), l'électrophorèse sur papier en tampon classique est maintenant abandonnée en raison de son trop faible pouvoir de résolution. En 1963, LEES et HATCH (117) améliorent considérablement la technique par l'introduction d'un tampon renfermant 1 % d'albumine humaine. Cette technique a servi de base à la classification des hyperlipoprotéinémies décrite par FREDRICKSON et actuellement la plus admise (71).

La séparation des lipoprotéines s'effectue par une électrophorèse verticale dans une cuve DURRUM. Le tampon de migration est un tampon classique à base de véronal, auquel on ajoute de la sérumalbumine destinée à neutraliser les charges négatives du support et à modifier les phénomènes d'adsorption. Cette méthode nécessite 16 heures de migration.

La coloration des lipoprotéines est assurée par le noir soudan ou l'oil red O. La coloration concomitante du support est éliminée par plusieurs rinçages dans une solution décolorante, ce qui entraîne toujours une légère diminution de la coloration des fractions lipoprotéiques. L'appréciation quantitative de chacune d'entre-elles par lecture densitométrique est donc très imprécise, d'autant plus que la perte de coloration spécifique n'affecte pas uniformément l'ensemble des lipoprotéines mais plus volontiers les fractions pauvres en triglycérides.

Cette technique d'électrophorèse sur papier est longue et souvent imprécise. Son pouvoir séparateur est faible au niveau des bêta et pré-bêta lipoprotéines ; il existe souvent un chevauchement des deux zones de coloration (fig. 10 page 58) et le terme de "broad-band" employé pour représenter le profil électrophorétique d'un type III a été créé avec cette technique.

Néanmoins, la méthode continue à être citée en référence, et l'O.M.S. lui donnait encore la préférence en 1970 (11).

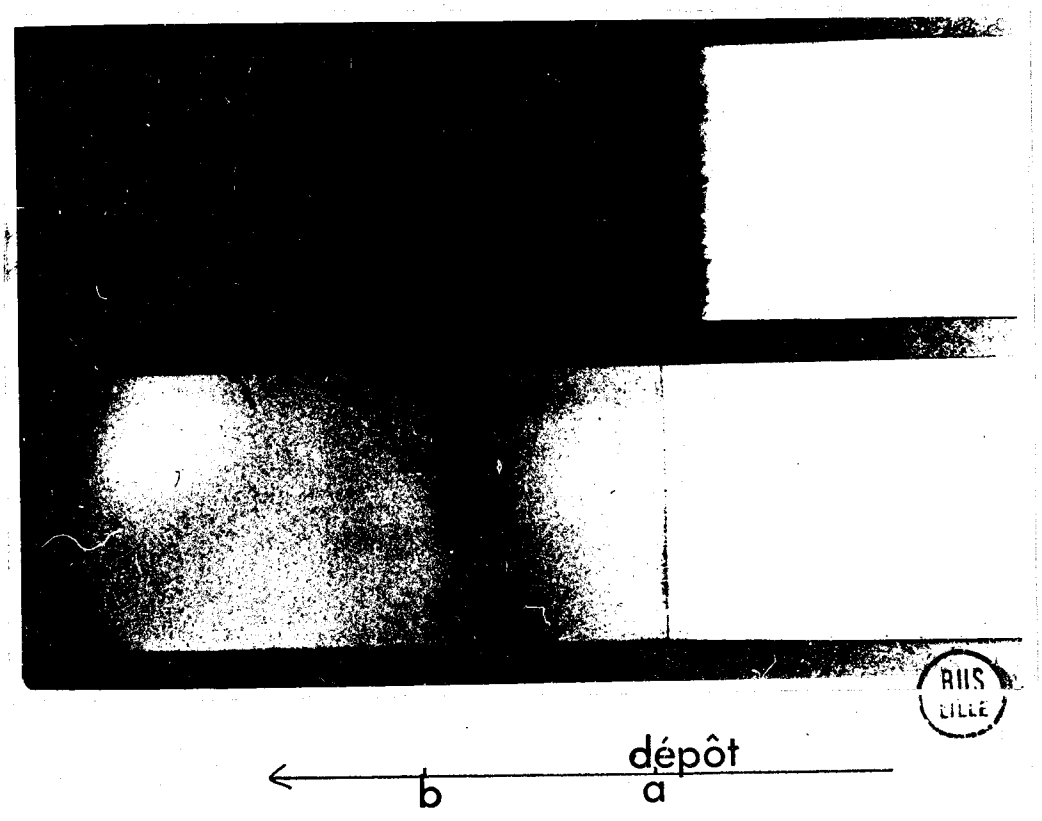
C/ L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AMIDON

Utilisé en 1952 pour séparer les lipoprotéines sériques (112), le gel d'amidon présente plusieurs inconvénients. Il est délicat à préparer, à manipuler et enfin à démouler. La concentration exacte d'un tel support est difficile à connaître. Comparé au gel de polyacrylamide, polymère synthétique, le gel d'amidon est difficile à standardiser.

L'emploi de ce support présente cependant un intérêt : on peut en effet facilement extraire d'un gel les produits qui y sont inclus par simple diffusion dans une solution isotonique. MAHLEY et coll. isolent ainsi des lipoprotéines par électrophorèse sur bloc de GEON-PEVIKON suivie d'un découpage des bandes séparées et élution dans une solution saline. Ils préparent par cette technique jusqu'à 200 mg de lipoprotéines comparables à celles que l'on peut purifier par ultracentrifugation préparative, quant à leur composition chimique, leur réactivité immunologique, leur taille en microscopie électronique et leur composition en apoprotéines (129, 130).

FIGURE 10

LIPIDOGRAMME SUR PAPIER EN TAMPON ALBUMINE



RIIS LILLE

A : SERUM NORMAL + CHYLOMICRONS

B : SERUM NORMAL

a : CHYLOMICRONS

b : LDL

D/ L'ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE

L'acétate de cellulose possède un bon pouvoir de résolution mais il retient fortement les colorants des graisses. Il existe différentes structures d'acétate de cellulose et, sur cellogel (type gélatineux), il est souvent utile, après migration et fixation des lipoprotéines par l'alcool, d'effectuer une hydrolyse alcaline ménagée qui transforme le support en hydrocellulose dépourvue d'affinité pour les colorants lipophiles (noir soudan, rouge ciba). On peut aussi mettre en oeuvre un agent tensioactif qui empêche le colorant de se fixer sur l'acétate de cellulose mais pas sur les lipoprotéines.

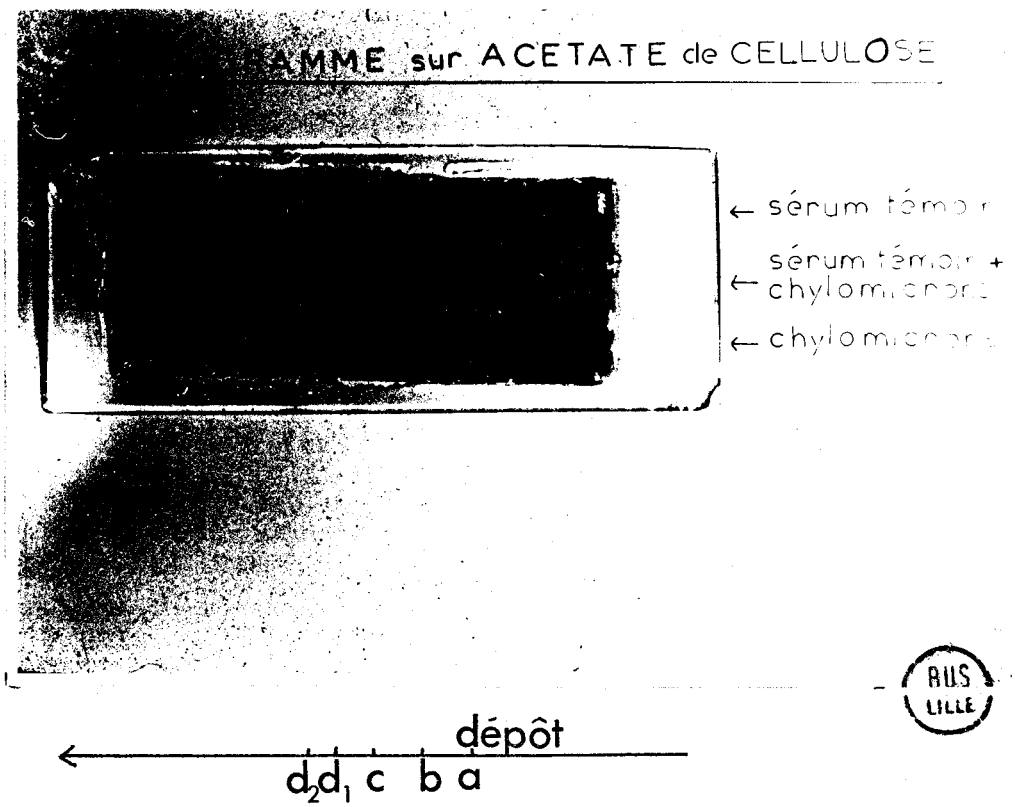
Avec ce support, les migrations électrophorétiques sont rapides et les séparations des fractions bêta et pré-bêta lipoprotéines sont nettes (fig. 11 page 60). L'enregistrement densitométrique est aisé mais fournit des résultats inexacts vu qu'il n'existe aucune relation linéaire entre la concentration lipoprotéique et la quantité de colorant fixée.

Cette méthode a d'autre part des limites et des inconvénients :

- le support convient mal à l'individualisation des chylomicron car seuls les chylomicrons natifs de grande taille restent au point de dépôt alors que les chylomicrons sériques qui ont déjà subi l'action de la lipoprotéine-lipase migrent en grande partie dans la zone des pré-bêta-lipoprotéines et quelquefois même au niveau des alpha-lipoprotéines recouvrant tout l'électrophorégramme. CHARMAN et BRAUELER (50) ont récemment passé en revue les différents types d'acétate de cellulose et concluent que son utilisation, à propos de sérums turbides et lactescents, peut aboutir à la confusion des types de la classification de FREDRICKSON ;

FIGURE 11

LIPIDOGRAMME SUR ACETATE DE CELLULOSE



BUS LILLE

a : CHYLOMICRONS

b : LDL

c : VLDL

d_1 d_2 : HDL

- la bande "broad β " spécifique du type III n'est pas toujours bien individualisée et la confusion avec un type II_B est fréquente ;
- la Lp(a) ou "sinking pre-beta-lipoprotein" n'est pas individualisée et sa migration en position pré-β peut induire des erreurs de typage (80).

Aussi, si l'électrophorèse sur acétate de cellulose reste précieuse dans l'exploration du métabolisme lipidique en pratique journalière, il est souvent nécessaire de s'adresser à d'autres techniques pour le typage précis des hyperlipémies.

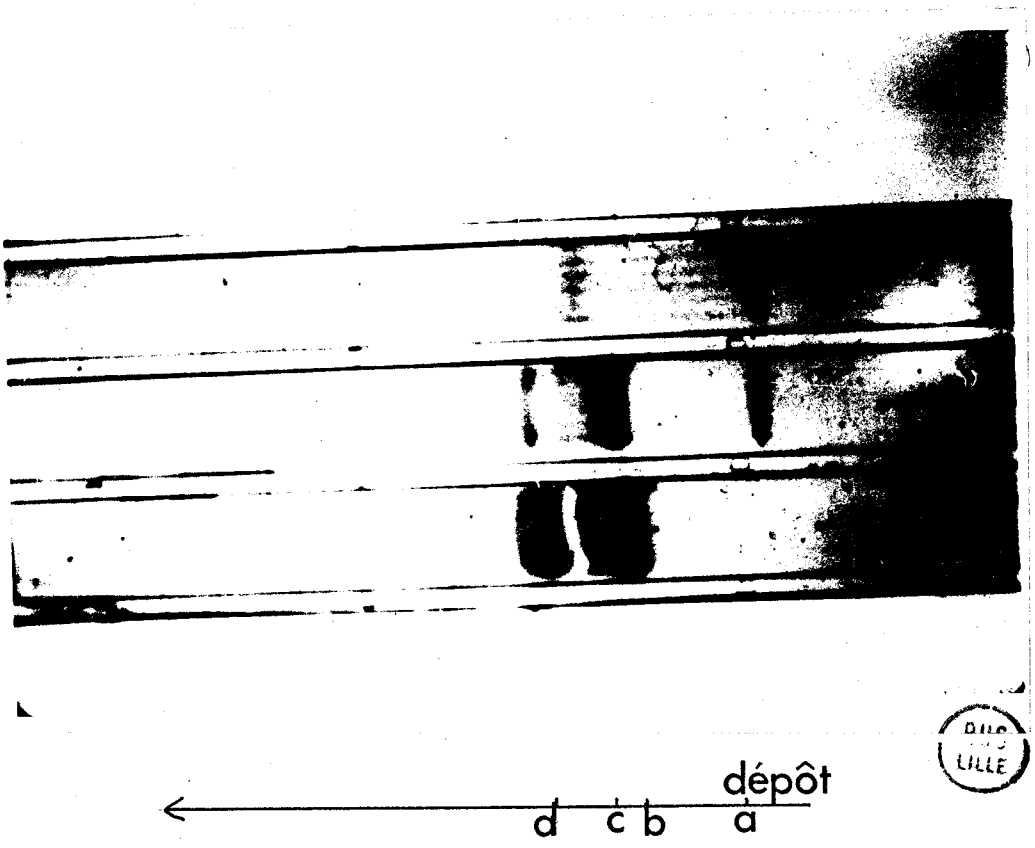
E/ L'ELECTROPHORESE SUR AGAROSE

Employé depuis 1968 pour la séparation des lipoprotéines (143), l'agarose est commercialisé actuellement en couche uniforme sur un support inerte (laboratoires Millipore, Bio Rad, Beckman). Après migration et fixation dans un mélange alcool-acide, les lipoprotéines sont en général révélées par le noir soudan. La coloration demande dans ce cas une dessication préalable du gel, opération relativement longue.

Le pouvoir de résolution del'agarose est excellent en ce qui concerne les alpha, bêta et pré-bêta-lipoprotéines, mais comme sur l'acétate de cellulose ou le papier, en cas d'hyperchylomicronémie, une partie des chylomicrons migre en traînée depuis le point de dépôt jusqu'à la zone des pré-bêta lipoprotéines (figure 12 page 62). L'addition d'albumine humaine au tampon d'électrophorèse permet néanmoins de remédier en partie à cet inconvénient.

FIGURE 12

LIPIDOGRAMME SUR AGAROSE (BIORAD)



BIU LILLE

A : CHYLOMICRONS

B : SERUM NORMAL + CHYLOMICRONS

C : SERUM NORMAL

a : CHYLOMICRONS
b : LDL
c : VLDL
d : HDL

L'emploi de ce support ne permet donc pas de résoudre le problème du typage des sérums lactescents mais facilite le diagnostic du type III (à sérum clair) lorsqu'on utilise une révélation particulière par les polyanions selon SEIDEL et coll. (173, 199) qui ont adapté à l'électrophorèse les tests de précipitation proposés par BURSTEIN (41). Le protocole est le suivant, il est résumé sur la figure 13 (page 64) :

- dans un premier temps, les VLDL sont précipitées dans le gel par une solution d'héparinate de sodium et de chlorure de magnésium,
- dans un second temps, les autres lipoprotéines (LDL et HDL) sont précipitées par une solution de sulfate de dextrane et de chlorure de calcium.

En présence d'un type IV, les LDL apparaissent entre les VLDL et le point de dépôt.

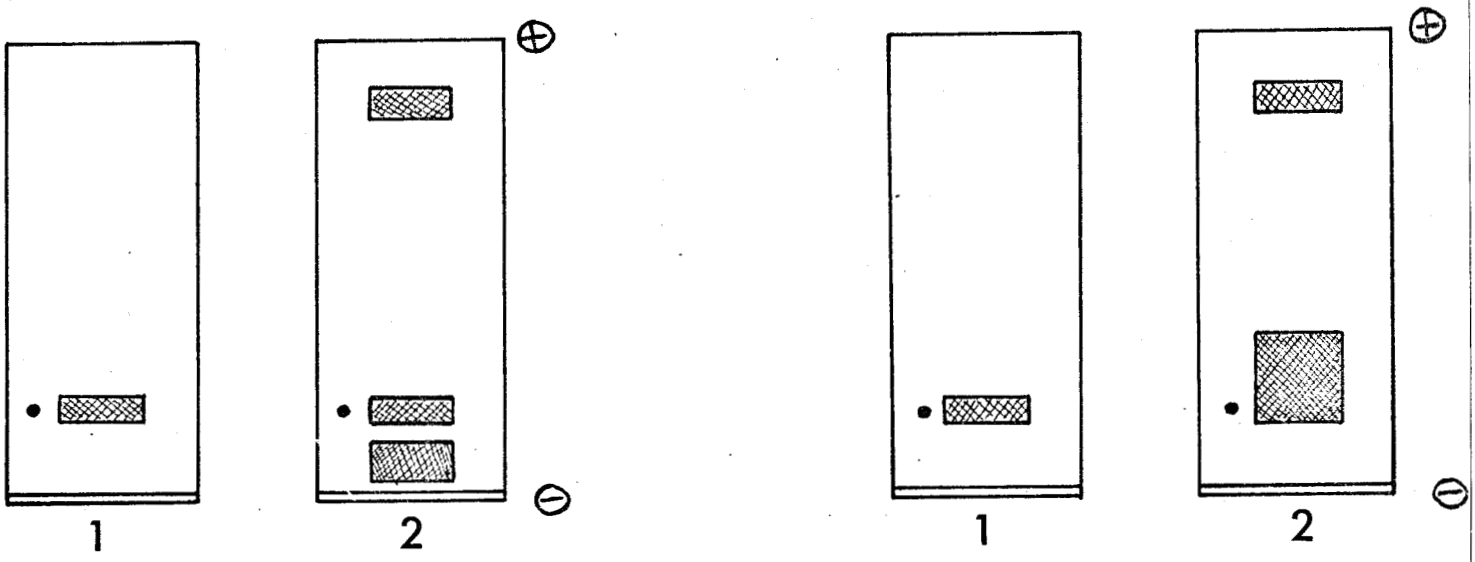
En présence d'un type III, les LDL apparaissent en aval et renforcent la première bande puisque la lipoprotéine anormale du type III a une migration de type LDL mais précipite comme les VLDL.

La méthode est excellente : jusqu'à présent le typage ne reposait que sur l'aspect de "broad-band" obtenu sur papier en tampon albumineux et sur les critères quasi obligatoires d'ultracentrifugation de flottation. Cependant, dans notre expérience, nous avons pu constater à la suite d'autres auteurs (136) qu'avec cette technique certains type III confirmés en ultracentrifugation n'étaient pas repérés.

FIGURE 13

REVELATION DE SEIDEL

PAR LES POLYANIONS



TYPE IV

TYPE III

1: précipitation par l'héparinate de sodium qui révèle les pré-bêta (type IV) ou la lipoprotéine anormale (type III).

2: précipitation par le sulfate de dextran qui révèle toutes les lipoprotéines.

BIUS LILLE

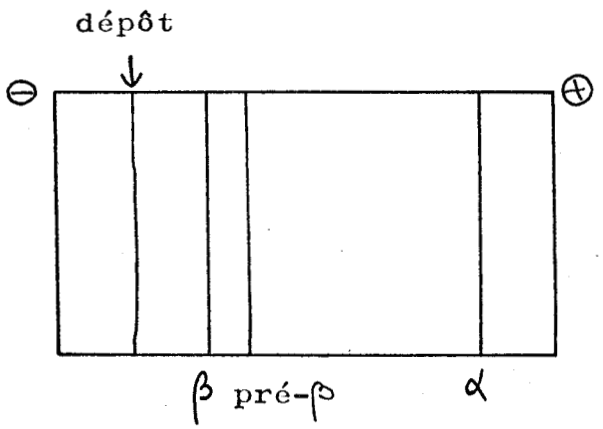
Combinée à certains tests de précipitation sélective par les polyanions, l'électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une intégration densitométrique des fractions ainsi individualisées est utilisée par certains auteurs pour quantifier les lipoprotéines. C'est ainsi que LOPEZ et coll. (123) apprécient les bêta et pré-bêta-lipoprotéines d'un plasma.
Il n'existe cependant aucune linéarité entre la concentration en lipoprotéines et la quantité de colorant fixé par chaque classe d'entre elles et de nombreuses objections sont faites à cette méthode.
Le problème de la fixation du colorant par les lipoprotéines se pose également dans une autre technique de quantification basée exclusivement sur la séparation électrophorétique obtenue sur gel d'agarose selon la technique des laboratoires Bio Rad (94) et pour résoudre ce problème, les auteurs introduisent des facteurs de correction ou "facteurs de coloration". D'autres facteurs interviennent : ce sont des facteurs de standardisation interne qui tiennent compte principalement de la manipulation proprement dite et de la précision plus ou moins grande de la distribution des échantillons déposés sur le gel.

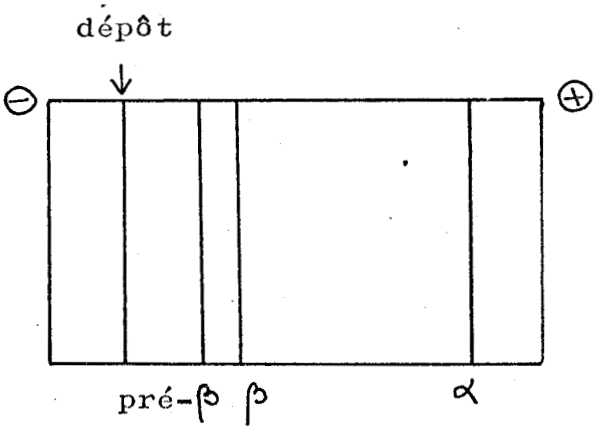
En conclusion, le gel d'agarose est un support qui devrait être essentiellement utilisé par la séparation analytique des lipoprotéines de sérums clairs : il ne doit être employé qu'avec beaucoup de réserves pour une étude quantitative.

F/ L'ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Tous les systèmes électrophorétiques précédemment envisagés séparent les lipoprotéines d'après leurs différences

de charge et donc d'après leur mobilité électrophorétique, sans faire intervenir d'autres propriétés physiques. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide fait intervenir, en plus, le facteur taille moléculaire. C'est pourquoi l'ordre de migration des VLDL et des LDL se trouve modifié sur ce support si on le compare à celui obtenu sur papier, acétate de cellulose ou agarose :





papier
acétate de cellulose
agarose

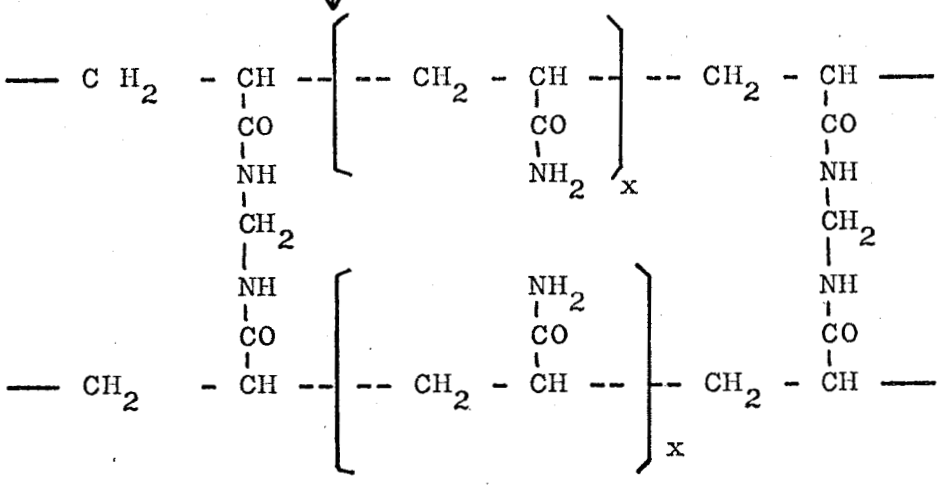
gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé par co-polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide en présence d'un catalyseur libérant des radicaux libres et d'un initiateur. Sa formation peut être schématisée ainsi :

$CH_2 = CHCONH_2$ + $CH_2\ (NHCOCH = CH_2)_2$

acrylamide — N, N' méthylène bis-acrylamide

Catalyseur
Initiateur



Ce support est particulièrement utile pour la séparation des macromolécules :

- il assure une séparation rapide,
- les phénomènes d'adsorption et d'électro-osmose sont très faibles,
- on peut jouer sur la porosité et choisir la taille des pores en fonction de celle des macromolécules à isoler. Deux paramètres exprimés en pourcentages définissent généralement les gels : T et C

$$\% T = \text{concentration en acrylamide} + \text{concentration en bis-acrylamide}$$

$$\% C = \frac{\% \text{ bis-acrylamide}}{\% T}$$

Récemment, RUCHEL et coll. (159) ont suivi en microscopie électronique les modifications morphologiques d'un gel, associées à des variations de la concentration en acrylamide ou en bis-acrylamide. Ils montrent ainsi qu'une augmentation de la concentration en monomère induit non seulement une augmentation de la masse structurale par unité de surface, mais également un épaississement des membranes du gel. De même, il existe une relation entre la concentration en bis-acrylamide et l'organisation structurale définitive. Les édifices obtenus sans agent de pontage sont formés uniquement de fibrilles longues et fines dont la longueur diminue au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en bis-acrylamide, pouvant même atteindre l'état de points ou de noeuds. Un "gel" préparé exclusivement à l'aide de bis-acrylamide consiste en une multitude d'unités sphériques agrégées au hasard.

L'emploi de ce support a considérablement simplifié le problème du diagnostic des hyperlipémies et le gel de polyacrylamide nous paraît avoir un très grand pouvoir de résolution. La mise en évidence de nombreuses bandes intermédiaires offre des possibilités supplémentaires pour le typage. Inversement le fait d'observer une bande unique sur ce support constitue un puissant critère d'homogénéité pour une fraction lipoprotéique isolée par ultracentrifugation ou chromatographie.

NARAYAN, en 1965, préconise le premier l'emploi d'un tel support (138, 139, 140). En 1969, PRATT et DANGERFIELD

(150) publient la méthode de préparation d'un gel de polyacrylamide à gradient continu de concentration. La résolution, au niveau des lipoprotéines sériques, était déjà ainsi très supérieure à celle obtenue avec les techniques plus classiques. FRINGS en 1971 (74) puis HALL en 1972 (90) mettent au point le système "quick Disc". La séparation s'effectue sur une petite colonne de gel d'acrylamide à gradient discontinu de concentration. Trois sortes de gels sont successivement coulés et polymérisés : gel de séparation, gel de concentration et gel de dépôt auquel on incorpore le sérum précoloré.

La préparation des gels et de la solution colorante distinguent les procédés.

Deux critiques s'adressent à ceux-ci :

- d'une part l'utilisation du noir soudan comme réactif de précoloration se révèle peu satisfaisante malgré les modifications apportées par HALL. En effet, celui-ci préconise l'acétylation du colorant qui augmente son affinité pour les lipoprotéines et réduit de ce fait le volume de solution colorante utilisée ; cela permet de diminuer la concentration en acrylamide et bis-acrylamide dans le gel de dépôt et donc d'en augmenter la porosité. On pouvait ainsi espérer obtenir une légère migration anodique des chylomicrons ;
- d'autre part, les chylomicrons ne pénétrant pas dans le gel selon la technique de FRINGS, sont le plus souvent masqués par le dépôt du colorant excédentaire, ce qui rend encore difficile le diagnostic différentiel entre les hyperlipémies de type IV et V.

En 1974, SEGAL et coll. (171) publient une méthode de précoloration des lipoprotéines par le diformazan de nitro bleu de tétrazolium (NBT) qui, en simplifiant la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, la rend de réalisation facile et relativement rapide.

Nous présentons dans le deuxième chapître une récente méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration (174). Cette technique, mise au point au laboratoire, permet le plus souvent de lever les doutes ou impossibilités d'interprétation d'un lipidogramme sur l'un des supports plus classiques tel l'acétate de cellulose. Chaque type d'hyperlipoprotéinémie a son profil particulier et les ambiguïtés sont exceptionnelles d'un type à l'autre.

D'autre part, ce support permet la mise en évidence facile des lipoprotéines particulières, comme la Lp(a) ou la lipoprotéine intermédiaire s'accumulant dans l'hyperlipémie de type III.

L'excellente résolution des lipoprotéines sériques obtenue sur ce support a conduit certains auteurs à l'utiliser pour préparer des fractions purifiées. Comme pour le gel d'amidon, les bandes de lipoprotéines sont extraites par découpage et élution. Le broyage dans un mortier sous un faible volume de solution saline est ici préféré à la simple diffusion (193).

Dans le troisième chapître, nous présentons une technique originale d'électrophorèse préparative sur colonne de gel d'acrylamide avec élution continue des différentes bandes de lipoprotéines (58). Ce système est appliqué à la préparation des bêta et alpha-lipoprotéines ; il nous a permis également d'isoler à l'état pur la Lp(a) lipoprotéine et d'en faire une étude partielle.

Sur le plan qualitatif, l'apport de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est indiscutable. L'utilisation de ce support permet en outre de préparer très facilement et à l'état pur certaines classes de lipoprotéines, ce qui jusqu'à maintenant nécessitait la pratique de l'ultracentrifugation. C'est donc un support de choix pour l'analyse des lipoprotéines.

LES PRECIPITATIONS SELECTIVES PAR VOIE CHIMIQUE

A/ PRINCIPE

En 1955, BURSTEIN et SAMAILLE (37) montrent que les polyanions forment avec les lipoprotéines des complexes insolubles en présence de cations bivalents. Ce sont les premiers travaux d'une très longue liste et des polyanions aussi variés que l'héparine, le sulfate de dextrane, le tréburon, le liquoïde, l' hémoclar, le sulfate d'amylopectine, voire même le polystyrène sulfonate de sodium ou l'acide phosphotungstique sont associés à divers cations bivalents tels le calcium, le magnésium, le manganèse ou le cobalt. La précipitation des lipoprotéines peut de même être sélective lorsqu'on ajoute au sérum un détergent cationique ou un polymère neutre tel le polyvinyl-pyrrolidone.

Ces tests de précipitation sélective sont simples et très facilement réalisables par tout laboratoire d'analyses. Ils ont été exploités par de nombreux auteurs et sont à la base de plusieurs schémas proposant la quantification des lipoprotéines sériques, très intéressante à considérer en pathologie.

B/ LES PRECIPITATIONS SELECTIVES

1 - La précipitation polyanionique

a) - historique

Avec BERNFELD (15) et ONCLEY (145), BURSTEIN et SAMAILLE (37) montrent les premiers en 1955 que dans certaines conditions, les lipoprotéines sériques de basse densité précipitent à pH neutre par formation de complexes insolubles avec des polysaccharides sulfatés de haut poids moléculaire tels l'amylopectine et le sulfate de dextrane, ou de poids moléculaire plus faible tel l'héparine ; dans ce dernier cas, il faut ajouter un cation bivalent. De très nombreux auteurs avaient déjà décrit la formation de complexes solubles entre d'autres protéines sériques et des polysaccharides sulfatés (21 , 100). Cependant, l'affinité de ces derniers est beaucoup plus grande pour les bêta-lipoprotéines, et BERNFELD et coll. montrent qu'avec de faibles concentrations en polysaccharides dans une zone de pH allant de 7,5 à 8,6, seules s'établissent des interactions avec les bêta-lipoprotéines (16 , 18).

Les complexes ainsi formés sont, soit solubles, soit insolubles, selon la nature chimique du polysaccharide utilisé.

En 1957 (38), apparaissent d'autres composés sulfatés, tel le sel de sodium de l'acide polyanéthol sulfonique, qui précipitent les lipoprotéines de basse densité en présence de calcium.

Faisant varier les conditions expérimentales (nature du cation, concentration des réactifs, force ionique) BURSTEIN décrit en 1962 (30) la précipitation des HDL par les polysaccharides sulfatés jusqu'alors utilisés pour celle des lipoprotéines de faible densité. Dans des conditions expéri-

mentales parfaitement définies, il est possible de précipiter sélectivement une classe particulière de lipoprotéines.

Des anions autres que les polysulfates peuvent être employés et l'addition de cations bivalents s'impose. C'est ainsi que BURSTEIN en 1963 (31) obtient des complexes entre les lipoprotéines de basse densité et le phosphotungstate de sodium. En 1970 (40) les lipoprotéines de haute densité sont précipitées par le même polyanion.

De telles interactions sont également obtenues avec des polyphosphates inorganiques (33) ou avec de simples anions : des tétracyclines (113), des sels biliaires, des acides gras et le lauryl-sulfate de sodium (35).

Des techniques basées sur la formation de ces complexes insolubles lipoprotéine-polyanion-cation sont alors largement développées. BURSTEIN et SCHOLNICK (41) ont récemment rapporté les très nombreuses méthodes basées sur ce principe et assurant une précipitation sélective des lipoprotéines.

b) - Spécificité de la précipitation

Lorsqu'elle doit être sélective, la précipitation polyanionique des lipoprotéines réclame des exigences expérimentales particulières. En effet, les lipoprotéines ne précipitent pas toutes dans les mêmes conditions : on peut jouer sur la nature du polyanion et celle du cation, sur la force ionique et le pH du milieu réactionnel et enfin sur les concentrations finales respectives des trois réactants.

La formation du complexe insoluble lipoprotéine-polyanion-cation est plus facilement obtenue avec les chylo-

microns et les VLDL qu'avec les LDL, et plus facilement avec les LDL qu'avec les HDL. Ce fait s'explique par un rapport croissant protéine/lipide. C'est ainsi qu'une précipitation sélective des différentes classes de lipoprotéines peut être obtenue avec un même polyanion et en présence du même cation, en augmentant progressivement la concentration des réactifs.

c) - Nature de l'interaction

La facilité avec laquelle se forme le complexe dépend du rapport protéine/lipide, mais non de la composition lipidique des lipoprotéines précipitées. BURSTEIN en 1970 (43) précipite les lipoprotéines anormales d'un sérum ictérique et les VLDL dans les mêmes conditions, malgré leur teneur très différente en lipides. Cependant, dans les deux cas, les rapports protéine/lipide sont sensiblement égaux.

La formation des complexes peut s'expliquer par une interaction électrostatique s'établissant entre le polyanion et l'apoprotéine. Le complexe soluble ainsi obtenu est ensuite précipité par le cation bivalent. La nature de l'apoprotéine est très importante :

- En absence de cations bivalents, il y a une grande diversité des pH exigés pour la précipitation des différentes classes de lipoprotéines par l'héparine (40).

- En utilisant des LDL acétylées, NISHIDA et COGAN (142) montrent que les groupes polaires des protéines sont responsables de l'interaction sulfate de dextrane-LDL formant ainsi un complexe soluble. Des liaisons supplémentaires entre les charges négatives du polyanion et des LDL et les charges positives du cation bivalent sont enfin responsables de la conversion en complexe insoluble.

Par contre, pour d'autres auteurs (17, 47), les polysaccharides sulfatés se combinent aux groupements positifs des phospholipides des LDL. La partie protéique n'est donc pas essentielle.

Néanmoins, les lipides sont nécessaires pour la précipitation. BURSTEIN montre en 1970 que, après délipidation des HDL, les apoprotéines solubles ne sont pas précipitées par les polyanions dans les mêmes conditions que la lipoprotéine entière (40).

Quelle que soit l'hypothèse retenue il faut noter que les polysaccharides sulfatés et les phosphotungstates de sodium ne forment pas de sels insolubles avec les cations bivalents. Lorsque la précipitation des lipoprotéines est obtenue avec les polyphosphates, les tétracyclines ou les détergents, l'association de ces réactifs et du cation bivalent résulte en un sel insoluble, entraînant la précipitation des lipoprotéines.

2 - La précipitation polycationique

La précipitation des lipoprotéines a lieu également lorsqu'on ajoute au sérum un détergent cationique tel le bromure de cétyltriméthylammonium ou le cétavlon, et un polyélectrolyte de charge opposée sous forme d'héparine (34).

Lorsqu'on remplace le couple détergent - polyélectrolyte par deux polyélectrolytes de charge opposée (par exemple le lauryl-sulfate de sodium et le cétavlon), les lipoprotéines restent en solution. Il en résulte que leur précipitation est liée à la formation d'un complexe soluble lipoprotéines - détergent. Celui-ci flocule en présence d'un électrolyte qui forme avec le détergent un sel insoluble.

3 - La précipitation par le polyvinyl-pyrrolidone

La précipitation des lipoprotéines s'obtient également par interaction de ces macromolécules avec un polymère neutre, le polyvinyl-pyrrolidone.

A pH neutre et dans un milieu hypertonique à base de chlorure de sodium, le polyvinyl-pyrrolidone précipite

sélectivement les chylomicrons, les VLDL et les LDL ; les concentrations de polyvinyl-pyrrolidone nécessaires pour obtenir cette précipitation sont plus faibles pour les chylomicrons que pour les VLDL (36) et plus faibles pour les VLDL que pour les LDL (19 , 32).

GORDIS et BIERMAN utilisent la précipitation par le polyvinyl-pyrrolidone des lipoprotéines d'un sérum opalescent ou turbide pour traduire, soit un défaut d'épuration des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL), soit une hypersynthèse hépatique de VLDL qui, lorsqu'elles sont de grande taille sont désignées sous le nom de lipomicrons. Dans le test de GORDIS (144), la précipitation s'effectue dans une colonne à gradient de concentration en polyvinyl-pyrrolidone de 0 à 5 %. Le test de BIERMAN (20) consiste à déposer le sérum au fond d'un tube contenant une solution aqueuse de polyvinyl-pyrrolidone à 3 %. Après une nuit à 37° C, les chylomicrons se rassemblent en surface, alors que les lipomicrons diffusent en traînée sur toute la hauteur de la colonne liquide.

C/ APPLICATIONS

La presque totalité des hyperlipoprotéinémies se traduit par une augmentation du taux des lipoprotéines du groupe bêta : bêta-lipoprotéines lourdes (type II_A), pré-bêta-lipoprotéines légères (type IV ou V) ou ensemble des bêta et des pré-bêta-lipoprotéines (type II_B mixte). Le dosage des bêta et des pré-bêta-lipoprotéines sériques présente donc un intérêt majeur dans le diagnostic différentiel de ces hyperlipoprotéinémies. Dans ce but, il convient de disposer de techniques d'analyses simples et rapides permettant outre l'identification précise du trouble lipidique, de suivre l'évolution d'une hyperlipémie ou d'en faire un dépistage précoce.

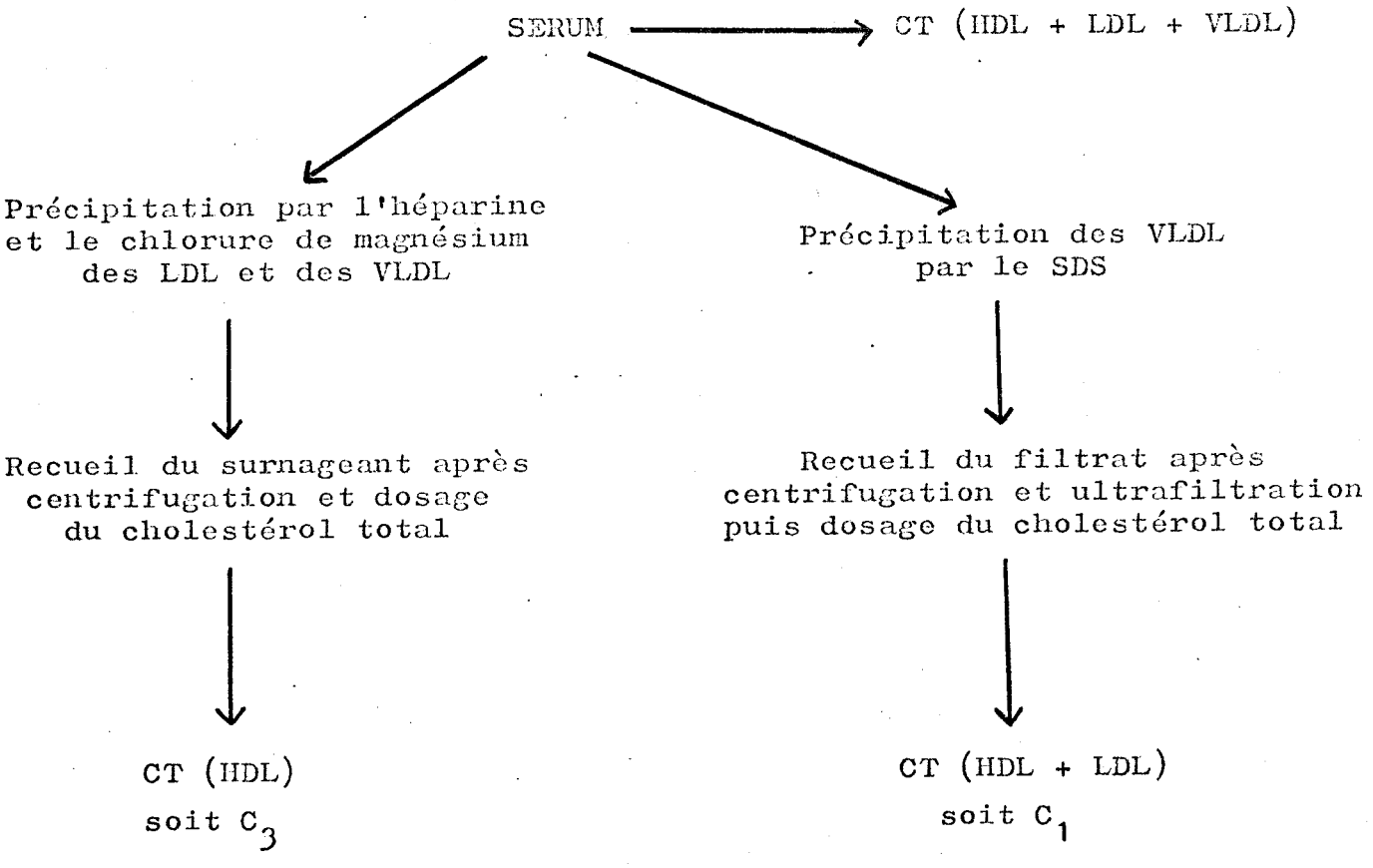
Parmi les quatre types de méthodes utilisables : l'ultracentrifugation, l'électrophorèse, la précipitation immunologique et la précipitation chimique, seules les deux dernières se prêtent aisément et efficacement pour les analyses de routine. Du fait de la composition protéique des lipoprotéines, les techniques immunologiques ne permettent pas de différencier entre elles les deux groupes bêta et pré-bêta-lipoprotéines (44).

C'est pourquoi les méthodes de précipitation sélective par voie chimique s'avèrent particulièrement intéressantes. Certains protocoles de quantification des lipoprotéines les combinent à l'électrophorèse (123), d'autres ne font appel qu'à leurs seules propriétés de précipitation sélective. C'est ainsi que WILSON et coll. (203, 204) décrivent une méthode utilisant le dosage du cholestérol des lipoprotéines séparées par deux étapes de précipitation. Dans ce protocole, les VLDL sériques sont précipitées dans un premier temps par le lauryl-sulfate de sodium et on mesure la concentration en cholestérol du surnageant qui contient les HDL et les LDL. Dans un second temps, les VLDL et les LDL sont précipitées par un complexe polyanion-cation divalent et on mesure la concentration en cholestérol du surnageant qui ne contient plus que les HDL. A partir des valeurs obtenues et du cholestérol total, on calcule, par différence, le taux de cholestérol des VLDL et des LDL. La figure 14 (page 78) résume les principaux temps de la méthode.

Deux autres réactions de floculation sont utilisées par GIRARD et coll. (86) pour quantifier les lipoprotéines : la précipitation de l'ensemble bêta-lipoprotéines + pré-bêta-lipoprotéines par addition de sulfate de dextrane

FIGURE 14

QUANTIFICATION DES LIPOPROTEINES SELON WILSON ET SPIGER (204)



C_3 = CT(HDL)

$C_1 - C_3$ = CT(LDL)

$C_2 - C_1$ = CT(VLDL)

BIUS LILLE

et de magnésium, et la précipitation des pré-bêta-lipoprotéines (et les chylomicrons éventuellement présents) par action du lauryl-sulfate de sodium. Ces précipitations se pratiquent directement sur le sérum et se prêtent aisément à des adaptations automatiques (45 , 46 , 86). La mesure de l'intensité du trouble développé met en oeuvre un fluonéphélomètre. Les résultats sont exprimés en grammes par litre de lipides liés aux lipoprotéines.

Un troisième exemple d'application des tests de précipitation sélective des lipoprotéines par voie chimique est donné dans le second chapître où nous décrivons une technique simple et reproductible d'appréciation semi-quantitative des lipoprotéines de basse densité (75). Elle est susceptible d'être utilisée dans les laboratoires de routine et couple deux tests turbidimétriques décrits par BURSTEIN et coll. (39 , 42).

L A D I F F E R E N C I A T I O N

I M M U N O C H I M I Q U E

En première analyse, les lipoprotéines sériques se répartissent en deux grandes catégories immunologiquement distinctes, les alpha-lipoprotéines d'une part et les bêta-lipoprotéines d'autre part. Il existe une parenté immunologique évidente entre les LDL et les VLDL, c'est pourquoi les immunsérums usuels ne permettent pas la distinction entre bêta et pré-bêta-lipoprotéines, mais réalisent simplement la distinction alpha/bêta.

Les caractéristiques immunologiques des lipoprotéines sont apportées par les apolipoprotéines, la copule lipidique intervenant pour renforcer la réactivité (haptène), ou au contraire, pour dissimuler certains déterminants antigéniques. De récents travaux montrent l'importance des apoprotéines dans le métabolisme des lipoprotéines (66 , 114) et certains auteurs, comme ALAUPOVIC, n'hésitent pas à classer les lipoprotéines en familles (LPA, LPB, LPC, LPD) (2). Les apolipoprotéines peuvent être dosées immunologiquement par tous les proédés classiques :

- immunoprécipitation ou mesure de la hauteur du précipité immun en tube capillaire (96),
- immunoprécipitation en milieu gélifié (immunodiffusion radiale simple (107, 116) ou électroimmunodiffusion (65 , 127),
- dosage radioimmunologique (10 ,167 , 168),

- immunonéphélométrie (85). Cette méthode est une application de la précipitation en milieu liquide et vient d'être adaptée à l'analyse automatique. Le trouble formé lors de la réaction antigène-anticorps est apprécié à l'aide d'un fluorimètre muni de deux filtres primaire et secondaire identiques de façon à mesurer la quantité de lumière diffusée par le précipité. Il devient ainsi possible de mesurer la concentration des alpha ou celle des bêta-lipoprotéines selon l'immunsérum mis en oeuvre, au cours de grandes séries de dosages.

Une autre application de l'immunologie au domaine des lipoprotéines est la détermination du caractère Lp(a) positif ou négatif des sujets. La mise en évidence de cet antigène nécessite un immunsérum spécifique anti-Lp(a) obtenu en deux temps. Nous en détaillerons la préparation ultérieurement. La Lp(a) est alors détectée par double diffusion en gélose (12) ou mieux par immuno-diffusion radiale (6) ou électroimmuno-diffusion (194). Ces deux dernières méthodes permettent en outre la quantification immunologique de cette lipoprotéine dont la concentration sérique varie entre les individus et dont la signification pathologique reste à préciser.

L'immunologie permet également la mise en évidence de la lipoprotéine anormale, la Lp (X), caractéristique de la cholostase. Cette lipoprotéine possède certaines des caractéristiques des pré-bêta-lipoprotéines, mais sa mobilité sur gélose est différente. L'observation d'un précipité immun dans la zone cathodique lors de la révélation par un immunsérum anti-pré-bêta-lipoprotéines (anti-apo-C) (172) est un signe éloquent en faveur de la présence de la Lp(X) dans le sérum examiné. Son dosage précis peut être réalisé par divers moyens, en l'occurence par des méthodes immunologiques (111).

L A C H R O M A T O G R A P H I E

Le fractionnement des lipoprotéines sériques pose très souvent le problème de leur instabilité. La plupart des procédés employés (électrophorèse, ultracentrifugation, formation de complexes insolubles) sont généralement agressifs et drastiques et modifient la structure des macromolécules isolées (118, 175).

Les lipoprotéines purifiées doivent être intactes qualitativement et de nombreux auteurs préconisent dans ce but une chromatographie de tamisage moléculaire. Dans un tel contexte, les lipoprotéines sont uniquement soumises aux forces de diffusion et restent en solution tamponnée pendant toute la durée de l'isolement.

Comparée à la méthode de référence qu'est l'ultracentrifugation, cette méthode est beaucoup plus rapide. Elle offre de plus l'avantage d'une possible distribution des lipoprotéines en fonction de leur taille.

La chromatographie sur colonne des lipoprotéines plasmatiques est utilisée par différents auteurs sur des supports aussi variés que l'hydroxylapatite (54), des billes de verre (48 , 51), des échangeurs d'ions type DEAE cellulose microgranulaire (22 , 104 , 132 , 181), des gels Séphadex (23 , 67 , 68 , 70) et enfin les gels d'agarose qui, de tous les supports présentés, fournissent les meilleurs résultats. Ils ont été utilisés par de nombreux auteurs

(108, 134 , 151 , 162 , 163 , 196) et il semble que le Bio Gel A - 5 m (agarose à 6 % (p/v)) préconisé par RUDEL et coll. (160) possède une porosité satisfaisante pour isoler quantitativement les lipoprotéines en trois fractions distinctes et parfaitement pures.

Souvent employée dans un but essentiellement préparatif, la chromatographie des lipoprotéines sur colonne de gel d'agarose peut cependant être utile sur un plan plus théorique et donner des informations sur la structure des composés isolés (108) ou sur leur masse moléculaire (134), ou même aider au typage d'une hyperlipémie : c'est ainsi que le diagramme d'élution obtenu par SHEPHERD et coll. (175) après chromatographie des lipoprotéines d'un sérum dyslipémique de type III est tout à fait caractéristique.

Des études récentes d'interactions entre la concanavaline A et les classes majeures de lipoprotéines ont permis l'application du principe de la chromatographie d'affinité à la séparation des lipoprotéines d'un sérum total (60) ou au sous-fractionnement des lipoprotéines séparées par ultracentrifugation (126, 176). Cette méthode est très spécifique. Elle fournit des lipoprotéines extrêmement pures et doit être recommandée pour la préparation de solutions d'antigènes.

En conclusion, la chromatographie sur colonne s'avère très utile à l'isolement des lipoprotéines. De tous les principes présentés (chromatographie d'adsorption, d'échanges d'ions, de tamisage moléculaire, d'affinité), la chromatographie de tamisage moléculaire sur gel d'agarose est la plus couramment employée.

Rarement appliquée seule, elle intervient souvent comme seconde étape d'une purification, la première faisant généralement appel à l'ultracentrifugation.

LA Lp(a) LIPOPROTEINE

-=-=-=-=-=-

I N T R O D U C T I O N

D'implication pathologique encore très incertaine, la Lp(a) lipoprotéine a suscité de nombreux travaux. Cependant, beaucoup de questions restent actuellement posées quant à l'isolement, la structure, la composition exacte et le métabolisme de cette macromolécule particulière.

Nous nous proposons de rappeler brièvement quelques données acquises sur ce sujet, avant de présenter dans la seconde partie de ce mémoire une technique originale d'électrophorèse préparative des lipoprotéines qui, couplée à l'ultracentrifugation, nous permet d'isoler la Lp(a).

Son obtention à l'état pur est la base d'une partie de notre travail actuellement en cours au laboratoire. Le dernier chapître en présente les premiers résultats.

L A L p (a) L I P O P R O T E I N E :
D E F I N I T I O N E T C A R A C T E R I S A T I O N
D A N S L E P L A S M A

A/ DEFINITION

La préparation d'un hétéro-immunsérum chez le lapin a permis en 1963 la découverte par BERG d'un nouveau système génétique : le système Lp (12). Deux phénotypes Lp (a +) et Lp(a -) sont mis en évidence par immunodiffusion radiale.

En 1968, le facteur antigénique Lp(a), associé à un variant génétique polymorphe des LDL (13), est retrouvé dans une fraction de densité élevée ($1{,}050 < d < 1{,}120$) (169, 198). GAROFF en 1970 le caractérise par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (83).

Pour certains auteurs, il s'agit d'une sous-fraction de pré-bêta-lipoprotéines, appelée "sinking-pre-β-lipoprotein" (155) ou encore pré-β_1- lipoprotéine (14 , 55) ; d'autres la définissent comme une sous-fraction des LDL (135, 147).

B/ CARACTERISATION DANS LE PLASMA

La caractérisation de la Lp(a) dans le plasma fait appel à des méthodes électrophorétiques et immunologiques.

Sur les supports classiques d'électrophorèse (agarose, acétate de cellulose, papier), cette lipoprotéine migre en position pré-bêta (155) ; son repérage est de ce fait quasiment impossible et elle est très souvent responsable d'une augmentation des pré-β-lipoprotéines rencontrée chez certains sujets normotriglycéridénimiques.

Son individualisation par électrophorèse nécessite une séparation sur gel de polyacrylamide (83) et nous verrons que l'emploi d'un gradient discontinu de pH et de concentration permet son identification (174). Sur ce support, la Lp(a) se situe juste au-dessus des LDL.

Bien qu'une communauté antigénique très étroite existe entre les LDL et la Lp(a), 20 % de la copule protéique totale de la Lp(a) sont spécifiques à cette molécule (6), définissant ainsi l'apo-Lp(a) qui développe avec un immunsérum correspondant un arc de précipitation caractéristique. Sa recherche dans le plasma se fait donc très simplement par des méthodes classiques d'immunodiffusion ou d'immunoélectrophorèse (6 , 12 , 194).

ISOLEMENT, PROPRIETES PHYSIQUES, STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE DE LA Lp(a)

A/ ISOLEMENT

Plusieurs protocoles d'isolement de la Lp(a) lipoprotéine sont décrits dans la littérature.

Trois raisons majeures rendent la purification de cette lipoprotéine relativement difficile :

- sa densité est intermédiaire entre celles des LDL et des HDL (169),
- sa structure est instable et la molécule isolée se polymérise rapidement (177),
- enfin, sa présence dans le plasma est quantitativement très variable, mais souvent faible (6).

Tous les schémas d'isolement proposés préconisent l'ultracentrifugation de flottation avec ajustements intermédiaires des densités (95). La purification est ensuite complétée par chromatographie sur hydroxylapatite (186), ou par tamisage moléculaire sur sépharose (62 , 119 , 177) ou agarose (6). Les rendements obtenus sont très faibles et la fraction de Lp(a) ainsi préparée n'est généralement que partiellement purifiée.

Plus récemment, WALTON et coll. (194) associent une précipitation par le sulfate de dextrane (146), l'ultracentrifugation préparative (95) et une chromatographie d'affinité (194). La Lp(a) est alors obtenue sous une forme parfaitement homogène.

B/ PROPRIETES PHYSIQUES

Le tableau ci-dessous résume quelques caractéristiques physiques de la Lp(a) lipoprotéine. Elles ont été définies par SIMONS et coll. en 1970 (177).

CARACTERISTIQUES	
Masse moléculaire (1)*	$4,8 \cdot 10^6$
Masse moléculaire (2)**	$5,6 \cdot 10^6$
Densité (en g/ml)	1,050 - 1,120
Structure	sphérique
Diamètre moyen (en Å)	255
Point isoélectrique	4,9

* définie par tamisage moléculaire sur une colonne de sépharose 2 B

** définie en microscopie électronique

C/ STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE

La Lp(a) lipoprotéine se dissocie en trois composants (61 , 185 , 192). Les propriétés immunologiques, la mobilité électrophorétique et le comportement en ultracentrifugation étant particuliers à chacun d'entre-eux, il est possible de les identifier :

- l'un est assimilable à des LDL (" β -LDL_2"),
- un autre contient de l'albumine,
- un troisième porte le déterminant antigénique spécifique à la Lp(a) : c'est la protéine Lp(a).

Des études quantitatives montrent que la partie protéique de la Lp(a) lipoprotéine est formée de 65 % d'apo-B (apoprotéine des LDL), 20 % de protéine Lp(a) et moins de 15 % d'albumine (61 , 192).

La dissociation de la Lp(a) peut se produire spontanément ou après traitement chimique par l'urée ou des détergents tel le Triton X-100 (185). Les auteurs émettent alors l'hypothèse d'une liaison hydrophobe entre la "β-LDL_2" et la protéine spécifique Lp(a).

Le rôle et même la présence de l'albumine dans la molécule de Lp(a) restent encore très controversés :

- UTERMANN et coll. (185) constatent que les préparations obtenues après chromatographie sur hydroxylapatite sont beaucoup plus stables que celles purifiées sur sépharose : des cations bivalents consolideraient le complexe Lp(a) et seraient fixés facilement par la sérumalbumine.
- pour EHNHOLM et coll. (61), le fait que la Lp(a) lipoprotéine, sous sa forme homogène, réagisse en immunodiffusion radiale, à la fois avec un immunsérum anti-LDL et un immun-

sérum anti-Lp(a) mais non avec un immunsérum anti-albumine, est la preuve que l'albumine fait partie intégrante du complexe.

Pour d'autres auteurs, cette conclusion est mise en doute (194) : s'agit-il d'un déterminant antigénique masqué et révélé lors de la dégradation de la lipoprotéine ou d'un contaminant ?

Lorsqu'elle n'est pas dissociée, la Lp(a) lipoprotéine se comporte comme une molécule homogène. Elle contient 65 % de lipides, 27 % de protéines et 8 % de glucides.

La composition lipidique est très proche de celle des LDL (109,119 ,177 ,186). L'analyse de la composition en acides aminés et en glucides distingue ces deux lipoprotéines (61 , 177).

Le tableau ci-dessous donne la composition lipidique de la Lp(a) comparée à celle des LDL.

Fraction de lipoprotéine	Références	Lipides : en % de lipides totaux (p/p)				Lipides / Protéines (p/p)
		CE	CL	TG	Phospho.	
Lp(a)	SIMONS et coll. (177)	59	14	3	24	1,8
	LINDEN et coll. (119)	51	13	8	28	3,0
LDL	SIMONS et coll. (177)	56	13	5	26	3,7
	LINDEN et coll. (119)	52	13	6	29	3,3

Nous pourrions le compléter par d'autres analyses indiquant une distribution similaire des phospholipides majeurs dans les deux lipoprotéines. La Lp(a) contient essentiellement de la phosphatidyl-choline et de la sphingomyéline, un peu de lysolécithine et de cérébrosides, et des traces de phosphatidyl-éthanolamine (109, 192).

Les lipides neutres sont formés de 60 % de cholestérol dont 2/3 sont estérifiés et beaucoup d'auteurs s'accordent pour trouver un taux de glycérides faible (6 ,119 , 177, 186, 192). Cependant, VOGELBERG et coll. (192) faisant état de variations individuelles considérables intervenant dans la composition de la Lp(a), isolent du plasma d'un sujet une fraction composée presque exclusivement de glycérides partiels (mono et diglycérides).

La composition en acides aminés de la lipoprotéine Lp(a), molécule homogène, ressemble également à celle des LDL (61 , 177). Cependant, l'examen du tableau ci-après révèle quelques différences et c'est ainsi que le taux de cystéine est environ 3 fois plus important dans la Lp(a).

Composition en acides aminés de la Lp(a) lipoprotéine et des LDL (en moles/1000 moles) d'après SIMONS et coll. (177)

Acide aminé	Lp(a)	LDL
Lysine	62,8	75,9
Histidine	21,3	23,0
Arginine	40,3	33,3
Acide aspartique	98,9	106,7
Thréonine	68,0	65,2
Sérine	78,2	80,2
Acide glutamique	117,8	122,0
Proline	54,1	39,7
Glycocolle	75,1	52,1
Alanine	82,6	61,4
Cystéine	17,8	6,0
Valine	60,1	55,1
Méthionine	15,8	17,1
Isoleucine	43,5	56,7
Leucine	84,9	118,6
Tyrosine	34,8	30,3
Phénylalanine	35,2	50,4
Tryptophane	8,7	6,4

BUS LILLE

Dans la littérature, très peu de renseignements sont donnés quant à la protéine Lp(a), spécifique de la molécule et mise en évidence après dénaturation du complexe lipoprotéique. Il serait dès lors intéressant de connaître la composition en acides aminés et de déterminer la structure de cette protéine particulière.

Si la composition lipidique, et, dans une moindre mesure, celle en acides aminés de la Lp(a) et des LDL se ressemblent, l'analyse de la composition en glucides distingue ces deux lipoprotéines (177).

SIMONS et coll. (177) ont déterminé le taux d'hexoses, d'hexosamines et d'acide sialique de la Lp(a) et des LDL isolées du plasma de trois sujets différents. Le tableau suivant fait état de leurs résultats.

Composition glucidique de la Lp(a) lipoprotéine et des LDL chez trois sujets différents - d'après SIMONS et coll. (177)

µg/mg de protéine		Hexoses	Hexosamines	Acides sialiques
1	LDL	47,4	24,7	11,7
	Lp(a)	101,0	72,9	60,0
2	LDL	66,6	32,8	9,9
	Lp(a)	113,0	101,0	79,0
3	LDL	49,8	27,2	9,7
	Lp(a)	110,0	78,0	59,0

Comparée aux LDL, la Lp(a) lipoprotéine est environ 3 fois plus riche en glucides, contenant 2 fois plus d'hexoroses, 3 fois plus d'hexosamines et 6 fois plus d'acide sialique. Les hexoses sont représentés par le mannose et le galactose : en quantité égale dans la Lp(a) et plus de mannose que de galactose dans les LDL.

Les LDL contiennent uniquement la N-acétyl-glucosamine, alors que la Lp(a) possède en plus la N-acétyl-galactosamine.

Enfin, on trouve 6 fois plus d'acide sialique dans la Lp(a). Ce contenu très élevé en acide sialique pourrait expliquer certaines caractéristiques physiques de la Lp(a) : son point isoélectrique (pHi) relativement bas, sa mobilité électrophorétique en position pré-bêta sur agarose, et enfin sa rétention sur des colonnes échangeuses d'anions (158).

DOSAGE DE LA Lp(a) DANS LE PLASMA

METABOLISME

INCIDENCE PATHOLOGIQUE

La Lp(a) lipoprotéine possède dans sa molécule 20 % d'apoprotéine Lp(a) spécifique, réagissant avec un immunsérum anti-apo Lp(a) pour donner un arc de précipitation caractéristique. De ce fait, son dosage dans le plasma se fait par des méthodes immunologiques classiques d'immunodiffusion radiale selon la technique de MANCINI (6), ou d'immunoélectrophorèse monodimensionnelle selon LAURELL (194). Dans les deux cas, il y a proportionnalité entre le taux d'antigène Lp(a) et, soit le carré du diamètre de l'anneau de précipitation, soit le carré de la hauteur des pics ("rockets").

Récemment, la mise au point d'un dosage radioimmunologique a permis de détecter et de doser des quantités extrêmement faibles d'antigène (170). Cette méthode nécessite la préparation d'un immuno-adsorbant couplant des anticorps anti-Lp(a) à du sépharose activé par le bromure de cyanogène.

Par immunodiffusion radiale, ALBERS et coll. (6) montrent que 92 % des sujets d'une population prise au hasard possèdent un taux de Lp(a) supérieur à 1,5 mg/100 ml de sérum, limite inférieure de sensibilité de la méthode. Ils trouvent

une concentration moyenne dans le plasma de 14 mg/100 ml, la valeur maximale obtenue lors de leur étude étant de 76 mg/100 ml.

L'expression du phénotype Lp(a) est sous contrôle génétique.

Pour BERG, en 1963, ce contrôle semblait être qualitatif (12) dépendant d'un gène autosomal dominant. Depuis, de nombreux travaux suggèrent un contrôle quantitatif (6 , 61 ,62 , 91 , 157, 187).

La mise en oeuvre du dosage radioimmunologique, méthode rapide et précise, a permis de faire une étude statistique et d'expliquer ainsi une distribution du phénotype selon une courbe bimodale (170).

Une étude génétique familiale ménée récemment semble effectivement indiquer un mode de contrôle génétique de l'antigène Lp(a) par un seul locus autosomal à effet majeur. Il y aurait au moins deux allèles sur le gène, et l'expression de ceux-ci serait affectée par divers facteurs (178).

Le métabolisme de la Lp(a) reste actuellement sans schéma. Pour WALTON et coll. (194), la voie de synthèse de la Lp(a) serait parallèle à celle des LDL : ces auteurs retrouvent en effet une partie de la réactivité Lp(a) dans la fraction VLDL.

Beaucoup d'auteurs s'interrogent sur l'incidence pathologique de cette lipoprotéine particulière qu'est la Lp(a). Elle a été trouvée avec une fréquence beaucoup plus élevée chez des sujets atteints d'infarctus du myocarde (14 , 49 , 55 , 73), d'athérosclérose coronarienne (149, 182 , 191) ou d'artérite (102) que chez des sujets sains.

Pour certains auteurs, la concentration en Lp(a) dans le plasma d'un sujet hyperlipémique est toujours augmentée, et ce, quel que soit le type de l'hyperlipémie (194) ; pour d'autres, cette élévation n'existe que dans le type II_A, une diminution interviendrait même dans les type II_B (5) ou IV. Très récemment, OSE et coll. (147) ont montré que la présence de sous-fractions bêta-lipoprotéines dans le plasma, dont l'une a les propriétés antigéniques de la Lp(a), constitue un facteur de risque supplémentaire du développement d'une athérosclérose coronarienne sévère, même en l'absence de toute autre hyperlipoprotéinémie.

TRAVAUX PERSONNELS

BUS LILLE

ANALYSE QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES

ETABLISSEMENT D'UN BILAN LIPIDIQUE

-=-=-=-=-

I N T R O D U C T I O N

La classification des hyperlipémies telle qu'elle a été proposée par FREDRICKSON a représenté un réel progrès, en permettant d'adapter la thérapeutique diététique ou médicamenteuse à chaque type d'hyperlipoprotéinémie.

Néanmoins, les méthodes de typage qui sont à la base de cette classification sont imparfaites et, en particulier, le lipoprotéinogramme sur papier en tampon albumineux ne permet pas une analyse différentielle parfaite des lipoprotéines plasmatiques.

Comme il est, de plus, intéressant de pouvoir estimer l'importance des lipoprotéines de basse et de très basse densités, de nombreuses tentatives ont été faites pour les apprécier quantitativement dans le plasma. L'ultracentrifugation reste la méthode de référence ; nous en avons déjà rapporté la complexité. La mise au point de techniques simples, reproductibles, facilement accessibles à tout laboratoire de biochimie clinique était donc souhaitable.

Deux nouvelles méthodes d'analyse des lipoprotéines sont présentées dans ce travail :

- la première est une adaptation de techniques antérieurement proposées par d'autres auteurs (74 , 90) ; elle fait appel à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration et permet une séparation fine des différentes classes de lipoprotéines (174),

- la seconde, très simple, utilise la précipitation sélective par les polyanions et les détergents, deux tests décrits par BURSTEIN (39 , 42), pour apprécier quantitativement les LDL et VLDL. Elle permet le dépistage, le typage simplifié et la surveillance des hyperlipémies.

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

A/ INTRODUCTION

L'analyse qualitative précise des différentes classes de lipoprotéines plasmatiques fait appel soit à l'ultracentrifugation, soit beaucoup plus couramment à l'électrophorèse de zone.

Dans la revue générale, la valeur de chacun des supports classiquement utilisés pour la séparation électrophorétique des lipoprotéines a été mise en cause. Elle est très inégale et aucun d'entre eux n'est recommandable sans restriction pour aider au typage d'une hyperlipémie (81) ; par contre, l'apport de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est indiscutable. En effet, méthode simple et rapide, elle permet une parfaite séparation des lipoprotéines et fournit des informations comparables à celles obtenues par l'ultracentrifugation (80 , 103).

Le gel de polyacrylamide est le support idéal pour le typage des hyperlipémies.

Polymère synthétique, il est mieux défini et sa concentration peut être parfaitement standardisée. En faisant varier la quantité des constituants de base dans le mélange, on peut jouer sur la taille des pores du gel et effectuer ainsi un tamisage moléculaire des macromolécules à fractionner.

De plus, l'effet d'électro-endosmose généralement observé avec les autres supports est pratiquement inexistant.

La technique d'électrophorèse que nous présentons utilise un gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration (29, 57, 174). Elle est basée sur la précoloration des lipoprotéines par le nitrobleu de tétrazolium selon SEGAL et coll. (171) et sur leur séparation dans un tube contenant trois gels superposés : gel intermédiaire (A), gel de concentration (B) et gel de séparation (C).

B/ MATERIEL ET METHODES

a) - Sérums

Nous avons utilisé des sérums normo et hyperlipémiques provenant de la Consultation des Maladies Métaboliques (Professeur JAILLARD) de la Clinique Médicale générale A (Cité Hospitalière - Lille).

Les échantillons de sang sont prélevés après 12 heures de jeûne et recueillis sur EDTA. Après centrifugation, les sérums sont analysés le jour même ou le lendemain.

b) - Coloration des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont précolorées par le nitrobleu de tétrazolium (NBT) (Sigma).

A 100 µl de sérum on ajoute successivement :

- 50 µl d'une solution aqueuse de NBT à 3 mg/ml,
- et 50 µl d'une solution aqueuse de nicotinamide-adénine-dinucléotide sous forme réduite (NADH) (Boehringer) à 10 mg/ml.

Après mélange, la réduction du NBT (coloration bleue violacée) s'obtient en ajoutant approximativement 10 µg de méthosulfate de phénazine (Sigma).

Le sérum ainsi précoloré peut être conservé pendant 24 heures.

c) - Appareillage

Nous utilisons l'appareillage Canalco "Quick disc" modèle 1200. La séparation des lipoprotéines s'effectue le long d'une petite colonne de gel supportée par des tubes de verre de 75 mm de long, 7 mm de diamètre extérieur et 5 mm de diamètre intérieur.

d) - Réactifs

Différentes solutions tamponnées (tableau 4 page 106) sont préparées à partir de Tris 2 M (242 g/l), d'HCl 1 N, de glycocolle 0,5 M (37,5 g/l) et de TEMED (N, N, N', N', tétraéthyléthylène-diamine) ; elles se conservent 3 mois à + 4° C.

La solution (a) est utilisée pour préparer, par dilution au 1/5 avec de l'eau distillée, le tampon d'électrophorèse. Conservé à 4° C, ce tampon peut être utilisé pendant une semaine à raison de 2 migrations par jour.

La composition d'autres solutions est donnée dans le tableau 5 page 107 . Elles sont conservées à + 4° C et ramenées à température ambiante avant d'être mélangées en proportions déterminées pour obtenir les solutions de gels.

Les solutions de gels A, B et C sont préparées juste avant l'emploi. Le tableau 6 page 108 en donne les compositions.

TABLEAU 4

SOLUTIONS TAMPONNEES UTILISEES POUR L'ELECTROPHORESE (a)
ET POUR LA PREPARATION DES GELS (b) (c) (d)
(conservation 3 mois à + 4° C)

SOLUTIONS		a (°)	b	c	d
pH ajusté à		8,3	6,7	6,7	8,9
TRIS 2 M	(ml)	25	25	50	150
HCl 1 N	(ml)	-	48	96	48
GLYCOCOLLE 0,5 M	(ml)	768	-	-	-
TEMED	(ml)	-	0,46	0,92	0,23
EAU DISTILLEE	q.s.p.	1000	200	200	200

(°) : à diluer au 1/5 pour usage.

BUS LILLE

TABLEAU 5

SOLUTIONS "REACTIFS" UTILISEES POUR LA PREPARATION DES GELS

(conservation à + 4° C)

SOLUTIONS	e (°)	f (°)	g (°)	h	i	j
ACRYLAMIDE (°°) (g)	12	13	8	-	-	-
BISACRYLAMIDE (°°) (g)	0,6	0,5	2	-	-	-
RIBOFLAVINE (mg)	-	-	-	4	-	-
SACCHAROSE (g)	-	-	-	-	80	-
PERSULFATE D'AMMONIUM (mg)	-	-	-	-	-	140
EAU q.s.p. (ml)	100	100	100	100	100	100

(°) : dissoudre sous agitation magnétique et filtrer.

(°°) : APELAB 92 - BAGNEUX

BUS LILLE

TABLEAU 6

SOLUTIONS DE GELS A PREPARER JUSTE AVANT L'EMPLOI

(en volumes)

SOLUTIONS	GEL A	GEL B	GEL C
b	-	1	-
c	1	-	-
d	-	-	1
e	-	-	1
f	-	1	-
g	1	-	-
h	-	1	-
i	-	1	-
j	2	-	2
TOTAL	4	4	4

BUS LILLE

e) - Préparation du support d'électrophorèse

Les gels sont successivement coulés et polymérisés à raison de :

. 0,7 ml de solution C pH 8,9 et 3 % (p/v) d'acrylamide.
La polymérisation est obtenue en 30 minutes sous l'effet catalytique du persulfate d'ammonium,

. 0,1 ml de solution E pH 6,7 et 3,25 % (p/v) d'acrylamide.
La polymérisation s'opère en 30 minutes sous éclairage artificiel intense, le catalyseur employé étant dans ce cas une solution de riboflavine

. 0,1 ml de solution A pH 6,7 et 2 % (p/v) d'acrylamide.
La polymérisation est obtenue comme pour celle de la solution C.

Dans les trois cas, une goutte d'eau est déposée avec précaution, en évitant tout mélange, au-dessus de la solution pour éviter la formation d'un ménisque lors de la polymérisation ; cette goutte d'eau doit être éliminée par absorption sur papier filtre avant l'introduction de la solution suivante.

f) - Electrophorèse proprement dite

Après avoir déposé 20 µl de sérum précoloré à la surface du gel A, les tubes sont disposés verticalement dans la cellule d'électrophorèse ; du tampon est ajouté lentement au-dessus du dépôt précoloré puis jusqu'au sommet du tube.

Environ 200 et 800 ml de tampon froid (4° C) sont versés dans les parties haute et basse respectivement de la cuve. L'électrophorèse se poursuit en moyenne pendant 40 minute

à raison de 5 mA par tube de gel (intensité constante). La migration est arrêtée lorsque la bande correspondant aux alphalipoprotéines (HDL) se situe à quelques millimètres de l'extrêmité du tube.

C/ RESULTATS

Sur ce support, les fractionnements se font en fonction de la charge électrique et de la taille moléculaire. De ce fait les chylomicrons s'individualisent parfaitement et les bêta-lipoprotéines migrent plus loin que les pré-bêta, comme l'indique le schéma de la figure 15 page 111 .

La figure 15 page 111 objective la migration des différentes classes de lipoprotéines :

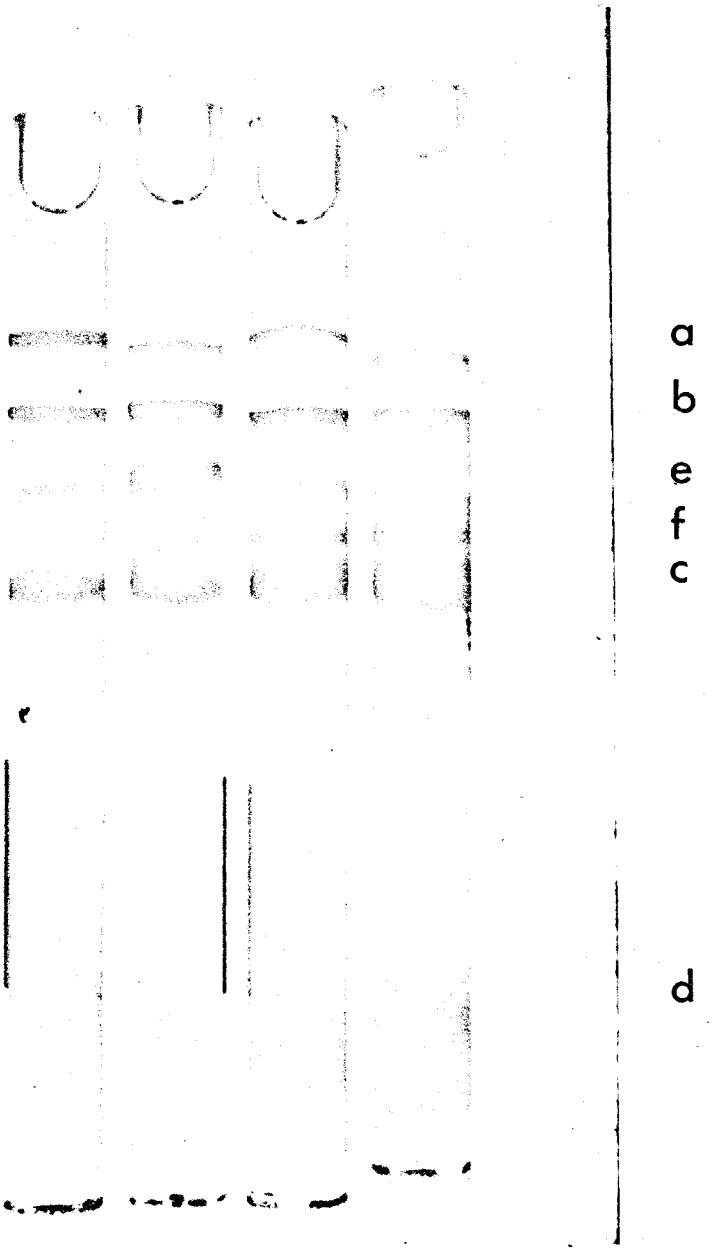
- le gel A est imperméable aux chylomicrons,
- le gel B bloque la migration des VLDL qui, après avoir traversé le gel A, se localisent à la limite supérieure du gel B en une bande plus ou moins étalée mais nettement définie,
- le gel C fractionne les autres lipoprotéines : les LDL forment une bande principale parfaitement séparée des VLDL et la bande diffuse située au voisinage de l'anode correspond aux HDL.

La puissance du pouvoir séparateur de cette méthode d'électrophorèse est démontrée par la mise en évidence de bandes intermédiaires :

- Dans certains sérums riches en VLDL, on note en effet une bande supplémentaire siègeant juste au-dessous des VLDL et correspondant sans doute à la fraction "U" décrite par MEAD et coll. (135). Il s'agirait de VLDL de taille moléculaire plus petite, et donc des lipoprotéines intermédiaires se formant lors du catabolisme des VLDL en LDL (IDL).

FIGURE 15

LIPIDOGRAMMES EN GRADIENT DISCONTINU D'ACRYLAMIDE



a: CHYLOMICRONS
b: VLDL
c: LDL
d: HDL
e: IDL
f: $L_p(a)$

BUS LILLE

- Une autre bande additionnelle, très colorée, située juste au-dessus des LDL est observée dans de nombreux sérums. Isolée par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide selon un procédé original décrit ultérieurement, cette lipoprotéine particulière est caractérisée par des méthodes immunologiques et identifiée à la Lp(a) ou "sinking pre-beta-lipoprotein" décrite par BERG en 1963 (12).

L'usage du gel de polyacrylamide permet en outre l'identification du type III de FREDRICKSON (figure 16 page 113) sans qu'il soit nécessaire de compléter le diagnostic par l'ultracentrifugation. On note, en effet, dans ce cas, le contraste entre le taux de cholestérol supérieur à la normale et la quasi disparition de la bande des LDL, alors que celles des VLDL et surtout des IDL sont anormalement marquées. Ceci est dû au fait que le type III se caractérise par la présence dans le sérum d'une lipoprotéine anormale s'apparentant, du point de vue de la taille moléculaire, aux VLDL mais ayant sur papier ou agarose, une migration électrophorétique de type bêta.

D/ CONCLUSION

- L'emploi du gel de polyacrylamide à gradient de concentration comme support d'électrophorèse rend l'interprétation du lipidogramme beaucoup plus spécifique.

- L'excellente séparation des chylomicrons exogènes et des lipoprotéines endogènes (ou VLDL) prévient toute confusion entre les types IV et V et rend la méthode nettement supérieure à celle qui utilise l'acétate de cellulose. Le gel de polyacrylamide se révèle être un support de choix pour la résolution des sérums lactescents.

FIGURE 16

LIPIDOGRAMMES EN GRADIENT DISCONTINU D'ACRYLAMIDE

MISE EN EVIDENCE DE LA LIPOPROTEINE DE TYPE III

A : SERUM NORMAL

B : SERUM DE TYPE III

a : CHYLOMICRONS
b : VLDL
c : LDL
d : HDL
e : IDL

BUS LILLE

- La qualité de l'individualisation des LDL et des VLDL présente un énorme avantage, permettant de diagnostiquer sans ambiguïté un type III.

- D'autre part, ce support permet la mise en évidence de lipoprotéines particulières telle la Lp(a).

Migrant en position pré-bêta sur les supports classiques (155), elle est ici parfaitement séparée et cette constation éclaire d'un jour nouveau les observations de sérums normotriglycéridémiques avec pré-bêta augmentées sur les supports classiques (80).

- L'excellente résolution des principales classes de lipoprotéines et l'individualisation de la Lp(a) obtenues par l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide selon le protocole que nous venons de décrire nous a suggéré la mise au point d'un appareil préparatif utilisant le même support et dont la description et la technologie seront rapportées ultérieurement.

ESTIMATION SEMI-QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES DE BASSE DENSITE

A/ INTRODUCTION

De nombreuses tentatives ont été faites pour doser les lipoprotéines.

L'ultracentrifugation de flottation est à nouveau citée comme méthode de référence.

La détermination densitométrique à partir du lipidogramme est largement utilisée. De réalisation simple, elle n'est cependant pas exacte et deux objections majeures peuvent être faites :

- la première a déjà été mentionnée : il s'agit de la "valeur qualitative" du lipidogramme sur agarose ou acétate de cellulose, ces deux supports se prêtant le plus volontiers à l'intégration ;
- la deuxième pose le problème de la quantité variable de colorant fixée par chaque classe de lipoprotéines.

Arguant du fait que la richesse en cholestérol d'un type donné de lipoprotéines est relativement constante, son dosage dans les différentes fractions séparées selon divers moyens (ultracentrifugation, précipitation chimique ....) permet une quantification indirecte. Cependant une excellente technique de dosage du cholestérol s'impose.

Les méthodes basées sur les principes que nous venons de citer sont, pour la plupart, longues et difficilement applicables.

Depuis les travaux de BURSTEIN et SCHOLNICK (41), la validité des méthodes de précipitation sélective des lipoprotéines est unanimement reconnue.

Nous décrivons dans ce travail (78) une technique simple et reproductible d'appréciation quantitative des lipoprotéines de basse densité. Elle comporte deux tests turbidimétriques décrits par BURSTEIN et coll. : le test à l'héparine-calcium qui apprécie l'ensemble LDL - VLDL - chylomicrons (39), et le test au dodécyl-sulfate de sodium (SDS) qui apprécie l'ensemble VLDL - chylomicrons (42).

B/ MATERIEL ET METHODES

a) - Sérums

Nous avons utilisé des sérums de sujets normaux provenant du Centre de Transfusion Sanguine de LILLE, du Service de Pédiatrie Néonatale, du Service de Gériatrie et de la Consultation des Maladies Métaboliques de la Clinique Médicale générale A (Cité Hospitalière - Lille).

Les échantillons de sang sont prélevés après 12 heures de jeûne, et les sérums sont traités le jour même ou le lendemain.

b) - Réactifs

Quatre réactifs sont utilisés en solution aqueuse :

- solution I : chlorure de calcium 0,025 M (Merck),
- solution II : chlorure de sodium à 3 % (p/v),
- solution III : héparinate de sodium à 1 % (p/v) (Prolabo),
- solution IV : SDS à 10 % (p/v) (Labosi).

c) - Appareillage (figure 17 page 118)

Un turbidimètre mis au point par le Centre de Technologie Biomédicale de l'I.N.S.E.R.M. (directeur Y. MOSCHETTO) permet de standardiser les résultats entre les différents laboratoires.

Il est constitué d'une cellule de lecture uniquement composée d'éléments électroniques solides ; la source émettrice stabilisée est une diode électroluminescente X G 554 émettant à 697 nanomètres. Le récepteur est un phototransistor BP X 81. La source lumineuse est commandée par une horloge qui pilote simultanément un redressement synchrone. Ce montage très stable évite tout parasitage lumineux.

Les turbidités sont lues directement sur le cadran en unités Shank et Hoagland (USH). Les réponses de l'appareil sont linéaires entre 0 et 20 USH, points de préétalonnage de l'instrument qu'une grille spéciale permet de vérifier. Au-delà les indices turbidimétriques évoluent de façon logarithmique, avec une courbure plus ou moins accusée selon la composition du sérum en lipoprotéines et le test utilisé.

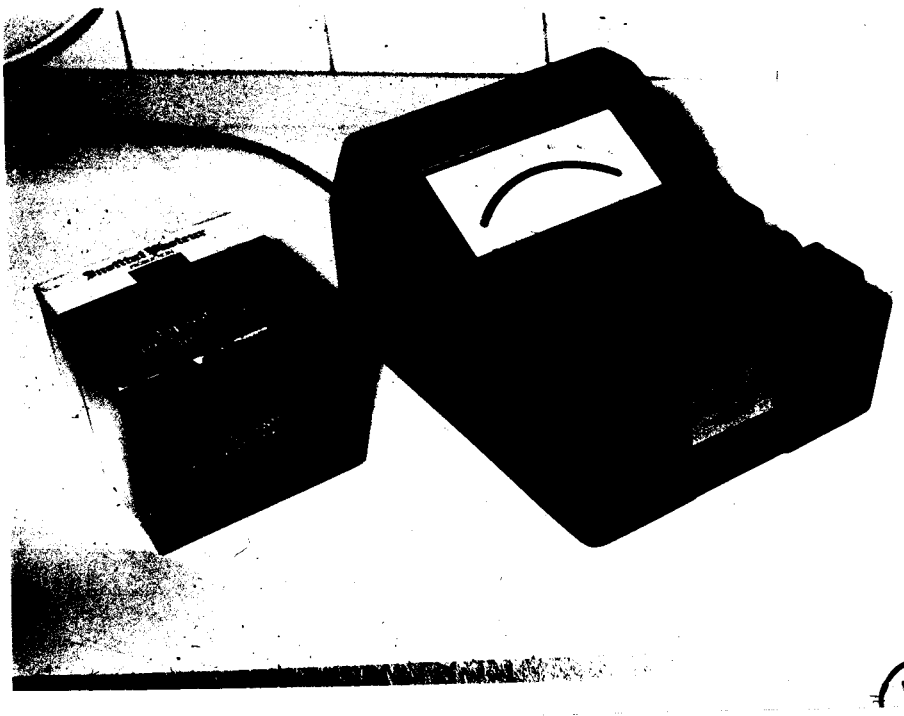
L'ensemble turbidimètre et réactifs est commercialisé par l'Institut Pasteur sous le nom de Lipidotest (marque déposée).

d) - Méthodes

Les différents apports de sérum et de réactifs se font directement dans des cuves de lecture en matière plastique conformément aux données du tableau 7 page 119 .

FIGURE 17

BIOTURBIDIMETRE LIPIDOTEST



BUS LILLE

TABLEAU 7

.....

ESTIMATION TURBIDIMETRIQUE DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Héparine-Ca : LDL - VLDL - chylomicrons

SDS : VLDL - chylomicrons

TEST	HEPARINE-Ca	SDS
Réactif I	2 ml	-
Réactif II	-	1,5 ml
Sérum	0,2 ml	0,5 ml
	Mélange, lecture ⟶ T_1 (°)	
Réactif III	40 µl	-
Réactif IV	-	50 µl
	Mélange, lecture après 4 min. ⟶ T_2	Mélange, lecture après 1h au B.M.37°C ⟶ T_2
Calculer	$T_2 - T_1$	$T_2 - T_1$

BUS LILLE

(°) : mesure facultative, ne doit jamais être prise en considération en cas de sérum lipémique.

T_1 mesure l'absorbance avant précipitation des lipoprotéines, elle est négligeable pour la grande majorité des sérums.

La différence $T_2 - T_1$ apprécie la teneur en lipoprotéines spécifiquement floculées, mais, en cas de chylomicronémie créant une turbidité de base incluse dans T_1, il convient de ne pas tenir compte de T_1.

Lorsque les turbidités T_2 sont importantes, il est possible de refaire les mesures après dilution du sérum, avec du sérum physiologique pour le test à l'héparine-calcium et avec un sérum normal pauvre en VLDL pour le test au SDS ; dans ce dernier cas en effet la précipitation nécessite la présence d'un facteur sérique thermolabile (41).

C/ RESULTATS

a) - Etude de la fiabilité des turbidimètres

Afin d'apprécier la fiabilité des turbidimètres, 120 tests sont réalisés sur six appareils différents (29 , 78)

L'analyse de la variance dans différentes zones de turbidité montre que les réponses des divers appareils ne diffèrent pas significativement pour les turbidités supérieures à 10 unités Shank et Hoagland.

Par contre, dans la zone inférieure à 10 USH, les réponses peuvent varier d'un appareil à l'autre du fait de la faiblesse de l'intensité du trouble développé.

Ces variations n'ont, en fait, que peu d'importance d'abord parce que cette zone correspond à des sujets normolipé-

miques, ensuite parce que les résultats sont d'autant plus concordants que la turbidité est plus importante, comme on peut le constater sur le tableau suivant.

Etude de la fiabilité des turbidimètres

(6 appareils testés simultanément dans différentes zones de turbidité)

comparaison des 6 moyennes par l'analyse de la variance (test F

Zones (USH)	Sérums testés (6 appareils)	F	F critique (point 5 %)
0 - 10	44	4,7*	2,21
10 - 20	39	1,8**	2,21
20	57	0,1**	2,21

* : différences significatives entre les 6 appareils
** : différences non significatives entre les 6 appareils

b) - Etude de la répétabilité des méthodes

En effectuant 30 déterminations sur des sérums normaux ou pathologiques (29 , 78), nous avons pu constater que la répétabilité des méthodes proposées était bonne.

Dans le cas du test à l'héparine - calcium, le coefficient de variation (CV) est de l'ordre de 0,9 % en zone normale (17 USH) ; pour le test au SDS il est de 2,4 % en zone normale (11 USH) et de 1 % en zone pathologique (30 USH).

Etude de la répétabilité des tests de turbidité

(moyenne des 30 mesures effectuées en zones normale et pathologique)

	Moyenne (USH)	Ecart-type (USH)	C.V. en %
Test à l'héparine calcium	17 35	0,16 0,21	0,9 0,6
Test au SDS	11,3 30,7	0,27 0,3	2,4 1

c) - Correspondance entre les turbidités mesurées et les quantités correspondantes de lipoprotéine (57 , 76 , 79)

Une première étude effectuée sur 143 sérums normo et hypertriglycéridémiques (0,5 à 9 g/l) est menée dans le but d'établir la corrélation entre les valeurs SDS mesurées dans la zone linéaire de réponse de l'appareil (sérum éventuellement dilué) et les taux de triglycérides totaux dont on sait qu'ils sont essentiellement déterminés par la concentration en VLDL et en chylomicrons. Le tableau 8 et la figure 18 montrent que la liaison est étroite et que les valeurs SDS peuvent être considérées comme des indices VLDL.

Pour définir un indice représentatif de la teneur sérique en LDL, nous réalisons, sur 5 sérums différents, l'étude dont le protocole est schématisé dans le tableau 9 page 125 . Les résultats obtenus figurent sur le tableau 10 page 126 ; ils permettent de conclure que la différence (héparine-calcium-SDS) est assimilable à un indice représentatif des concentrations sériques en LDL.

TABLEAU 8

ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES INDICES TURBIDIMETRIQUES ET LES TAUX DE LIPIDES DES LIPOPROTEINES

	INDICE VLDL (143 valeurs : Fig.)	INDICE LDL (47 valeurs : Fig.)
Régression de y en x	$y_1 = 0,11\ x_1 + 0,66$	$y_2 = 0,073\ x_2 + 0,29$
Dispersion : s_{yx}	0,59	0,42
Coefficient de détermination : r^2	0,810	0,735
Coefficient de corrélation : r	0,900	0,875
Limites de confiance à p = 0,05	$0,863 < p < 0,928$	$0,783 < p < 0,930$

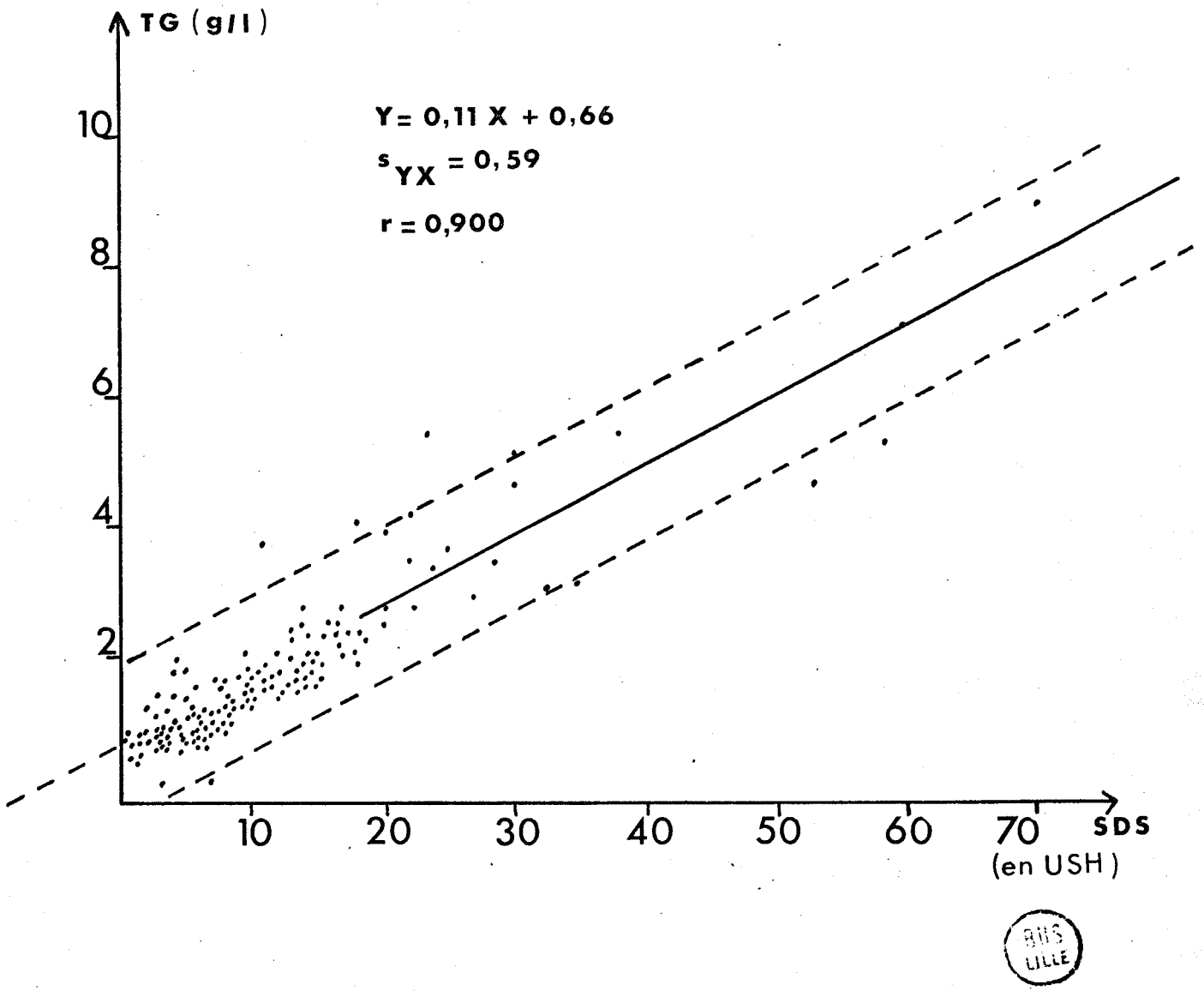
x_1 : valeur SDS	x_2 : valeur (Héparine-Ca-SDS)
y1 : triglycérides totaux (g/l)	y_2 : cholestérol LDL (g/l)

BUS LILLE

FIGURE 18

VALEURS SDS MESUREES ET TAUX DE TRIGLYCERIDES TOTAUX

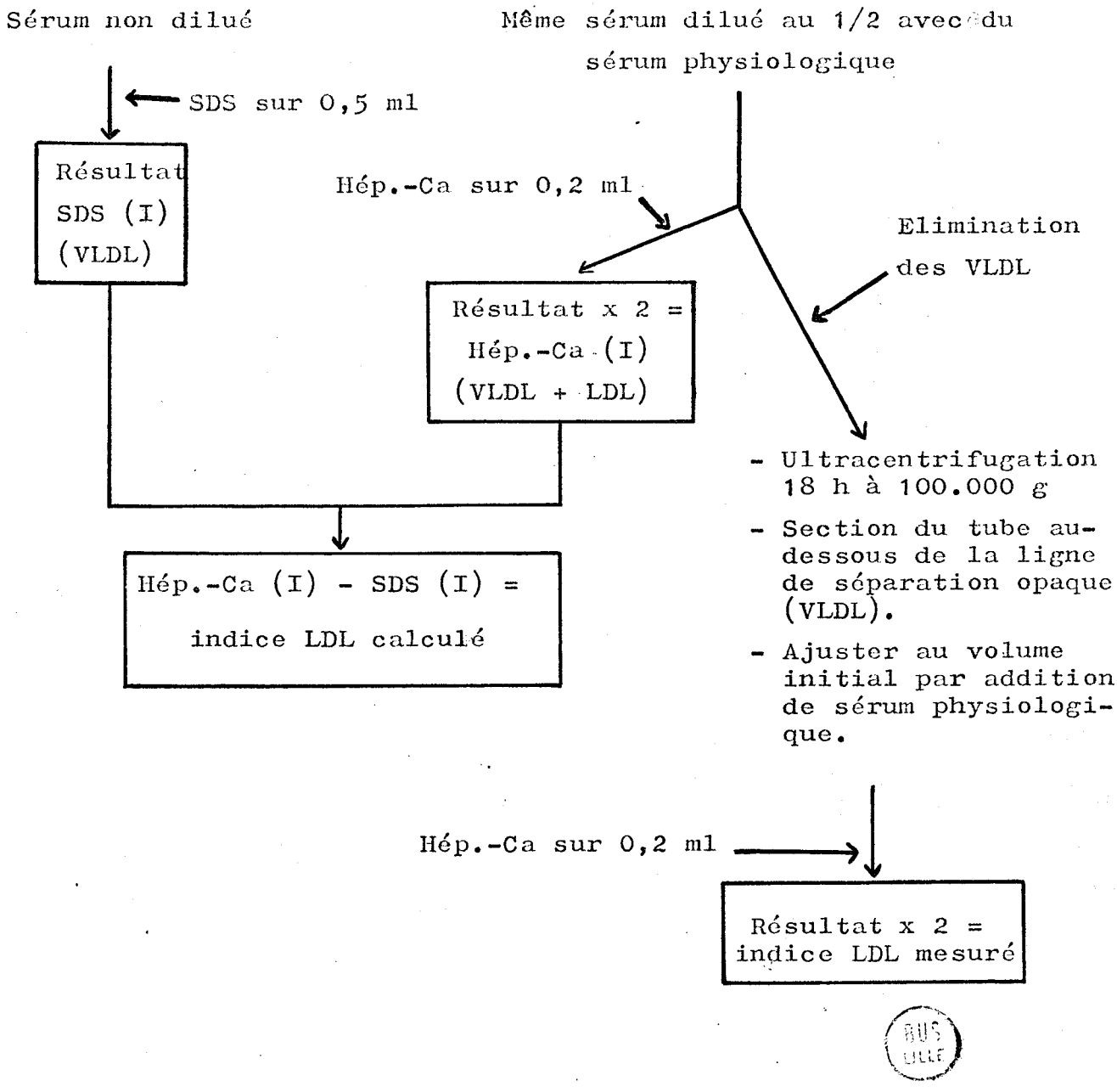
(Régression de Y en X)



BIU LILLE

TABLEAU 9

PROTOCOLE D'ETUDE D'UN INDICE LDL



BUS LILLE

TABLEAU 10

ETUDE COMPAREE DES DETERMINATIONS DIRECTE (II) ET INDIRECTE (I) DE L'INDICE LDL

S U J E T S	1	2	3	4	5	m ± s	Signification (°) t	Signification (°) p
(I) Sérum non traité								
. Héparine - Ca	19	21	22	22	19			
. SDS	10	11	9	11	7			
. Indice LDL (Hépar.-Ca - SDS)	9	10	13	11	12	11 ± 1,6	0,88	NS
(II) Sérum sans VLDL (°°)								
. Indice LDL (Héparine-Ca)	11	11	14	12	11	11,6 ± 1,5		

(°) : test t de STUDENT-FISHER pour séries appariées.

(°°) : VLDL éliminées par ultracentrifugation.

SDS (I) : mesures sur 0,5 ml de sérum

Hép.Ca (I) : mesures sur 0,2 ml de sérum

Hép.Ca (II) : mesures sur 0,2 ml de sérum reconstitué en volume après élimination de la fraction contenant les VLDL.

BHS LILLE

Pour confirmer ces résultats, nous montrons, à partir de 47 sérums normo et hypercholestérolémiques de tous types (tableau 8 page 123 et figure 19 page 128) que ces turbidités différentielles (héparine-calcium-SDS) sont étroitement liées au taux de cholestérol (0,7 à 4 g/l) des LDL déterminé après fractionnement des lipoprotéines selon la méthode de WILSON (204), et dosage du cholestérol (28 , 77) (appendice technique, pages 193 et 201).

On peut donc considérer que le test au SDS fournit dans les conditions expérimentales utilisées un indice de turbidité représentatif de la teneur du sérum en VLDL ou VLDL + chylomicrons alors que la différence (test héparine - test SDS) définit un indice représentatif des concentrations en LDL.

d) - Valeurs normales

A partir de 500 sérums normolipémiques provenant de sujets à jeun apparemment normaux, nous définissons les valeurs moyennes de référence de deux indices en fonction de l'âge et du sexe (figures 20 et 21 pages 129 et 130).

On constate que la teneur en LDL et en VLDL, très faible chez le nouveau-né, augmente avec l'âge dans les deux sexes, mais de façon plus accusée chez la femme après la ménopause.

e) - Applications cliniques

- Application au dépistage des hyperlipoprotéinémies

Une méthode de dépistage doit répondre à trois critères : elle doit être d'exécution rapide, fournir un maximum de renseignements et être peu coûteuse.

Le dosage des lipides totaux généralement utilisé pour dépister les hyperlipémies répond aux deux derniers critères mais n'offre qu'un intérêt limité. En effet les méthodologies sont encore en question et les valeurs de référence généralement mal définies.

FIGURE 19

VALEURS HEP.Ca-SDS CALCULEES

ET TAUX DE CHOLESTEROL DES LDL

(Régression de Y en X)

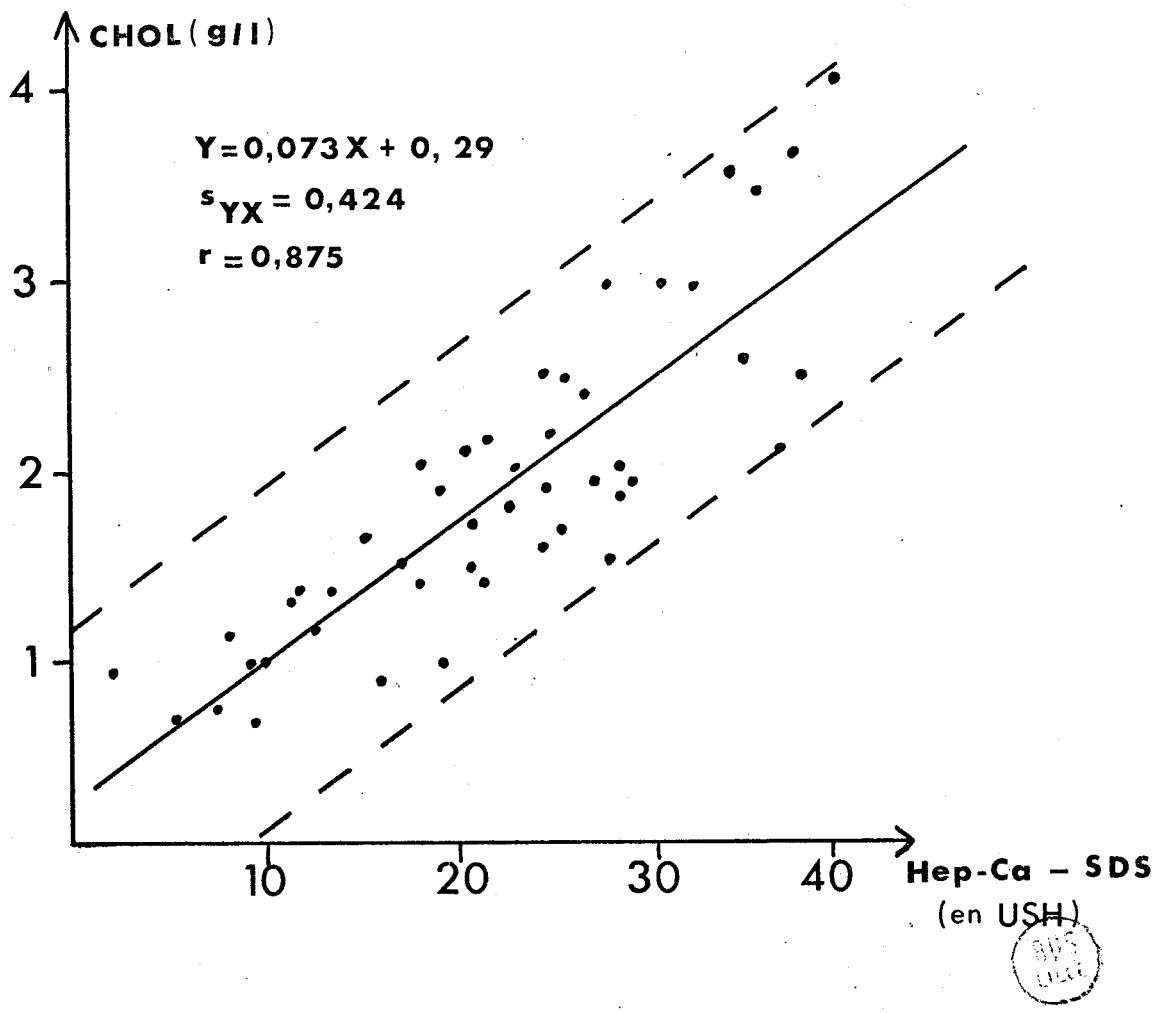
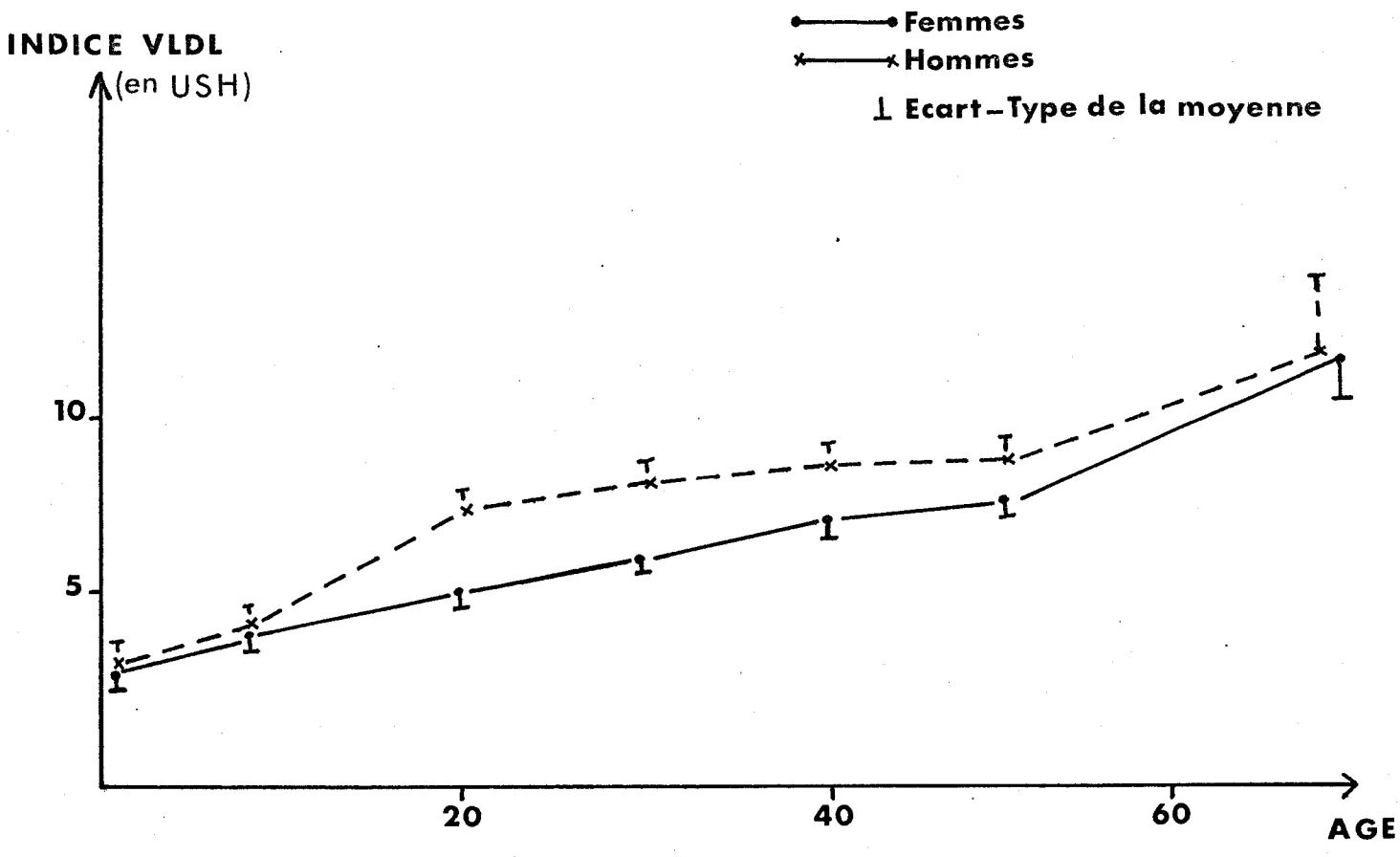


FIGURE 20

VALEURS MOYENNES DE REFERENCE DE L'INDICE VLDL

SELON L'AGE ET LE SEXE

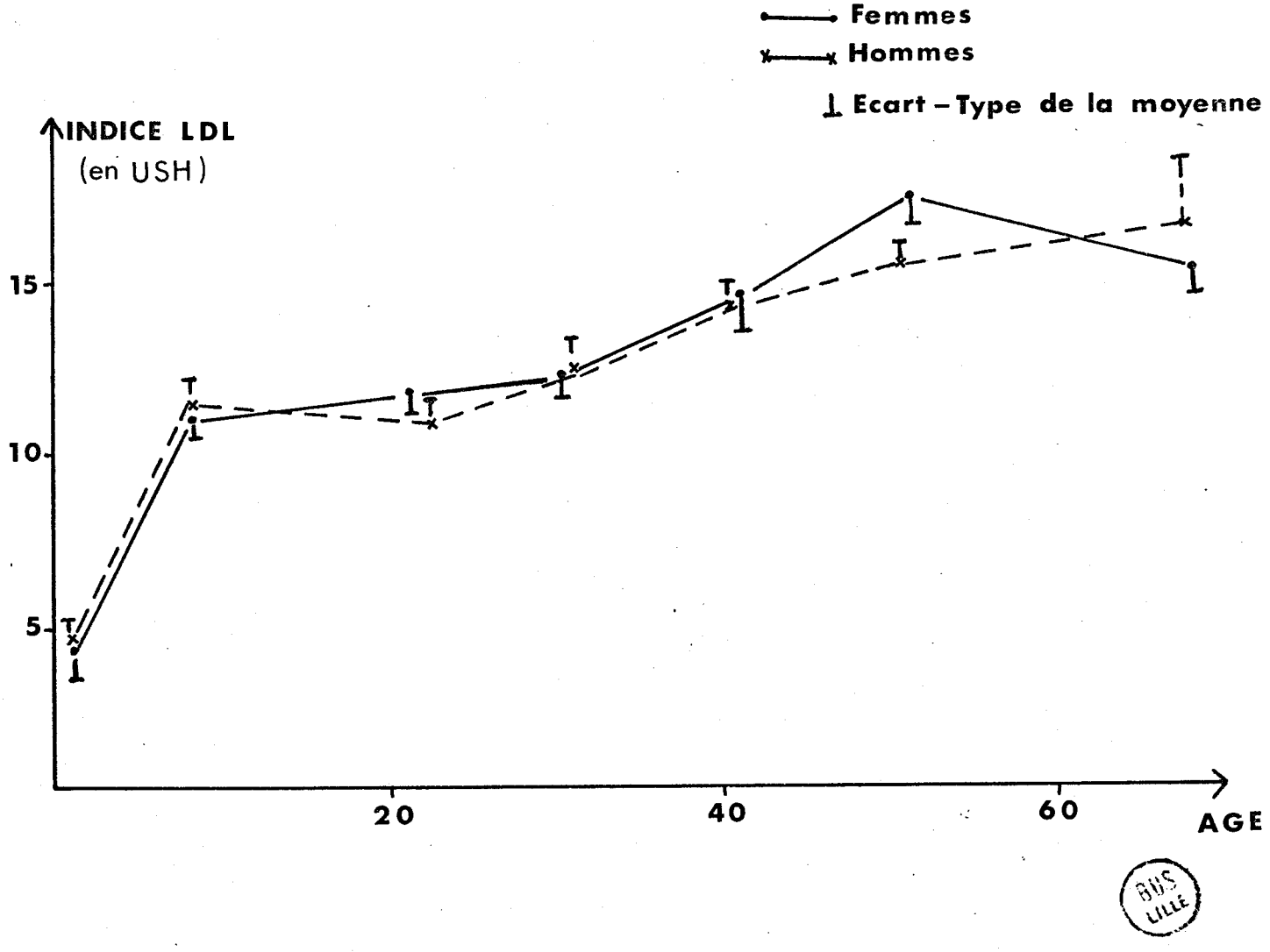


BUS LILLE

FIGURE 21

VALEURS MOYENNES DE REFERENCE DE L'INDICE LDL

SELON L'AGE ET LE SEXE



BUS LILLE

Le dosage couplé du cholestérol et des triglycérides est indispensable pour typer une hyperlipémie, mais son utilisation en tant que méthode de dépistage s'avère onéreuse. De plus, les taux varient en fonction de la méthode utilisée, de l'âge et du sexe. Il importe donc que chaque laboratoire précise ses valeurs de référence en tenant compte de ces paramètres, ce qui est rarement fait en pratique biologique courante.

La méthode que nous proposons permet de faire très rapidement et très simplement l'appréciation quantitative des lipoprotéines de basse et très basse densités. Elle présente l'avantage de quantifier non plus les lipides qui sont répartis dans toutes les classes de lipoprotéines mais les lipoprotéines elles-mêmes. En outre, la mise au point d'un appareil assurant la standardisation des résultats nous permet de définir, une fois pour toutes, les valeurs de référence pour chacun des tests proposés en fonction de l'âge et du sexe.

- Application au typage simplifié des hyperlipoprotéinémies

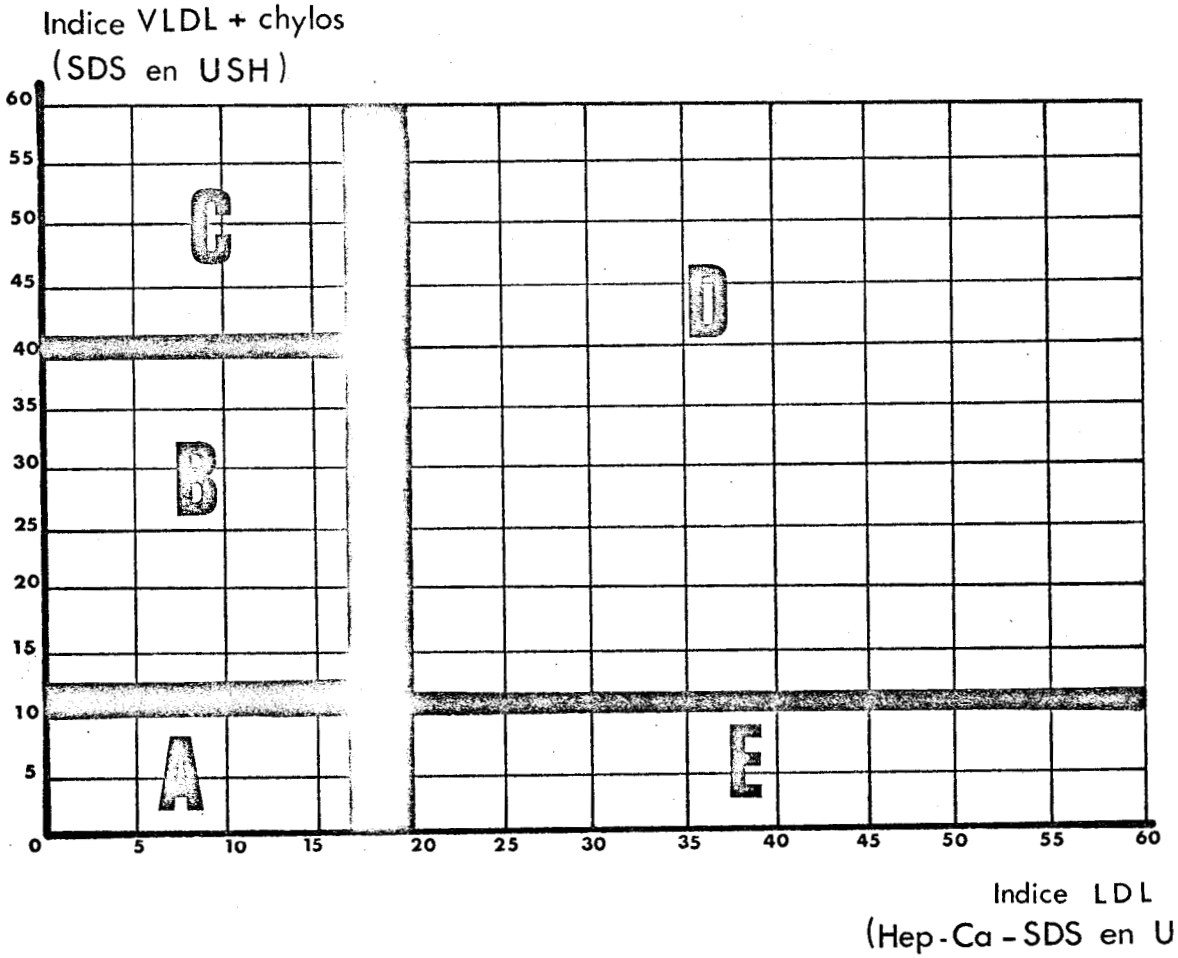
Lorsque l'hyperlipémie est dépistée le "lipidotest" en fournit un typage simplifié.

A l'aide de méthodes de référence concernant le dosage des triglycérides (110), le dosage enzymatique du cholestérol (28 , 77) et le lipidogramme sur gel de polyacrylamide (174) et en analysant 500 sérums normo et hyperlipémiques typés selon les critères de la classification internationale, nous établissons un nomogramme reliant les deux indices turbidimétriques au type d'hyperlipoprotéinémie (figure 22 page 132).

Le chevauchement (zones d'incertitude) entre les plages ainsi délimitées est minime et le pourcentage d'erreur n'est en moyenne que de 5 %.

FIGURE 22

INDICES TURBIDIMETRIQUES ET TYPAGE SIMPLIFIE DES HYPERLIPEMIES



CORRESPONDANCE DES ZONES

A Sujet normolipoprotéinémique

B Sujet porteur d'une hyperpré-β LP (↗ des VLDL)
hyperlipémie assimilée au type IV de la classificatio
internationale

C Sujet porteur d'une hyperpré-β LP (↗ des VLDL) avec chylomicronémie
hyperlipémie assimilée au type V

D Sujet porteur d'une hyperpré-β LP (↗ des VLDL)
et d'une hyper-βLP (↗ des LDL)
hyperlipémie assimilée au type II_B

E Sujet porteur d'une hyper-β LP (↗ des LDL)
hyperlipémie assimilée au type II_A

BHS LILLE

Toute augmentation isolée de l'indice LDL traduit une hyper-bêta-lipoprotéinémie (type II_A).

Toute augmentation isolée de l'indice VLDL traduit, suivant l'importance de la variation, une hyper-pré-bêta-lipoprotéinémie (type IV) ou une association avec une hyperchylomicronémie (type V).

L'accroissement simultané des deux indices traduit une hyperlipoprotéinémie mixte (type II_B).

Les hyperlipémies de type III non traitées se localisent, en général, dans la zone s'apparentant au type IV, bien que le taux de cholestérol total soit élevé ; en effet, la lipoprotéine anormale du type III est précipitée avec les VLDL par le SDS et il en résulte une augmentation de l'indice VLDL associée à une diminution de l'indice LDL. Cette orientation diagnostique doit cependant être confirmée par des méthodes plus précises.

Enfin, les sérums normaux contenant une forte quantité de Lp(a) qui est précipitable par l'héparine-calcium mais pas par le SDS, se localisent en général entre la zone de normolipoprotéinémie et celle de l'hyper-bêta-lipoprotéinémie.

Le typage simplifié ainsi obtenu n'a qu'une valeur d'orientation. Il nous permet néanmoins de distinguer l'hypertriglycéridémie majeure (type IV), l'hypercholestérolémie essentielle (type II_A) et l'hyperlipémie mixte (type II_B).

Cette distinction, selon De GENNES (84), suffit le plus souvent en biologie clinique courante et en thérapeutique.

- Application à la surveillance des dyslipémies

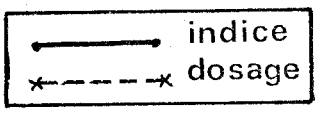
La contraception orale s'accompagne parfois de perturbations du métabolisme des lipides sériques et on a noté une augmentation des accidents cardio-vasculaires à la suite de la prise de contraceptifs oraux.

D'autre part, tout sujet dyslipémique traité par la diététique ou par une médication hypolipémiante doit être régulièrement suivi sur le plan lipidique.

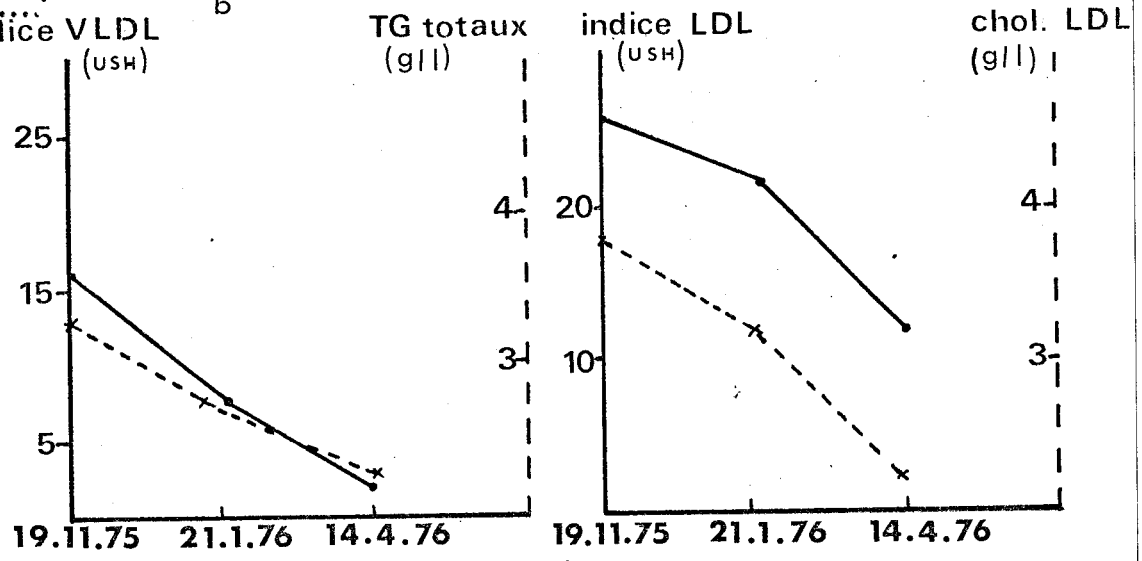
Une fois le typage établi, l'estimation turbidimétrique des lipoprotéines de basse et de très basse densités peut être utilisée avec profit comme test de surveillance pour suivre l'évolution sous l'effet du régime alimentaire ou de la thérapeutique mise en oeuvre (figure 23 page 135).

FIGURE 23

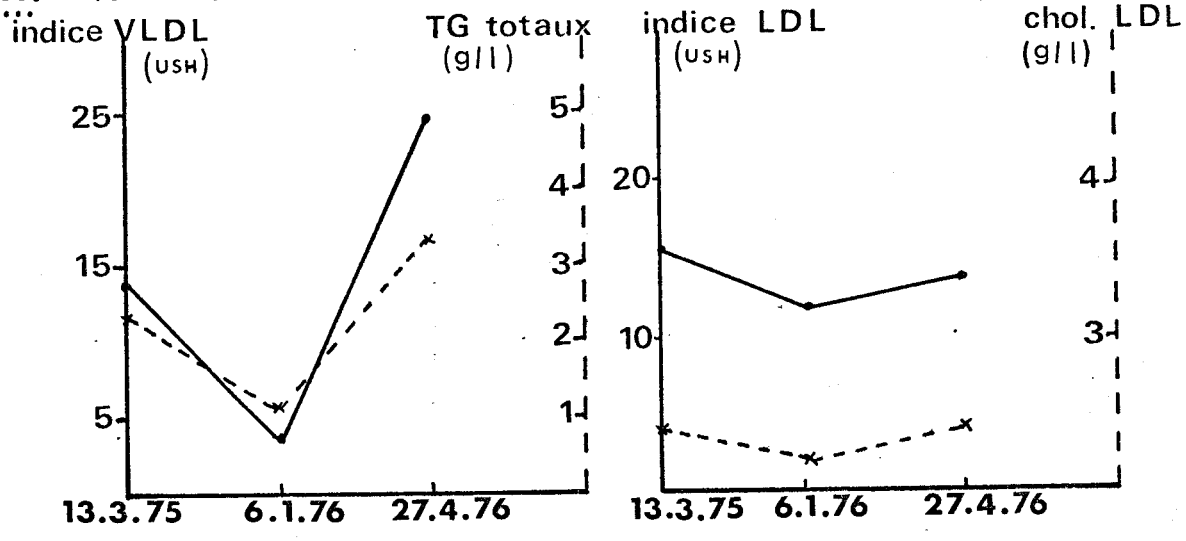
SURVEILLANCE DES DYSLIPEMIES



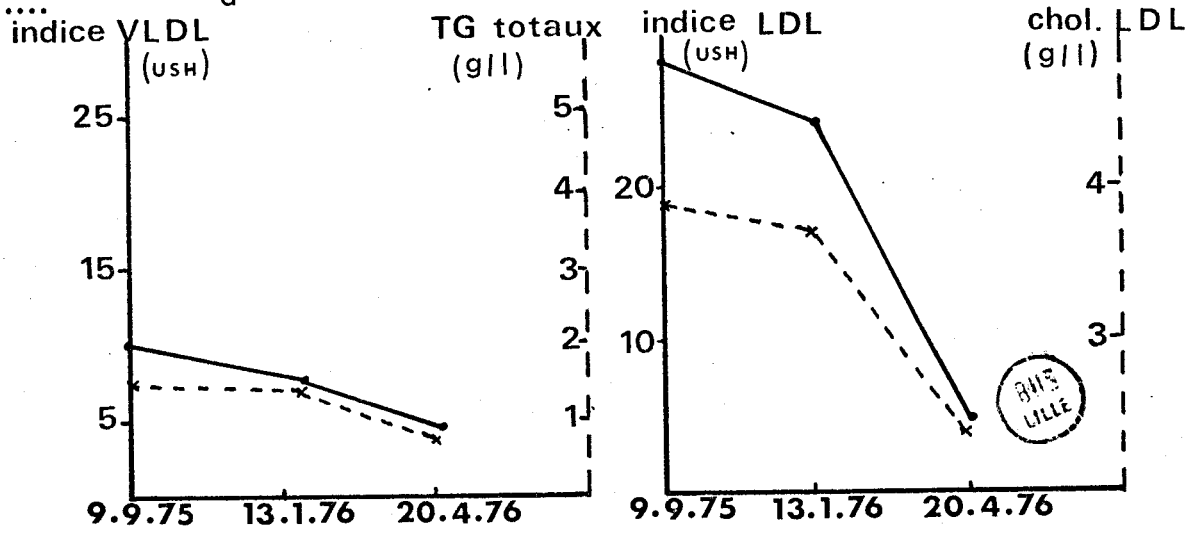
MARTINACHE M. 58ans II_b



DELTOUR A. 46ans IV



DOCQUOIS M. 27ans II_a



BIU LILLE

CONCLUSION - ETABLISSEMENT D'UN BILAN LIPIDIQUE

Les deux méthodes d'analyse des lipoprotéines que nous venons de proposer présentent plusieurs avantages :

- Elles peuvent être mises en oeuvre facilement dans les laboratoires de routine.

- Elles fournissent des renseignements suffisants pour faire face aux problèmes rencontrés quotidiennement en biochimie clinique.

Jusqu'à présent, l'application des tests de précipitation sélective était limitée par le fait que la mesure de l'intensité de la floculation des lipoprotéines était réalisée avec des appareils non conçus pour cette mesure, si bien que les résultats variaient considérablement d'un laboratoire à l'autre. La mise au point d'un turbidimètre qui assure une standardisation parfaite de ces résultats permet de remédier à cet inconvénient.

Cependant, les renseignements apportés par le "lipidotest" ne dispensent pas d'effectuer un typage précis à l'aide du lipidogramme et des dosages du cholestérol et des triglycérides.

La méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu du pH et de concentration permet de

faire sans ambiguïté le diagnostic différentiel entre les différents types d'hyperlipémies. Elle permet en outre le repérage de lipoprotéines particulières comme la lipoprotéine Lp(a) dont la signification pathologique reste à préciser.

Une fois que le typage est établi l'estimation turbidimétrique des lipoprotéines de basse et très basse densités peut être utilisée comme test de surveillance.

En conclusion, le tableau 11 (page 138) établit les bilans lipidiques de base caractérisant chaque type d'hyperlipémie et définis selon les deux techniques originales mises au point dans ce travail.

TABLEAU 11

BILAN LIPIDIQUE DE BASE : PROTOCOLE PROPOSE

TYPE	TURBIDITE PLASMATIQUE	DOSAGES		LIPIDOTEST		ACRYLAMIDE				
		C T	T G	Ind LDL	Ind VLDL + chyl.	chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Normal	0	N < 2,8 g/l	N < 1,6 g/l	N < 20	N ≤ 12	0	N	N	N	N
I	lactescent	N à +	++++	N	++++	++++	↓	↓	↓	↓
II_A	clair	+++	N	++	N	0	N	N	+	N
II_B	clair ou trouble	+++	+	+	+	0	+	N	+	N
III	trouble	++	++	↓↓	++	0 à +	+	+++	↓↓↓	N
IV	trouble	N à +	++	N	++	0	++	N à +	N à ↓	N à ↓
V	lactescent	N à +	+++	N	+++	++	++	N	N à ↓	N à ↓

CT : cholestérol total (enzymatique)

TG : triglycérides totaux

Ind LDL : indice LDL

Ind VLDL + chyl. : indice VLDL + chylomicrons éventuels

BIBLIOTECA

ELECTROPHORESE PREPARATIVE DES LIPOPROTEINES SUR COLONNE DE GEL DE POLYACRYLAMIDE

APPLICATION A LA PURIFICATION ET A LA CARACTERISATION DES HDL, LDL ET Lp(a)

-=-=-=-=-

I N T R O D U C T I O N

L'instabilité et l'hétérogénéité des complexes lipoprotéiques rendent leur isolement et leur purification très difficiles (108).

Bien qu'étant considérée comme méthode de référence, l'ultracentrifugation préparative avec ajustement intermédiaire des densités (95) exige une manipulation longue et délicate pouvant, de plus, entraîner des altérations de structure des lipoprotéines (3, 4, 97, 118, 166).

Les autres techniques de séparation des lipoprotéines basées sur leurs différences de réactivité chimique vis-à-vis des polyanions, de charge électrique, de composition en apoprotéines, et de taille moléculaire, sont généralement utilisées comme méthodes d'analyse qualitative.

L'excellente résolution des lipoprotéines plasmatiques, obtenue par l'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide (174) (figure 15 page 111), en chylomicrons, VLDL, LDL, HDL et Lp(a) nous a suggéré la mise au point d'un appareil préparatif (58, 59).

Le principe associe l'électrophorèse et le tamisage moléculaire. La séparation s'effectue le long d'une colonne de gel de polyacrylamide à gradient discontinu de concentration. Les macromolécules ainsi individualisées sont éluées quantitativement par l'intermédiaire d'un système que nous décrivons.

Un tel procédé est utilisé depuis longtemps pour les préparations de protéines : séparées par électrophorèse, les molécules sont éluées de façon continue dans un flux de tampon. Elles sont, de ce fait, très diluées (88 , 99 , 106) et certains auteurs pallient cet inconvénient par une électrophorèse et une élution intermittentes (27 , 101 , 154). Cette technique présente cependant des inconvénients car elle est longue et exige en outre un système d'élution très élaboré, nécessaire pour éviter toute fuite au niveau de la chambre (133).

A l'inverse, la méthode simple que nous proposons permet d'isoler rapidement et quantitativement les lipoprotéines de basse et de haute densités (LDL et HDL). Couplée à l'ultracentrifugation, l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide permet en outre l'isolement de la Lp(a), lipoprotéine particulière dont l'obtention à l'état pur est très difficile.

L'homogénéité des lipoprotéines purifiées par ce procédé original d'électrophorèse préparative a été contrôlée sur la base de critères électrophorétiques, immunologiques et chimiques.

L'isolement de la Lp(a) à partir d'un plasma anormalement riche en cette fraction nous a permis d'établir partiellement sa composition chimique, de préparer un immunsérum spécifique et de mettre au point une méthode de dosage immunologique de la Lp(a) plasmatique.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

A/ DESCRIPTION DU SYSTEME D'ELECTROPHORESE PREPARATIVE

L'appareil d'électrophorèse préparative qui nous a servi dans cette étude a été mis au point en collaboration avec le Centre de Technologie Biomédicale de l'I.N.S.E.R.M. (Directeur Y. MOSCHETTO). Schématisé dans la figure 24 page 143 , il se compose de deux parties :

- une colonne proprement dite,
- et une chambre d'élution.

Muni d'un niveau à bulle, l'ensemble repose sur un support à trois pointes réglables permettant d'ajuster la verticalité du système.

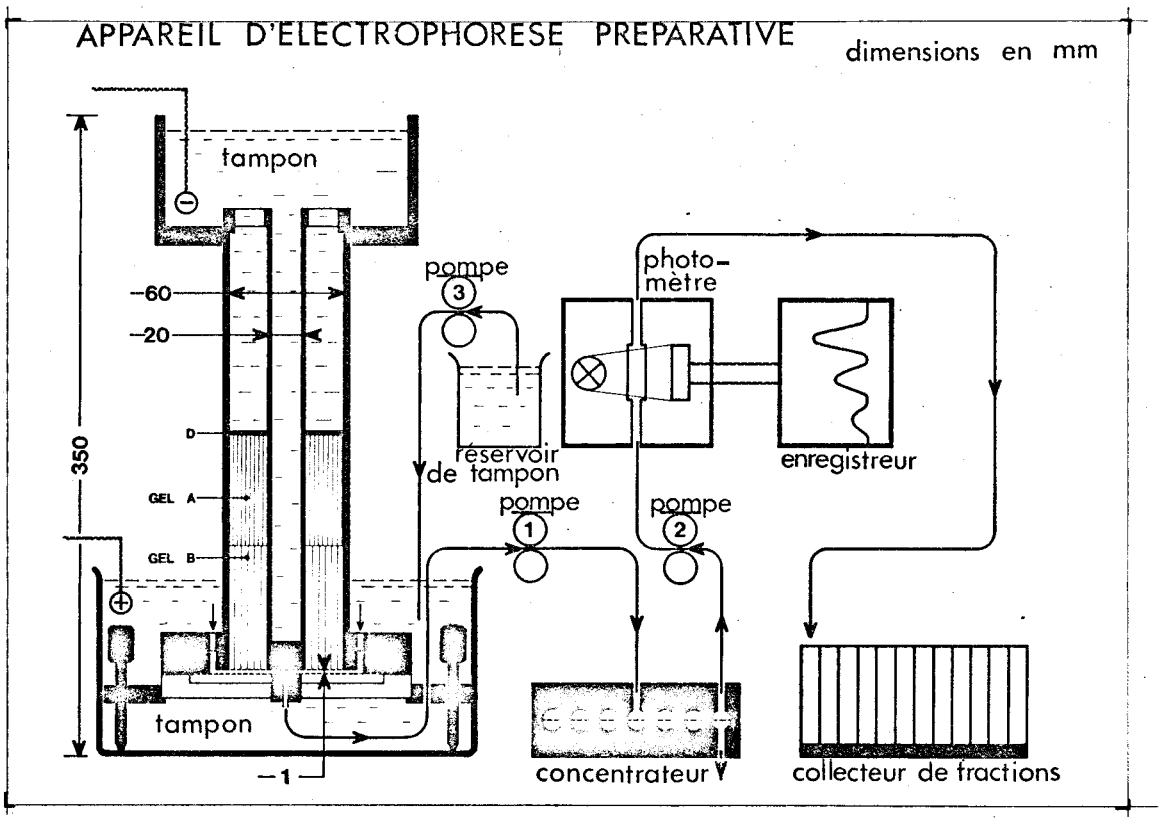
a) La colonne proprement dite

La colonne est formée de deux tubes concentriques en plexiglass dont l'un, central et creux, constitue le système de réfrigération. La convection du tampon qui le remplit suffit à éviter toute élévation de température.

Le gel, coulé dans la couronne extérieure, est maintenu à sa base par une trame de nylon parfaitement tendue et plane, centrée sur le tube de réfrigération et totalement imperméable au gel.

FIGURE 24

APPAREILLAGE UTILISE POUR L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE



BUS LILLE

b) La chambre d'élution

La chambre d'élution s'adapte à la base de la colonne. D'une hauteur de 0,8 mm, elle est délimitée par la surface inférieure du gel et une membrane en matière plastique tendue.

L'aspiration est centrale et l'admission du tampon s'effectue par l'intermédiaire d'un barillet extérieur donnant ainsi un flux convergeant de la périphérie vers le centre entre deux surfaces planes sans obstacle et donc sans volume mort.

B/ PREPARATION DU SUPPORT D'ELECTROPHORESE

Pour la préparation du support, la chambre d'élution est remplacée par un bouchon s'adaptant de façon parfaitement étanche à la trame de nylon.

Deux gels, de concentration différente en acrylamide, sont successivement coulés et polymérisés : un gel B ou gel d'élution de concentration 2 % (p/v) (100 ml) et un gel A ou gel de séparation de concentration 3 % (p/v) (100 ml). La composition des solutions servant à ces préparations est donnée dans le tableau 12 (page 145).

Dans chaque cas, la polymérisation est obtenue en 30 min. à température ambiante, sous l'effet catalytique du persulfate d'ammonium.

Le gel d'élution ayant une structure très lâche, l'addition de la solution du gel de séparation doit être effectuée avec beaucoup de précautions pour éviter toute perturbation du gel inférieur.

TABLEAU 12

COMPOSITION DU TAMPON ET DES GELS DE SEPARATION ET D'ELUTION

UTILISES POUR L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE DES LIPOPROTEINES.

ELECTROPHORESE (Tampon A pH 8,3)		GELS D'ACRYLAMIDE		
			Séparation	Elution
TRIS	15 g	Acrylamide	3 g	2 g
GLYCINE	72 g	Bis-acrylamide	0,25 g	0,5 g
Eau dist. q.s.p.	5 l	Tampon A	80 ml	80 ml
		AGITER ET DEGAZER		
		Persulfate d'NH_4 *	0,7 ml	0,7 ml
		TEMED	30 l	30 l
		Tampon A q.s.p.	100 ml	100 ml

TRIS : hydroxyméthylamino-méthane

* : solution aqueuse à 10 % (p/v)

TEMED : tétraméthyléthylènediamine

C/ PREPARATION DES ECHANTILLONS A PURIFIER

L'isolement des LDL et des HDL d'un plasma, en vue d'une analyse lipidique de chaque fraction, ne nécessite aucune préparation préalable et des quantités allant jusqu'à 5 millilitres de plasma peuvent être déposées en vue de l'électrophorèse. Si l'on désire étudier la partie protéique des lipoprotéines ou préparer des immunsérums spécifiques, il est nécessaire d'éliminer dans un premier temps les autres protéines par une ultracentrifugation menée pendant 24 heures à la densité d = 1,21.

Pour la purification de la Lp(a), deux étapes d'ultracentrifugation, avec ajustement intermédiaire des densités, s'imposent avant l'électrophorèse.

L'ultracentrifugeuse que nous utilisons (Spinco Beckman modèle L2 HV) est munie d'un rotor Ti50. Elle donne, à la vitesse de 40 000 tours/minutes et pour le rayon moyen, une accélération de 105 000 *g*.

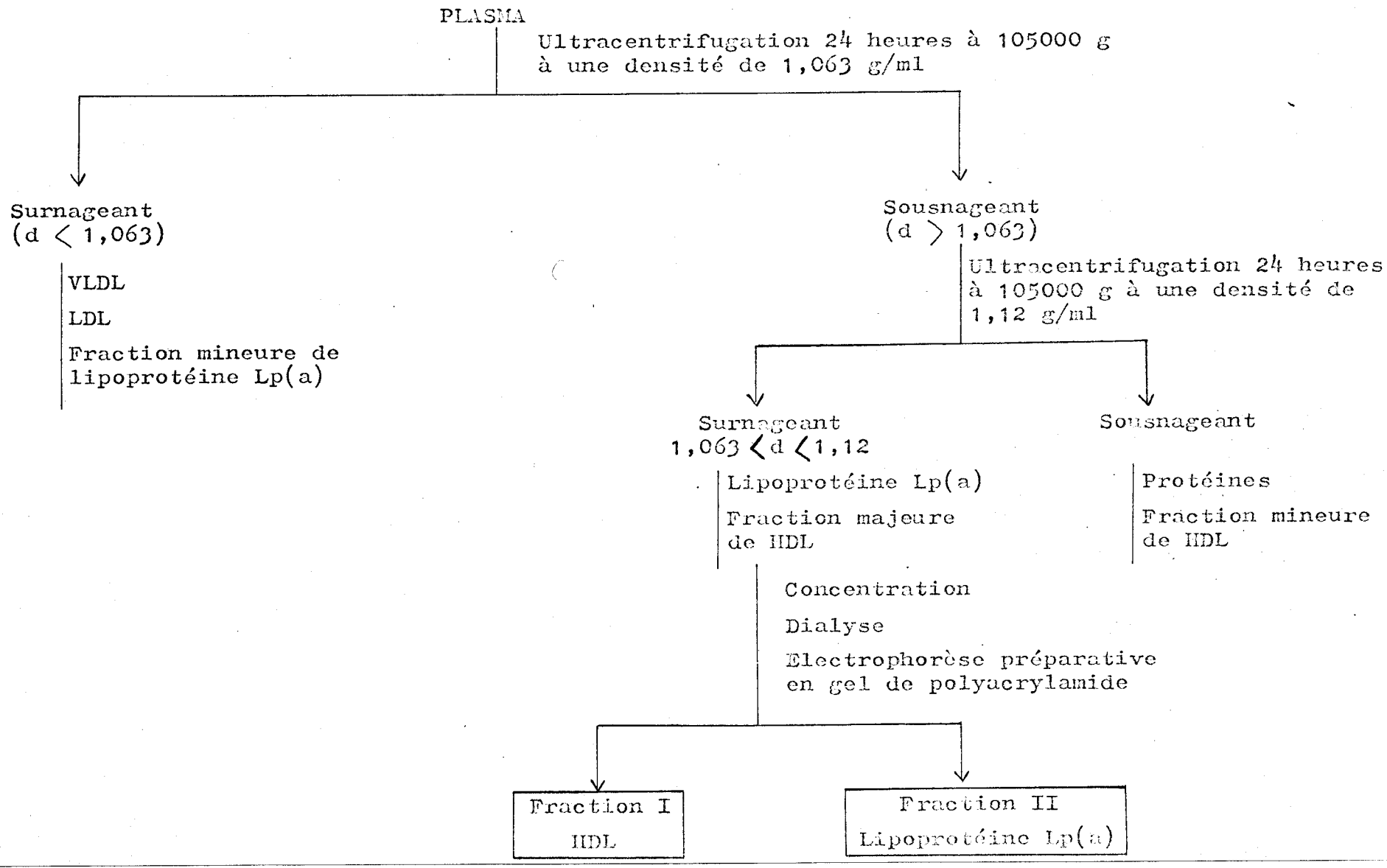
Les densités sont mesurées avec un densimètre Jobin-Yvon à affichage numérique. L'ajustement se fait par addition d'une solution saline à base de NaCl et de KBr (95).

Le tableau 13 (page 147) en résume les différentes étapes :

- Une première ultracentrifugation, menée à la densité 1,063 pendant 24 heures à 105 000 *g*, permet d'éliminer par flottation les VLDL et les LDL. La majeure partie de la Lp(a) sédimente, dans ces conditions, avec les HDL.
- Une deuxième ultracentrifugation, effectuée sur le surnageant et menée à la densité 1,12 pendant 24 heures à 105 000 *g*, assure l'isolement de la Lp(a) et de la fraction HDL_2 qui se trouvent dans le surnageant.

TABLEAU 13

PROTOCOLE D'ISOLEMENT DE LA LIPOPROTEINE Lp(a)



Lille Sciences

Cette fraction est récupérée, puis dialysée et concentrée avant d'être dissociée en Lp(a) et HDL_2 par électrophorèse préparative.

La dialyse est effectuée contre du sérum physiologique dans un dialyseur à fibres creuses d'acétate de cellulose (Hollow Fiber, Laboratoires Bio Rad).

La concentration est obtenue par ultrafiltration au-travers d'une membrane Diaflo PM 10 (Amicon Corporation).

D/ ELECTROPHORESE

Lorsque les gels ont été coulés et polymérisés, la chambre d'élution est adaptée à la base de la colonne.

La partie inférieure du système est immergée dans un réservoir rempli de tampon et contenant une anode en platine.

Du tampon est ensuite ajouté jusqu'au sommet de la colonne puis dans un réservoir supérieur contenant la cathode et communiquant avec le tube central de réfrigération.

L'échantillon est déposé à la surface du gel de séparation, sous le tampon (figure 24 page 143).

L'électrophorèse se fait pendant 16 heures, à + 4° C, dans une enceinte thermostatée, sous un voltage constant de 200 volts.

E/ ELUTION DES LIPOPROTEINES

Les différentes unités, couplées en sortie de colonne pour permettre l'élution des fractions séparées par l'électro-

phorèse, sont représentées sur la figure 24 page 143 .

Une pompe péristaltique à trois canaux assure des débits réguliers (figure 24 : 1, 2, 3, page 143).

Un tuyau calibré, connecté au centre de la chambre d'élution (canal 1), est relié à un concentrateur d'éluats de colonne (On-Line concentrator - Amicon Corporation). Dans ce système, le parcours effectif des éluats sur une membrane d'ultrafiltration suit une mince spirale. Le solvant et les micromolécules de taille inférieure au diamètre des pores de la membrane sont capables de la traverser, tandis que les macromolécules en solution beaucoup plus concentrée restent en surface. Elles sont dirigées par l'intermédiaire d'un second tuyau (canal 2) dans la microcuve d'un spectrophotomètre dont le monochromateur est calé sur une longueur d'onde de 280 nm (ou 520 nm quand les lipoprotéines sont précolorées), puis enfin récupérées dans un collecteur de fractions réglé pour recueillir des volumes de 4 ml pour un débit de 1,3 ml/mi

Le tuyau du canal 3 de la pompe assure l'alimentation en tampon du bac anodique de façon continue, avec un débit identique au débit d'élution.

F/ CARACTERISATION DES FRACTIONS PURIFIEES

La pureté des fractions de lipoprotéines ainsi préparées a été testée par des méthodes électrophorétiques et immunologiques ; l'analyse de leur composition lipidique complète l'identification.

a) Caractérisation électrophorétique

Les lipoprotéines des fractions isolées ont fait l'objet d'une analyse qualitative par électrophorèse sur gel

de polyacrylamide (174) et éventuellement sur gel d'agarose (méthode Bio Gram A des Laboratoires Bio Rad).

b) Caractérisation immunologique

Les propriétés immunologiques des fractions isolées ont été étudiées par double diffusion en gel d'agarose (148) à l'aide d'immunsérums spécifiques anti-alpha et anti-bêta-lipoprotéines (Boehringer) et anti-Lp(a) (fourni par le Docteur BURSTEIN, CNTS Paris).

Les réactions sont lues après 48 heures de diffusion des deux réactants, à température ambiante, dans un gel d'agar à 1 % (p/v) en tampon véronal 0,05 M pH 8,6.

c) Caractérisation chimique

Les lipides des lipoprotéines, extraits par la méthode de FOLCH (69), ont été fractionnés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, soit dans le solvant de migration éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (90/10/1 v/v/v) pour l'isolement des triglycérides (TG), des glycérides partiels, du cholestérol libre (CL) ou estérifié (CE), soit dans le solvant chloroforme-méthanol-NH_4OH 7 N (115/45/7,5 v/v/v) pour l'isolement des principales classes de phospholipides (appendice technique, page 183).

Après révélation des taches par l'iode et élution par un mélange chloroforme-méthanol (v/v), le cholestérol et les glycérides ont été dosées à l'autoanalyseur Technicon, respectivement par la méthode de RUSH et coll. (161) et celle de KESSLER et LEDERER (110) (appendice technique, page 188) ; les phospholipides ont été déterminés par la méthode de RAHEJA et coll. (152) (appendice technique, page 186). Les compositions en acides gras des triglycérides, des esters de cholestérol et des phosphatidyl-cholines ont été établies

par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras obtenus par méthanolyse des fractions préalablement isolées sur couche mince. Les lipides, révélés par la rhodamine, sont chauffés directement en présence de méthanol et d'acide sulfurique, pendant 2 heures à + 70° C (89). Après extraction par l'heptane, les esters méthyliques sont purifiés par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans un solvant de migration constitué par du benzène (180), puis analysés à 180° C sur colonne de succinate de diéthylène glycol à 10 % (p/p) sur chromosorb W/AW (colonne d'acier inoxydable de 3 m). Les pourcentages des différents acides gras ont été obtenus par intégration automatique (Migrator Autolab Spectra Physics).

L'étude de la composition glucidique des lipoprotéine a été effectuée après délipidation par un mélange chloroforme-méthanol (1/4 v/v) d'une fraction aliquote (2 mg de protéine) et lyophilisation (137). Les hexoses ont été dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (184) modifiée par RIMINGTON (156) avec, comme témoin interne, un mélange équimoléculaire de mannose et de galactose (appendice technique page 205).

La teneur en acides sialiques a été appréciée par une modification de la méthode de NIAZI et STATE (141) modifiée par WERNER et ODIN (197) en utilisant un réactif à la diphénylamine et l'acide N-acétylneuraminique comme témoin interne (appendice technique page 208).

Les protéines des différentes fractions ont été dosées selon la méthode de LOWRY (125) en utilisant comme étalon de la sérumalbumine (appendice technique page 211).

L'analyse qualitative de la copule protéique de la Lp(a) a été effectuée après délipidation par un mélange éthanol-éther éthylique (3:1 v/v) (165). Les protéines de

l'extrait sec, solubilisées dans une solution de dodécylsulfate de sodium (4 % p/v) ont été séparées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide - SDS selon une adaptation de la méthode de WEBER et OSBORN (195) (appendice technique page 214). En présence du détergent, les protéines forment des complexes micellaires qui se séparent en gel de polyacrylamide en fonction du poids moléculaire de la protéine. Nous avons pu vérifier, par l'analyse d'un mélange de lysozyme, antitrypsine, sérumalbumine, RNA polymérase (classe β), albumine d'oeuf et chymotrypsinogène (Boehringer Mannheim) qu'il existait une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et la mobilité électrophorétique de chaque protéine (figure 1, page 220).

R E S U L T A T S E T A P P L I C A T I O N S

A/ ISOLEMENT DES HDL ET DES LDL-APPLICATIONS

a) Isolement

La figure 26 page 154 montre qu'après électrophorèse préparative du plasma, les lipoprotéines sont éluées respectivement selon deux pics parfaitement séparés.

Comme le montre l'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en gradient (fig. 27 page 156), le pic I correspond aux HDL alors que le pic II correspond aux LDL. Les VLDL dont la taille est trop importante pour traverser les mailles du gel restent en haut de la colonne.

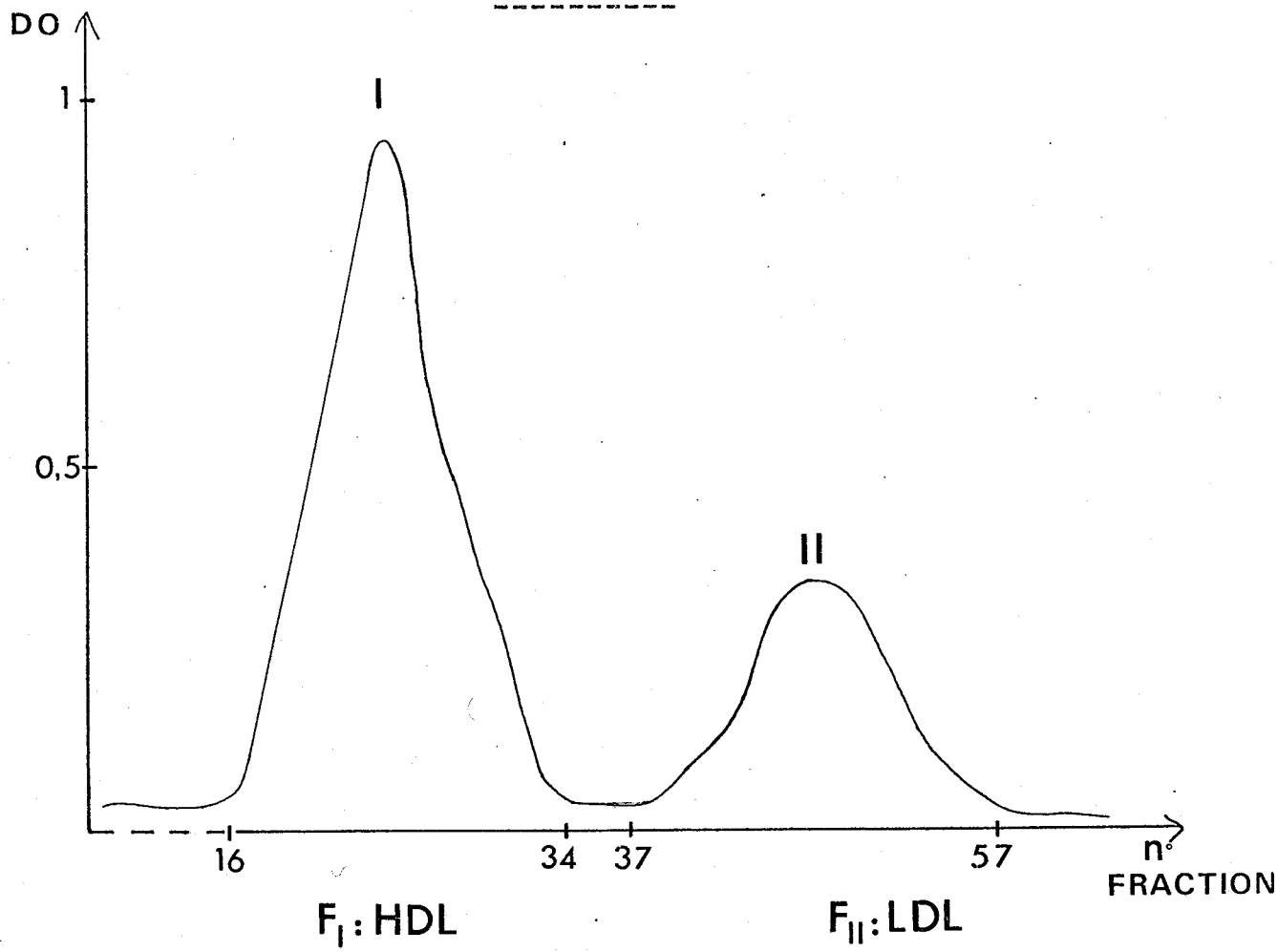
Lorsqu'on désire étudier leur composition lipidique, les lipoprotéines sont précolorées et l'enregistrement se fait à 520 nm.

En revanche, lorsqu'on s'intéresse à leur copule protéique, les lipoprotéines doivent être débarrassées au préalable des autres protéines plasmatiques par ultracentrifugation à la densité 1,21 et l'enregistrement se fait à 280 nm.

FIGURE 26

ENREGISTREMENT SPECTROPHOTOMETRIQUE DU FRACTIONNEMENT OBTENU PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE D'UN PLASMA PREALABLEMENT CENTRIFUGE

A d = 1,21



DEPOT : 5ml de plasma de d< 1,21

DEBIT : 1,3ml / mn TAMPON tris-glycocolle pH 8,3

200 volts 16heures 4°c

ENREGISTREMENT : 280 nm

RUS LILLE

Les deux lipoprotéines isolées donnent une seule bande en électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide (fig. 27 page 156) et réagissent spécifiquement avec leur antisérum correspondant (fig. 28 page 157) en immunodiffusion selon OUCHTERLONY.

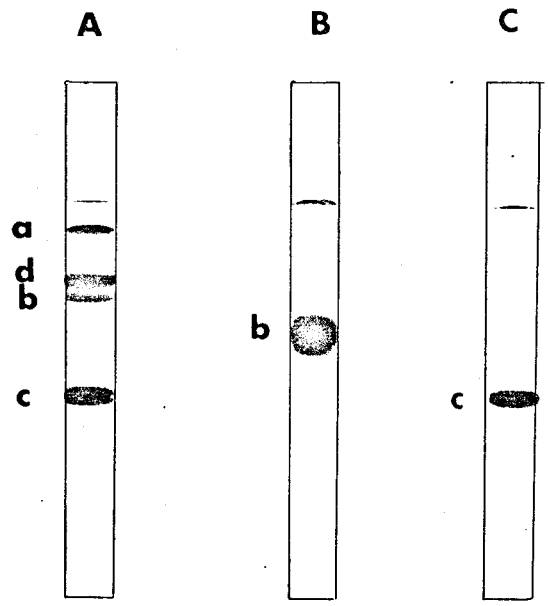
Les compositions lipidiques partielles des deux fractions sont résumées dans le tableau 14 page 158 . Elles sont parfaitement en accord avec les compositions proposées dans la littérature pour ces mêmes lipoprotéines isolées selon des procédés différents comme l'ultracentrifugation de flottation (179).

Afin de connaître le pourcentage de récupération des lipoprotéines dans notre système, nous avons effectué l'analyse quantitative des HDL et des LDL séparées par électrophorèse préparative d'une part et déterminées, d'autre part, par précipitation sélective à l'aide de polyanions et de détergents selon WILSON et coll. (204) (appendice technique, page 201). Pour ce faire, nous avons dosé le cholestérol de chacune des fractions en chromatographie en phase gazeuse selon AMBERT et coll. (7) (la chromatographie gazeuse a été choisie de préférence au dosage automatique enzymatique en fluorimétrie à cause de l'interférence de la précoloration dans cette dernière méthode) (appendice technique, page 196).

Les résultats rassemblés dans le tableau 15 page 159, montrent que le pourcentage de récupération déterminé en prenant comme référence la méthode de WILSON, est excellent dans le cas des HDL (rendement = 94,3 %) et un peu moins bon dans le cas des LDL (rendement = 79 %).

FIGURE 27

ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN GRADIENT DISCONTINU POUR L'ETUDE DES FRACTIONS ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE



A : plasma total

B : LDL (éluats du pic II)

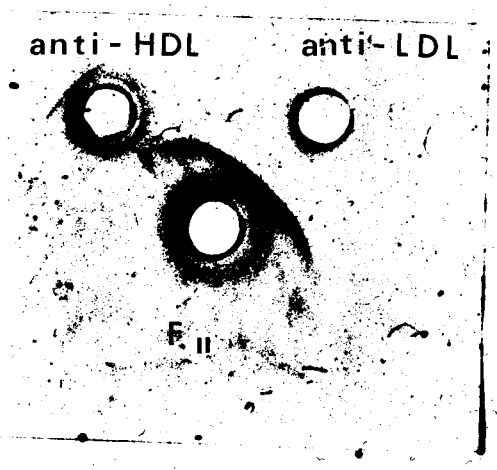
C : HDL (éluats du pic I)

a : VLDI
b : LDL
c : HDL
d : $L_{p(a)}$

BUS LILLE

FIGURE 28

IMMUNODIFFUSION DOUBLE POUR LE CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES FRACTIONS ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE



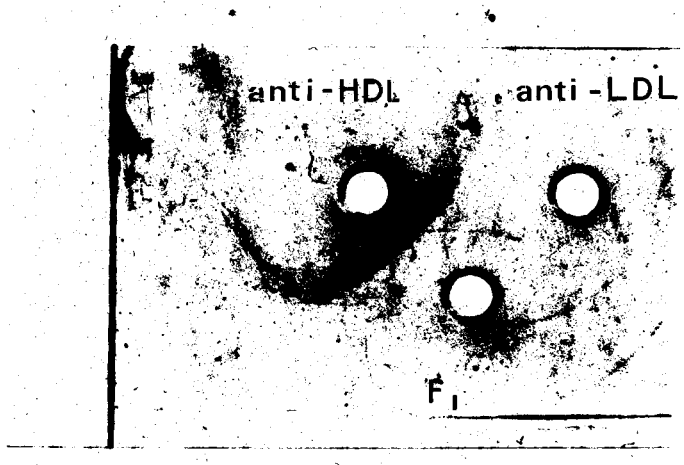


TABLEAU 14

COMPOSITIONS LIPIDIQUES COMPAREES DES HDL ET LDL PLASMATIQUES ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE (58) ET ULTRACENTRIFUGATION DE FLOTTATION (179)

	En pourcentages - par rapport aux poids de lipides totaux				En pourcentages - par rapport aux phospholipides		Rapports	
	Cholestérol libre	Cholestérol estérifié	Phospho-lipides	Glycérides	Lécithine	Sphingo-myéline	Chol. total / Phospholipides	Chol. estérifié / Chol. total
HDL A	7,5	35,7	44	9,9	75	10,5	0,98	0,82
HDL B	7,4	35,1	46,6	6,6	75,4	11,8	0,91	0,82
LDL A	13	40,3	26,3	20	42,7	32,4	2,02	0,75
LDL B	10,5	33,5	21,7	28,3	61	20,3	2,02	0,76

A : présent travail (58)

B : SKIPSKI et coll. (179)

TABLEAU 15

ETUDE DU POURCENTAGE DE RECUPERATION DES LIPOPROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

	C*HDL (16 CAS)		C*LDL (16 CAS)	
	METHODE DE WILSON	ELECTRO-PHORESE PREPARATIVE	METHODE DE WILSON	ELECTRO-PHORESE PREPARATIVE
MOYENNE (g/l)	0,53	0,50	1,28	1,01
ECART-TYPE	0,15	0,03	0,31	0,31
COEFFICIENT DE VARIATION	28 %	18,6 %	24 %	31 %
RENDEMENT		94,3 %		79 %

C* = CHOLESTEROL

BIUS LILLE

b) Applications

L'électrophorèse préparative s'adapte à la quantification des lipoprotéines (tableau 15 page 159). L'analyse des coefficients de variation indique que pour l'analyse des HDL, la séparation sur colonne est plus adaptée alors que pour celle des LDL la précipitation par les polyanions et les détergents est meilleure. Ceci peut s'expliquer par le fait que les HDL, petites molécules très ionisées à pH alcalin, sont éluées rapidement et sans perte alors que les LDL plus grosses et moins chargées sont moins facilement éluées et restent en partie (21 %) dans les mailles des gels.

L'électrophorèse préparative se révèle particulièrement utile pour la séparation des LDL et surtout des HDL. Elle évite les nombreux ajustements de densité et les multiples centrifugations que nécessite l'ultracentrifugation de flottation. Les lipoprotéines isolées sont intactes qualitativement, si l'on en juge d'après leur mobilité électrophorétique, leur réactivité antigénique et leur composition lipidique.

Cette méthode est susceptible d'être utilisée avec profit dans de nombreuses occasions :

- Elle fournit des lipoprotéines pures qui, injectées à l'animal en présence d'adjuvant de FREUND, provoquent la formation d'anticorps spécifiques. On peut obtenir ainsi très facilement des immunsérums anti α et anti β lipoprotéines.

- Elle rend beaucoup plus accessible l'analyse structurale des lipoprotéines en recherche fondamentale. De récents travaux ont montré l'importance des apoprotéines dans le métabolisme des lipoprotéines (66 , 114). Il est aisé, après délipidation des fractions purifiées par électrophorèse préparative, de séparer par différentes méthodes physicochimiques les apoprotéines de l'extrait.

- Elle est particulièrement adaptée à l'obtention d'HDL pures qui sont nécessaires, en tant que substrat, pour la détermination de la lécithine-cholestérol-acyltransférase plasmatique.

B/ ISOLEMENT DE LA Lp(a) - APPLICATIONS

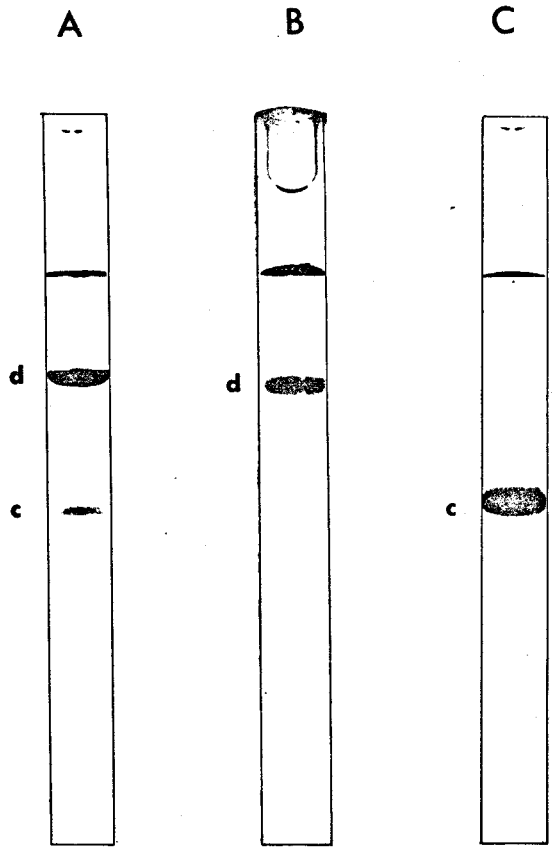
a) Isolement et purification

L'isolement et la purification de la Lp(a) nécessitent deux étapes préliminaires d'ultracentrifugation (tableau 13 page 147) qui éliminent les VLDL et les LDL. Par rapport au sérum de départ dont le profil lipoprotéique a été établi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu (174), la fraction obtenue contient la majeure partie de la Lp(a) et des HDL (figure 29 page 162). L'électrophorèse préparative dissocie cet ensemble en deux sous-fractions I et II (figure 30 page 163). La fraction I (figure 29 page 162) correspond aux HDL et ne contient pas de Lp(a). La fraction II qui ne contient pas de HDL donne une seule bande par électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide (figure 29 page 162) et une seule bande en position pré-β par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 31 page 164).

Cette fraction II, correspondant à la Lp(a) ainsi isolée réagit en immunodiffusion (figure 32 page 165) avec l'immunsérum anti-Lp(a) mais aussi avec l'immunsérum anti-LDL du fait de la communauté antigénique partielle qui existe entre les deux types de lipoprotéine (62) (186) (192). Le petit éperon qui se forme lors de la réunion des deux arcs semble indiquer l'existence d'une certaine dissociation de la Lp(a) en ses différents composants.

FIGURE 29

ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN GRADIENT DISCONTINU POUR L'ETUDE DES FRACTIONS ISOLEES PAR COUPLAGE DE L'ULTRACENTRIFUGATION ET DE L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE



A : fraction de densité 1,063 < d < 1,120

B : Lp(a) (éluats du pic II)

C : HDL (éluats du pic I)

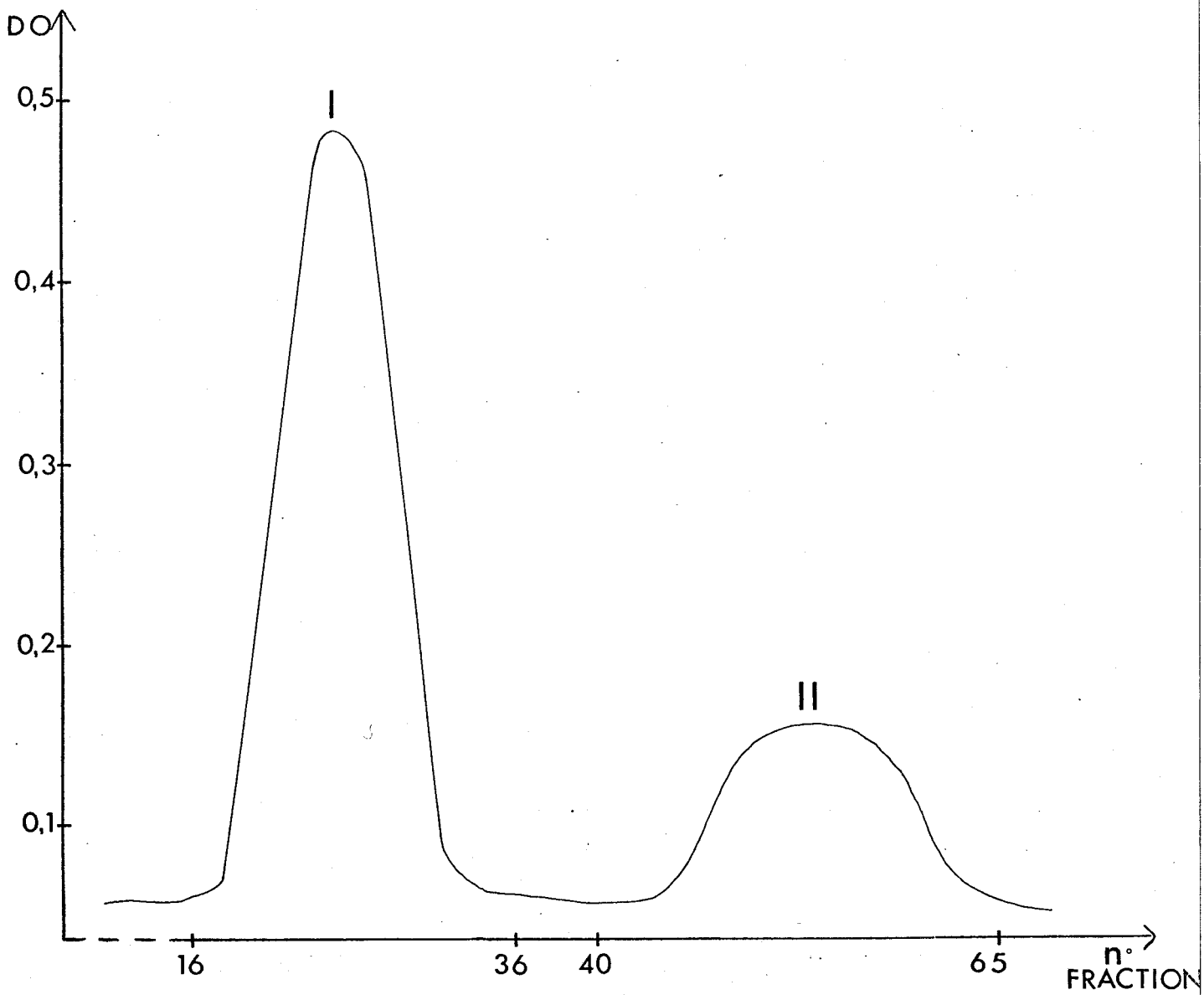
c : HDL

d : Lp(a)

BIUS LILLE

FIGURE 30

ENREGISTREMENT SPECTROPHOTOMETRIQUE DU SOUS-FRACTIONNEMENT OBTENU PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE A PARTIR DE LA FRACTION LIPOPROTEIQUE ISSUE DE L'ULTRACENTRIFUGATION ($1,063 < d < 1,120$)



DEPOT: 5ml de la fraction de densité $1,063 < d < 1,120$

DEBIT: 1,3 ml / mn TAMPON tris-glycocolle pH 8,3

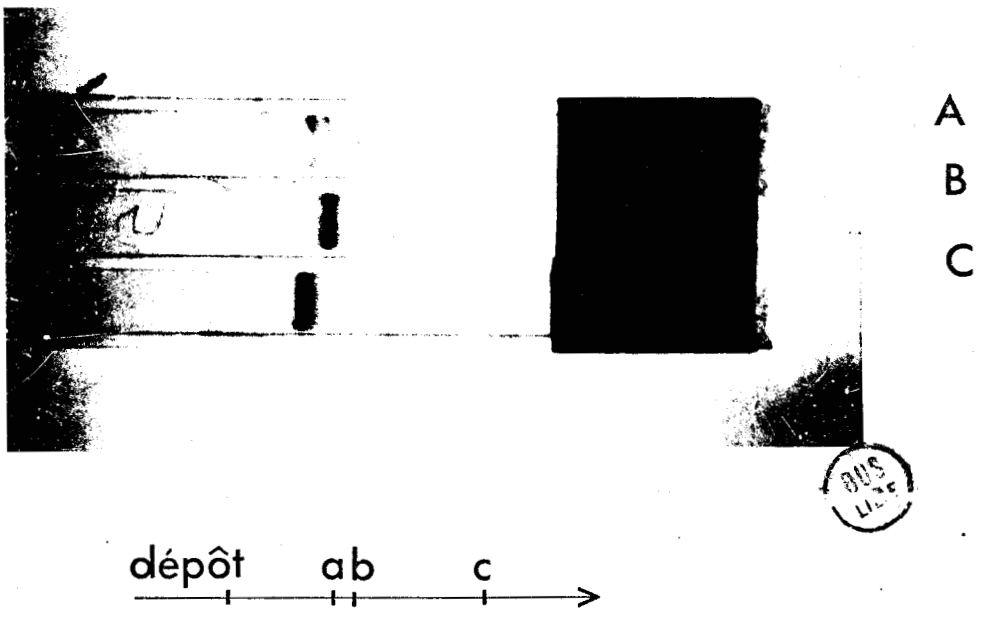
200 volts 20 heures 4°c

ENREGISTREMENT: 280 nm

BIUS LILLE

FIGURE 31

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DE LA Lp(a) ISOLEE PAR ULTRACENTRIFUGATION SUIVIE D'ELECTROPHORESE PREPARATIVE



A : SERUM TEMOIN

B : Lp (a)

C : LDL

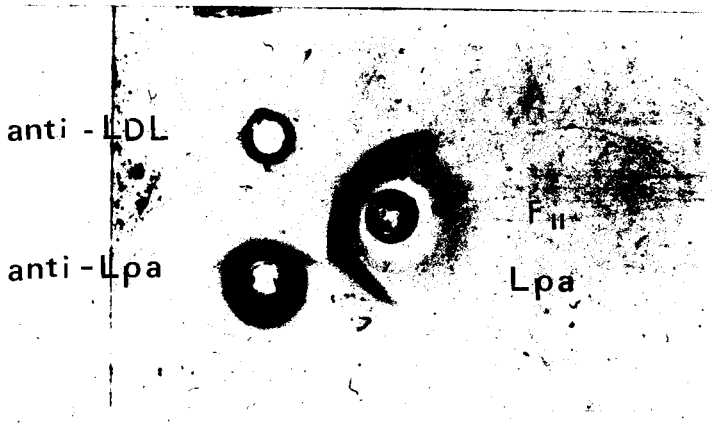
a : LDL (β)

b : VLDL (pré-β)

c : HDL (a)

FIGURE 32

IMMUNODIFFUSION DOUBLE DE LA Lp(a) LIPOPROTEINE ISOLEE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE CONTRE UN IMMUNSERUM ANTI-Lp(a) ET UN IMMUNSERUM ANTI-LDL



BHS LILLE

En revanche, l'absence de réaction avec l'immunsérum anti-HDL confirme la parfaite séparation des deux lipoprotéines lors de l'électrophorèse préparative (figure 33 , page 167).

b) Applications

* Purification et caractérisation de la Lp(a) d'un sujet dyslipoprotéinémique

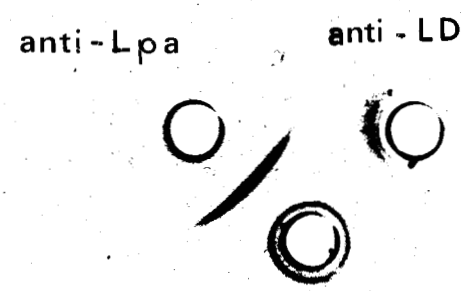
Le développement de la méthode que nous venons de rapporter nous a permis de purifier la Lp(a) isolée du plasma provenant d'un sujet dyslipoprotéinémique et de déterminer sa composition lipidique, glucidique et protéique, comparativement à celle des LDL isolées chez le même sujet.

Le tableau 16 page 168 fait état des résultats enregistrés au niveau de la composition lipidique des LDL et de la Lp(a). Comme d'autres auteurs (6) (111) (119) (177) nous trouvons de grandes analogies de répartition des différentes classes de lipides. Comme les LDL, la Lp(a) se caractérise par sa richesse en cholestérol dont 72 % sont sous forme estérifiée et par sa composition en phospholipides essentiellement représentés par des lécithines et des sphingomyélines et accessoirement par des traces de lysolécithine, de cardiolipide et de phosphatidyl-éthanolamine.
La seule différence importante porte sur les glycérides partiels qui sont plus abondants dans la Lp(a) que dans les LDL.

Le tableau 17 page 169 établit une comparaison entre cette composition lipidique et celle obtenue par d'autres auteurs pour différentes préparations de Lp(a). Les compositions sont très proches ; la seule différence porte sur la teneur en glycérides partiels qui est plus forte dans notre étude, probablement à cause de la triglycéridémie subnormale constamment retrouvée chez notre patient.

FIGURE 33

IMMUNODIFFUSION DOUBLE DE LA Lp(a) LIPOPROTEINE ISOLEE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE CONTRE UN IMMUNSERUM ANTI-HDL POUR LE CONTROLE DE LA PURIFICATION



BUS LILLE

TABLEAU 16

COMPOSITIONS LIPIDIQUES COMPAREES DES LDL ET DE LA Lp(a) CHEZ UN MEME SUJET

	LDL	Lp (a)
RAPPORT $\frac{\text{LIPIDES}}{\text{PROTEINES}}$ (p/p)	3,5	2,7
LIPIDES (mole %)		
Esters de cholestérol	54,7	52,5
Cholestérol libre	20,6	20,0
Triglycérides	9,4	10,2
Mono et Diglycérides	3,0	7,9
Phospholipides *	12,3	9,4
	100	100
RAPPORTS MOLAIRES		
$\frac{\text{Esters de cholestérol}}{\text{Cholestérol libre}}$	2,6	2,6
$\frac{\text{Lécithine}}{\text{Sphingomyéline}}$	2,5	2,1
$\frac{\text{Triglycérides}}{\text{Glycérides partiels}}$	3,1	1,3

* Evalués en moles de lécithine et de sphingomyéline qui représentent plus de 85 % du phosphore lipidique total.

BUS LILLE

TABLEAU 17

COMPOSITION LIPIDIQUE DE LA Lp(a) SELON DIFFERENTS AUTEURS

Références	En pourcentages de lipides totaux (p/p)				Lipides / Protéines (p/p)
	Cholestérol estérifié	Cholestérol libre	Triglycérides	Phospholipides	
SIMONS et coll.(177)	59	14	3	23	1,8
ALBERS et coll.(6)	65		6	30	2,4
LINDEN et coll.(119)	51	13	8	28	3,0
A*	46	17	20	17	2,7

* : présent travail

BIUS LILLE

On retrouve au niveau des acides gras constitutifs de la lécithine, des stérides et des triglycérides (tableau 18 page 171) les analogies de compositions entre LDL et Lp(a) très récemment rapportées par KÄLLBERG et coll. (109). Les stérides sont riches en acides gras polyinsaturés notamment en acide linolénique (18 : 2) ; au niveau des triglycérides on retrouve, comme acides gras majeurs, les acides palmitique (16 : 0), oléique (18 : 1) et linolénique (18 : 2) ; les lécithines ont une composition classique avec un fort pourcentage d'acides gras longs insaturés (C 20 : 4).

La composition glucidique (tableau 19 page 172) de cette Lp(a) isolée chez un seul sujet dyslipoprotéinémique est analogue à celle obtenue par SIMONS à partir d'un mélange de sérums (177). Elle est très différente de celle des LDL et contient environ sept fois plus d'acides sialiques et deux fois plus d'hexoses par milligramme de protéine.

L'appréciation des hexosamines n'a pu être faite : peu de matériel délipidé était à notre disposition et les conditions d'hydrolyse transformant les osamines liées en osamines libres dosées colorimétriquement étaient à définir.

La mise en place de la copule glucidique des lipoprotéines s'effectue essentiellement dans l'appareil de GOLGI au niveau cellulaire et les glucides ajoutés, en particulier les acides sialiques, peuvent jouer un rôle dans les mécanismes de sécrétion des lipoprotéines. La très grande richesse en acides sialiques de la Lp(a) isolée à partir du plasma du sujet étudié pouvait suggérer une anomalie de sa composition glucidique. Cette hypothèse ne peut être retenue puisque nous trouvons des compositions glucidiques analogues à celles rapportées par d'autres auteurs (177).

TABLEAU 18

ETUDE COMPAREE DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES PRINCIPALES CLASSES DE LIPIDES DE LA Lp(a) ET DES LDL

(évaluation en poids %)

	P C		C E		T G	
	Lp(a)	LDL	Lp(a)	LDL	Lp(a)	LDL
14 : 0	2,4	1,0	2,9	2,8	1,8	2,0
16 : 0	26,8	27,7	10,6	11,2	28,3	24,8
16 : 1	2,2	0,6	4,6	5,7	3,6	8,1
18 : 0	17,0	19,0	1,5	0,9	6,2	6,3
18 : 1	24,7	25,0	37,6	34,9	48,8	51,7
18 : 2	18,9	19,2	41,8	42,8	10,9	6,8
20 : 4	8,0	7,5	1,0	1,7	0,4	0,3

PC : phosphatidyl-choline

CE : esters de cholestérol

TG : triglycérides

THS LILLE

TABLEAU 19

COMPOSITIONS GLUCIDIQUES COMPAREES DE LA Lp(a) ET DES LDL

g/mg de protéine	Lp(a)		LDL
	A	B	B
Hexoses	127	108	54,6
Acides sialiques	70	66	10,4
Total	197	174	65

A : présent travail

B : SIMONS et coll. (177)

BUS LILLE

En immunodiffusion, la Lp(a) réagit à la fois avec l'immunsérum anti-Lp(a) et avec l'immunsérum anti-LDL, ce qui montre que sa copule protéique est hétérogène. De récents travaux (61) (192) ont montré que cette copule pouvait, après purification de la Lp(a), se dissocier au cours de la conservation à 0° C en trois composants : apoprotéine B (65 %), sérumalbumine (15 %) et apoprotéine Lp(a) (20 %).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide - SDS (figure 34 page 174) confirme la présence de sérumalbumine et d'apo-B. Elle indique en outre la présence de deux autres protéines : l'une majeure de poids moléculaire voisin de 95 000, l'autre mineure, à peine visible sur le cliché, de poids moléculaire voisin de 31 000. L'une d'entre elles ou les deux pourraient correspondre à l'apo-Lp(a).

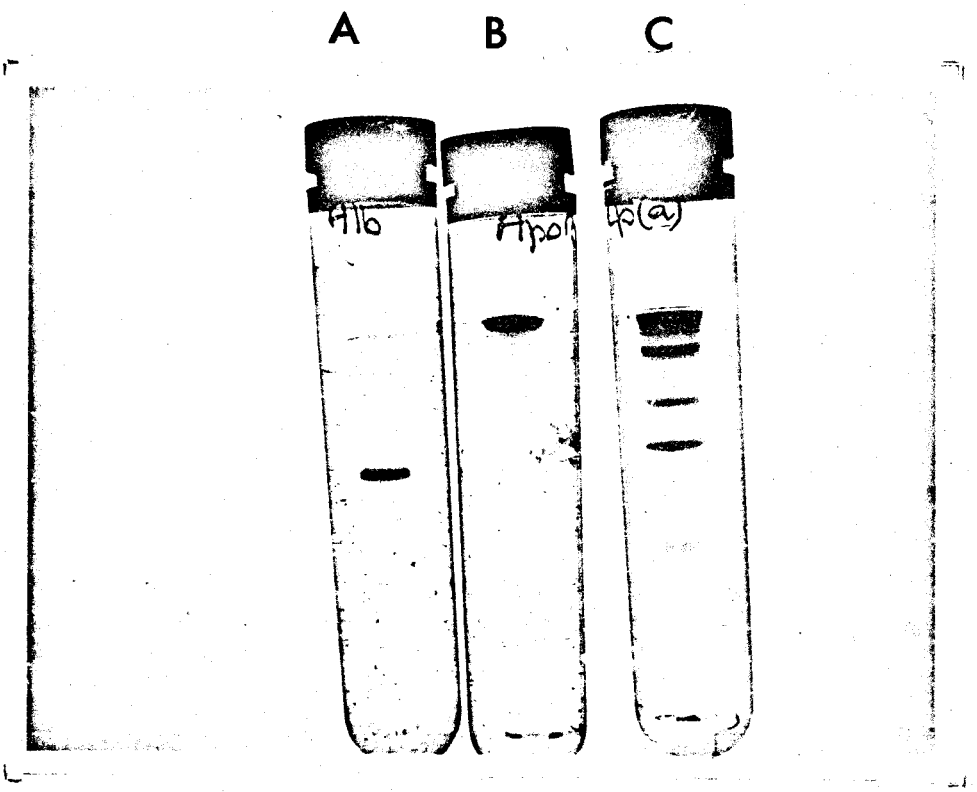
La mise en oeuvre de la méthode de purification que nous proposons devrait nous permettre dans un proche avenir d'obtenir une quantité de Lp(a) suffisante pour étudier plus avant la composition protéique de cette lipoprotéine.

* Obtention d'un immunsérum anti-apo-Lp(a)

Disposant d'une fraction purifiée de Lp(a), il nous a semblé intéressant de l'utiliser pour la préparation d'un immunsérum spécifique, ceci dans le but d'effectuer ensuite un dosage immunologique de cette lipoprotéine. Pour la préparation de cet immunsérum, une partie de la fraction de densité 1,006 - 1,063 qui contient des LDL et de la Lp(a), est concentrée de façon à obtenir 1 mg de protéines dans un volume de 1 ml. Après dialyse contre du sérum physiologique, on ajoute une part égale d'adjuvant complet de FREUND contenant 2,5 mg de Mycobactérium butyricum et on injecte à l'animal. Le lapin est ainsi immunisé par 40 injections intradermiques de 50 µl

FIGURE 34

ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS DE LA Lp(a)
ISOLEE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE POUR L'ANALYSE
QUALITATIVE DE SA COPULE PROTEIQUE



tube A : albumine pure

tube B : apo- B pure

tube C : Lp a délipidée

a : apo-Lpa ?

b : apo-Lpa ?

c : apo- B

d : albumine

BUS LILLE

chacune de la solution d'antigènes (188) ; les injections sont faites au niveau du dos, préalablement rasé, de l'animal et on termine par une piqûre intra-musculaire de Penthydral (Institut Pasteur - ampoule de 1 ml).

Les prélèvements de sang sont effectués à l'oreille ; la première saignée est pratiquée trois semaines après l'immunisation, les autres ont lieu à 15 jours d'intervalles. Dans tous les cas, le sérum recueilli après centrifugation est préservé de toute contamination microbienne par addition d'azoture de sodium à 1 °/$_{oo}$ (p/v). Les anticorps non spécifiques sont absorbés par incubation de l'immunsérum à 37° C, pendant 2 heures, avec du sérum total humain préalablement phénotypé Lp(a-) par immunodiffusion et électrophorèse (194), puis maintien à 4° C pendant 1 nuit ; cette absorption a pour but d'éliminer la spécificité anti apo-B et anti-albumine. Une centrifugation de 10 minutes à 1600 g permet ensuite d'éliminer les complexes antigène-anticorps non spécifiques qui sédimentent ; le surnageant qui renferme les anticorps spécifiques est gardé à - 20° C jusqu'à utilisation.

L'immunsérum ainsi préparé est testé par immunodiffusion contre une fraction pure de LDL isolée en ultracentrifugation et contre des sérums témoins Lp(a+) et Lp(a-).

Les réactions sont appréciées au bout de 48 heures ; elles sont comparées à celles obtenues avec un immunsérum connu et spécifique anti-apo Lp(a) (fourni par le Docteur BURSTEIN, CNTS, PARIS).

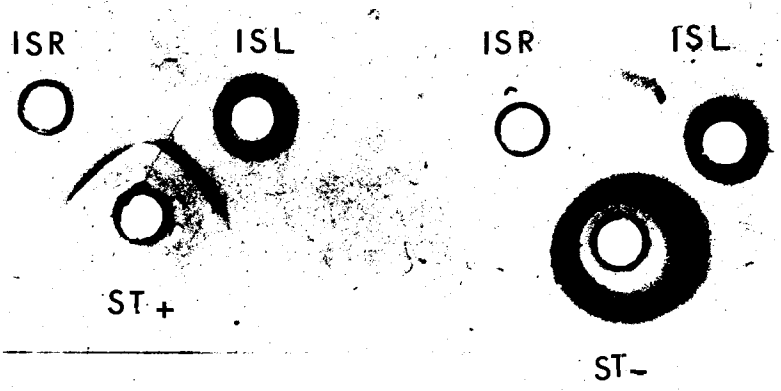
La figure 35 (page 176) fait état de nos résultats.

L'immunsérum anti-apo Lp(a) obtenu par immunisation du lapin est spécifique ; il donne un arc de précipitation avec

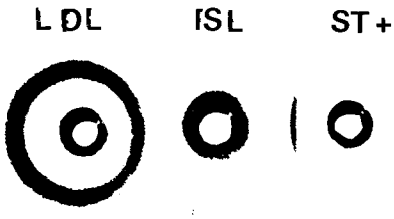
FIGURE 35

CONTROLE DE LA SPECIFICITE DE L'IMMUNSERUM ANTI-Lp(a)

PREPARE CHEZ LE LAPIN



Lame 1



Lame 2

ISR : IMMUNSERUM DE REFERENCE
ISL : IMMUNSERUM DE LAPIN

ST+ : SERUM TEMOIN Lpa +
ST- : SERUM TEMOIN Lpa -

le sérum témoin Lp(a+) (lame 1) mais aucun avec un sérum témoin phénotypé Lp(a-), par diffusion contre l'immunsérum de référence.

L'absorption totale des anticorps non spécifiques est confirmée par l'absence d'arc de précipitation lorsqu'on fait réagir l'immunsérum du lapin contre une fraction purifiée de LDL (lame 2).

* Mise au point d'une méthode de dosage immunologique de la Lp(a) - Application

Nous avons utilisé l'immunsérum spécifique anti-apo Lp(a), ainsi préparé, pour le dosage de la Lp(a) dans le plasma par immunoélectrophorèse monodimensionnelle selon la technique de LAURELL (115) (appendice technique, page 221).

Le principe de ce dosage est le suivant : l'antigène (plasma Lp(a+)) est soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose contenant l'anticorps spécifique du constituant à doser (l'apo-Lp(a)). Il y a formation d'un pic de précipitation ou "rocket" dont la hauteur est représentative de la quantité d'apo-Lp(a). Une droite d'étalonnage permet de convertir cette hauteur en poids de lipoprotéine ; elle est établie en incorporant des quantités croissantes de Lp(a) à un sérum choisi arbitrairement Lp(a-) et en reportant le carré de la hauteur des "rockets" qu'ils donnent en immunoélectrophorèse en fonction de ces taux.

Nous ferons plusieurs remarques à propos de cette méthode de dosage de la Lp(a) (194) :

- quand elle est isolée, la molécule de Lp(a) est instable. Il faut donc l'incorporer rapidement à un sérum pour calibrer les standards d'étalonnage. Ceux-ci se conservent à - 20° C

et donnent alors des hauteurs de "rockets" reproductibles pendant quelques semaines ;

- la concentration en Lp(a) est déterminée à partir du carré des hauteurs des "rockets" ;

- l'électroimmunodiffusion doit être préférée à l'immunodiffusion radiale selon MANCINI (131 , 194). En effet, la masse moléculaire de la Lp(a) étant relativement importante, la lipoprotéine diffuse très lentement dans l'agarose. Les diamètres des anneaux de précipitation sont donc petits et il est difficile de les différencier des zones de diffusion dues à la concentration.

La mise au point de cette méthode nous a permis de déterminer la concentration en Lp(a) du plasma qui avait servi à son isolement. Nous avons pu ainsi constater que ce sujet (DUB... Roger) possédait une quantité très importante de Lp(a) dans son sérum estimée à 2,50 g par litre, c'est-à-dire très loin des valeurs maximales rapportées dans la littérature (6).

Nous avons pu, en outre, effectuer ce dosage dans le plasma de la fille et dans celui de l'épouse de ce patient. Alors que la mère ne possède que des traces non dosables de Lp(a) dans son plasma, la fille en possède également une concentration très élevée (1,17 g par litre).

Cette observation constitue, à notre connaissance, la première observation mondiale de l'hyper Lp(a) primitive et soulève le problème du caractère héréditaire de la transmission de l'anomalie.

C O N C L U S I O N

Nous présentons une nouvelle technique d'électrophorèse préparative des lipoprotéines plasmatiques.

Elle est simple et s'oppose aux autres méthodologies généralement longues et complexes qui, bien souvent, ne fournissent que des préparations impures et dénaturées.

Elle s'applique :

- à la séparation des LDL et des HDL à partir du plasma total,

- à la purification de la Lp(a) lipoprotéine à partir d'une fraction de lipoprotéine la contenant et préalablement isolée par ultracentrifugation de flottation.

Nous présentons en outre la composition chimique partielle de la Lp(a) et la préparation d'un immunsérum spécifique qui nous permet le dosage dans le plasma. Enfin, cet isolement nous fournit le matériel de base pour l'étude d'une protéine particulière spécifique de la Lp(a) et encore totalement inconnue.

CONCLUSION

Deux orientations sont données au travail présenté dans ce mémoire.

* Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux problèmes de typage des hyperlipémies et dans un but de recherche très appliquée, nous avons mis au point d'une part une méthode simple et précise d'appréciation quantitative des lipoprotéines sériques de basse densité, d'autre part une méthode de fractionnement électrophorétique des lipoprotéines sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu.

* Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés au problème de la purification des lipoprotéines.
La mise au point d'un appareil d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide nous a permis d'isoler les LDL, les HDL et la lipoprotéine Lp(a).
D'implication pathologique encore totalement inconnue, la lipoprotéine Lp(a) suscite actuellement de très nombreux travaux. Son obtention à l'état purifié nous a permis de faire l'étude partielle de sa composition chimique et de préparer un immunsérum spécifique anti-apo Lp(a). Une méthode de dosage immunologique de cette lipoprotéine par électroimmunodiffusion a alors été mise au point. En l'appliquant à l'étude des sujets dyslipoprotéinémiques de la Consultation des Maladies Métaboliques du Professeur JAILLARD, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois l'existence d'une hyper Lp(a) lipoprotéinémie et soulever la possibilité d'une transmission héréditaire de cette affection.

APPENDICE TECHNIQUE

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES LIPIDES

PRINCIPE

On fractionne par adsorption selon leur polarité, les mélanges de lipides principalement en classe de composés.

Le processus d'adsorption s'explique par le faible degré d'hydratation de l'adsorbant : gel de silice.

On utilise des plaques de verre sur lesquelles on fait couler l'adsorbant additionné d'un solvant fixe : l'eau.

REACTIFS

1) SOLVANTS CLASSES PAR FORCE D'ELUTION CROISSANTE

Ether de Pétrole,
Chloroforme,
Ether Ethylique,
Méthanol,
Eau.

L'addition d'acide acétique augmente considérablement la force d'élution.
Le choix des solvants est fait en fonction des fractionnements recherchés.

2) SOLUTION DE RHODAMINE 6 G

Rhodamine	10 mg
Méthanol	100 ml

3) IODE

MATERIEL ET METHODES

1) PLAQUES DE 20 x 20 mm

- dégraisser à l'éther ethylique ;
- mélanger dans un mortier :
  - . Gel de silice G (KIESELGEL G) 45 g
  - . Eau distillée 84 ml
- verser le mélange bien homogène dans l'étaleur automatique CAMAG ;
- laisser sécher les plaques à l'air.

2) CUVES DE DEVELOPPEMENT EN VERRE

- appliquer sur les 3 faces internes de la cuve, des bandes de papier Whatman n° 3, préalablement trempées dans l'éluant ;
- introduire le solvant approprié soit environ 200 ml ;
- laisser l'équilibre s'établir et au bout de 10 à 15 mn, commencer à développer.

3) TECHNIQUE

- réactiver des plaques 10 mn à 110° ;
- tracer au crayon, sur la plaque : 2 sillons latéraux extrêmes pour éviter les effets de distorsion et un à la partie supérieure de la plaque.

	LIPIDES APOLAIRES	LIPIDES POLAIRES
DEPOT	à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque à l'aide d'une seringue HAMILTON	
SOLVANT	Ether de pétrole 180ml Ether ethylique 20ml CH_3COOH pur 2 ml	Chloroforme 115 ml Méthanol 45 ml Ammoniaque 7 N 7,5 ml
REVELATION	Rhodamine 6 G : taches fluorescentes sous rayonnement ultra-violet à 360 nm Iode : taches brunes	
ELUTION	Repérage des taches Grattage du gel correspondant Eluer les lipides dans un mélange d'extraction choisi.	

BUS LILLE

DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

d'après RAHEJA et Coll. (152)

(1973) - Journal of Lipid Research. 14, 695.

PRINCIPE

Les phospholipides sont dosés sans minéralisation.

REACTIFS

1) METHANOL

2) CHLOROFORME

3) SOLUTION CHROMOGENE :

. Solution A :

Dissoudre 16 g de molybdate d'ammonium dans 120 ml d'eau.

. Solution B :

Prélever 80 ml de la solution A, ajouter 40 ml d' HCl concentré et 10 ml de mercure.
Agiter pendant 30 mn et filtrer.

. Solution C :

Mélanger 200 ml d'H_2SO_4 concentré au reste de la solution A et ajouter le mélange à la solution B.

. Solution chromogène proprement dit :

Prélever 25 ml de solution C, ajouter 45 ml de méthanol, 5 ml de chloroforme et 20 ml d'eau.

METHODE

Après fraction sur gel de silice et révélation par l'iode, les fractions phospholipidiques sont grattées et éluées par agitation avec 5 ml de chloroforme, 5 ml de méthanol. Après déphasage par addition de 4,5 ml d'eau, la phase inférieure chloroformique est récupérée et évaporée sous azote.

Le résidu sec est repris par 0,4 ml de chloroforme et 0,1 ml de solution chromogène. Le mélange est porté 85 secondes au bain-marie bouillant et après 10 mn de refroidissement à température ambiante, 5 ml de chloroforme sont ajoutés. Après agitation et repos de 30 mn, la lecture se fait à 710 nm contre un blanc témoin.

Des courbes d'étalonnage relatives aux différentes classes de phospholipides sont établies en utilisant des étalons traités dans les mêmes conditions. La teneur en phospholipides est lue sur la droite obtenue. L'étalonnage doit être effectué chaque fois que l'on prépare une nouvelle solution chromogène.

Il existe une relation linéaire entre la densité optique et la teneur en phosphore pour des valeurs comprises entre 1 et 10 µg de phosphore lipidique.

DOSAGE SIMULTANE DU CHOLESTEROL ET DES GLYCERIDES

SUR AUTOANALYSEUR II

d'après RUSH R.L., LEON L.P., TURREL J. (161)

Advances in automated analysis technicon.

Internation. Congress (1970)

PRINCIPE

1/ DOSAGE DES GLYCERIDES

La méthode de dosage des glycérides au moyen de l'autoanalyseur II utilise la réaction :

$$\text{GLYCERIDES} \xrightarrow{\text{saponification}} \text{GLYCEROL} \xrightarrow{\text{oxydation}} \text{FORMALDEHYDE}$$

$$\text{FORMALDEHYDE} \longrightarrow \text{3,5,DIACETYL-1,4,DIHYDROLUTIDINE}$$

en présence : - d'acétate d'ammonium
- d'acétylacétone.

Les glycérides des extraits lipidiques isopropanoliques sont saponifiés par la potasse alcoolique. Le glycérol libéré est oxydé en formaldéhyde par un réactif periodique. Le formaldéhyde est ensuite condensé avec les ions ammonium et l'acétylacétone en 3,5,diacétyl-1,4 dihydrolutidine fluorescente.

Après excitation à 405 nm, l'intensité de la fluorescence est appréciée à 485 nm.

2/ DOSAGE DU CHOLESTEROL

Les extraits lipidiques isopropanoliques sont introduits dans du réactif de LIEBERMANN, puis chauffés à 60°C dans un bain-marie où se produit le développement de la réaction colorée.

La coloration verte obtenue est lue à 630 nm.

REACTIFS

1) REACTIF DE COLORATION DU CHOLESTEROL

A 600 ml d'anhydride acétique, ajouter lentement 300 ml d'acide acétique glacial

Refroidir à + 4°C et ajouter avec précaution 100 ml d'acide sulfurique pré-refroidi en mélangeant constamment.

Stocker à + 4°C dans une bouteille sombre.

2) ISOPROPANOL A 99 % (MERCK 9634)

Il doit être exempt d'aldéhyde.

3) POTASSE 0,8 M.

KOH 45 g.

H_2O distillée qsp 1000 ml.

4) REACTIF AU PERIODATE

Dans une fiole jaugée de 1 litre : à 500 ml d'eau distillée ajouter lentement 115 ml d'acide acétique glacial.

Dissoudre 5,4 g de periodate de sodium et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

5) REACTIF A L'ACETYLACETONE

Mélanger 25 ml d'isopropanol à 99 % et 7,5 ml d'acétylacétone.

Les additionner à 500 ml d'acétate d'ammonium 2M amené à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique 2N.

Compléter à 1 litre avec l'acétate d'ammonium 2M de pH 6 et conserver en bouteille ambrée.

Le réactif doit être préparé chaque jour.

6) MELANGE ABSORBANT

Moudre 200 g de zéolite et la laisser sécher une nuit à 110° C.

Après refroidissement, ajouter : 20 g de réactif de Lloyd
20 g d'hydroxyde de calcium
10 g de sulfate de cuivre.

Mélanger par agitation.

7) SOLUTIONS ETALONS

Des solutions étalons combinées servant aux dosages simultanés du cholestérol et des glycérides, sont préparées à partir d'une solution-mère de cholestérol dans l'isopropanol (à 5 g/l) et de solutions de trioléine dans l'isopropanol contenant respectivement 50, 100, 150, 200, et 300 mg de trioléine pour 100 ml d'isopropanol.

Procéder selon le schéma suivant :

	Solutions de trioléine	Solution-mère de cholestérol	Isopropanol	Concentrations	
				cholestérol g/l	triglycérides g/l
1	0,5 ml	0	qsp 10 ml	0	0,5
2	0,5 ml	0	qsp 10 ml	0	1
3	0,5 ml	0,1 ml	qsp 10 ml	1	1,5
4	0,5 ml	0,2 ml	qsp 10 ml	2	2
5	0,5 ml	0,4 ml	qsp 10 ml	4	3

TRAITEMENT DES SERUMS

Pipetter 0,5 ml de sérum dans 9,5 ml d'isopropanol à 99 %.

Agiter au Vortex 30 secondes.

Ajouter 2 g de zéolite et agiter à nouveau 30 secondes au Vortex.

Laisser déposer 30 minutes, en agitant toutes les 10 minutes.

Centrifuger et recueillir le surnageant.

DOSAGE

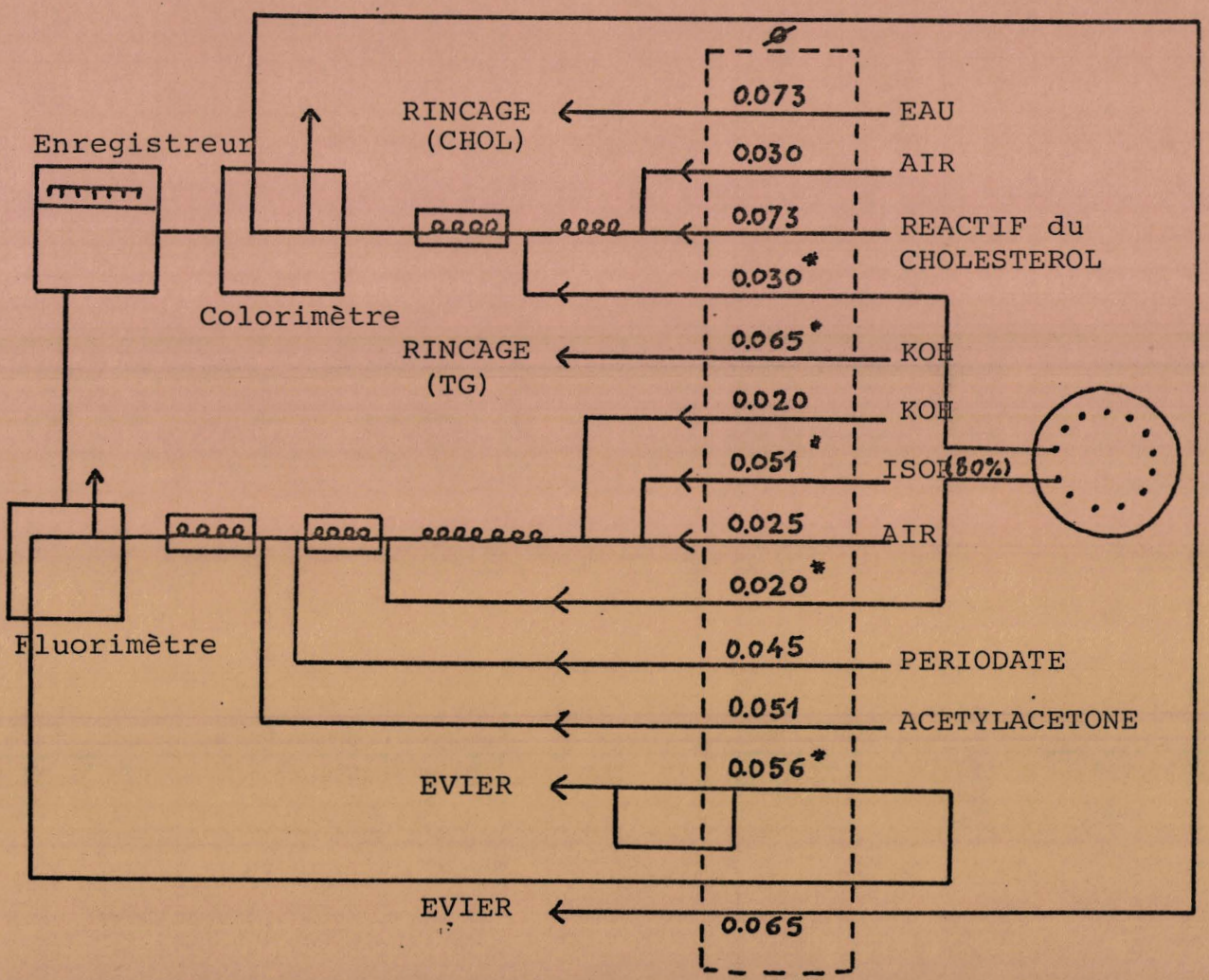
Le schéma de montage figure à la page suivante.

- pour le dosage des glycérides, établir la ligne de base sur l'eau puis sur les réactifs afin de dépister une fluorescence parasite.

- pour le dosage du cholestérol, la ligne de base est établie sur le réactif avec de l'isopropanol à la place de l'échantillon.

Dans les deux cas, l'expansion d'échelle est faite sur l'étalon le plus concentré.

* ACIDFLEX



SCHEMA DU MONTAGE POUR LE DOSAGE

SIMULTANE DES TRIGLYCERIDES ET DU CHOLESTEROL

BIUS LILLE

DOSAGE ENZYMATIQUE DU CHOLESTEROL LIBRE ET TOTAL EN FLUX CONTINU

d'après FRUCHART et Coll.(77)

(1976) - Clinica Chimica Acta. 63, 399.

PRINCIPE

Après dénaturation des lipoprotéines par l'hydroxypolyéthoxydodécane, le cholestérol libre est transformé en Δ_4-cholesténone par la cholestérol-oxydase en présence d'oxygène. Le peroxyde d'hydrogène formé dans la réaction oxyde le méthanol en formaldéhyde en présence de catalase et le formaldéhyde réagit avec l'acétylacétone et des ions ammonium pour former le 3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine dosée fluorimétriquement. Le cholestérol total est dosé selon le même principe mais les stérides sont hydrolysés au préalable par la cholestérol-estérase.

REACTIFS

1) Tampon phosphate d'ammonium 0,6 M pH 7.
   Méthanol 1,7 M.
   Catalase > 700 U/ml.

2) Acétylacétone 0,42 M.
   Méthanol 1,5 M.
   Hydroxypolyéthoxydodécane 2,2 %.

3) Cholestérol-estérase > 7 U/ml.

4) Cholestérol-oxydase > 4 U/ml.

5) Gamme étalon de cholestérol en solution aqueuse stabilisée (Préciset-Boehringer n° 15.730).

6) Solution de chlorure de sodium à 9 g/l.

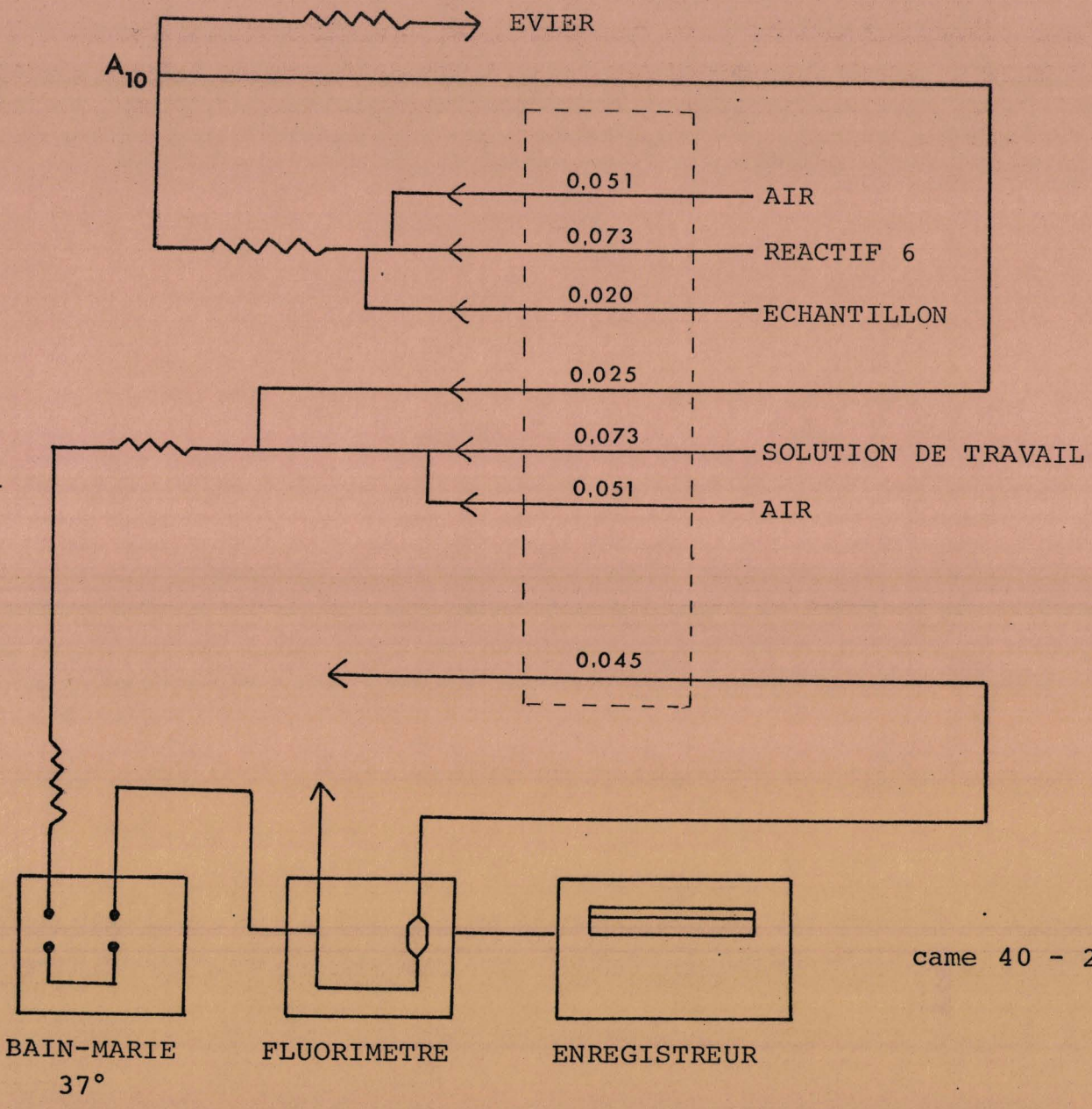
7) Solution de travail (à préparer extemporanément). Pour le dosage du cholestérol total, elle est obtenue en mélangeant les réactifs 1, 2, 3 et 4 dans les proportions 100/5/0,4 (v/v/v/v).

Pour le dosage du cholestérol libre, la solution de travail est préparée de la même façon mais le réactif 3 est remplacé par de l'eau distillée.

TECHNIQUE

Les dosages sont réalisés à l'Autoanalyseur Technicon AAI (selon le schéma p.195).

Le sérum ou les étalons dilués automatiquement avec du sérum physiologique sont mélangés à la solution de travail contenant les deux enzymes. L'incubation est réalisée à 37° C dans un bain-marie à double bobine. La fluorescence de la lutidine formée est appréciée à 485 nm après excitation à 405 nm. La cadence est de 40 dosages à l'heure avec un rapport temps de prélèvement/temps de rinçage de 2/1. La ligne de base de l'enregistreur est réglée sur l'eau distillée. L'expansion est faite sur l'étalon le plus concentré de la gamme choisie (4 g/l pour le cholestérol total, 2 g/l pour le cholestérol libre) en amenant l'index de l'enregistreur aux environs de la graduation 80 à l'aide du bouton d'expansion du fluorimètre. Dans ces conditions, les taux de cholestérol se déduisent de la courbe d'étalonnage après enregistrement automatique.



SCHEMA DE MONTAGE POUR LE DOSAGE ENZYMATIQUE

DU CHOLESTEROL LIBRE ET TOTAL EN FLUX CONTINU

BUS LILLE

DOSAGE DU CHOLESTEROL TOTAL ET DU CHOLESTEROL LIBRE PLASMATIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ LIQUIDE

d'après AMBERT et coll.(7)

(1976) - Clinica Chimica Acta. 68, 31.

PRINCIPE

Après extraction des lipides et déphasage, la phase organique contenant le cholestérol libre est injectée dans une colonne de verre contenant du Gas chrom Q 100/120 mesh imprégné de 3 % de phase apolaire O V 17. La séparation est réalisée à 260° C et la détection se fait par ionisation de flamme. Le pic correspondant au cholestérol est quantifié par rapport au pic d'un étalon interne de cholestane.

Le cholestérol total est dosé selon le même principe mais les stérides sont saponifiés au préalable par l'hydroxyde de tétraméthylammonium.

APPAREILLAGE

1 - Chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation et couplé à un intégrateur.
2 - Colonne de verre (longueur 0,75 m, diamètre interne 3,5 mm).

3 - Seringues à injection d'une contenance de 25 µl.

4 - Bain-marie réglé à 75° C.

REACTIFS

1 - Acétate d'éthyle.

2 - Hydroxyde de tétraméthylammonium (TMH en solution à 20 % dans le méthanol).

3 - Ether éthylique.

4 - Isopropanol.

5 - Méthanol.

6 - Chloroforme.

7 - 5 α cholestane (Sigma).

8 - Solution d'étalon interne :

5 α cholestane.....	25	mg
Ether éthylique.....	1,25	ml
Dissoudre puis compléter avec l'isopropanol.....q.s.p.....	100	ml

9 - Réactif d'extraction :

Solution d'étalon interne.....	20	ml
Méthanol.....	5	ml

10 - Réactif d'extraction et de saponification :

Solution d'étalon interne.....	20	ml
TMH à 20 %.....	5	ml

11 - Cholestérol purissime (Baker conservé sous Argon).

12 - Solution de cholestérol :

. Solution mère à 13 mmol/l

Cholestérol.....	502 mg
Isopropanol.....q.s.p.....	100 ml

. Solution de travail à 1,3 mmol/l

Solution mère.....	5 ml
Isopropanol.....q.s.p.....	50 ml

13 - Préparation et conditionnement de la colonne :
Avant le remplissage, le tube est rempli de Glass-Treet (Touzart et Matignon), rincé avec du méthanol et chauffé à 100° C pendant une nuit. Après mise en place de la phase stationnaire constituée de Gas-Chrom Q 100/120 mesh imprégné de 3 % d'O V 17, les extrémités du tube sont fermées avec de la laine de verre silanisée.

La colonne est conditionnée 1 heure à 290° C sans gaz vecteur puis deux jours à 260° C avec gaz vecteur (N_2).

TECHNIQUE

- Dans des tubes à centrifuger de 15 ml à bouchage hermétique, mesurer :

	Etalonnage		Dosage	
	5,2 mmol/l	10,4mmol/l*	Total	Libre
Solution de cholestérol (ml)				
- à 1,3 mmol/l	1	-	-	-
- à 2,6 mmol/l	-	1	-	-
Evaporer à sec				
Eau distillée (ml)	0,25	0,25	-	-
Sérum ou plasma (ml)	-	-	0,25	0,25
Réactif d'extraction et de saponification (ml)	1	1	1	-
Réactif d'extraction (ml)	-	-	-	1

* : facultatif

BUS UNIL

Agiter pendant 10 secondes.
Placer à 75° C pendant 20 mn. Refroidir.
Dans chaque tube mesurer : acétate d'éthyle : 1,5 ml
eau distillée : 3,5 ml
Agiter, centrifuger pendant 5 mn à 1000 xg. Recueillir le surnageant prêt à être injecté dans l'appareil.

- Les conditions de la chromatographie sont les suivantes :
Température de colonne : 260° C
Température de l'injecteur : 290° C
Température du détecteur : 300° C
Débit d'hydrogène : 45 ml/mn
Débit d'air : 600 ml/mn
Atténuation : 100x2
Volume injecté : 3 µl

CALCUL

Sur le chromatogramme, après la réponse du détecteur au solvant, apparaissent successivement le pic de cholestane et celui du cholestérol en dernier 10 à 15 minutes après l'injection.

Etablir le rapport :

$$R = \frac{\text{Surface du pic de cholestérol (1,3 µmol)}}{\text{Surface du pic de cholestane}}$$

Les concentrations mmolaires en cholestérol total et libre sont obtenues selon les formules :

$$\text{Cholestérol total (en mmol/l)} = \frac{\text{Surface du pic cholestérol total}}{\text{Surface du pic cholestane}} \times \frac{1,3 \times 4}{R}$$

$$\text{Cholestérol libre (en mmol/l)} = \frac{\text{Surface du pic cholestérol libre}}{\text{Surface du pic cholestane}} \times \frac{1,3 \times 4}{R}$$

APPLICATION DE LA PRECIPITATION SELECTIVE DES LIPOPROTEINES PAR LES POLYANIONS ET DETERGENTS A LA QUANTIFICATION DES LDL ET HDL PLASMATIQUES

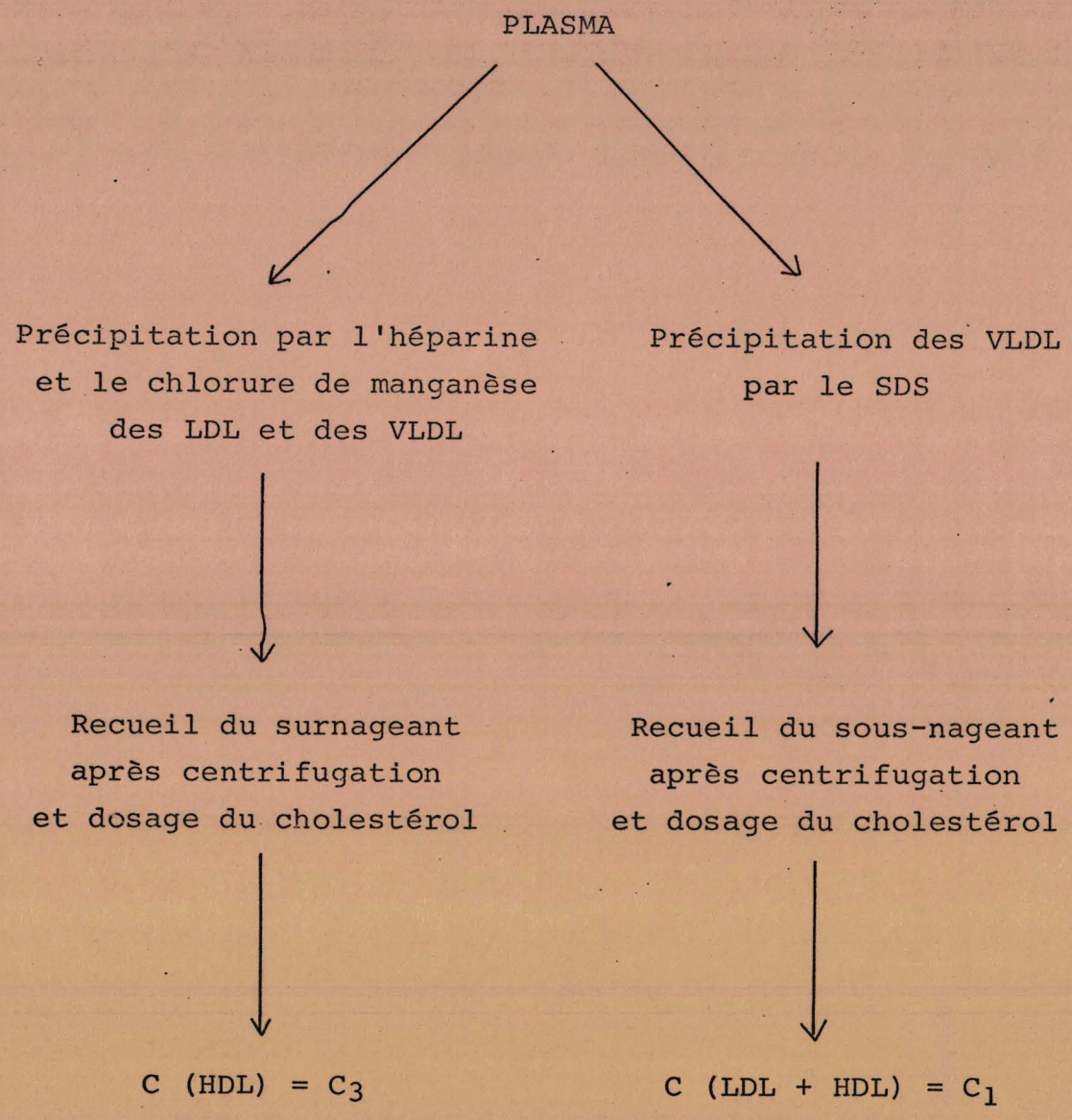
d'après une adaptation par WILSON et SPIGER de la méthode de FREDRICKSON et coll.(204)

(1973) - J. Lab. Clin. Med. 82, 473.

PRINCIPE

Après fractionnement des lipoprotéines par deux étapes de précipitation, le cholestérol de chaque fraction est dosé. A partir des valeurs obtenues, le taux de cholestérol contenu dans les HDL et les LDL est calculé.

- Le principe de la précipitation est résumé dans le schéma 1 (p.202).
- Le dosage du cholestérol est effectué par chromatographie gaz-liquide (appendice technique, p.196).



C_3 = C (HDL)

$C_1 - C_3$ = C (LDL)

SCHEMA 1 : PRECIPITATION SELECTIVE DES LIPOPROTEINES

BUS LILLE

REACTIFS

1) SOLUTION DE LAURYLSULFATE DE SODIUM (SDS)

. SDS.....	10	g
. NaCl 0,15 M, pH 9,0.....	100	ml

La solution est ajustée à pH 9 avec de la soude N.

2) SOLUTION DE CHLORURE DE MANGANESE

. $MnCl_2$ 1 M.....	19,8	g
. Eau distillée.....	100	ml

3) HEPARINATE DE SODIUM (Prolabo)

TECHNIQUE

- Pour la séparation des HDL, 3 ml de plasma sont mélangés avec 0,15 ml de solution de $MnCl_2$ et 6 mg d'héparinate de sodium. Après 24 h à + 4° C, les VLDL et les LDL forment un précipité qui est éliminé par centrifugation à + 4° C et à 3 000 g pendant 20 minutes. Le cholestérol est dosé sur le surnageant, soit C_3.

- Pour la séparation des VLDL et chylomicrons éventuels, 2 ml de plasma sont mélangés à 0,15 ml de la solution de SDS et le mélange est incubé 2 h au bain-marie à 35° C. Après centrifugation à 3 000 g pendant 15 minutes, le sous-nageant est récupéré et le cholestérol est dosé, soit C_1.

CALCUL

C_{HDL} est obtenu directement (C_3).

$C_{LDL} = C\ (LDL + HDL) - C\ (HDL)$ soit $C_1 - C_3$.

DOSAGE DES HEXOSES

d'après la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (184)

modifiée par RIMINGTON (156)

PRINCIPE

Par chauffage en présence d'acide sulfurique, les hexoses libèrent des chromogènes dérivés du furfural qui, par condensation avec l'orcinol donnent une coloration brun-orangé.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oses.

REACTIFS

1) SOLUTION D'ORCINOL

Dissoudre 1,5 g d'orcinol dans une solution aqueuse d'H_2SO_4 pur à 30 p. 100 (v/v) et compléter à 100 ml.

La solution d'orcinol doit être conservée à 0° C et dans des flacons en verre pyrex. Généralement, elle laisse déposer des cristaux que l'on redissout au bain-marie.

2) SOLUTION A 60 p. 100 D'H_2SO_4 CONCENTRE (v/v)

3) SOLUTIONS D'OSES POUR "TEMOINS INTERNES"

Solution mère contenant 100 mg d'oses totaux pour 100 ml d'eau bidistillée. Cette solution se conserve à - 20° C après avoir été additionnée de quelques gouttes de chloroforme et d'une goutte de HCl.

Solution-témoin contenant 100 µg d'oses par ml, obtenue par dilution au 1/10 de la solution-mère.

Elle est également conservée en présence de chloroforme et d'acide chlorhydrique et peut se garder 1 mois à 0° C.

DEVELOPPEMENT DE LA REACTION

Dans des tubes à hémolyse très propres sont introduits, 100 µl de la solution à doser (ou extrait sec repris par 100 µl d'eau bidistillée), 200 µl de la solution d'orcinol et 1,5 ml de la solution d'H_2SO_4 à 60 p. cent.

Les tubes sont maintenus 20 minutes exactement dans un bain-marie réglé à 80° C $\pm$ 2° C.

Ils sont ensuite refroidis sous un courant d'eau et placés à l'obscurité pendant 45 minutes.

L'absorbance de chacune des solutions est déterminée à 510 nm.

RESULTATS

Pour des quantités égales des différents oses, les absorbances varient. La solution de référence utilisée pour les dosages est constituée d'un mélange en quantités égales de galactose et de mannose dans des rapports de concentration identiques aux rapprots molaires des différents oses.

La quantité d'oses totaux présents dans la solution est donnée en mg par ml, par la formule suivante :

$$\frac{A_X}{A_{100} \times 10}$$

où A_X = absorbance de la solution à titrer

A_{100} = absorbance de 100 µg d'ose(s) pure(s) de la solution témoin

DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

d'après la méthode de NIAZI et STATE (141)

modifiée par WERNER et ODIN (197)

PRINCIPE

Les acides sialiques, acide N-acétyl-neuraminique surtout, sous l'action des acides présents dans le réactif à la diphénylamine sont rapidement désacétylés et décarboxylés en 2-désoxy-4-amino-octose. Ce composé subit ensuite une dégradation plus poussée avec formation d'un chromogène dont la condensation à la diphénylamine fournit une coloration bleue-violacée qui présente un maximum d'absorption à 530 nm.

Cette méthode s'applique aux acides sialiques conjugués.

REACTIFS

1) SOLUTIONS AQUEUSES D'ACIDE TRICHLORACETIQUE (ATCA)

Solutions à : 5,0 g/100 ml
7,5 g/100 ml
et 15,0 g/100 ml

2) REACTIF A LA DIPHENYLAMINE

Dissoudre 5 g de diphénylamine pure dans un mélange de 450 ml d'acide acétique pur et 50 ml d'acide sulfurique pur.

Le réactif se conserve à 2° C et à l'obscurité. Si des cristaux se forment, on les redissout par chauffage dans un bain-marie tiède.

3) SOLUTIONS TITREES D'ACIDE SIALIQUE

Dissoudre 100 µg d'acide N-acétyl-neuraminique dans 1 ml d'eau bidistillée. Cette solution étalon est additionnée d'une goutte de HCl concentré et de chloroforme et conservée à 2° C.

DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

Dans des tubes à essais très propres, on introduit l'échantillon à doser et les solutions étalon et l'une des solutions d'ATCA dans un volume final de 300 µl. La concentration finale en ATCA doit être de 5 p. 100 (p/v).

Aux 300 µl de solution ainsi obtenue, on ajoute 0,6 ml du réactif à la diphénylamine.

Les tubes sont soigneusement agités et placés au bain-marie bouillant pendant 30 minutes.

Ils sont ensuite refroidis et maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes.

La mesure des absorbances est effectuée à 530 nm et la coloration est stable à l'obscurité pendant 6 heures.

RESULTATS

Les différents acides sialiques ne donnent pas à quantité égale, la même absorbance. Il est donc important de préciser la composition de la solution étalon lors de l'expression des résultats, ou d'utiliser des solutions contenant les mêmes acides sialiques et à concentrations identiques que la solution à doser.

La quantité d'acides sialiques totaux (en mg par ml) est calculée par la formule suivante :

$$\frac{A_x}{A_{100} \times 10}$$

où A_x = absorbance donnée par 1 ml de la solution à doser

A_{100} = absorbance donnée par 100 µg d'acides sialiques.

DOSAGE DES PROTEINES

d'après la méthode de LOWRY (125)

modifiée par DAUGHADAY et coll. (56)

PRINCIPE

Il repose sur la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin, en présence du complexe formé en milieu alcalin entre les ions Cu^{2+} et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines. Il se développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle au taux de protéines. L'absorbance est mesurée à 750 ou 500 nm.

REACTIFS

1) SOLUTION_A

Solution de Na_2CO_3 à 2 % (p/v) dans de la soude 0,1 M et contenant 0,02 % (p/v) de tartrate double de Na et de K.

2) SOLUTION_B

Solution de $CuSO_4$, 5 H_20 à 0,5 % (p/v) dans de l'eau distillée.

3) SOLUTION C

Solution de travail préparée par un mélange de 50 volumes de solution A et de 1 volume de solution B.

Elle se conserve une journée.

4) REACTIF DE FOLIN-CIOCALTEU (Merck)

A diluer au 1/2 avec de l'eau bidistillée.

5) ETALONS DE SERUMALBUMINE*

Une gamme d'étalonnage de 5 à 200 µg de sérumalbumine/ml est réalisée par dilution dans de l'eau bidistillée d'une solution mère de sérumalbumine bovine titrant 200 µg/ml.

MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse très propre, introduire 0,2 ml de la solution à doser et 1 ml de la solution C.

Agiter et laisser 10 minutes au moins à température ambiante.

Ajouter ensuite 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et mélanger immédiatement.

La coloration se développe en 30 minutes à l'obscurité.

L'absorbance de la solution est mesurée :

- à 750 nm pour les étalons titrant 5 à 25 µg/ml,
- à 500 nm pour les étalons titrant 50 à 200 µg/ml.

* Sérumalbumine bovine Pentex - Laboratoire Miles

RESULTATS

Une droite d'étalonnage C = k A (A = absorbance et C = concentration) permet de relier directement l'absorbance d'une solution à son taux de protéines exprimé en µg/ml.

SEPARATION DES APOPROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE DODECYLSULFATE DE SODIUM

d'après une adaptation de la méthode de WEBER et OSBORN (195)

PRINCIPE

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). Le détergent réagit avec les protéines et les complexes micellaires formés se séparent en fonction du poids moléculaire de la protéine ; il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et la mobilité électrophorétique.

REACTIFS

- Acrylamide (p.a.)
- N, N'-méthylène-bisacrylamide (p.a.)
- Phosphate monosodique (p.a.) ($H_2 NaPO_4, 2H_2O$)
- Phosphate disodique (p.a.) ($HNa_2 PO_4, 12H_2O$)
- Dodécylsulfate de sodium (p.a.) (SDS)
- Persulfate d'ammonium (p.a.)
- N, N, N', N'-tétraméthyléthylénediamine (p.a.) (TEMED)

- Glycérol bidistillé (p.a.)
- Lysozyme (Boehringer Mannheim France)
- Isopropanol (p.a.)
- Acide acétique (p.a.)
- Amidoschwartz 10 B (p.a.)
- Bleu de bromophénol (p.a.)

APPAREILLAGE

- Cuve thermostatée pour électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Polyanalyst, Buchler Instruments*) reliée à un cryostat réglé à + 17° C.

- Tubes de verre de 75 mm de long, 7 mm de diamètre extérieur et 5 mm de diamètre intérieur.

- Dispositif d'agitation (Prolabo).

MODE OPERATOIRE

1) PREPARATION DES GELS

Les compositions des différentes solutions utilisées pour la préparation des gels sont données dans le tableau I . Elles se conservent à + 4° C en bouteille sombre.

La solution de gel est obtenue en mélangeant extemporanément 15 ml de solution II avec : 13 ml de solution I, 2 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 1 % (p/v) et 30 µl de TEMED.

* OSI, 15 rue de Javel, 75739 PARIS CEDEX 15

Elle est coulée dans les tubes de verre sur une hauteur de 65 mm. Une goutte d'eau est déposée, avec précaution et en évitant tout mélange, au dessus de la solution pour pallier la formation d'un ménisque lors de la polymérisation qui se fait en 1 heure à température du laboratoire. Cette goutte d'eau est ensuite éliminée par absorption sur papier filtre.

2) PREPARATION DU TAMPON D'ELECTROPHORESE

Le tampon d'électrophorèse (solution III) est préparé suivant les indications du tableau I . Il se conserve à + 4° C et peut être utilisé pendant une semaine à raison de 2 migrations par semaine.

3) PREPARATION ET DEPOT DES ECHANTILLONS

Avant l'électrophorèse, 100 µl d'une solution contenant 5 g de protéines par litre d'échantillon à analyser ou de solution protéique servant de référence sont mélangés volume à volume avec une solution de SDS (à la concentration de 2 % p/v dans la solution II dilué au 1/5).

Ce mélange est porté au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, puis additionné d'une goutte de glycérol et d'une goutte d'une solution de bleu de bromophénol à 0,05 % (p/v) dans la solution II diluée au 1/5. Le glycérol évite, lors de la mise en route de l'électrophorèse, la diffusion des protéines dans le tampon et le bleu de bromophénol sert de témoin de migration.

Une fraction aliquote de 20 µl du mélange ainsi obtenu, qui contient 40 µg de protéines, est déposée au sommet du gel et les tubes sont remplis de tampon d'électrophorèse, avec précaution, de manière à ne pas mélanger les 2 solutions.

4) MIGRATION

Les tubes sont introduits dans la cellule d'électrophorèse thermostatée, de manière à ce que leur extrêmité inférieure baigne dans le tampon.

La partie supérieure de la cellule est remplie de tampon et la migration électrophorétique s'effectue sous une intensité constante de 5 mA par tube pendant 4 H 30 à 5 heures, temps nécessaire pour que le bleu de bromophénol se situe à 10 mm environ de l'extrêmité inférieure du tube.

5) COLORATION ET DECOLORATION

Après démoulage, les gels sont colorés d'après une adaptation de la méthode de FAIRBANKS (64), sous une faible agitation dans une solution à 0,01 % d'amidoschwartz dans l'isopropanol à 2,5 % contenant 10 % d'acide acétique glacial.

La décoloration s'effectue par diffusion dans de l'acide acétique à 10 % sous agitation. Dans ces conditions, au bout de 48 heures, le fond des gels est parfaitement incolore.

6) CONSERVATION

Les gels peuvent être conservés, à l'abri de la lumière, dans de l'acide acétique à 7 % ou dans l'eau distillée.

TABLEAU I : Composition des différentes solutions utilisées pour la préparation des gels et du tampon d'électrophorèse.

Solutions	I Solution d'acrylamide	II Tampon phosphate 0,05 M - SDS 2 % pH 7,1	III Tampon phosphate 0,025M - SDS 1 % pH 7,1
Acrylamide	22,5 g		
Bis-acrylamide	0,63 g		
Phosphate monosodique		8,81 g	8,81 g
Phosphate disodique		51,5 g	51,5 g
S D S		2 g	2 g
Eau distillée q.s.p.	130 ml	1000 ml	2000 ml

RESULTATS

L'analyse d'un mélange de lysozyme, d'antitrypsine, de sérumalbumine, de RNA-polymérase β, d'albumine d'oeuf et de chymotrypsine permet de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et la mobilité électrophorétique de chacune des protéines (figure 1, p. 220).

Le RM correspond à la mobilité électrophorétique rapportée à celle du lysozyme et choisie arbitrairement comme étant égale à 1.

Les correspondances suivantes sont obtenues :

	R M	P M
Lysozyme	1	14 300
Antitrypsine	0,89	21 500
Sérumalbumine	0,42	68 000
RNA-polymérase β	0,10	160 000
Albumine d'oeuf	0,59	45 000
Chymotrypsine	0,77	25 000

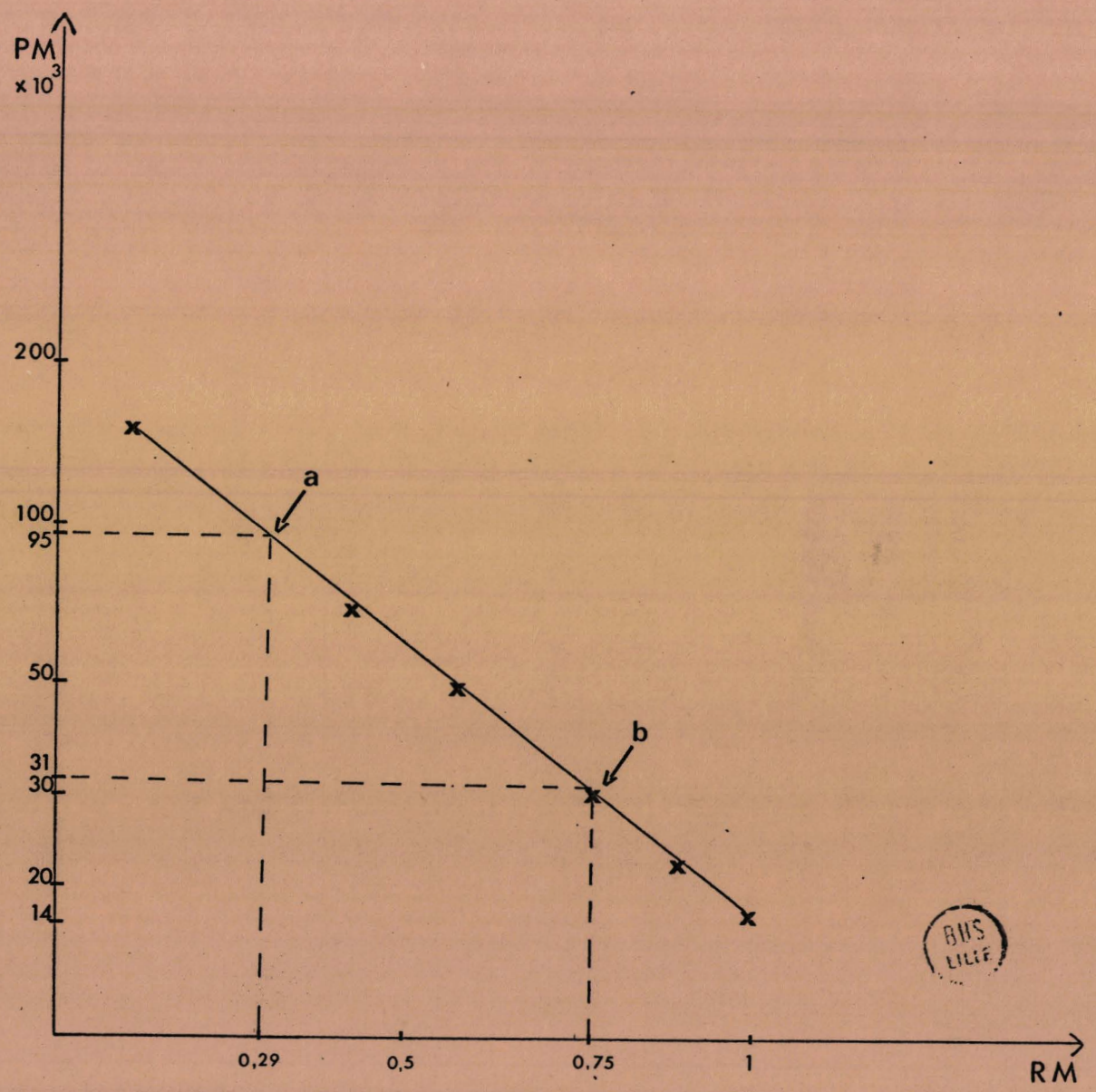
L'électrophorèse de la lipoprotéine Lp(a) délipidée met en évidence les différentes apoprotéines entrant dans la composition de sa copule protéique (figure34 , page 174 , tube C).

Par rapport à des migrations témoins de sérumalbumine et d'apo-C (tubes A et B), les bandes de migration correspondant à ces 2 protéines sont facilement localisées (a, b).

Deux autres bandes (c et d) pourraient correspondre à l'apoprotéine Lp(a) spécifique de la lipoprotéine et, si l'on se reporte à la figure 1, à des valeurs de RM respectives de 0,29 et 0,75 correspondent des protéines de PM 95 000 et 31 000.

FIGURE 1

DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PROTEINES EN FONCTION DE LEUR MOBILITE ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS



BUS LILLE

IMMUNOELECTROPHORESE SELON LA METHODE DE LAURELL

APPLICATION AU DOSAGE DE LA Lp(a) LIPOPROTEINE

d'après LAURELL (115)

(1966) - Analytical Biochemistry. 15, 45.

PRINCIPE

Une séparation électrophorétique de l'antigène est effectué dans un gel d'agar auquel on incorpore préalablement un immun-sérum monospécifique.

Une réaction antigène-anticorps se développe pendant la migration de l'antigène. Il y a formation d'un pic de précipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en antigène.

REACTIFS

1) SOLUTION TAMPON

Dissoudre 20,6 g de véronal sodé et 3,5 g de véronal acide dans environ 4 litres d'eau distillée.
Ajuster le pH à 8,6 avec de la soude ou de l'acide acétique, puis compléter à 5 litres avec de l'eau distillée.

2) SOLUTION D'AGAROSE A 2 % (p/v) DANS LE TAMPON

Dissoudre par chauffage au bain-marie bouillant :

Agarose Serva*	2	g
Solution tampon pH 8,6	100	ml
Azoture de sodium	0,1	g

3) SOLUTION COLORANTE

Dissoudre 5 g de bleu de Coomassie dans le solvant suivant :

Alcool 95°	450	ml
Acide acétique	100	ml
Eau distillée	450	ml

Laisser reposer une nuit à température ambiante.
Filtrer et conserver à l'abri de la lumière.

4) SOLUTION DECOLORANTE

Mélanger :

Alcool éthylique 95°	450	ml
Acide acétique	100	ml
Eau distillée	450	ml

APPAREILLAGE

Plaques de verre (20,5 x 11 cm)
Table horizontale réglable
Bain-marie réglé à 54° C ± 1° C
Emporte-pièces de 3 mm de diamètre
Microseringue de 5 µl
Chambre d'électrophorèse comprenant 2 bacs à électrodes et une plaque réfrigérée par serpentin à circulation d'eau (Behring Institute - 10 rue Clément Marot - PARIS 75008).

* Agarose pur Feinbiochemica (Heidelberg)

Siphon pour l'égalisation des niveaux du tampon
Redresseur de courant avec voltmètre.

Mode opératoire appliqué au dosage de la Lp(a) lipoprotéine dans le plasma

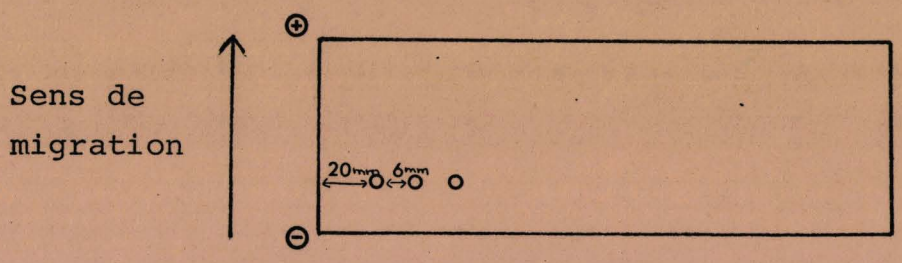
- Confection des plaques

Sur les plaques dégraissées à l'éther, on coule une "couche d'imprégnation" (une goutte de la solution d'agarose à 2 % étalée au pinceau) destinée à retenir le gel lors des lavages.

Ce gel, d'une concentration de 1 % est obtenu en diluant au 1/2 la solution d'agarose à 2 % avec l'immunsérum en solution dans le tampon pH 8,6 ; le mélange se fait à 54 - 55° C avec des solutions ramenées préalablement à cette température.

30 ml de gel, ainsi préparé, sont coulés par plaque.

La plaque est ensuite portée au réfrigérateur pendant environ 10 minutes. Lorsque le gel est pris, on creuse des puits de 3 mm de diamètre selon le schéma suivant :



- Préparation des étalons

Le taux de protéines de la solution lipoprotéique purifiée est déterminé par dosage selon la méthode de LOWRY (p. 211). Le coefficient de transformation en taux de lipoprotéine est de 2,8

Une gamme d'étalonnage est réalisée en incorporant différentes quantités connues de cette solution standard à un plasma choisi arbitrairement mais Lp(a-).

Une gamme d'étalonnage est ainsi réalisée ; elle correspond à 25, 50, 75 et 100 mg de Lp(a) pour 100 ml de plasma.

- Dépôt de l'antigène et des étalons

A l'aide d'une microseringue, 5 µl de chaque étalon et de plasma sont déposés dans les puits. Le plasma est pur ou dilué dans du tampon pH 8,6.

- Migration

Un champ électrique uniforme est créé sur toute la plaque au moyen de ponts de papier de même épaisseur que le gel. Immergés dans le tampon d'électrophorèse, ils sont posés sur la couche de gel.

Deux fois deux litres de tampon sont versés dans les bacs à électrodes équilibrées avec un régulateur de niveau.

La migration se fait à 4° C pendant 24 heures à raison de 3 volts/cm.

- Lavage et dessication du gel

. Séchage du gel

Lorsque l'électrophorèse est arrêtée, le gel de la plaque est recouvert d'une feuille de papier buvard pendant 10 à 15 mn.

. Elimination des protéines excédentaires

Elle s'obtient par les lavages suivants :

- 2 lavages successifs pendant 15 min. dans une solution de NaCl 0,1 M,
- 1 lavage pendant 15 min. dans de l'eau distillée.

. Dessication du gel

Après séchage du gel obtenu comme précédemment, la plaque est portée dans une étuve ventilée à air chaud (60° C). Lorsque le gel est bien déssé-ché, la plaque est ramenée à température ambiante.

- Coloration

La coloration des pics de précipitation est obtenue par immersion de la plaque pendant 10 minutes dans la solution colorante.

- Décoloration

La décoloration du fond nécessite le passage de la plaque dans 3 bains successifs de la solution décolorante ; chaque rinçage demande environ 10 minutes.

RESULTATS

Le taux d'antigène du plasma étudié (en mg/100 ml de plasma) est calculé directement à partir de la droite d'étalonnage établie en reportant les hauteurs en mm (ou les carrés des hauteurs) des pics étalons en fonction des quantités d'antigène incorporées.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALAUPOVIC P., KOSTNER G., LEE D.M., MAC CONATHY W.J., MAGNANI H.N. (1972)

In "Exposés annuels de Biochimie Médicale", p. 145, P. BOULANGER et coll. (Eds) Masson, Paris

2 - ALAUPOVIC P., LEE D.M., MAC CONATHY W.J. (1972)

Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins.

Biochim. Biophys. Acta, 260 : 689

3 - ALAUPOVIC P., SANBAR S.S., FURMAN R.H., SULLIVAN M.L., WALRAVEN S.L. (1966)

Studies of the composition and structure of sérum lipoproteins. Isolation and characterization of very high density lipoproteins of human serum.

Biochemistry, 5 : 4044

4 - ALBERS J., ALADJEM F. (1971)

Precipitation of 125_I labeled lipoproteins with specific polypeptide antisera. Evidence for two populations with differing polypeptide compositions in human high density lipoproteins.

Biochemistry, 10 : 3436

5 - ALBERS J.J., CABANA V.G., WARNICK G.R., HAZZARD W.R. (1975)

Lp(a) lipoprotein : relationship to sinking-preβ -lipoprotein, hyperlipoproteinemia, and apolipoprotein B.

Metabolism, 24 : 1047

6 - ALBERS J.J., HAZZARD W.R. (1974)

Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein .

Lipids, 9 : 15

7 - AMBERT J.P., CAHOUR A., HARTMANN L. (1976)

Dosage en deux temps du cholestérol total et du cholestérol libre plasmatiques par chromatographie gaz-liquide.

Clin. Chim. Acta, 68 : 31

8 - BARCLAY M., BARCLAY R.K., TEREBUS-KEKISH O., SILAH E.B., SKIPSKI V.P. (1963)

Disclosure and characterization of new high-density lipoproteins in human serum.

Clin. Chim. Acta, 8 : 721

9 - BARCLAY M., ESCHER G.C., KAUFMAN R.J., TEREBUS-KEKISH O., GREENE E.M., SKIPSKI V.P. (1964)

Serum lipoproteins and human neoplastic disease.

Clin. Chim. Acta, 10 : 39

10 - BAUTOVITCH G.J., SIMONS L.A., WILLIAMS P.F., TURTLE J.R. (1975)

Radioimmunoassay of human plasma apolipoproteins.

Atherosclerosis, 21 : 217

11 - BEAUMONT J.L., CARLSON L., COOPER G., FEJFAR E., FREDRICKSON D., STRASSER T. (1970)

Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias.

Bull. Wlth. Org., 43 : 891

12 - BERG K. (1963)

A new serum type system in man-The Lp system.

Acta Path. Microbiol. Scand., 59 : 369

13 - BERG K. (1968)

The Lp system.

Ser. Haematol., 1 : 111

14 - BERG K., DAHLEN G. FRICK M-H. (1974)

Lp(a) lipoprotein and pre-β_1-lipoprotein in patients with coronary heart disease.

Clin. Genet., 6 : 230

15 - BERNFELD P. (1955)

Interaction of plasma proteins with polyelectrolytes.

Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 14 : 182

16 - BERNFELD P.,DONAHUE V.M., BERKOWITZ M.E. (1957)

Interaction of human serum β-lipoglobulin with polyanions.

J. Biol. Chem., 226 : 51

17 - BERNFELD P., KELLEY T.F. (1964)

Proteolysis of human serum β - lipoprotein.

J. Biol. Chem., 239 : 3341

18 - BERNFELD P., NISSELBAUM J.S., BERKELEY B.J., HANSON R.W. (1960)

The influence of chemical and physicochemical nature of macromolecular polyanions on their interaction with human serum β-lipoproteins.

J. Biol. Chem., 235 : 2852

19 - BIERMAN E.L., GORDIS E., HAMLIN J.T. (1962)

Heterogeneity of fat particles in plasma during alimentary lipemia.

J. Clin. Invest., 41 : 2254

20 - BIERMAN E.L., PORTE D., O'HARA D.D., SCHWARTZ M., WOOD F.C. (1965)

Characterization of fat particles in plasma of hyperlipemic subjects maintened on fat free high-carbohydrate diets.

J. Clin. Invest., 44 : 261

21 - BLASIUS R., SEITZ W. (1952)

Die Beeinflussung der Elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von Serum-Globulinen durch Zusatz von Heparin.

Klin. Wochenschr., 30 : 905

22 - BLATON V., PEETERS H. (1966)

Chromatography on new DEAE-cellulose derivates - II The separation of human serum lipoproteins.

Protids of the biological fluids, 14 : 659

23 - BLATON V., PEETERS H. (1967)

Stability of lipoproteins during gel filtration.

Protids of the biological fluids, 15 : 585

24 - BLIX G., TISELIUS A., SVENSSON H. (1941)

Lipids and polysaccharides in electrophoretically separed blood-serum proteins.

J. Biol. Chem., 137 : 485

25 - BOQUILLON M., PARIS R., CLEMENT J. (1972)

Composition, particle size and role in dietary fat transport of two different lipoproteins of the intestinal lymph.

Lipids, 7 : 414

26 - BRAGDON J.H., HAVEL R.J., BOYLE E. (1956)

Human serum lipoproteins. Chemical composition of four fractions.

J. Lab. Clin. Med., 48 : 36

27 - BROWNSTONE A.D. (1969)

A versatile system for preparative electrophoresis in acrylamide gel.

Anal. Biochem., 27 : 25

28 - BUASSA-bu-TSUMBU (1975)

Automatisation en fluorimétrie du dosage enzymatique du cholestérol : applications cliniques.

Mémoire pour le Diplôme d'Etudes et de Recherche en Biologie Humaine, Faculté de Médecine LILLE

29 - BUASSA-bu-TSUMBU (1975)

Apport de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et des tests de précipitation sélective des lipoprotéines à l'exploration des hyperlipidémies.

Thèse pour le Doctorat en Médecine LILLE

30 - BURSTEIN M. (1962)

Précipitation sélective d'une fraction de lipoprotéines sériques de densité élevée par le sulfate de dextrane en présence de chlorure de magnésium et de saccharose.

Life Sci., 1 : 739

31 - BURSTEIN M. (1963)

Isolement des lipoprotéines sériques de faible densité après floculation par le phosphotungstate de soude à pH neutre en présence de chlorure de magnésium.

Nouv. Rev. Fr. Hématol., 3 : 139

32 - BURSTEIN M., BERLINSKI M. (1960)

Dosage turbidimétrique des β-lipoprotéines du sérum après floculation par le polyvinil-pyrrolidone.

Rev. Fr. Etud. Clin. Biol., 5 : 193

33 - BURSTEIN M., MORFIN R. (1968)

Précipitation des lipoprotéines sériques de faible densité par des polyphosphates et le chlorure de calcium à pH neutre.

Nouv. Rev. Fr. Hématol., 8 : 65

34 - BURSTEIN M., MORFIN R. (1968)

Précipitation des lipoprotéines sériques en présence de détergents anioniques et de protamine, ou de détergents cationiques et d'héparine.

Rev. Fr. Etud. Clin. Biol., 13 : 274

35 - BURSTEIN M., MORFIN R. (1971)

Détergents anioniques et lipoprotéines sériques.

Nouv. Rev. Fr. Hématol., 11 : 173

36 - BURSTEIN M., PRAWERMAN A. (1959)

Précipitation des β-lipoprotéines et des chylomicrons par le polyvinyl-pyrrolidone.

Pathol. Biol., 7 : 1035

37 - BURSTEIN M., SAMAILLE J. (1955)

Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine in vitro.

C.R. Acad. Sci., 241 : 664

38 - BURSTEIN M., SAMAILLE J. (1957)

Rev. Hématol., 5 : 679

39 - BURSTEIN M., SAMAILLE J. (1959)

Nouvelle méthode de séparation et de dosage des lipoprotéines de faible densité.

Ann. Biol. Clin., 17 : 23

40 - BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R. (1970)

Isolement d'anticorps de lapin contre les protéines du sérum humain à partir du précipité spécifique après adsorption des antigènes par le sulfate de baryum à pH acide.

Nouv. Rev. Fr. Hématol., 10 : 181

41 - BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R. (1973)

Lipoprotein metal interactions.

Advan. Lipid Res., 11 : 67

42 - BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R. (1973)

Turbidimetric estimation of chylomicrons and very low density lipoproteins in human sera after precipitation by sodium lauryl sulfate.

Biomedicine, 19 : 16

43 - BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R., MORFIN R. (1970)

Rapid method for the isolation of lipoproteins from human sera by precipitation with polyanions.

J. Lipid Res., 11 : 583

44 - CANAL J. (1974)

Dosage immunologique des lipoprotéines sériques. Aspects théoriques et pratiques.

In : Immunochimie clinique, LYON 1974, Simep Editions

45 - CANAL J., DELATTRE J., LEGRAND A., GIRARD M.L. (1974)

Détermination par voie automatique des lipides sériques du bloc (bêta + pré-bêta) lipoprotéines.

Path. et Biol., 22 : 173

46 - CANAL J., DELATTRE J., LEGRAND A., ROUSSELET F., GIRARD M.L. (1975)

Dosage différentiel par précipitation sélective des alpha, bêta et pré-bêta-lipoprotéines : réalisation automatique.

In : Automatisation et Biologie Prospective, 3e colloque, octobre 1975, PONT A MOUSSON

47 - CANAL J., GIRARD M.L. (1968)

Mécanisme de la fixation des polysaccharides sulfatés sur les lipoprotéines : rôle des phospholipides.

Bull. Soc. Chim. Biol., 50 : 1523

48 - CARLSON L.A. (1960)

Chromatographic separation of serum lipoproteins on glass powder columns.

Clin. Chim. Acta, 5 : 528

49 - CARLSON L.A. (1973)

Plasma lipids and atherosclerosis.

J. Clin. Path., Suppl. 5 : 43

50 - CHARMAN R.C., BRAUELER C. (1973)

An evaluation of cellulose acetate electrophoresis for the determination of human plasma lipoprotein patterns.

Atherosclerosis, 17 : 483

51 - CHHABIRANI M., MUKHERJEE S. (1971)

Chemical and immunological characterization of serum lipoproteins isolated by glass-column chromatography.

Experientia, 28 : 1295

52 - COHN E.J., GURD F.R.N., SURGENOR D.M., BARNES B.A., BROWN R.K., DEROUAUX G., GILLEPSIE J.M., KAHNT F.W., LEVER N.F., LIN C.H., MITTELMAN D., MOUTON R.F., SCHID K., UROMA E. (1950)

A system for the separation of the components of human blood : quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma.

J. Amer. Chem. Soc., 72 : 465

53 - CORNWELL D.G., KRUGER F.A., HAMWI G.J., BROWN J.B. (1961)

Studies on the characterization of human serum lipoproteins separated by ultracentrifugation in a density gradient. Serum lipoproteins in normal, hyperthyroïd and hypercholesterolemic subjects.

Amer. J. Clin. Nutr., 9 : 24

54 - CRAMER K., BRATTSTEN I. (1961)

Characterization of β -lipoproteins isolated from HAP columns.

J. Atheroscler. Res., 1 : 335

55 - DAHLEN G., ERICSON C., FURBERG C., LUNDKVIST L., SVÄRDSUND K. (1972)

Studies on an extra pre-beta-lipoprotein fraction.

Acta med. scand., Suppl. 531

56 - DAUGHADAY W.H., LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FIELDS W.S. (1952)

Determination of cerebrospinal fluid protein with the Folin phenol reagent.

J. Lab. Clin. Med., 39 : 663

57 - DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J., SEZILLE G. (1976)

Analyse des lipoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par précipitation fractionnée à l'aide de polyanions et de détergents.

Ann. Biol. Clin., 34 : 309

58 - DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J., SEZILLE G. (1977)

Fractionation of serum lipoproteins by preparative electrophoresis in polyacrylamide gel.

J. of Chromatogr., 130 : 336

59 - DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., MOSCHETTO Y., DEWAILLY P., SEZILLE G., JAILLARD J. (1976)

Application de l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide à l'isolement des lipoprotéines sériques.

13e Congrès Mondial de la Société Internationale pour l'Etude des Corps Gras.
Communication faite à MARSEILLE le 30 août 1976

60 - DEUTSCH D.G., FOGLEMAN D.J., von KAULLA K.N. (1973)

Isolation of lipids from plasma by affinity chromatography.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 50 : 758

61 - EHNHOLM C., GAROFF H., RENKONEN O., SIMONS K. (1972)

Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma.

Biochemistry, 11 : 3229

62 - EHNHOLM C., GAROFF H., SIMONS K., ARO H. (1971)

Purification and quantitation of the human plasma lipoprotein carrying the Lp(a) antigen.

Biochim. Biophys. Acta, 236 : 431

63 - EWING A.M., FREEMAN N.K., LINDGREN F.T. (1965)

Analysis of human serum lipoprotein distributions.

Adv. Lipid Res., 3 : 25

64 - FAIRBANKS G., STECK L., WALLACH D.F.H. (1971)

Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.

Biochemistry, 10 : 2606

65 - FARISH E., SHEPHERD J., LAWRIE T.D.V., MORGAN H.G. (1975)

Plasma apolipoprotein A levels in healthy human adults.

Clin. Chim. Acta, 62 : 97

66 - FIELDING C.J., SHORE V.G., FIELDING P.E. (1972)

A protein cofactor of lecithin-cholesterol acyltransferase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 46 : 1493

67 - FLODIN P. (1962)

Dextrans gels and their application in gel filtration.

Pharmacia, uppsala.

68 - FLODIN P., KILLANDER J. (1962)

Fractionation of human-serum proteins by gel filtration.

Biochim. Biophys. Acta, 63 : 403

69 - FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G.H. (1957)

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. Biol. Chem., 226 : 497

70 - FRANZINI C. (1966)

Gel filtration behaviour of human serum lipoproteins.

Clin. Chim. Acta, 14 : 576

71 - FREDRICKSON D.S., LEES R.S. (1965)

System for phenotyping hyperlipoproteinemia.

Circulation, 31 : 321

72 - FREDRICKSON D.S., LEVY R.I., LEES R.S. (1967)

Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders.

New Eng. J. Med., 276 : 32, 94, 148, 215, 273

73 - FRICK M.H., DAHLEN G., FURBERG C., ERICSON C., WILJASALO M. (1974)

Serum pre- β_1 lipoprotein fraction in coronary athero - sclerosis.

Acta med. scand. 195 : 337

74 - FRINGS C.S., FOSTER L.B., COHEN P.S. (1971)

Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel.

Clin. Chem., 17 : 111

75 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, DEWAILLY P. (1975)

Estimation turbidimétrique des lipoprotéines de basse densité et ses applications.

3e Colloque International de PONT A MOUSSON, Biologie Prospective, 6-10 octobre 1975

76 - FRUCHART J.C., BUASSA-bu-TSUMBU, DEWAILLY P., JAILLARD J., SEZILLE G. (1976)

Lipoprotéines de basse et de très basse densité : estimation turbidimétrique et applications cliniques.

Nouvelle Presse Médicale, 26 : 1641

77 - FRUCHART J.C., BUASSA-bu-TSUMBU, JAILLARD J., SEZILLE G. (1975)

Automation en fluorimétrie du dosage enzymatique du cholestérol total sérique.

Clin. Chim. Acta, 63 : 399

78 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G., JAILLARD J. (1975)

Quantitative and qualitative analysis of lipoproteins. Colloque International "of lipoproteins and hyperlipemies" LISBONNE du 3 au 6 septembre 1975

79 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, DEWAILLY P. (1976)

Méthodes d'étude des lipoprotéines sériques.

Journées Nationales de Biologie, GRENOBLE, p. 99, 7 et 8 février 1976

80 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., JAILLARD J., SEZILLE G. (1974)

Intérêt clinique du lipidogramme sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration dans l'exploration des dyslipémies.

LILLE Médical, 19 : 927

81 - FRUCHART J.C., SEZILLE G., JAILLARD J., DECOOPMAN E., DESREUMAUX C. (1974)

Hyperlipémies et lipoprotéinogrammes.

LILLE Médical, 19 : 84

82 - FURMAN R.H., HOWARD R.P., LAKSHMI K., NORCIA L.N. (1961)

The serum lipids and lipoproteins in normal and hyperlipidemic subjects as determined by preparative ultracentrifugation.

Amer. J. Clin. Nutr., 9 : 73

83 - GAROFF H., SIMONS K., EHNHOLM C., BERG K. (1970)

Demonstration by disc electrophoresis of the lipoprotein carrying the Lp(a) antigen in human sera.

Acta path. microbiol. scand., 78 : 253

84 - de GENNES J.L. (1971)

Classification simplifiée des hyperlipidémies idiopathiques.

Presse Médicale, 79 : 791

85 - GIRARD M.L., CANAL J. (1975)

Méthodes d'études des lipoprotéines sériques.

Colloque International "Lipoprotéines et Hyperlipémies". LISBONNE, septembre 1975

86 - GIRARD M.L., CANAL J., DELATTRE J. (1972) .

Réalisation automatique du dosage des bêta-lipoprotéines sériques par voie néphélométrique.

In : Automatisation et Biologie Prospective, 2e Colloque, octobre 1972, PONT A MOUSSON

87 - GOFMAN J.W., LINDGREN F.T., ELLIOTT H.A. (1949)

Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum.

J. Biol. Chem., 179 : 973

88 - GORDON A.H. (1962)

The catabolic rate of albumin doubly labelled with ^{131}I and ^{14}C in the isolated perfused rat liver.

Biochem. J., 82 : 531

89 - HAGENFELDT L. (1966)

A gas-chromatographic method for the determination of individual free fatty acids in plasma.

Clin. Chim. Acta, 13 : 266

90 - HALL F.F., RATLIFF C.R., WESTFALL C.L., CULP T.W. (1972)

Serum lipoprotein electrophoresis : an improved polyacrylamide procedure.

Biochem. Med., 6 : 464

91 - HARVIE N.R., SCHULTZ J.S. (1970)

Studies of Lp-lipoprotein as a quantitative genetic trait.

P. N. A. S., 66 : 99

92 - HATCH F.T., FREEMAN N.K., JENSEN L.C., STEVENS G.R., LINDGREN F.T. (1967)

Ultracentrifugal isolation of serum chylomicron-containing fractions with quantitation by infrared spectrometry and NCH elemental analysis.

Lipids, 2 : 183

93 - HATCH F.T., LEES A.S. (1968)

Practical methods for plasma lipoprotein analysis.

Advan. Lipid Res., 6 : 1

94 - HATCH F.T., LINDGREN F.T., ADAMSON G.L., JENSEN L.C., WONG A.W. (1973)

Quantitative agarose gel electrophoresis of plasma lipoproteins : a simple technique and two methods of standardization.

J. Lab. Clin. Med., 82 : 473

95 - HAVEL R.J., EDER H.A., BRAGDON J.H. (1955)

The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.

J. Clin. Invest., 34 : 1345

96 - HELSKELL C.L., FISK R.T., FLORSHEIM W.H., TACHI A., GROODMAN J.R., CARPENTER C.M. (1961)

A simple method for quantitation of serum beta-lipoproteins by means of the immunocrit.

Amer. J. Clin. Path., 35 : 222

97 - HERBERT P.N., FORTE T.M., SHULMAN R.S., GONG E.L., LA PIANA M.J., NICHOLS A.V., LEVY R.I., FREDRICKSON D.S. (1973)

Selective loss of apolipoproteins upon ultracentrifugation of very low density lipoproteins (VLDL).

Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 32 : 548 A

98 - HINTON R.H., KOWALSKI A.J., MALLINSON A. (1973)

Choice of conditions for the gradient flotation of serum lipoproteins in swing-out rotors.

Clin. Chim. Acta, 44 : 267

99 - HJERTEN S., JERSTEDT S., TISELIUS A. (1965)

Electrophoretic "Particle Sieving" in polyacrylamide gels as applied to ribosomes.

Anal. Biochem., 11 : 211

100 - HOCH M., CHANUTIN A. (1952)

Effects of anticoagulants on serum and plasma.

J. Biol. Chem., 197 : 503

101 - HODSON A.W., LATNER A.L. (1971)

An automated preparative gel electrophoresis apparatus.

Anal. Biochem., 41 : 522

102 - HUISMANDS B.D. (1971)

Häufigkeit dobbelter Prä-Beta-Banden in der Lipid-elektrophorese auf Membranfolien bei Gefässkranken.

Z. klin. Chem., 9 : 176

103 - JAILLARD J., SEZILLE G., FRUCHART J.C., DESREUMAUX C. (1976)

Apport de l'électrophorèse des lipoprotéines en gel de polyacrylamide au typage des hyperlipoprotéinémies.

Cahiers de Nutrition et de Diététique, 5 : 66

104 - JAMES K., STANWORTH D.R. (1964)

Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl (DEAE) - cellulose. I - The effect of the chemical and physical nature of the exchanger.

J. of Chromatogr., 15 : 324

105 - JENCKS W.P., HYATT M.R., JETTON M.R., MATTINGLY T.W., DURRUM E.L. (1956)

J. Clin. Invest., 35 : 980

106 - JOVIN T., CHRAMBACH A., NAUGHTON M.A. (1964)

An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem., 9 : 351

107 - KAHAN J., SUNDBLAD L. (1969)

Immunochemical determination of beta-lipoproteins.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 24 : 61

108 - KALAB M., MARTIN W.G. (1968)

Gel filtration of native and modified pig serum lipoproteins.

J. of Chrom., 35 : 230

109 - KÄLLBERG M., LINDEN L., GUSTAFSON A. (1976)

Studies on an additional pre- β -lipoprotein, sinking pre- β (SPB). II - Fatty acid composition of lipid moieties.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 36 : 59

110 - KESSLER G., LEDERER H. (1966)

Fluorimetric measurement of triglycerides.
In : Automation in analytical chemistry.
Technicon Symposium. NEW YORK.Media Inc. p. 341

111 - KOSTNER G.M., PETEK W., HOLAZEK A. (1974)

Immunochemical measurement of lipoprotein-X.

Clin. Chem., 20 : 676

112 - KUNKEL H.G., SLATER R.J. (1952)

Lipoprotein patterns of serums obtained by zone electrophoresis.

J. Clin. Invest., 31 : 684

113 - LACKO L., KORINEK J., BURGER M. (1959)

The interaction of antibiotics of the tetracyclinic type with serum lipoproteins.

Clin. Chim. Acta, 4 : 800

114 - LA ROSA J.C., LEVY R.I., HERBERT P., LUX S.E., FREDRICKSON D.S. (1970)

A specific apoprotein activator of lipoprotein lipase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 41 : 57

115 - LAURELL C.B. (1966)

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Anal. Biochem., 15 : 45

116 - LEES R.S. (1970)

Immunoassay of plasma low density lipoproteins.

Science, 169 : 493

117 - LEES R.S., HATCH F.T. (1963)

Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin containing buffer.

J. Lab. Clin. Med., 61 : 518

118 - LEVY R.I., FREDRICKSON D.S. (1965)

Heterogeneity of plasma high density lipoproteins.

J. Clin. Invest., 44 : 426

119 - LINDEN L., KÄLLBERG M., GUSTAFSON A., DAHLEN G. (1976)

Studies on an additional pre-β-lipoprotein, sinking pre-β (SPB). I - Isolation and characterization.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 36 : 51

120 - LINDGREN F.T., JENSEN L.C., WILLS R.D., FREEMAN N.K. (1969)

Flotation rates, molecular weights and hydrated densitie of the low-density-lipoproteins.

Lipids, 4 : 337

121 - LINDGREN F.T., JENSEN L.C., WILLS R.D., STEVENS G.R. (1972)

Subfractionation of S_f 4-10^5, S_f 4-20 and high density lipoproteins.

Lipids, 7 : 194

122 - LINDGREN F.T., NICHOLS A.V. (1960)

Structure and function of human serum lipoproteins

In : Plasma proteins, P. 252, vol. II, LONDRES, 1960, Putnam ed, Academic Press)

123 - LOPEZ S.A., SRINIVASAN S.R., DUGAN R.S., RALILAKRISHNANURTHY B., BERENSON G.S. (1971)

Detection of subtil abnormalities of serum beta and pre-beta-lipoproteins in "normal" individuals by turbidimetric and electrophoretic methods.

Clin. Chim. Acta, 31 : 123

124 - LOSSOW W.J., LINDGREN F.T., MURCHIO J.C., STEVENS G.R., JENSEN L.C. (1969)

Particle size and protein content of six fractions of the $S_f > 20$ plasma lipoproteins isolated by density gradient centrifugation.

J. Lipid Res., 10 : 68

125 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193 : 265

126 - MAC CONATHY W.J., ALAUPOVIC P. (1974)

Studies on the interaction of concanavalin A with major density classes of human plasma lipoproteins. Evidence for the specific binding of lipoproteins B in its associated and free forms.

Febs Letters, 41 : 174

127 - MAC CONATHY W.J., ALAUPOVIC P., CURRY M.D., MAGNANI H.N., TORSVIK H., BERG K., GJONE E. (1973)

Identification of lipoprotein families in familial lecithin cholesterol acyltransferase deficiency.

Biochim. Biophys. Acta, 326 : 406

128 - MACHEBOEUF M. (1929)

Bull. Soc. Chim. Biol., 11 : 268

129 - MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H. (1974)

An electrophoretic method for the quantitative isolation of human and swine plasma lipoproteins.

Biochemistry, 13 : 1964

130 - MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H., FRY D.L. (1973)

Canine lipoproteins and atherosclerosis.

Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 32 : 294

131 - MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F. (1965)

Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion.

Immunochemistry, 2 : 235

132 - MANDL R.H., PEETERS H. (1958)

Protids of the Biological Fluids, Proc. 5th Colloq., BRUGES, 1957, Elsevier, AMSTERDEM, 1958, P. 81.

133 - MARCEAU N., BLAIS R., BALAUX N. (1975)

A practical design of an elution system for preparative electrophoresis in polyacrylamide gel.

Anal. Biochem., 68 : 17

134 - MARGOLIS S. (1967)

Separation and size determination of human serum lipoproteins by agarose gel filtration.

J. Lipid Research, 8 : 501

135 - MEAD M.G., DANGERFIELD W.G. (1974)

The investigation of "mid-band" lipoproteins using polyacrylamide gel electrophoresis.

Clin. Chim. Acta, 51 : 173

136 - MISHKEL M.A., NAZIR D.J., CROWTHER S. (1975)

A longitudinal assessment of lipid ratios in the diagnosis of type III hyperlipoproteinemia.

Clin. Chim. Acta, 58 : 121

137 - MONTREUIL J., SPIK G. (1963)

Microdosage des glucides. Monographie n° 1 : méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux.

Faculté des Sciences - LILLE

138 - NARAYAN K.A., CREININ H.L., KUMMEROW F.A. (1966)

Disc electrophoresis of rat plasma lipoproteins.

J. Lipid Res., 7 : 150

139 - NARAYAN K.A., DUDACEK W.E., KUMMEROW F.A. (1966)

Disc electrophoresis of isolated rat-serum lipoproteins.

Biochim. Biophys. Acta, 125 : 581

140 - NARAYAN K.A., NARAYAN S., KUMMEROW F.A. (1965)

Disc electrophoresis of human serum lipoprotein.

Nature, 205 : 246

141 - NIAZI S., STATE D. (1948)

The diphenylamine reaction of human serum.

Cancer Research, 8 : 653

142 - NISHIDA T.J., COGAN U. (1970)

Nature of the interaction of dextran sulfate with low density lipoproteins of plasma.

J. Biol. Chem., 245 : 4689

143 - NOBLE R.P. (1968)

Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel.

J. Lipid Res., 9 : 693

144 - O'HARA D.D., PORTE D., WILLIAMS R.H. (1966)

Use of constant composition polyvinyl-pyrrolidone columns to study the interaction of fat particles with plasma.

J. Lipid Res., 7 : 264

145 - ONCLEY J.L., WALTON K.W., CORNWELL D.G. (1955)

128th Meet. Amer. Chem. Soc., MINNEAPOLIS, P. 41 C.

146 - ONCLEY J.L., WALTON K.W., CORNWELL D.G. (1957)

A rapid method for the bulk isolation of β-lipoproteins from human plasma.

J. Amer. Chem. Soc., 79 : 4666

147 - OSE L., KALAGER T., GRUNDT I.K. (1976)

Serum beta-lipoprotein subfractions in polyacrylamide gel electrophoresis associated with coronary heart disease.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 36 : 75

148 - OUCHTERLONY O. (1958)

Diffusion in gel methods for immunological analysis.

Progr. Allergy, 5 : 1

149 - PAPADOPOULOS N.M., BEDYNEK J.L. (1973)

Serum lipoprotein patterns in patients with coronary atherosclerosis.

Clin. Chim. Acta, 44 : 153

150 - PRATT J.J., DANGERFIELD W.G. (1969)

Polyacrylamide gels of increasing concentration gradient for the electrophoresis of lipoproteins.

Clin. Chim. Acta, 23 : 189

151 - QUARFORDT S.H., NATHANS A., DOWDEE M., HILDERMAN H.L. (1972)

Heterogeneity of human very low density lipoproteins by gel filtration chromatography.

J. Lipid Res., 13 : 435

152 - RAHEJA R., KAUR C., SINGH A., BHATIA I. (1973)

New colorimetric method for the quantitative estimation of phospholipid without acid digestion.

J. Lipid Res., 14 : 695

153 - REDGRAVE T.G., ROBERTS D.C.K., WEST C.E. (1975)

Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation.

Anal. Biochem., 65 : 42

154 - REZNICK A.Z., ALLEN H.J., WINZLER R.J. (1973)

Sequential elution of proteins in small volumes by preparative polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem., 52 : 395

155 - RIDER A.K., LEVY R.I., FREDRICKSON D.S. (1970)

"Sinking" pre-beta-lipoprotein and Lp antigen.

Circulation, 42, Suppl. 3 : 10

156 - RIMINGTON C. (1931)

Biochem. J., 25 : 1062

157 - RITTNER C., WICHMANN D. (1967)

Zur Genetic des Lp-Systems-Nachweis der erblichen quantitativen Merkmalssteuerung sowie einer pränatalen Selektion.

Humangenetik, 5 : 42

158 - ROELCKE D., KRAH E., FAHIMIAN A. (1968)

Die Unterteilbarkeit menschlicher Lipoproteine niederer Dichte (LDL) hinsichtlich ihrer Lp(a) - Eigenschaft durch Ionenaustauscher-Saülen Chromatographie.

Blut., 18 : 160

159 - RUCHEL R., BRAGER M.D. (1975)

Scanning electron microscopic observations of polyacrylamide gels.

Anal. Biochem., 68 : 415

160 - RUDEL L.L., LEE J.A., MORRIS M.D., FELTS J.M. (1974)

Characterization of plasma lipoproteins separated and purified by agarose column chromatography.

Biochem. J., 139 : 89

161 - RUSH R.L., LEON L., TURREL J. (1970)

Automated simultaneous cholesterol and triglyceride determination on the Autoanalyser II instrument.

Advances in automated analysis, 1 : 503

162 - SATA T., ESTRICH D.L., WOOD P.D.S., KINSELL L.W. (1970)

Evaluation of gel chromatography for plasma lipoprotein fractionation.

J. Lipid Res., 11 : 331

163 - SATA T., HAVEL R.J., JONES A.L. (1972)

Characterization of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hyperlipemic humans.

J. Lipid Res., 13 : 757

164 - SCANU A., CUMP E., TOTH J., KOGA S., STILLER E., ALBERS L. (1970)

Degradation and reassembly of a human serum high-density lipoprotein. Evidence for differences in lipid affinity among three classes of polypeptide chains.

Biochemistry, 9 : 1327

165 - SCANU A.M., EDELSTEIN C. (1971)

Solubility in aqueous solutions of ethanol of the small molecular weight peptides of the serum very low density and high density lipoproteins.

Anal. Biochem., 44 : 576

166 - SCANU A., GRANDA J.L. (1966)

Effects of ultracentrifugation on the human serum high-density lipoproteins.

Biochemistry, 5 : 446

167 - SCHONFELD G., LEES R.S., GEORGE P.K., PFLEGER B. (1974)

Assay of total plasma apolipoprotein B concentration in human subjects.

J. Clin. Invest., 53 : 1458

168 - SCHONFELD G., PFLEGER B. (1974)

The structure of human high density lipoprotein and the levels of apoprotein A_1 in plasma as determined by radioimmunoassay.

J. Clin. Invest., 54 : 236

169 - SCHULTZ J.S., SHREFFLER D.S., HARVIE N.R. (1968)

Genetic and antigenic studies and partial purification of human serum lipoprotein carrying the Lp antigenic determinant.

Proc. Nat. Acad. Sci., 61 : 963

170 - SCHULTZ J.S., SHREFFLER D.S., SING C.F. (1974)

The genetics of the Lp antigen-I. Its quantitation and distribution in a sample population.

Ann. Hum. Genet., Lond., 38 : 39

171 - SEGAL A.W., PUTMAN D., MINCHIN-CLARKE H.G. (1973)

Nitroblue tetrazolium : a new lipoprotein stain.

Atherosclerosis, 18 : 499

172 - SEIDEL D. (1971)

A new immunochemical technique for a rapid semi-quantitative determination of the abnormal lipoprotein (LpX) characterizing cholestasis.

Clin. Chim. Acta, 31 : 225

173 - SEIDEL D., WIELAND H., RUPPERT C. (1973)

Improved techniques for assessment of plasma lipoprotein patterns : precipitation in gels after electrophoresis with polyanionic compounds.

Clin. Chem., 19 : 737

174 - SEZILLE G., FRUCHART J.C., JAILLARD J., DEWAILLY P., DESREUMAUX C. (1975)

Improved serum lipoprotein electrophoresis procedure in polyacrylamide gradient gel.

Biomedicine, 23 : 315

175 - SHEPHERD J., PACKARD C.J., DRYBURGH F.J., THIRD J.L. (1975)

Diagnosis of type III hyperlipoproteinemia by chromatography of plasma lipoproteins on columns containing agarose.

Clin. Chem., 21 : 1887

176 - SHORE V.G., SHORE B. (1973)

Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components.

Biochemistry, 12 : 502

177 - SIMONS K., EHNHOLM C., RENKONEN O., BLOTH B. (1970)

Characterization of the Lp(a) lipoprotein in human plasma.

Acta path. microbiol. scand., 78 : 459

178 - SING C.F., SCHULTZ J.S., SHREFFLER D.D. (1974)

The genetics of the Lp antigen-II. A family study and proposed models of genetic control.

Ann. Hum. Genet., Lond., 38 : 47

179 - SKIPSKI V.P., BARCLAY M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J., ARCHIBALD F.M. (1967)

Lipid composition of human serum lipoproteins.

Biochem. J., 104 : 340

180 - SNYDER F., BLANK M.L., WYKLE R.L. (1971)

The enzymic synthesis of ethanolamine plasmalogens.

J. Biol. Chem., 246 : 3639

181 - SOBER H.A., GUTTER F.J., WYCKOFF M.M., PETERSON E.A. (1956)

Chromatography of proteins. II - Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose.

J. Amer. Chem. Soc., 78 : 756

182 - STOCKER M.A., BERGE K.G., ELVEBACK L.R., CONNOLY D.C., JIMENEZ B.J., ELLEFSON R.D. (1972)

Abnormal lipoproteins as predictors of atherosclerotic disease.

Circulation, Suppl., 2 : 277

183 - SWAHN B. (1952)

A method for localization and determination of serum lipids after electrophoretical separation and filter paper.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 4 : 52

184 - TILLMANS J., PHILLIPPI K. (1929)

Über den Gehalt der Wichtigsten Proteine der Nahrungsmittel an Kohlehydrat und über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Stickstofffneiem Zucker in Eiweiß.

Biochem. Z., 215 : 36

185 - UTERMANN G., LIPP K., WIEGANDT H. (1972)

Studies on the Lp(a) lipoprotein of human serum - IV : the disaggregation of the Lp(a) lipoprotein.

Humangenetik, 14 : 142

186 - UTERMANN G., WIEGANDT H. (1969)

Darstellung und Characterisierung einer Lipoproteins mit Antigenwirksamkeit im Lp-System.

Humangenetik, 8 : 39

187 - UTERMANN G., WIEGANDT H. (1970)

Disk-electrophoretischer Nachweis des Lp(a)-Proteins in Lipoproteinfraktionen.

Humangenetik, 11 : 66

188 - VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T. (1971)

A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.

J. Clin. Endocr., 33 : 988

189 - VIIKARI J., HAAHTI E., HELELÄ T.T., JUVA K., NIKKARI T. (1969)

Fractionation of plasma lipoproteins with preparative zonal ultracentrifugation.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 23 : 85

190 - VIIKARI J., PELLINIEMI T.T. (1974)

Fractionation of plasma lipoproteins by density gradient centrifugation in swing-out rotors.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 34 : 67

191 - VLOEDMAN D.A., NAJMI M., INSULL W. (1972)

Relation of the plasma pre-beta-lipoprotein subfraction to the severity of coronary artery disease.

Circulation, Suppl. 2 : 170

192 - VOGELBERG K.H., UTERMANN G., GRIES F.A. (1973)

Zur Differenzierung des Lp(a)-Lipoproteins mit Hilfe der Agarosegel Electrophorese.

Z. klin. Chem. Klin. Biochem., 11 : 291

193 - WADA M., NAITO H.K., EHRHART L.A., LEWIS L.A. (1973)

Polyacrylamide-gel block-electrophoresis of plasma lipoproteins.

Clin. Chem., 19 : 235

194 - WALTON K.W., HITCHENS J., MAGNANI H.N., KHAN M. (1974)

A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and of its significance in health hyperlipidoemia and atherosclerosis.

Atherosclerosis, 20 : 323

195 - WEBER K., OSBORN M. (1969)

The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem., 244 : 4406

196 - WERNER M. (1967)

Estimation of blood lipoproteins by radial immunodiffusion after agarose gel filtration.

J. of Chromatogr., 28 : 59

197 - WERNER I., ODIN L. (1952)

On the presence of sialic acid in certain glycoproteins and in gangliosides.

Acta Soc. Med. upsaliensis, 57 : 230

198 - WIEGANDT H., LIPP K., WENDT G.G. (1968)

Identifizierung einer Lipoproteins mit Antigenwirksamkeit im Lp-System.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 349 : 489

199 - WIELAND H., SEIDEL D. (1973)

Improved techniques for assessment of plasma lipoprotein patterns.

Clin. Chem., 19 : 1139

200 - WILCOX H.G., DAVIS D.C., HEIMBERG M. (1971)

The isolation of lipoproteins from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors.

J. Lipid Res., 12 : 160

201 - WILCOX H.G., HEIMBERG M. (1968)

The isolation of human serum lipoproteins by zonal ultracentrifugation.

Biochim. Biophys. Acta, 152 : 424

202 - WILCOX H.G., HEIMBERG M. (1970)

Isolation of plasma lipoproteins by zonal ultracentrifugation in the B_{14} and B_{15} titanium rotors.

J. Lipid Res., 11 : 7

203 - WILSON D.E., DONE G.A. (1974)

Dual precipitation methods for lipoprotein quantitation. Improvement by membrane ultrafiltration of lipemic samples.

Clin. Chem., 20 : 394

204 - WILSON D.E., SPIGER M. (1973)

A dual precipitation method for quantitative plasma lipoprotein measurement without ultracentrifugation.

J. Lab. Clin. Med., 82 : 473

TABLE DES MATIERES

Page

I N T R O D U C T I O N 1

R E V U E G E N E R A L E 4

REVUE GENERALE SUR LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES 5

INTRODUCTION 7

LES LIPIDES PLASMATIQUES 8

LES CARACTERISTIQUES DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES .. 11

A - Définition des lipoprotéines 11

B - Classification des lipoprotéines 12

C - Répartition quantitative des lipoprotéines ... 18

D - Composition des lipoprotéines 18

E - Biosynthèse et sécrétion des lipoprotéines ... 26

. Au niveau de la muqueuse intestinale ... 26

. Au niveau du foie 29

F - Destinée des lipoprotéines circulantes 31

. Destinée des chylomicrons 31

. Destinée des VLDL 34

. Destinée des HDL 37

G - Conclusion 39

PRINCIPALES ANOMALIES DE REPARTITION DES LIPOPROTEINES 40

ETUDE CRITIQUE DES PRINCIPALES METHODES D'ETUDE DES LIPOPROTEINES 42

INTRODUCTION 43

ULTRACENTRIFUGATION 47

A - Principe 47

B - Ultracentrifugation analytique 49

C - Ultracentrifugation préparative 51

D - Conclusions 53

ELECTROPHORESE 54

A - Introduction 54

B - Electrophorèse sur papier 56

C - Electrophorèse sur gel d'amidon 57

D - Electrophorèse sur acétate de cellulose 59

E - Electrophorèse sur agarose 61

F - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 65

PRECIPITATIONS SELECTIVES PAR VOIE CHIMIQUE 71

A - Principe 71

B - Précipitations sélectives 72

1 - La précipitation polyanionique 72

. Historique 72

. Spécificité de la précipitation 73

. Nature de l'interaction 74

2 - La précipitation polycationique 75

3 - La précipitation par le polyvinyl-pyrrolidone 75

C - Applications 76

DIFFERENCIATION IMMUNOCHIMIQUE 80

CHROMATOGRAPHIE 82

LA Lp(a) LIPOPROTEINE 84

INTRODUCTION 85

DEFINITION ET CARACTERISATION DANS LE PLASMA 86

A - Définition 86

B - Caractérisation dans le plasma 86

ISOLEMENT, PROPRIETES PHYSIQUES, STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE 88

A - Isolement 88

B - Propriétés physiques 89

C - Structure et composition chimique 90

DOSAGE DANS LE PLASMA, METABOLISME, INCIDENCE PATHOLOGIQUE 96

T R A V A U X P E R S O N N E L S 99

ANALYSE QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES - ETABLISSEMENT D'UN BILAN LIPIDIQUE 100

INTRODUCTION 101

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE 103

A - Introduction 103

B - Matériel et méthodes 104
. Sérums 104
. Coloration des lipoprotéines 104
. Appareillage 105
. Réactifs 105
. Préparation du support d'électrophorèse 109
. Electrophorèse proprement dite 109

C - Résultats 110

D - Conclusion 112

ESTIMATION SEMI-QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES DE BASSE DENSITE 115

A - Introduction 115

B - Matériel et méthodes 116
. Sérums 116
. Réactifs 116
. Appareillage 117
. Méthodes 117

C - Résultats 120
. Etude de la fiabilité des turbidimètres 120
. Etude de la répétabilité des méthodes .. 121
. Correspondance entre les turbidités mesurées et les quantités correspondantes de lipoprotéines 122
. Valeurs normales 127
. Applications cliniques 127

CONCLUSION - ETABLISSEMENT D'UN BILAN LIPIDIQUE 136

ELECTROPHORESE PREPARATIVE DES LIPOPROTEINES SUR COLONNE DE GEL DE POLYACRYLAMIDE - APPLICATION A LA PURIFICATION ET A LA CARACTERISATION DES HDL, LDL ET Lp(a) 139

INTRODUCTION 140

MATERIEL ET METHODES 142

A - Description du système d'électrophorèse préparative 142
. La colonne proprement dite 142
. La chambre d'élution 144

B - Préparation du support d'électrophorèse 144

C - Préparation des échantillons à purifier 146

D - Electrophorèse 148

E - Elution des lipoprotéines 148

F - Caractérisation des fractions purifiées 149
. Caractérisation électrophorétique 149
. Caractérisation immunologique 150
. Caractérisation chimique 150

RESULTATS ET APPLICATIONS 153

A - Isolement des HDL et LDL - Applications 153
. Isolement 153
. Applications 160

B - Isolement de la Lp(a) - Applications 161
. Isolement et purification 161
. Applications 166
- Purification et caractérisation de la Lp(a) d'un sujet dyslipoprotéinéique 166

- Obtention d'un immunsérum anti-apo-Lp(a) 173
- Mise au point d'une méthode de dosage immunologique de la Lp(a) - Application 177

CONCLUSION 179

C O N C L U S I O N G E N E R A L E 180

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E 182

- Chromatographie sur couche mince des lipides 183
- Dosage des phospholipides 186
- Dosage simultané du cholestérol et des glycérides sur Autoanalyseur II 188
- Dosage enzymatique du cholestérol libre et total en flux continu 193
- Dosage du cholestérol total et du cholestérol libre plasmatique par chromatographie gaz-liquide 196
- Application de la précipitation sélective des lipoprotéines par les polyanions et détergents à la quantification des LDL et HDL plasmatiques 201
- Dosage des hexoses 205
- Dosage des acides sialiques 208

- Dosage des protéines 211

- Séparation des apoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium 214

- Immunoélectrophorèse selon la méthode de Laurell - Application au dosage de la Lp(a) lipoprotéine 221

B I B L I O G R A P H I E 226

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE Section de SCIENCES LILLE