

N° Ordre 506

50376

1980

174

50376

1980

174

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

OPTION : BIOCHIMIE

Présentée à

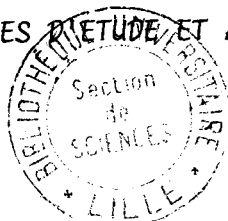
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Par

Catherine FIEVET-DESREUMAUX

FRACTIONNEMENT ET ANALYSE DES LIPOPROTEINES SERIQUES HUMAINES

NOUVELLES METHODES D'ETUDE ET APPLICATIONS



Présentée le 20 Décembre 1980 devant la Commission d'Examen
sous la Présidence de Monsieur le Professeur MONTREUIL

Membres du Jury :

Rapporteurs	M.	J. MONTREUIL	, Professeur
	M.	J. JAILLARD	, Professeur
	Mme	J. CLEMENT	, Directeur de Recherche au C.N.R.S.
Examineurs	Melle	G. SPIK	, Professeur
	M.	G. BISERTE	, Professeur
	M.	R. INFANTE	, Directeur de l'Unité I.N.S.E.R.M. N° 9

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A Monsieur le Professeur MONTREUIL

Vous me faites le grand honneur de
présider cette thèse.

Soyez assuré de toute ma gratitude
et veuillez trouver, dans cet
ouvrage, l'expression de mon plus
profond respect.

A Monsieur le Professeur JAILLARD

Soyez assuré de toute ma gratitude
pour le grand honneur que vous m'avez
fait en m'accueillant dans votre
laboratoire.

Veillez trouver, ce jour, le
témoignage de mon profond respect et
de ma très vive reconnaissance.

A Madame CLEMENT,

Directeur de Recherche au C.N.R.S.

Il m'a été donné d'apprécier votre gentillesse et votre amabilité, ayant eu, en effet, le privilège de vous avoir comme marraine de recherche à l'I.N.S.E.R.M.

Vous acceptez aujourd'hui de juger cette thèse et je vous prie de trouver, dans ce travail, l'expression de mon plus profond respect et de toute ma reconnaissance.

A Mademoiselle SPIK

Professeur à l'Université des Sciences
et Techniques de Lille I.

J'ai souvent pu apprécier votre
amabilité et votre disponibilité
au cours de mes études à la Faculté.

Vous avez accepté, aujourd'hui, de
juger ce travail et vous en suis
infiniment reconnaissante. Je vous
prie de recevoir l'expression de
mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur BISERTE

Vous avez accepté de juger ce travail
et ce, malgré vos multiples charges.

Je vous prie de bien vouloir trouver
ici, l'expression de ma respectueuse
gratitude.

A Monsieur le Docteur INFANTE

J'ai été très touchée de l'intérêt
qu'il vous a plu de réserver à ce
travail.

Je tiens à vous exprimer mes
remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Docteur SEZILLE

Pendant ces quelques années passées dans votre laboratoire, j'ai pu bénéficier de votre esprit de synthèse et de votre grande culture scientifique.

Vous avez dirigé ce travail et votre collaboration à sa réalisation m'a été précieuse.

Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur FRUCHART

Vous avez, en grande partie, inspiré et guidé ce travail et l'intérêt que vous lui avez toujours manifesté m'a été d'un grand réconfort. Votre aide morale et scientifique m'ont très souvent aidée. Que ce travail soit pour vous le témoignage de toute ma reconnaissance.

Je vous dois beaucoup et vous exprime ma plus profonde admiration.

A Monsieur le Professeur DEWAILLY

Vous avez très activement participé à l'énorme problème de l'étalonnage auquel nous nous sommes longuement heurtés lors de la mise au point du dosage immunonéphélométrique de l'apoprotéine A-I.

Votre collaboration m'a encouragé, je vous en remercie beaucoup et vous exprime toute ma gratitude.

A Madame ROSSENEU, Docteur es-Sciences
*Laboratoire de Recherche, A.Z. St Jan, Ruddershove,
8000 Brugge, Belgique.*

Mademoiselle SPIK, Professeur
*Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences
et Techniques de Lille I, 59650 Villeneuve d'Ascq.*

Monsieur le Professeur DAUTREVAUX
*Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine,
1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex.*

Monsieur le Professeur MASSEYEIFF
*Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine,
Chemin de Vallombroise, 06000 Nice.*

Monsieur le Professeur POLONOVSKI
*Faculté de Médecine Saint Antoine, 27 rue Chaligny,
75575 Paris Cédex.*

Monsieur le Docteur MOSCHETTO, Directeur
*Centre de Technologie Biomédicale de l'I.N.S.E.R.M.,
Rue Camille Guérin, 59000 Lille.*

Monsieur le Docteur SAUTIERE,
*Maître de Recherche au C.N.R.S.,
Institut de Recherche sur le Cancer, Centre Hospitalier
Régional, Place de Verdun, 59000 Lille.*

Vous m'avez accueilli dans vos laboratoires et aidé
à la réalisation de certains dosages et mises au
point.

Je vous remercie de vos précieux conseils et pour
tout ce que vous m'avez appris.

A toute l'équipe du laboratoire :

A Mesdames Edith DEDONDER
 Claudine MONSTERLEET

et tout particulièrement

A Madame Marie Chantal MULLET

A Mesdemoiselles Elisa CAMPOS
 Odette LABIAU

A Messieurs Luc BOUSSEKEY
 Pascal LECONTE
 André NOUVELOT

Ce travail est le fruit d'une étroite
collaboration.

Que toutes et tous en soient ici très
sincèrement remerciés.

A Madame Claudine MONSTERLEET et
Mesdemoiselles Chantal LIBOURAUX et
Murielle VERGHOTE

Vous n'avez pas ménagé vos efforts dans
la préparation de cet ouvrage et c'est
avec une extrême gentillesse que vous
avez veillé à sa réalisation. Je vous
adresse un très grand merci.

Ce travail a été effectué dans le cadre de l'Université
du Droit et de la Santé de Lille II :

- Laboratoire de Physiopathologie des Lipides
(Professeur J. JAILLARD), Faculté de Pharmacie,
- Laboratoire de la Clinique Médicale Générale A
(Professeur J. JAILLARD), Faculté de Médecine.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

LP : lipoprotéine

Apo : apoprotéine

Apo A-I : apoprotéine A-I

VLDL : very-low-density lipoprotein

IDL : intermediary-density lipoprotein

LDL : low-density lipoprotein

HDL : high-density lipoprotein

VHDL : very-high-density lipoprotein

LPL : lipoprotéine-lipase

TGLH : triglycéride-lipase hépatique

LCAT : lécithine-cholestérol-acyltransférase

Ce travail a fait l'objet des mémoires, publications et communications suivants :

- Mémoires -

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

- Thèse de Doctorat de 3ème cycle, option Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille, le 24 janvier 1977.

- Publications -

- Improved serum lipoprotein electrophoresis procedure in polyacrylamide gradient gel.

SEZILLE G., FRUCHART J.C., JAILLARD J., DEWAILLY P. and DESREUMAUX C.,
Biomedicine Express, 1975, 23, 315-317.

- Etude critique des différentes techniques de lipidogramme : intérêt de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

JAILLARD J., DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., et SEZILLE G.,
Ann. Biol. Clin., 1975, 33, 391

- Apport de l'électrophorèse des lipoprotéines en gel de polyacrylamide au typage des hyperlipoprotéinémies.

JAILLARD J., SEZILLE G., FRUCHART J.C., et DESREUMAUX C.,
Cahiers de Nutrition et de Diététique, 1975, 5, 66-69.

- Analyse des lipoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par précipitation fractionnée à l'aide de polyanions et de détergents.

DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J. et G. SEZILLE.

Ann. Biol. Clin., 1976, 34, 309-316.

- Fractionation of serum lipoproteins by preparative electrophoresis in polyacrylamide gel.

DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J. and SEZILLE G.
J. Chromatography, 1977, 130, 336-341.

- Purification et caractérisation de la lipoprotéine LP(a).

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

Biochimie, 1977, 59, 543-546.

- Enzyme immunoassay for human apolipoprotein B, the major protein moiety in low-density- and very-low-density lipoproteins.

FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G., JAILLARD J., CARLIER Y., BOUT D. and CAPRON A.

Clinical Chemistry, 1978, 24, 455-459.

- Inhibition enzyme immoassay. Application to human apolipoprotein B.

CARLIER Y., BOUT D., FRUCHART .J.C., DESREUMAUX C., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Journal of Immunological Methods, 1978, 21, 317-324.

- Immunochemical determination of human apolipoprotein B by laser nephelometry.

FIEVET-DESREUMAUX C., DEDONDER-DECOOPMAN E., FRUCHART J.C., DEWAILLY P. and SEZILLE G.

Clinica Chimica Acta, 1979, 95, 405-408.

-Immunochemical determination of human apolipoprotein AI by laser nephelometry.

FIEVET C., DEDONDER E., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Clinica Chimica Acata, à paraître.

- Plasma levels of apoproteins B and A-I in a random population. Influence of several risk factors.

DEDONDER E., FIEVET C., CAMPOS E., MOULIN S., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Atherosclerosis, à paraître.

- Communications -

- Estimation turbidimétrique des lipoprotéines de basse densité et ses applications.

FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, et DEWAILLY P.

Communication présentée au IIIème Colloque Biologie Prospective, Pont à Mousson, le 9 octobre 1975.

In "Organisation dans les laboratoires - Biologie Prospective" IIIème Colloque Pont à Mousson, Ed. Expansion Scientifique Française, p.523-527, 1976.

- Quantitative and qualitative analysis of lipoproteins.

FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Communication présentée au Colloque International of "Lipoproteins and Hyperlipemias". Lisbonne du 3 au 6 septembre 1976.

- Méthode d'étude des lipoprotéines sériques.

FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU et DEWAILLY P.

Communication présentée aux Journées Nationales de Biologie, Grenoble/Lyon, Le 8 février 1975.

In "Journées Nationales de Biologie Grenoble/Lyon". Ed. Simep, p.99-105, 1976.

- Application de l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide à l'isolement des lipoprotéines sériques.

DESREUMAUX C.,FRUCHART J.C.,MOSCHETTO Y.,DEWAILLY P.,SEZILLE P et JAILLARD J.

Communication présentée au XIIIème Congrès Mondial pour l'Etude des Corps Gras, Marseille du 30 août au 4 septembre 1976.

- Application de l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide à l'isolement des lipoprotéines sériques.

DESREUMAUX C.,FRUCHART J.C.,DEWAILLY P.,SEZILLE G.,JAILLARD J.,et MOSCHETTO Y.

Communication présentée au XIX International Conference of the Biochemistry of Lipids, Paris, du 6 au 8 septembre 1976.

- Study and characterization of the LP(a) lipoprotein from plasma of patient with hyper LP(a) lipoproteinaemia.

DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Communication présentée lors du XXV Colloque "Protides of the Biological Fluids", Brugge du 2 mai au 6 mai 1977.

In "Protides on the Biological Fluids", Pergamon Press, Oxford and New-York, p.289-292, 1978.

- Enzyme-immunoassay (EIA) from human apolipoprotein B.

FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G., CARLIER Y., BOUT D. and CAPRON A.

Communication présentée lors du XXV Colloque "Protides of the Biological Fluids", Brugge du 2 mai au 6 mai 1977.

In "Protides on the Biological Fluids", Pergamon Press, Oxford and New-York, p.429-432, 1978.

- Mise au point d'une micro-méthode de dosage de l'apolipoprotéine B par électroimmuno-diffusion sur plaque.

FRUCHART J.C., FIEVET C., DEDONDER E., DEWAILLY P. et SEZILLE G.

Communication présentée à la Société Française de Biologie Clinique, le 12 janvier 1979, Paris.

- Diurnal patterns of plasma glucose, triglycerides, free fatty acids, cholesterol and apolipoproteins in normal subjects on regular feeding.

DEWAILLY P., MOULIN S., FIEVET C. and SEZILLE G.

Communication présentée lors du 5th International Symposium on Atherosclerosis du 6 au 9 novembre 1979, Houston, U.S.A.

- Variations nyctémérales des apoprotéines B et A-I chez le sujet normal en fonction des repas.

DEWAILLY P., MOULIN S., DEDONDER E., FIEVET C., SEZILLE G. et JAILLARD J.

Communication présentée lors des Journées Nationales du GERLI, groupe d'étude et de recherche des lipides et lipoprotéines, Dijon mai 1980.

- Plasma levels of apoproteins B and A-I in ambulatory population. Influence of several risk factors.

DEWAILLY P., DEDONDER E., FIEVET C., MOULIN S., SEZILLE G. and JAILLARD J.

Communication présentée lors du VII International Symposium on Drugs affecting lipid metabolism, Milan, mai 1980.

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION	1
REVUE GENERALE SUR LES LIPOPROTEINES	3
 <u>A- Généralités sur les lipoprotéines</u>	
1- Introduction	3
2- Lipides plasmatiques	3
3- Historique des lipoprotéines	4
4- Différents systèmes de classification des lipoprotéines ..	4
5- Répartition quantitative des lipoprotéines	11
6- Composition des lipoprotéines	11
7- Structure des lipoprotéines	17
 <u>B- Les apoprotéines : définition, structure et répartition dans les lipoprotéines plasmatiques</u>	
1- Définition	22
2- Classification selon ALAUPOVIC	22
3- Propriétés moléculaires des apoprotéines	24
4- Répartition des apoprotéines dans les lipoprotéines	31
 <u>C- Les principales enzymes intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines</u>	
1- Introduction	35
2- Les triglycérides-lipases	35
3- La lécithine-cholestérol-acyl-transférase	38

D- Les quatre classes majeures de lipoprotéines : origine, biosynthèse, structure, dégradation, rôle.

1- Les chylomicrons	39
2- Les VLDL	49
3- Les LDL	61
4- Les HDL	68

E- Désordres associés au métabolisme des lipoprotéines

1- Les hyperlipidémies	81
2- Absence congénitale de β -lipoprotéines	86
3- Absence congénitale de α -lipoprotéines	86
4- Absence congénitale de lécithine-cholestérol-acyl- transférase	87
5- Les hypo- β -lipoprotéinémies	88
6- Les hyper- α -lipoprotéinémies	88

F- Lipoprotéines et athérosclérose

1- Rôle des lipoprotéines dans la genèse de la plaque d'athérome	91
2- Lipoprotéines athérogènes et lipoprotéines anti-athérogènes	92
3- Rappels épidémiologiques et prévention du risque athéromateux par les HDL	93
4- Conclusion pratique	102
5- LP(a) et athérosclérose	103

REVUE GENERALE SUR LES METHODES D'ETUDE DES LIPOPROTEINES

A- Méthodes d'analyse des lipoprotéines

1- L'ultracentrifugation	104
2- L'électrophorèse	105
3- Les précipitations sélectives par voie chimique	108
4- Le dosage du cholestérol des lipoprotéines	111

5- La différenciation immunochimique	112	
6- La chromatographie	113	
 <u>B- Revue générale sur les méthodes d'étude des apoprotéines</u>		
 <u>I- Isolement des apoprotéines et principes généraux de la délipidation</u>		
1- Introduction	114	
2- Délipidation proprement dite	114	
3- Solubilité et conservation des apoprotéines	115	
4- Conclusion	116	
 <u>II- Purification des apoprotéines</u>		
1- Principe général	116	
2- Procédés de fractionnement	116	
3- Conclusion	118	
 <u>III- Critères de pureté</u>		119
 <u>IV- Méthodes de dosage des apoprotéines</u>		
1- Introduction	119	
2- Méthodes immunologiques	120	
3- Méthodes densitométriques	126	
 <u>V- Problèmes relatifs au dosage des apoprotéines</u>		
1- Choix des standards	127	
2- Réactivité des apoprotéines purifiées, délipidées et natives	128	
3- Auto-association et agrégation des apoprotéines purifiées.	130	

VI- Valeurs physiologiques habituelles des apoprotéines

et intérêts de leur dosage chez l'homme 131

TRAVAUX PERSONNELS

A- Analyse qualitative des lipoprotéines sériques

1- Introduction 135
2- Matériel et méthodes 135
3- Résultats 138
4- Conclusion 140

B- Electrophorèse préparative des lipoprotéines sur colonne de gel d'acrylamide - Application à la purification des HDL, LD et LP(a) - Caractérisation partielle de la LP(a)

1- Introduction 141
2- Matériel et méthodes 141
3- Résultats et applications 146
4- Conclusion 159

C- Estimation semi-quantitative des lipoprotéines de basse et très basse densités - Applications au bilan lipidique

1- Introduction 160
2- Matériel et méthodes 160
3- Résultats 161
4- Conclusion 175

<u>D- Dosage des apoprotéines B et A-I chez l'homme - Applications à une population de 477 sujets en relation avec le taux des lipides circulants - Influence du sexe, de l'âge, de l'index pondéral, de la consommation d'alcool, du tabac et des contraceptifs oraux</u>	
<u>I- Introduction</u>	176
<u>II- Dosage de l'apoprotéine B par immunoenzymologie</u>	
1- Principe de la méthode	177
2- Matériel et méthodes	177
3- Résultats	180
4- Discussion	183
<u>III- Dosage des apoprotéines B et A-I par immunonéphélométrie</u>	
1- Principe	188
2- Dosage de l'apoprotéine B	188
3- Dosage de l'apoprotéine A-I	201
<u>IV-Applications</u>	
1- Introduction	214
2- Matériel et méthodes	214
3- Résultats	215
4- Discussion	233
5- Conclusion	237
CONCLUSION GENERALE	240
APPENDICE TECHNIQUE	241
BIBLIOGRAPHIE	285

Pour la rédaction des revues générales que nous présentons, nous nous sommes inspirés des ouvrages suivants :

- Blood Lipids and Lipoproteins : quantitation, composition and metabolism ; G.L. Nelson (Ed), New-York, London, Sydney, Toronto, Wiley-Interscience, 1972.
- "Lipides et Lipoprotéines". Métabolisme et méthodes d'exploration. Applications au diagnostic et à la physiopathologie des hyperlipémies. G. Sézille, J.C. Fruchart, J. Jaillard, P. Dewailly. Crouan et Roques (Eds) Lille 1976.
- "Lipides et Lipoprotéines". J.C. Fruchart, G. Sézille. Ed. par Boehringer Mannheim France S.A. 1979.
- Progress in Biochemical Pharmacology "Lipoprotein Metabolism", Vol. 15, S. Eisenberg, R. Paoletti. S. Karger Ag, 4011 Basel (Ed) 1979.
- Quelques aspects du métabolisme des lipoprotéines. J. Polonovski. Biochimie, 1976, 58, 971.
- Lipoprotein lipase. C.J. Fielding and R.J. Havel. Archs Path., 1977, 101, 225-229.
- The proteins of plasma lipoproteins : properties and significance. A. M. Scanu, M.C. Ritter. Adv. Clin. Chem., 1973, 16, 11-151.
- Serum Lipoproteins. In "The plasma proteins" 1975, 1, 317-391. A.M. Scanu, C. Edelstein, P. Keim, F.N. Putnam (Ed).
- Lipoprotein metabolism and hyperlipemia, S. Eisenberg ; in Atherosclerosis reviews 1976, 1, 23-61. Jr Raven Press, New York (Ed).
- The plasma lipoproteins. J.C. Osborne, J.R. Bryan Brewer. Advances in protein chemistry, 1977, 31, 253-337.
- Lipoprotein apoprotein metabolism. E.J. Schaefer, S. Eisenberg, R.I. Levy. J. Lipid Res. 1978, 19, 667-687.

INTRODUCTION

* L'étude des lipoprotéines plasmatiques (LP) au cours de ces dernières années a permis, grâce à une meilleure connaissance de leur structure et de leur fonction, d'effectuer d'importants progrès dans la compréhension des mécanismes physiologiques et des phénomènes pathologiques du métabolisme lipidique. La façon d'aborder les problèmes s'est radicalement transformée et l'exploration des lipides et des lipoprotéines plasmatiques est encore en "phase évolutive" nécessitant de fréquentes mises au point.

* Le travail que nous présentons est axé sur le développement de techniques simples mais fiables d'exploration des LP :

- Le premier chapitre fait état de généralités concernant les LP humaines : classification, répartitions quantitative et qualitative, origine et destinée. Après avoir abordé le problème des dyslipidémies qui sont des anomalies de répartition des LP nous soulignons le rôle important joué par ces LP dans le développement des atteintes cardio-vasculaires et tout spécialement dans la genèse de l'athérosclérose ; on tend à accorder actuellement, au dosage des LP plasmatiques, une certaine valeur prédictive vis-à-vis de la survenue de l'athérome.

- Le deuxième chapitre traite des méthodes d'étude des LP et en fait une analyse critique. Certaines, comme l'ultracentrifugation, l'électrophorèse, la précipitation sélective, la chromatographie sont connues de longue date ; d'autres, plus récentes, concernent la copule protéique des LP, c'est à dire les apoprotéines. Bien qu'ayant fait récemment l'objet d'importants progrès, ces dernières méthodes posent encore de nombreux problèmes.

- Le troisième chapitre traite de nos travaux personnels sur les LP :

. Nous proposons tout d'abord deux techniques originales d'études des LP mettant en jeu soit l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient discontinu de pH et de concentration soit les tests de précipitation sélective ; ces méthodes se sont, depuis, révélées très utiles dans les domaines du dépistage, du typage et de la surveillance des hyperlipidémies.

. L'excellente résolution obtenue avec le gel d'acrylamide nous a amenés à utiliser ce support et à concevoir un appareillage adapté à l'isolement et à la purification des LP. Nous avons pu ainsi mettre en service des techniques plus simples que celles antérieurement décrites ; à cette occasion nous avons réussi à isoler et à étudier, chez un sujet porteur d'un type rare d'hyperlipidémie, une lipoprotéine particulière, la LP(a).

. Enfin, des études épidémiologiques ayant montré le rôle athérogène des LP de basse densité et le rôle plutôt protecteur des LP de haute densité, nous nous sommes intéressés au dosage de ces deux groupes de LP et ce, par l'intermédiaire de leurs apoprotéines majeures : Apo B d'une part et Apo A-I d'autre part que nous avons dosées par des techniques originales faisant appel à l'immunoenzymologie et à l'immunonéphélométrie. Nous avons appliqué ces méthodes et dosé en parallèle lipides circulants et apoprotéines dans une population présumée saine et composée de 206 hommes et 271 femmes.

CHAPITRE I

REVUE GENERALE SUR LES LIPOPROTEINES

A - GENERALITES SUR LES LIPOPROTEINES

1- INTRODUCTION -

Le plasma humain contient normalement 5 à 7 g de lipides par litre. Ils sont constitués de cholestérol, de glycérides, de phospholipides et d'acides gras libres. Seule l'existence d'interactions avec des protéines spécifiques permet de les maintenir en une véritable solution moléculaire, exception faite pour les acides gras transportés en majorité par la sérumalbumine.

Les complexes lipoprotéiques ainsi formés ont un caractère hydrophile et assurent de ce fait le transport et la distribution des lipides dans l'organisme. Il s'agit plus exactement de lipoglycoprotéines, qui représentent des molécules très hétérogènes d'un point de vue physico-chimique et immunologique.

2- LIPIDES PLASMATIQUES -

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

- des acides gras non estérifiés (AGNE). Ils portent souvent le nom d'acides gras libres (AGL) ;

- des glycérides. Ils sont essentiellement représentés par les triglycérides (85 % des glycérides), les glycérides partiels n'étant que des intermédiaires du métabolisme des triglycérides ;

- des phospholipides. Ils sont répartis en lécithine (69 %), sphingomyéline (19 %), lysolécithine (7 %), céphalines (5 %) ;

- des stérols. Le principal représentant est le cholestérol qui existe sous formes libre et estérifiée.

Les triglycérides et les AGL sont des substrats énergétiques. Le cholestérol est un constituant de structure nécessaire à la synthèse et au renouvellement de toutes les membranes cellulaires, ainsi qu'à la stéroïdogénèse surrénalienne et à la synthèse des acides biliaires.

La répartition pondérale de ces différents lipides dans un sérum normal est la suivante :

- acides gras libres	: 0,14 à 0,23 g/l	- (0,3 à 0,7 mmoles/l)
- glycérides	: 0,7 à 1,6 g/l	- (0,8 à 1,8 mmoles/l)
- phospholipides	: 1,5 à 2,8 g/l	- (1,9 à 3,6 mmoles/l)
- cholestérol	: 1,9 à 2,8 g/l	- (4,9 à 7,2 mmoles/l)

3- HISTORIQUE DES LIPOPROTEINES -

La plus ancienne préparation d'une lipoprotéine (LP) isolée du sérum, contenant des proportions stables de lipides et de protéines, a été obtenue par MACHEBOEUF en 1927 (231). C'est la "cenapse acido-précipitable" du sérum de cheval.

Cet auteur a montré que cette fraction migre comme une α -1-globuline en électrophorèse, et que son coefficient de sédimentation est de 2,5 à 4,0 unités Svedberg.

Cette conception initiale des LP établit la constance de composition comme le critère majeur de définition de ces entités chimiques caractérisées par l'existence de lipides liés à des protéines spécifiques.

En 1941, BLIX et coll. (46) montrent que de grandes quantités de lipides sont associées à des fractions α - et β -globulines, séparées en électrophorèse à partir du plasma humain normal.

ADAIR et ADAIR, en 1943 (1), isolent une fraction lipoprotéique qui, en raison de sa faible densité, remonte en surface au cours de l'ultracentrifugation. Sa mobilité électrophorétique est celle d'une β -globuline.

En 1945, PEDERSEN (270) démontre que ce composant de nature β -globuline possède une densité comprise entre 1,030 et 1,035 g/ml.

Des fractionnements du plasma humain montrent ensuite que les lipides du plasma sont précipités en deux fractions bien séparées, combinés à deux types de LP différentes par leur solubilité, leur taille et leur forme moléculaire, leur contenu lipidique et leur charge électrique. En 1949, GURD et coll. (164) caractérisent ces deux LP.

Le développement vers les années 1950-1955 des techniques de précipitation fractionnée, telle la méthode de COHN (89), puis ultérieurement celles de BURSTEIN (65), ainsi que les techniques d'ultracentrifugation analytique décrites par GOFMAN (152) puis par DE LALLA et GOFMAN (98), ouvre la voie à de nombreuses publications concernant les LP et leurs rapports avec l'athérosclérose.

Ces techniques d'isolement des LP permettent de déterminer leur composition dans diverses affections hyperlipidémiques (153).

L'introduction en 1963 par HATCH et LEES (168) d'une technique simple d'électrophorèse sur papier en tampon albumineux, séparant les LP du sérum en quatre classes, permet à FREDRICKSON et LEES de proposer en 1965 une classification des hyperlipoprotéïnémies en cinq variétés fondamentales caractérisées par l'augmentation d'une ou de plusieurs classes de LP (137).

4- DIFFERENTS SYSTEMES DE CLASSIFICATION DES LIPOPROTEINES -

a) Classification des lipoprotéines selon leur densité hydratée.

Les phospholipides et les triglycérides sont, avec le cholestérol, les constituants lipidiques de base des LP. 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. L'ajustement convenable de la densité du sérum permet, soit de faire flotter l'ensemble des LP, tout en faisant sédimenter les protéines, soit d'isoler des classes, voire des sous-classes de LP.

L'ultracentrifugation préparative définit les classes selon leurs densités respectives, et l'ultracentrifugation analytique selon leurs vitesses de flottation ou Sf mesurées dans un milieu de densité 1,063 g/ml.

Ces classifications sont dues essentiellement aux travaux de deux équipes de chercheurs, d'une part celle de HAVEL et coll. (170), d'autre part celle de LINDGREN et coll. (221), travaillant sous la direction de GOFMAN (152).

On distingue ainsi cinq classes majeures de LP (tableau 1, page 8) :

- Les chylomicrons ($d < 0,94$ g/ml - Sf < 400). Ils forment de grosses molécules responsables de la turbidité du sérum en période post-prandiale.

- Les "very-low-density-lipoproteins" ou VLDL ($0,94 < d < 1,006$ g/ml - Sf 20-400). Elles se répartissent en un spectre de LP, et une forte augmentation de ces particules se traduit par une opalescence du sérum.

- Les "low-density-lipoproteins" ou LDL ($1,006 < d < 1,063$ g/ml - Sf 0-20). Elles comprennent une fraction majeure de LDL proprement dites (LDL_2 $1,019 < d < 1,063$ g/ml - Sf 0-12) et une fraction mineure (LDL_1 ou IDL "intermediary-density-lipoproteins") ($1,006 < d < 1,019$ - Sf 12-20).

- Les "high-density-lipoproteins" ou HDL ($1,063 < d < 1,210$ g/ml). Elles se subdivisent en HDL_3 prépondérantes, HDL_2 et HDL_1 (fraction mineure isolée avec les LDL).

- Les "very-high-density-lipoproteins" ou VHDL ($d > 1,21$ g/ml). Elles sont quantitativement peu importantes et sédimentent avec les protéines sériques.

- Enfin, le résidu d'ultracentrifugation ($d > 1,25$ g/ml) peut être considéré comme le stade ultime des LP dans l'échelle des densités. Il contient encore quelques LP mais essentiellement des complexes formés d'albumine, d'acides gras et de lysolécithine.

b) Classification des lipoprotéines selon leur mobilité électrophorétique.

La présence de groupements ionisables dans la molécule lipoprotéinique permet à celle-ci de se déplacer sous l'action d'un champ électrique.

Bien que son pouvoir de résolution soit très faible, la technique d'électrophorèse sur papier en tampon albumineux décrite en 1963 par LEES et HATCH, continue à être citée comme méthode de référence (217) et sert de base à la séparation des LP plasmatiques en quatre classes (tableau 1, page 8). Elle distingue :

- Les bêta-lipoprotéines en position β -globuline et correspondant aux LDL précédemment définies.
- Les pré-bêta-lipoprotéines en position α_2 -globuline et correspondant aux VLDL.
- Les alpha-lipoprotéines en position α_1 -globuline et correspondant aux HDL.
- Et enfin, les VHDL migrant parallèlement à la sérumalbumine.

Outre ces classes majeures de LP, il convient de signaler l'existence de deux LP particulières :

- la LP (a) lipoprotéine ou "sinking pre-beta-lipoprotein".

Longtemps associée à une marque de polymorphisme génétique, elle n'a pas encore d'implications pathologiques connues, et semble exister chez tous les individus mais en quantité très variable (11). De composition particulière, elle a une densité comprise entre 1,050 et 1,080 g/ml. Sa mobilité électrophorétique sur agarose est celle des pré-bêta-LP, mais en ultracentrifugation elle sédi-mente à la densité 1,006 g/ml, 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'hyperlipidémie primitive (type III). Elle a une mobilité électrophorétique de type bêta, et flotte à la densité 1,006 en ultracentrifugation.

c) Classification des lipoprotéines fondée sur les apoprotéines.

Les travaux d'ALAUPOVIC en 1968 (6) supposent l'existence d'une variation continue de la composition protéique des LP en fonction de la présence à un taux variable de trois types d'apolipoprotéines dans chacun des compartiments

du spectre de densités jusqu'alors classiquement proposé pour la répartition en classes des LP. C'est sur cette base que l'auteur introduit le concept de familles de LP :

- la famille LP-A caractérisée par l'apoprotéine A ;
- la famille LP-B caractérisée par l'apoprotéine B ;
- la famille LP-C caractérisée par l'apoprotéine C ;

La prédominance d'une famille de LP dans une classe de densité particulière, à savoir la LP-A dans la fraction de haute densité, et les LP-B et LP-C respectivement dans celles de basse et très basse densités, reflète dans certaines limites un degré de spécificité dans l'aptitude de chaque type d'apoprotéine à fixer les lipides. La disponibilité en substrat lipidique, essentiellement en triglycérides, conditionne la répartition sur l'échelle de densités de l'ensemble des familles de LP. Chacune d'entre elles représente ainsi un système très dispersé, s'étendant sur la totalité de cette échelle.

La figure 1, page 9, établit les relations entre le système de classification en familles et celui dérivé des paramètres d'électrophorèse et d'ultra-centrifugation. Elle indique à l'évidence que chaque classe de densité ou chaque bande électrophorétique correspond au moins à deux, sinon à trois familles reconnues de LP.

En 1972, ALAUPOVIC et ses collaborateurs confirment l'existence de ces familles de LP qu'ils isolent et quantifient à partir des HDL et de LDL du sérum de sujets normaux (3). Ils mettent par ailleurs en évidence la présence de mélanges ou d'associations de familles de LP, et actuellement on conçoit que d'une manière générale, à des densités supérieures à 1,019 et 1,030 g/ml, les familles sont isolées en tant qu'entités particulières, tandis qu'à des densités inférieures à ce niveau, elles se trouvent sous la forme de complexes associés (figure 2, page 10).

C'est ainsi qu'OSBORNE et BREWER ont pu proposer, en 1977 (263), de distinguer deux grandes classes de LP : les unes "primaires" ou formes libres, se caractérisant par une seule apoprotéine, et les autres "secondaires" ou formes complexes, se définissant par la présence de plusieurs apoprotéines. L'état d'équilibre entre ces deux classes serait sous la dépendance de la loi d'action de masse (figure 2, page 10), et l'organisation moléculaire de ces particules "primaires" dans les complexes "secondaires" est encore inconnue.

Actuellement, ALAUPOVIC et coll. (4) utilisant des méthodes immunologiques et chromatographiques, décrivent six familles de LP : LP -A, B, C, D, E et F, correspondant à différentes apoprotéines purifiées que nous étudierons plus longuement par ailleurs.

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
VLDL	20 - 400	0,94 - 1,006	30 - 70	7,5.10 ⁶	pré-β
LDL	12 - 20	1,006 - 1,019	15 - 25	2,5.10 ⁶	β
	0 - 12	1,019 - 1,063			
HDL	1***	< 1,063			α
	2	< 1,125	6 - 14	3,9.10 ⁵	
	3	< 1,21	4 - 10	1,9.10 ⁵	
VHDL		< 1,25		1,5.10 ⁵	
Alb - AGL		> 1,25		69.10 ³	Alb
Lp(a)		1,055 - 1,085	25	4,8.10 ⁶	pré-β

P.M. : Poids moléculaire

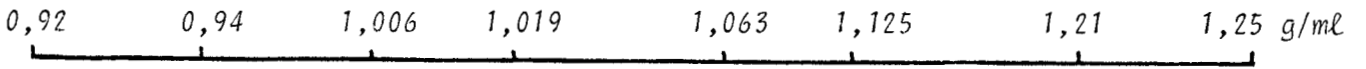
M.E. : Mobilité électrophorétique (agarose)

** : Vitesse de flottation en unités Svedberg (10⁻¹³ cm/sec/dyne/g) à 26° C dans une solution de NaCl à 1,063 g/ml

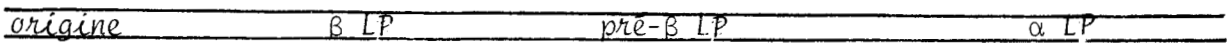
*** : Représente moins de 5 % des LDL isolées par ultracentrifugation



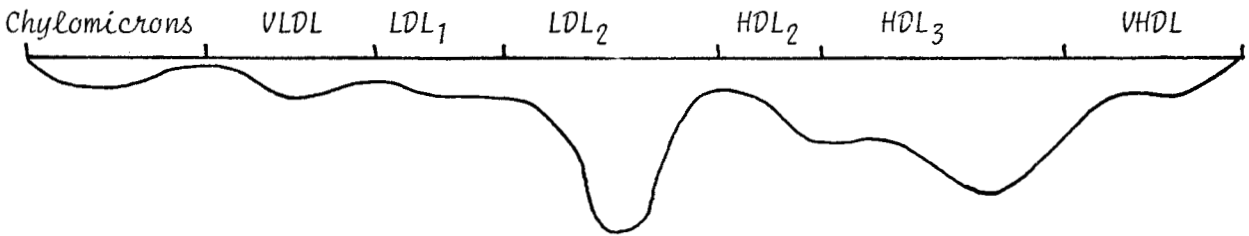
DENSITES



PROFIL ELECTROPHORETIQUE



ULTRACENTRIFUGATION



FAMILLES DE LIPOPROTEINES

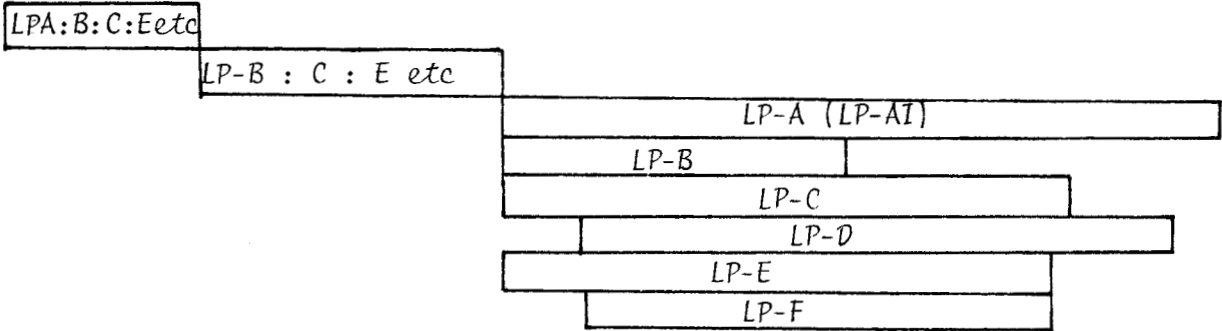


Figure 1

RELATIONS ENTRE FAMILLES DE LIPOPROTEINES ET CLASSIFICATION
SELON LES CRITERES D'ELECTROPHORESE ET DE DENSITE



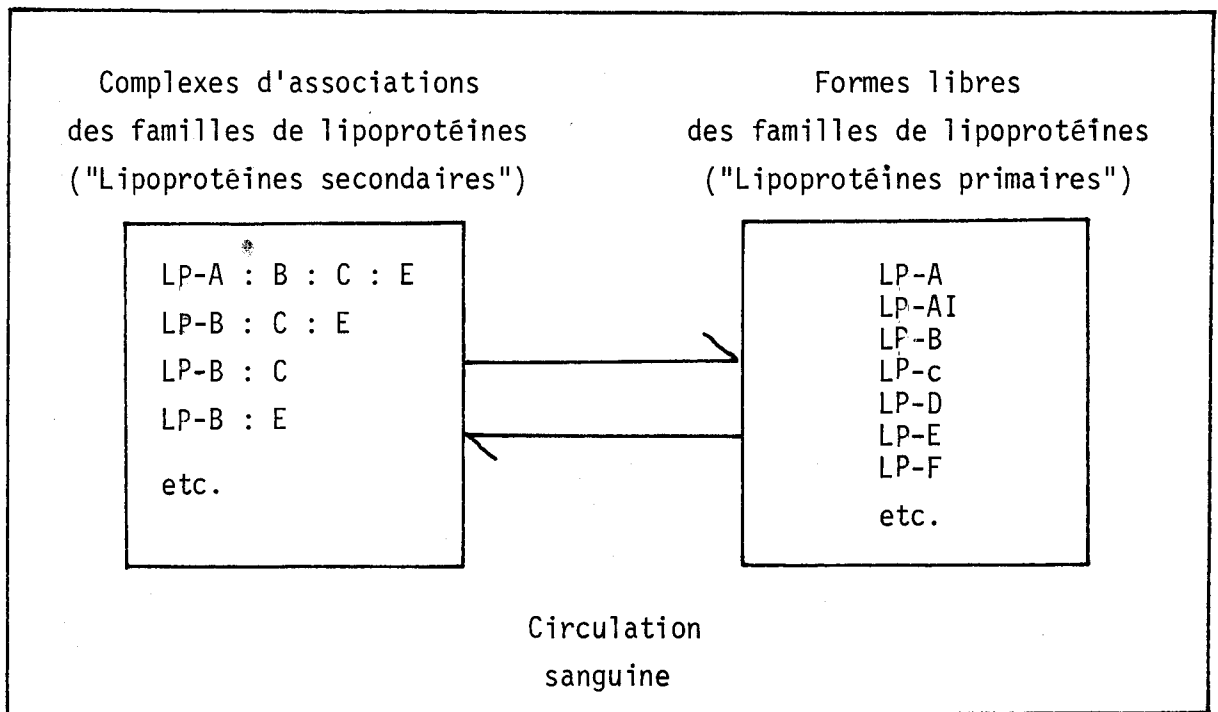


Figure 2

SYSTEME LIPOPROTEINIQUE PLASMATIQUE HUMAIN REPRESENTE COMME UN ETAT
D'EQUILIBRE ENTRE FORMES LIBRES ET COMPLEXES
D'ASSOCIATIONS DES FAMILLES DE LIPOPROTEINES



5- REPARTITION QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES -

Chez le sujet à jeun, pour une concentration globale de l'ordre de 8 g de LP par litre de sérum, on trouve en moyenne 12 % de VLDL, 1 % de LDL₁, 50 % de LDL₂ et 37 % de HDL (tableau 2, page 12).

Le tableau 3 (page 13) fait état de la répartition des LP sur la base de leur teneur en cholestérol, critère beaucoup plus courant d'appréciation de cette distribution.

En règle générale, et tout au moins avant la ménopause, il y a davantage de HDL et moins de LDL et VLDL chez la femme que chez l'homme. Ce sont les HDL₂ qui sont systématiquement plus élevées en fonction de la production d'oestrogènes, alors que les HDL₃, en général également plus élevées, dépendent surtout du sujet. Dans les deux sexes, les plus grandes variabilités s'observent au niveau des VLDL et des LDL. L'âge le mode d'alimentation, le poids, le degré de sédentarité sont les principaux facteurs de variation.

La lipoprotéine LP(a) n'existe normalement chez l'homme qu'en quantité très faible, et la concentration plasmatique moyenne d'une population rassemblant 340 sujets, déterminée par ALBERS et coll. (11) est de 140 mg/l, la valeur maximale obtenue lors de leur étude étant de 760 mg/l. Ces taux sont indépendants de l'âge et du sexe.

6-COMPOSITION DES LIPOPROTEINES -

a) Composition lipidique

Les variations de la composition lipidique des différentes classes de LP précédemment décrites sont quantitatives plutôt que qualitatives.

Nous verrons, lors de l'étude du métabolisme de chacune de ces classes, que les différences sont déterminées par la fonction physiologique de transport des lipides relative 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 LP :

TABLEAU 2

REPARTITION QUANTITATIVE (MOYENNE \pm ECART-TYPE) DES PRINCIPALES
CLASSES DE LIPOPROTEINES CHEZ LE SUJET NORMAL A JEUN
AGE DE 16 A 65 ANS

	H O M M E	F E M M E
Chylomicrons	0,11 \pm 0,13 g/l	0,03 \pm 0,03 g/l
V L D L	1,10 \pm 0,50 g/l	0,50 \pm 0,30 g/l
L D L	4,10 \pm 0,60 g/l	3,20 \pm 1,10 g/l
H D L	2,70 \pm 0,20 g/l	4,40 \pm 0,70 g/l



TABLEAU 3

REPARTITION NORMALE (MOYENNE \pm ECART-TYPE) DU CHOLESTEROL PLASMATIQUE
ENTRE LES DIFFERENTES CLASSES DE LIPOPROTEINES

$x \pm sx$	SERUM	VLDL	LDL	HDL	$\frac{LDL}{HDL}$	$\frac{LDL + VLDL}{HDL}$
Hommes	5,48	0,54 \pm 0,36	3,70 \pm 0,73	1,24 \pm 0,36	2,98	3,42
Femmes	5,34	0,36 \pm 0,18	3,37 \pm 0,67	1,61 \pm 0,54	2,09	2,32
Ensemble	5,42	0,45 \pm 0,28	3,54 \pm 0,70	1,43 \pm 0,35	2,48	2,79

(Evaluation en mmol/l ; 1 mmol = 0,386 g)

4,84

1,16

3,17



CLASSE DE LIPIDES	HDL	LDL	VLDL	CHYLO	LP(a)
Phospholipides*	55,0	28,3	21,0	7,0	28
Cholestérol libre	9,0	10 - 11	8,0	2,0	13
Esters de cholestérol	28,0	47 - 55	14,0	5,0	51
Triglycérides	8,0	8 - 10	57,0	86,0	0

(Les valeurs sont données en % du poids de l'ensemble des lipides).

* majeurs : phosphatidyl choline (lécithine) et sphingomyéline, et mineurs: lysolécithine, polyglycérol-phosphatides, cérébrosides (dans la LP(a)).

La fraction de densité supérieure à 1,21 g/ml 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. Le résidu d'ultracentrifugation par contre contient la plupart des acides gras libres et une quantité importante de lysolécithine.

b) Composition protéique -

Le pourcentage pondéral de protéines varie en fonction de la LP :

- les chylomicrons n'en contiennent au maximum que 2 %. Ils sont enrichis au cours de leur trajet dans la circulation lymphatique ;
- les VLDL : 8 à 10 % ;
- les LDL : 20 à 22 % ;
- les HDL : environ 50 % ;
- la LP(a) : environ 40 %.

Il existe de nombreuses dénominations concernant les copules protéiques (ou apoprotéines) des LP, et en fonction de la complexité des procédés utilisés pour leur séparation, la liste s'allonge.

Nous pouvons citer, à titre d'exemples, les nomenclatures de SCANU et coll. (300), SHORE et coll. (333) ou ALAUPOVIC (2), fondées respectivement sur la position de l'éluion des différentes apoprotéines après chromatographie sur colonne, sur la nature de l'acide aminé en position C-terminale, sur les polypeptides constitutifs des familles de LP (Tableau 4 , page 16).

La classification la plus couramment employée étant celle d'ALAUPOVIC, nous l'utiliserons tout au long de ce travail. Elle fait intervenir actuellement six apoprotéines purifiées à partir des LP majeures.

Le problème de la LP(a) est différent. En effet il s'agit d'une LP dont la composition protéique comporte pour la plupart des auteurs (109 environ 65 % d'apoprotéines B identiques à celle des LDL, 20 % d'apoprotéines LP(a) spécifique, moins de 15 % d'albumine et des traces d'apoprotéines A-I. Pour JÜRGENS et coll. (196), la protéine spécifique de la LP (a), représenterait moins de 5 % de la masse protéique totale.

Toutes les apoprotéines actuellement identifiées diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques, leur rôle dans le métabolisme des LP, et leur distribution dans les classes de densité. Ces paramètres seront étudiés en détail ultérieurement.

c) Composition glucidique -

Les glucides ne représentent qu'un faible pourcentage du poids des LP, environ 1 %.

La composition en glucides des chylomicrons et des VLDL est incertaine.

Les LDL et les HDL contiennent des hexoses neutres (galactose, mannose, glucose), des hexosamines (glucosamine) et de l'acide sialique répartis comme suit :

GLUCIDES	H D L	L D L
Galactose	x	x
Mannose	x 1,5	x 3,2
Glucose	x	
Glucosamine	1,5	1,2
Acide sialique	0,5	0,2

(les taux sont indiqués en grammes pour 100 g de protéines).



TABLEAU 4

NOMENCLATURE DES POLYPEPTIDES DES LIPOPROTEINES SERIQUES HUMAINES

Alaupovic (1972) (2)	Scanu et coll (1969) (300)	Shore et coll. (1972) (333)
A-I A-II B C-I C-II C-III ₀ C-III ₁ C-III ₂	F III F IV Apo LDL F V	Glu-I Glu-II R-Ser R-Glu R-Ala-0 R-Ala-1 R-Ala-2

La LP(a) se caractérise par une plus grande richesse en glucides que les autres LP, et en particulier que les LDL dont elle a pendant longtemps été considérée comme un variant génétique. Le tableau ci-dessous montre que, comparée aux LDL, la LP(a) est environ trois fois plus riche en glucides, contenant deux fois plus d'hexose, trois fois plus d'hexosamines et six fois plus d'acide sialique (108).

	HEXOSES	HEXOSAMINE	ACIDE SIALIQUE	TOTAL
LDL	54,6 + 10,5	28,2 + 4,2	10,4 + 1,1	100
LP(a)	108,0 + 6,2	84,0 +15,0	66,0 +11,3	260

(Les taux sont donnés en microgrammes par mg de protéines).

En outre, les VLDL, les LDL et les HDL contiennent des glycosphingolipides, en quantités généralement plus faibles dans les HDL (2,0 à 4,5 μ moles/g de protéines) que dans les VLDL et LDL (4,0 à 9,5 μ moles/g de protéines).

En ne tenant pas compte du faible pourcentage de glucides, on peut résumer la composition lipoprotéique selon le tableau 5, page 18.

7- STRUCTURE DES LIPOPROTEINES -

La liaison lipide-protéine est un processus biologique fondamental, tant au niveau des membranes cellulaires, des réactions enzymatiques et des processus de la coagulation sanguine que de la structure des LP du sérum.

Dans ce paragraphe, nous ne faisons qu'envisager l'organisation moléculaire des LP intactes.

La connaissance des structures secondaires et tertiaires des LP et des variations conformationnelles du complexe lipoprotéique procèdent de méthodes physico-chimiques très nombreuses, basées dans la plupart des cas sur les changements caractéristiques de la structure secondaire des apoprotéines lorsqu'elles s'associent aux différents lipides. En effet, les interactions lipide-protéine dépendent essentiellement des apoprotéines et de leurs structures.

TABLEAU 5

COMPOSITION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES CLASSES
DE LIPOPROTEINES PLASMATIQUES HUMAINES

	PROTEINES* LIPIDES*	COMPOSITION LIPIDIQUE (en mmole %)				RAPPORT CE/CL
		PL	TG	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
Lp(a)	36/64	32	8	40	20 60	2

* : en % du poids de lipoprotéine

PL : Phospholipides

TG : Triglycérides

CE : Cholestérol estérifié

CL : Cholestérol libre



De nombreux modèles moléculaires de LP ont été proposés au cours de ces dernières années. Toutes les constatations expérimentales restent valables, seule l'interprétation diffère, et nous verrons qu'une conception uniciste peut être envisagée.

a) Moyens utilisés pour l'étude de la structure des lipoprotéines -

De très nombreuses méthodes physiques et chimiques sont mises à profit pour étudier la structure des LP :

- Les méthodes physiques -

Elles sont variées et comprennent :
des méthodes spectroscopiques en infra-rouge ou de fluorescence, des techniques de dispersion optique rotatoire (DOR), de dichroïsme circulaire (DC) de résonance magnétique nucléaire (RMN), de diffraction des rayons X et de microscopie électronique (298).

C'est ainsi qu'ASSMANN et coll. en 1974 (17), associant les principes de la RMN et du DC proposent un nouveau modèle pour les HDL humaines dans lequel les apoprotéines globulaires se répartissent comme des "icebergs" au sein d'une "mer" de lipides.

LUZZATI et coll. (227) ont très récemment déterminé la structure des LDL₂ du singe hyperlipidémique par la diffraction des rayons X. Ils décrivent des particules ayant une configuration isométrique. Leurs noyaux presque sphériques de diamètre 105 Å ont une faible densité électronique, contenant les lipides et quelques protéines dont certaines d'entre-elles sont entourées de quatre globules protéiques de diamètre 95 Å et disposés en tétraèdre. Ces globules sont séparés par une distance d'environ 230 Å.

La structure des LDL humaines normales, proposée tout à fait récemment, est basée sur des études en microscopie électronique qui confirment une structure sphérique imparfaite avec quelques globules sur la couche extérieure (247).

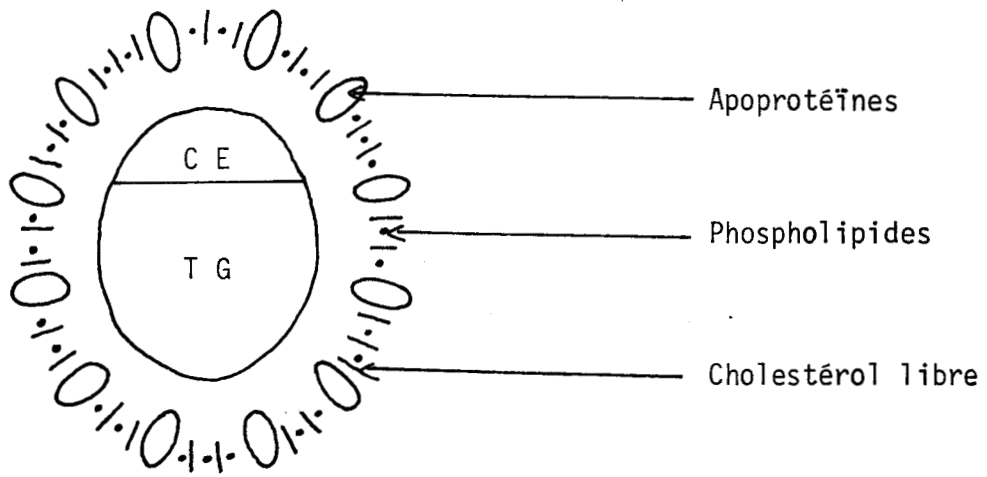
- Les méthodes chimiques -

Le plus souvent, il s'agit de méthodes enzymatiques et, par exemple, SCANU en 1972 a utilisé une phospholipase pour montrer que sur les HDL la majorité des phospholipides se situent en surface (296). Très récemment, BASU et coll. ont utilisé la phospholipase D pour montrer que les lécithines ne sont pas également accessibles lorsqu'on étudie des LDL provenant de sujets normaux ou hypercholestérolémiques (32). De même, la localisation des apoprotéines à la surface des HDL a été étudiée à l'aide de protéases (trypsine et chymotrypsine) par SHORE et coll. (330) qui mettent ainsi en évidence une variabilité dans l'accessibilité des acides aminés des apoprotéines par ces enzymes.

L'utilisation de molécules fluorescentes permet à SCHROEDER et coll. (317) de montrer que la fluidité des molécules de VLDL dépend, à l'intérieur même de la classe, du degré de saturation des acides gras et que les résultats obtenus ainsi sont en parfait accord avec une structure des VLDL en simple couche entourant un noyau de lipides.

b) Modèle moléculaire proposé -

Nous définirons ultérieurement la structure proposée actuellement pour chaque classe de LP, mais il est possible dès maintenant de décrire un modèle général. Dans le sang, les LP circulent sous forme de micelles sphériques dans lesquelles les lipides apolaires (triglycérides et esters de cholestérol) situés au coeur de la particule sont enveloppés d'une monocouche superficielle constituée par les apoprotéines et les lipides polaires (phospholipides et cholestérol libre (figure 3, page 21). Cette enveloppe hydrophile assure la solubilité des particules dans le plasma, la fonction essentielle des LP étant de transporter les lipides hydrophobes du coeur de la particule.



C E : Cholestérol estérifié

T G : Triglycérides

Figure 3

STRUCTURE GENERALE DES LIPOPROTEINES



B - LES AOPROTEINES : DEFINITION, STRUCTURE

ET REPARTITION DANS LES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES

1- DEFINITION -

Les LP sont des macromolécules constituées d'une part de lipides, et d'autre part de protéines appelées apoprotéines. Bien que représentant quelquefois moins de 1 % de la masse totale d'une LP, comme dans le cas des chylomicrons, nous verrons qu'en fait les apoprotéines sont essentielles à l'organisation, à la sécrétion et au métabolisme des LP.

Une apoprotéine est une protéine capable de fixer des lipides et de former ainsi une famille de LP solubles et polydispersées. Les apoprotéines sont formées soit d'une chaîne polypeptidique, soit de plusieurs polypeptides.

1- CLASSIFICATION DES APOPROTEINES SELON LA NOMENCLATURE D'ALAUPOVIC (2)

Les LDL et les HDL sont caractérisées par des protéines distinctes dénommées apoprotéine-B (Apo B) et A (Apo A). En plus de ces deux apoprotéines majeures, une troisième protéine initialement détectée dans les VLDL de sujets hypertriglycéridémiques a été appelée apoprotéine C (Apo C) (2).

Plus récemment, quatre apoprotéines mineures supplémentaires ont été reconnues comme étant des constituants normaux des LP plasmatiques :

- * l'une, isolée à partir des HDL, est l'apoprotéine D (Apo D) (28) ;
- * une autre, isolée à partir des VLDL, initialement dénommée "arginin rich polypeptide" est l'apoprotéine E (Apo E) (32) ;
- * un polypeptide acide isolé des HDL correspond à l'apoprotéine F (Apo F) (62) ;
- * enfin, l'apoprotéine G (Apo G), de découverte récente (26), est purifiée à partir des HDL et des VHDL.

L'Apo A comprend deux polypeptides différents A-I et A-II. L'Apo C contient trois polypeptides différents : C-I, C-II, C-III. L'Apo E semble correspondre à une seule chaîne polypeptidique .

Quant aux autres apoprotéines, Apo B, D, F ou G, on ignore encore s'il s'agit de chaîne de polypeptides simples ou de complexes formés de polypeptides différents.

Les différents polypeptides constitutifs d'une même apoprotéine sont eux aussi distingués, et l'Apo C-III par exemple se subdivise en Apo C-III₀, Apo C-III₁ et Apo C-III₂.

Ainsi, comme indiqué dans le tableau ci-dessous, les apoprotéines apparaissent en lettres majuscules, les polypeptides en chiffres romains et les différentes formes d'apoprotéines ou de polypeptides en chiffres arabes.

APOPROTEINES	POLYPEPTIDES CONSTITUTIFS	FORMES POLYMORPHES	FAMILLE DE LIPOPROTEINES
Apo A	A-I A-II	A-I-1 A-I-2	LP-A LP-A-I
Apo B			LP-B-
Apo C	C-I C-II C-III	C-III-0 C-III-1 C-III-2	LP-C
Apo D			LP-D
Apo-E		E-1 E-2 E-3	LP-E
Apo-F			LP-F
Apo-G			LP-G



3- PROPRIETES MOLECULAIRES DES APOPROTEINES -

a) Apo A -

L'apoprotéine A est le constituant protéique majeur des HDL. Elle est formée de deux polypeptides constitutifs A-I et A-II immunologiquement distincts.

-Apo A-I -

L'Apo A-I comporte une seule chaîne polypeptidique de 243 acides aminés et de masse moléculaire voisine de 28 000 daltons. La séquence déterminée par BREWER et coll. (51) diffère en quelques endroits de celle proposée par BAKER et coll. (27) ou DELAHUNTY et coll. (97). Les acides aminés en positions C- et N-terminales sont respectivement la glutamine et l'acide aspartique. Il n'y a pas d'isoleucine dans la structure primaire.

Enfin, après hydrolyse de la protéine en quatre sous-peptides au moyen du bromure de cyanogène, il a été possible de localiser les sites actifs impliqués dans la liaison avec les lipides et de les identifier aux résidus d'acides aminés 152 - 243 (296).

La structure secondaire de l'Apo-A-I présente 57,1 % d'hélice α , 9,4% de coude β , 14,7 % de feuillet plissé β , le reste de la protéine étant sans structure définie (298).

Bien que l'Apo A-I puisse être purifiée en quantité relativement importante, ses propriétés en solution aqueuse sont très mal définies ; en effet, cette protéine, lorsqu'elle est isolée, a une forte tendance à s'auto-associer formant des agrégats de poids moléculaires variables.

Certains auteurs purifient l'Apo-I sous deux formes polymorphiques d'Apo A-I₁ et d'Apo A-I₂ (107), de mêmes poids moléculaire, composition en acides aminés et propriétés immunologiques. Elles sont séparables par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % en tampon alcalin et en présence d'urée mais ont une distance de migration semblable lorsqu'on abaisse le pH à 3,5. Elles ont la même structure covalente, ne possèdent pas de glucides et sont interconvertibles.

-Apo A-II -

L'Apo A-II comporte deux chaînes polypeptidiques identiques réunies par un pont disulfure. Chaque peptide a une masse moléculaire de 8 500 daltons et possède une séquence connue de 77 acides aminés (52). Les résidus en

position C- et N- terminales sont respectivement la glutamine et l'acide pyroglutamique. L'histidine, l'arginine et le tryptophane ne figurent pas dans la structure primaire.

Enfin, la séquence minimale nécessaire pour une fixation aux phospholipides se situe entre les acides aminés 47 et 77 (192).

La structure secondaire de l'Apo A-II présente 37,7 % d'hélice α , 20,8% de coude β , 15,6 % de feuillet plissé β et 25,9 % de la protéine sont sans structure définie (293).

Les propriétés moléculaires de l'Apo A-II en solution sont relativement mieux connues que celles de l'Apo-A-I. Cette apoprotéine est le plus souvent présente sous forme de dimères mais existe également sous forme monomère et même trimère (265). Il semble en outre que les liaisons intervenant dans les phénomènes d'auto-association de l'Apo A-II soient plus solides que dans le cas de l'Apo A-I puisqu'elles résistent à une température plus élevée et à des concentrations supérieures en agents dénaturants tel que le chlorhydrate de guanidine (357).

b) Apo B -

L'apoprotéine B est actuellement la moins bien caractérisée de toutes les apoprotéines plasmatiques.

De nombreuses controverses existent quant à sa taille, sa masse moléculaire, le nombre de ses sous-unités dans les LDL, ses propriétés chimiques et sa composition. Les difficultés d'étude sont dues en majeure partie à son insolubilité et à sa facilité de polymérisation en solutions aqueuses lorsqu'elle est isolée à l'état pur. L'addition de fortes concentrations de détergents la resolubilise en partie, mais bien souvent, ces traitements offrent le désavantage majeur de modifier ses comportements électrophorétique, chromatographique et immunologique (190). Néanmoins, ayant fait l'objet de nombreux travaux, il est possible d'émettre certaines hypothèses relatives à sa structure :

- * sa masse moléculaire varie selon les auteurs de 10 000 à 250 000 daltons (359);
- * sa conformation tridimensionnelle est un mélange d'hélice α , de structure β et de pelote statique (298) ;
- * sa structure primaire encore incertaine semble indiquer que l'acide aminé en position N-terminale est bloqué. L'étude de l'extrémité C-terminale devrait

aider à la détermination du nombre de polypeptides constitutifs de cette protéine. On sait cependant qu'il s'agit d'une glycoprotéine dont la partie glucidique, partiellement caractérisée (356), représenterait 5 à 6 % de la masse totale de la protéine.

Diverses tentatives ont été faites pour solubiliser l'Apo B en vue de son étude :

* IKAI et coll. (190) utilisent le Triton X-100 et leurs études ultérieures les conduisent à envisager une structure en dimère de poids moléculaire 270000 daltons.

* HELENIUS et SIMONS (173) étudient par ailleurs la capacité qu'ont plusieurs détergents d'extraire l'Apo-B des LDL sans détruire ses propriétés immunologiques. Ils montrent que le Nonidet P-40, analogue au Triton X-100 répond à cette exigence, mais que par contre il faut éviter l'emploi du sodium-dodecyl-sulfate (SDS) ou du cétyle-triméthyl-ammonium, composés très souvent utilisés ;

* enfin, une nouvelle technique de solubilisation de l'Apo-B en milieu aqueux a été récemment proposée (184). Ce procédé devrait permettre d'effectuer des progrès quant à la caractérisation de la protéine. Les auteurs mentionnent également les situations qui entraînent inévitablement l'agrégation et l'insolubilité de l'Apo B :

- ancienneté des plasmas servant à la séparation des LDL, ou des LDL elles-même en solution ou à l'état déshydraté ;

- déplacement incomplet de l'air par l'azote dans les solutions de protéines ;.

- contamination par des peroxydes présents dans l'éther utilisé pour la délipidation.

En effet, il semble que la peroxydation des lipides des LDL provoque l'apparition d'artéfacts de hauts poids moléculaires lors de la séparation électrophorétique de l'Apo B sur gel de polyacrylamide-SDS.

c) Apo C -

Les Apo C représentent un groupe de trois protéines distinctes : C-I, C-II, C-III de faible masse moléculaire. La structure primaire de chacune d'entre-elles est connue. Aucune ne contient de cystéine ; C-I et C-II ne renferment pas de glucides et C-III se différenciant en C-III-0, C-III-1, C-III-2 contient respectivement, outre 1 mole de galactose et 1 mole de galactosamine, 0,1 ou 2 moles d'acide sialique/mole de protéine. Leur pHi est déterminé par isoélectrofocalisation entre les pH 4 et 6 (238) ; il est de 4,78 pour l'Apo C-II et 4,93, 4,72 et 4,54 respectivement pour les Apo C-III₀, 1 et 2. L'Apo C-I de pHi plus acide ne se situe pas dans la zone de pH utilisé.

D'autres formes mineures d'Apo C ont été décrites récemment (82). Elles sont mal caractérisées et sont actuellement étudiées.

-Apo C-I-

L'Apo C-I est une protéine simple de masse moléculaire 6 620 daltons (302).

Sa structure primaire comporte 57 résidus d'acides aminés parmi lesquels la thréonine et la sérine sont respectivement en position N- et C-terminales (35).

Sa structure secondaire présente 63,2 % d'hélice α , 21,0 % de coude β et 15,8 % sont sans structure (298).

L'Apo C-I se lie très avidement aux phospholipides et la partie C-terminale de la chaîne peptidique est la plus active pour cette fixation (345).

Enfin, comme pour les Apo A, la forme monomère isolée s'associe à elle-même très rapidement en solutions aqueuses et à pH neutre (264).

-Apo C-II-

L'Apo C-II est une protéine de masse moléculaire 9 930 daltons, composée de 78 acides aminés avec la thréonine et l'acide glutamique en positions N- et C-terminales respectivement (191).

Bien que jouant un rôle important dans le métabolisme des LP, cette apoprotéine est la moins bien connue quant à ses propriétés moléculaires.

-Apo C-III-

C'est l'apoprotéine la mieux caractérisée parmi les Apo C en raison, probablement, de son abondance.

Elle est formée de 79 acides aminés avec en position N- et C-terminales respectivement la sérine et l'alanine ; sa masse moléculaire est de 8 800 daltons (302).

Il s'agit en fait d'une glycoprotéine, et les résidus glucidiques (galactose, galactosamine et acide sialique) sont branchés sur la thréonine en position 74 dans la chaîne peptidique (53).

Sa structure secondaire présente 17,7 % d'hélice α , 17,7 % de feuillet plissé β , 30,4 % de coude β et le reste (34,2 %) n'a pas de structure définie (298).

Elle se lie spontanément aux phospholipides, et les déterminants plus actifs intervenant dans cette fixation sont encore portés par la région C-terminale (346).

Enfin, des auteurs rapportent la présence de formes dimères et trimères d'Apo C-III en solutions aqueuses (263).

Autres formes d'Apo C-

CATAPANO et coll. (82) quantifiant chez l'homme par une technique d'isoélectrofocalisation les Apo C-II et C-III dans les VLDL, mettent en évidence deux peptides supplémentaires Apo C mineurs (Apo C-IV et Apo C-V) de pHi respectifs 4,61 et 4,44. Ces apoprotéines ne sont pas encore caractérisées et ne représentent que 14 % de l'ensemble des protéines des VLDL. Les auteurs montrent cependant qu'il ne s'agit pas d'artéfacts techniques.

D'autre part, une forme d'Apo C-III contenant trois résidus d'acide sialique a été mise en évidence par KANE et coll. (201) et appelée C-III-3. Elle représenterait environ 10 % de la masse des Apo C.

d) Apo D -

La première identification de l'Apo D date de 1973 (228). Sa composition et son métabolisme ne sont pas parfaitement définis.

Il s'agit d'une glycoprotéine de masse moléculaire 22 700 daltons et comportant 18 % de son poids en glucides. Les acides aminés en positions N- et C-terminales sont bloqués et les auteurs rapportent la présence dans la protéine de tous les acides aminés habituels y compris le tryptophane et la cystéine (230).

e) Apo E -

L'Apo E ou "Arginin-Rich Protein" (ARP) a été isolée des VLDL par SHORE et coll. en 1974 (334). Ses propriétés moléculaires ne sont pas encore connues.

C'est une protéine ayant une masse moléculaire de 33 000 daltons (324). Elle est très riche en arginine (10 % des acides aminés totaux) ; l'acide aminé en position N-terminale est la lysine, et la séquence C-terminale est leucine-serine-alanine (366).

Par isoélectrofocalisation, plusieurs formes polymorphiques de l'Apo E ont été rapportées, et UTERMANN et coll. (368) en décrivent trois : E₁, E₂ et E₃ de pHI respectifs 5,5, 5,6 et 5,75.

Récemment, MAHLEY et coll. (234) ont isolé des VLDL de malades atteints d'hyperlipémie de type III et des HDL₂ de sujets normaux, une apoprotéine de masse moléculaire 48 000 daltons, la "pro-arginin-rich-protein" (pro-ARP), dont la réduction par le mercapto-éthanol libère deux sous-unités : une première fraction de 37 000 daltons identique à l'Apo E quant à sa composition et ses propriétés immunologiques, et une seconde ayant une masse moléculaire de 10 000 daltons. On ne sait pas actuellement si cette pro-ARP correspond à un précurseur de l'Apo E, ou à une forme polymorphique de cette même apoprotéine, ou encore à un agrégat de protéines.

f) Apo F -

L'Apo F est une apoprotéine mineure isolée à partir des HDL par OLOFSSON et coll. en 1978 (262).

Elle représente une entité lipoprotéique parfaitement distincte, de masse moléculaire 26 000 à 30 000 daltons, et contient tous les acides aminés couramment retrouvés dans les apoprotéines, à l'exception du tryptophane.

C'est une protéine acide dont le pHI déterminé par isoélectrofocalisation est de 3,7.

Sa mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide est la même que celle de l'Apo D.

g) Apo G -

L'Apo G est l'apoprotéine la plus récemment découverte (26), identifiée dans les VHDL et HDL.

C'est une protéine immunologiquement distincte des autres apoprotéines déjà connues et correspond à une entité lipoprotéique également distincte appelée LP-G.

Sa masse moléculaire est d'environ 72 000 daltons. Sa composition en acides aminés diffère de celle des polypeptides bien caractérisés des LP du sérum humain. Elle contient de la glucosamine.

Sa migration en gel d'acrylamide est très voisine de celle de l'Apo D.

h) Autres apoprotéines -

-Apo A-III-

KOSTNER (208) a isolé en 1974 à partir des HDL une apoprotéine qu'il associe tout d'abord à l'Apo D et qu'il appelle "thin-line polypeptide", puis plus tard Apo A-III, croyant qu'elle était effectivement associée à la famille LP-A.

En fait, il s'agit d'une protéine parfaitement distincte de l'Apo D (230), ne contenant pas de cystéine et dont l'acide aminé C-terminal est la sérine.

-Apo A-IV-

Isolée tout d'abord chez l'homme dans les chylomicrons du canal thoracique, et chez le rat dans la lymphe intestinale (381), l'Apo A-IV ainsi mise en évidence est identique à celle que l'on trouve dans les HDL₁ du rat et du chien (37).

Elle a une masse moléculaire de 46 000 daltons, et sa composition en acides aminés est différente de celle des autres apoprotéines déjà identifiées (367).

Elle possède en outre des propriétés immunologiques qui lui sont propres, ce qui permet de la caractériser parmi les autres apoprotéines.

D'après des études d'immunoélectrophorèse en double dimension, il semble bien que l'Apo A-IV existe dans le sérum sous deux formes : à l'état libre, non associée avec les fractions majeures de LP, et sous forme associée aux

chylomicrons (367). Ces deux formes sont retrouvées en ultracentrifugation respectivement dans la fraction de densité $> 1,21$ g/ml et $< 1,006$ g/ml.

Enfin, elle est présente chez l'homme en tant qu'apoprotéine majeure dans les chylomicrons provenant d'ascite chyleuse, mais on ne la retrouve pas au niveau des chylomicrons isolés de sérums des sujets hypertriglycéridémiques. Il est donc probable que l'Apo A-IV entre dans la composition protéique des chylomicrons natifs, et qu'elle soit ensuite rapidement éliminée lorsque ceux-ci pénètrent dans le compartiment plasmatique (159).

-Apo LP(a)-

Le polypeptide spécifique de la LP(a) (Apo LP(a)) est très mal caractérisé jusqu'à ce jour n'ayant fait l'objet que d'une seule étude particulière (196).

La masse moléculaire de l'Apo LP(a) spécifique, calculée d'après la composition en acides aminés, est de l'ordre de 14 300 daltons ; mais compte tenu de la richesse en sucre de cette protéine, cette détermination est inexacte et serait plutôt de 35.000 daltons d'après son k_{av} d'éluion par chromatographie sur Séphadex G. 75.

5- REPARTITION DES APOPROTEINES DANS LES LIPOPROTEINES -

Le tableau 6 page 34 , résume la répartition chez l'homme normal des apoprotéines précédemment définies dans les différentes classes de LP séparées par ultracentrifugation (302).

Quelques commentaires peuvent être faits à propos de ce tableau, mais il faut au préalable rappeler que les valeurs qu'il mentionne ne représentent qu'une répartition des apoprotéines à un moment donné, alors qu'en fait il s'agit d'un phénomène dynamique, et que tout au long de la dégradation et de la synthèse des LP, se produisent des échanges et des transferts d'apoprotéines entre les différentes classes.

a) Les Apo A -

Dans un plasma normal, 87 % de l'Apo A-I et 90 % de l'Apo A-II sont retrouvés au niveau des HDL. Le reste se répartit à l'état de traces dans les autres LP.

Cependant, 12 % d'Apo A-I et 9 % d'Apo A-II peuvent être retrouvés dans la fraction de densité supérieure à 1,21 g/ml. Ces concentrations augmentent parfois considérablement en fonction notamment du nombre de lavages effectués au cours des ultracentrifugations, et FAINARU et coll. (120) montrent que jusqu'à 60 % de l'Apo A-I des HDL peuvent ainsi être dissociés et se retrouver dans le sous-nageant de densité supérieure à 1,21 g/ml.

D'autre part, on peut noter un pourcentage relativement élevé d'Apo A dans les chylomicrons natifs de la lymphe ; mais lorsque ceux-ci sont isolés à partir du sérum, du fait de leur métabolisme, ils n'en possèdent plus que 2%.

b) Les Apo B -

L'Apo B fait partie intégrante des chylomicrons natifs, des VLDL et des LDL, représentant respectivement 20 %, 40 % et 98 % des protéines totales de ces LP. Elle n'existe qu'à l'état de traces dans les HDL.

c) Les Apo C -

Des concentrations variables d'Apo C sont retrouvées dans toutes les LP plasmatiques, et représentent plus de 60 % de la masse protéique totale des chylomicrons, 40 à 80 % de celle des VLDL, et 2 à 10 % de celle des HDL. Les LDL en contiennent des traces.

d) L'Apo D -

Chez des sujets normaux, l'Apo D est détectable par des méthodes immunologiques dans toutes les classes de densité, mais seulement mesurable dans les HDL₂, HDL₃ et VHDL où elle se répartit respectivement selon les pourcentages suivants : 21 %, 43 % et 36 % de sa totalité.

Ces valeurs correspondent à des fractions de LP séparées par ultracentrifugation, mais non lavées. En effet, des ultracentrifugations répétées et destinées à enlever l'albumine contaminante résultent en une perte d'Apo D pouvant aller de 40 à 50 % (94).

e) L'Apo E -

L'Apo E est retrouvée normalement chez l'homme dans les VLDL où elle représente 13 % des protéines, et dans les HDL, et plus précisément dans les IDL et les HDL₂.

Cependant, après une seule ultracentrifugation, une grande partie de l'Apo E (30 à 40 %) peut être dissociée des LP et se retrouver ainsi dans le sous-nageant de densité supérieure à 1,21 g/ml (122).

f) L'Apo F -

Cette apoprotéine a été isolée à partir des HDL, et actuellement on ignore encore si elle existe dans d'autres fractions de LP (262).

g) L'Apo G -

Comme dans le cas de l'Apo F, l'Apo G n'ayant été découverte que très récemment, on ne l'a caractérisée jusqu'à présent que dans les fractions ayant servi à son isolement c'est à dire dans les HDL et les VHDL (26).

Mais quoiqu'il en soit, ces deux dernières apoprotéines sont mineures et n'existent qu'en quantités très faibles dans leurs fractions respectives.

TABLEAU 6

REPARTITION DES APOPROTEINES DANS LES DIFFERENTES CLASSES
DE LIPOPROTEINES PLASMATIQUES CHEZ L'HOMME

APOPROTEINES	CHYLOMICRONS		VLDL	LDL	HDL	VHDL
	natifs**	circulants***				
A-I	7,4	traces	traces	-	67	+
A-II	4,2	traces	traces	-	22	+
B	22,5	5 - 20	36,9	98	traces	-
C-I	15	15	3,3	traces	1 - 3	-
C-II	15	15	6,7	traces	1 - 3	-
C-III	35,6	40	39,9	traces	3 - 5	-
D	-	-	-	-	+	+
E	-	+	13,0	traces	+	+
F	-	-	-	-	+	-
G	-	-	-	-	+	+

(en pourcentages des protéines totales des Lp)

** isolés de la Lymphe

*** isolés du plasma



C - LES PRINCIPALES ENZYMES INTERVENANT

DANS LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES

1- INTRODUCTION -

De très nombreuses enzymes interviennent dans le métabolisme des LP:

- * différentes lipases parmi lesquelles des phospholipases, des glycérides-lipases et notamment des triglycérides-lipases, et la cholestérol-estérase;
- * des protéases et des hydrolases acides lysosomales, très importantes pour le catabolisme intra-cellulaire des LDL ;
- * des réductases et en particulier la β -hydroxy- β -méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG - CoA réductase), enzyme de régulation de la biosynthèse du cholestérol ;
- * des transférases, notamment la lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT) et l'acyl-coenzyme A-cholestérol-acyltransférase (ACAT), enzyme d'estérification du cholestérol libre.

Dans ce chapitre, nous nous limiterons à l'étude des propriétés physico-chimiques des triglycérides-lipases et de la LCAT, enzymes fondamentales du métabolisme des LP.

2- LES TRIGLYCERIDES-LIPASES -

L'hydrolyse des triglycérides des LP circulantes dépend des activités lipolytiques de la paroi endothéliale des capillaires.

Ces activités sont celles d'au moins deux lipases ayant des propriétés moléculaires différentes et propres à chacune d'entre-elles. Il s'agit de la triglycéride-lipase hépatique (TGLH) de la lipoprotéine-lipase (LPL).

Les activités de ces enzymes ne sont pas mesurables dans le plasma normalement. En effet, elles semblent bien liées à l'endothélium des vaisseaux et ne peuvent être appréciées qu'après injection d'héparine, correspondant ainsi aux activités du "plasma post-héparine".

a) La lipoprotéine lipase (LPL) -

Le foie, bien que site majeur de l'épuration du cholestérol des LP (273), n'intervient chez l'homme que pour 20 à 30 % de celle des triglycérides, le reste étant catabolisé dans des tissus extra-hépatiques (39).

Mais avant d'être captés, les triglycérides plasmatiques, transportés principalement par les chylomicrons et les VLDL, sont hydrolysés par la LPL et l'enzyme présente une stéréospécificité pour les acides gras en position 1 (256).

La LPL est une enzyme présente dans le muscle squelettique, le coeur les glandes mammaires, les poumons, les tissus myocardique et surtout adipeux (287), et son activité dans les tissus varie selon les états nutritionnels et physiologiques (le jeûne, l'exercice physique, la grossesse, la lactation) (318). Elle est libérée très rapidement quand les organes isolés sont perfusés "in vitro" avec des solutions contenant de l'héparine (128), ce qui prouve sa localisation sur un site tissulaire immédiatement accessible dans la lumière vasculaire. Son site normal d'action est la surface des capillaires des cellules endothéliales (287).

En fait, l'enzyme existerait sous deux formes, et de nombreux travaux sont en faveur d'une autre forme intracellulaire dans la plupart des organes. (20).

Pour CUNNINGHAM et ROBINSON (91), la forme instable serait à l'extérieur de l'adipocyte, la forme stable étant intracellulaire. Celle-ci est considérée par ailleurs comme étant le précurseur de la précédente (360), et lorsqu'on passe "in vivo" de l'état à jeun à l'état nourri, l'enzyme instable apparaît à l'extérieur des cellules adipeuses afin de remplir son rôle physiologique. Les tissus diffèrent quant à leur contenu en chacune des formes, et dans le coeur de rat par exemple, seuls 25 % de l'activité LPL totale sont libérés par l'héparine (129).

La fixation de l'enzyme aux membranes cellulaires semble se faire par l'intermédiaire de glycosaminoglycannes soufrés (287). OLIVECRONA et coll. suggèrent que la lipase est attachée aux polymères par des interactions électrostatiques, la longueur de ces liaisons pouvant aller de 20 à 50 nm, et que le composant déterminant de tous les polysaccharides est l'acide L-iduronique (260).

Ainsi, la LPL doit hydrolyser les triglycérides situés dans le noyau des chylomicrons et des VLDL, et on ne sait pas encore comment se fait l'interaction entre cette enzyme et son substrat. L'activité phospholipasique de la LPL reconnue par certains auteurs (373) pourrait peut-être dans ce cas être en cause dans un premier temps en hydrolysant des phospholipides de surface (374).

Lors de sa mise en incubation "in vitro" avec des triglycérides, l'activité de la LPL dépend de la présence d'un facteur sérique (207). Cet activateur peut être apporté par des HDL ou des VLDL, et en 1970, HAVEL et coll. l'ont identifié à l'Apo C-II, une des apoprotéines de ces LP (172). Le mécanisme précis de cette activation n'est pas encore bien connu, et le fait que la LPL puisse quand même hydrolyser les triglycérides en absence d'Apo C-II, mais à une vitesse beaucoup plus faible, exclut un rôle de co-enzyme vraie (172). Le taux d'hydrolyse des triglycérides augmente en fonction de la concentration en Apo C-II, il est maximum pour un rapport molaire enzyme/Apo C-II égal à 1/1 (127).

Enfin, KINNUNEN et coll. (206) identifient dans la séquence de l'Apo C-II trois régions peptidiques différentes impliquées dans le processus d'activation :

- * une région C-terminale formée de deux acides glutamiques (Glu) interagirait de façon électrostatique avec une autre région, chargée positivement, de la LPL;
- * une seconde région changerait la structure de l'enzyme, provoquant ainsi une augmentation de la catalyse enzymatique ;
- * une troisième région en position N-terminale serait impliquée dans la liaison avec les lipides.

L'activation de la LPL par l'Apo C-II est inhibée par l'Apo C-III normalement présente dans les VLDL (360) ; ceci explique pourquoi l'enzyme, essentiellement active au premier stade de la dégradation des chylomicrons et des VLDL, a son activité qui diminue au fur et à mesure que les molécules deviennent plus petites, cette baisse correspondant à une diminution du rapport Apo C-II/Apo C-III.

b) La triglycéride-lipase hépatique (TGLH) -

Ainsi, même si chez l'homme une grande partie des triglycérides des chylomicrons et des VLDL est catabolisée dans un premier temps par la LPL dans des tissus extra-hépatiques, la dégradation totale par le foie des particules résiduelles (ou "remnants") ainsi formées réclame quand même un certain potentiel lyolytique et fait intervenir la TGLH.

Le mécanisme exact de la réaction n'est pas bien connu, mais il semblerait qu'il y ait un contact direct des LP et des microvillosités de surface de l'hépatocyte par l'intermédiaire de l'espace de Disse (352).

La TGLH est localisée sur les membranes plasmiques des cellules du foie, et lors d'injection intraveineuse d'héparine, cette enzyme est libérée plus vite et en plus grande quantité que la LPL (85).

3- LA LECITHINE-CHOLESTEROL-ACYL TRANSFERASE (LCAT) -

La LCAT est une enzyme synthétisée dans le foie. Elle circule dans le plasma essentiellement liée aux HDL, et catalyse le transfert d'un acide gras en position 2 de la phosphatidyl-choline (ou lécithine) à du cholestérol libre (144), induisant ainsi la formation de lysophosphatidyl-choline (ou lysolécithine) et d'esters de cholestérol riches en acides gras essentiels qui sont les acides gras majeurs des lécithines.

Certaines LP plasmatiques réagissent directement avec l'enzyme, et beaucoup de preuves expérimentales sont en faveur d'une réaction préférentielle de la LCAT sur les HDL, et plus précisément sur les HDL₃ (143), plus petites que les HDL₂. Des études effectuées "in vitro" et "in vivo" ont également montré que de "grosses" VLDL ont une réactivité plus grande en présence de LCAT que les mêmes LP mais plus petites (147).

Cependant, bien que l'action directe de la LCAT s'exerce préférentiellement au niveau des HDL, les substrats nécessaires à cette activité (lécithine et cholestérol) peuvent être fournis par les VLDL ou les LDL, et lorsque la réaction est terminée, le cholestérol estérifié ainsi obtenu est restitué à ces deux LP de départ (169).

Ainsi, le fait même de la réaction LCAT est de synthétiser des esters de cholestérol échangeables et de la lysocécithine :

* chez l'homme, la demi-vie des esters de cholestérol des HDL est très différente de celle de l'Apo A-I, apoprotéine majeure de ces mêmes LP, ce qui suggère une destinée différente ; l'incubation "in vitro" de LP de malades déficients en LCAT avec l'enzyme montrent en effet que 80 à 90 % des esters formés apparaissent dans les LP possédant de l'Apo B (259) ;

* le devenir métabolique de la lysolécithine est relativement mal connu et il semble que ce composé soit capté soit par la sérumalbumine circulante, soit par les membranes cellulaires. WILLE et coll. (386) caractérisent d'autre part par électrophorèse sur agarose une famille de LP très riche en lysolécithine, contenant en plus de l'albumine et de l'Apo A-I ; ce complexe appelé A-A-L par les auteurs se chargerait de la lysolécithine provenant de la réaction LCAT pour la transporter jusqu'aux tissus où elle serait réacylée.

La réaction LCAT est fortement stimulée en présence d'Apo A-I (130). De plus, une activité optimale de l'enzyme est obtenue lorsque le rapport lécithine/cholestérol libre est au minimum égal à 3/1 (131).

Les Apo C-I et -D sont également des activateurs de la LCAT; par contre, l'Apo A-II inhibe l'activation due à la présence d'Apo A-I (395).

D - LES QUATRE CLASSES MAJEURES DE LIPOPROTEINES :

ORIGINE ET BIOSYNTHESE, STRUCTURE, DEGRADATION, ROLE

1- LES CHYLOMICRONS -

a) Synthèse des chylomicrons -

Les graisses alimentaires, essentiellement sous forme de triglycérides, parvenant au duodénum, subissent une dégradation sous l'action des enzymes du suc pancréatique (une lipase, des estérases, une phospholipase A), et en présence de la bile d'origine hépatique. Il se forme des micelles composées d'acides biliaires et surtout d'acides gras (AG) et de monoglycérides (MG).

Après incorporation dans la cellule intestinale, les acides gras de longueur de chaîne inférieure ou égale à 12 atomes de carbone, passent dans le sang de la veine porte où ils sont pris en charge par la sérualbumine à destination du foie. Les autres rejoignent le "pool" intracellulaire qui comprend des acides gras issus de la captation des acides gras libres (AGL) circulants ou provenant d'une synthèse locale. Tous ces acides gras sont utilisés :

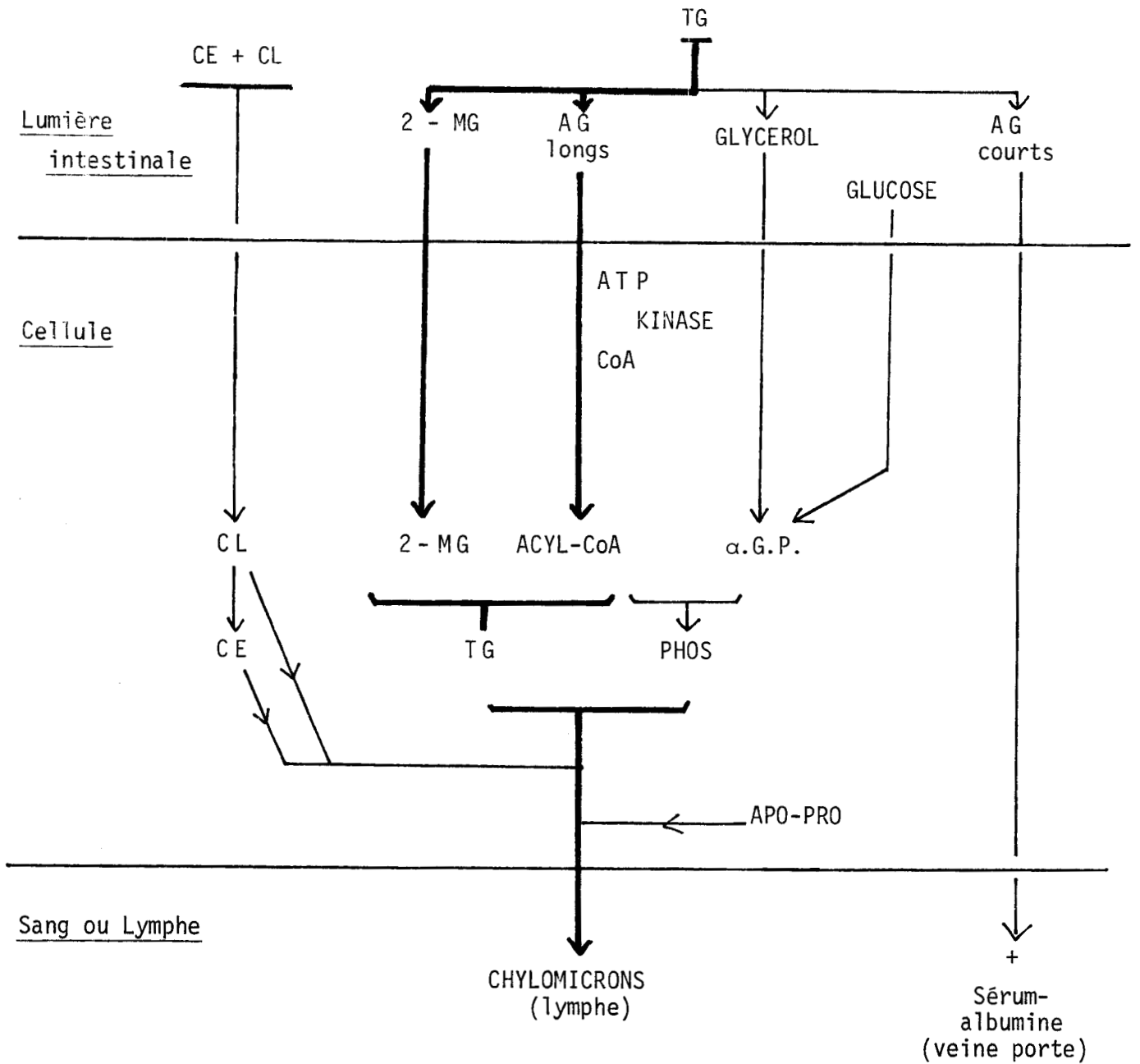
- * pour la synthèse de nouveaux triglycérides à partir des 2 MG (c'est la voie majeure) ;
- * pour la synthèse de phospholipides par la voie classique du 3 phospho-glycérol issu de la glycolyse ;
- * pour la synthèse de cholestérol estérifié soit à partir du cholestérol issu de l'absorption intestinale, soit à partir de cholestérol synthétisé "de novo" à partir de l'acétyl-coenzyme-A (AcCoA).

Cholestérol et triglycérides s'associent aux phospholipides et aux Apo B synthétisées "in situ" au niveau des ribosomes pour former des chylomicrons ensuite libérés dans la lymphe intestinale ; ces chylomicrons rejoignent enfin la circulation générale au niveau du canal thoracique. La synthèse d'Apo B est essentielle pour la formation des chylomicrons, et ceux-ci sont absents dans les plasmas de patients abétalipoprotéiniques, maladie familiale caractérisée par un défaut de synthèse d'Apo B.

La figure 4, page 41 résume la biosynthèse et la sécrétion des chylomicrons.

b) Structure et composition des chylomicrons -

En microscopie électronique, les chylomicrons apparaissent comme de très grosses sphères à surface lisse, de diamètre 10^2 à 10^3 nm. Ils ont une



CE : Cholestérol estérifié
CL : Cholestérol libre
2-MG : 2-monoglycérides
AG : Acides gras

TG : Triglycérides
PHOS : Phospholipides
α.G.P. : Glycéro-phosphate
APO-PRO : Apoprotéines

Figure 4

BIOSYNTHESE ET SECRETION DES CHYLOMICRONS



densité inférieure à 0,95 g/ml et une masse comprise entre $0,4 \cdot 10^9$ et $30 \cdot 10^9$ daltons.

Leur structure correspond à celle d'un noyau de triglycérides entouré de phospholipides (essentiellement de lécithine), de cholestérol et d'apoprotéines répartis en couche monomoléculaire (295).

Les compositions lipidique et protéique des chylomicrons varient selon leur origine, et les particules natives isolées de la lymphe du canal thoracique contiennent plus de phospholipides et moins de protéines que celles du plasma (110).

Les lipides constitutifs des chylomicrons plasmatiques sont essentiellement des triglycérides représentant 85 à 95 % de la masse lipidique totale, et 5 à 10 % et 3 à 5 % de celle-ci sont respectivement formés de phospholipides et de cholestérol.

Moins de 2 % de la composition des chylomicrons sont constitués de protéines. Comparés aux particules natives, les chylomicrons plasmatiques contiennent moins d'Apo A (A-I et A-II) et plus d'Apo C et E (303) (Tableau 7 page 43).

c) Dégradation des chylomicrons -

Ainsi, les chylomicrons sécrétés par l'intestin subissent d'importants changements dans le plasma avant d'être dégradés, acquérant notamment des Apo C et E, et libérant des Apo A. En effet, de très nombreuses études effectuées chez le rat montrent que l'intestin produit des particules lipoprotéiques contenant des Apo B et A, mais dépourvues d'Apo C, celles-ci n'étant ajoutées qu'après la synthèse des chylomicrons (389).

Des travaux très récents suggèrent que chez l'homme, les Apo A-I et A-II des chylomicrons de la lymphe qui représentent plus de 12 % des apoprotéines totales, servent de précurseurs pour les Apo A des HDL (303).

Les Apo C, par l'intermédiaire de l'Apo C-II, jouent un rôle dans l'activation de la LPL, enzyme-clef du catabolisme des LP riches en triglycérides, et donc des chylomicrons (172).

Quant à l'Apo E, elle pourrait servir de signal pour la dernière étape d'épuration des chylomicrons (186).

Les chylomicrons apparaissent en période post-prandiale chez l'homme et sont éliminés très rapidement :

- * la demi-vie de leurs triglycérides est inférieure à 20 minutes ;
- * et en moins de 6 heures, ils disparaissent du plasma chez le sujet normal.

TABLEAU 7

COMPOSITION CENTESIMALE EN APOPROTEINES CHEZ L'HOMME
DES CHYLOMICRONS NATIFS ET PLASMATIQUES (303)

APOPROTEINES	B	A-I	A-II	C-I	C-II	C-III
Chylomicrons natifs*	22,5	7,4	4,2	15,2	15,1	35,6
Chylomicrons plasmatiques	5 - 20	traces	traces	15	15	40

* isolés de la lymphe du canal thoracique



L'étape catabolique principale des chylomicrons est une délipidation par perte de triglycérides sous l'influence d'un système enzymatique représenté par la LPL et localisé au niveau de l'endothélium des capillaires de tous les tissus utilisateurs de triglycérides. Pour être reconnus par l'enzyme, ces chylomicrons doivent d'abord recevoir des HDL un complément d'Apo C et d'Apo C-II en particulier ; il s'agit en fait d'un échange, et après l'hydrolyse, ces Apo C-II sont reprises par les HDL servant ainsi de "navette".

Le mécanisme de fixation des chylomicrons sur la LPL n'est pas bien connu, et il semblerait qu'une liaison spécifique protéine-protéine se forme entre l'Apo C-II du substrat et l'enzyme à la surface de la cellule endothéliale (341).

Il est encore possible que l'interaction initiale des chylomicrons et de la surface cellulaire ne mette pas en jeu la LPL. En effet, des études "in vitro" montrent que l'Apo B et l'Apo E se lient à l'héparine avec une grande affinité (59), et très probablement la fixation de l'enzyme aux membranes se faisant par l'intermédiaire de glycosamino-glycannes soufrés, on peut penser aussi qu'une liaison électrostatique s'établit entre les chylomicrons et les chaînes glycaniques.

Quoi qu'il en soit, lors de l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons par la LPL, il y a libération d'acides gras, de diglycérides et de glycérol. Les diglycérides sont incorporés, hydrolysés et les deux acides gras sont utilisés.

Ainsi les acides gras libérés sous l'action de la LPL peuvent suivre trois voies métaboliques :

- * utilisation "in situ", comme source d'énergie pour les muscles squelettiques et le myocarde, ou pour la synthèse des triglycérides du lait par la glande mammaire ;
- * mise en réserve dans le tissu adipeux où les triglycérides sont reconstitués en présence de phospho-3-glycérol ;
- * transport au foie assuré par la sérumalbumine qui leur confère l'hydrosolubilité.

Au niveau du cytosol de l'hépatocyte, les AGL peuvent soit pénétrer dans les mitochondries et être oxydés, soit être réestérifiés en triglycérides. La figure 5, page 45 illustre l'activation et le rôle de la LPL tissulaire.

Parallèlement à la perte de triglycérides, les chylomicrons s'appauvrissent également en matériel de surface :

- * par transfert de cholestérol libre et d'Apo C sur les HDL ;
- * et par hydrolyse des lécithines en lysolécithines qui se fixent sur l'albumine et/ou les membranes cellulaires. Cette hydrolyse fait encore intervenir la LPL qui possède une action phospholipasique A₁ (373).

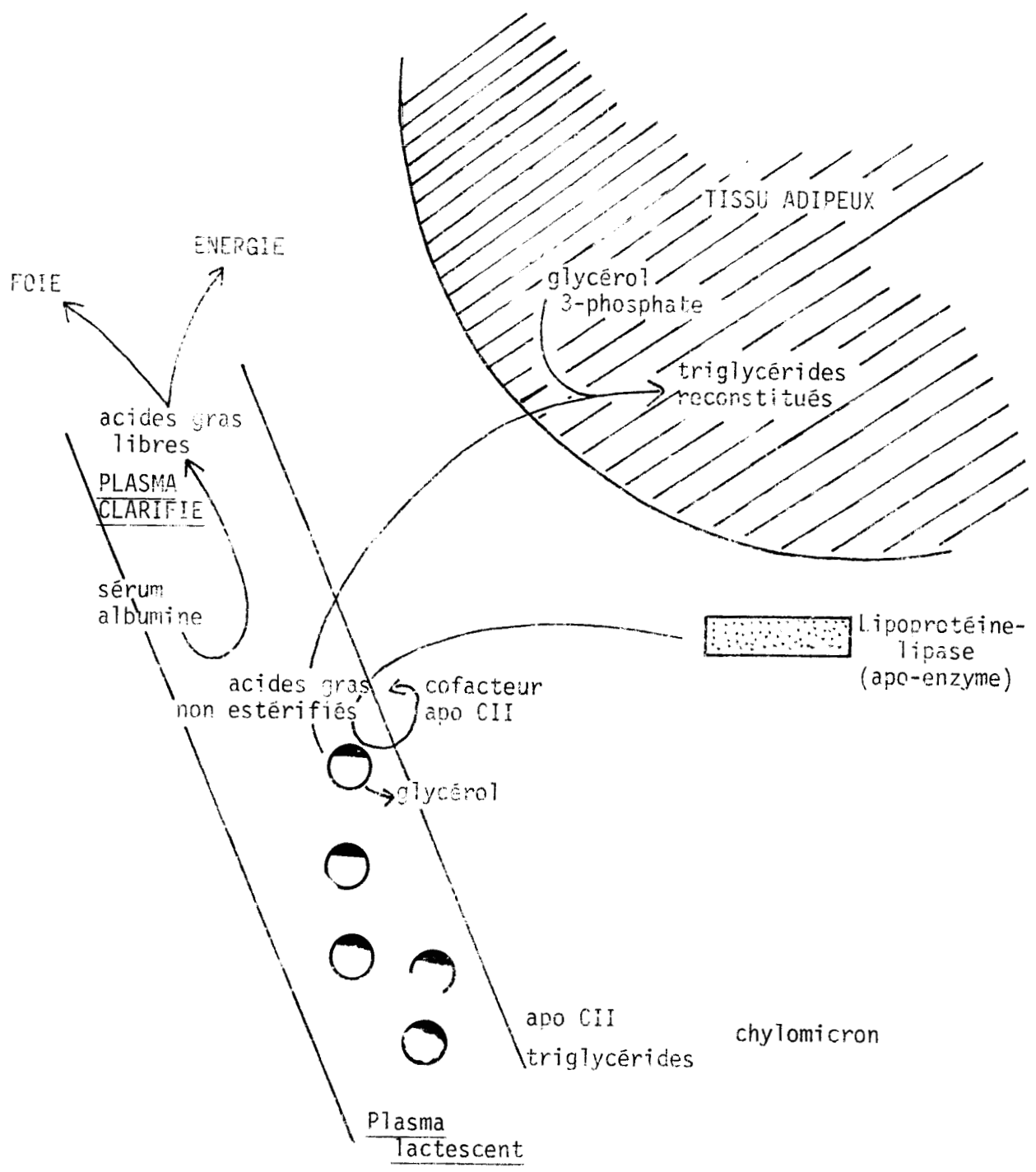


Figure 5

ACTIVATION ET ROLE DE LA LIPOPROTEINE-LIPASE TISSULAIRE (EN PHASE PLASMATIQUE)

La délipidation progressive des chylomicrons donne lieu à la formation dans le plasma de particules résiduelles ou "remnants" appauvries en glycérides, mais proportionnellement enrichies en cholestérol estérifié et en Apo B.

Le devenir des "remnants" chez l'homme est encore relativement mal connu, et plusieurs hypothèses sont possibles :

* Les modifications de la répartition des apoprotéines (perte d'Apo C-II, rapport élevé Apo B/Apo C) rendant les "remnants" insensibles à la LPL extra-hépatique, favoriseraient leur fixation sur des récepteurs cellulaires spécifiques, essentiellement au niveau des hépatocytes, où ils seraient complètement dégradés ou simplement à nouveau délipidés sous l'influence de la TGLH et de la cholestérol estérase et transformés ainsi en LDL (110) ;

* le cholestérol libre libéré des chylomicrons et transféré aux HDL pourrait subir l'action de la LCAT et être redistribué ensuite sous forme d'esters de cholestérol aux autres LP (VLDL, IDL, LDL) (147). En même temps, il y aurait un transfert de l'Apo E des sous-fractions de HDL en contenant, aux VLDL et IDL et les esters seraient ensuite éliminés par un mécanisme hépatique dépendant de la reconnaissance de l'Apo E par des récepteurs spécifiques (figure 6, page 47).

La figure 7, page 48 illustre le métabolisme intravasculaire des chylomicrons.

d) Rôle des chylomicrons -

La fonction essentielle des chylomicrons est de transporter aux niveaux des sites utilisateurs et de stockage les acides gras d'origine exogène absorbés dans les périodes post-prandiales.

Les besoins caloriques étant relativement constants durant tout le jour, les calories lipidiques excédentaires qui entrent dans la circulation après chaque repas sont transportées au niveau du tissu adipeux, lieu de stockage, et sont ainsi mises en évidence pour être utilisées ensuite à des fins énergétiques entre les repas (les AGL assurent environ 40 % des besoins énergétiques chez l'homme).

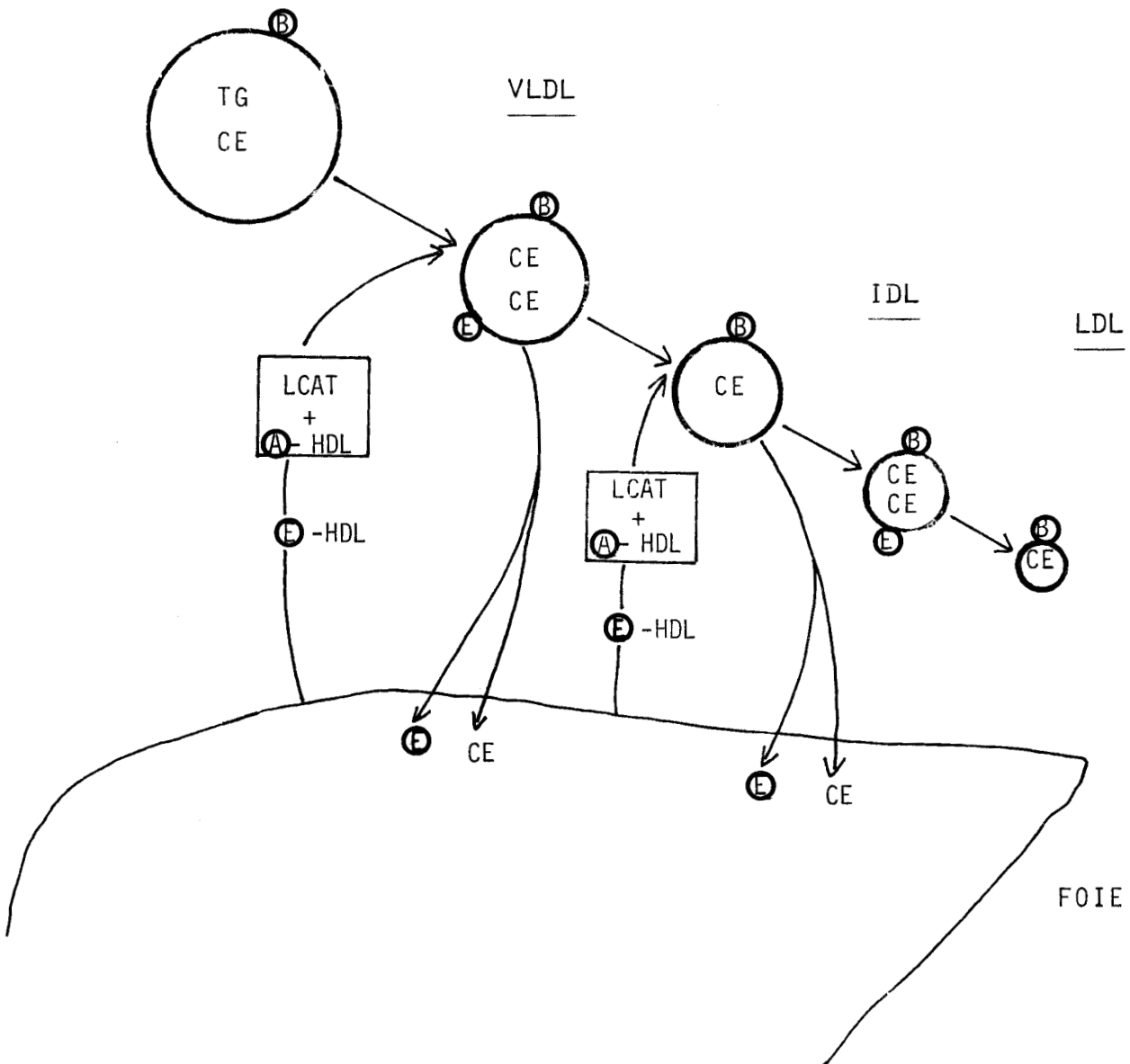
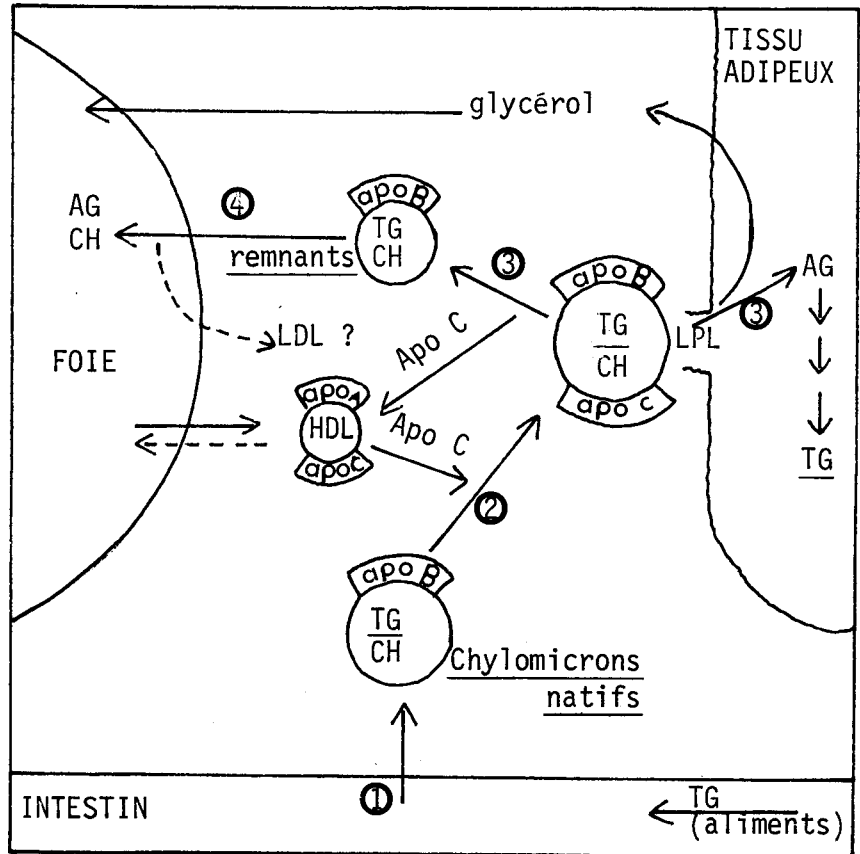


Figure 6

ROLE PROBABLE DE L'APO E DANS LE RETOUR
DES ESTERS DE CHOLESTEROL AU FOIE





- HDL : high density lipoproteins
- LPL : lipoprotéine-lipase
- AG : acides gras
- TG : triglycérides
- CH : cholestérol

Figure 7

METABOLISME INTRAVASCULAIRE DES CHYLOMICRONS



LES VLDL -

a) Synthèse des VLDL -

La biosynthèse des VLDL s'effectue essentiellement au niveau du foie, et accessoirement de l'intestin.

La synthèse par l'intestin est beaucoup plus permanente que celle des chylomicrons, intermittente et n'intervenant qu'en période nutritionnelle. Elle est cependant quantitativement très inférieure à celle du foie, et ne représente que 10 % de l'ensemble des VLDL déversées dans le sang.

L'élément majeur régulant la synthèse et la sécrétion des VLDL par l'hépatocyte et l'entérocyte est la quantité d'acides gras disponibles localement (d'origine exogène ou endogène).

Les lipides constitutifs des VLDL proviennent essentiellement du métabolisme hépatique endogène.

En effet, le foie synthétise activement de nombreux phospholipides et des triglycérides à partir du 3-phospho-glycérol et d'acides gras activés en acyl-coenzyme A.

Les acides gras utilisés peuvent avoir une double origine, et provenir soit d'une synthèse "in situ" à partir de la molécule d'acétyl-coenzyme A d'origine glucidique ou lipidique, soit de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux par l'intermédiaire d'une captation des acides gras circulants, proportionnelle au flux sanguin traversant le foie.

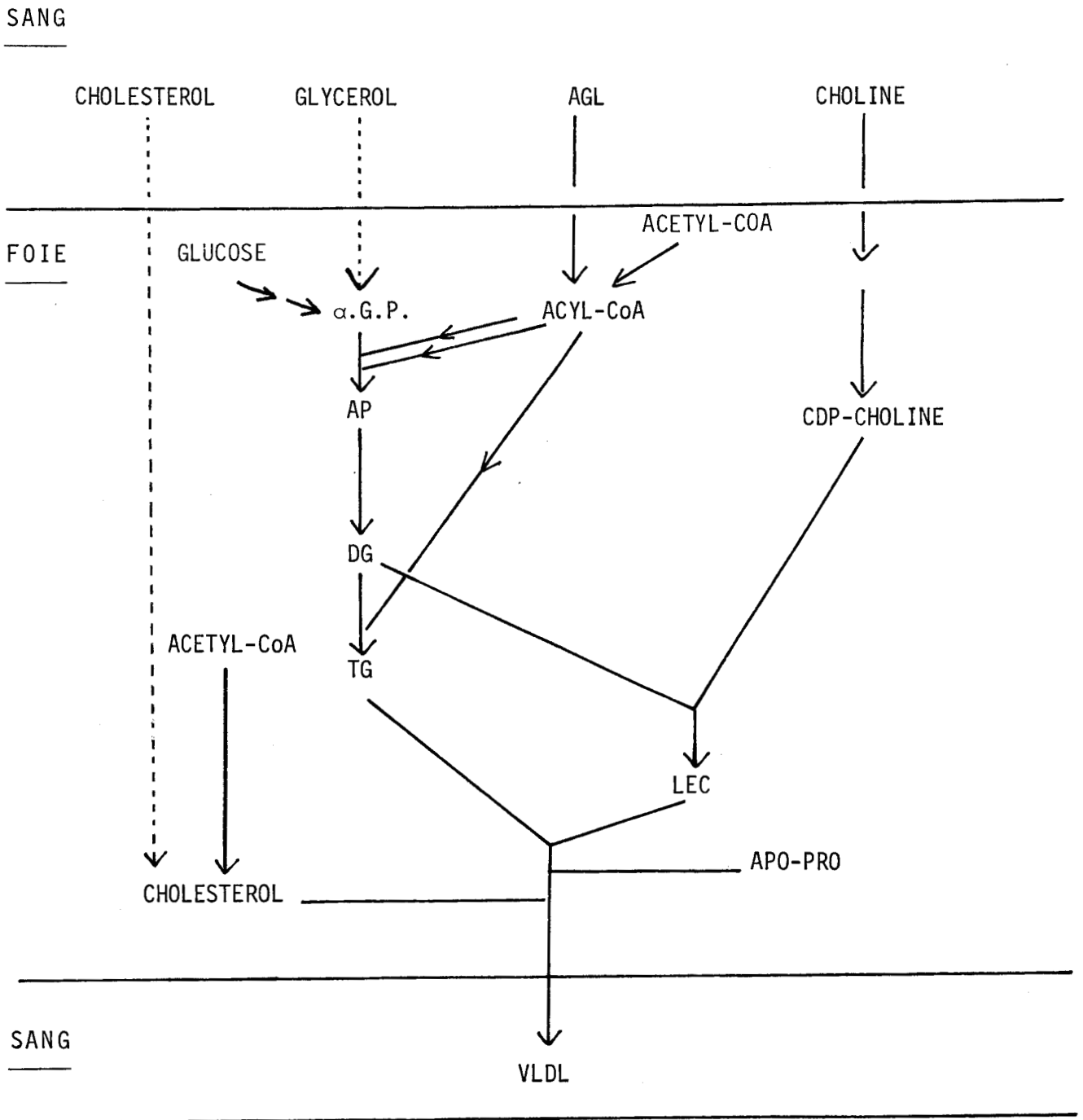
Le 3-phospho-glycérol provient soit d'une phosphorylation du glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux où il n'est pas réutilisable efficacement, soit d'une réduction de la phospho-dihydroxyacétone issue de la glycolyse hépatique.

Le cholestérol hépatique est essentiellement synthétisé "de novo" à partir de l'acétyl-coenzyme A (90 % de la production de tout l'organisme), mais il peut également provenir de l'intestin, par la captation des "remnants" issus du catabolisme intravasculaire des chylomicrons.

Enfin, les lécithines sont formées à partir du 3-phospho-glycérol et de la CDP-choline, par la voie des diglycérides.

La figure 8, page 50 résume la biosynthèse des VLDL.

Comme dans la cellule intestinale, les VLDL se forment tout d'abord au niveau du réticulum endoplasmique, les ribosomes synthétisant l'Apo B (figure 9, étape 1, page 52). Ces apopeptides passent ensuite dans la lumière



- α .G.P. : Phospho-3-glycérol
- AP : Acide phosphatidique
- DG : 1-2-diglycérides
- TG : Triglycérides
- LEC : Lécithines
- AGL : Acide gras libre
- APO-PRO : Apoprotéines



Figure 8

BIOSYNTHESE ET SECRETION DES VLDL

du réticulum endoplasmique granuleux (étape 2). Les glucides sont ajoutés (étape 3), et l'on aboutit ainsi à la formation d'apoglycopeptides dans le réticulum endoplasmique lisse et l'appareil de Golgi. Il y a enfin addition des lipides, soit en une seule étape (étape 4), soit selon un processus à plusieurs temps (étape 4a), dans lequel d'abord les phospholipides et peut-être le cholestérol sont ajoutés et seulement ensuite le reste des lipides (239, 363).

Les VLDL ainsi formées sont libérées à l'extérieur de la cellule grâce à un système micro-tubulaire. Les LP natives apparaissent dans l'espace de Disse, puis dans le sinussoïde hépatique où elles entrent en contact avec les HDL₂, s'enrichissant ainsi en Apo C et E.

Les Apo C ne sont pas obligatoires pour la synthèse ou la sécrétion des VLDL, et ne jouent qu'un rôle mineur dans la structure des LP ; elles sont par contre indispensables pour l'action métabolique de la LPL (111). Comme pour les chylomicrons, la synthèse d'Apo B est essentielle à celle des VLDL (110).

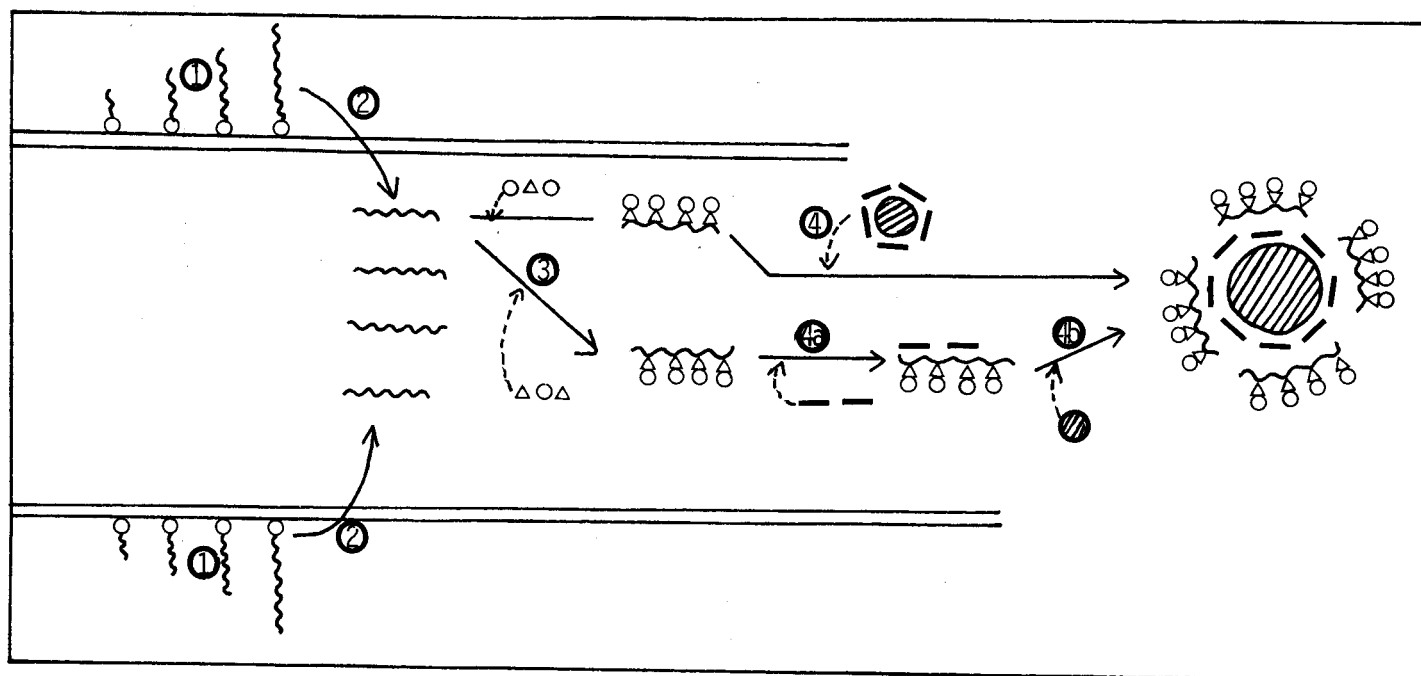
Peu de choses sont connues quant aux facteurs de régulation de la synthèse des VLDL.

EISENBERG et coll. (110) suggèrent que le facteur majeur déterminant le taux de triglycérides des VLDL est représenté par les acides gras à partir desquels sont synthétisés ces triglycérides.

La synthèse des apoprotéines peut également jouer un rôle dans cette régulation, et il est intéressant de préciser à cet égard, l'existence d'un "pool" préformé d'apoprotéines dans les cellules hépatiques : en effet, certains auteurs montrent une sécrétion de VLDL malgré la perfusion de cet organe avec de la cycloheximide (110). Il est alors fort probable que la synthèse des apoprotéines soit le tout premier stade de la formation des VLDL.

b) Composition et structure des VLDL -

En microscopie électronique, les VLDL apparaissent comme des particules sphériques ayant un diamètre de 300 à 800 Å, et de récents travaux montrent en outre l'existence fréquente de particules de diamètre 100 à 250 Å, et même dans certains cas inférieur à 100 Å (161). Ces LP ont une masse moléculaire comprise entre 5 et 100 millions de daltons, et possèdent en ultracentrifugation analytique un Sf de 20 à 400. Leur densité est inférieure à 1,006g/ml. Il s'agit donc d'une classe très hétérogène, et récemment 7 sous-fractions de VLDL ont été décrites en ultracentrifugation zonale (269).



~~~~~ apoprotéines  
OΔO glucides  
⊙ lipides

Figure 9

DIFFERENTES ETAPES DE LA SYNTHÈSE DES VLDL



Les compositions lipidique et protéique de chacune d'entre-elles varient et on ne peut indiquer qu'une composition moyenne des VLDL : 90 % de la masse des molécules sont constitués par des lipides, répartis en triglycérides (60 à 70 %), phospholipides et cholestérol (10 à 15 %). Le rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié est voisin de 10 ; 80 % des phospholipides sont des glycérophospholipides, essentiellement de la lécithine, et le reste est constitué de sphingomyéline.

Des changements progressifs interviennent au fur et à mesure que les VLDL deviennent plus denses et plus petites : la masse totale des triglycérides diminue, les valeurs relatives des phospholipides et du cholestérol augmentent, et les rapports cholestérol libre/cholestérol estérifié et lécithine/sphingomyéline décroissent.

La composition en apoprotéines est également variable, et une particule "moyenne" de VLDL contient 40 % d'Apo B, 50 % d'Apo C, et 10 à 15 % d'autres protéines parmi lesquelles essentiellement de l'Apo E. Comparativement à des grosses molécules, certains auteurs montrent par des études métaboliques que les petites particules sont plus riches en Apo E (116). D'autre part, KANE et coll. (201) utilisant une technique de précipitation par la tétraméthylurée (TMU) qui différencie les protéines insolubles (Apo B) des protéines solubles (Apo C + E), étudient les variations des ces apoprotéines en fonction de la taille des VLDL. Ils trouvent ainsi que la masse d'Apo B est proportionnelle à la densité, et que le rapport Apo E/Apo B décroît moins vite que le rapport Apo C/Apo B.

La figure 10, page 54 représente les variations des lipides et des apoprotéines dans les particules de VLDL en fonction de leur masse moléculaire. Elle est adaptée des travaux de PATSCH et coll. (269) et confirme ceux de EISENBERG (112) dans lesquels l'auteur observe qu'une diminution de 50 % du poids moléculaire moyen des VLDL s'accompagne d'une baisse de 60 % des triglycérides, 40 % des esters de cholestérol, 40 % des Apo C et 30 et 40 % du cholestérol libre et des phospholipides respectivement, mais que le taux absolu d'Apo B reste toujours constant.

La structure des VLDL répond parfaitement au modèle général des LP dans lequel un noyau central renferme les constituants apolaires (triglycérides et esters de cholestérol), et une coquille externe d'épaisseur environ 20 Å contient les composés polaires et amphipathiques (apoprotéines, phospholipides et cholestérol libre) (307). D'après certains auteurs, quelques molécules de cholestérol libre peuvent également être dissoutes au coeur de la particule (195).

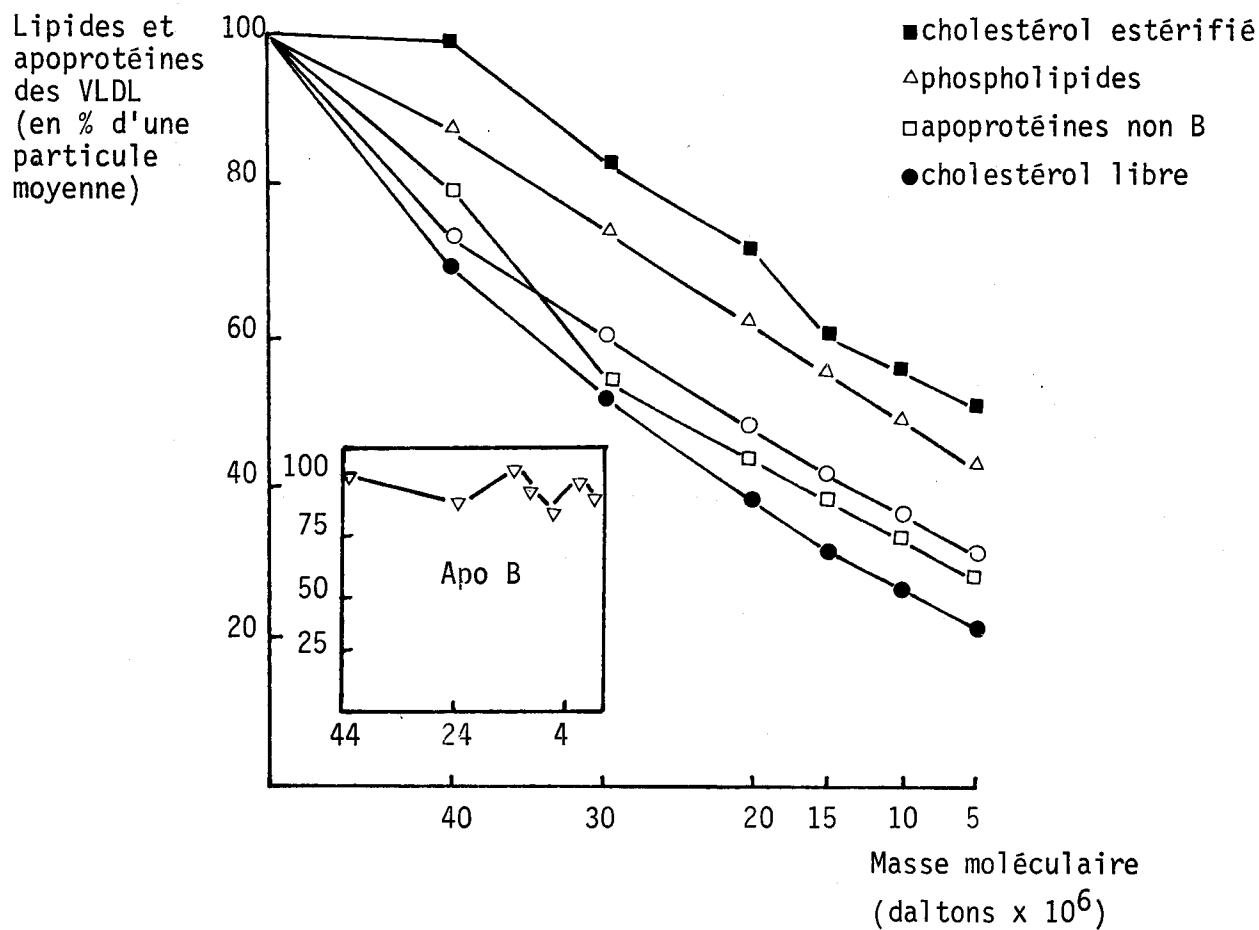


Figure 10

LIPIDES ET APOPROTEINES DES VLDL DE MASSES MOLECULAIRES VARIABLES

c) Dégradation des VLDL -

Les VLDL représentent la forme de transport majeure des triglycérides plasmatiques. Elles sont rapidement et entièrement métabolisées, et leur demi-vie est de l'ordre de 2 à 4 heures. Ce catabolisme fait intervenir les mêmes enzymes que celles qui sont nécessaires à la dégradation des chylomicrons : LPL et LCAT.

La LPL hydrolyse les triglycérides des VLDL, mais en fait, l'interaction d'une molécule de VLDL d'une part et d'une molécule d'enzyme d'autre part, ne résulte qu'en une hydrolyse partielle des triglycérides, et ce n'est qu'après une série d'interactions en des sites multiples que des particules de Sf inférieur à 20 et de densité supérieure à 1,006 sont formées.

Parallèlement à la perte de triglycérides, d'autres composants des VLDL sont échangés, transformés ou hydrolysés. Ceci aboutit à des molécules encore relativement riches en triglycérides, pouvant encore être dégradées et correspondant aux IDL. Celles-ci seront transformées en LDL par un second processus.

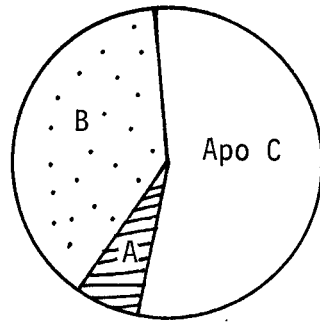
Les IDL sont mal caractérisées chez l'homme.

"In vivo", les LP "post-lypolyse" accumulées ont un Sf compris entre 12 et 60, et seulement environ un tiers d'entre-elles sont les IDL. Elles contiennent deux fois plus d'Apo B que d'Apo C, et la répartition pondérale de leurs composants est la suivante : 15 % de protéines, 7 % de cholestérol, 22 à 26 % d'esters de cholestérol, 17 % de phospholipides et 35 à 39 % de triglycérides (111). En outre, FELLIN et coll. (125) mettent en évidence l'hétérogénéité des IDL humaines qui se subdivisent en deux populations différentes quant à leur contenu d'Apo B.

Ainsi le catabolisme des VLDL est un processus de délipidation en chaîne dont l'étape finale résulte en la formation de LDL, et à tout moment dans le plasma on trouve des VLDL nouvellement synthétisées et des particules partiellement hydrolysées parmi lesquelles des IDL (figure 11, page 56).

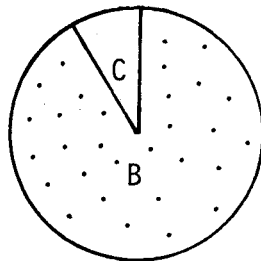
De très nombreuses études mettent en évidence des relations précurseur-produit entre les triglycérides ou le cholestérol des VLDL et des LDL (112), et entre l'Apo B des VLDL, IDL et LDL (336). La perte progressive des triglycérides s'accompagne d'un enrichissement relatif en esters de cholestérol, et de remaniements structuraux importants.

En fait, les mécanismes impliqués dans la dégradation des VLDL ont été beaucoup mieux compris après avoir étudié le métabolisme de leurs apoprotéines.



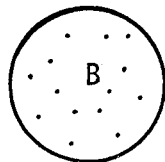
VLDL  
 $d < 1,006$

TG<sup>++++</sup>  
CE<sup>+</sup>



Lipoprotéine  
intermédiaire  
 $1,006 < d < 1,019$

TG<sup>++</sup>  
CE<sup>++</sup>



LDL  
 $1,019 < d < 1,063$

TG<sup>±</sup>  
CE<sup>+++</sup>

TG : Triglycérides

CE : Cholestérol estérifié



Figure 11

METABOLISME INTRAVASCULAIRE DES VLDL

Lors de travaux menés "in vivo" chez l'homme, divers auteurs (110) utilisent des VLDL marquées à l'iode 125 et repèrent ainsi les apoprotéines (à l'exception de l'Apo C-II qui ne contient pas de tyrosine). Ils observent qu'après l'injection de telles VLDL, au bout de 6 heures, la totalité de l'Apo B se retrouve dans une fraction de densité comprise entre 1,006 et 1,019 g/ml, correspondant à celle des IDL. Après 24 heures, ces mêmes Apo B sont transférées en totalité sur les LDL de densité comprise entre 1,019 et 1,063 g/ml. Quant à la radioactivité liée aux Apo C, elle se répartit entre les VLDL et les HDL.

La conversion métabolique des VLDL en LDL s'effectue donc en deux étapes:

- \* une première étape rapide, sensible à l'injection d'héparine et donc dépendante de la LPL, aboutit aux IDL riches en Apo B et pauvres en Apo C ;
- \* une seconde étape, plus lente, non affectée par l'héparine, aboutit aux LDL dépourvues d'Apo C et très riches en Apo B (111).

L'importance de la TGLH dans ce processus est encore inconnue mais il semble cependant que l'enzyme intervienne.

Les grosses particules de VLDL riches en Apo C sont métabolisées préférentiellement par les lipases des tissus extra-hépatiques activées par l'Apo C-II, et au fur et à mesure qu'elles deviennent plus petites, la contribution de l'enzyme hépatique augmente. Selon cette hypothèse, la TGLH serait l'enzyme prépondérante de l'hydrolyse des triglycérides des LP au stade d'IDL.

Si l'on se réfère à la figure 10, page 54, on observe que les VLDL, IDL, LDL possèdent toutes le même nombre de molécules d'Apo B. Ainsi, une seule particule est formée à partir de son précurseur sans qu'il y ait scission ou fusion lors du processus de délipidation.

Lors de l'hydrolyse des triglycérides, les molécules d'Apo C quittent progressivement les VLDL (116). On les retrouve dans le plasma associées aux HDL (171) qui les cèdent à nouveau aux VLDL nouvellement synthétisées entrant dans la circulation (114). La distribution des Apo C entre les VLDL et les HDL s'effectue selon deux mécanismes : un échange et un transfert.

L'étude "in vitro" du premier mécanisme montre qu'à l'équilibre la répartition des Apo C est proportionnelle à la concentration des deux LP dans le milieu d'incubation et que toutes les molécules sont échangeables (113). Les Apo C s'échangent entre les LP sous une forme délipidée, ou associées seulement à quelques phospholipides.



Le second mécanisme mis en jeu est un transfert des Apo C des VLDL sur les HDL. Celui-ci n'a lieu qu'après l'hydrolyse des triglycérides, et il est proportionnel au degré de la lipolyse (116).

On a ainsi pu suggérer que les HDL participaient indirectement au transport des triglycérides, puisqu'elles servent de réservoirs de ces importantes molécules physiologiques que sont les Apo C. Il faut cependant remarquer que la lipolyse des VLDL intervient quand même "in vitro" dans des systèmes dépourvus de plasma et que le taux de disparition des Apo C est proportionnel à celui de l'hydrolyse des triglycérides, la présence dans le milieu réactionnel d'albumine véhiculant les AG étant alors indispensable (169).

Le mécanisme de cette dissociation des molécules d'Apo C n'est pas encore bien connu ; de même, on ignore encore le type de liaison qui pourrait exister entre les Apo C et les triglycérides du noyau des VLDL.

Quoiqu'il en soit, les phospholipides étant probablement les premières molécules de lipides à se lier aux apoprotéines lors de la synthèse des LP (figure 9, page 52), et la LPL possédant une activité phospholipasique A (373), il se pourrait que l'hydrolyse et l'élimination des phospholipides des VLDL provoquent la libération des Apo C.

En fait, ce problème est beaucoup plus complexe, et des auteurs montrent que l'hydrolyse des triglycérides par une autre lipase dépourvue d'activité phospholipasique (lipase salivaire) ne s'accompagne pas du départ des Apo C des VLDL (115).

Le métabolisme de l'Apo E est moins bien connu, cependant des VLDL ayant perdu 80 % de leurs triglycérides contiennent encore 70 % des molécules d'Apo E de départ (116), et si l'on admet que les Apo B, C et E sont également réparties parmi toutes les particules de VLDL, il semble alors que l'Apo E, comme l'Apo B, reste associée au noyau résiduel des LP. Mais comme il n'y a que très peu d'Apo E dans les LDL, cette apoprotéine pourrait se dissocier des VLDL, ou plus probablement des IDL, à un stade fort avancé de la délipidation.

Le devenir des autres constituants de surface des VLDL (cholestérol libre et phospholipides) reflète un phénomène intrinsèque de la lipolyse qui ne dépend pas d'accepteurs lipoprotéiques, et qui fait intervenir la LCAT des HDL: \* le cholestérol libre est en majeure partie transféré sur les HDL, substrat préférentiel de la LCAT qui assure alors son estérification, et les esters de cholestérol formés se retrouvent dans les LP possédant de l'Apo B, établissant ainsi un échange entre les VLDL et les HDL (112). Des études "in vivo"

montrent en effet qu'une hydrolyse brutale des triglycérides provoquée par l'injection d'héparine résulte en une augmentation du taux de cholestérol des HDL dans le plasma, et plus particulièrement des HDL<sub>2</sub> (213). De plus, il semble que l'élimination du cholestérol libre lors du processus lipolytique soit fonction de la taille des VLDL (114).

\* Quant aux phospholipides, 90 % de la lécithine et 60 % de la sphingomyéline des VLDL sont éliminés lors de l'hydrolyse quasi-complète des triglycérides (114). Environ 30 à 50 % de cette lécithine se transforment en lysolécithine sous l'action de la LCAT et des HDL ; le reste est éliminé sous une forme non hydrolysée retrouvée au niveau des HDL. La lysolécithine se fixe à l'albumine (117).

Il y a donc au cours de la dégradation des VLDL un transfert continu d'Apo C, de phospholipides et de cholestérol vers les HDL.

On a montré d'autre part récemment que la source majeure des apoprotéines des HDL (Apo A-I et A-II) est en fait les LP riches en triglycérides d'origine intestinale (304).

De plus, "in vitro", dans des systèmes dépourvus de plasma, la majeure partie des constituants de surface des VLDL éliminés lors de la lipolyse, se retrouvent dans une zone de densités comprises entre 1,040 et 1,210 g/ml, et lorsqu'on étudie les particules de cette fraction en microscopie électronique, on observe des structures en disques très semblables à celles des HDL naissantes isolées de perfusats de foie de rat (167) ou de lymphé intestinale (160).

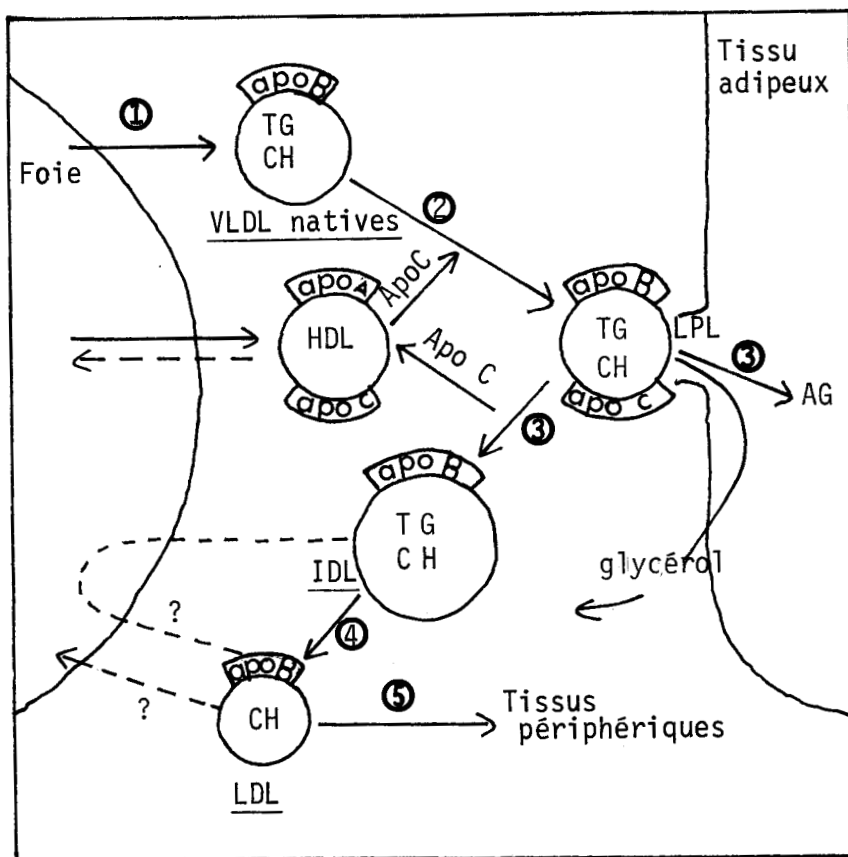
Le processus de dégradation des VLDL peut ainsi constituer une source de HDL circulantes qui seraient en fait des produits du métabolisme des constituants de surface des chylomicrons et des VLDL transformés ensuite en HDL sous l'action de la LCAT par l'Apo A-I des HDL circulantes (391).

Les HDL représenteraient en quelque sorte des "remnants de surface" tandis que les LDL correspondraient aux "remnants" du noyau des VLDL. Cette théorie serait par ailleurs en accord avec les relations inverses qui existent entre les taux de VLDL et de HDL (251), et entre l'épuration des triglycérides appréciée par l'activité LPL et les HDL (254).

La figure 12, page 60 résume le métabolisme intravasculaire des VLDL.

#### d) Rôle des VLDL chez l'homme -

La fonction principale des VLDL est d'assurer aux tissus utilisateurs riches en LPL l'apport d'acides gras d'origine dite "endogène" dans les périodes post-absorptives à distance des repas.



VLDL : very low density lipoproteins  
 IDL : intermediary density lipoproteins  
 LDL : low density lipoproteins  
 HDL : high density lipoproteins

LPL : lipoprotéine-lipase  
 AG : acides gras  
 TG : triglycérides  
 CH : cholestérol



Figure 12

METABOLISME INTRAVASCULAIRE DES VLDL

3- LES LDL -

a) Origine des LDL -

Jusqu'à maintenant, l'hypothèse selon laquelle toutes les molécules de LDL dérivent de la dégradation des VLDL par une série de délipidations est très largement admise, et beaucoup de résultats expérimentaux sont en faveur de cette origine (par exemple, le taux moyen d'Apo B d'une particule de VLDL est égal à celui d'une molécule de LDL (112)).

Alors que pour la plupart des auteurs, il n'y a aucune sécrétion directe hépatique ou intestinale de LDL, FELTS et ITAKURA (126) suggèrent une participation du foie dans la dernière étape de conversion des VLDL en LDL selon laquelle les "petites" VLDL, presque totalement hydrolysées, ou les IDL, seraient captées par les hépatocytes, transformées, et libérées enfin sous forme de LDL. Le rôle de la TGLH à ce niveau reste encore à préciser.

Il est par ailleurs tout à fait évident qu'une sécrétion très significative de LDL synthétisée "de novo" intervient chez des malades atteints d'hypercholestérolémie familiale (271) ou chez certaines espèces animales (singe, rat, porc) (185). Ainsi, la sécrétion directe de LDL serait un processus normal, d'importance variable selon les espèces et dans certains états pathologiques.

Mais ceci est encore très obscur et la majorité des travaux indique que la quasi totalité de l'Apo B des LDL dérive d'une biosynthèse hépatique par le biais des VLDL. Une petite quantité provient en outre chaque jour des chylomicrons et des VLDL d'origine intestinale.

b) Composition et structure des LDL -

Les LDL sont définies différemment par les auteurs (355) :

\* pour certains, elles représentent la fraction de LP de densités comprises entre 1,006 et 1,063 g/ml ;

\* pour d'autres, la fraction isolée entre 1,006 et 1,019 correspond aux IDL, ou encore à une sous-classe appelée LDL<sub>1</sub> possédant, outre de l'Apo B, des Apo C et E, et seules les LP de densité 1,019 à 1,063 représentent les LDL (ou LDL<sub>2</sub>) ne contenant que de l'Apo B et quelques traces d'Apo C.

Les LDL<sub>2</sub>, chez l'homme, sont des molécules sphériques de diamètre 170 - 250 Å et de masse moléculaire  $1,8 \cdot 10^6$  -  $4 \cdot 10^6$  daltons. Elles ont un Sf de 0 à 12 en ultracentrifugation analytique.

Environ 45 % de leur masse sont formés de cholestérol, 25 % de protéines, 20 à 30 % de phospholipides (lécithine essentiellement et sphingomyéline) et 5 à 10 % de triglycérides. Les rapports cholestérol estérifié/cholestérol libre et lécithine/sphingomyéline sont respectivement d'environ 4,0 et 2,0.

95 % des protéines sont des apoprotéines B, et comme pour les VLDL, le nombre de molécules d'Apo B est identique quelle que soit la taille des particules.

Deux sous-fractions de LDL de composition peptidique différente ont récemment été obtenues par chromatographie sur colonne de DEAE agarose (29), et les LDL éluées à faible concentration contiennent relativement moins d'Apo non-B (Apo C et A-I) que celles qui sont éluées à forte concentration.

Le modèle structural des LDL le plus souvent admis est le même que celui des autres LP : par un noyau central de lipides apolaires (cholestérol estérifié et triglycérides) entouré d'une coquille polaire formée de protéines et de phospholipides (355).

La configuration de l'Apo B des LDL natives n'est pas bien connue, et de très nombreuses structures en sous-unités sont proposées dans la littérature (355). En fait, ces LP sont très difficiles à étudier, compte tenu des propriétés d'insolubilité qui caractérisent leur apoprotéine majeure, l'Apo B.

#### c) Dégradation des LDL -

Les LDL du plasma humain renferment les 2/3 du cholestérol total, dont les 3/4 sont estérifiés par un acides gras à longue chaîne de préférence insaturé.

En période de croissance, l'organisme utilise du cholestérol, et la synthèse de nouvelles membranes par les cellules réclame du cholestérol libre. Cette synthèse de cholestérol intervient dans de très nombreux tissus, mais n'est quantitativement importante que dans la muqueuse intestinale et surtout dans le foie où elle est soumise à une régulation. L'importance de la synthèse extra-hépatique est mal connue, et nous verrons que très vraisemblablement, elle dépend de la suppression, par les LDL, de la synthèse endogène de cholestérol (154). Chez l'adulte, tout le cholestérol déposé dans les tissus périphériques, doit par ailleurs retourner au foie, seul organe capable de le métaboliser en acides biliaires et de l'excréter dans la bile (exception faite pour le cortex surrénalien et les gonades qui peuvent également en sécréter un peu).

Les travaux de SNIDERMAN et coll. (342) montrent que chez l'homme, certaines LP de densités comprises entre 1,019 et 1,053 g/cm<sup>3</sup> contribuent au retour du cholestérol au foie, cet organe étant alors capable de capter et cataboliser les LDL.

Cependant, d'autres auteurs (73, 342), pratiquant des hépatectomies chez l'animal afin d'étudier l'épuration plasmatique de LDL marquées à l'iode 125, n'obtiennent pas de diminution de la vitesse d'épuration des LP, et notent au contraire une accélération du processus. Le foie n'est donc pas indispensable à la dégradation des LDL qu'il semble même stabiliser.

Plusieurs travaux (355) mettent par ailleurs en évidence une dégradation très rapide de LDL marquées par des cultures tissulaires de cellules d'aorte de porc ou de fibroblastes humains.

Enfin, dans leurs nombreux travaux, GOLDSTEIN et BROWN (154) étudient la dégradation des LDL par les cellules des tissus périphériques, et montrent l'existence de sites membranaires récepteurs de ces LP. Ils suggèrent en outre que l'importance du catabolisme des LDL dans les cultures cellulaires varie selon la disponibilité de ces récepteurs spécifiques, et que, en fait, même lorsque ce nombre est minimum (en présence par exemple de LDL ou de cholestérol libre dans le milieu d'incubation), il est toujours plus important que "in vivo" (355).

De nombreuses cellules, chez l'homme, possèdent des sites récepteurs spécifiques des LDL : les fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des lymphocytes, des cellules endothéliales (59). Récemment certains de ces sites immunoréactifs ont été parfaitement caractérisés en microscopie électronique (157).

La figure 13, page 64 illustre les différentes étapes de la dégradation d'une particule LDL par un fibroblaste humain (156).

La voie catabolique intracellulaire des LDL nécessite leur fixation préalable sur des récepteurs membranaires spécifiques et de haute affinité. L'incorporation se fait ensuite par endocytose : il y a formation d'une vésicule endocytaire qui migre dans le cytoplasme jusqu'à un lysosome. Les LP sont alors exposées à l'action de plusieurs enzymes :

- \* des protéases qui hydrolysent l'Apo B en acides aminés,
- \* et la lipase lysosomale acide qui hydrolyse les esters de cholestérol en cholestérol libre capable de traverser la membrane du lysosome et de se retrouver ainsi dans le compartiment cellulaire, pouvant alors être utilisé pour des synthèses membranaires.

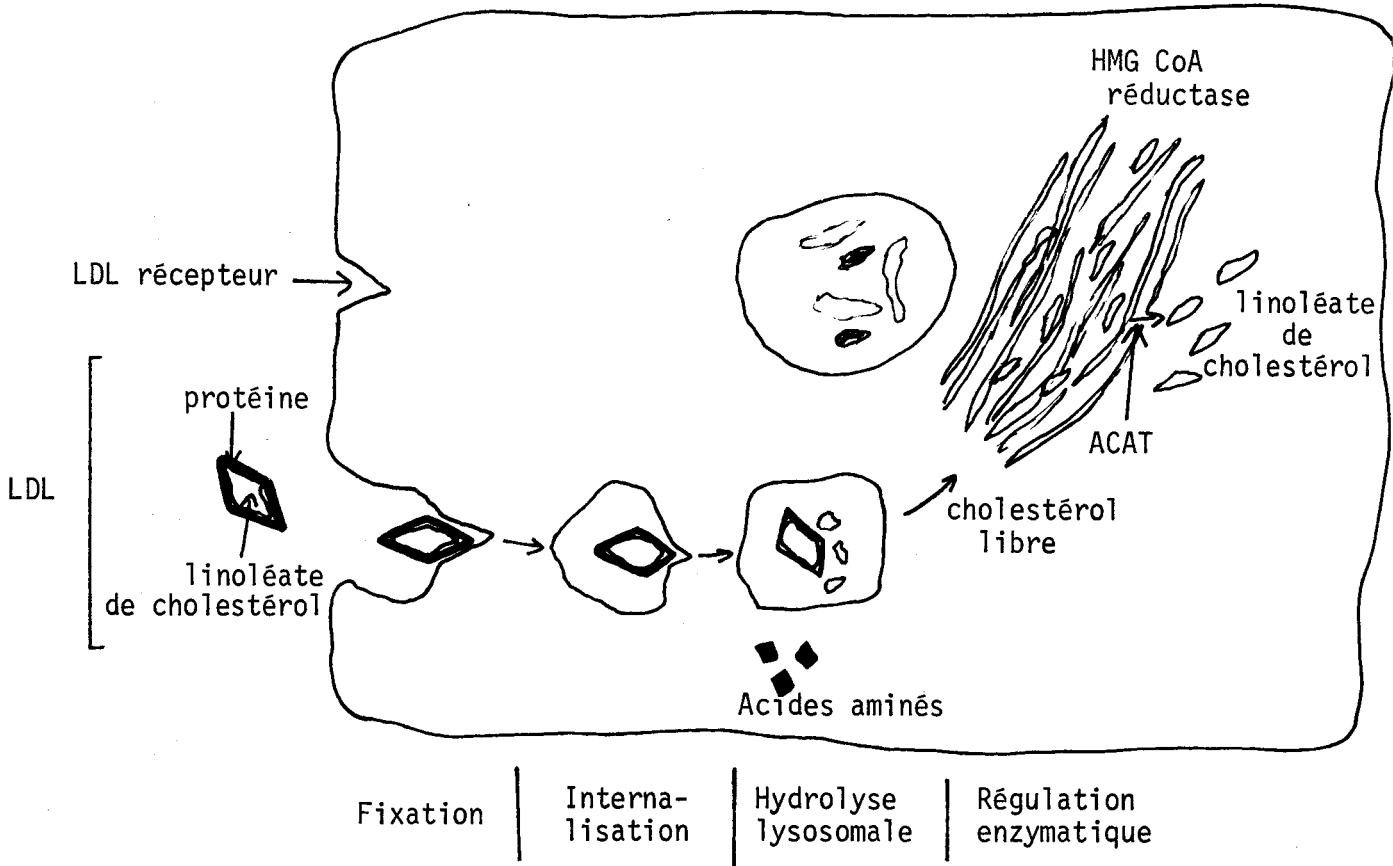


Figure 13

FIXATION CELLULAIRE ET DEGRADATION DES LDL

Un excès de concentration intracellulaire de cholestérol libre va déterminer trois processus métaboliques importants :

- \* le premier consiste en une inhibition de la synthèse des récepteurs de LDL limitant la fixation ultérieure de nouvelles particules de LDL ;
- \* par le second, il y a une inactivation de l'HMG CoA-réductase, et donc un blocage de la synthèse endocellulaire de cholestérol à partir de l'acétyl-CoA. Physiologiquement, cette synthèse périphérique est peu importante, les cellules périphériques utilisant préférentiellement du cholestérol importé des LDL circulantes.

Par ces deux mécanismes de rétro-contrôle, le fibroblaste contribue à la régulation de son "pool" de cholestérol et se protège d'une surcharge en stérides.

- \* Enfin, l'activation de l'acyl-cholestérol-acyl-transférase (ACAT), enzyme strictement cellulaire, permet la réestérification d'une partie du cholestérol, ce qui entraîne un enrichissement cellulaire en cholestérol estérifié, pouvant être hydrolysé en cholestérol libre sous l'influence d'une cholestérol-estérase.

On dispose de très peu d'informations quant à la régulation "in vivo" de la dégradation des LDL, et certains auteurs ont montré très récemment à ce sujet que l'insuline augmente de 25 % la dégradation de LDL par des fibroblastes humains en culture (83). Plusieurs explications sont possibles : soit qu'il existe une interaction entre deux sites récepteurs différents, l'un spécifique des LDL et l'autre de l'insuline, soit qu'il y ait une régulation par l'insuline au niveau du récepteur spécifique des LDL.

Le processus de dégradation des LDL ainsi proposé par GOLDSTEIN et coll. (156) (Figure 13, page 64) est très séduisant, mais il semble d'après certains faits qu'il soit beaucoup plus complexe :

- \* l'acétylation des LDL qui augmente leur charge nette négative supprime leur fixation sur les récepteurs spécifiques et leur incorporation ; par contre, des LDL chargées positivement se fixent plus vite et non spécifiquement (33).
- \* la dégradation tryptique partielle permet la dégradation des LDL par des cellules périphériques de certains malades atteints d'hypercholestérolémie familiale et dépourvues de récepteurs (73).

Toutes ces modifications pouvant intervenir "in vivo" on pourrait penser que le catabolisme des LDL ne dépend pas exclusivement des récepteurs spécifiques, et des auteurs expliquent ainsi l'apparition chez certains malades



d'importants dépôts d'esters de cholestérol provenant des LDL dans des macrophages ne possédant pas de sites récepteurs (157).

Récemment, GOLDSTEIN et BROWN (156) montrent qu'en fait, les 2/3 des LDL sont en effet normalement incorporées et dégradées par les cellules périphériques selon un processus d'endocytose spécifique, et que l'épuration du 1/3 restant, indépendant des récepteurs spécifiques, est assurée par pinocytose par les cellules macrophagiques ; dans certains cas pathologiques, ce dernier processus est primordial.

On commence actuellement à mieux caractériser les récepteurs spécifiques des cellules périphériques, et récemment BASU et coll. (34) montrent qu'ils possèdent une très grande affinité et spécificité, qu'ils dépendent de la présence de calcium et qu'ils sont sensibles à la pronase et à d'autres enzymes protéolytiques. On connaît aussi l'importance de la charge nette portée par la surface des LDL (134) et plusieurs travaux démontrent que les résidus d'acide sialique (135), lysine et arginine (382) des Apo B sont indispensables au maintien d'une certaine conformation du site de reconnaissance de la LP.

La partie phospholipidique des LDL apparaît de même essentielle au maintien de cet arrangement spatial (189), mais il semble bien cependant que la fixation spécifique des LP sur les récepteurs soit le fait des apoprotéines et donc de l'Apo B (232).

MAHLEY et coll. (235), nourrissant des chiens avec un régime très riche en cholestérol, mettent en évidence l'apparition d'une LP particulière HDL<sub>C</sub> de mobilité électrophorétique  $\alpha_2$ -globuline. Elle est très riche en cholestérol estérifié et sa taille moléculaire est intermédiaire entre celle des LDL et des HDL normales. Sa composition protéique révèle la présence d'un peu d'Apo A-I et C, mais surtout une très grande richesse en Apo E (16 moles/mole de LP) ; elle ne contient pas d'Apo B.

Son métabolisme est particulier et cette LP se fixe au niveau des récepteurs spécifiques des LDL (21). De très récents travaux appréciant l'intensité de cette liaison démontrent qu'elle est 23 fois plus forte que celle existant avec les LDL, et qu'il faut 4 fois plus de LDL pour saturer les sites, chaque molécule HDL<sub>C</sub> se fixant donc sur plusieurs récepteurs cellulaires dans un rapport de 4/1 (272).

L'Apo E - HDL<sub>C</sub> posséderait ainsi plusieurs sites de reconnaissance, et il s'agirait en outre dans les deux cas d'une même classe de sites, plus riches en résidus arginine en ce qui concerne l'Apo E.

Immunologiquement, l'Apo B est distincte de l'Apo E, et plusieurs possibilités peuvent expliquer cette compétition : soit que les deux apoprotéines possèdent en commun une séquence structurale non antigénique, soit que le récepteur cellulaire possède deux sites de reconnaissance.

Beaucoup de questions restent posées quant à ces sites spécifiques des LDL; et il semble que le même phénomène, mais à un degré moindre, fasse intervenir les HDL et les VLDL :.

- les effets des HDL sur la fixation périphérique ont été souvent étudiés, mais apparaissent généralement contradictoires dans la littérature.

BROWN et GOLSTEIN (58) observent "in vitro" une inhibition de la captation des LDL par les fibroblastes en présence de fortes concentrations de HDL ; MILLER et coll. (244) montrent par ailleurs une activation du phénomène lorsque les rapports molaires HDL/LDL sont bas et une diminution très significative de la dégradation des LDL lorsque ceux-ci sont élevés (25/1 ou plus), cette baisse étant proportionnelle à l'augmentation du rapport. Ces auteurs confirment de plus les travaux de BROWN et coll. (57), et l'incubation de fibroblastes avec des quantités importantes de HDL n'entraîne, si ce n'est aucune, qu'une très faible hausse du taux de cholestérol intracellulaire.

Plusieurs explications sont possibles :

\* d'une part, les HDL en réduisant la fixation et la dégradation des LDL plus riches en cholestérol, sont responsables d'une captation moins importante de cholestérol par les cellules ;

\* d'autre part, nous verrons que les HDL ont un rôle d'épuration du cholestérol tissulaire, et donc de celui des LDL, et que, lorsqu'elles sont présentes, elles tendent à faire baisser la concentration en cholestérol dans la cellule, cette chute induisant une nouvelle synthèse de récepteurs spécifiques de LDL.

Enfin, on peut rappeler qu'une sous-fraction de HDL chez l'homme, les HDL<sub>1</sub>, possède une très grande affinité vis à vis des récepteurs des LDL (244). La composition protéique de ces LP fait intervenir des Apo A (A-I et A-II), des Apo E et un complexe Apo (A-II - E), et récemment des auteurs montrent qu'après réduction et alkylation de ce complexe, et donc obtention des Apo E et A-II sous une forme isolée, ces LP ont une affinité encore plus grande (188). Ils posent alors la question de savoir si cette conversion d'une forme inactive de l'Apo E en forme active n'interviendrait pas "in vivo" jouant un rôle de régulation quant à la fixation des HDL sur les récepteurs spécifiques des LDL.

Ainsi les HDL<sub>1</sub> ont une grande affinité pour les sites récepteurs des LDL, plus importante que celle des HDL totales, elle-même bien plus forte que celle des HDL<sub>2</sub> ou HDL<sub>3</sub> seules qui ne possèdent pas d'Apo E (232). Peut-être pourrait-on expliquer ainsi les divergences des résultats obtenus selon les laboratoires quant à cette interaction HDL - LDL au niveau des cellules périphériques, et dépendant en fait des préparations de HDL.

-Le problème des VLDL a été moins bien étudié, et on sait simplement que les VLDL de sujets normaux sont environ 5 fois moins efficaces que les LDL pour la suppression de l'activité de l'HMG-CoA réductase, mais que des VLDL de malades atteints d'hyperlipidémie de type III sont également actives, de même les VLDL de patients hypertriglycéridémiques (type IV ou V) (142).

#### d) Rôle des LDL -

Les LDL ont pour rôle essentiel de fournir aux tissus périphériques le cholestérol nécessaire à la formation et au renouvellement de toutes les membranes plasmiques. Leur catabolisme est entièrement cellulaire, contrairement aux particules riches en triglycérides, chylomicrons et VLDL.

Nous proposerons ultérieurement, lors de l'étude du rôle des HDL (page 77), un schéma de transport du cholestérol dans les LP.

### 4- LES HDL (Figure 14, page 69).

#### a) Synthèse des HDL -

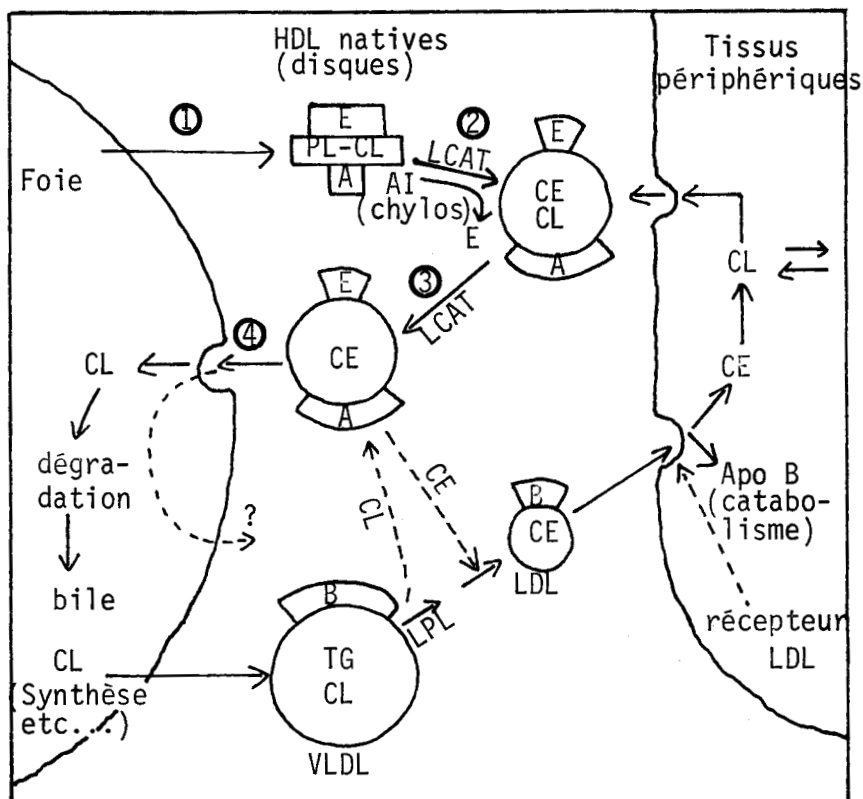
L'origine des HDL chez l'homme n'est pas bien connue.

Ces LP semblent d'une part être synthétisées par le foie et l'intestin, d'autre part provenir directement du catabolisme intravasculaire des chylomicrons et des VLDL.

Les HDL sont les LP majeures du rat, et la majeure partie des études concernant leur métabolisme a d'abord été menée chez cet animal.

#### - Biosynthèse des HDL -

Chez le rat : HAMILTON et coll. en 1972 (166) décrivent les HDL nouvellement synthétisées "in vitro" comme étant des particules de structure discoïdale,



- |                                               |                            |
|-----------------------------------------------|----------------------------|
| HDL : high density lipoproteins               | LPL : lipoprotéine-lipase  |
| LDL : low density lipoproteins                | PL : phospholipides        |
| VLDL : very low density lipoproteins          | CL : cholestérol libre     |
| LCAT : lécithine-cholestérol-acyl transférase | CE : cholestérol estérifié |
|                                               | A, B, E : apoprotéines     |

Figure 14

HDL ET RETOUR DU CHOLESTEROL DES TISSUS VERS LE FOIE



riches en phosphatidylcholine et cholestérol libre. Ces formes particulières disparaissent lorsque les LP sont incubées avec du plasma, et les auteurs suggèrent que la population HDL est constamment modifiée dans la circulation, ceci étant probablement dû à l'interaction des particules avec la LCAT et donc à la formation d'esters de cholestérol.

De nombreuses expériences de perfusion de foie montrent que cet organe sécrète des particules de densité identique à celles des HDL, mais contenant beaucoup plus d'Apo E et moins d'Apo A-I que les LP circulantes (167).

Plus récemment, divers auteurs (124) ont mis en évidence la production par le foie d'une molécule de HDL native discoïdale ayant un rapport ApoE/Apo A-I égal à 10/1, alors qu'il est de 1/7 dans les LP correspondantes sphériques du plasma.

Enfin, apparemment l'hépatocyte de l'animal peut également synthétiser une particule LP-B retrouvée dans la zone de densités des HDL<sub>2</sub> (119).

Chez l'homme, et plus particulièrement chez les malades souffrant d'une hépatite alcoolique et d'une déficience en LCAT, les taux de HDL dans le plasma sont diminués, et l'Apo E constitue environ 40 % de la masse protéique HDL totale (276) ; par ailleurs, les VLDL de ces patients sont dépourvues d'Apo E. Lorsque le plasma est mis en incubation avec de la LCAT, l'Apo E des HDL se retrouve au niveau des VLDL, et après guérison de l'hépatite tout redevient normal.

Tous ces faits, constatés chez le rat ou l'homme, sont parfaitement en accord avec l'hypothèse d'une synthèse hépatique d'une particule native discoïdale HDL possédant principalement de la LP-E et peu de LP-B, la LP-A ayant une autre source.

Il semble actuellement que la LP-A soit en fait synthétisée au niveau de l'intestin, et différents points expérimentaux peuvent être cités à ce propos :

- \* l'intestin de rat perfusé produit des particules contenant des Apo B et A-I et dépourvues d'Apo C (89) ;

- \* chez l'homme, des études d'immunofluorescence montrent une augmentation rapide et très nette de la synthèse intestinale d'Apo A intervenant lors de l'absorption de lipides (143), et au moyen de marquages radioactifs, des auteurs suggèrent que les Apo A (A-I et A-II) des chylomicrons lymphatiques servent de précurseurs pour les Apo A retrouvées dans les HDL (03) ;

- \* très récemment, RACHMILEWITZ et FAINARU (274) ont obtenu "in vitro" une synthèse d'Apo A-I par des cultures de cellules intestinales. Cette synthèse semble être régulée d'une part par l'accumulation d'apoprotéines, et d'autre part par

l'absorption de lipides ;

\* enfin, s'intéressant à la morphologie des sous-fractions HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> dans le sang hépatique, artériel et veineux des auteurs démontrent une sécrétion de HDL par l'intestin chez l'homme (364). En effet, des particules sphériques sont retrouvées au niveau des HDL<sub>3</sub> dans le sang artériel et veineux et au niveau des HDL<sub>2</sub> seulement dans le sang artériel. Par contre, les HDL<sub>2</sub> du sang veineux représentent un mélange de formes sphériques et discoïdales rappelant les structures en "rouleaux" fréquentes chez des malades déficients en LCAT. Une synthèse de HDL<sub>2</sub> intervient donc ailleurs que dans le foie, or on sait que l'intestin est le seul site extrahépatique de synthèse lipoprotéique.

En résumé, on peut penser que :

- \* les LP-C et -E proviennent du foie,
- \* la LP-B est synthétisée par le foie et l'intestin,
- \* la LP-A est fournie en majeure partie par l'intestin. La contribution relative de l'intestin et du foie pour la synthèse de la LP-A reste à étudier.

Quoiqu'il en soit des origines des apoprotéines des HDL, la biosynthèse de ces LP semble débiter comme celle des autres LP formées par le foie, au niveau du réticulum endoplasmique où les différents types de lipides s'associent aux protéines.

Les HDL natives sont libérées dans l'espace de Disse puis le sinusoiide hépatique sous la forme de disques bilamellaires comportant une juxtaposition de phospholipides, de cholestérol libre et d'Apo A et E.

Une fois parvenues dans le sang, elles subissent immédiatement l'action de la LCAT. Le cholestérol estérifié hydrophobe ainsi formé pénètre à l'intérieur des molécules qui prennent progressivement une configuration sphérique (146, 167). Dans le même temps, l'Apo E quitte les particules pour se fixer sur les VLDL. Ce processus aboutit à la formation de HDL<sub>3</sub> dont la composition protéique s'enrichit progressivement en Apo C à partir des VLDL circulantes et des chylomicrons, et enfin aux HDL<sub>2</sub>. Récemment, PATCH et coll. (268) démontrent "in vitro" ce phénomène, et SHEPHERD et coll. (239) quantifiant le transfert des Apo C, observent en fait qu'il dépend de la sous-fraction de HDL présente. Ils retrouvent 50 %, 69 % et 78 % des Apo C des VLDL respectivement au niveau des HDL<sub>3</sub>, des HDL totales et des HDL<sub>2</sub>. Ils rappellent en outre qu'il y a un transfert possible entre les HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>, mais que celui-ci est toujours préférentiel pour les HDL<sub>2</sub>. Cet échange dépend de la conformation des

molécules, il est inhibé par couplage des protéines à certains ligands et au contraire favorisé en présence de fortes concentrations d'ions chaotropiques tel l'ion bromure (162).

- Catabolisme intravasculaire des chylomicrons  
et des VLDL et formation de HDL -

Lors de la dégradation des LP riches en TG, nous avons déjà retenu l'hypothèse selon laquelle, actuellement, chez l'homme, la formation intravasculaire des HDL est en relation avec le processus lipolytique (391).

De nombreux travaux sont en faveur de ce concept :

- \* Lors de la transformation des chylomicrons en "remnants", non seulement les triglycérides mais aussi des apoprotéines solubles (A et C) et des phospholipides sont transférés rapidement dans la fraction HDL (84).
- \* Suite à la lipolyse induite "in vivo" par injection d'héparine, il y a une augmentation rapide de la concentration en HDL (219) et transfert du cholestérol des VLDL aux HDL (252).
- \* L'épuration physiologique des chylomicrons s'accompagne d'un enrichissement en protéines et en phospholipides des HDL<sub>2</sub> (171).
- \* Il existe une corrélation inverse très significative entre la triglycémie et la concentration en HDL dans le plasma (364).
- \* De même, des auteurs font apparaître une corrélation positive entre l'activité LPL du tissu adipeux et le taux de cholestérol lié aux HDL (255).
- \* La délipidation sélective du noyau des chylomicrons induit "in vitro" la formation d'agrégats lamellaires composés de phospholipides, de cholestérol et d'Apo A, apparaissant comme des vésicules à double couche constituées des composants libérés lors de la lipolyse (84). Selon TALL et coll. (359), du fait d'une interaction entre ces structures et les HDL circulantes, entraînant un transfert d'Apo A-I, la LCAT serait activée, et le cholestérol libre des vésicules serait estérifié. A la faveur de cette estérification ces différentes formations donneraient lieu à des sphères possédant des Apo A et ayant les caractères des HDL<sub>3</sub> circulantes. L'intervention des Apo A-I des HDL circulantes dans ce processus est suggérée "in vitro" par la libération d'une partie de ces apoprotéines lors d'incubation de HDL et de modèles membranaires phospholipidiques (358).

TABLEAU 8

COMPOSITION CHIMIQUE DES HDL, HDL<sub>2</sub> ET HDL<sub>3</sub>

|                  | PROTEINES** | CHOLESTEROL** | TRIGLYCERIDES** | PHOSPHOLIPIDES** | <u>CHOL. EST.</u><br>CHOL LIBRE | <u>PROTEINES</u><br>LIPIDES |
|------------------|-------------|---------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| HDL              | 53          | 18            | 5               | 24               | 4,46                            | $\frac{53}{47}$             |
| HDL <sub>2</sub> | 43          | 23            | 6               | 28               | 2,81                            | $\frac{43}{57}$             |
| HDL <sub>3</sub> | 58          | 14            | 5               | 22               | 4,38                            | $\frac{58}{41}$             |

\*\* Les chiffres sont indiqués en % du poids total





b) Composition et structure des HDL -

Les HDL représentent la fraction de LP isolées en ultracentrifugation préparative dans la zone de densité comprise entre 1.063 et 1.21g/ml. Elles se subdivisent en trois sous-classes :

- \* HDL<sub>3</sub> prépondérantes ( $1.125 < d < 1.210\text{g/ml}$ ) ;
- \* HDL<sub>2</sub> ( $1.063 < d < 1.125\text{g/ml}$ ) ;
- \* HDL<sub>1</sub> fraction mineure isolée avec les LDL en ultracentrifugation.

Récemment, par ultracentrifugation en gradient de densité, ANDERSON et coll. (16) définissent deux populations de HDL<sub>2</sub>, des HDL<sub>2b</sub> ( $1.063 < d < 1.100\text{g/ml}$ ) et des HDL<sub>2a</sub> ( $1.100 < d < 1.125\text{g/ml}$ ).

Le tableau 7, page indique la composition chimique de la fraction HDL globale. Les rapports cholestérol libre/cholestérol estérifié et lécithine/sphingomyéline sont respectivement environ 1/3 et 5/1. La composition protéique se caractérise essentiellement par la présence d'Apo A (A-I et A-II) qui représentent 90 % de l'ensemble des apoprotéines des HDL, le rapport A-I/A-II est d'environ 3/1. On trouve en outre d'autres protéines, en quantités moindres, tels que les Apo C, D, E, F et G.

Les compositions des HDL<sub>2</sub> et des HDL<sub>3</sub> sont différentes, et les HDL<sub>2</sub> sont plus riches en lipides que les HDL<sub>3</sub> (tableau 8 page 73). Ces deux sous-classes montrent de plus des variations respectives de la répartition des principales apoprotéines, et le rapport A-I/A-II est soit plus élevé dans les HDL<sub>2</sub> (92), soit égal (138), soit plus faible (7). D'autre part, les HDL<sub>2</sub> sont plus riches en Apo C que les HDL<sub>3</sub>, l'Apo E n'existe que dans les HDL<sub>2</sub> et l'Apo D ne se trouve que dans les HDL<sub>3</sub>. Les contradictions notées dans la littérature quant au rapport Apo A-I/Apo A-II dans les HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> semblent être dues à la technique d'ultracentrifugation mise en oeuvre pour isoler les LP (87). Ainsi, par ultracentrifugation zonale et de courte durée (24 heures), le rapport est plus élevé dans les HDL<sub>2</sub>, tandis que par ultracentrifugation préparative, méthode beaucoup plus longue, les rapports sont identiques. De plus, les fortes concentrations salines nécessaires pour ajuster les densités des LP peuvent être responsables en partie de la dissociation préférentielle de certains apoprotéines des HDL. En effet, les Apo A-II étant liées beaucoup plus fortement aux lipides dans les HDL que les Apo A-I, il est possible que certaines Apo A-I dissociées se lient à des particules ou en forment d'autres de densités hydratées inférieures à celles dont elles dérivent. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait qu'on retrouve 2% de l'Apo A-I totale plasmatique dans la fraction de densité inférieure à 1.063g/ml.

Ayant défini lors de la classification des LP l'existence de familles de LP de densités supérieures à 1.019 et 1.030g/ml distinctes et séparables, il serait dès lors souhaitable de s'exprimer non plus en termes de HDL, mais en ceux de familles LP-A, LP-B, LP-C, LP-D, LP-E, LP-F et LP-G les composant. La LP-A est majeure et deux types la définissent : les LP-A des HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>, contenant seulement des Apo A-I et A-II. Cependant, KOSTNER et coll. (211) rapportent la présence d'une sous-fraction ne contenant que de l'Apo A-I, et ASSMAN et coll. (18) isolent une particule dans le plasma de malades atteints de la maladie de TANGIER ne possédant que de l'Apo A-II.

Différents modèles structuraux sont proposés pour les HDL, basés sur des études chimiques ou enzymatiques ou utilisant la microscopie électronique et la spectroscopie RMN. Seule la structure des HDL<sub>3</sub> réalisant une sous-classe relativement homogène est établie de manière assez précise. Ces particules forment des micelles sphériques de diamètre 90 à 120 Å comportant des lipides dont les groupements polaires phospholipidiques se trouvent en surface et des apoprotéines globulaires en partie réparties dans les lipides (17). Les forces majeures de l'interaction protéines - lipides sont très importantes pour l'organisation des HDL natives.

### c) Dégradation des HDL -

La dégradation des HDL reste encore à l'heure actuelle assez mystérieuse. Leur demi-vie chez les sujets normaux est beaucoup plus longue que celles des autres LP. Cependant elle varie selon les auteurs de 3.3 à 5.8 jours, et on pense que cette divergence est due à l'hétérogénéité des marqueurs utilisés (HDL ou Apo-HDL), les vitesses de catabolisme étant différentes dans chaque cas (325). La cinétique du catabolisme des Apo A-I et A-II dans les HDL est également sujette à controverse : pour certains auteurs elle est semblable (47), pour d'autres l'Apo A-I est catabolisée plus vite que l'Apo A-II chez les sujets normaux (301). Là encore il faut considérer le matériel utilisé, et CASLAKE et coll. (79) montrent récemment que le métabolisme de l'Apo A-I injectée "in vivo" chez l'homme n'est pas comparable à celui de la même protéine intégrée dans la molécule de HDL.

La répartition quantitative différente des HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> liée au sexe (le rapport respectif de ces deux sous-fractions étant plus élevé chez la femme que chez l'homme), peut également laisser supposer deux métabolismes différents, de même pour les apoprotéines les composant (le rapport A-I/A-II

étant différent dans les deux sous-classes). En fait il n'en est rien (326), et compte tenu de l'échange dynamique des composés protéiques entre HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>, il semble plutôt que les fluctuations liées au sexe soient liées à une redistribution des protéines entre les sous-fractions.

Les concentrations plasmatiques des HDL sont très variables chez l'homme, étant soumises à de nombreuses variations physiologiques ou pathologiques et il est très probable que des modifications du catabolisme des HDL jouent un rôle majeur dans la régulation de leurs taux.

Le site même de dégradation des HDL chez l'homme n'est pas connu, et toutes les études à ce sujet ont été faites chez le rat. Après injection de HDL marquées à l'Iode 125, la radioactivité se retrouve dispersée dans deux compartiments : environ 10 % dans le foie et 50 % dans l'intestin grêle (289). De plus, cette distribution est régulière, ce qui prouve que les molécules sont éliminées en tant que particules entières et intactes (288). D'autres expériences localisent la radioactivité surtout dans les cellules hépatiques parenchymateuses, et un peu au niveau des cellules endothéliales et des cellules de KUPFER (275). Les HDL seraient en fait probablement captées par un phénomène de pinocytose, puis transportées vers leur site de catabolisme vraisemblablement les lysosomes secondaires (275). Une même localisation est observée dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle. En outre, l'intervention des enzymes hépatiques lysosomales dans la dégradation des apoprotéines des HDL est confirmée par des études "in vitro", et des HDL de rat ou d'homme délipidées ou non, sont hydrolysées très activement à pH acide (349).

On peut encore considérer la participation du système réticulo-endothélial dans le processus de dégradation des HDL. En effet, après perfusion de coeurs de rat avec des LP marquées, de la radioactivité est retrouvée dans les lysosomes secondaires de macrophages interstitiels (354).

Enfin il ne faut pas oublier une certaine dégradation possible des HDL par les cellules périphériques, et de très nombreuses études de culture tissulaire montrent que les LP peuvent être "incorporées" essentiellement par un processus d'endocytose fluide ne mettant pas en jeu de récepteurs spécifiques (245).

Mais si l'on essaie de relier le catabolisme des HDL à un paramètre fonctionnel, comme on le fait pour les LDL, à savoir la régulation de la synthèse du cholestérol, il est évident que dans la plupart des tissus les HDL ne jouent pas un rôle important, exception faite pour l'ovaire et les surrénales, seuls organes dans lesquels les HDL sont les principales LP qui régulent la synthèse des stérols (15).

c) Rôle des HDL -

- Les HDL jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des LP, intervenant:
- \* dans l'épuration des LP riches en triglycérides en leur cédant l'Apo C-II nécessaire à l'action de la LPL extrahépatique, et en acceptant les produits d'hydrolyse (Apo C, cholestérol, phospholipides),
  - \* dans l'estérification du cholestérol, puisqu'elles constituent le substrat préférentiel de la LCAT,
  - \* dans le métabolisme cellulaire du cholestérol.

Les deux derniers points sont très intéressants à considérer, et permettent d'expliquer le rôle anti-athérogène maintenant largement reconnu des HDL. A ce propos, on peut simplement rappeler que les plaques d'athérome très riches en cholestérol proviennent des LDL, LP de transport du cholestérol jusqu'aux organes, et que toute accumulation de cholestérol dans les cellules doit être évitée. Dans ce but, deux hypothèses peuvent expliquer le rôle protecteur des HDL :

- \* la première est celle d'une captation du cholestérol tissulaire par les HDL, ce cholestérol provenant de la dégradation périphérique des LDL ou d'une biosynthèse "de novo". C'est l'hypothèse de GLOMSET, les HDL travaillant de concert avec la LCAT (147),
- \* la seconde est celle d'une prévention par les HDL de l'accumulation de cholestérol dans les cellules, par interaction compétitive avec les LDL au niveau des récepteurs spécifiques.

- Première hypothèse-

De nombreuses expériences "in vitro" montrent en présence de HDL une épuration très significative du cholestérol d'un grand nombre de types de cellules (353), et d'autres auteurs mettent en évidence une captation de cholestérol présent dans le milieu d'incubation par des complexes Apo HDL- phospholipides (350). De même l'élimination du cholestérol de cellules préalablement chargées en ce lipide est accélérée (304, et le taux de cholestérol de cellules exposées à des LDL est diminué en présence de HDL (244). Enfin, GLOMSET montre que les HDL augmentent l'estérification enzymatique du cholestérol en facilitant l'action de la LCAT (145) et donc que les molécules de cholestérol estérifié traversent plus difficilement les membranes cellulaires. En restant à l'extérieur de la cellule, elles ont ainsi plus de chances d'être captées par les HDL.

SMALL et coll. (340) proposent un mécanisme un peu différent. Les HDL natives de structures discoïdales sont pauvres en cholestérol libre, composé dont elles vont précisément s'enrichir en le captant au niveau des sites membranaires. Ce cholestérol est secondairement estérifié par la LCAT, devenant ainsi hydrophobe. Il est alors incorporé à l'intérieur de la particule HDL qui prend de ce fait une configuration sphérique. Les sites de surface sont libérés, les HDL peuvent de nouveau capter du cholestérol et l'emmagasiner sous une forme estérifiée.

Quoiqu'il en soit, les molécules de HDL chargées en cholestérol estérifié sont captées par le foie pour y être métabolisées. Le cholestérol est à nouveau hydrolysé par la cholestérol-estérase hépatique en cholestérol libre disponible pour de nouvelles synthèses de VLDL, ou est éliminé par la voie biliaire sous forme de cholestérol biliaire ou d'acides biliaires.

Ce processus est très séduisant, mais il faut cependant remarquer qu'aucune preuve évidente de son déroulement effectif chez l'homme, donc "in vivo", n'est retrouvée dans la littérature. "In vitro", le rôle des HDL en tant qu'accepteur de cholestérol est très probablement surestimé, car on utilise non pas des molécules natives, mais des LP circulantes déjà riches en cholestérol estérifié. De plus, aucune expérience ne démontre vraiment que le cholestérol capté par les HDL retourne au foie, dont il est évident maintenant qu'une partie est transférée d'abord aux VLDL puis aux LDL.

#### - Seconde hypothèse -

Nous avons étudié précédemment (page 67) la compétition possible entre LDL et HDL vis-à-vis des récepteurs spécifiques des cellules périphériques et il est possible que les HDL régulent l'entrée du cholestérol dans les cellules en bloquant la fixation des LDL sur les sites récepteurs, et par conséquent leur pénétration et dégradation. On peut alors rappeler l'hétérogénéité des HDL et la présence d'une fraction mineure HDL<sub>1</sub> riche en Apo E (page 67). Connaissant la très grande affinité de cette apoprotéine pour les récepteurs spécifiques, l'importance physiologique de cette sous-classe n'est pas négligeable, mais il faut dans ce cas supposer que le contact accepteur-membrane cellulaire soit nécessaire pour le transfert du cholestérol hors de la cellule.

Pour conclure ce chapitre, il nous semble intéressant de rappeler quelques points concernant le métabolisme du cholestérol chez l'homme, et son transport dans les LP. Le cholestérol de l'organisme se répartit schématiquement en deux "pools" en interrelations dont la vitesse de "turn-over" est différente:

\* un "pool A" à échange rapide assimilable au cholestérol plasmatique, hépatique et intestinal ;

\* un "pool B" à échange lent représenté par les autres tissus.

L'entrée et la sortie du système se font presque exclusivement par le pool A.

Les entrées proviennent :

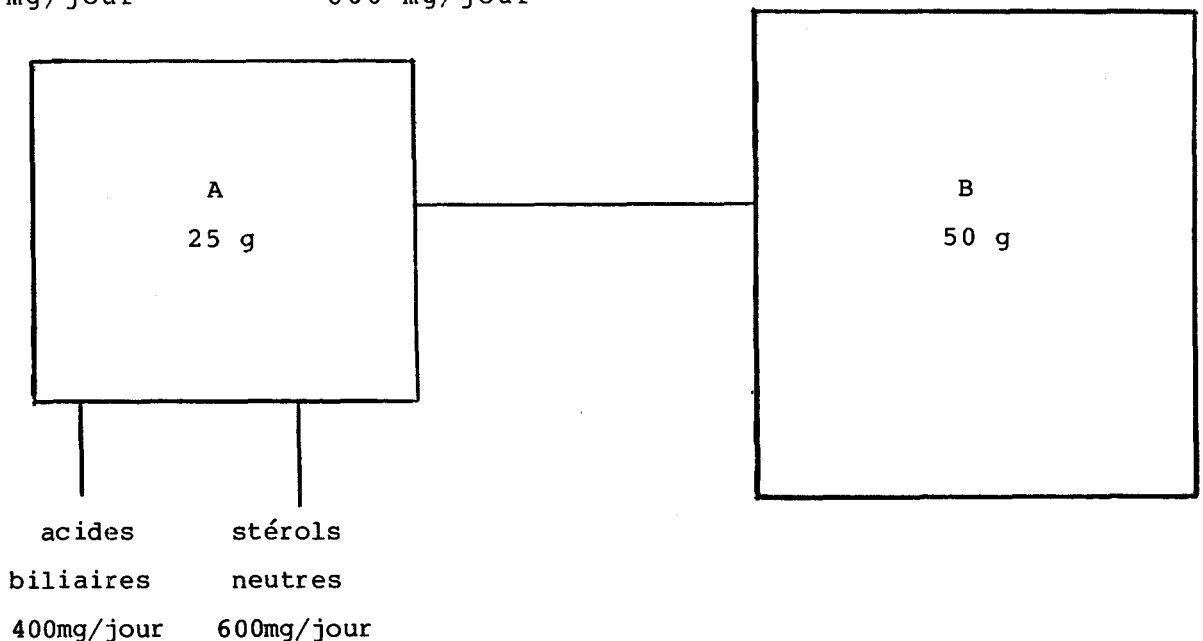
- du cholestérol exogène absorbé au niveau intestinal (environ 200mg par jour) ne dépassant pas 10 % de la quantité ingérée aux taux d'ingestion les plus élevés,

- du cholestérol endogène synthétisé essentiellement (environ 800mg/jour) par le foie et l'intestin. Toutes les cellules de l'organisme peuvent cependant effectuer cette synthèse.

Les sorties de cholestérol sont surtout dépendantes de l'excrétion biliaire sous les formes d'acides biliaires (400 mg par jour) et de stérols neutres (600 mg par jour), soit au total 1 g par jour. De ce fait, entrées et sorties du système sont en équilibre.

La figure ci-dessous résume ce bilan :

|             |             |
|-------------|-------------|
| Cholestérol | cholestérol |
| alimentaire | endogène    |
| 200 mg/jour | 800 mg/jour |



Pool corporel total de cholestérol : bilan des entrées et des sorties.

Enfin, la figure 15, page 80 rappelle le rôle joué par les différentes classes de LP dans le transport du cholestérol, amené jusqu'aux cellules essentiellement par les LDL, puis repris en charge par les HDL afin d'être excrété.

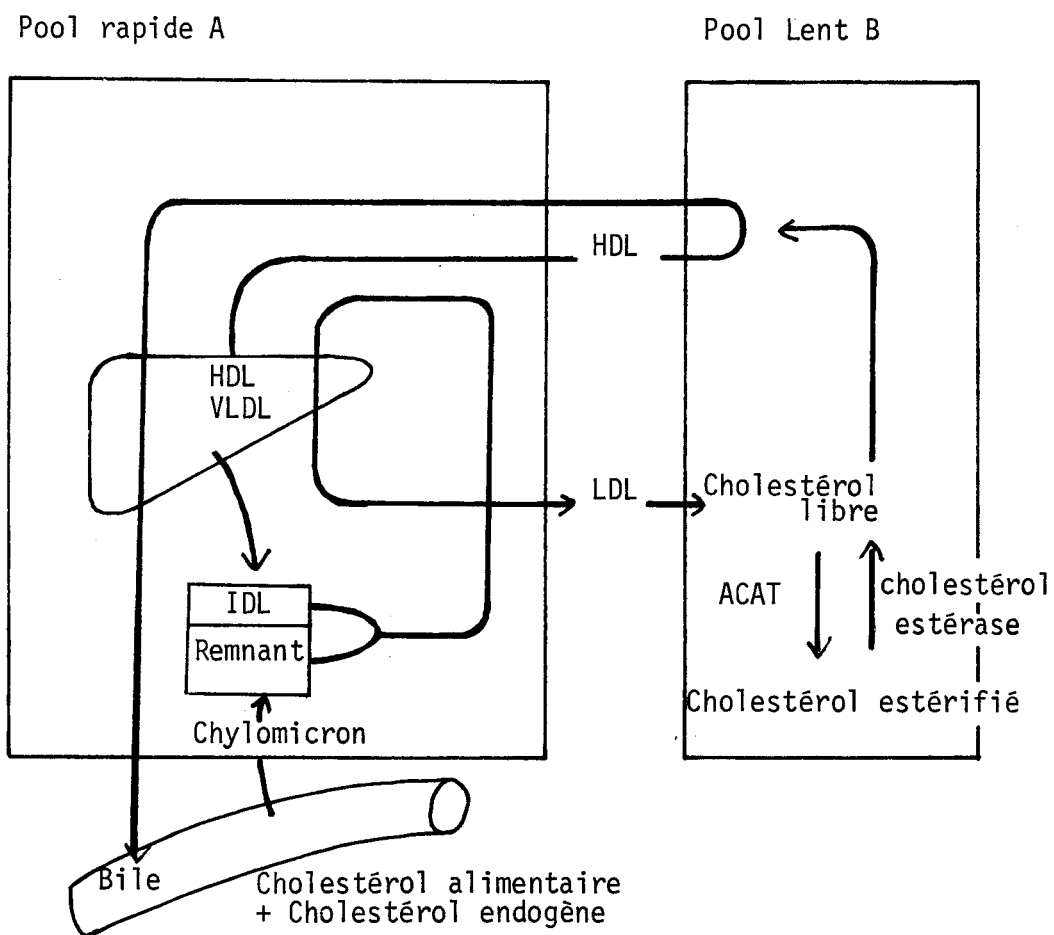


Figure 15

TRANSPORT DU CHOLESTEROL DANS LES LIPOPROTEINES

E - DESORDRES ASSOCIES AU METABOLISME DES LIPOPROTEINES

---



1- LES HYPERLIPOPROTEINEMIES -

a) Hyperlipidémies et hyperlipoprotéinémies -

Il y a hyperlipidémie lorsque le taux d'un ou des deux constituants lipidiques principaux du plasma, cholestérol et triglycérides, dépasse de plus de 20 % le taux normal le plus fréquent établi pour une ethnie donnée en fonction de l'âge et du sexe.

Les hyperlipidémies ne sont pas des affectations rares puisqu'elles touchent, en France, 4 à 5 % de l'ensemble de la population. En réalité, elles témoignent d'un désordre métabolique siégeant au niveau des LP, et c'est pour cette raison que depuis 1965, à la suite de FREDRICKSON, on préfère employer le terme d'hyperlipoprotéinémie au lieu d'hyperlipidémie.

Il n'existe pas de critères absolus de typage des hyperlipoprotéinémies, et parmi les nombreuses classifications proposées, nous citerons celle de FREDRICKSON actuellement la plus admise (137) et celle de DE GENNES (96). Les éléments du diagnostic biochimique comprennent essentiellement l'aspect du sérum à jeun, les taux de cholestérol et de triglycérides, et la répartition électrophorétique des LP.

Sur ces bases, on distingue six types principaux qui se répartissent en trois catégories correspondant aux hypercholestérolémies essentielles, hypertriglycéridémies majeures et hyperlipidémies mixtes.

b) Hypercholestérolémie essentielle -

Il s'agit du type IIa caractérisé par une augmentation élective des LDL (hyperLDLémie). La pathogénie de ce trouble semble s'expliquer par un défaut de catabolisme des LDL au niveau des cellules réceptrices périphériques, lié soit à une absence (type IIa homozygote) ou une insuffisance de récepteurs spécifiques (type IIa hétérozygote), soit à un défaut de pénétration des LDL. Il s'ensuit une diminution de l'incorporation cellulaire du cholestérol, avec levée de l'inhibition de la synthèse du cholestérol (figure 16 (3), page 84).

Cette affection se manifeste par des dépôts de cholestérol localisés surtout aux tendons, mais touchant également d'autres tissus. Les conséquences les plus graves en sont l'athérosclérose précoce et les atteintes coronariennes (infarctus).

c) Hypertriglycéridémies majeures -

- type I ou hyperchylomicronémie essentielle -

L'anomalie métabolique, responsable de l'accumulation des chylomicrons, est une déficience en lipoprotéine-lipase. La durée de vie des chylomicrons est donc considérablement accrue et leur épuración par la voie normale des "remnants" est fortement diminuée (figure 16 (2), page 84).

Les symptômes de cette affection peuvent être très bénins. Elle se révèle souvent par des douleurs abdominales, dont on attribue l'origine à une atteinte pancréatique, complication relativement fréquente de l'hypertriglycéridémie.

La taille des chylomicrons et leur faible teneur en Apo B rendent compte de leur absence de pénétration dans la paroi artérielle, et de leur non-fixation sur les récepteurs des cellules musculaires lisses artérielles, et l'on conçoit que l'hyperchylomicronémie ne comporte pas de risque athérogène.

- type IV ou hypertriglycéridémie familiale à VLDL -

Ce type d'hyperlipoprotéinémie (hyperVLDLémie) est très fréquemment rencontré. C'est vraisemblablement encore un cadre hétérogène où plusieurs étiologies sont possibles (figure 16 bis (5), page 85).

Dans certains cas, il semble que l'anomalie porte uniquement sur une synthèse accrue de VLDL favorisée par de nombreux facteurs (glucose, alcool, hormones lipolytiques). Dans d'autres cas, elle serait en rapport avec un catabolisme insuffisant des VLDL avant le stade des IDL, en rapport avec une diminution de l'activité de la lipoprotéine-lipase.

Le diabète est souvent associé à cette hypertriglycéridémie, de telle sorte que l'hyperlipidémie d'origine diabétique est difficile à dissocier de l'hypertriglycéridémie primitive. Elle s'accompagne souvent d'obésité, parfois d'hyperuricémie. Les complications cardiovasculaires de cette maladie sont fréquentes mais surviennent à un âge plus avancé que dans les types II et III. Le risque athérogène de l'hyperVLDLémie est cependant modéré compte tenu de la faible teneur en cholestérol des VLDL et du rapport Apo B/Apo C relativement faible de ces LP.

- Le type V ou hypertriglycéridémie mixte -

La présence simultanée de chylomicrons et d'un excès de VLDL peut se rencontrer dans des cas familiaux relativement rares. Hormis la sensibilité

à l'alcool qui donne ce type d'hypertriglycéridémie, on ne connaît pas l'étiologie dans la majorité des cas connus.

Le type V dépend à la fois des graisses (chylomicrons) et des glucides (VLDL). Il rassemble les caractéristiques des types I et IV, et l'hypertriglycéridémie semble en rapport avec un déficit de la lipoprotéine-lipase extrahépatique (figure 16 bis (6), page 85 ). Les symptômes de cette affection peuvent être très discrets. Les complications cardiovasculaires sont rares ou tardives. La pancréatite et les douleurs abdominales sont à redouter, et le diabète s'associe assez fréquemment.

#### d) Hyperlipidémies mixtes -

##### - Le type IIb -

L'hyperlipidémie mixte où l'on voit à la fois une augmentation des LDL et des VLDL est vraisemblablement la résultante :

- \* du degré de surproduction hépatique de VLDL,
- \* de l'efficacité du catabolisme intravasculaire des VLDL en LDL,
- \* de la vitesse d'épuration plasmatique des LDL.

Les symptômes de cette maladie sont assez voisins de ceux de l'hypercholestérolémie familiale. Ils dépendent essentiellement du taux de la cholestérolémie qui est souvent moins élevée que dans le type IIa.

Le type IIb est très athérogène, et sa fréquence est de l'ordre de 1 à 3%.

##### - Le type III -

Le lipidogramme d'un type III révèle la présence d'une  $\beta$ -LP anormalement étalée de mobilité intermédiaire entre les  $\beta$ - et pré- $\beta$ -LP. Il s'agit d'une famille de LP de type LDL légère, de densités comprises entre 1,010 et 1,060 g/ml et dont la composition correspond à des intermédiaires entre VLDL et LDL relativement proches des LDL mais contenant encore une certaine quantité de triglycérides et des protéines, notamment des Apo E.

L'hyperlipoprotéïnémie de type III serait la conséquence d'un blocage intervenant au niveau de la délipidation transformant les VLDL en LDL, et créant ainsi en amont des LDL une accumulation des particules intermédiaires précédemment définies (figure 16 bis (4), page 85).

Le mécanisme exact du blocage n'est pas connue et les sujets affectés par cette anomalie présenteraient éventuellement une insuffisance en Apo E-III,

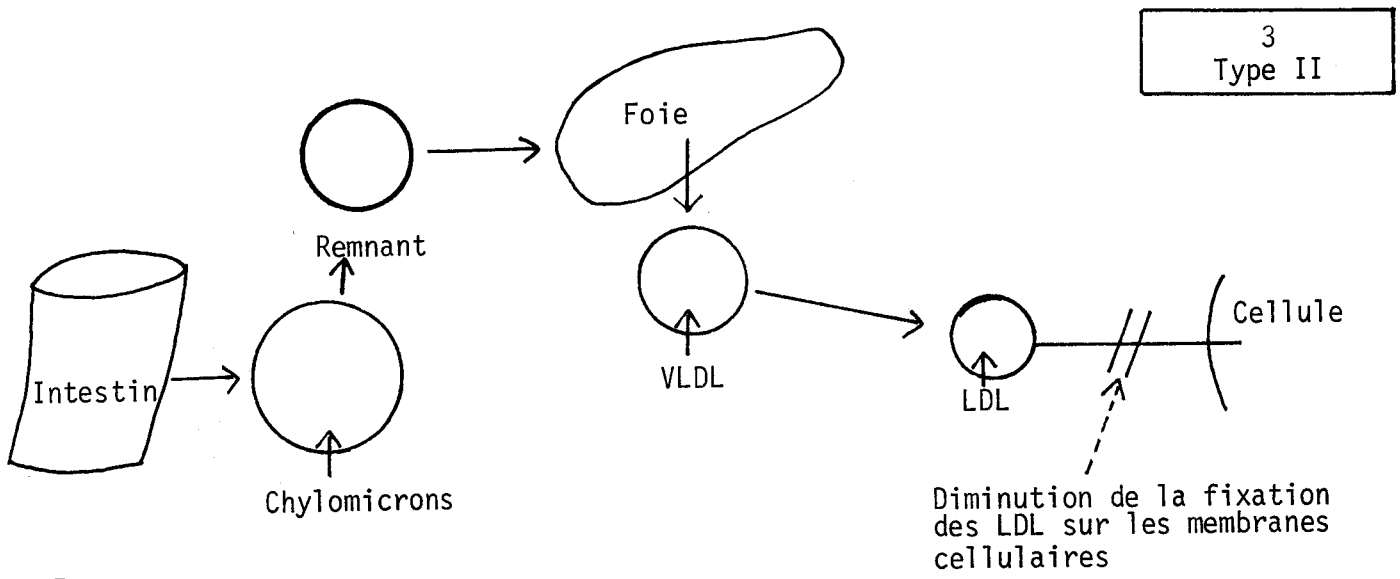
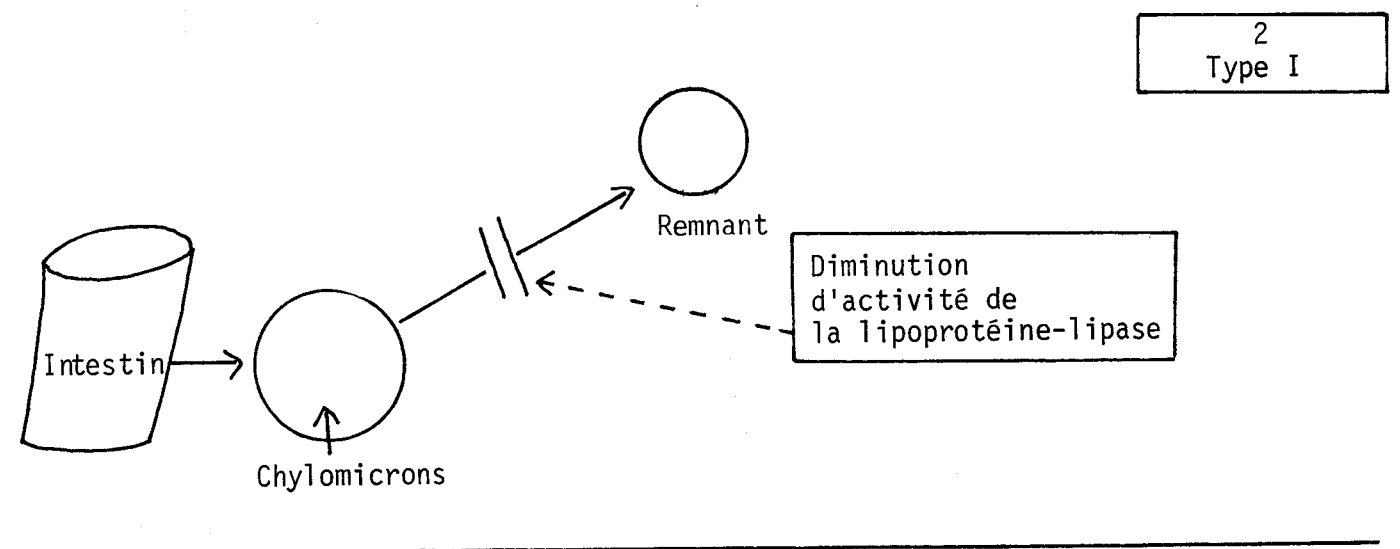
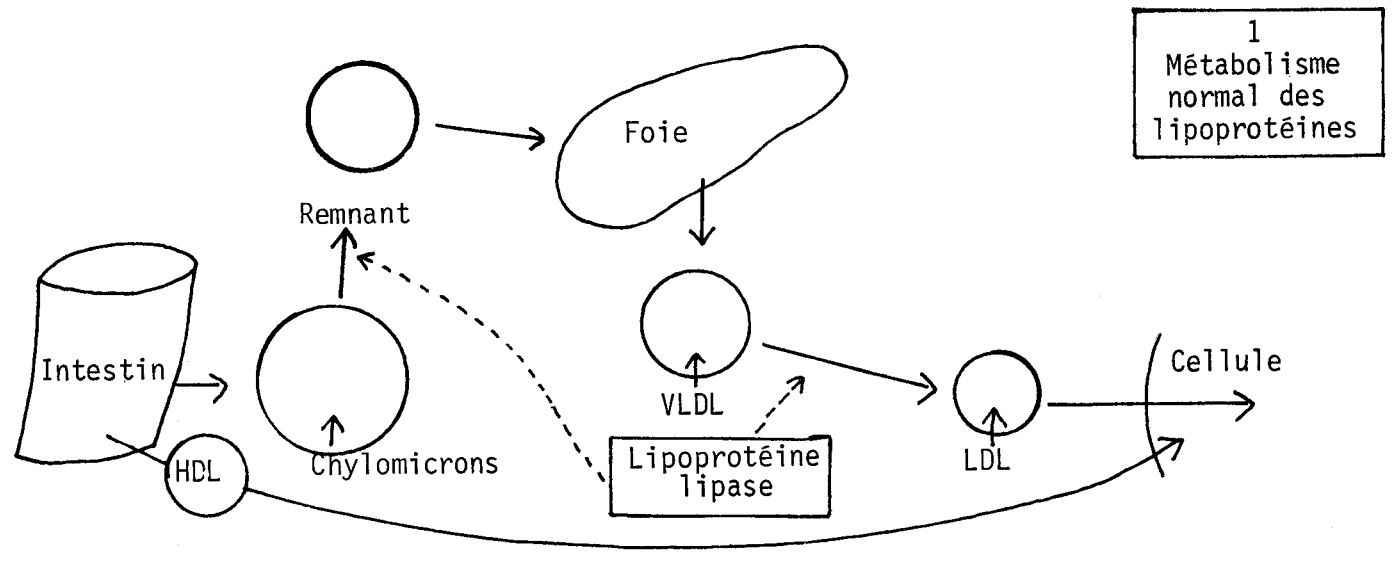


Figure 16

MECANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE DES HYPERLIPOPROTEINEMIES

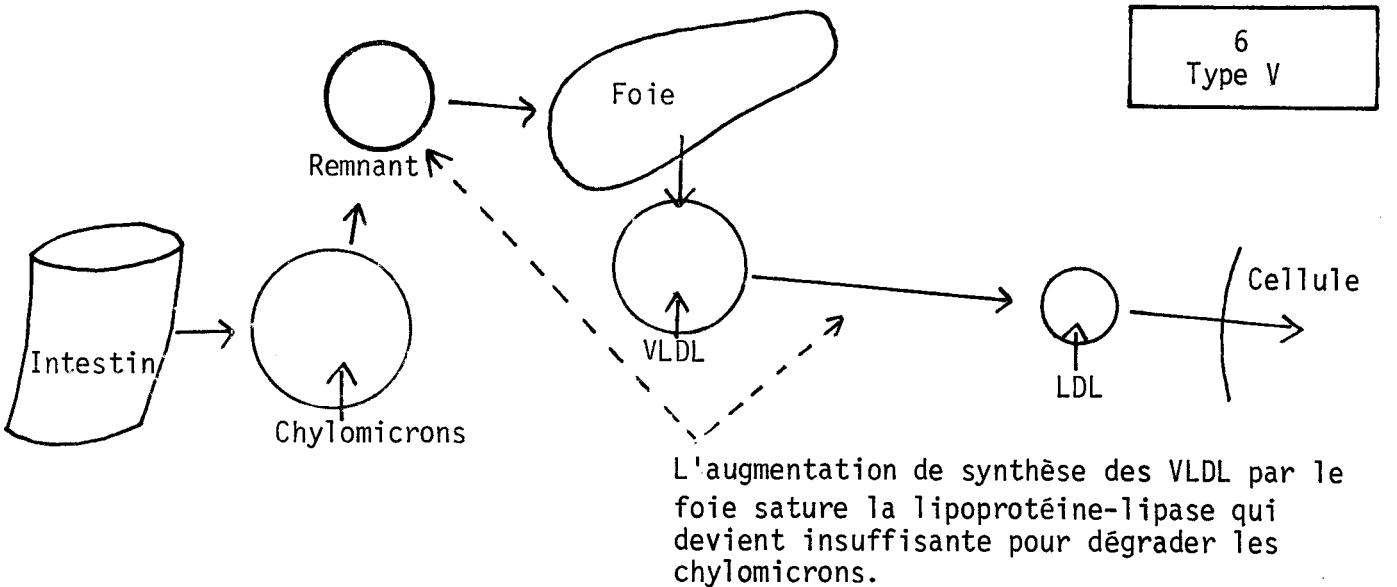
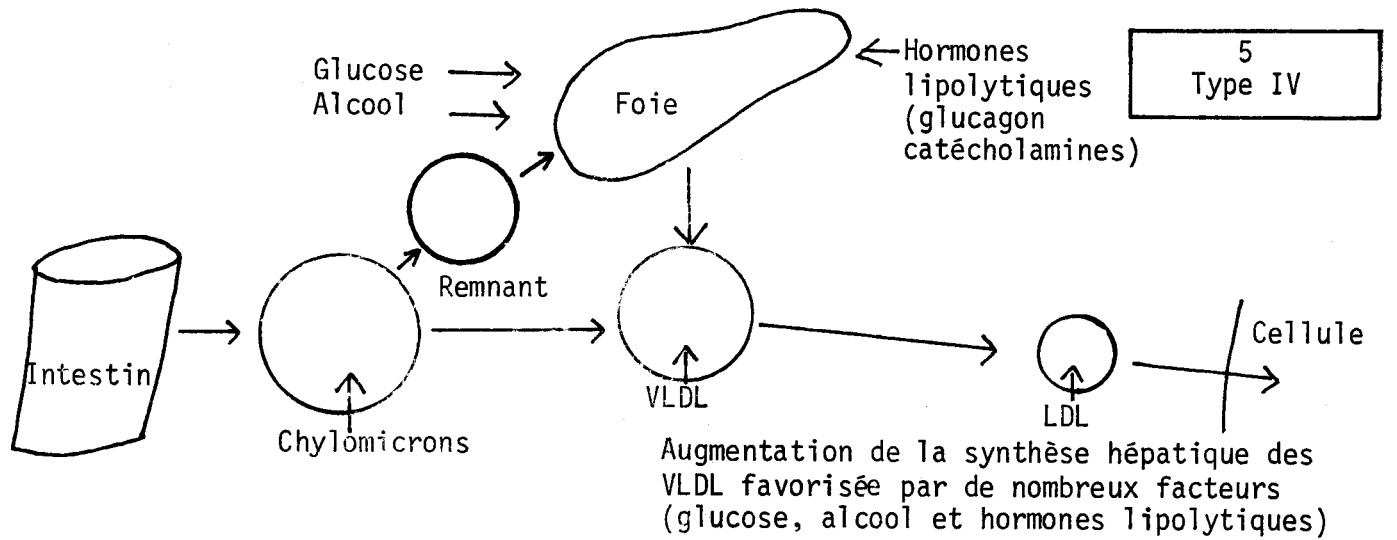
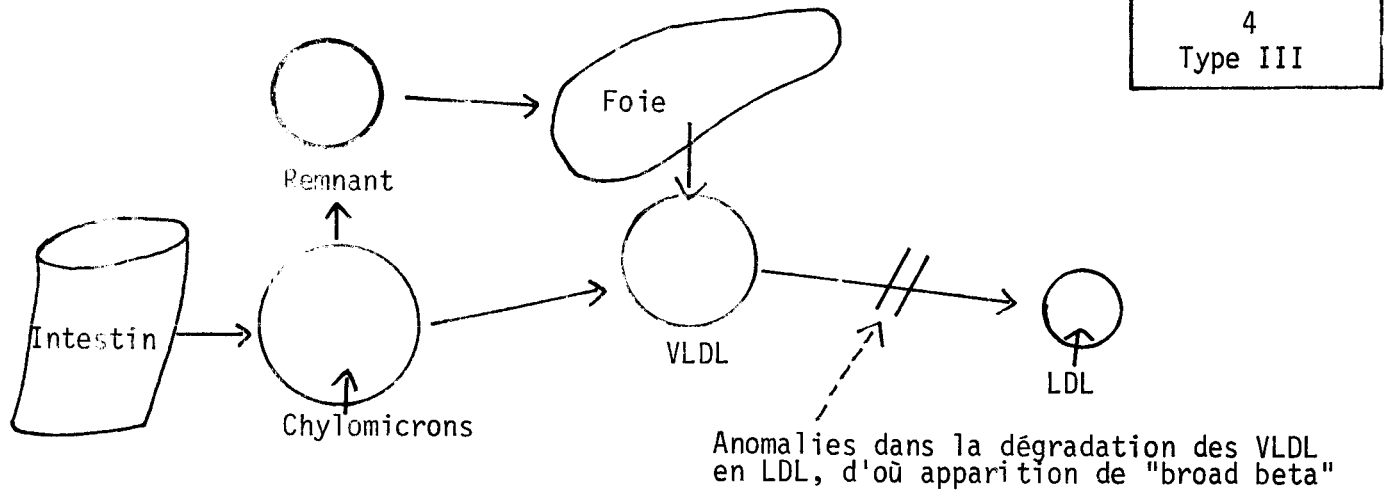


Figure 16 (bis)



alors que la concentration totale en Apo E dans les VLDL de ces sujets est nettement plus élevée que celle des sujets normaux.

Ce type relativement rare d'hyperlipoprotéïnémie a un haut potentiel athérogène en rapport avec le fait que les LP intermédiaires très riches en Apo E, mais également enrichies en Apo B et en esters de cholestérol, peuvent être fixées aux récepteurs cellulaires pour y être catabolisées.

L'ensemble des données concernant ces six types d'hyperlipoprotéïnémies est rassemblé dans les tableaux 9 et 9bis, pages 89 et 90).

## 2- ABSENCE CONGENITALE DE $\beta$ -LP OU $\alpha$ - $\beta$ -LIPOPROTEINEMIE -

Décrite pour la première fois en 1950, cette maladie peut entraîner des complications rapidement fatales par l'absence d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. Elle résulte d'une déficience en Apo B, nécessaire à la formation des VLDL et des chylomicrons.

Le diagnostic peut être fait par l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique du sérum, démontrant l'absence de  $\beta$ -LP. En fait, l' $\alpha$ - $\beta$ -lipoprotéïnémie est un désordre métabolique affectant toutes les LP plasmatiques et on retrouve, chez les patients atteints de cette maladie, deux classes de particules lipoprotéiques circulantes :

\* une première classe "LDL" dont la durée de vie est très brève, de l'ordre de quelques minutes, constituée de particules ayant les propriétés de flottation des LDL possédant le polypeptide constitutif de base de HDL, mais dont les propriétés physiques ne correspondent ni à celles des HDL, ni à celles des LDL,

\* et une seconde classe comprenant des particules type HDL<sub>2</sub> qui présentent un défaut d'estérification du cholestérol. Comparées aux LP normales, elles sont respectivement plus et moins riches en sphingomyéline et lécithine.

Enfin, lors de cette affection, les particules HDL possèdent quelques polypeptides habituellement absents de leur composition.

## 3- ABSENCE CONGENITALE D' $\alpha$ -LP OU MALADIE DE TANGIER -

Le premier cas d'absence d' $\alpha$ -LP plasmatiques a été étudié par FREDRICKSON en 1961, sur un malade de l'île de Tangier aux U.S.A. Les symptômes principaux de cette affection touchent le système réticulo-endothélial qui se charge en esters de cholestérol.

Les formes homozygotes de la maladie de Tangier se caractérisent par une hypocholestérolémie, une hypertriglycémie modérée, la présence de chylomicrons anormaux et de très faibles taux de HDL (0,5 à 4,5 % des valeurs normales, pouvant atteindre 50 % chez les hétérozygotes). Les taux d'Apo A-I et A-II, apoprotéines majeures des HDL, sont très modifiés chez ces malades, n'atteignant respectivement que 1 et 7 % des pourcentages normaux, leurs rapports molaires respectifs étant de 1/12 (alors qu'ils sont environ 3/1 chez les sujets normaux). Certains patients présentent même des particules HDL ne possédant que de l'Apo A-II. Ceci peut s'expliquer par une vitesse de catabolisme différente à la fois des HDL et des différentes apoprotéines selon qu'il s'agit de sujets normaux, ou de malades homozygotes ou hétérozygotes. En effet, la durée de vie dans le plasma des HDL des patients est très inférieure à celle des sujets normaux et de plus, chez les homozygotes, l'Apo A-I est catabolisée beaucoup plus vite que l'Apo A-II.

La distribution des Apo A est également différente : chez les sujets normaux et hétérozygotes, la plus grande partie se trouve dans la fraction HDL, tandis que chez les homozygotes l'Apo A-I se retrouve surtout dans les VLDL, les LDL et la fraction de densité supérieure à 1,21, et l'Apo A-II dans les VLDL et les LDL.

Bien que présente à un taux très faible dans cette affection, l'Apo A-I est tout à fait comparable quant à sa composition protéique et ses propriétés immunologiques à l'Apo A-I d'un plasma normal. Une hypothèse possible permettant d'expliquer cette déficience quantitative pourrait être celle d'un défaut de synthèse de l'apoprotéine par le malade, mais aucune preuve réelle n'est apportée dans ce sens. En fait, après administration d'un repas gras à un patient, on note une synthèse intestinale très nette d'Apo A-I et une élévation de son taux dans le plasma, et il semblerait plutôt qu'on soit en présence dans cette anomalie d'un métabolisme anormal des chylomicrons. On sait déjà que chez l'homme, les Apo A des chylomicrons servent de précurseurs pour les Apo A des HDL, et les malades atteints de la maladie de Tangier ayant probablement un défaut de ce processus possèderaient de l'Apo A-I à un taux anormalement élevé dans les VLDL et LDL.

#### 4- ABSENCE CONGENITALE DE LECTHINE-CHOLESTEROLACYL-TRANSFERASE (LCAT) -

Il s'agit d'une affection très rare dont la pathogénie biochimique est relativement bien élucidée. L'analyse des lipides plasmatiques permet le diagnostic par le taux très faible de cholestérol estérifié et par l'absence de

LCAT. Les conséquences de cette déficience portent sur la structure et le métabolisme des LP : les HDL et les LDL anormales se présentent au microscope électronique non comme des sphères, mais comme des disques empilés en rouleaux. Il suffit de les incuber avec un sérum normal contenant l'enzyme LCAT pour qu'elles deviennent sphériques sous l'effet de la transformation du cholestérol en esters de cholestérol plus hydrophobes.

L'absence d'estérification du cholestérol pourrait entraîner l'accumulation de produits intermédiaires de la dégradation des VLDL comme on en observe dans le plasma au cours de la cholestase (lipoprotéines X riches en lécithines, en cholestérol libre et contenant des Apo C et de la sérumalbumine).

La teneur du plasma en Apo A et B est notablement abaissée ; l'hyperlipidémie qui apparaît chez ces patients peut résulter, d'une part des altérations rénales, d'autre part de la diminution de captation des LP par le foie.

#### 5- LES HYPO- $\beta$ -LIPOPROTEINEMIES -

Le cadre de ces troubles métaboliques est encore mal connu. On décrit sous le nom de maladie d'ANDERSON un syndrome rappelant l'intolérance aux graisses de l' $\alpha$ - $\beta$ -lipoprotéinémie, mais où sont présentes des quantités plus ou moins importantes de  $\beta$ -LP. L'étiologie de cette affection n'est pas élucidée ; il est possible que l'anomalie porte aussi sur les Apo B.

#### 6- LES HYPER- $\alpha$ - LIPOPROTEINEMIES -

L'hyper- $\alpha$ -lipoprotéinémie familiale est un désordre héréditaire siégeant au niveau des  $\alpha$ -LP et décrit récemment par GLUECK (15). Il se caractérise par un taux élevé de cholestérol au niveau des HDL.

Cette anomalie peut également être secondaire à diverses atteintes hépatiques, à l'alcoolisme, à la prise d'oestrogènes, à certaines conditions de vie et à l'environnement (par exemple favorisée après exposition à des pesticides chlorés hydrocarbonés). Certains de ces facteurs sont connus comme agissant au niveau du réticulum endoplasmique du foie, et il semble qu'ils induisent une augmentation des HDL par le biais d'une stimulation de la synthèse protéique, en l'occurrence de l'Apo A-I, apoprotéine majeure de ces LP.



TABLEAU 9

CLASSIFICATION OMS DES HYPERLIPOPROTEINEMIES

| Type                                    | Aspect du plasma                          |                                                       | Cholestérol | Triglycérides | Ultra-centrifugation | Electrophorèse                      | Troubles initiaux            | Hyperlipidémie induite par         | Fréquence et mode de transmission                                            | Caractéristiques principales                                          |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|---------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                                         | Avant décantation                         | Après décantation 12h à +4°C                          |             |               |                      |                                     |                              |                                    |                                                                              |                                                                       |
| I<br>Hypertriglycéridémie exogène       | crèmeux (molécule volumineuse 100-1000nm) | décantation ++ surnageant crémeux très léger (d 0,94) |             | +++           | +++<br>chylomicrons  | +++<br>chylomicrons                 | lipoprotéine lipase (PHLA) ↓ | .lipides<br>.régime hypercalorique | .rare autosomique récessif<br>.découverte dans la petite enfance             | .pas d'obésité<br>.non athérogène<br>.douleurs abdominales (pancréas) |
| IIa<br>Hypercholestérolémie essentielle | clair                                     | clair                                                 | +++         | ↑<br>±        | ↑↑<br>LDL            | ↑↑<br>bêta-lipoprotéine             | mauvais catabolisme des LDL  | lipides ?                          | .fréquent<br>.autosomique dominant<br>.60-70% des hyperlipidémies infantiles | .plaque d'athérome                                                    |
| IIb<br>mixte (II + IV)                  | clair ou lactescent                       | clair ou lactescent                                   | +++         | ↑↑            | LDL<br>↑ et VLDL     | bêta et prébêta- ↑<br>lipoprotéines |                              | .glucides<br>.alcool               | .fréquent                                                                    | .athérome                                                             |



TABLEAU 9 bis

CLASSIFICATION OMS DES HYPERLIPOPROTEINEMIES

| Type                                     | Aspect du plasma      |                                                   | Cholestérol | Triglycérides | Ultra-centrifugation       | Electrophorèse                          | Troubles initiaux                             | Hyperlipidémie induite par | Fréquence et mode de transmission        | Caractéristiques principales                                 |
|------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|-------------|---------------|----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                          | Avant décantation     | Après décantation 12h à +4°C                      |             |               |                            |                                         |                                               |                            |                                          |                                                              |
| III                                      | clair ou lactescent   | clair ou lactescent                               | ↑           | ↑↑            | LDL anormales (flottantes) | bêta lipoprotéines "larges"             | bêta lipoprotéines enrichies en triglycérides |                            | rare                                     | .athérome<br>.diabète (1/3 des cas)                          |
| IV<br>Hypertriglycéridémie endogène      | lactescent            | lactescent                                        | ↑<br>±<br>- | ↑↑            | ↑ VLDL                     | prébêta-lipoprotéines (lipomicros) ↑    | augmentation de synthèse                      | .glucides<br>.alcool       | .assez fréquent<br>.autosomique dominant | .obésité<br>.diabète (50%)<br>.hyperuricémie<br>.athérome    |
| V<br>Hypertriglycéridémie mixte (I + IV) | crèmeux ou lactescent | décantation possible avec sous-nageant lactescent | ↑           | ↑↑↑           | ↑ chylo-micros<br>↑ VLDL   | ↑ prébêta-lipo-micros<br>↑ chylo-micros | lipoprotéine lipase saturée                   | .glucides<br>.lipides      | rare                                     | .obésité<br>.diabète<br>.troubles pancréatiques<br>.athérome |

F - LIPOPROTEINES ET ATHEROSCLEROSE

---

1- RÔLE DES LIPOPROTEINES DANS LA GENESE DE LA PLAQUE D'ATHEROME -

a) Athérosclérose et athéromatose -

La paroi artérielle comporte trois tuniques superposées : l'intima, la média et l'adventice externe. Athérome et athérosclérose caractérisent la pathogénie vasculaire :

- \* l'athéromatose correspond à la formation d'une plaque lipidique sous-intimale,
- \* l'athérosclérose est définie par l'ensemble d'un dépôt athéromateux, d'une calcification et d'une sclérose.

Les hyperlipoprotéïnémies figurent au tout premier rang des facteurs de risque athérogènes : ces facteurs sont de différents ordres (hypertension, obésité, "stress", hérédité, tabagisme) et présentent de nombreuses interactions.

b) Lipoprotéïnémies et athérogénèse -

Les lésions initiales du processus athéromateux siègent au niveau de la jonction intimo-médiale des artères et consistent en une accumulation locale initialement intra-cellulaire de graisses et particulièrement d'esters de cholestérol importés du plasma.

Les LP plasmatiques pénètrent la paroi artérielle par un mécanisme d'insudation dépendant de leur concentration et de la pression moyenne de filtration. Les VLDL et surtout les LDL riches en linoléate de cholestérol sont captées par les cellules musculaires lisses de la paroi et le cholestérol est hydrolysé.

Le cholestérol libre est soit incorporé dans la membrane plasmique, soit réestérifié et stocké dans la cellule essentiellement sous forme d'esters. Les HDL qui pénètrent également la paroi artérielle peuvent capter le cholestérol libre de la membrane, pratiquant ainsi son épuration.

Un excès de pénétration de LDL, conséquence d'une concentration plasmatique élevée, d'une augmentation de la pression de filtration, d'une hyperperméabilité locale, provoque une accumulation de cholestérol, la multiplication des cellules musculaires lisses et leur migration vers les lésions intimes. Théoriquement, une carence en HDL, engendrant une épuration insuffisante, pourrait également conduire à une accumulation intra-cellulaire de cholestérol estérifié y compris pour un niveau normal de cholestérol LDL.

Ultérieurement, les cellules musculaires lisses saturées de cholestérol ne captent plus les VLDL et les LDL qui s'accumulent dans la paroi vasculaire,

conduisant à des dépôts extra-cellulaires de linoléate de cholestérol non épurable par les HDL et inducteurs de fibrose.

Dans l'hyperlipoprotéinémie de type IIa, où l'hyperLDLcholestérolémie est génétiquement déterminée par l'insuffisance ou l'absence de récepteurs cellulaires de LDL, il est possible que les cellules musculaires lisses aortiques se comportent comme des cellules macrophagiques fixant et dégradant les LDL par un processus n'impliquant pas les récepteurs spécifiques. Dans cette hypothèse, du fait de taux élevés de LDL, la cellule musculaire lisse accumule des taux importants d'esters de cholestérol responsables d'une cytotoxicité, d'une multiplication cellulaire et de la formation de la plaque athéromateuse.

Une corrélation significative entre la présence d'une hyperlipoprotéinémie et le risque d'athérosclérose est mise en évidence lors de très nombreuses études épidémiologiques :

- \* The Honolulu Heart Study (28),
- \* The Tecumseh Study (338),
- \* The Framingham Study (203),
- \* The Stockholm-Edinburg Comparison Study (26),
- \* The Evans Country Cardiovascular Study (365),
- \* Données du Groupe français d'étude sur l'épidémiologie de l'athérosclérose (105).

Il ressort de ces enquêtes prospectives que l'athérosclérose est en relation étroite avec le niveau de la cholestérolémie et, à un degré moindre, avec celui de la triglycéridémie. La corrélation est particulièrement nette dans le cas de l'athérosclérose coronarienne ; elle l'est moins dans les localisations cervico-encéphaliques où l'hypertension artérielle joue le rôle principal ainsi que dans les artérites des membres inférieurs où l'intoxication tabagique se situe au premier rang des facteurs de risque.

## 2- LIPOPROTEINES ATHEROGENES ET LIPOPROTEINES ANTI-ATHEROGENES -

De nombreux travaux épidémiologiques confirment le rôle athérogène des LP de très basse et surtout de basse densités, ainsi que l'action anti-athérogène des LP de haute densité, montrant notamment une corrélation très significative entre la concentration plasmatique des HDL et l'incidence des cardiopathies ischémiques.

Par un dosage électroimmunologique de l'Apo B au niveau de plusieurs tissus (foie, poumon, rate, rein, myocarde et muscle squelettique), des auteurs montrent récemment (180) que l'intima artérielle est bien le site primaire d'athérogénèse. Il existe même au niveau de la lésion athéroscléreuse des régions différentes d'un point de vue morphologique présentant des affinités plus ou moins fortes pour l'Apo B; celle-ci étant beaucoup plus solidement liée aux régions nécrotiques qu'aux régions fibrotiques (181). Enfin, les particules isolées de plaques fibrotiques, comparées aux LP plasmatiques ou à celles de l'intima normale, sont moins riches en cholestérol estérifié et triglycérides, et ont un rapport linoléate/oléate plus faible (179).

Par contre, de très nombreuses études récentes montrent que les HDL exercent un pouvoir protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose. Nous ferons à ce sujet quelques rappels épidémiologiques dans le paragraphe suivant.

Ainsi, d'après RHOADS et coll. (281), le risque athérogène est proportionnel au taux de cholestérol LDL et inversement proportionnel au taux de cholestérol-HDL (figure 17, page 94), et GLUECK et coll. (149) calculant le pourcentage de longévité chez huit familles atteintes d'une hypo- $\beta$ -lipoprotéïnémie et dix huit familles atteintes d'une hyper- $\alpha$ -lipoprotéïnémie, obtiennent un pourcentage très nettement accru par rapport à la "moyenne américaine", et montrent que les accidents artériopathiques sont pratiquement inexistantes dans ces familles. De même, l'hyperHDLémie et/ou l'hypoLDLémie sont rencontrées habituellement chez les octogénaires (150).

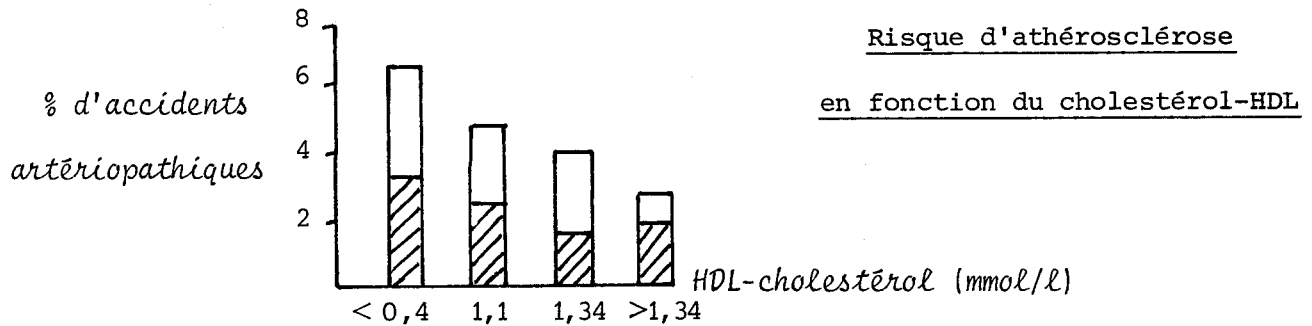
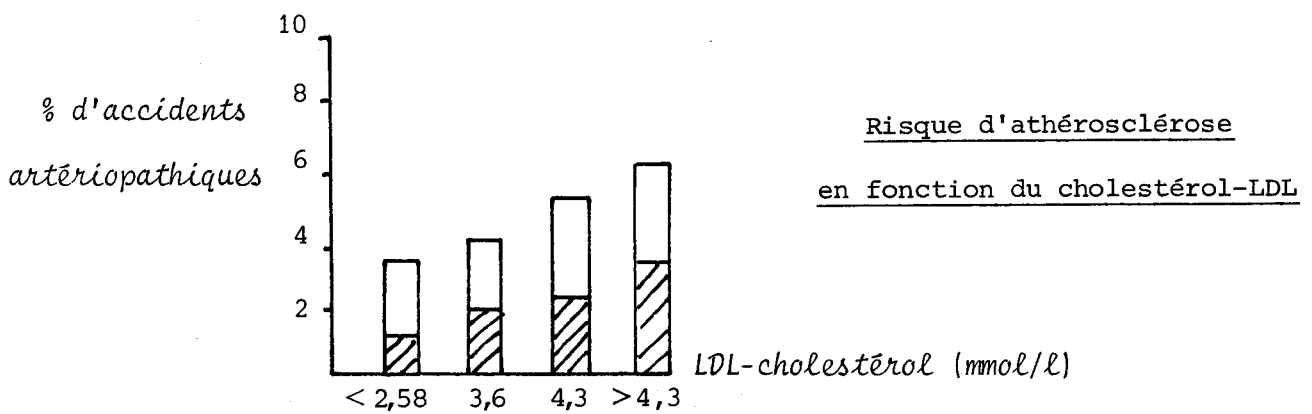
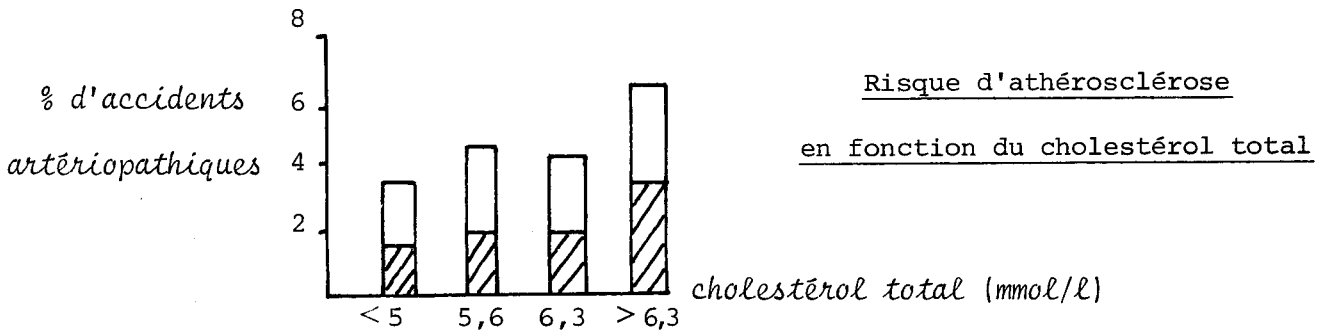
### 3- RAPPELS EPIDEMIOLOGIQUES ET PREVENTION DU RISQUE ATHEROMATEUX PAR LES HDL -

#### a) Variations des taux de HDL -

Les taux circulants de HDL sont soumis à de très nombreuses variations physiologiques et pathologiques. Ainsi, il faut être très prudent, et toute appréciation quantitative des HDL doit prendre en compte soigneusement le rôle éventuel de ces différents facteurs.

#### - Variations physiologiques -

Le cholestérol est en étroite corrélation avec le taux circulant d'Apo A-I et les variations de l'un et de l'autre en fonction de l'âge et du sexe sont parallèles. Ainsi, le cholestérol-HDL et l'Apo A-I sont plus élevés chez la femme que chez l'homme (12,305). De plus, en fonction de l'âge on observe une



□ autres affections liées à l'athérosclérose (artérite, atteinte vasculaire)  
▨ infarctus du myocarde



Figure 17

CORRELATION ENTRE LA TENEUR EN CHOLESTEROL  
DES DIFFERENTES LIPOPROTEINES ET LE RISQUE ATHEROGENE

augmentation parallèle de ces taux jusqu'à la ménopause, après laquelle les valeurs tendent à diminuer. Par contre, chez l'homme, les valeurs sont plus stables (tableau 10, page 96) (23).

D'autre part, les études épidémiologiques révèlent d'importantes différences du cholestérol-HDL en fonction des populations examinées. Ainsi, les taux sont généralement plus élevés chez les Esquimaux, les Indiens Tarahumara, les Noirs américains. En effet, parmi les facteurs pouvant influencer le taux circulant des HDL, le facteur génétique apparaît très important (365).

#### - Variations pathologiques -

Parmi les principaux facteurs influençant les taux plasmatiques des HDL circulantes, il convient de considérer :

\* les facteurs nutritionnels parmi lesquels la surcharge pondérale (24), un régime enrichi en hydrates de carbone (390) ou en graisses polyinsaturées (327), induisant une diminution des HDL, ou l'alcool qui par contre affecte les taux en déterminant une élévation (38). Les effets du cholestérol alimentaire sur le métabolisme des HDL ne sont pas bien connus.

\* L'activité physique, des études ayant montré que les coureurs, les skieurs, les bûcherons (392) présentent un taux plasmatique de cholestérol-HDL plus élevé que les sujets contrôles du même âge.

\* Les hormones, ayant fait l'objet de très nombreux travaux, compte tenu en particulier des différences observées en fonction du sexe (50). Chez l'homme, l'administration d'oestrogènes augmente le taux du cholestérol-HDL, à l'inverse celle de méthyl-testostérone le diminue. L'administration d'oestrogènes à des femmes ménopausées relève le taux de cholestérol-HDL. Les effets des contraceptifs oraux sont fonction de leur composition respective en oestrogènes et progestatifs, et les taux augmentent en fonction de la teneur en oestrogènes, et diminuent en fonction de la teneur en progestatifs.

\* Des médicaments parmi lesquels certains augmentent le taux des HDL (le clofibrate, l'acide nicotinique, la phénytoïne) (328), et d'autres le diminuent (le colestipol, l'hydro-chlorothiazide) (391).

\* Le tabac entraînant une baisse très significative de la teneur du sérum en HDL, le pourcentage de diminution étant même fonction du nombre de cigarettes (118).

\* Certaines affectations pathologiques parmi lesquelles le diabète (223) ou l'insuffisance rénale (278) responsables d'une diminution du cholestérol-HDL, les dyslipémies telle la maladie de Tangier caractérisée par une absence quasi-complète des HDL (301) ou les hyperlipémies qui, quel que soit leur type, s'accom-



TABLEAU 10

VALEURS NORMALES DU CHOLESTEROL-HDL  
EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE

| ANNEES  | HOMMES  | FEMMES  |
|---------|---------|---------|
| 0 - 19  | 51 ± 13 | 54 ± 18 |
| 20 - 29 | 49 ± 11 | 56 ± 13 |
| 30 - 39 | 46 ± 11 | 57 ± 17 |
| 40 - 49 | 48 ± 13 | 65 ± 14 |
| 50 - 59 | 42 ± 8  | 49 ± 13 |

(Les valeurs sont exprimées en mg/100 ml)

pagne d'une baisse du cholestérol-HDL (308), et enfin l'athérosclérose (242). A ce propos, très nombreux sont les arguments qui plaident en faveur du rôle anti-athérogène des HDL, et depuis trois ans environ se développe aux U.S.A. une campagne de presse et de publicité incitant les citoyens américains à inclure dans le bilan de santé le dosage du cholestérol lié aux LP lourdes (HDL). Une affiche montrant un esquimau, annonce : "Cet esquimau a un taux élevé de lipoprotéines lourdes, c'est une bonne nouvelle pour son coeur".

b) Relations entre les lipoprotéines lourdes et la fréquence des maladies coronariennes -

Dès 1951, BARR constate au cours d'une étude effectuée au "New-York Hospital Cornell Medical Center" :

- \* qu'il existe une relation entre la diminution du taux de cholestérol contenu dans les HDL et la fréquence de l'athérosclérose,
- \* que la richesse en cholestérol des LP denses du nouveau-né est comparable à celle du sang du lapin ou du chien, animaux présentent spontanément une grande résistance à l'athérosclérose (tableau 11 page 98),
- \* qu'avec l'âge, le taux de cholestérol lié aux HDL diminue jusqu'à un cinquième du cholestérol total (30).

A l'exception des travaux de GOFMAN en 1966 (153), qui rapporte que le taux de cholestérol contenu dans les HDL est anormalement bas chez les jeunes sujets développant une maladie coronarienne, les travaux de BARR tombent dans l'oubli jusqu'à ce qu'en 1975, MILLER démontre qu'un taux bas de cholestérol des HDL accélère le développement de l'athérosclérose coronarienne par suite d'une diminution de la mobilisation normale du cholestérol de la paroi artérielle et de son transport vers le foie où il est normalement catabolisé puis éliminé (243).

Enfin, en 1977, GORDON et coll.(158) rapportent les études qu'ils ont effectuées dans la petite ville de Framingham aux U.S.A. qui abrite la population la mieux connue médicalement du monde, puisqu'elle est suivie dans sa totalité depuis une vingtaine d'années. Les taux de cholestérol et des triglycérides des diverses fractions lipoprotéiques sanguines sont mesurés entre 1969 et 1971 chez 1025 hommes et 1445 femmes âgés de 49 à 82 ans. En 1976, soit 5 ans plus tard, 142 de ces sujets sont atteints d'une maladie coronarienne et 42 en sont morts. Les auteurs comparent à postériori les taux de cholestérol et

TABLEAU 11

## POURCENTAGE DE CHOLESTEROL PLASMATIQUE CONTENU DANS LES HDL

|                                         | Cholestérol plasmatique total<br>g/l | Pourcentage de cholestérol plasmatique contenu dans les HDL |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Hommes et Femmes<br>18 - 35 ans         | 1,92                                 | 29,3 %                                                      |
| Hommes et Femmes<br>45 - 65 ans         | 2,45                                 | 23,2 %                                                      |
| Survivants d'un infarctus du myocarde   | 2,58                                 | 14,1 %                                                      |
| Nouveau-nés                             | 0,65                                 | 43,5 %                                                      |
| Chien normal                            | 1,67                                 | 83 %                                                        |
| Chien avec athérosclérose expérimentale | 26,98                                | 5,8 %                                                       |
| Lapin normal                            | 0,41                                 | 52,7 %                                                      |
| Lapin avec athérosclérose expérimentale | 3,64                                 | 9,6 %                                                       |



triglycérides des fractions lipoprotéiques dans la population épargnée et chez les sujets atteints, en tenant compte également des facteurs de risques connus : l'hyperglycémie, les surcharges pondérales, la pression sanguine, le tabagisme. Il ressort de leurs résultats que le taux de cholestérol de la fraction HDL est le meilleur indicateur du risque cardiovasculaire : plus le taux est élevé, plus le risque d'accident et de mort cardiovasculaire est faible, et cela reste vrai quels que soient les autres facteurs de risques, y compris le taux de cholestérol total (figure 18, page 100).

Des enquêtes analogues effectuées à Albany, San Francisco, Porto Rico, Honolulu aboutissent aux mêmes conclusions, à savoir qu'il existe une relation inverse entre le taux de HDL et la fréquence des maladies coronariennes, et que l'hypercholestérolémie est sans valeur péjorative chez les sujets présentant un taux élevé de HDL (tableau 12, page 101).

Enfin, ZILVERSMITT apporte en 1977 une preuve expérimentale à cette hypothèse grâce à des constatations faites chez le vison dont la cholestérolémie élevée, mais prise en charge à 80 % par les HDL, ne s'accompagne jamais d'athérosclérose (396).

En fonction de ces études de physiopathologie comparée, il est possible d'affirmer que l'homme est l'un des rares mammifères à avoir des concentrations plasmatiques plus élevées en LDL qu'en HDL, et que c'est probablement la raison pour laquelle il est le plus sensible aux maladies cardiovasculaires consécutives à l'athérosclérose. La baisse des HDL, plus marquée chez l'homme que chez la femme, rend peut-être compte également de la plus grande fréquence de l'athérosclérose dans la population masculine.

Ces découvertes épidémiologiques offrent des cibles nouvelles pour des agents thérapeutiques mieux adaptés, ou toute autre campagne d'activités menée dans le but d'augmenter le taux de HDL et de diminuer celui des VLDL et des LDL.

BUS  
LILLE

Pourcentage de risque de maladie coronarienne

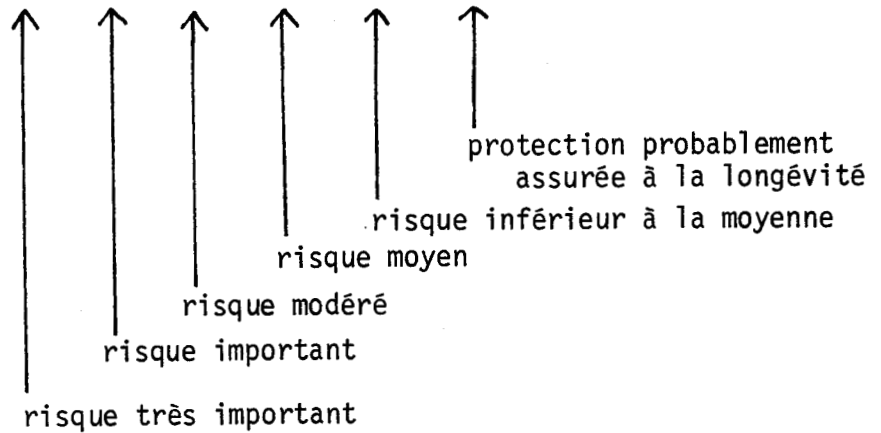
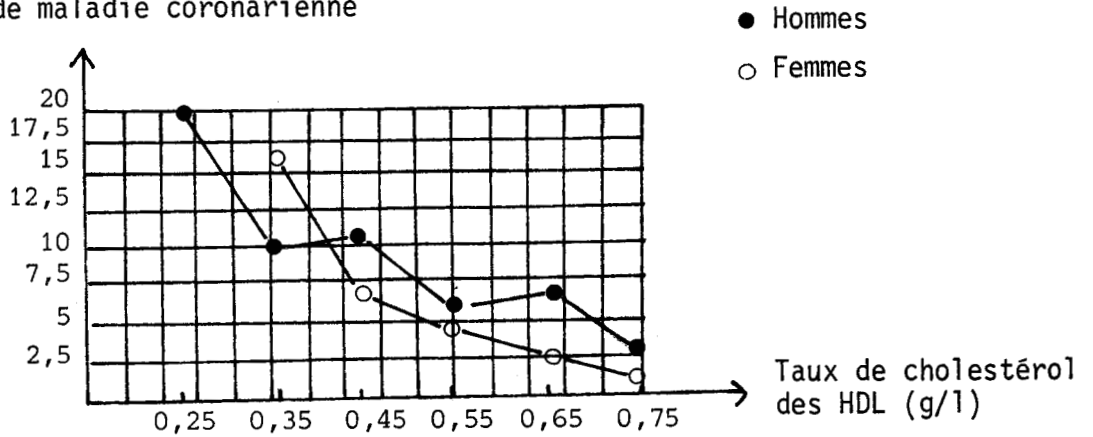


Figure 18

RELATION ENTRE LE TAUX DE CHOLESTEROL-HDL  
ET L'INCIDENCE DU RISQUE CORONARIEN A FRAMINGHAM



TABLEAU 12.

CHOLESTEROL ET INCIDENCE DE LA MALADIE CORONARIENNE

| Taux de cholestérol total | Taux cholestérol des HDL | Incidence de la maladie coronarienne                                                                       |
|---------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elevé                     | Diminué                  | Risque très important                                                                                      |
| Normal ou diminué         | Augmenté                 | Risque très faible                                                                                         |
| Augmenté                  | Augmenté                 | Risque plus faible que celui habituellement pronostiqué pour un taux élevé de cholestérol total            |
| Normal ou diminué         | Diminué                  | Risque plus important que celui habituellement pronostiqué pour un taux normal ou bas de cholestérol total |



4- CONCLUSION PRATIQUE -

Dans l'état actuel de nos connaissances, il serait souhaitable d'envisager une réorganisation de la prévention des maladies coronariennes, mais les difficultés de réalisation pratique et le coût des enquêtes épidémiologiques à grande échelle sont énormes. Le dernier obstacle, et non le moindre, réside dans l'impossibilité de réaliser des études prolongées sur l'ensemble d'une population.

En vue d'une éventuelle prévention primaire la plus précoce possible, l'idéal serait d'envisager un dépistage systématique et obligatoire ainsi standardisé :

- \* à la naissance, par dosage de la cholestérolémie dans le sang du cordon. En effet, tout nouveau-né dont le cholestérol est supérieure à 1 g par litre est porteur d'une hyperlipoprotéïnémie génétique ;
- \* à 1 an, âge auquel les hyperlipidémies franches sont déjà détectables;
- \* à 20 ans, en raison des possibilités pratiques (sélection pour le Service National chez l'homme, planning familial chez la femme) ;
- \* puis tous les 5 ans, car de nombreuses hyperlipidémies se démasquent plus ou moins tardivement, à la faveur de la prise de poids, de la sédentarité, des mauvaises habitudes alimentaires, des oestro-progestatifs à visée anticonceptionnelle.

Une telle perspective demeure cependant utopique, malgré l'enjeu.

5- LP(a) ET ATHEROSCLEROSE -

La lipoprotéine LP(a) est présente dans le sang de tous les individus, mais à des concentrations extrêmement variables, et beaucoup d'auteurs s'interrogent sur l'incidence pathologique de cette LP.

Sa présence dans les plaques d'athéromes (377), ainsi que de nombreuses études concernant les fréquences d'augmentation de son taux plasmatique, semblent indiquer qu'elle est athérogène. Elle a été en effet trouvée avec une fréquence beaucoup plus élevée chez des sujets atteints d'infarctus du myocarde d'athérosclérose coronarienne ou d'artérite que chez des sujets sains (266).

Pour certains auteurs, la concentration en LP(a) dans le plasma d'un sujet hyperlipidémique est toujours augmentée, et ce, quel que soit le type de l'hyperlipipémie (377) ; pour d'autres, cette élévation n'existe que dans le type II A, une diminution intervenant même dans les types IIb ou IV (9). OSE et coll. (266) montrent par ailleurs que la présence de la LP constitue un facteur de risque supplémentaire du développement d'une athérosclérose coronarienne sévère, même en l'absence de toute autre hyperlipoprotéïnémie.

Pour JAILLARD et coll. (194), récemment, l'association d'une hyperlipidémie (type II A, IIb ou IV), et en particulier d'une hypercholestérolémie (type II A), d'une part, et la présence en quantité élevée de LP(a) circulante d'autre part, correspond à un risque majeur d'athérosclérose en général.



CHAPITRE II

REVUE GENERALE SUR LES METHODES D'ETUDE  
DES LIPOPROTEINES

A- MÉTHODES D'ANALYSE DES LIPOPROTÉINES

1- L'ULTRACENTRIFUGATION -

1') 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 LP 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.

En pratique, les vitesses de flottation des LP de basse densité (VLDL et LDL) sont mesurées dans un milieu de densité 1,063, et sont simplement désignées par le symbole Sf (152).

b) Ultracentrifugation préparative -

L'ultracentrifugation de flottation permet le fractionnement des différentes classes de LP selon leurs densités en vue de les analyser. La composition lipidique moyenne de chaque classe de LP étant connue (339), il est en outre possible d'obtenir par cette méthode une mesure indirecte du taux des LP correspondantes ; on peut en effet admettre en première approximation l'existence d'une relation déterminée entre la masse moléculaire moyenne d'une classe donnée de LP 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 LP sériques réclament plusieurs ultracentrifugations à des densités progressivement croissantes ajustées intermédiairement par addition de sels minéraux et chaque séparation doit être poursuivie jusqu'à ce que les LP atteignent leur position d'équilibre ce qui généralement demande 24 heures (170).

Cette méthode d'ultracentrifugation est très laborieuse et nécessite un appareillage coûteux. Les manipulations sont de plus longues et délicates, l'ajustement des densités doit se faire avec une précision de l'ordre de  $10^{-3}$ , et bien que toujours citée comme méthode de référence pour la purification des LP, l'ultracentrifugation de flottation n'est pas utilisable en routine.

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 élevées, pouvant entraîner de ce fait des altérations de structure (87).

La qualité du fractionnement peut être améliorée en mettant en oeuvre un gradient de densité. Il s'agit d'une centrifugation isopycnique, relativement moins longue que la précédente, et PATSCH et coll. (269) décrivent une méthode de séparation par ultracentrifugation zonale dans un gradient de densité préformé, permettant d'obtenir toutes les LP sériques en une seule étape. Cependant, cette technique nécessite encore un appareillage très sophistiqué.

Nous utilisons au laboratoire une ultracentrifugeuse de paillasse (ultracentrifugeuse Airfuge Beckman), version miniaturisée simple à turbine à air, d'emploi facile, ne nécessitant que peu de sérum (600  $\mu$ l) et des temps de centrifugation de l'ordre de 3 heures (54). Le coût et le prix de revient de la manipulation sont modérés, et ce matériel pourrait être utilisé plus facilement par tous les laboratoires de biologie.

## 2- L'ELECTROPHORESE -

### a) Electrophorèse qualitative -

Rapide et simple, l'électrophorèse de zone est couramment utilisée pour l'analyse qualitative des LP. Son pouvoir de résolution dépend de la qualité du support utilisé (100).

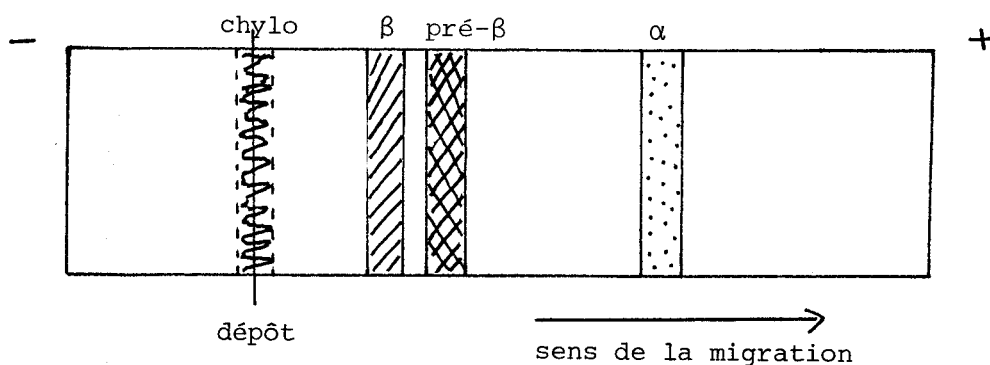
### - Electrophorèse sur papier -

Réalisée dans une cuve verticale type Durrum à pH 8,6 en tampon véronal additionné de sérumalbumine, la technique d'électrophorèse sur papier décrite par LEES et HATCH en 1963 (217) a servi de base à la classification des hyperlipoprotéïnémies proposées par FREDRICKSON, et actuellement la plus admise (137).

Elle permet une individualisation des principales classes de LP avec, par ordre de mobilité croissante :

- \* les chylomicrons qui restent au point de dépôt ;
- \* les bêta-lipoprotéines qui correspondent aux LDL ;
- \* les pré-bêta-lipoprotéines qui correspondent aux VLDL ;
- \* les alpha-lipoprotéines qui correspondent aux HDL.

Le schéma ci-dessous représente cette répartition :



La méthode est longue (16 heures de migration). Les chylomicrons restent au point de dépôt mais le pouvoir séparateur est faible au niveau des  $\beta$  et pré- $\beta$  LP, et il existe souvent un chevauchement des deux zones après coloration.

#### - Electrophorèse sur acétate de cellulose -

Bien que les migrations électrophorétiques sur acétate de cellulose soient rapides et que les séparations des fractions  $\beta$  et pré- $\beta$  LP soient nettes, cette méthode présente certains inconvénients majeurs :

- \* seuls les chylomicrons natifs de grande taille restent au point de dépôt alors que les chylomicrons sériques ayant déjà subi l'action de la LPL migrent en grande partie dans la zone des pré- $\beta$  LP, et quelquefois même au niveau des  $\beta$ -LP, recouvrant tout l'électrophorégramme. L'utilisation d'un tel support à propos de sérums turbides et lactescents peut aboutir à la confusion des types I, IV et V de la classification de FREDRICKSON ;
- \* la bande "broad  $\beta$ " spécifique du type III n'est pas toujours bien individualisée, et la confusion avec un type IIb est fréquente ;
- \* la lipoprotéine LP(a) n'est pas mise en évidence et sa migration en position pré- $\beta$  peut induire des erreurs de typage.

#### - Electrophorèse sur agarose -

Le pouvoir de résolution de l'agarose est excellent en ce qui concerne les  $\alpha$ ,  $\beta$  et pré- $\beta$  LP (25g, mais comme précédemment, en cas d'hyperchylomicro-némie, une partie des chylomicrons migre en traînée depuis le point de dépôt jusqu'à la zone des pré- $\beta$  LP, et l'emploi de ce support est limité à l'exploration du métabolisme lipidique en pratique journalière. Pour le typage précis des hyperlipidémies, il est souvent nécessaire de s'adresser à d'autres techniques.

- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide -

Ce support réalise une séparation où le principe de l'électrophorèse est associé à l'emploi d'un gel effectuant un tamisage moléculaire. Le facteur taille intervient alors en plus de la charge électrique et de ce fait, la migration des VLDL et des LDL est inversée par rapport à celle obtenue sur les autres supports.

L'emploi de ce support a considérablement simplifié le problème du diagnostic des hyperlipidémies, et FRINGS en 1971 (139) puis HALL en 1972 (165) 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 LP 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 hyperlipidémies de type IV et V.

En 1974, SEGAL et coll. (321) publient une méthode de précoloration des LP 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 troisième chapitre une méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration (322) mise au point au laboratoire et qui 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 LP particulières, comme la LP(a) ou la LP intermédiaire s'accumulant dans l'hyperlipidémie de type III.

Enfin, l'excellent pouvoir séparateur de ce support nous a suggéré son application pour la mise au point d'un système d'électrophorèse préparative des LP (102).

#### b) Electrophorèse quantitative -

Les différents supports proposés couramment pour l'électrophorèse des LP (papier, agarose, acétate de cellulose, gel de polyacrylamide) ne permettent essentiellement qu'une étude qualitative des fractions. En effet, s'il est toujours possible de quantifier les LP par enregistrement densitométrique des bandes de séparation, et si par ailleurs cet enregistrement est relativement aisé (222), il faut être très prudent et savoir qu'il n'existe aucune relation linéaire entre la concentration en LP et l'intensité de la coloration. Seuls des facteurs de correction difficiles à établir pourraient permettre une standardisation des valeurs obtenues. D'autres facteurs peuvent également intervenir, tenant compte de la manipulation proprement dite ou de la précision plus ou moins grande de la distribution des échantillons déposés ou encore de l'adsorption du colorant sur le support. Celle-ci est très variable, et nous pouvons citer le cas du papier qui, absorbant très fortement le Noir Soudan ou l'Oil Red O, colorants spécifiques des LP, exige après migration et coloration de nombreux 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 LP mais plus volontiers les fractions pauvres en triglycérides.

### 3- LES PRECIPITATIONS SELECTIVES PAR VOIE CHIMIQUE -

#### a) La précipitation polyanionique -

Dès 1955, plusieurs auteurs montrent que dans certaines conditions, les LP 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 moléculaires plus faible tel l'héparine ; dans ce dernier cas, il faut ajouter un cation bivalent (40, 65).

Faisant varier les conditions expérimentales (nature du cation, concentration des réactifs, force ionique) BURSTEIN décrit en 1962 (61) la précipitation des HDL par les polysaccharides sulfatés jusqu'alors utilisés pour celle des LP de faible densité, et démontre que dans des conditions expérimentales parfaitement définies, il est possible de précipiter sélectivement une classe particulière de LP. Des anions autres que les polysulfates peuvent être employés et l'addition de cations bivalents s'impose (69).

De telles interactions sont également obtenues avec des polyphosphates inorganiques ou avec de simples anions : des tétracyclines, des sels biliaires, des acides gras et le lauryl-sulfate de sodium (63).

Lorsqu'elle doit être sélective, la précipitation polyanionique des LP réclame des exigences expérimentales particulières, ne précipitant pas toutes dans les mêmes conditions. On peut alors 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 chylomicrons et les VLDL qu'avec les LDL, et plus facilement avec les LDL qu'avec les HDL. C'est ainsi qu'une précipitation sélective des différentes classes de LP peut être obtenue avec un même polyanion et en présence du même cation, en augmentant progressivement la concentration des réactifs. La facilité avec laquelle se forme le complexe dépend du rapport protéine-lipide des LP, mais non de la composition lipidique des LP précipitées (67).

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 LP par l'héparine (66),

\* en utilisant des LDL acétylées, NISHIDA et COGAN (257) 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 (71), 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, et BURSTEIN et coll. montrent en 1970 que, après délipidation des HDL, les apoprotéines solubles ne sont pas précipitées par les polyanions dans les mêmes conditions que la LP entière (66).

#### b) La précipitation polycationique -

La précipitation des LP a lieu également lorsqu'on ajoute au sérum un détergent cationique tel le bromure de cetyltriméthylammonium ou le cétavlon, et un polyélectrolyte de charge opposée sous forme d'héparine (62).

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

#### c) La précipitation par le polyvinyl-pyrrolidone -

La précipitation des LP s'obtient également par interaction de ces macromolécules avec un polymère neutre, le polyvinyl-pyrrolidone (64). A pH neutre et dans un milieu hypertonique à base de chlorure de sodium, le polyvinyl-pyrrolidone précipite sélectivement les chylomicrons, VLDL et LDL, cette sélectivité repose sur des concentrations différentes du polymère nécessaire pour précipiter chacune des classes de LP.

#### d) Applications -

La presque totalité des hyperlipoprotéïnémies se traduit par une augmentation du taux des LP du groupe bêta : bêta-LP lourdes (type II<sub>A</sub>), pré-bêta-LP légères (type IV ou V) ou ensemble des bêta et pré-bêta LP (type II b mixte). Le dosage des bêta et des pré-bêta-LP sériques présente donc un intérêt dans le diagnostic différentiel de ces hyperlipoprotéïnémies. Dans ce but, il convient de disposer de techniques d'analyses simples et rapides permettant, outre l'identification précise du trouble lipoprotéinique, de suivre l'évolution d'une hyperlipidémie 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 LP, les techniques immunologiques ne permettent pas de différencier entre elles les deux groupes bêta et pré-bêta-LP ( 70 ). C'est pourquoi les méthodes de précipitation sélective par voie chimique s'avèrent particulièrement intéressantes.

Dans le troisième chapitre nous décrivons une application de ces tests et proposons une technique simple et reproductible d'appréciation semi-quantitative des LP de basse densité (101). Susceptible d'être utilisée dans les laboratoires de routine, elle couple deux tests turbidimétriques décrits par BURSTEIN et coll. ( 65, 68).

#### 4- LE DOSAGE DU CHOLESTEROL DES LP -

En se fondant sur le fait que le taux de cholestérol est à peu près constant dans chaque type de LP, il est toujours possible de les quantifier par le biais d'un dosage du cholestérol des différentes classes isolées. Les résultats fournis sont généralement satisfaisants, pourvu que l'on dispose d'une excellente technique de dosage de cholestérol. C'est ainsi que WILSON et coll. (388) décrivent une méthode utilisant le dosage des LP 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 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.

Depuis la mise en évidence par des études épidémiologiques récentes du rôle anti-athérogène des HDL (242), de nombreuses méthodes d'estimation de ces dernières ont été proposées aux biologistes et aux cliniciens par l'intermédiaire de celle de leur contenu en cholestérol. Parmi ces techniques, il convient de distinguer trois classes différentes suivant qu'elles font appel à l'ultracentrifugation, l'électrophorèse ou la précipitation.

##### a) Par ultracentrifugation -

Les HDL sont séparées du plasma par flottation dans un milieu de densité comprise entre 1.063 et 1.21 g/ml, et on dose le cholestérol de cette fraction.

L'inconvénient majeur de cette méthode est lié au fait que la préparation est contaminée par la LP(a) de densité comprise entre 1.050 et 1.080 g/ml et particulièrement riche en cholestérol.

b) Par électrophorèse -

Pour séparer les LP et en particulier les HDL, l'électrophorèse est une méthode de choix et quelques auteurs (90) ont proposé de doser le cholestérol des LP ainsi séparées en utilisant une révélation enzymatique spécifique permettant une mesure par densitométrie. A partir des pourcentages et du taux de cholestérol total sérique, on peut calculer le cholestérol HDL.

Ces méthodes présentent l'avantage de ne pas être influencées par la présence éventuelle de LP(a) dans le sérum, mais cependant elles sont peu sensibles et sont assorties de coefficients de variation relativement élevés. De plus, dans le cas de sérums hyperHDLémiques, il faut être certain de révéler quantitativement le cholestérol contenu dans les LP.

c) Par précipitation -

Dans ce principe les LP de basse densité (chylomicrons, VLDL et LDL) sont précipitées et après centrifugation on dose le cholestérol du surnageant qui ne contient plus que les HDL. Il semble que l'agent précipitant idéal et/ou les conditions expérimentales restent à trouver, et les nombreux travaux publiés récemment sont souvent contradictoires. La précipitation des LP est assurée par des réactifs "spécifiques" (complexes polyanion-cation divalent) aussi divers que l'héparine-manganèse (13), le sulfate de dextran-magnésium (209), le phosphotungstate-magnésium (224), l'héparine-calcium (378), le polyéthylène-glycol (372), la concanavaline A (393).

5- LA DIFFÉRENCIATION IMMUNOCHEMIQUE -

La signification biochimique du concept de familles de LP est liée au fait que les apoprotéines sont les déterminants les plus probables de l'intégrité structurale et de la spécificité fonctionnelle des LP (4). La seule façon de déterminer les concentrations en familles de LP est donc de quantifier leurs apoprotéines correspondantes, et en raison de la complexité des LP plasmatiques, les méthodes de dosage font le plus souvent appel à l'immunologie afin d'être

spécifiques et sensibles. Ces techniques sont très nombreuses et la plupart d'entre-elles ont été développées récemment, au cours de ces cinq dernières années.

Nous proposerons dans le paragraphe suivant une revue générale des différentes méthodes d'étude des apoprotéines.

## 6- LA CHROMATOGRAPHIE -

Le fractionnement des LP 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. Les LP purifiées doivent être intactes qualitativement et de nombreux auteurs préconisent dans ce but une chromatographie de tamisage moléculaire. Dans un tel contexte, les LP sont uniquement soumises aux forces de diffusion et restent en solution tamponnée pendant toute la durée de l'isolement (43).

La chromatographie des LP plasmatiques majeures a été utilisée essentiellement sur colonne sur des supports aussi variés que l'hydroxylapatite (210), des billes de verre (75), des échangeurs d'ions type DEAE cellulose microgranulaire (42), des gels séphadex (383), et enfin des gels d'agarose qui, de tous les supports présentés fournissent les meilleurs résultats (292).

Des études d'interactions entre la concanavaleine A et les classes majeures de LP ont permis l'application du principe de la chromatographie d'affinité à la séparation des LP d'un sérum total ou au sous-fractionnement des LP séparées par ultracentrifugation (229). Cette méthode est très spécifique, fournissant des LP extrêmement pures, et doit de ce fait être recommandée pour la préparation de solutions d'antigènes (384).

Cependant, bien que rarement appliquée seule pour l'isolement des LP, la chromatographie intervient le plus souvent comme seconde étape d'une purification, la première faisant généralement appel à l'ultracentrifugation (11, 369).

B- REVUE GÉNÉRALE SUR LES MÉTHODES D'ÉTUDE DES APOPROTÉINES

## I- ISOLEMENT DES APOPROTEINES ET PRINCIPES GENERAUX DE LA DELIPIDATION -

### 1') Introduction -

L'obtention des apoprotéines à partir des LP entières met en oeuvre un procédé de délipidation. Une technique de délipidation idéale doit être totale et fournir une protéine totalement débarrassée des lipides, de structure native, et soluble en milieu aqueux. En fait, toutes ces exigences ne sont jamais satisfaites, et il reste toujours dans le meilleur des cas 1 à 3 % de phospholipides. De plus, l'apoprotéine délipidée montre généralement des différences spectrales par rapport à l'apoprotéine native. Ces changements sont cependant réversibles, et l'apoprotéine modifiée retrouve une forme native lorsqu'elle est réassociée avec des lipides (296). Enfin, les propriétés de solubilité sont variables selon les LP de départ. Ainsi, les apoprotéines des HDL et des VLDL sont rapidement solubilisées en milieu aqueux surtout dans des tampons de faible force ionique et alcalins (319). Par contre, l'apoprotéine des LDL est totalement insoluble, à moins d'ajouter un agent dénaturant quelconque (urée, chlorhydrate de guanidine, détergent), ou même de la soumettre à un traitement chimique (page 25).

### 2') Délipidation proprement dite -

Il existe une multitude de méthodes de délipidation mais aucune n'est parfaitement standardisée. En général, les manipulations s'effectuent au froid (-30°, -10°, 0°, +4°), avec des solvants fraîchement distillés et stockés au congélateur. Il faut de plus opérer dans des conditions qui préviennent la peroxydation des lipides et la dénaturation des protéines.

Le plus souvent, la délipidation des apoprotéines commence par leur précipitation, et les rapports du mélange de solvants organiques retenus sont choisis dans ce but. Mais on peut encore obtenir l'insolubilisation en lyophilisant les LP de départ.

Dans certains procédés relativement rares (320) on cherche au contraire à empêcher cette précipitation, et à mener entièrement la délipidation dans un système liquide-liquide. Ceci peut être intéressant pour l'apoprotéine des LDL en particulier, compte tenu de sa très faible, voire même de sa totale insolubilité en solution aqueuse.

Les solvants organiques utilisés sont très nombreux (182) : le dioxane, le triméthyl-phosphate, l'isopropanol, l'acétone, la tétraméthyl-urée, le

diméthyl-formamide, l'acétonitrile, le méthyl-sulfoxyde, etc..., mais les deux mélanges les plus couramment retenus sont : (éthanol-éther) et (chloroforme-méthanol) en proportions variables. On peut encore employer des détergents tels le dodécyl (ou le décyl) sulfate de soude, ou encore le triton X-100.

Le choix des solvants se fait en fonction des apoprotéines que l'on veut préparer et il existe une certaine sélectivité. Ainsi, l'utilisation du mélange chloroforme-méthanol pour délipider des HDL permet une meilleure récupération des apoprotéines C, et l'acétone sur les VLDL solubilise les apoprotéines CI, CII et CIII mais non l'apoprotéine "arginin-rich". Enfin, en règle générale, il faut se méfier d'une certaine solubilité des apoprotéines C, et plus particulièrement de l'Apo C-I en milieu éthanolique (205).

Une technique de délipidation, plus spécifique proposée par KANE (200) utilise la tétraméthyl-urée (TMU) ; ce solvant offre l'avantage de garder en solution toutes les apoprotéines des VLDL, sauf l'apoprotéine B qui précipite dans sa totalité.

Toutes les techniques de délipidation se terminent en général par un ou plusieurs lavages à l'éther. Cette étape est très délicate, car les apoprotéines allégées sédimentent très mal lors de la centrifugation menée dans le but de les récupérer, et des quantités plus ou moins importantes sont éliminées lors de l'aspiration de la phase étherée surnageante.

### 3') Solubilité et conservation des apoprotéines -

Bien que la délipidation parfaite cherche à obtenir une protéine soluble, on se heurte parfois à certains problèmes. Par expérience on sait que les apoprotéines des HDL facilement solubilisées en tampon aqueux ne le sont que partiellement au-dessus d'une certaine concentration maximum qu'il ne faut pas dépasser sinon apparaît une gélification des protéines. De même, les apoprotéines des VLDL reprises en tampon Tris sont enrichies en Apo C, mais ne contiennent que peu d'Apo E et pas d'Apo B ; par contre, en présence d'urée, toute leur Apo E est solubilisée, et même une petite partie de leur Apo B ; enfin en présence de dodécyl-sulfate de soude, leur Apo B est retrouvée en totalité.

La conservation des apoprotéines ainsi délipidées pose un dernier problème que chacun essaie de résoudre en fonction de sa propre expérience. Certains auteurs préconisent la lyophilisation avec conservation des protéines sous la forme d'une poudre sèche ; d'autres préfèrent les garder en solution à +4°C ou à -30°C.

#### 4°) Conclusion -

A la suite de ces très brèves généralités relatives aux techniques de délipidation, il est tout à fait évident qu'il s'agit d'une étape difficilement contrôlable de l'analyse des LP, et que pour être reproductible, elle doit être menée avec beaucoup de vigilance et de précautions.

### 2- PURIFICATION DES APOPROTEINES -

#### 1°) Principe général -

La purification des apoprotéines peut faire appel aux nombreux procédés de fractionnement classiques de chromatographie ou d'électrophorèse. Certaines remarques particulières doivent cependant être faites, et il faut savoir que même dans le cas des apoprotéines solubles, elles existent en solution sous forme d'agrégats moléculaires (263). Il est donc impératif :

- \* d'effectuer les fractionnements soit avec des tampons contenant de l'urée ou du chlorure de guanidine, soit avec des tampons acides (acide acétique 1M),
- \* de travailler avec une solution d'urée très fraîchement désionisée par passage sur résine mixte pour éviter toute carbamylation qui entraînerait une modification chimique irréversible des protéines,
- \* de ne pas prolonger le temps de contact des apoprotéines purifiées et de l'urée en choisissant des méthodes relativement rapides et en commençant la dialyse des fractions séparées le plus vite possible,
- \* enfin, de ne pas conserver les apoprotéines en solution trop concentrée.

#### 2°) Procédés de fractionnement -

##### a) Méthodes chromatographiques -

De nombreuses méthodes chromatographiques ont été appliquées au fractionnement des apoprotéines. Tous les paramètres propres à la chromatographie (supports, taille des colonnes, solvants d'éluion, débits...) sont différents selon les auteurs et nous proposerons pour chaque type de séparation celles qui sont le plus souvent utilisées. Il faut dire d'emblée que l'Apo B pose un problème particulier, ne disposant d'aucune technique de préparation acceptable à ce jour.



\* La chromatographie de tamisage moléculaire -

Elle se réalise le plus souvent sur Séphadex, et c'est ainsi qu'à partir d'apoprotéines de HDL humaines, SCHONFELD et coll. (310) purifient l'Apo A-II par deux passages successifs sur Séphadex G-200 avec un tampon tris-Hcl de pH 8,6 et contenant de l'urée 8M, ou encore que RUDMAN et coll. (293) séparent les Apo A et C sur Séphadex G-75 en présence d'acide acétique 1M. Ce dernier protocole est de même utilisé par JÜRGENS et KOSTNER (196) pour séparer le polypeptide Apo LP(a) spécifique de la LP(a).

\* La chromatographie d'échange d'ions -

La chromatographie de tamisage moléculaire n'est que rarement appliquée seule et généralement elle est couplée à une seconde étape de chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose (diéthylaminoéthyl-cellulose). Ainsi, la méthode de référence la plus souvent utilisée pour purifier l'Apo A-I des HDL comporte un premier fractionnement sur Séphadex G-200, suivi d'une deuxième séparation sur DEAE cellulose (120). De même, la préparation de l'Apo F met en oeuvre 3 étapes chromatographiques successives : les deux premières par tamisage moléculaire sur Séphadex G-100 et LH-20 et la troisième par échange d'ions sur carboxy-méthyl-cellulose (CM cellulose) (262).

La seule pratique de la chromatographie d'échange d'ions peut cependant être suffisante pour séparer les différentes apoprotéines des HDL (332).

\* La chromatographie d'adsorption -

Le principe de la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite (HAP) est mis à profit pour le fractionnement de l'Apo D à partir des apoprotéines des HDL<sub>3</sub> (228), et pour celui de l'Apo G à partir des apoprotéines des HDL<sub>3</sub> et VHDL (26).

\* La chromatographie d'affinité -

SHELBURNE et QUARFORDT (324) rapportent un procédé de purification de l'Apo E à partir d'Apo-VLDL par chromatographie d'affinité sur Séphadex 4B activé par du bromure de cyanogène et sur lequel est fixée de l'héparine. Les auteurs mettent à profit le fait que de toutes les apoprotéines solubles en milieu aqueux ou en milieu urée, seule l'Apo E ayant une grande affinité pour l'héparine se fixe très fortement au polysaccharide.

b) Méthodes faisant appel à l'électrophorèse et à l'isoélectrofocalisation -

Lorsque les apoprotéines ont un profil électrophorétique bien distinct, il est possible après migration de les extraire du support. Mais généralement il faut qu'elles aient été au préalable partiellement purifiées par d'autres techniques, et la protéine à extraire doit en outre être visualisée par un réactif non-dénaturant. Ainsi ALBERS et coll. (12) terminent la préparation de l'Apo A-I par ce procédé qui fait suite à deux chromatographies, l'une de tamisage moléculaire et l'autre d'échange d'ions.

UTERMANN (366) couple une chromatographie de tamisage moléculaire et une électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide dans un système discontinu pour isoler l'Apo E à partir des VLDL humaines, et propose dans le même but l'application d'une simple électrophorèse préparative d'Apo-VLDL partiellement purifiées au préalable par précipitation sélective de l'Apo B par la tétraméthyl-urée.

Actuellement bien développées pour la séparation qualitative des apoprotéines (82) les méthodes d'isoélectrofocalisation fournissent en outre sur le plan préparatif d'énormes avantages de rapidité et de simplicité. C'est le principe de choix retenu pour la purification des Apo C des VLDL (238), ou celle des différentes formes d'Apo E (380). Il existe cependant un inconvénient majeur résidant dans le fait que les ampholines utilisées pour la séparation sont très difficiles à dissocier des protéines que l'on veut purifier.

3') Conclusion -

Pour conclure, malgré de multiples efforts de simplification, exception faite de l'isoélectrofocalisation, les méthodes proposées sont généralement très longues. En effet, le couplage des chromatographies de tamisage moléculaire et d'échanges d'ions est une manipulation qui dure en moyenne 60 heures, durée à laquelle il faut encore ajouter celle de la dialyse c'est-à-dire environ 72 heures. Ces différentes techniques sont donc réservées à des laboratoires très spécialisés

### 3- CRITERES DE PURETE -

Mise à part l'Apo B, toutes les apoprotéines isolées sont homogènes par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant de l'urée 8M ou du dodécyl sulfate de sodium (SDS) (298). L'électrophorèse en présence de SDS avec évaluation des Rf est particulièrement recommandée pour l'identification de Apo A-I et A-II. De plus cette technique permet de mettre en évidence la structure en double chaîne de l'Apo A-II par changement du Rf lorsque la migration est réalisée en présence de mercaptoéthanol. L'électrophorèse en présence d'urée s'applique plus souvent pour identifier les Apo C.

Des anticorps spécifiques pouvant être produits chez l'animal contre chaque apoprotéine purifiée, tous les critères de pureté immunologiques classiques, telle l'immunoélectrophorèse en double dimension sont, de même, couramment pratiqués. Enfin, la composition en acides aminés de la majorité des apoprotéines étant actuellement connue, il est très commode de contrôler la composition de référence avec celle d'une apoprotéine dont on veut confirmer la pureté.

### 4- METHODES DE DOSAGE DES APOPROTEINES -

#### 1') Introduction -

Les apoprotéines portent les caractéristiques immunologiques des LP et peuvent être étudiées et dosées par tous les procédés classiques de l'immunologie au moyen des immunsérums correspondants. Parmi ces techniques, on dispose :

- \* de l'immunoprécipitation en milieu liquide (immunocrite et immunonéphélométrie),
- \* de l'immunodiffusion radiale et de l'électroimmunodiffusion en milieu gélifié,
- \* du marquage de l'anticorps ou de l'antigène (radioimmunologie, enzymoimmunologie).

Il est encore possible de doser certaines apoprotéines par densitométrie après séparation électrophorétique des fractions délipidées et déjà partiellement purifiées.

Toutes ces méthodes sont en fait déjà couramment utilisées dans le domaine des protéines mais de très nombreux problèmes se posent quant à leurs applications au dosage des apoprotéines, que celles-ci soient à l'état purifié ou à l'état natif.

## 2') Méthodes immunologiques -

### a) Immunoprécipitation en milieu liquide -

#### - Principes généraux -

Le mélange en proportions convenables du sérum et de l'immunsérum spécifique de l'apoprotéine à doser provoque la formation d'un précipité antigène-anticorps dont l'importance est proportionnelle à la quantité d'apoprotéine.

Dans la technique "immunocrite", la précipitation est réalisée dans un tube capillaire, et on apprécie la hauteur du précipité après centrifugation (174).

Mais il est beaucoup plus fiable et plus fréquent d'évaluer l'intensité du trouble développé par la réaction et de mesurer la quantité de lumière diffractée par les immuns-complexes dans un angle compris entre 0° et 90° : c'est l'immunonéphélométrie :.

\* Le système Technicon répond à ce principe et réalise une méthode immunonéphélométrique automatisée, basée sur la formation du complexe en veine liquide, avec mesure à 90° (72). La source lumineuse est une lampe Tungstène, et la détection se fait en fluorescence.

\* RITCHIE, faisant autorité en matière d'immunonéphélométrie, préconise l'utilisation d'un rayon laser comme source lumineuse et augmente ainsi beaucoup la sensibilité des méthodes (286).

#### - Principe du système d'immunonéphélométrie laser -

La source lumineuse est un laser à gaz (mélange d'hélium et de néon), émettant une lumière de longueur d'onde 632,8 nm. L'appareil se compose d'un tube plasma à chaque extrémité duquel se trouvent deux miroirs réfléchissants, rigoureusement parallèles. L'espace entre les deux miroirs s'appelle la cavité optique du laser. Un système générateur de courant à haute tension crée une décharge au niveau des électrodes et une accélération des électrons qui vont exciter les noyaux d'hélium. Ces noyaux d'hélium ainsi excités transfèrent une partie de leur énergie sur les noyaux de néon, puis une réaction en chaîne de désexcitations et d'excitations successives de ces noyaux va entretenir la libération de photons de longueur d'onde constante, créant ainsi une lumière cohérente.

L'amplification de ce phénomène est assurée par les miroirs réfléchissants qui maintiennent les photons au sein de la matière. La signification du mot laser est ainsi tout à fait représentative du processus : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.

Différents modes de détection sont préconisés sur les appareils (photodiode, photomultiplicateur) et l'angle de détection selon lequel on mesure la diffraction de la lumière varie selon les constructeurs (31,8°, entre 5 et 12°, 90°).

Le signal obtenu est traduit sur un écran digital par des chiffres correspondants à des valeurs de mesures répétitives et sélectives du pourcentage de dispersion relative de la lumière (% RLS).

- Applications des méthodes immunonéphélométriques au dosage des apoprotéines, intérêts et inconvénients -

Les méthodes d'immunoprécipitation automatisée utilisant la néphélométrie ont trouvé quelques applications pour le dosage de l'Apo B dans le sérum (197, 198, 282). Celles-ci sont relativement anciennes et cette technique n'est plus guère utilisée, étant relativement peu sensible. De plus, elle n'est rentable que pour d'importantes séries de dosages.

Par contre, la néphélométrie laser semble être une technique d'avenir en raison de la richesse des possibilités et des développements analytiques qu'elle offre. L'application de ce système pour le dosage des apoprotéines est tout à fait récente, et alors que nous en développons la mise au point pour le dosage des Apo B (133) puis A-I (132), BALLANTYNE et coll. (28) puis SHAPIRO et coll. (323) décrivaient de même l'utilisation d'un tel système pour quantifier respectivement les Apo B et A-I chez l'homme.

Les avantages d'un tel système et les caractéristiques de la méthode seront envisagés ultérieurement lors de la présentation de notre travail.

La présence de lipides, et notamment de triglycérides, en quantités relativement importantes dans les LP, est un obstacle majeur à l'utilisation des méthodes immunonéphélométriques pour le dosage des apoprotéines dans les sérums hyperlipémiques. Deux facteurs interviennent :

\* l'opalescence de base des échantillons à doser qui crée une dispersion non spécifique de la lumière s'ajoutant à la néphélométrie du complexe antigène-anticorps. Il est possible d'éliminer cet artefact par l'addition de détergents seuls (177) ou associés à diverses enzymes lipolytiques (176),

\* et la taille des particules que BALLANTYNE et coll. (28) mettent en cause pour expliquer les taux plus élevés d'Apo B obtenus par néphélométrie dans des sérums hyperlipidémiques, comparés à ceux fournis par une méthode radioimmunologique. Pour ces auteurs, les grosses particules de chylomicrons et de VLDL, lorsqu'elles sont liées à l'anticorps, peuvent être considérées comme d'énormes complexes capables d'attirer d'autres LP de façon non spécifique et d'augmenter ainsi la dispersion de la lumière. En outre, par néphélométrie, selon la méthode utilisée, ils obtiennent des valeurs plus faibles par immunonéphélométrie laser que par immunoprécipitation automatisée car l'angle de détection étant plus petit dans le premier cas, le phénomène de dispersion non spécifique dû à la taille importante des LP est mieux détecté.

Pour DURRINGTON et coll. (106), en immunonéphélométrie, c'est surtout la variabilité de la taille des particules contenant de l'Apo B qui intervient, les immuns-complexes devant être d'une dimension constante afin que l'intensité de la diffraction de la lumière soit proportionnelle à la concentration de l'antigène, or on sait que cette taille varie de  $2,2 \times 10^6$  à  $430.000 \times 10^6$  daltons (168).

b) Immunoréactions en milieu gélifié -

- L'immunodiffusion radiale -

Par immunodiffusion radiale de l'antigène dans un gel d'agarose contenant l'anticorps, selon la méthode originale décrite par MANCINI et coll. (236), le carré du diamètre de l'anneau de précipitation développé est proportionnel à la concentration de l'antigène.

Cette technique a permis le dosage de plusieurs apoprotéines : Apo A-I (12, 86, 280), Apo A-II (86), Apo B (93), Apo E (212), Apo D (94) et de la partie protéique globale de la lipoprotéine LP(a) (11). C'est une méthode relativement longue (la diffusion des particules n'étant complète qu'au bout de 3 jours) et son coefficient de variation est généralement assez élevé (de l'ordre de 15 %). En outre, et plus particulièrement pour le dosage de l'Apo B, elle ne peut être appliquée qu'à des sérums normolipémiques, et les taux obtenus dans le cas de sérums riches en grosses LP (chylomicrons, VLDL) dont la diffusion dans le gel est difficile, sont largement sous-estimés. A cet égard, KARLIN et coll. (204) montrent que le dosage de l'Apo B par immunodiffusion radiale dans des sérums hyperlipidémiques de types II(b), III ou IV riches en VLDL reflète uniquement l'Apo B des LDL.

## - L'électroimmunodiffusion -

Une séparation électrophorétique de l'antigène est effectuée dans un gel d'agarose auquel est incorporé un immunosérum spécifique ou polyvalent. La réaction antigène-anticorps se développe pendant la migration de l'antigène et il y a formation d'un pic de précipitation dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'antigène.

Ce principe a permis à beaucoup d'auteurs d'effectuer le dosage des Apo A, B et D dans des sérums ou des fractions lipoprotéiques (92, 93, 94, 123), selon la technique originale de LAURELL (214).

Comparée à l'immunodiffusion radiale, c'est une méthode beaucoup plus rapide, et les temps de migrations varient de 3 à 12 heures ; elle est en outre plus précise, les coefficients de variation ne dépassant jamais 8 %. Enfin, elle est très sensible (détectant moins de 50 ng d'apoprotéines) et très exacte si on compare les résultats à ceux obtenus par gravimétrie (215).

Permettant l'incorporation d'un immunosérum polyvalent dans le gel, cette méthode offre de plus l'avantage particulier de pouvoir différencier les formes libres et associées des familles de LP, d'étudier ainsi les relations structurales qui existent entre les différentes apoprotéines ou leurs polypeptides constitutifs, ou encore de doser plusieurs apoprotéines à partir d'un mélange d'antigènes. C'est ainsi que CURRY et coll. (92) dosent les Apo A totales (A-I + A-II) de divers sérums avec un immunosérum polyspécifique anti-LPA, n'obtenant dans ce cas qu'un seul pic de précipitation car les deux apoprotéines appartiennent à la même famille, tout en caractérisant l'Apo D qui développe un pic parfaitement distinct de celui des Apo A (94). Ils démontrent ainsi qu'il s'agit de deux entités physicochimiques totalement différentes.

Malgré leurs nombreux avantages, les méthodes immunoélectrophorétiques ne sont pas sans inconvénients, et il faut être très prudent quant à leur application au dosage des apoprotéines dans des sérums hyperlipidémiques. En effet, la migration de grosses LP dans l'agarose n'est pas excellente et des auteurs (216) ont ainsi observé des différences suivant les courbes d'étalonnage utilisées et établies par exemple soit avec de la LP-B de densité 1,040 - 1,053 g/ml, soit avec un sérum natif servant d'étalon secondaire.

Par contre, CURRY et coll. (93), comparant trois méthodes de dosage de l'Apo B (immunoélectrophorèse, immunodiffusion radiale et radioimmunologie) dans des fractions de VLDL, obtiennent des résultats très concordants avec les LP isolées de sérums normaux, mais dans le cas d'échantillons préparés à partir de sérums hyperlipidémiques, seule l'immunoélectrophorèse est satisfaisante et

dose la totalité de l'Apo B. Les auteurs mettent en cause l'importance de la source commerciale de l'agarose, celui-ci devant contenir le plus faible pourcentage d'eau possible.

c) Méthodes de dosage utilisant un marquage de l'antigène ou de l'anticorps

- Méthodes radioimmunologiques-

Dans la littérature, de très nombreuses méthodes de dosage des Apo A, B et C sont basées sur des essais radioimmunologiques à propos desquels KARLIN et coll. (204) ont fait récemment une revue générale.

Le principe du dosage radioimmunologique repose sur la compétition entre un antigène marqué par un isotope (apoprotéine purifiée sur laquelle est fixé un traceur radioactif) et le même antigène non marqué ou antigène froid (apoprotéine à doser), vis-à-vis d'un anticorps spécifique. Les quantités d'antigène marqué et d'anticorps étant constantes, toute adjonction d'antigène froid entraîne une réduction des quantités d'antigènes radioactifs fixés à l'anticorps et une augmentation sous forme libre. En mesurant la radioactivité en solution et / ou précipitée, on apprécie l'une ou l'autre forme, ou les deux, l'importance de celles-ci étant directement proportionnelle à la quantité d'antigène froid introduite lors du dosage.

Plusieurs protocoles méthodologiques sont proposés, et selon les auteurs, la durée et la température d'incubation des réactants varient. De même, pour le marquage de l'antigène généralement effectué avec de l'iode 125, on peut utiliser différents procédés. C'est ainsi qu'ALBERS et coll. (8) comparant leur dosage radioimmunologique de l'Apo B dans le sérum humain à celui de SCHONFELD et coll. (314) expliquent la divergence des résultats : les premiers auteurs incubent pendant 40 heures et utilisent des LDL marquées par l'intermédiaire du chlorure d'iode, 90 % d'entre-elles étant ainsi précipitées par un immunosérum anti-LDL ; les seconds incubent pendant 72 heures et 70 % seulement des LDL marquées par la méthode à la chloramine T sont précipitées par l'immunosérum.

L'application des dosages radioimmunologiques aux apoprotéines a beaucoup d'avantages. Basés d'une part sur la réaction antigène-anticorps, ils sont d'une très grande spécificité et d'autre part d'une très haute sensibilité compte tenu du mode de détection par radioactivité. Ils permettent ainsi de doser des apoprotéines n'existant qu'en concentration très faible dans le sérum et se révèlent ainsi très intéressants dans le cas de l'Apo C-II qui, malgré son importance biologique, ne peut être quantifiée par les méthodes classiques



d'immunodiffusion radiale ou d'immunoélectrophorèse.

Cependant, pour réaliser de telles techniques, certaines exigences sont réclamées :

- du fait de la très grande sensibilité, les dilutions utilisées sont souvent très élevées et doivent être effectuées avec rigueur pour que la manipulation soit la plus précise possible ;

- l'immunsérum doit posséder un titre élevé ;

- l'antigène marqué doit avoir une haute activité spécifique et une bonne stabilité ;

- enfin, les laboratoires doivent faire un certain nombre d'investissements en matériel et s'équiper notamment d'un spectromètre de détection. Ils doivent en outre respecter les contraintes de sécurité et de réglementation définies quant à l'emploi "in vitro" de substances radioactives.

#### - Méthodes immunoenzymologiques -

Les méthodes de dosage immunoenzymologique sont celles où l'extension de la réaction d'un antigène avec l'anticorps spécifique correspondant est quantifiée par l'intermédiaire de la mesure d'une activité enzymatique. Ce résultat est obtenu en créant une marque enzymatique sur l'antigène ou l'anticorps.

Ces techniques, faisant appel à l'utilisation de traceurs enzymatiques d'emploi beaucoup plus facile que les isotopes, sont actuellement largement appliquées au dosage d'antigènes ou d'anticorps très variés ainsi qu'à celui de nombreux médicaments (99).

Plusieurs schémas réactionnels peuvent être proposés selon la nature de la substance à doser (antigène ou anticorps), le mode opératoire (mise en compétition d'un réactif marqué avec un réactif non marqué à doser ou absence de compétition), le procédé de séparation du réactif ayant fixé l'antigène ou l'anticorps (on distingue alors dans ce cas les méthodes faisant appel à un réactif insolubilisé s'effectuant en phase solide ou hétérogène de celles se déroulant en phase liquide ou homogène).

Le choix de l'enzyme marqueur est guidé par certaines exigences et les plus utilisées sont la peroxydase, la glucose-oxydase, la phosphatase-alcaline et la  $\beta$ -galactosidase. Il existe différents modes de couplage de l'enzyme et de l'anticorps ou de l'antigène. L'anticorps et l'enzyme sont toujours des

protéines ; parfois l'enzyme est une glycoprotéine dont la partie glucidique est utilisée pour le couplage. Par contre, la nature chimique de l'antigène est très variable, et leurs méthodes de couplage échappent à toute description. La fixation enzyme-anticorps peut se faire par simple absorption physique ou par covalence (méthode d'Avrameas à la glutaraldéhyde ( 25 ) ou de Nakane au périodate ( 248 ).

Bien que devant offrir des possibilités intéressantes pour le dosage des apoprotéines, l'application des méthodes immunoenzymologiques dans ce domaine n'est pas connue. Dans la dernière partie de ce travail nous en décrivons une mise au point technologique pour le dosage de l'Apo B dans le sérum humain ( 141 ).

### 3') Méthodes densitométriques -

Après séparation électrophorétique, puis coloration des apoprotéines, leur dosage par densitométrie est très facile à réaliser. Ce principe a trouvé d'importantes applications pour les Apo C des HDL et surtout des VLDL ( 78 , 201 ), et même plus particulièrement pour les Apo C-I et C-III dont la purification très difficile rend l'obtention d'immunsérums spécifiques relativement limitée, empêchant ainsi l'application de toute technique immunologique.

Cependant, ces méthodes ne peuvent se réaliser que sur des fractions de LP isolées par ultracentrifugation puis délipidées par un mélange alcool-éther, ou plus simplement par la tétraméthyl-urée (TMU) ( 200 ) qui précipite sélectivement l'Apo B et libère les autres apoprotéines sous forme soluble.

La séparation des apoprotéines s'effectue généralement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH alcalin en présence d'urée ( 200 ) ou de SDS ( 379 ). Cependant, ce procédé ne sépare pas les différentes formes d'Apo C-III ( 76 , 201 , 316 ) et CATAPANO et coll. n'obtenant qu'une très mauvaise résolution des Apo C-III<sub>0</sub> et C-II ( 82 ) préfèrent l'isoélectrofocalisation pour doser ces deux apoprotéines dans des VLDL de sérums humains.

Enfin, les conditions de coloration doivent être choisies de façon à obtenir une réponse chromogène linéaire entre les apoprotéines natives et chaque apoprotéine purifiée, et pour que les dosages soient reproductibles il faut que les étapes de délipidation puis de coloration et décoloration soient parfaitement contrôlées.

5- PROBLEMES RELATIFS AU DOSAGE DES APOPROTEINES -

1') Choix des standards -

Quelle que soit la méthode de dosage des apoprotéines, que celle-ci soit réalisée sur des fractions lipoprotéiques ou des sérums, elle fait toujours intervenir une courbe d'étalonnage établie avec un standard convenablement choisi et précisément dosé.

Plusieurs raisons majeures font que les apoprotéines isolées sont de très mauvais étalons :

- \* elles sont instables en solution et généralement perdent leur immunoréactivité au bout d'une semaine à +4°C ou -20°C ( 93 ). Elles ne peuvent donc être utilisées dans le cas d'une méthode de dosage immunologique,
- \* leur purification nécessitant toute une série de manipulations (l'ultracentrifugation, délipidation, chromatographie, électrophorèse), il faut être très prudent quant à leur réactivité comparée à celles des mêmes protéines natives,
- \* et enfin, lors de leur isolement, elles tendent à former des agrégats très hétérogènes dont le comportement selon les méthodes de dosage utilisées est difficile à connaître.

Sous leur forme native, les apoprotéines sont stables beaucoup plus longtemps et se conservent pour la plupart d'entre elles au moins 6 mois à +4°C ou -20°C, l'Apo D garde même ainsi sa réactivité pendant 2 ans ( 94 ).

De ce fait, le standard utilisé dans tous les dosages est un sérum-étalon secondaire. Son étalonnage réclame une très grande précision, et sauf dans le cas des dosages d'Apo B, il ne peut se faire aisément que par rapport à la protéine fraîchement purifiée. Il s'agit d'un problème extrêmement délicat, compte tenu du comportement des apoprotéines une fois purifiées.

Pour le dosage de l'Apo B, l'étalonnage secondaire est relativement facile, et la majorité des auteurs utilisent une sous-fraction de LDL de densité 1,040 - 1,053 g/ml qui ne contient que de l'Apo B à l'exclusion de toute autre protéine (106).

Le choix du sérum-étalon secondaire nécessite une grande rigueur. Ce sérum doit avoir une distribution lipoprotéique la plus proche possible de celle des échantillons analysés : en effet, pour certains auteurs (106) les divergences notées quant aux taux normaux d'Apo B chez l'homme sont dues à une différence de composition non seulement entre les sérums à doser plus ou moins riches en grosses LP, mais également entre ces mêmes sérums et le standard.

RICHTER (283) considère ainsi que pour les dosages par immunodiffusion radiale, l'antigène et le standard choisi doivent avoir la même taille moléculaire et pour une même concentration, la surface des anneaux de précipitation est inférieure si la particule antigénique est de grande taille.

## 2') Réactivité des apoprotéines purifiées, délipidées et natives -

Ce problème est le plus souvent remis en cause à propos du dosage des Apo A, l'étalonnage de celui de l'Apo B ne posant aucune difficulté majeure. Quant aux autres apoprotéines, existant en quantités relativement faibles, leur dosage soulève des difficultés supplémentaires et ne font l'objet que de quelques travaux.

Déjà en 1965, après divers traitements de HDL (congélation et décongélation successives, délipidation, dénaturation en présence d'urée), LEVY et FREDRICKSON caractérisent par immunoélectrophorèse une forme de HDL migrant plus lentement que les LP natives (218).

De même, en 1974, SCHONFELD et PFLEGER (315) obtiennent par la même technique, avec un immunsérum anti-Apo A-I un arc de précipitation situé à un endroit différent selon que l'antigène déposé est de l'Apo A-I pure, ou de l'Apo A-I sous forme de HDL délipidées ou encore de HDL natives.

KARLIN et coll. en 1978 (204) montrent par ailleurs que les taux d'Apo A-I dosés dans les HDL natives et délipidées ne sont pas identiques, et qu'une perte sélective des protéines intervenant lors de la délipidation est responsable de cette discordance.

Enfin, SCHONFELD et coll. (310) préfèrent doser l'Apo A-II dans le sérum humain par une méthode radioimmunologique plutôt que par immunoélectrophorèse sur gel d'agarose, l'apoprotéine isolée n'ayant pas la même vitesse de migration que l'apoprotéine native ou délipidée et développant des pics beaucoup plus hauts. Par contre, pour d'autres auteurs (92), les migrations électrophorétiques sont identiques à condition d'ajouter du Dextran T10 à l'agarose en solution.

Outre ces différences de comportement liées essentiellement à des modifications physicochimiques, les apoprotéines ont une réactivité immunologique variable selon leur état. En effet, la délipidation permettant l'obtention d'une particule plus petite débarrassée de la quasi-totalité des lipides et possédant une configuration différente, démasquerait certains sites antigéniques devenant de ce fait accessibles.

Certains auteurs (8) ayant dosé l'Apo B des VLDL et des chylomicrons par une méthode radioimmunologique ont comparé les taux respectifs de mêmes fractions natives et partiellement délipidées. Ils ont montré que les valeurs sont plus faibles à l'état natif, et ils expliquent cette différence par une teneur importante en lipides des LP natives cachant certains sites antigéniques.

Ce problème de "disponibilité" immunologique est également soulevé pour l'Apo A des HDL. A ce sujet on note dans la littérature des avis contradictoires, et pour le dosage immunologique de l'Apo A-I dans les HDL ou le sérum, selon les auteurs :

- \* il est indispensable de délipider totalement au préalable les échantillons afin d'obtenir une réactivité complète, et SCHONFELD et coll. (315) ont montré que seulement 5 % des sites antigéniques de HDL natives étaient disponibles. Par contre, après congélations et décongélations successives, ou après dénatura-tion par une solution d'urée 8M ou de chlorhydrate de guanidine, ils multiplient la réactivité respectivement par 2 et 5. En 1976, les mêmes auteurs (313) ont suggéré que la configuration de certains sites antigéniques de la molécule d'Apo A-I serait masquée dans les HDL natives par des interactions entre les lipides et les protéines, plus particulièrement leurs régions N terminales ;
- \* la délipidation au contraire entraîne une perte d'apoprotéines (284) et les auteurs préfèrent une simple dénaturation des LP ou des sérums à doser par chauffage des échantillons à +52°C pendant 30 mn (121), ou par de la tétraméthylurée (86) ou encore du décyl-sulfate de soude (121) ;
- \* pour d'autres enfin, aucun traitement ne s'impose, et il est tout à fait possible de doser l'Apo A-I au niveau des HDL ou des sérums natifs (92, 323, 348).

L'explication de ces divergences n'est pas connue, et pour certains auteurs, celles-ci seraient dues à la diversité des méthodes de dosage utilisées (121). Cependant, si on compare les résultats de FAINARU et coll. (120) ou STARR et coll. (348), à ceux de SCHONFELD et coll. (315), on constate que malgré un même principe de dosage (essai radioimmunologique), le premier groupe travaille sur des sérums natifs tandis que le second les délipide préalablement. Le mode opératoire lui-même peut alors être mis en cause, la technique de marquage de l'antigène et la température d'incubation des réactants étant différentes.

Une différence de spécificité antigénique selon les laboratoires (celle-ci étant liée à la diversité des méthodes de purification de l'Apo A-I), entraînant de ce fait la sélection d'une population d'anticorps d'affinité variable pourrait également être à l'origine de la grande disparité des résultats.

Ainsi, en 1976, SCHONFELD et BRADSHAW (309) ont séparé à partir d'un immunosérum anti-Apo A-I humaines deux lots d'anticorps de spécificité différente. Il semble en outre que d'une part l'espèce animale choisie pour fabriquer les anticorps et d'autre part la méthode d'immunisation interviennent : le mouton, la chèvre ou le lapin créant des anticorps hétérogènes, et des temps d'immunisation longs avec des injections de rappel fréquentes développant une population d'anticorps à très haute affinité (284).

Enfin, certains auteurs utilisent l'immunosérum entier, d'autres purifient les anticorps par chromatographie d'affinité et cette étape supplémentaire de purification peut encore être source de divergences quant aux résultats obtenus lors des dosages (284).

Pour le dosage de l'Apo A-II, la plupart des auteurs obtiennent une réactivité complète dans des échantillons natifs (19, 310), et comme pour l'Apo A-I la délipidation serait même déconseillée (237, 284). Cependant, CHEUNG et coll. (86) préconisent le traitement des prélèvements à la tétraméthyl urée.

SCHONFELD et coll. (311) expliquent difficilement cette complète réactivité de l'Apo A-II, celle-ci se liant beaucoup plus fortement aux lipides que l'Apo A-I (193, 241) et il serait logique de penser que la délipidation soit au contraire souhaitable, libérant tous les sites antigéniques.

### 3°) Auto-association et agrégation des apoprotéines purifiées -

Malgré de très nombreux travaux menés dans le but d'étudier les propriétés des apoprotéines en solution aqueuse, un grand nombre de problèmes persistent, dus pour la plupart d'entre-eux à des difficultés technologiques relatives à la complexité des molécules apoprotéiques qui, lorsqu'elles sont isolées, tendent à former des agrégats par auto-association (263). Ce phénomène est très difficile à contrôler, et semble essentiellement favorisé par la lyophilisation ou la conservation des apoprotéines en solution très concentrée.

Récemment, des auteurs ont défini certains paramètres intervenant dans ce processus : la force ionique, le pH du milieu et la température (357). Ils ont montré ainsi qu'à des concentrations inférieures à 0,5 mg d'Apo A-I par ml de solution, celle-ci se trouve essentiellement à l'état de monomère ; par contre, au-dessus de cette limite se forment des polymères de masses moléculaires variables. Le pH semble particulièrement important dans le cas de solutions d'Apo C-I, car à pH neutre, l'auto-association de cette protéine est très rapide ; par contre à pH acide l'Apo C-I se présente essentiellement sous une forme monomère (264).

Certains travaux suggèrent par ailleurs que de telles modifications de la structure quaternaire modifient l'affinité des protéines vis-à-vis des lipides ; ainsi l'incubation préalable d'Apo A-I avec de la lysolécithine, prévenant le phénomène d'agrégation, augmente sa capacité de fixation aux phospholipides (290, 371).

#### 4- VALEURS PHYSIOLOGIQUES HABITUELLES DES APOPROTEINES

##### ET INTERETS DE LEUR DOSAGE CHEZ L'HOMME -

Compte tenu des très nombreux problèmes qui se posent lors des dosages d'apoprotéines (choix d'un bon étalon, validité de la méthode utilisée, méthodologie différente pour une même technique, sélection des échantillons analysés, utilisation d'immunsérums spécifiques d'affinité variable selon les laboratoires, etc...), il est extrêmement difficile de définir une valeur normale des taux chez l'homme, et les tableaux 13 et 14 (pages 133 et 134) établissent respectivement une comparaison des résultats trouvés quant aux dosages de l'Apo B et de l'Apo A-I dans des sérums normolipidémiques, par différents essais immunologiques.

L'âge, le sexe et d'autres paramètres tels que l'index pondéral, la consommation d'alcool ou de tabac, l'activité physique semblent également intervenir sur les taux d'Apo B et A-I (95).

ALAUPOVIC ( 4 ), en utilisant une méthode immunoélectrophorétique obtient pour les 9 apoprotéines principales les valeurs physiologiques suivantes :

| Apoprotéines | Taux normaux<br>(en mg/dl)<br>(moyenne $\pm$<br>écart type) |
|--------------|-------------------------------------------------------------|
| A-I          | 134 $\pm$ 24                                                |
| A-II         | 68 $\pm$ 18                                                 |
| B            | 98 $\pm$ 20                                                 |
| C-I          | 7 $\pm$ 2                                                   |
| C-II         | 13,7 $\pm$ 2                                                |
| C-III        | 13 $\pm$ 5                                                  |
| D            | 10 $\pm$ 4                                                  |
| E            | 10 $\pm$ 4                                                  |

A la lumière des premiers dosages sériques d'apoprotéines dans différentes affections (certaines hyperlipoprotéinémies primaires, maladie de Tangier, abêtalipoprotéinémie, déficience en LCAT, diabète, certaines maladies hépatiques), il semble que la détermination du profil apoprotéique permette de mieux caractériser les perturbations affectant le métabolisme lipidique circulant (4).

Dans le domaine de l'athérosclérose, les dosages d'Apo B et A-I apparaissent également intéressants dans la mesure où ils reflètent respectivement les LP de basse et de haute densités, les premières étant athérogènes et les secondes étant anti-athérogènes.

Le tableau ci-dessous résume les modifications les plus caractéristiques des apoprotéines dans certaines dyslipoprotéinémies :

|                        |                            |
|------------------------|----------------------------|
| type I .....           | Apo A-I   A-II ↓ , Apo B ↓ |
| type IIa .....         | Apo B ↑                    |
| type IV .....          | Apo C-I   C-III ↓          |
| type III .....         | Apo E ↑                    |
| type V .....           | Apo C-II ↓                 |
| athérosclérose .....   | Apo A   Apo B ↓            |
| maladie de Tangier ... | Apo A-I ↓↓ , Apo A-II ↓↓   |
| Abêtalipoprotéinémie . | Apo B ↓↓                   |

Modifications des taux d'apoprotéines dans les dyslipoprotéinémies.

Enfin, connaissant l'importance des apoprotéines dans le métabolisme des LP (l'Apo C-II active la LPL chargée de l'épuration des triglycérides ; l'Apo A-I est indispensable à l'action de la LCAT chargée de l'estérification du cholestérol ; l'Apo B spécifique des VLDL et LDL permet ainsi de suivre le devenir de ces LP ; l'Apo E participe au métabolisme cellulaire du cholestérol par compétition au niveau des récepteurs cellulaires avec l'Apo B des LDL), et d'un aspect plus fondamental, il peut être très utile de les doser.



TABLEAU 13

DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DE L'APO B CHEZ L'HOMME

| Référence | Type de dosage* | Préparation des LDL                                           | Mode de marquage des LDL | Dosage chez des sujets normolipidémiques |                                      |                                                  |
|-----------|-----------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
|           |                 |                                                               |                          | Nombre de sujets                         | Moyenne d'âge des sujets (en années) | Taux d'apo B totale dans les sérums (en g/l)**** |
| 93        | RID             | Précipitation par le sulfate de dextran + ultracentrifugation | ---                      | 64                                       | 34                                   | 0,83 ± 0,25                                      |
| 93        | RIE             | d 1,030 - 1,043 g/ml***                                       | ---                      | 12                                       | ---                                  | 0,89 ± 0,13                                      |
| 304       | RIA             | d 1,025 - 1,050 g/ml***                                       | Chloramine T             | 42                                       | 42 ± 13                              | 0,83 ± 0,16                                      |
| 8         | RIA             | d 1,030 - 1,050 g/ml***                                       | Monochlorure d'iode      | 349                                      | (20 - 65)                            | 0,81                                             |
| 204       | RIA             | d 1,020 - 1,050 g/ml***                                       | Chloramine T             | 82                                       | (20 - 35)                            | 0,90 ± 0,24                                      |
| 204       | RIA             | d 1,019 - 1,063 g/ml***                                       | Chloramine T             | 42                                       | (20 - 39)                            | 0,92 ± 0,21                                      |

\*\*\*\* : Valeur moyenne ± écart type

\*\*\* : LDL isolées de sérums normolipémiques par ultracentrifugation préparative

\* : RID = immunodiffusion radiale  
 RIE = électroimmunodiffusion  
 RIA = essai radioimmunologique

TABLEAU 14

## DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DE L'APO A-I CHEZ L'HOMME

| Référence | Type de dosage** | Sujets |        | Moyenne d'âge (en années) | Taux d'Apo A-I dans les sérums (en g/l)*** |
|-----------|------------------|--------|--------|---------------------------|--------------------------------------------|
|           |                  | Sexe   | Nombre |                           |                                            |
| 86        | RID              | hommes | 263    | 39                        | $1,20 \pm 0,20$                            |
|           |                  | femmes | 99     | 36                        | $1,29 \pm 0,25$                            |
| 92        | RIE              | hommes | 19     | -                         | $1,46 \pm 0,78$                            |
|           |                  | femmes | 19     | -                         | $1,43 \pm 0,24$                            |
| 315       | RIA              | hommes | 41     | 37                        | $1,00 \pm 0,35$                            |
|           |                  | femmes | 34     | 29                        | $1,04 \pm 0,34$                            |
| 120       | RIA              | hommes | 17     | 27                        | $1,30 \pm 0,20$                            |
|           |                  | femmes | 35     | 33                        | $1,49 \pm 0,30$                            |

\*\* : RID : immunodiffusion radiale  
 RIE : électroimmunodiffusion  
 RIA : essai radioimmunologique

\*\*\* : Valeur moyenne  $\pm$  écart type



CHAPITRE III

---

TRAVAUX PERSONNELS

---

A - ANALYSE QUALITATIVE DES LIPOPROTEINES SÉRIQUES

## 1 - INTRODUCTION

La classification des hyperlipidémies 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'hyperlipoprotéïnémie.

Néanmoins, les méthodes de typage qui sont à la base de cette classification sont imparfaites.

L'analyse qualitative précise des différentes classes de LP plasmatiques fait appel soit à l'ultracentrifugation, soit beaucoup plus couramment à l'électrophorèse de zone, or la valeur de chacun des supports classiquement utilisés pour la séparation électrophorétique des LP est très inégale et aucun d'entre eux n'est réellement recommandable pour le typage d'une hyperlipidémie.

Par contre, l'apport de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est indiscutable ; ce polymère semble être le support idéal, simplifiant considérablement le problème du diagnostic des hyperlipidémies.

Nous présentons, dans ce travail, la mise au point d'une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu de pH et de concentration (322). Elle est basée sur la précoloration des LP par le nitrobleu de tétrazolium selon SEGAL et coll. (321) et sur leur séparation dans un tube contenant trois gels superposés : gel intermédiaire (A), gel de concentration (B) et gel de séparation (C).

## 2 - 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 LP 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 LP 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

Les compositions des différents réactifs sont données dans les tableaux suivants :

#### - Solutions tamponnées

| Solutions<br>pH ajusté à : | a<br>8,3 | b<br>6,7 | c<br>6,7 | d<br>8,9 |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Tris 2 M                   | 25 ml    | 125 ml   | 250 ml   | 750 ml   |
| HCl 1 N                    | -        | 240 ml   | 480 ml   | 240 ml   |
| Glycocolle                 | 28,8 g   | -        | -        | -        |
| TEMED*                     | -        | 2,3 ml   | 4,6 ml   | 1,15 ml  |
| Eau distillée q.s.p.       | 1000 ml  | 1000 ml  | 1000 ml  | 1000 ml  |

\* Tétraméthyléthylènediamine

- Autres solutions

| Solutions                   | Acrylamide |        |        | Autres |        |        |
|-----------------------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                             | e          | f      | g      | h      | i      | j      |
| Acrylamide                  | 12 g       | 13 g   | 8 g    | -      | -      | -      |
| Bisacrylamide               | 0,6 g      | 0,5 g  | 2 g    | -      | -      | -      |
| Riboflavine                 | -          | -      | -      | 4 mg   | -      | -      |
| Saccharose                  | -          | -      | -      | -      | 80 g   | -      |
| Persulfate d' $\text{NH}_4$ | -          | -      | -      | -      | -      | 0,14 g |
| Eau distillée q.s.p.        | 100 ml     | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| Conservation à + 4° C       | 1 mois     | 1 mois | 1 mois | 1 mois | 3 mois | 1 sem. |

- Solutions de gels

| Gel | A     | B     | C     |
|-----|-------|-------|-------|
| b   | -     | 1 vol | -     |
| c   | 1 vol | -     | -     |
| d   | -     | -     | 1 vol |
| e   | -     | -     | 1 vol |
| f   | -     | 1 vol | -     |
| g   | 1 vol | -     | -     |
| h   | -     | 1 vol | -     |
| i   | -     | 1 vol | -     |
| j   | 2 vol | -     | 2 vol |

e) Electrophorèse

Les gels sont successivement coulés et polymérisés (gel B polymérisé à la lumière) à raison de 0,7 ml de gel de séparation (C), 0,1 ml de gel de concentration (B) et 0,1 ml de gel intermédiaire (A).

Après avoir déposé 20  $\mu\text{l}$  de sérum précoloré, les tubes de gel sont déposés dans la cellule. L'électrophorèse se fait dans le tampon (a) de pH 8,3 pendant environ 35 min. sous une intensité constante de 5 mA par tube de gel. Le tampon (a) est utilisé froid (+ 4° C).



### 3 - RESULTATS

Les LP sont fractionnées non seulement en fonction de leur charge mais aussi de leur taille. De ce fait, les chylomicrons s'individualisent parfaitement, et les  $\beta$ -LP migrent plus loin que les pré- $\beta$ -LP.

La Figure 19, page 139 objective la migration des différentes classes de LP :

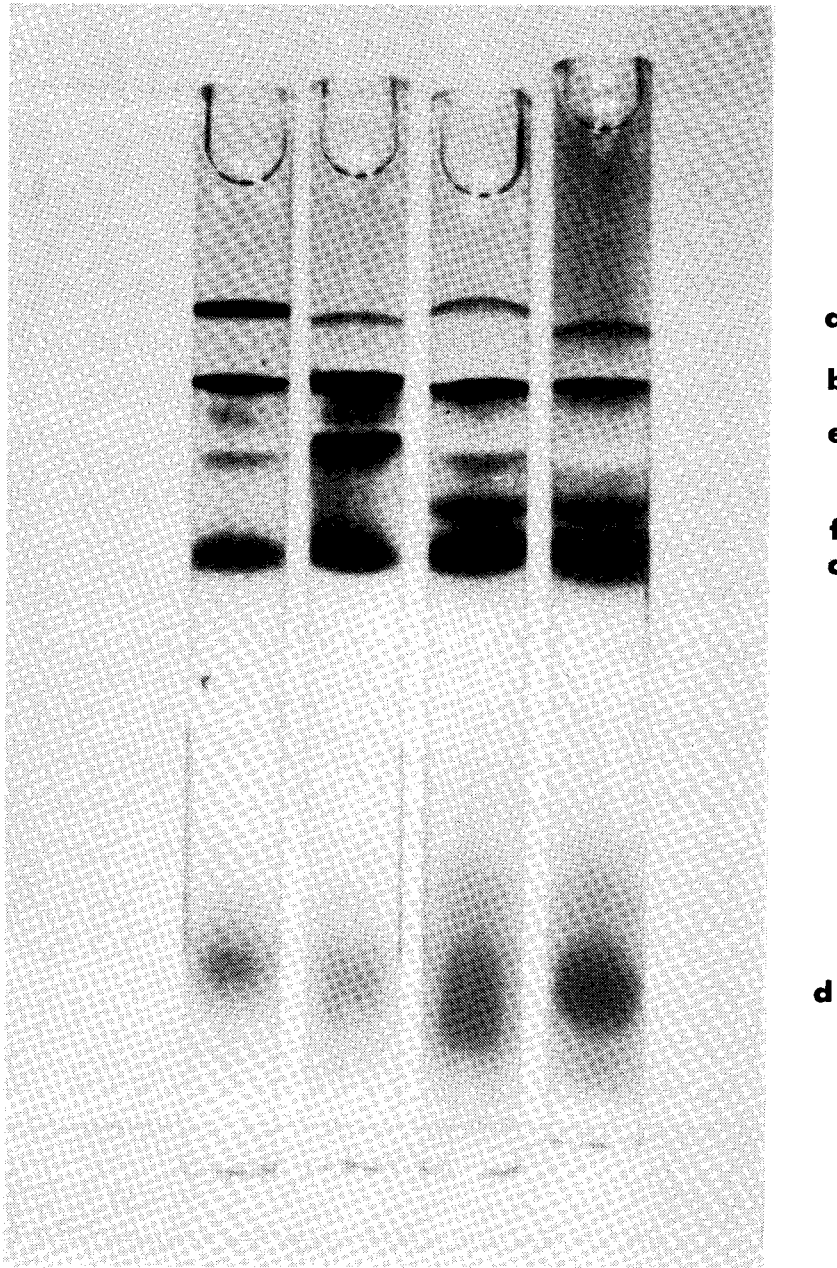
- Le gel A est imperméable aux chylomicrons,
- Le gel B bloque la migration des VLDL qui, après avoir traversé le gel A, se localisent à la limite supérieure du gel B en une bande plus ou moins étalée mais nettement définie,
- Le gel C fractionne les autres LP : les LDL forment une bande principale parfaitement 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 siégeant juste au-dessous des VLDL et correspondant sans doute à la fraction "U" décrite par MEAD et coll. ( 240). Il s'agirait de VLDL de taille moléculaire plus petite, et donc des LP intermédiaires se formant lors du catabolisme des VLDL en LDL (IDL).
- 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 LP particulière est caractérisée par des méthodes immunologiques et identifiée à la Lp(a).

L'usage du gel de polyacrylamide permet en outre l'identification du type III de FREDRICKSON sans qu'il soit nécessaire de compléter le diagnostic par l'ultracentrifugation, critère indispensable jusqu'alors. 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 LP 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.





a : chylomicrons

b : VLDL

c : LDL

d : HDL

e : IDL

f : Lp(a)

Figure 19

LIPIDOGAMMES EN GRADIENT DISCONTINU D'ACRYLAMIDE



#### 4 - CONCLUSIONS

- L'emploi du gel de polyacrylamide à gradient de concentration comme support d'électrophorèse rend l'interprétation du lipidogramme beaucoup plus spécifique, et la technique que nous décrivons est très simple à réaliser.
- L'excellente séparation des chylomicrons exogènes et des LP 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.
- 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 LP particulières telle la Lp(a). Migrant en position pré-bêta sur les supports classiques (337), elle est ici parfaitement séparée et cette constatation éclaire d'un jour nouveau les observations de sérums normotriglycéridémiques avec pré-bêta augmentées sur les supports classiques (103).

B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE DES LIPOPROTEINES  
SUR COLONNE DE GEL D'ACRYLAMIDE

---

APPLICATION A LA PURIFICATION DES  
HDL, LDL ET L<sub>p</sub>(a)

---

CARACTERISATION PARTIELLE DE LA L<sub>p</sub>(a)

---

## 1 - INTRODUCTION

L'excellente résolution des principales classes de LP et l'individualisation de la Lp(a) obtenues par l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide nous a suggéré la mise au point d'un appareil préparatif utilisant le même support. La séparation s'effectue le long d'une colonne de gel d'acrylamide à gradient discontinu de concentration, et les LP ainsi individualisées sont éluées quantitativement et de façon continue par l'intermédiaire d'un système que nous décrivons (102).

La méthodologie est très simple, et permet d'isoler rapidement à partir d'un sérum, les LDL et HDL qu'il contient.

En outre, couplée à l'ultracentrifugation, cette technique nous a permis l'obtention à l'état pur de la Lp(a) à partir d'un sérum anormalement riche en cette fraction, et d'en faire une étude partielle (103).

## 2 - MATERIEL ET METHODES

### a) Description du système préparatif

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 20, page 142, il se compose de deux parties :

- une colonne proprement dite,
- et une chambre d'élu-tion.

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

#### - 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.

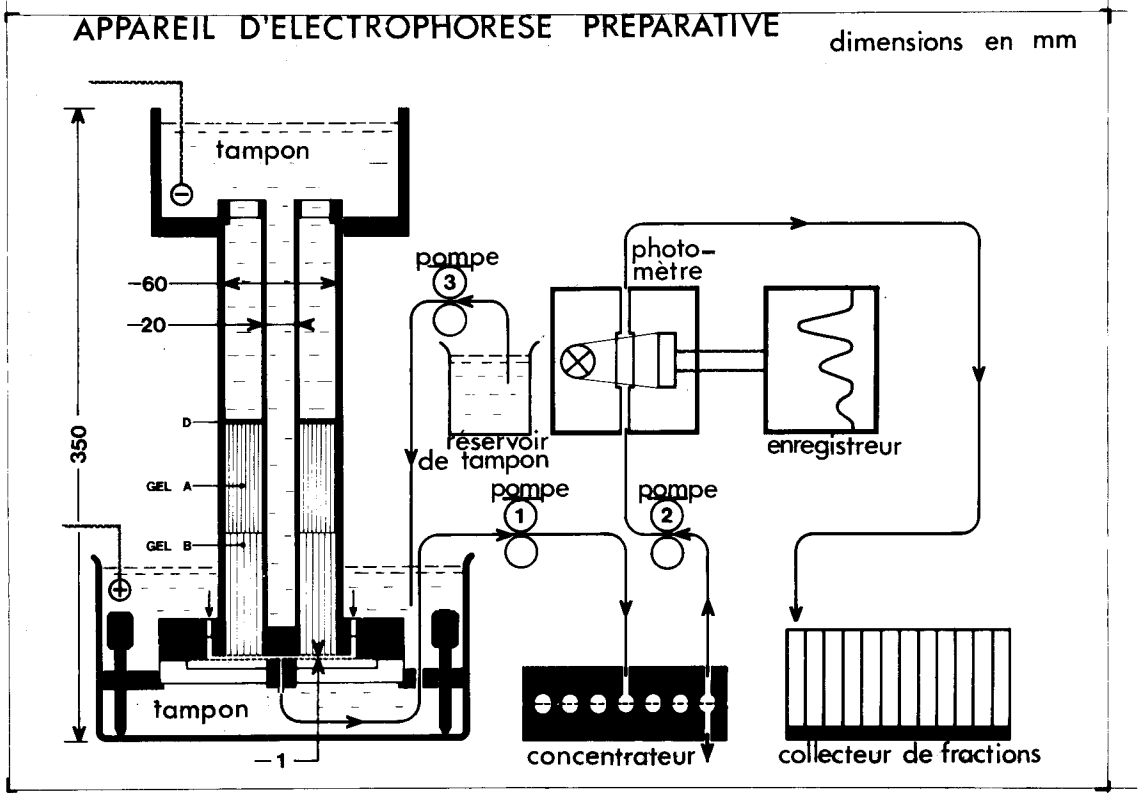


Figure 20

APPAREIL D'ELECTROPHORESE PREPARATIVE



- 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 convergent de la périphérie vers le centre entre deux surfaces planes sans obstacle et donc sans volume mort.

b) Préparation du support d'électrophorèse

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 indiquée ci-dessous :

|                                           | Gel de Séparation<br>A | Gel d'Elution<br>B |
|-------------------------------------------|------------------------|--------------------|
| Acrylamide                                | 3 g                    | 2 g                |
| Bisacrylamide                             | 0,25 g                 | 0,5 g              |
| Tampon d'électrophorèse**                 | 80 ml                  | 80 ml              |
| Agiter et dégazer                         |                        |                    |
| Solution de persulfate***<br>à 10 % (p/v) | 0,7 ml                 | 0,7 ml             |
| TEMED****                                 | 30 µl                  | 30 µl              |
| Tampon d'électrophorèse                   | q.s.p. 100 ml          | q.s.p. 100 ml      |

\* Tampon pH 8,3 (Tris 15 g, Glycocolle 72 g, Eau distillée q.s.p. 5000 ml)

\*\*\* A préparer extemporanément

\*\*\*\* Tétraméthyléthyléthyldiamine

Dans chaque cas, la polymérisation est obtenue en 30 min. à température ambiante.

### c) Préparation des échantillons à 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 ml de plasma peuvent être déposées en vue de l'électrophorèse. Si l'on désire étudier la partie protéique des LP ou préparer des immunosérums 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, et la fraction de LP de densité comprise entre 1,063 et 1,12 g/ml est déposée sur la colonne après dialyse contre du sérum physiologique. Cette fraction, comprenant la majeure partie de la Lp(a) et les HDL<sub>2</sub>, est dissociée par électrophorèse préparative.

### d) Electrophorèse

La chambre d'élution est adaptée à la base de la colonne, et la partie inférieure du système est immergée dans le bac anodique. Du tampon d'électrophorèse est ajouté jusqu'au sommet de la colonne puis dans le bac cathodique, puis l'échantillon est déposé à la surface du gel de séparation, sous le tampon. L'électrophorèse se poursuit pendant 16 heures, à + 4° C, sous un voltage constant de 200 volts.

### e) Elution des lipoprotéines

Un tuyau calibré, connecté au centre de la chambre d'élution (canal 1 - Figure 20, page ), 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 - Figure 20, page 142) dans la microcuve d'un spectrophotomètre dont le monochromateur est calé sur une longueur d'onde de 280 nm (ou 520 nm quand les LP 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/min.

Le tuyau du canal 3 (Figure 20, page 142) de la pompe assure l'alimentation en tampon du bac anodique de façon continue, avec un débit identique au débit d'élution.

#### f) Caractérisation des fractions purifiées

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

##### - Caractérisation électrophorétique

Les LP des fractions isolées ont fait l'objet d'une analyse qualitative par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (322) et éventuellement sur gel d'agarose.

##### - Caractérisation immunologique

Les propriétés immunologiques des fractions isolées ont été étudiées par double diffusion en gel d'agarose (267) à l'aide d'immunsérums spécifiques anti-alpha et anti-bêta-LP (Boehringer) et anti-Lp(a) (fourni par le Docteur BURSTEIN, C.N.T.S. 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.

##### - Caractérisation chimique

Les lipides des LP, extraits par la méthode de FOLCH (136), ont été fractionnés par chromatographie sur couche mince de gel de silice (appendice technique, page 243).

Après révélation des taches par l'iode et élution par un mélange chloroforme-méthanol (v/v), le cholestérol et les triglycérides ont été dosés simultanément à l'autoanalyseur Technicon par la méthode de RUSH et coll. (294) (appendice technique, page 259), et les phospholipides ont été déterminés par la méthode de RAHEJA et coll. (277) (appendice technique, page 245). 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.



L'étude de la composition glucidique des LP a été effectuée après délipidation par un mélange chloroforme-méthanol (1/4 v/v) d'une fraction aliquote (2 mg de protéine) et lyophilisation (246). Les hexoses ont été dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (362) modifiée par RIMINGTON (285) avec, comme témoin interne, un mélange équimoléculaire de mannose et de galactose (appendice technique, page 247).

La teneur en acides sialiques a été appréciée par une modification de la méthode de NIAZI et STATE (250) modifiée, en utilisant un réactif à la diphénylamine et l'acide N-acétyl-neuraminique comme témoin interne ( appendice technique 249).

Les protéines des différentes fractions ont été dosées selon la méthode de LOWRY (226) en utilisant comme étalon de la sérumalbumine (appendice technique, page 241).

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) (297). 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 OSBORNE (379) (appendice technique, page 251). 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.

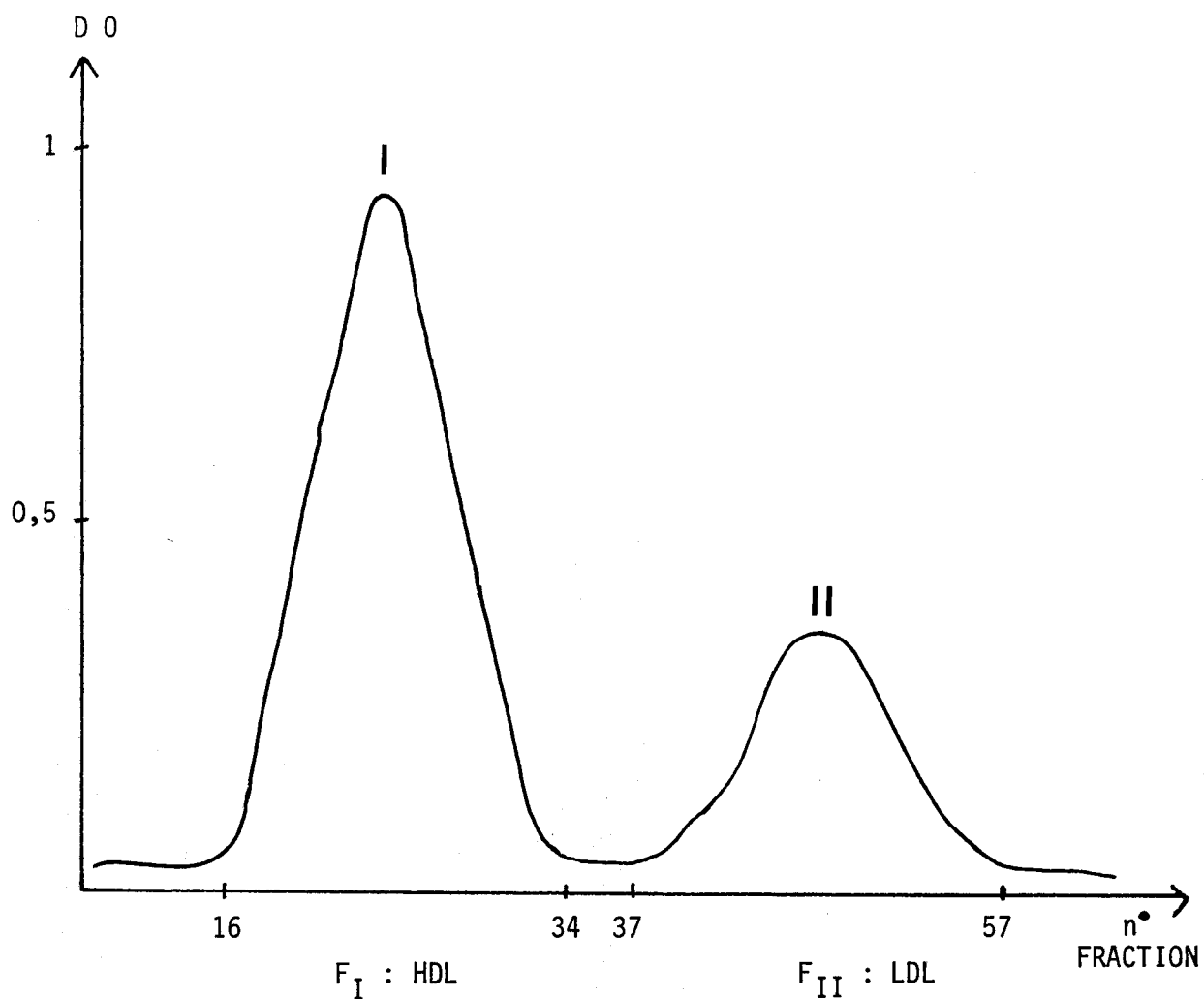
### 3 - RESULTATS ET APPLICATIONS

#### a) Isolement des HDL et des LDL - Applications

##### - Isolement

La Figure 21, page 147 montre qu'après électrophorèse préparative du sérum, les LP sont éluées respectivement en deux pics parfaitement séparés, et l'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide précise que 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.

Les deux LP isolées donnent une seule bande en électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide et réagissent spécifiquement avec leur antisérum correspondant en immunodiffusion.



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

DEBIT : 1,3 ml/mn

TAMPON : tris-glycolle

pH : 8,3

200 volts

16 heures

4° C

ENREGISTREMENT : 280 nm

Figure 21

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

A  $d = 1,21$



Les compositions lipidiques partielles des deux fractions sont résumées dans le tableau 15, page 149. Elles sont parfaitement en accord avec les compositions proposées dans la littérature pour ces mêmes LP isolées selon des procédés différents comme l'ultracentrifugation de flottation (339).

Afin de connaître le pourcentage de récupération des LP 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. (387) (appendice technique, page 256). Pour ce faire, nous avons dosé le cholestérol de chacune des fractions en chromatographie en phase gazeuse selon AMBERT et coll. (14) (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 263).

Les résultats rassemblés dans le Tableau 16, page 150, 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 %).

#### - Applications

L'électrophorèse préparative s'adapte à la quantification des LP (Tableau 16, page 150). 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 LP isolées sont intactes qualitativement, si l'on en juge d'après leur mobilité électrophorétique, leur réactivité antigénique et leur composition lipidique.

TABLEAU 15

COMPOSITIONS LIPIDIQUES COMPAREES DES HDL ET LDL PLASMATIQUES ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE (102) ET ULTRACENTRIFUGATION DE FLOTTATION (339)

|     | En pourcentages - par rapport aux poids de lipides totaux |                        |                |            | En pourcentages - par rapport aux phospholipides |                | Rapports                                           |                                                     |      |
|-----|-----------------------------------------------------------|------------------------|----------------|------------|--------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------|
|     | Cholestérol libre                                         | Esters de* cholestérol | Phospholipides | Glycérides | Lécithine                                        | Sphingomyéline | $\frac{\text{Chol. total}}{\text{Phospholipides}}$ | $\frac{\text{Chol. estérifié}}{\text{Chol. total}}$ |      |
| HDL | A                                                         | 6                      | 50             | 36         | 8                                                | 75             | 10,5                                               | 0,98                                                | 0,82 |
|     | B                                                         | 6                      | 50             | 39         | 5                                                | 75,4           | 11,8                                               | 0,91                                                | 0,82 |
| LDL | A                                                         | 10                     | 54             | 20         | 16                                               | 42,7           | 32,4                                               | 2,02                                                | 0,75 |
|     | B                                                         | 9                      | 49             | 18         | 24                                               | 61             | 20,3                                               | 2,02                                                | 0,76 |

A : présent travail

B : Skipski et coll. (339)

\* Esters de cholestérol = cholestérol estérifié x 1,7



TABLEAU 16

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

|                             | C* HDL (16 Cas)               |                                        | C* LDL (16 Cas)               |                                        |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|
|                             | Méthode de<br>Wilson<br>(388) | Electrophorèse<br>préparative<br>(102) | Méthode de<br>Wilson<br>(388) | Electrophorèse<br>préparative<br>(102) |
| Moyenne (g/l)               | 0,53                          | 0,50                                   | 1,28                          | 1,01                                   |
| Ecart-type                  | 0,15                          | 0,03                                   | 0,31                          | 0,31                                   |
| Coefficient de<br>variation | 28 %                          | 18,6 %                                 | 24 %                          | 31 %                                   |
| Rendement                   |                               | 94,3 %                                 |                               | 79 %                                   |

C\* = Cholestérol



## b) Isolement de la Lp(a) et applications

### - Isolement

L'électrophorèse préparative dissocie l'ensemble (Lp(a) + HDL<sub>2</sub>) déposé sur le gel en deux sous-fractions I et II (Figure 22, page 153) : la fraction I 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 et une seule bande en position pré-β par électrophorèse sur gel d'agarose.

Cette fraction II, correspondant à la Lp(a) réagit en immunodiffusion 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 LP (109, 369, 375). Un petit éperon se forme lors de la réunion des deux arcs, et semble indiquer l'existence d'une certaine dissociation de la Lp(a) en ses différents composants.

En revanche, l'absence de réaction avec l'immunsérum anti-HDL confirme la parfaite séparation des deux LP lors de l'électrophorèse préparative.

### - Applications

#### . Purification et caractérisation de la Lp(a) d'un sujet dyslipoprotéïnémique

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

Le Tableau 17, page 152 fait état des résultats enregistrés au niveau de la composition lipidique des LDL et de la Lp(a), et comme d'autres auteurs (11, 220, 337) nous trouvons de grandes analogies de répartition des différentes classes de lipides. 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.

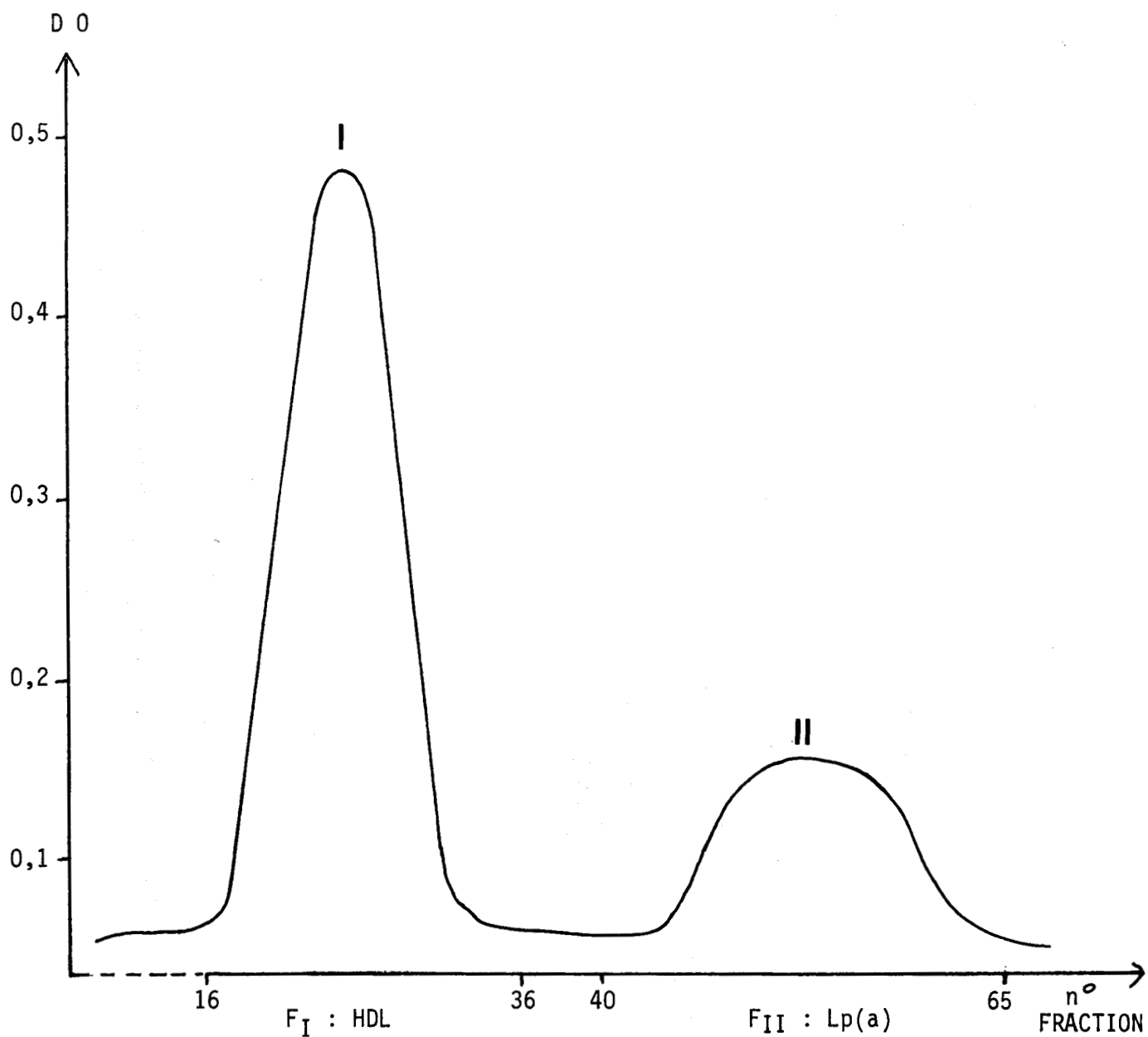
TABLEAU 17

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

|                                                                 | L D L      | Lp(a)      |
|-----------------------------------------------------------------|------------|------------|
| RAPPORT $\frac{\text{Lipides}}{\text{Protéines}}$ (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        |
|                                                                 | <u>100</u> | <u>100</u> |
| 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.





DEPOT : 5 ml 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

Figure 22

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



Le Tableau 18 , page 155 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.

On retrouve de même au niveau des acides gras constitutifs de la lécithine, des stérides et destriglycérides (tableau 19 page 156) une grande analogie de compositions entre LDL et LP(a) ( 199 ).

Les stérides sont riches en acides gras polyinsaturés notamment en acide linoléique (18:2) ; au niveau des triglycérides on retrouve, comme acides gras majeurs, les acides palmitique (16:0), oléique (18:1) et linoléique (18:2) ; les lécithines ont une composition classique avec un fort pourcentage d'acides gras longs insaturés, acide arachidonique en particulier.

La composition glucidique (Tableau 20, page 157) de cette Lp(a) isolée chez un seul sujet dyslipoprotéïnémique est analogue à celle obtenue par SIMONS à partir d'un mélange de sérums (337). 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.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide - SDS confirme l'hétérogénéité protéique de la Lp(a) et la présence, outre de sérumalbumine et d'Apo B, de deux autres protéines : l'une, majeure, de poids moléculaire voisin de 95 000, l'autre, mineure, de poids moléculaire voisin de 31 000. L'une d'entre-elles ou les deux pourrait correspondre à l'Apo-Lp(a).

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

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 LP. 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

TABLEAU 18

COMPOSITION LIPIDIQUE DE LA Lp(a) SELON DIFFERENTS AUTEURS

| Références            | En pourcentages de lipides totaux (p/p) |                      |               |                | Lipides<br>Protéines<br>(p/p) |
|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------|---------------|----------------|-------------------------------|
|                       | Cholestérol<br>estérifié                | Cholestérol<br>libre | Triglycérides | Phospholipides |                               |
| Simons et coll. (337) | 59                                      | 15                   | 3             | 23             | 1,8                           |
| Albers et coll. (11)  |                                         | 65                   | 6             | 30             | 2,4                           |
| Linden et coll. (220) | 51                                      |                      | 8             | 28             | 3,0                           |
| A*                    | 46                                      |                      | 20            | 17             | 2,7                           |

\* : Présent travail



TABLEAU 19

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  |

P C : Phosphatidyl-choline

C E : Esters de cholestérol

T G : Triglycérides



TABLEAU 20

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

| µg/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. ( 337 )



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 chacune, de la solution d'antigènes (370) ; les injections sont faites au niveau du dos, préalablement rasé, de l'animal et on termine par une piqûre intramusculaire 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 ‰ (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 (377), puis maintien à 4° C pendant une 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, C.N.T.S. Paris).

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

Nous avons utilisé l'immunsérum spécifique anti-apo Lp(a), ainsi préparé, pour le dosage de la Lp(a) dans le plasma par immunoelectrophorèse monodimensionnelle selon une adaptation de la technique originale de LAURELL (214) (appendice technique, page 277), et 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 (0,76 g/l) (11).

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/l).

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.

#### 4 - CONCLUSION

La technique d'électrophorèse préparative des LP plasmatiques que nous présentons est très simple. Elle s'oppose aux autres méthodologies, généralement longues et complexes, et qui, en outre, ne fournissent bien souvent 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) LP à partir d'une fraction de LP la contenant et préalablement isolée par ultracentrifugation de flottation.

C - ESTIMATION SEMI - QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES  
DE BASSE ET TRES BASSE DENSITES

---

APPLICATION AU BILAN LIPIDIQUE

---

## 1 - INTRODUCTION

Nous décrivons dans ce travail (101) une technique simple et reproductible d'appréciation quantitative des LP de basse et très basse densités, très intéressantes à considérer en pathologie.

Elle comporte deux tests turbidimétriques décrits par BURSTEIN et coll. ( 65, 68) : le test à l'héparine-calcium qui apprécie l'ensemble (LDL + VLDL + chylomicrons), et le test au dodécyl-sulfate de sodium (SDS) qui apprécie l'ensemble VLDL + chylomicrons.

## 2 - 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

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 LP 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 21, page 162.

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

La différence  $T_2 - T_1$  apprécie la teneur en LP 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 (69).

### 3 - RESULTATS

#### a) Etude de la fiabilité des turbidimètres

Afin d'apprécier la fiabilité des turbidimètres, 120 tests sont réalisés sur six appareils différents.

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.

TABLEAU 21

## ESTIMATION TURBIDIMETRIQUE DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Héparine-Ca : LDL - VLDL - chylomicrons

SDS : VLDL - chylomicrons

| TEST                                       | HEPARINE-Ca                                               | S D S                                                              |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Réactif I                                  | 2 ml                                                      | -                                                                  |
| Réactif II                                 | -                                                         | 1,5 ml                                                             |
| Sérum                                      | 0,2 ml                                                    | 0,5 ml                                                             |
| -----                                      |                                                           |                                                                    |
| Mélange, lecture $\longrightarrow T_1$ (°) |                                                           |                                                                    |
| -----                                      |                                                           |                                                                    |
| Réactif III                                | 40 $\mu$ l                                                | -                                                                  |
| Réactif IV                                 | -                                                         | 50 $\mu$ l                                                         |
| -----                                      |                                                           |                                                                    |
|                                            | Mélange, lecture<br>après 4 min.<br>$\longrightarrow T_2$ | Mélange, lecture<br>après 1h. au B.M.37°C<br>$\longrightarrow T_2$ |
| Calculer                                   | $T_2 - T_1$                                               | $T_2 - T_1$                                                        |



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

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 normolipémiques, 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<br>*** : Différences non significatives entre les 6 appareils |                             |        |                       |

b) Etude de la répétabilité des méthodes

En effectuant 30 déterminations sur des sérums normaux ou pathologiques, 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<br>(USH) | Ecart-type<br>(USH) | C.V.<br>(%) |
|------------------------------|------------------|---------------------|-------------|
| Test à l'héparine<br>calcium | 17               | 0,16                | 0,9         |
|                              | 35               | 0,21                | 0,6         |
| Test au SDS                  | 11,3             | 0,27                | 2,4         |
|                              | 30,7             | 0,3                 | 1           |

c) Correspondance entre les turbidités mesurées et les quantités correspondantes de lipoprotéines

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 22, page 165 et la Figure 23, page 166 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 23, page 168. Les résultats obtenus figurent sur le Tableau 24, page 169 ; ils permettent de conclure que la différence (héparine-calcium - SDS) est assimilable à un indice représentatif des concentrations sériques en LDL.

Pour confirmer ces résultats, nous montrons, à partir de 47 sérums normo et hypercholestérolémiques de tous types (Tableau 22, page 165 et Figure 24, page 167) 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 LP selon la méthode de WILSON (388), et dosage du cholestérol (140) (appendice technique, page 256).

TABLEAU 22.

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

|                                      | INDICE VLDL<br>(143 valeurs :<br>Fig.23 ) | INDICE LDL<br>(47 valeurs :<br>Fig.24 ) |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 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)        |                                         |
| $y_1$ : triglycérides totaux (g/l)   | $y_2$ : cholestérol LDL (g/l)             |                                         |

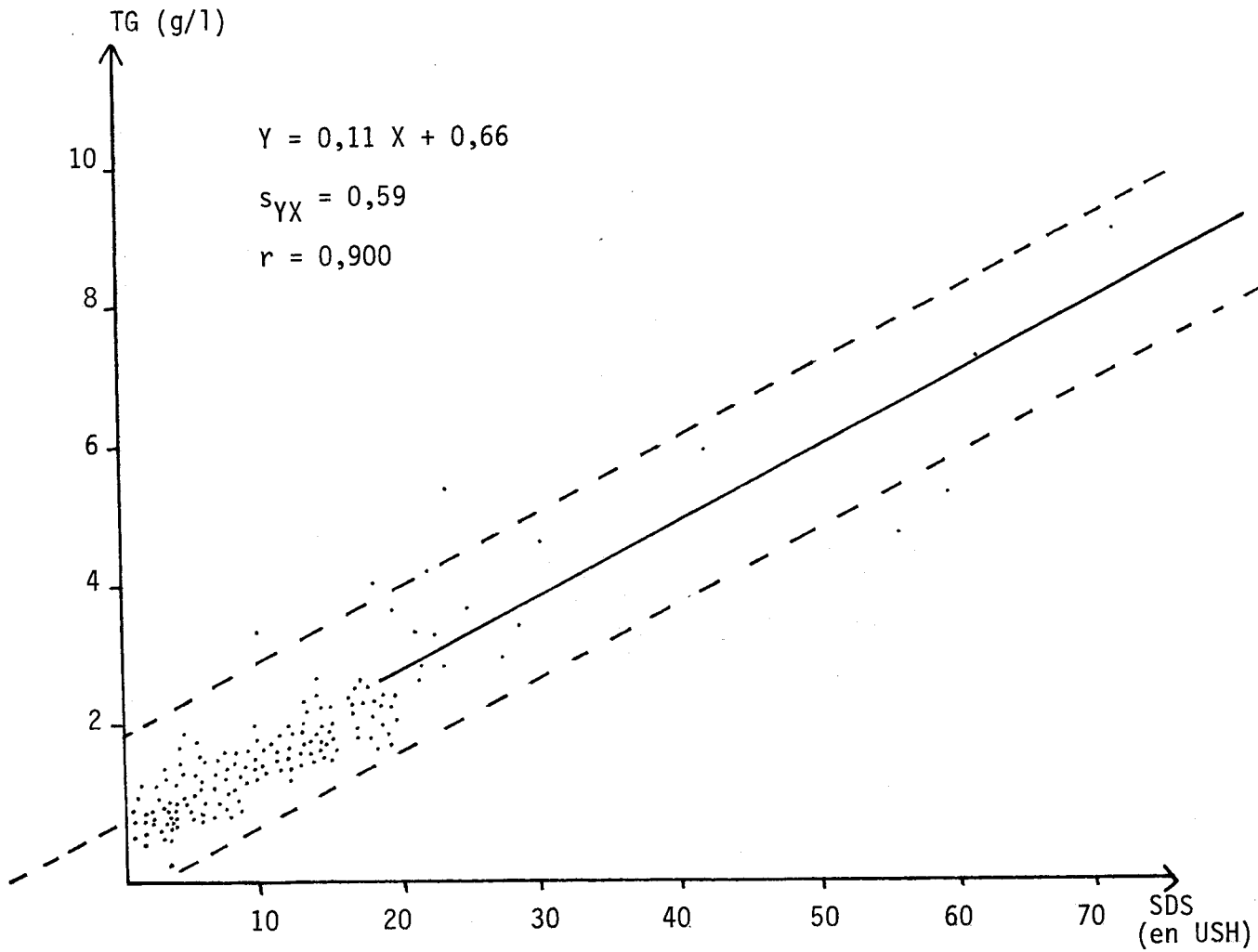


Figure 23

VALEURS SDS MESUREES ET TAUX DE TRIGLYCERIDES TOTAUX

(Régression de Y en X)



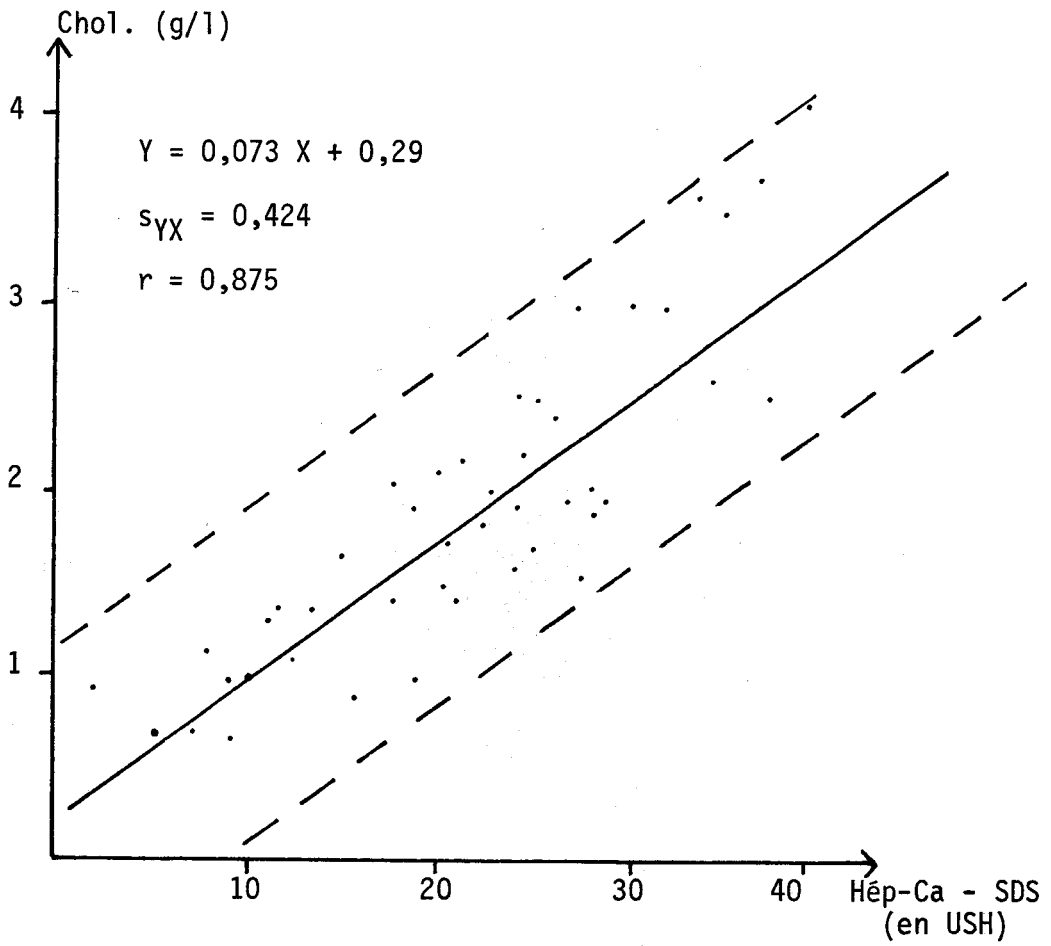


Figure 24

VALEURS HEP.Ca-SDS CALCULEES  
ET TAUX DE CHOLESTEROL DES LDL  
(Régression de Y en X)



TABLEAU 23

PROTOCOLE D'ETUDE D'UN INDICE LDL

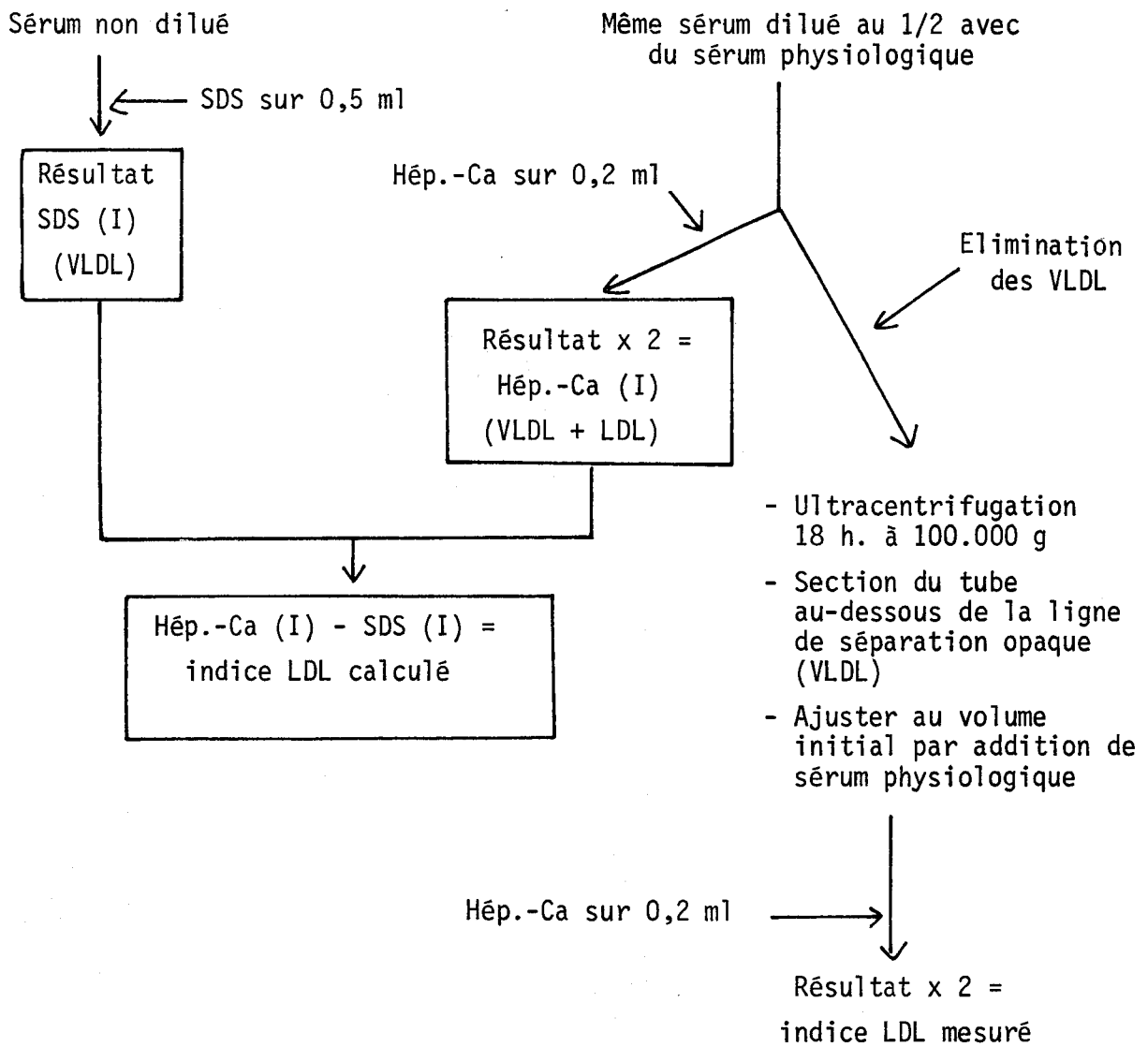




TABLEAU 24

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                 | p  |
| (I) <u>Sérum non traité</u>       |    |    |    |    |    |            |                   |    |
| • Héparine - Ca                   | 19 | 21 | 22 | 22 | 19 |            |                   |    |
| • S D S                           | 10 | 11 | 9  | 11 | 7  |            |                   |    |
| • Indice LDL<br>(Hépar.-Ca - SDS) | 9  | 10 | 13 | 11 | 12 | 11 ± 1,6   |                   |    |
| (II) <u>Sérum sans VLDL (°°)</u>  |    |    |    |    |    |            | 0,88              | NS |
| • Indice LDL<br>(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.



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 25 et 26, pages 171 et 172).

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 hyperlipoprotéïnémies

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

Dans ce but, le dosage couplé du cholestérol et des triglycérides, indispensable pour typer une hyperlipémie, s'avère onéreux. 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 LP de basse et très basse densités. Elle présente l'avantage de quantifier non plus les lipides qui sont répartis dans toutes les classes de LP, mais les LP 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 hyperlipoprotéïnémies

Lorsque l'hyperlipidémie est dépistée, le "Lipidotest" en fournit un typage simplifié.

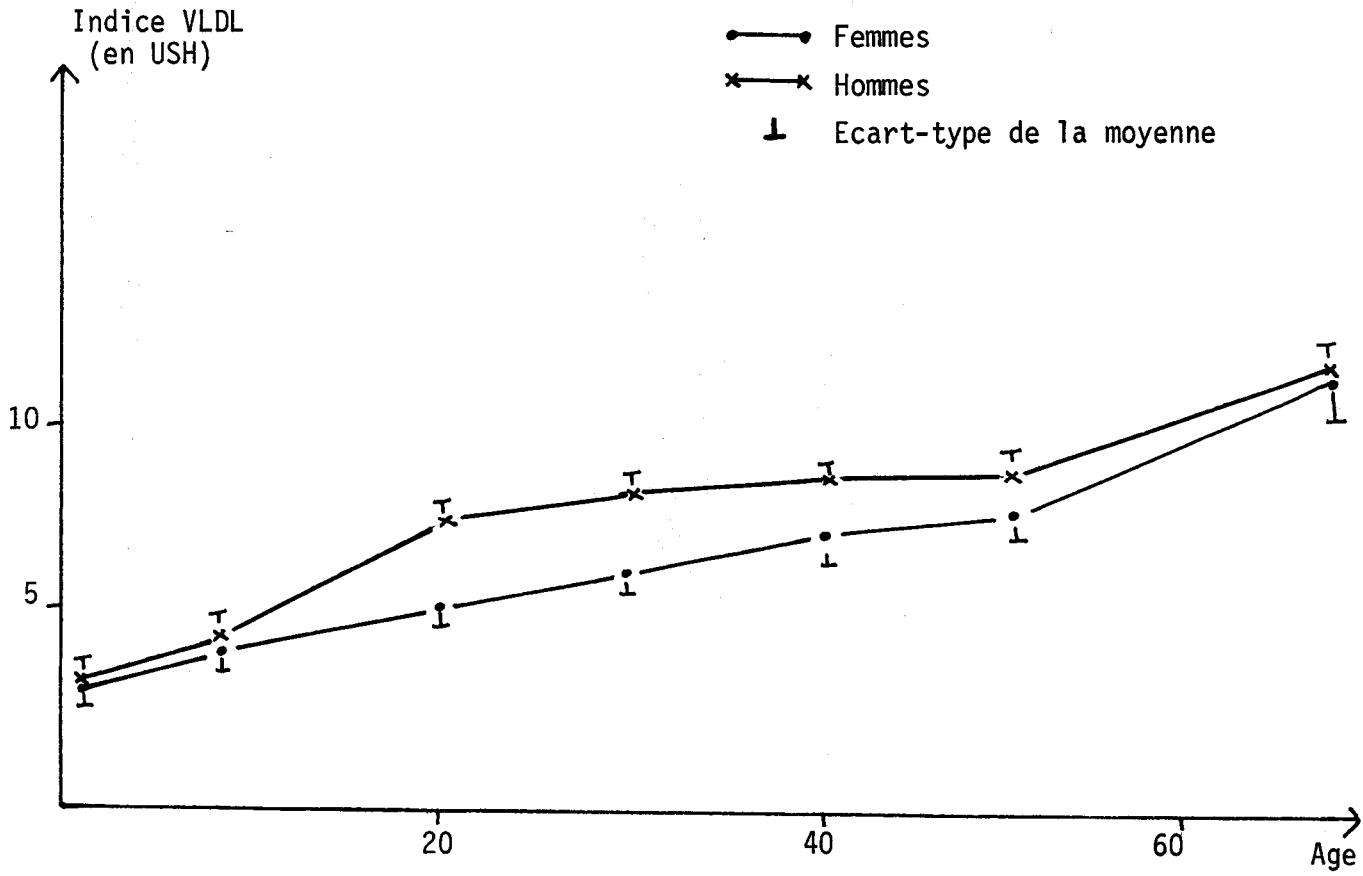


Figure 25

VALEURS MOYENNES DE REFERENCE DE L'INDICE VLDL  
SELON L'AGE ET LE SEXE



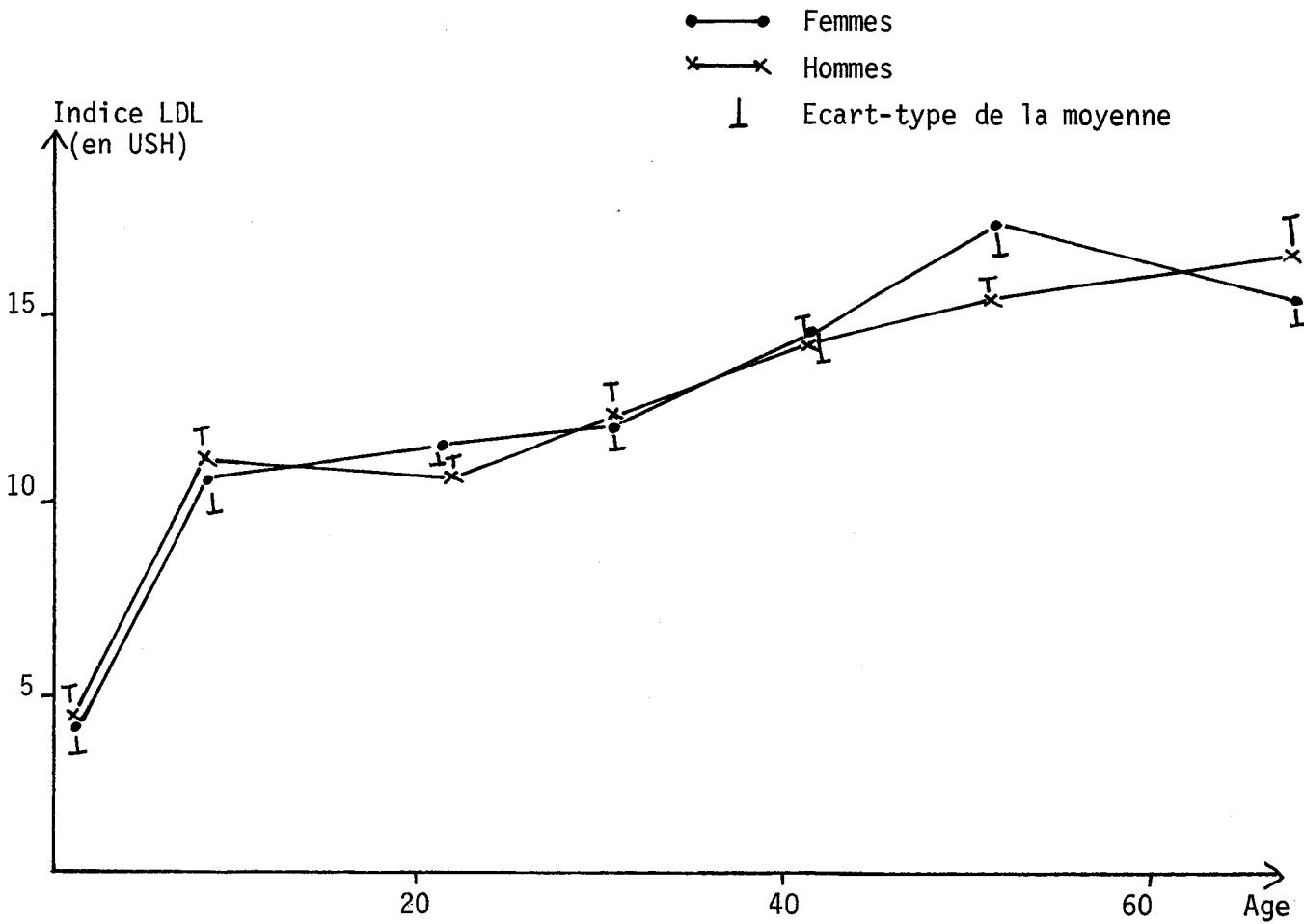


Figure 26

VALEURS MOYENNES DE REFERENCE DE L'INDICE LDL  
SELON L'AGE ET LE SEXE



A l'aide de méthodes de référence concernant les dosages des triglycérides et du cholestérol et le lipidogramme sur gel de polyacrylamide, 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'hyperlipoprotéïnémie (Figure 27 , page 174).

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

Toute augmentation isolée de l'indice LDL traduit une hyperbêta-lipoprotéïnémie (type II<sub>A</sub>).

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

L'accroissement simultané des deux indices traduit une hyperlipoprotéïnémie mixte (type II<sub>B</sub>).

Les hyperlipidémies 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 LP 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.

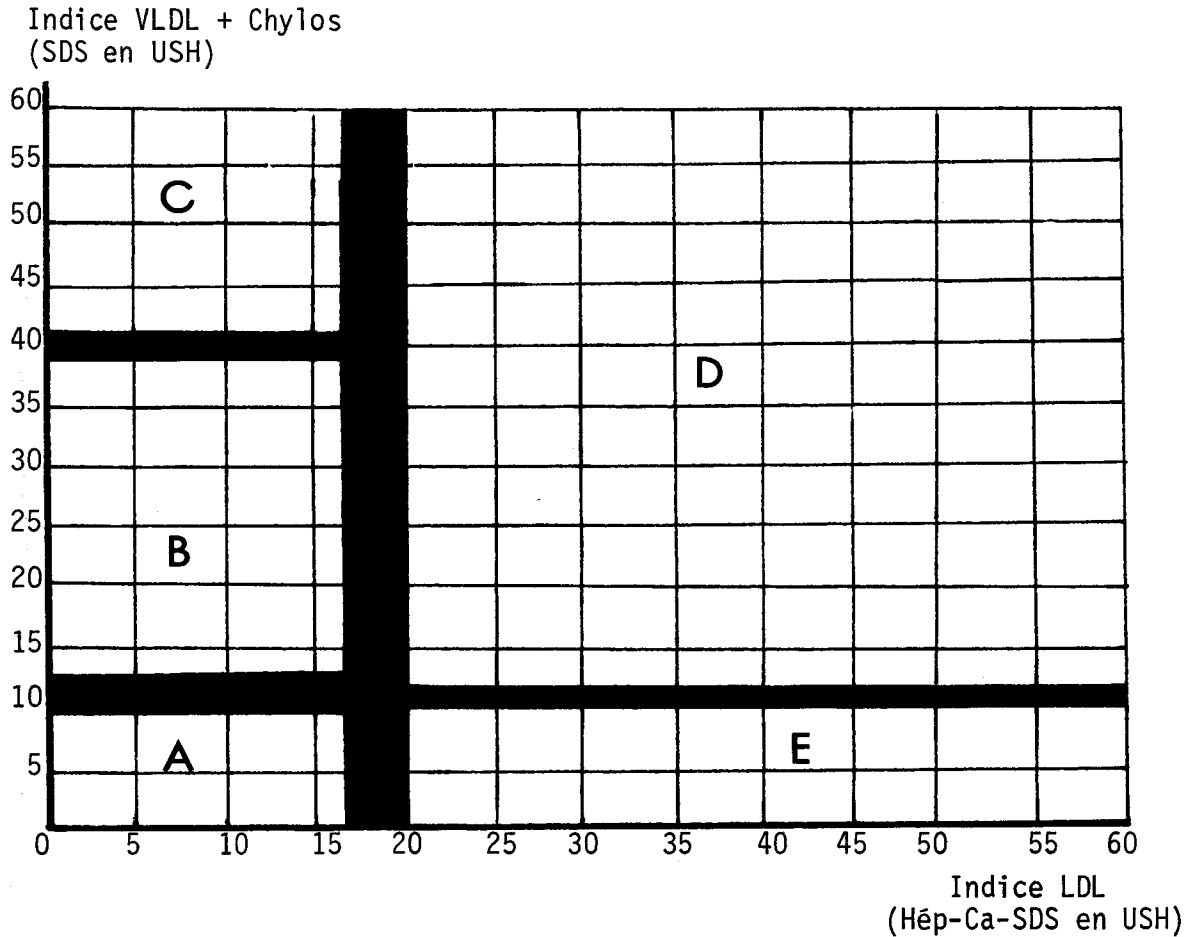
Enfin, les sérums normaux contenant une forte quantité de Lp(a) qui est précipitable par l'héparine-calcium mais pas par le SDS, se localisent en général entre la zone de normolipoprotéïnémie et celle de l'hyperbêta-lipoprotéïnémie.

Le typage simplifié ainsi obtenu n'a qu'une valeur d'orientation. Il nous permet néanmoins de distinguer l'hypertriglycémie majeure (type IV), l'hypercholestérolémie essentielle (type II<sub>A</sub>) et l'hyperlipidémie mixte (type II<sub>B</sub>).

Cette distinction, selon De GENNES ( 96 ), 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.



CORRESPONDANCE DES ZONES

- A : Sujet normolipoprotéïnémique
- B : Sujet porteur d'une hyperpré- $\beta$  LP ( $\uparrow$  des VLDL)  
Hyperlipémie assimilée au type IV de la classification internationale.
- C : Sujet porteur d'une hyperpré- $\beta$  LP ( $\uparrow$  des VLDL) avec chylomicronémie.  
Hyperlipémie assimilée au type V.
- D : Sujet porteur d'une hyperpré- $\beta$  LP ( $\uparrow$  des VLDL) et d'une hyper- $\beta$  LP ( $\uparrow$  des LDL).  
Hyperlipémie assimilée au type II<sub>b</sub>.
- E : Sujet porteur d'une hyper- $\beta$  LP ( $\uparrow$  des LDL).  
Hyperlipémie assimilée au type II<sub>a</sub>.

Figure 27

INDICES TURBIDIMETRIQUES ET TYPAGE SIMPLIFIE DES HYPERLIPEMIES



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 LP 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.

#### 4 - CONCLUSION

Jusqu'à présent, l'application des tests de précipitation sélective des LP était limitée par le fait que la mesure de l'intensité de la floculation des LP 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 et, lorsque le typage est établi, l'estimation turbidimétrique des LP de basse et très basse densités peut être utilisée comme test de surveillance.

D- DOSAGE DES APO B ET A-I CHEZ L'HOMME

APPLICATION À UNE POPULATION DE 477 SUJETS EN RELATION AVEC  
LE TAUX DES LIPIDES CIRCULANTS.

-----  
INFLUENCE DU SEXE, DE L'ÂGE, DE L'INDEX PONDÉRAL, DE LA  
CONSOMMATION D'ALCOOL, DU TABAC, ET DES CONTRACEPTIFS.



1- INTRODUCTION -

Les apoprotéines jouent un rôle majeur dans le métabolisme des LP ; de plus, pour des raisons pratiques, la seule façon de déterminer les concentrations en familles de LP est de doser leurs apoprotéines correspondantes.

L'Apo B est l'apoprotéine majeure des LP de basse et très basse densités, et l'Apo A-I caractérise essentiellement les LP de haute densité. Connaissant maintenant, grâce à de nombreuses études épidémiologiques, d'une part l'importance de ces deux groupes de LP dans le développement de l'athérosclérose, le premier et le second étant respectivement athérogène et anti-athérogène, et d'autre part le rôle fondamental joué par les HDL dans le processus lipolytique, il était devenu indispensable de pouvoir les quantifier facilement chez l'homme. Dans ce but, de nombreuses méthodes de dosage des apoprotéines, et plus particulièrement des Apo B et A-I ont été décrites. Nous en avons présenté une revue générale, indiquant pour chacune d'entre elles leurs avantages et inconvénients. La radioimmunologie semble offrir la plus grande sensibilité mais impose de sévères exigences sur le plan de l'équipement des laboratoires et celui des précautions à prendre lors des manipulations d'isotopes.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la mise au point de nouvelles méthodes de dosage des Apo B et A-I, et décrivons dans un premier temps le dosage de l'Apo B par une méthode immunoenzymologique et celui des Apo B et A-I par une méthode immunonéphélométrique. Ces dosages sont effectués dans des sérums normaux et hyperlipémiques provenant de la Consultation des Maladies Métaboliques de la Clinique Médicale Générale A (Professeur JAILLARD, Cité Hospitalière, Lille). Les échantillons de sang sont prélevés après 12 heures de jeûne et recueillis sur EDTA. Dans un deuxième temps, nous avons appliqué ces techniques et dosé les Apo B et A-I en relation avec les lipides circulants (triglycérides, cholestérol (VLDL+LDL) et cholestérol-(HDL)) dans des échantillons de 206 hommes et 271 femmes provenant d'une population présumée saine. Sur ces mêmes prélèvements, nous avons en outre examiné le rôle de certains facteurs susceptibles de déterminer des variations significatives des différents paramètres, et plus particulièrement l'influence de la surcharge pondérale, du tabac, de l'alcool et des contraceptifs sur les taux de HDL.

2- DOSAGE DE L'APO B PAR IMMUNOENZYMOLOGIE ( 74 , 141) -

---

1°) Principe de la méthode -

La substance à doser est un antigène (Apo B du sérum humain) et nous avons appliqué une méthode compétitive en milieu hétérogène dans laquelle, dans un premier temps, l'antigène purifié (Apo B pure) est insolubilisé par adsorption sur un tube de polystyrène (13 x 75 mm, Biomat, Hazebrouck, France). Après plusieurs lavages permettant d'éliminer l'excès d'antigène, on ajoute dans un deuxième temps l'antigène à doser (sérum contenant l'Apo B) et un immunosérum de lapin anti-Apo B humaines. Il y a donc compétition entre les antigènes fixés et solubles vis-à-vis des sites de fixation des anticorps. De nouveaux lavages éliminent les complexes antigène-anticorps en solution, puis, dans un troisième temps, on révèle les anticorps fixés à l'antigène lié par l'addition du conjugué, antisérum de mouton anti-immunoglobulines de lapin marqué à la peroxydase (Institut Pasteur Productions, Paris). Après avoir éliminé le conjugué en excès par plusieurs lavages successifs, l'activité peroxydasique fixée est mesurée dans les tubes. Ces différentes étapes sont représentées sur la figure 28 , page 178 .

2°) Matériel et méthodes -

a) Préparation du standard d'étalonnage -

Comme la majorité des auteurs, nous utilisons pour établir la courbe d'étalonnage, une sous-fraction de LDL (LP-B) de densité comprise entre 1,040 et 1,053 g/ml, cette fraction ne contenant que de l'Apo B à l'exclusion de toute autre protéine (106).

Cet isolement est réalisé à partir de sérums provenant de donneurs sains par ultracentrifugation préparative avec ajustement intermédiaire des densités par addition d'une solution saline à base de NaCl et KBr (170). La fraction LP-B est ensuite dialysée contre du sérum physiologique, puis sa pureté est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (322) et par immunoelectrophorèse en double dimension contre un immunosérum total (88). Sa concentration est enfin déterminée par un dosage des protéines selon la méthode de LOWRY (226) (appendice technique, page 241) et nous utilisons de la sérumalbumine humaine comme standard d'étalonnage. Afin de tenir compte des différences de composition en acides aminés des deux protéines, un facteur correctif de chromogénéicité de 0,9 est appliqué aux valeurs obtenues (93).

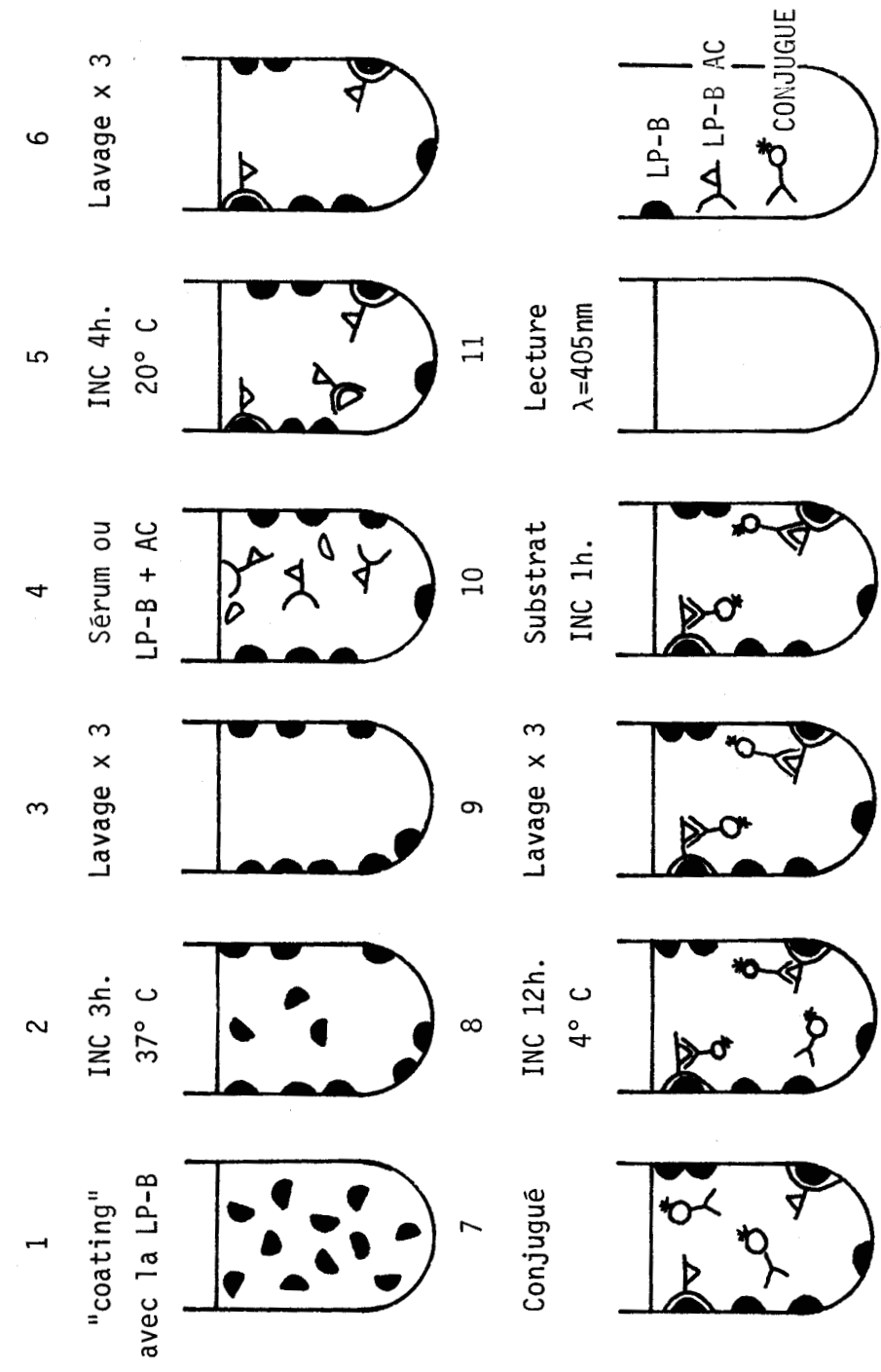


Figure 28

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE DE DOSAGE IMMUNOENZYMologique DE L'APO B

INS  
LILLE

b) Préparation de l'immunsérum -

L'immunsérum spécifique anti-Apo B humaines est obtenu chez le lapin selon la méthode de VAITUKAITIS et coll. (370), par injection intradermique en 20 points différents sur le dos rasé de l'animal d'environ 1,5 mg de LP-B préparée comme précédemment et émulsifiée avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund.

Les prélèvements de sang sont effectués à l'oreille ; la première saignée est pratiquée trois semaines après l'immunisation, les autres sont faites à 15 jours d'intervalle. Une injection de rappel a lieu toutes les six semaines, et la poursuite de l'immunisation est relativement longue (8-10 mois). Dans tous les cas, le sérum, recueilli après centrifugation, est préservé de toute contamination microbienne par addition d'azoture de sodium à 1% (p/v) puis gardé à -20°C. La spécificité de l'immunsérum est testée par immunoélectrophorèse en double dimension et on utilise comme antigène un sérum humain total.

c) Dosage enzymologique de l'Apo B -

Le "coating" des tubes dans lesquels sont effectués les dosages est obtenu par addition dans chacun d'entre-eux de 1 ml d'une solution de LP-B pure dans un tampon phosphate de sodium (PBS) 0,01M pH 7,2 contenant 0,02 % (p/v) d'azoture de sodium. Les tubes sont incubés au bain-marie à 37°C pendant 3 heures, puis vidés complètement par simple aspiration à la pipette Pasteur. Ainsi "coatés", ils se conservent au maximum une semaine à 4°C.

Immédiatement avant le dosage, les tubes sont lavés : on les remplit et on les vide successivement trois fois avec le même tampon PBS que précédemment et contenant 0,05 % (p/v) de Tween 20.

Les sérums ou les étalons à doser sont ensuite ajoutés en même temps que l'immunsérum anti-Apo B ; chacune de ces solutions est introduite sous un volume de 0,5 ml après avoir été convenablement diluée dans le tampon PBS + Tween. Après une seconde incubation de 4 heures, à température ambiante puis trois lavages successifs, on incorpore 1 ml de conjugué dilué dans le tampon PBS + Tween. Les tubes sont à nouveau incubés (une nuit à 4°C) et lavés. On mesure enfin en dernier lieu dans chacun d'entre-eux l'activité peroxydasique fixée par une méthode colorimétrique utilisant l'eau oxygénée comme substrat et l'orthodiansidine comme donneur d'hydrogène (appendice technique, page 267). La réaction se développe à température ambiante et au bout d'une heure, elle est stoppée par addition d'une goutte de HCl 5N. La coloration jaune obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm.

d) Autres méthodes -

Les résultats sont comparés à ceux obtenus par deux techniques de référence, l'électroimmunodiffusion et l'immunodiffusion radiale, selon une adaptation des méthodes originales décrites respectivement par LAURELL ( 214) et MANCINI et coll. (236) (appendice technique, pages 277 et 276 ). Le cholestérol et les triglycérides des sérums analysés sont dosés par des techniques enzymatiques à l'autoanalyseur Technicon (appendice technique, page 259 ) (294).

3°) Résultats -

a) Pureté de la LP-B et spécificité de l'immunsérum anti-Apo B -

La fraction LP-B préparée par ultracentrifugation ne donne qu'une seule bande par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Après migration d'un sérum total en seconde dimension dans un gel d'agarose contenant l'immunsérum à tester, il y a développement d'un seul pic de précipitation indiquant de ce fait la sélection d'un seul anticorps.

b) Conditions expérimentales -

- Détermination de la concentration optimale de LP-B à "coater" par tube -

La fixation de la LP-B sur les tubes de polystyrène est très bonne, et la réaction immunoenzymologique est réalisée sur plusieurs séries de tubes "coatés" avec différentes concentrations de LP-B, les autres paramètres étant invariables. Les absorbances mesurées au spectrophotomètre pour chaque série sont alors reportées sur une courbe en fonction de la concentration d'antigène "coaté" correspondante, et on détermine ainsi une concentration optimale soit 1 µg d'Apo B par ml (figure 28(a), page 182 ).

- Détermination de la dilution optimale de l'immunsérum anti-Apo B -

1 ml de différentes dilutions d'immunsérum sont incubés avec une quantité fixe de LP-B ( 1 µg/ml) "coâtée" sur des tubes, on effectue le dosage et on reporte sur une courbe les absorbances des concentrations d'anticorps (figure 29(b), page 182) :

\* l'absorbance est maximale pour des dilutions d'immunsérum inférieures à 1/500 ;

\* pour des dilutions inférieures à 1/20 000 ou en absence d'immunsérum,

l'absorbance est très faible et correspond à une adsorption non spécifique des anticorps sur les tubes.

La sensibilité optimale de l'essai est obtenue pour la plus forte dilution donnant l'absorbance la plus élevée, et en général, la préparation de l'immunsérum étant toujours effectuée dans les mêmes conditions, cette dilution est de 1/1000.

- Détermination de la dilution optimale du conjugué -

Les dosages sont réalisés dans des tubes "coatés" avec 1 µg/ml de LP-B, en présence de 1 ml d'immunsérum dilué au 1/1000 et de différentes concentrations du conjugué. La concentration optimale donnant les plus fortes absorbances est de 500 ng/ml.

c) Courbe d'étalonnage -

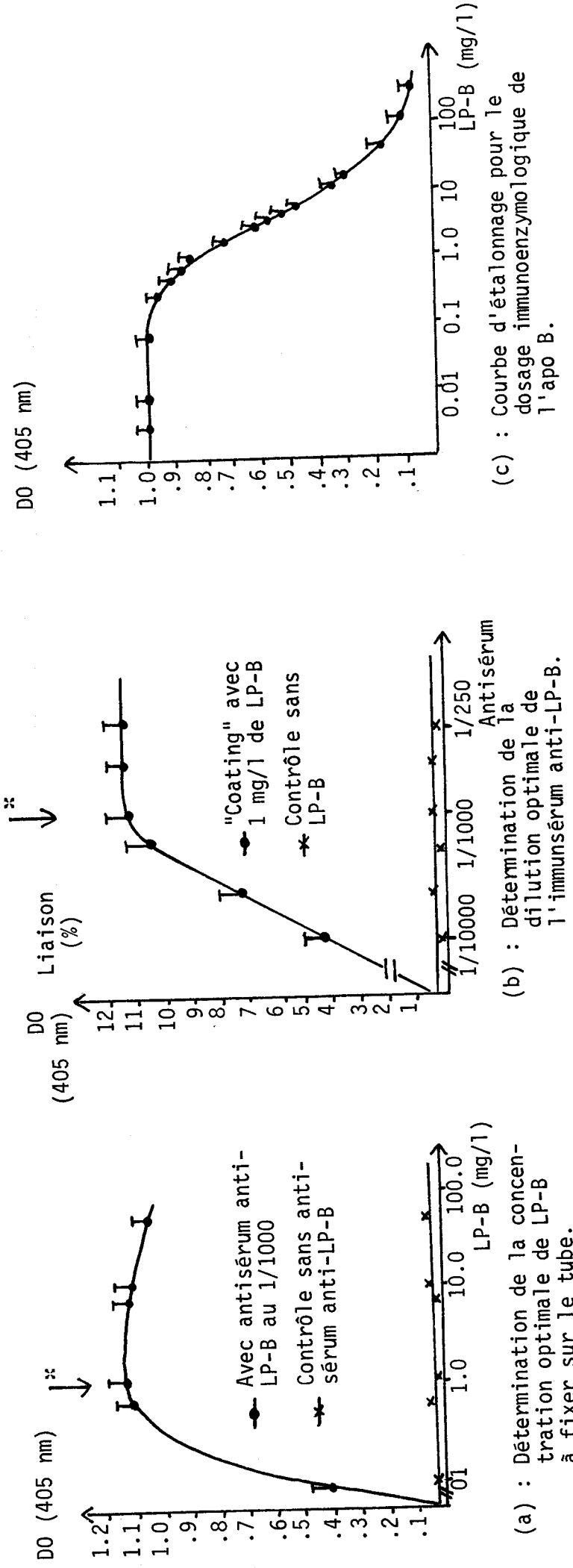
La courbe d'étalonnage est obtenue en introduisant différentes concentrations de LP-B pure dans des tubes "coatés" et en effectuant les dosages dans les conditions opératoires précédemment définies.

Comme le montre la figure 29(c), page 182, plus la quantité d'Apo B ajoutée est importante, plus il y a de complexes formés en solution. De ce fait, la fixation des anticorps anti-Apo B à la phase solide est diminuée, ce qui entraîne une baisse progressive de la coloration lors de la révélation de l'activité peroxydasique fixée. Une bonne linéarité de la courbe est obtenue pour des concentrations d'Apo B comprises entre 1 et 15 µg/ml.

d) Sensibilité et précision de la méthode -

La quantité minimale d'Apo B que l'on peut détecter est faible (1/µg), et le dosage de l'Apo B par enzymoimmunologie chez l'homme nécessite une dilution des sérums normaux et hyperlipidémiques respectivement au 1/200 et 1/400., l'hyperlipidémie se traduisant par une cholestérolémie supérieure à 2,80 g/l ou une triglycéridémie supérieure à 1,50 g/l.

La reproductibilité de la méthode a été calculée en effectuant 20 fois le dosage de 56 sérums contenant entre 0,14 et 3,94 g d'Apo B/l ; le coefficient de variation obtenu est de 4,5 %. La reproductibilité jour après jour est obtenue en analysant 2 sérums, respectivement faible (0,62 g/l) et fort (1,67 g/l) en Apo B, 1 fois par jour, pendant 20 jours, les coefficients de variation respectifs sont de 10,8 et 8,9 %.



- : Moyenne de 8 analyses
- ⊥ : Standard de déviation
- ⋆ : La flèche indique les conditions optimales retenues pour effectuer les dosages.

Figure 29

CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LE DOSAGE IMMUNOENZYMOLOGIQUE DE L'APO B



e) Exactitude de la méthode -

Quand on ajoute différentes quantités de LP-B pure à un sérum, le pourcentage moyen de recouvrement est de 98,3 %.

f) Comparaison avec les autres méthodes -

L'étude comparative est effectuée sur 56 sérums comprenant à la fois des sujets sains (27 sérums) et des sujets hyperlipoprotéïnémiques de types IIa, IIb, et IV (29 sérums).

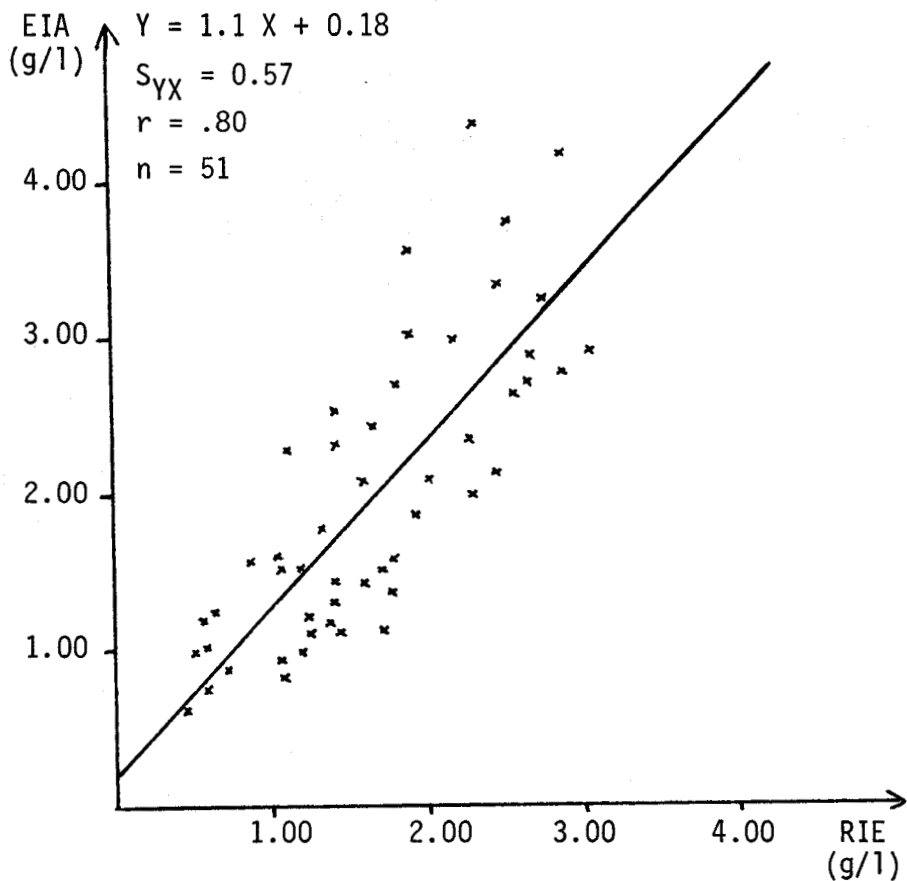
Les coefficients de corrélation obtenus entre la méthode néphélométrique d'une part et les méthodes immunoélectrophorétiques et d'immunodiffusion radiale d'autre part sont bons ( $r = 0,80$  et  $0,84$  respectivement), et les équations de droites de régression respectives ne mettent pas en évidence l'existence d'un biais additif (figure 30: A et B, page 184). Cependant, en moyenne, d'après le tableau 25 page 185, les concentrations en Apo B fournies par la méthode néphélométrique sont sensiblement plus élevées que celles obtenues par les autres méthodes. Ceci peut s'expliquer facilement par le fait que les sérums analysés rassemblaient des échantillons riches en VLDL dont on sait que la migration dans un gel d'agarose est très difficile.

4\*) Discussion -

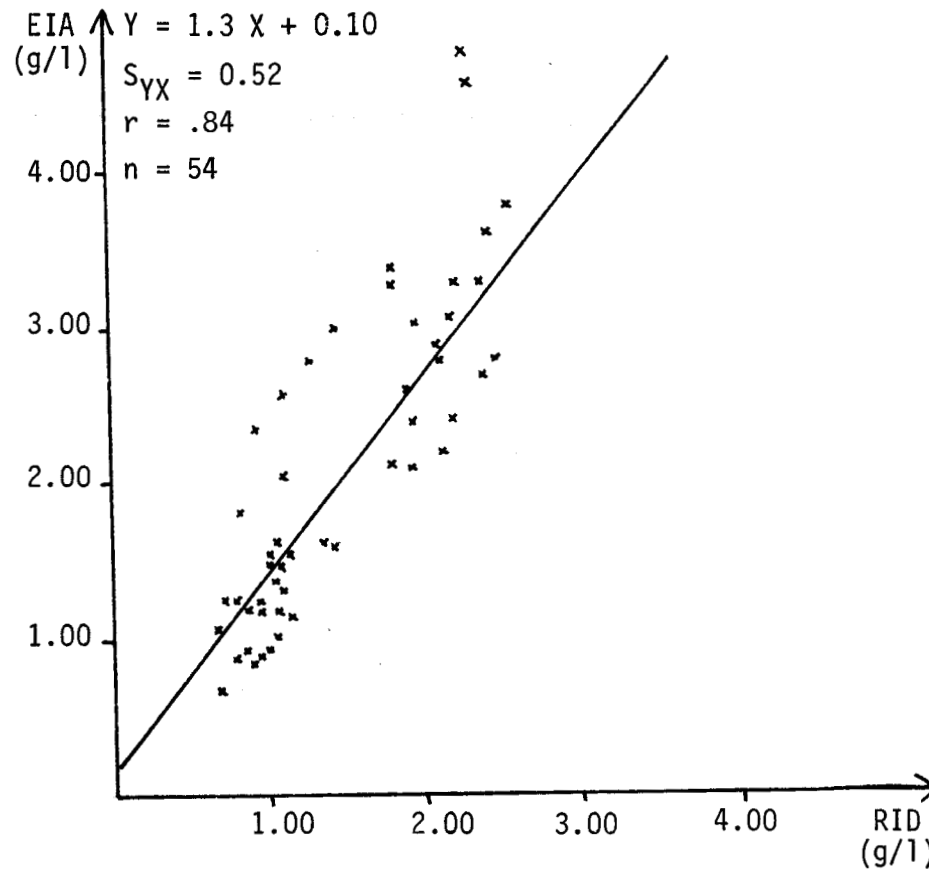
La méthode de dosage de l'Apo-B que nous décrivons est simple et facile à réaliser : comparée aux autres techniques les plus couramment employées, elle présente certains avantages, ne nécessitant aucun appareillage sophistiqué, utilisant des réactifs peu coûteux, stables et non radioactifs et pouvant enfin être appliquée à des sérums riches en LP de grande taille qui contiennent de l'Apo B en quantité non négligeable. Sa précision est très satisfaisante, comparable à celle obtenue par radioimmunologie ou électroimmunologie (106).

Elle offre une grande sensibilité, permettant de ce fait d'envisager facilement le dosage de l'Apo B dans des fractions lipoprotéiques, utile par exemple pour étudier sur un plan génétique certaines hyperlipoprotéïnémies (314). Toutes les manipulations sont effectuées dans le même tube, ce qui diminue considérablement le risque de pertes au cours des dosages ; de plus, la coloration se développant à partir de la phase solide, on évite ainsi de multiples interférences possibles dues en particulier à la présence de certains médicaments, d'hémoglobine ou de bilirubine.





A : Comparaison des taux d'apo B obtenus par la méthode immunoenzymologique (EIA) et l'électroimmuno-diffusion (RIE)



B : Comparaison des taux d'apo B obtenus par les méthodes immunoenzymologique (EIA) et d'immunodiffusion radiale (RID)

Figure 30

COMPARAISON DES TAUX D'APO B OBTENUS PAR LA METHODE IMMUNOENZYMOLOGIQUE ET DEUX AUTRES METHODES DE REFERENCE

TABLEAU 25

COMPARAISON STATISTIQUE DES RESULTATS OBTENUS POUR LE DOSAGE DE L'APO B  
 PAR LA METHODE IMMUNOENZYMOLOGIQUE (EIA) ET LES METHODES  
 D'ELECTROIMMUNODIFFUSION (RIE) ET D'IMMUNODIFFUSION RADIALE (RID)

|                                   | EIA<br>(Y) | RIE<br>(X) | EIA<br>(Y) | RID<br>(X') |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Moyenne $\pm$ Ecart-type<br>(g/l) | 2,04       | 1,70       | 2,04       | 1,49        |
| $a_0$                             | 0,18       |            | 0,10       |             |
| $a_1$                             | 1,10       |            | 1,30       |             |
| $S_{YX}, S_{YX'}$                 | 0,57       |            | 0,52       |             |
| r                                 | 0,80       |            | 0,84       |             |
| n                                 | 56         |            | 56         |             |

EIA : Essai immunoenzymologique

RIE : Electroimmunodiffusion

RID : Immunodiffusion radiale

$a_0$  : Ordonnée à l'origine de la droite de régression (Y, X)

$a_1$  : Pente de la droite de régression (Y, X)

$S_{YX}$  : Ecart-type de la droite de régression

r : Coefficient de corrélation

n : Nombre d'échantillons étudiés

Il est indispensable pour ces dosages d'utiliser des anticorps ayant de fortes constantes d'affinité, et formant avec les antigènes des complexes les plus stables possibles ; c'est pourquoi les temps d'immunisation des lapins sont très longs (8-10 mois).

Enfin, malgré les nombreux intérêts de la technique, il existe un inconvénient majeur causé par l'instabilité des tubes "coatés" avec la LP-B. Il faut donc préparer l'antigène pur de façon répétée, et faire une fixation extemporanée sur les tubes de polystyrène.

Il aurait alors été préférable de développer une méthode immunoenzymologique non compétitive dite "méthode sandwich" dans laquelle dans un premier temps l'antigène est extrait du milieu biologique avec un anticorps insolubilisé ; puis dans un second temps, par addition d'un second anticorps marqué spécifique de l'antigène à doser, on réalise la formation d'un triple complexe (anticorps-antigène-anticorps + enzyme), que l'on quantifie par la mesure de l'activité enzymatique fixée.

Quelques remarques relatives à ce principe peuvent être faites :

- \* à condition que le second anticorps marqué solubilisé soit purifié, l'anticorps insolubilisé mis en présence de la solution antigénique dans la première étape ne doit pas obligatoirement l'être, et on peut partir plus simplement d'une fraction enrichie en anticorps (immunsérum dont on précipite les  $\beta$ -globulines),
- \* les anticorps purifiés ou insolubilisés se conservent congelés,
- \* l'utilisation d'antigènes purifiés n'intervient qu'une seule fois pour établir la courbe d'étalonnage servant à doser un sérum étalon secondaire employé par la suite pour les dosages.

Cette méthode nous aurait permis ainsi d'éviter les isolements fréquents de LP-B et de pouvoir stocker au congélateur le matériel nécessaire à la réaction. Les  $\beta$ -globulines ont été précipitées par du sulfate de sodium à partir de l'immunsérum anti-Apo B, puis insolubilisées soit par simple adsorption sur des tubes en polystyrène, soit par covalence sur de la cellulose activée par du bromure de cyanogène (appendice technique page 269).

Les anticorps anti-Apo B purifiés ont été préparés à l'aide d'un immunoabsorbant (385) (appendice technique page 271) et marqués à la glucose-oxydase (248) (appendice technique page 274).

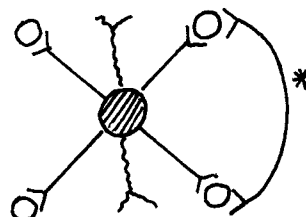
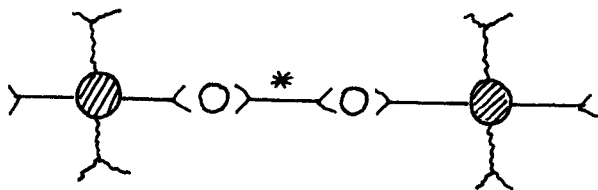
29 sérums ont ainsi été dosés avec les 2 types de support solide et les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis par l'électroimmunodiffusion d'une part et la méthode immunoenzymologique compétitive d'autre part.




Le coefficient de corrélation calculé entre la méthode non compétitive utilisant des anticorps insolubilisés sur plastique et les deux méthodes de référence est mauvais et les taux moyens obtenus sont nettement différents. Par contre, entre la méthode non compétitive utilisant des anticorps insolubilisés sur cellulose et les deux méthodes de référence, la corrélation est excellente, mais les taux moyens obtenus par la première technique sont deux fois trop faibles et les équations des droites de régression mettent en évidence l'existence d'un biais très important.



Cette sous-estimation est difficilement explicable et on peut supposer que lors de la fixation des anticorps sur la cellulose, deux molécules de ceux-ci peuvent l'être par grain de polymère. Dans ce cas, l'un des deux phénomènes représentés par les schémas ci-dessous, ou les deux phénomènes à la fois, peuvent se produire, et il s'agirait alors peut-être d'un problème de nombre de sites de fixation.

- 1ère possibilité -

- 2ème possibilité -



-  grain de cellulose
-  anticorps spécifique
-  molécule non spécifique

-  antigène
-  anticorps marqué à la glucose-oxydase.

Les difficultés que nous éprouvions quant à la mise au point de la méthode "sandwich" pour le dosage de l'Apo B, et l'inconvénient majeur de l'instabilité de l'Apo B "coatée" par la méthode compétitive en milieu hétérogène nous ont amené à développer d'autres techniques plus facilement réalisables et avons appliqué l'immunonéphélométrie-laser tout d'abord pour le dosage de l'Apo B, puis pour celui de l'Apo A-I.

3- DOSAGE DES APO B ET A-I PAR IMMUNONEPHELEMETRIE - (133, 132)

1°) Principe de la méthode -

Le principe des méthodes de dosage immunonéphélométriques a déjà été décrit et nous avons alors précisé l'intérêt plus particulier de la néphélémétrie-laser (page 120).

Pour notre travail nous avons utilisé un néphélémètre-laser Hyland PDQ<sup>TM</sup> (Division Hyland Travenol Lab. Inc.) dans lequel l'angle de détection est de 3,8° et le détecteur un photomultiplicateur.

Les dosages consistent à incuber dans des tubes en borosilicate (10 x 75 mm) fournis avec l'appareil, les échantillons à doser (étalons et sérums) et l'immunsérum correspondant de l'apoprotéine à doser (Apo B ou Apo A-I), puis à mesurer l'intensité du trouble développé par la formation des immuns-complexes. Des valeurs sont affichées sur un écran digital. Elles correspondent à des valeurs de mesures répétitives pendant 15 secondes du pourcentage de dispersion relative de la lumière, et on note une moyenne.

2°) Dosage de l'Apo B - (133)

a) Matériel et méthodes -

- Préparation du standard d'étalonnage -

De la LP-B pure est utilisée comme standard afin d'établir une courbe d'étalonnage et de doser un sérum servant par la suite d'étalon secondaire (sérum standard lyophilisé Kontrollogen-1-Behringwerke Ag). La préparation de la LP-B est identique à celle décrite précédemment pour le dosage immunoenzymologique (page 177), et la fraction de densité comprise entre 1.040 et 1.053 g/ml est obtenue par ultracentrifugation séquentielle.

- Obtention de l'immunsérum anti-Apo B -

De même que pour la méthode immunoenzymologique, de la LP-B est injectée au lapin par voie intra-péritonéale et les immunsérums sont conservés à -20°C en présence d'azoture de sodium.

- Dosage de l'Apo B -

L'immunsérum anti-Apo B est dilué dans un tampon phosphate de sodium (PBS) (10 n moles/l, pH 7,2; NaCl 0,15 moles/l), avec ou sans polyéthylène-glycol

(PEG) à 40 % (p/v). Il est filtré sur un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,4 µm (Nucleopore Cooperation) afin d'éliminer les petites particules en suspension. Les sérums à doser et les étalons sont dilués dans du sérum physiologique préalablement filtré également. Les dosages sont effectués directement dans les tubes de mesure selon le tableau suivant :

|                                 | Blanc tube | Blanc anticorps | Blanc dosage | Dosage |
|---------------------------------|------------|-----------------|--------------|--------|
| sérum physiologique             | 1 ml       | -               | 1 ml         | -      |
| immunsérum dilué                | -          | 1 ml            | -            | 1 ml   |
| étalon LP-B ou<br>sérum à doser | -          | -               | 100 1        | 100 1  |

Les tubes sont recouverts de parafilm et leur contenu est mélangé par trois retournements successifs du portoir les supportant.

Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, on effectue les lectures. L'appareil est réglé avec une sensibilité 4 sur les "blanc tube", puis on mesure les quantités de lumière dispersée d'abord dans le tube "blanc anticorps, puis pour chaque dosage en mesurant à chaque fois au préalable son blanc correspondant. La soustraction du "blanc dosage" se fait automatiquement sur l'appareil et les valeurs lues sur l'écran digital sont proportionnelles à la concentration de l'Apo B.

- Autres méthodes -

Une étude comparative des résultats obtenus est réalisée par rapport à la méthode enzymoimmunologique selon le procédé original décrit précédemment(141) et par rapport à l'électroimmunodiffusion (214) (appendice technique page 277 ). Le cholestérol et les triglycérides des sérums analysés sont dosés par ailleurs sur autoanalyseur Technicon (294) (appendice technique page 259).

b) Résultats -

- Conditions opératoires -

\* linéarité -

La figure 31 page 192 montre que les pourcentages de dispersion relative de la lumière sont reliés de façon linéaire à des concentrations d'Apo B allant de 4 à 20 mg/l. Cette zone de linéarité est retenue pour nos essais.

\* Dilution optimale de l'immunsérum -

Nous recherchons la dilution d'immunsérum la plus forte donnant une linéarité correcte dans la zone de concentrations précédemment définie. Généralement la dilution adoptée pour notre travail est 1/75 (v/v). Ce rapport est confirmé pour chaque nouveau lot d'immunsérum.

\* Temps d'incubation -

La durée de l'incubation nécessaire pour que la réaction soit complète est déterminée en effectuant la lecture d'un dosage d'abord toutes les 5 minutes pendant 60 minutes, ensuite toutes les 10 minutes, et ceci pendant 90 minutes au total : On reporte enfin le pourcentage de dispersion optique en fonction de ce temps. D'après la figure 32, page 193, un temps optimal de 45 minutes est retenu pour nos dosages.

\* Présence de PEG -

Le PEG est couramment utilisé dans les méthodes néphélométriques de dosage des protéines sériques. Cependant, étant connu comme substance interagissant avec les LP sériques (68), son influence lors de nos dosages d'Apo B est étudiée en analysant 32 sérums à l'aide du même immunsérum dilué soit avec le tampon PBS seul, soit avec le tampon PBS + PEG. Nous effectuons en outre un dosage supplémentaire à l'aide d'une méthode de référence en l'occurrence l'électroimmunodiffusion.

Le tableau 26, page 191, montre que la corrélation est bonne entre les deux dosages néphélométriques ( $r = 0,967$ ) mais les concentrations trouvées en l'absence de PEG (3118 mg/l en moyenne) sont significativement ( $p < 0,001$ ) plus élevées (+ 11 % en moyenne) et très proches de celles que l'on obtient par la méthode de référence (3253 mg/l).

Toutes les expérimentations ultérieures sont donc effectuées en tampon PBS sans PEG.

TABLEAU 26

INFLUENCE DU POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) SUR LE DOSAGE  
DE L'APO B PAR IMMUNONEPHELEMETRIE-LASER

|                                   | Sans PEG<br>(Y) | Avec PEG<br>(X) |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Moyenne $\pm$ Ecart-type<br>(g/l) | 3,14 $\pm$ 1,17 | 2,80 $\pm$ 0,94 |
| $a_0$                             | 0,35            |                 |
| $a_1$                             | 0,78            |                 |
| $S_{YX}$                          | 242             |                 |
| r                                 | 0,967           |                 |
| n                                 | 32              |                 |

$a_0$  : Ordonnée à l'origine de la droite de régression  $Y = 0,87 X + 354$

$a_1$  : Pente de la droite de régression

$S_{YX}$  : Ecart-type de la droite de régression

r : Coefficient de corrélation

n : Nombre de cas étudiés





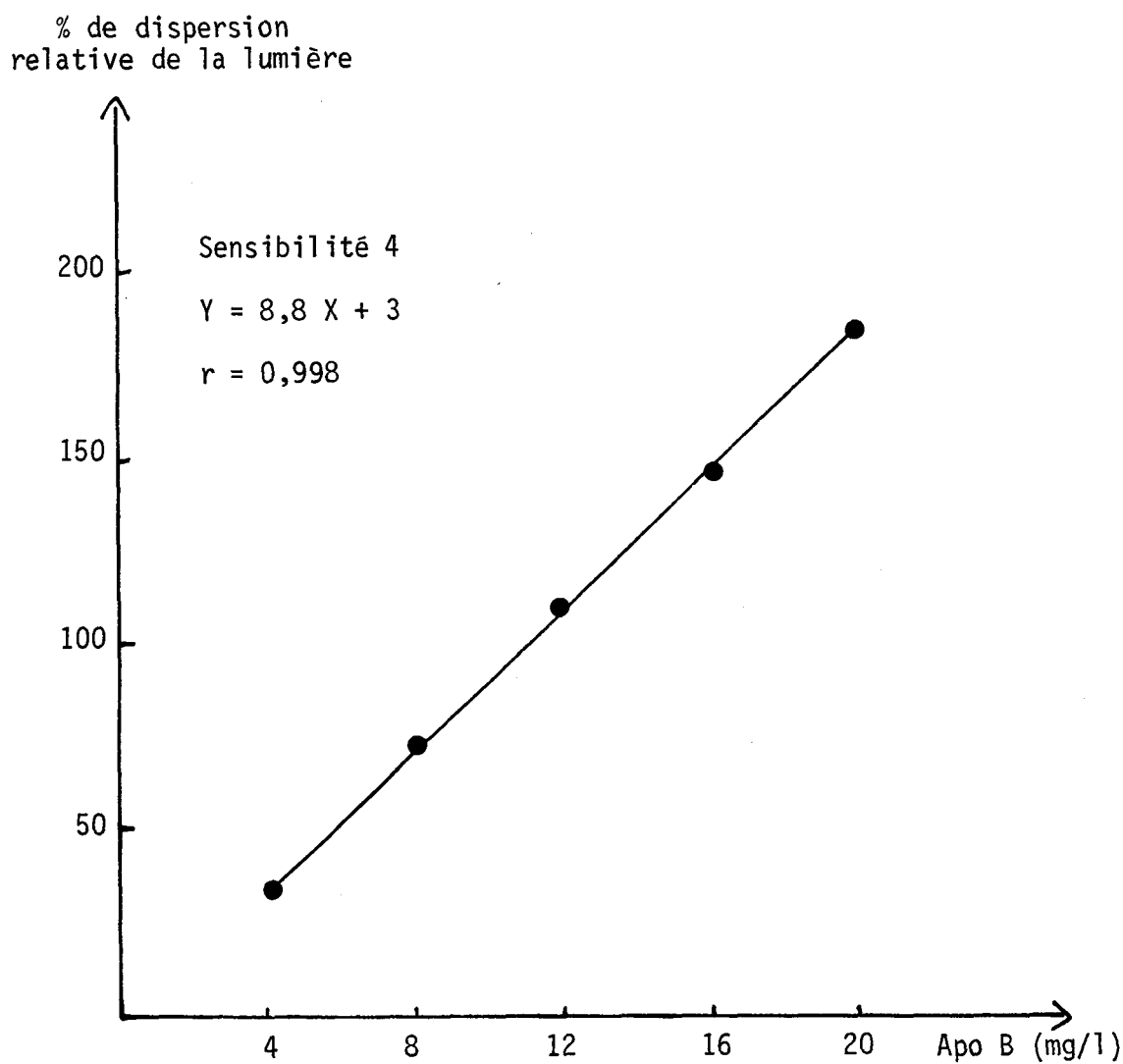


Figure 31

COURBE D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE  
LASER-IMMUNONEPHELEMETRIQUE DE L'APO B



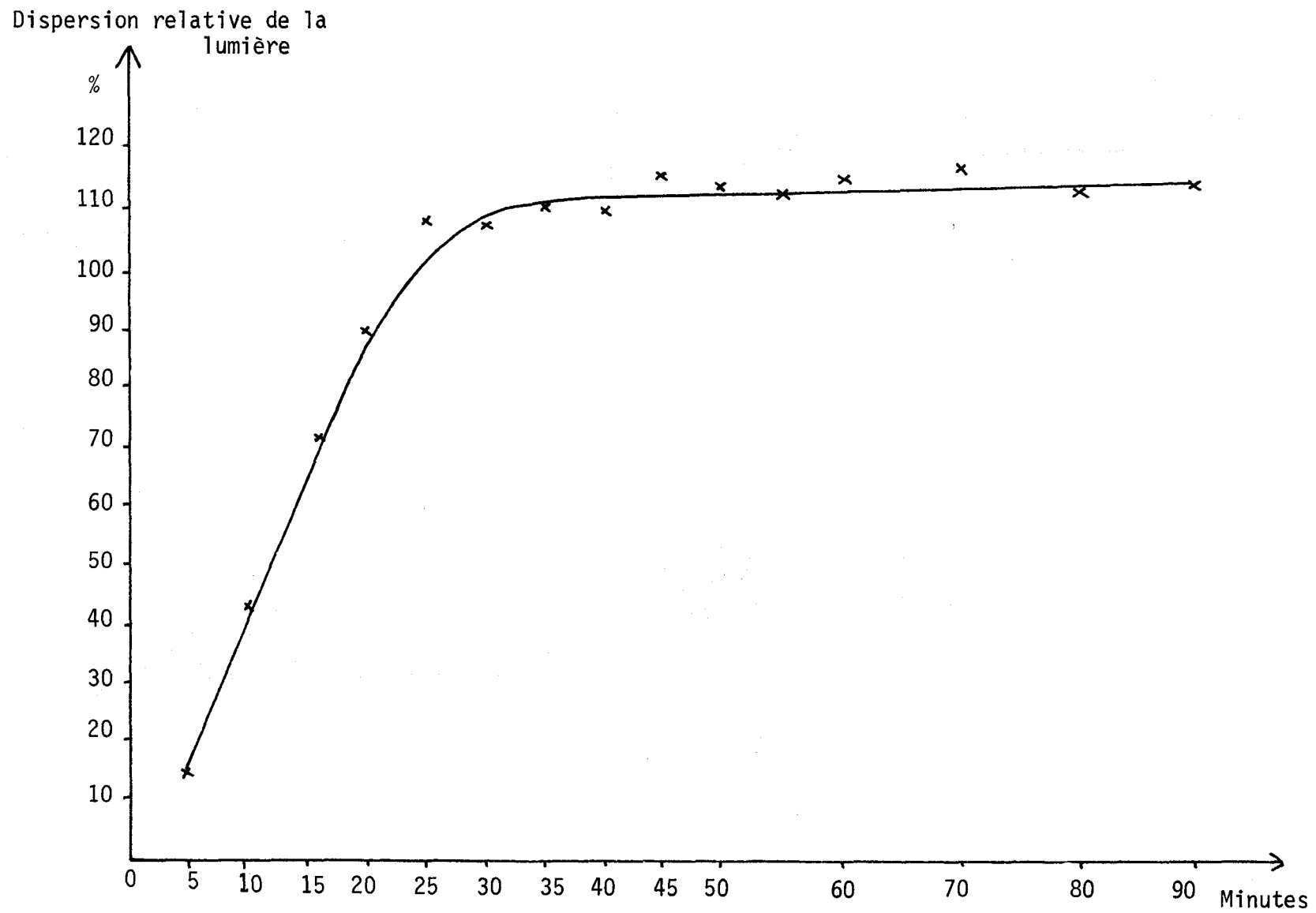


Figure 32

DETERMINATION D'UNE DUREE OPTIMALE DE L'INCUBATION  
 POUR LE DOSAGE LASER-IMMUNONEPHELEMETRIQUE DE L'APO B



\* Sensibilité et précision -

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des dilutions de plasma au 1/200 chez les sujets normolipidémiques et au 1/400 chez les sujets présentant une augmentation de leur concentration plasmatique en LP riches en Apo B se traduisant par une cholestérolémie supérieure à 2,80 g/l.

La répétabilité (30 mesures successives sur un même sérum) est étudiée en zones normale et pathologique (2,10 et 4,60 g/l de cholestérol respectivement) ; les coefficients de variation (CV) se situent respectivement, pour le dosage de l'Apo B, à 3 % et 4,6 %. La reproductibilité jour après jour (21 mesures) fournit dans les mêmes conditions, des CV respectifs de 7,5 % et 7,9 %, très acceptables.

\* Exactitude -

L'exactitude de la méthode est testée par recouvrement de quantités connues de LP-B pure (+ 40, 80, 1000, 1200 et 1600 mg/l) ajoutées à un sérum préalablement dosé à 1700 mg/l en Apo B. Le pourcentage de recouvrement calculé est très satisfaisant : il est de 105 % en moyenne.

\* Comparaison avec les autres méthodes -

Cette étude est effectuée sur 31 sérums provenant d'une population comprenant à la fois des sujets sains (18 sérums) et des sujets porteurs d'une hyperlipoprotéïnémie de type IIa, IIb ou IV. Globalement la population se définit par son taux de cholestérol :  $2,2 \pm 0,9$  g/l (moyenne  $\pm$  écart type).

Le tableau 27, page 196 montre que, en moyenne, les concentrations en Apo B fournies par les trois méthodes ne diffèrent pas significativement. Une excellente corrélation ( $r = 0,980$ ) existe en outre entre les méthodes néphélométrique et immunoélectrophorétique (figure 33 : A, page 195) ; la corrélation est bonne ( $r = 0,907$ ) entre les méthodes néphélométrique et immunoenzymologique (figure 33 : B page 195).

\* Corrélation entre la concentration en Apo B déterminée par néphélométrie et la cholestérolémie -

L'étude est réalisée à partir de 63 sérums provenant de sujets sélectionnés sur la base de leur cholestérolémie de façon à obtenir un échantillon de population régulièrement dispersé entre des valeurs très faibles et très élevées.

La corrélation est très bonne ( $r = 0,922$ ) entre les concentrations sériques en Apo B et le cholestérol total (tableau 28, page 197) ; l'équation

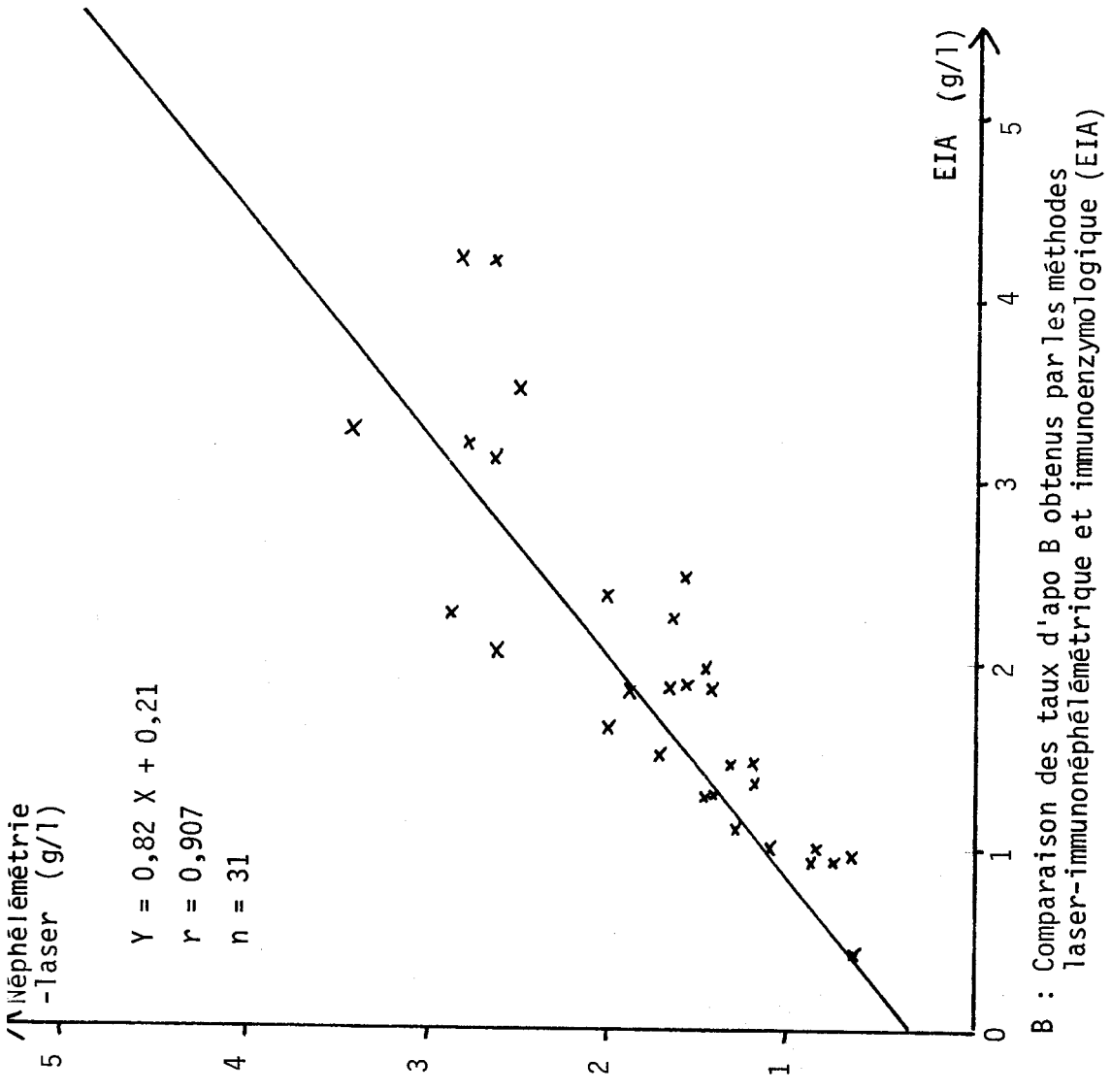
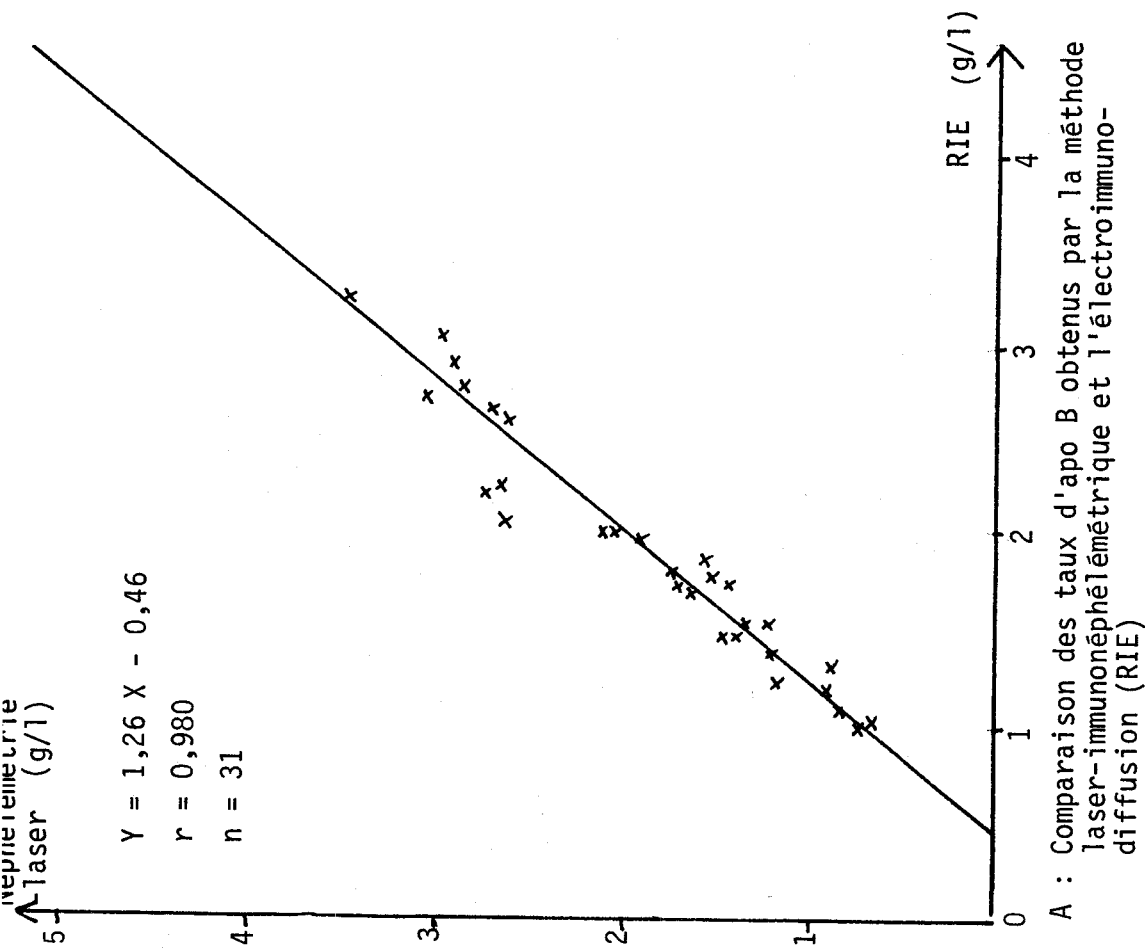


Figure 33

COMPARAISON DES TAUX D'APO B OBTENUS PAR LA METHODE D'IMMUNOPHELEMETRIE-LASER ET DEUX AUTRES METHODES DE REFERENCE

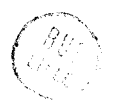


TABLEAU 27

COMPARAISON STATISTIQUE DES RESULTATS OBTENUS POUR LE DOSAGE DE L'APO B  
PAR LA METHODE LASER-IMMUNONEPHELEMETRIQUE ET LES METHODES  
D'ELECTROIMMUNODIFFUSION (RIE) ET IMMUNOENZYMOLOGIQUE (EIA)

|                                   | NEPHELEMETRIE<br>-LASER<br>(Y) | RIE<br>(X)      | NEPHELEMETRIE<br>-LASER<br>(Y) | EIA<br>(X)      |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| Moyenne $\pm$ Ecart-type<br>(g/l) | 1,93 $\pm$ 0,79                | 2,12 $\pm$ 1,12 | 1,96 $\pm$ 1,02                | 2,12 $\pm$ 1,12 |
| $a_0$                             | - 0,46                         |                 | 2,17                           |                 |
| $a_1$                             | 1,26                           |                 | 0,82                           |                 |
| $S_{YX}$                          | 0,22                           |                 | 438                            |                 |
| r                                 | 0,980                          |                 | 0,907                          |                 |
| n                                 | 31                             |                 | 31                             |                 |

$a_0$  : Ordonnée à l'origine de la droite de régression (Y, X)

$a_1$  : Pente de la droite de régression (Y, X)

$S_{YX}$  : Ecart-type de la droite de régression (Y, X)

r : Coefficient de corrélation

n : Nombre de cas étudiés



TABLEAU 28

COMPARAISON STATISTIQUE ENTRE LA CONCENTRATION SERIQUE  
EN APO B ET LA CHOLESTEROLEMIE

|                                   | NEPHELEMETRIE-LASER<br>(Y) | CHOLESTEROL TOTAL<br>(X) |
|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Moyenne $\pm$ Ecart-type<br>(g/l) | 2,56 $\pm$ 1,24            | 2,45 $\pm$ 0,89          |
| $a_0$                             | - 0,62                     |                          |
| $a_1$                             | 1,30                       |                          |
| $S_{YX}$                          | 0,48                       |                          |
| r                                 | 0,922                      |                          |
| n                                 | 63                         |                          |

$a_0$  : Ordonnée à l'origine de la droite de régression (Y, X)

$a_1$  : Pente de la droite de régression (Y, X)

$S_{YX}$  : Ecart-type de la droite de régression

r : Coefficient de corrélation

n : Nombre d'échantillons étudiés



de la droite de régression met cependant en évidence l'existence d'un biais additif relativement important.

c) Discussion -

- L'immunonéphélémétrie laser appliquée au dosage de l'Apo B dans le sérum humain offre une grande sensibilité et une parfaite spécificité. La précision d'une telle méthode est de même entièrement satisfaisante. Les réactifs utilisés sont stables ; ils sont très faciles à préparer et de plus leur nombre est limité. La réalisation de la technique est enfin extrêmement facile.

- L'emploi de PEG lors de dosages d'apoprotéines entrant dans la composition de LP n'est pas souhaitable. En effet, on sait que ce réactif favorise la précipitation des LP, et LORENZELLI et coll. (225) montrent récemment l'importance de ce phénomène lors de la quantification par immunonéphélémétrie d'immuns complexes circulants (immunoglobulines liées à des LDL). Le PEG favorise par ailleurs la précipitation des complexes antigène-anticorps formés et il faut alors, dans le cas de sa présence dans le tampon PBS, déterminer très précisément le temps de la réaction.

Les essais que nous avons réalisés avec et sans PEG nous montrent effectivement que les meilleurs résultats sont fournis par le tampon diluant ne contenant pas de PEG.

- La durée de l'incubation est fixée dans notre méthodologie à 45 minutes. En choisissant ce temps, on attend que la réaction soit maximale et stable, et on travaille en "point final". Il est cependant possible en immunonéphélémétrie de travailler avant ce point, en cinétique ; on considère alors la dérivée première de la diffusion de la lumière, c'est à dire la vitesse, en fonction du temps.

- Une très bonne corrélation existe entre les concentrations sériques en Apo B et le taux de cholestérol mais il n'y a pas de proportionnalité.

Ces deux résultats s'expliquent facilement, et lorsqu'on détermine une cholestérolémie on tient compte du cholestérol des HDL dont la concentration dans le sang est relativement constante d'un individu à l'autre, mais par ailleurs les HDL ne contiennent pas d'Apo B.

- La taille des LP possédant de l'Apo B est importante à considérer dans ce système (page 122 ) et il semble raisonnable de l'appliquer essentiellement à des sérums normaux ou de type IIa, ne contenant ni chylomicrons ni trop de VLDL. Dans notre étude, les dosages d'Apo B effectués sur 31 sérums fournis-

sent des moyennes tout à fait comparables à celles obtenues par les méthodes de référence, or notre échantillonnage rassemble non seulement des cas normaux et de type IIa mais aussi des sérums de types IIb et IV. En fait, les taux de VLDL de ces derniers sont certes augmentés mais modérément, le plus riche d'entre-eux étant dosé à 3,00 g de triglycérides.

- Alors que le présent travail était en cours, BALLANTYNE et coll. (28) ont fait une étude comparable et décrit le dosage de l'Apo B dans le sérum humain par néphélométrie laser.

Le tableau 29, page 200 compare les deux méthodes, celle des auteurs et la nôtre. Les conditions utilisées dans chacune d'entre-elles sont différentes, et BALLANTYNE et coll. préconisent une dilution très importante des échantillons à doser ( $1/2000^*$ ) ; celle-ci ne correspond pas, à notre avis, aux dilutions habituellement utilisées pour doser les protéines sériques qui sont à une concentration voisine de celle de l'Apo B dans le sérum. Par ailleurs le coefficient de corrélation qu'ils obtiennent entre la concentration plasmatique en Apo B et le taux de cholestérol est nettement inférieur à celui que nous avons rapporté. Enfin, ils diluent l'immunsérum en présence de PEG.

Les auteurs comparent en outre les concentrations d'Apo B mesurées dans 87 plasmas par trois méthodes différentes (immunonéphélométrie laser, immunoprécipitation automatisée, radioimmunologie). La moyenne des valeurs obtenues est difficilement comparable, la technique néphélométrique donnant les taux les plus forts ; néanmoins, dans ce cas, ceux-ci sont très proches des nôtres. Cette variabilité des résultats peut s'expliquer par la diversité même des techniques employées, les principes de celles-ci étant totalement différents. De plus, les échantillons dosés par les auteurs sont pris au hasard, certains pouvant être très hyperlipémiques (notamment riches en LP de grosse taille) ou avoir une composition lipoprotéique fort différente de celle du standard utilisé pour le dosage. On connaît cependant l'importance de ces critères en néphélométrie et plus particulièrement celle de la taille des particules mises en jeu qui, lorsqu'elle est trop grande, entraîne fréquemment une sur-estimation des taux (page 122).

Pour CURRY et coll. (93), le fait majeur responsable des divergences retrouvées dans la littérature quant aux valeurs normales moyennes d'Apo B chez l'homme est lié essentiellement non pas à la diversité des technologies employées, mais à l'application lors de la conversion des taux d'Apo B en protéines d'un facteur correctif extrêmement variable ; en effet pour certains

BUS  
LILLE



TABLEAU 29

COMPARAISON ENTRE DEUX METHODES DE DOSAGE  
DE L'APO B PLASMATIQUE PAR IMMUNONEPHELEMETRIE LASER

a : selon Ballantyne et coll. (28)

b : selon le présent travail

|                                                  | a                                 | b                                   |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Dilution du plasma                               | $\frac{1}{2000}$                  | $\frac{1}{200}$ , $\frac{1}{400}$ * |
| Dilution de l'immun sérum en                     | PEG + PBS                         | PBS (1/75)                          |
| Pourcentage moyen de recouvrement                | 76                                | 105                                 |
| Répétabilité (CV en %)                           | 4,2 <sup>1</sup> 2,5 <sup>2</sup> | 3,0 <sup>2</sup> 4,6 <sup>3</sup>   |
| Reproductibilité jour après jour (CV en %)       | 7,1 <sup>1</sup>                  | 7,5 <sup>2</sup> 7,9 <sup>3</sup>   |
| Coefficient de corrélation (apo B - cholestérol) | 0,75 (n***= 87)                   | 0,92 (n***= 63)                     |

\* : Sérum dont le taux de cholestérol est supérieur ou égal à 2,8 g/l

\*\*\* : Nombre d'échantillons étudiés

PEG : Polyéthylène-glycol

PBS : Tampon phosphate de sodium, pH 7,2

1 - 2 - 3 : Sérums dont les taux d'Apo B sont respectivement aux alentours de 500, 2000 et 5000 mg/litre.



auteurs ce facteur est de 0,77 (36, 216), pour d'autres il est de 0,82 (8) ou encore de 0,90 (93, 215).

En conclusion, il semble actuellement très difficile d'indiquer une valeur normale tant qu'une méthode de référence ne soit pas précisément définie.

### 3°) Dosage de l'Apo A-I (132) -

#### a) Matériel et méthodes -

##### - Préparation du standard d'étalonnage -

Une courbe d'étalonnage est établie avec une solution de HDL<sub>3</sub> analysée et dosée en Apo A-I dans le but de quantifier un sérum-étalon secondaire servant par la suite de standard (il s'agit du même sérum standard lyophilisé que celui utilisé pour le dosage de l'Apo B).

L'isolement des HDL<sub>3</sub> est réalisé par ultracentrifugation préparative et séquentielle (170) d'un "pool" de sérums provenant de donneurs sains, et correspond à la fraction de densité comprise entre 1,120 et 1,210 g/l. Sa pureté est contrôlée en déterminant la composition en acides aminés de sa partie protéique et en la comparant à celle décrite dans la littérature (331). Les apoprotéines des HDL<sub>3</sub> (Apo HDL<sub>3</sub>) sont obtenues par délipidation des LP à l'éther-éthanol selon la technique de BROWN et coll. (60) (appendice technique page 281). La concentration protéique de la fraction HDL<sub>3</sub> est déterminée par un dosage de LOWRY (226), puis convertie en celle d'Apo A-I sur la base de sa composition en acides aminés basiques et plus particulièrement sur celle en histidine (5).

La séparation des acides aminés basiques est réalisée par chromatographie sur un autoanalyseur Beckman multichrome dans une colonne de diamètre 0,9 cm et de hauteur 18 cm, remplie d'une résine M.82. L'élution est effectuée par un tampon citrate de sodium 0,35M de pH 5,28 et le débit est de 70 ml/heure.

6,1 % du nombre de moles d'histidine calculé sur le chromatogramme proviennent des Apo C, D et E entrant également dans la composition protéique des HDL<sub>3</sub>; l'Apo A-II ne contenant pas d'histidine n'intervient pas dans le calcul. Ce pourcentage est retranché, et le chiffre résiduel obtenu correspond au nombre de moles d'histidine de l'Apo A-I présente dans l'échantillon analysé, dont on déduit facilement les concentrations molaire et pondérale, sachant qu'une mole d'Apo A-I contient 5 moles d'histidine et possède une masse moléculaire de 28.000 daltons (27).

- Obtention de l'immunsérum anti-Apo A-I -

\* Préparation de l'antigène -

L'antigène est de l'Apo A-I purifiée. Cette purification met en oeuvre un protocole à plusieurs étapes relativement longues et nécessite dans un premier temps l'isolement des HDL dont l'Apo A-I représente 70 % des protéines.

Les HDL sont obtenues par ultracentrifugation préparative et séquentielle d'un "pool" de sérums provenant de donneurs sains et correspondant à la fraction de densité comprise entre 1,080 et 1,180 g/ml. Cette fraction est ensuite dialysée pendant deux jours contre plusieurs volumes de sérum physiologique afin d'éliminer les sels minéraux ajoutés pour ajuster les densités, puis délipidée à l'éther-éthanol (60) (appendice technique page 281). La délipidation s'effectue à 4°C avec des solvants conservés à -20°C, et la précipitation des protéines est assurée dans un premier temps par une lyophilisation des LP.

Le précipité d'apoprotéines ainsi récupéré (Apo HDL) est lavé à l'éther, séché sous azote puis remis en solution dans un tampon bicarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ ,  $5 \times 10^{-2} \text{M}$ ). Il est enfin dialysé une nuit contre du tampon tris-HCl 0,01 M pH 8,2 contenant de l'urée 6 M.

Après dialyse et concentration, les Apo HDL sont chromatographiées sur colonne de DEAE cellulose (cellulose Whatman DE 52 microgranulaire prégonflée) selon une modification de la méthode de SHORE et SHORE (44, 332). La chromatographie s'effectue à 4°C dans une colonne de 0,9 x 60 cm. Jusqu'à 30 mg de protéines peuvent être déposés. Le tampon d'éluion est un gradient linéaire et continu de 1600 ml de tris-HCl pH 8,2 urée 6M de molarité 0,01 M à 0,1 M, et la solution d'urée utilisée est fraîchement désionisée par passage sur une résine mixte d'Amberlite MB1. Le débit d'éluion est de 1,5 ml/heure et on collecte des fractions de 5 ml. L'enregistrement spectrophotométrique est fait à 280 nm. Les éluats des différents pics obtenus sont récupérés, dialysés à 4°C pendant 72 heures contre du sérum physiologique, concentrés puis analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu urée selon la technique de KANE (200) (appendice technique page 282).

L'éluat du pic correspondant à l'Apo A-I est seul conservé et sa pureté est contrôlée d'une part en immunoélectrophorèse en double dimension contre un immunsérum de lapin anti-immunoglobulines humaines et d'autre part en comparant sa composition en acides aminés à celle décrite dans la littérature (27). Pour la détermination de la composition en acides aminés nous utilisons le même appareil Beckman et la même résine que dans le cas de l'analyse des acides

aminés basiques des HDL<sub>3</sub>. La colonne est plus longue (0,9 x 55 cm) et le tampon d'éluion est un gradient discontinu de pH et de concentration en citrate de sodium. Le débit est le même : 70 ml/heure et la séparation s'effectue à 55°C.

La concentration de la solution d'Apo A-I est enfin déterminée par un dosage des protéines selon la méthode de LOWRY (226) (appendice technique page 241).

\* Obtention de l'immunsérum -

1,5 mg d'Apo A-I ainsi purifiée est émulsifiée avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund puis injecté aux lapins selon la méthode de VAITUKAITIS précédemment décrite (page 179) (370).

Au bout de trois semaines, les animaux reçoivent une injection de rappel; 15 jours plus tard, puis ensuite tous les mois ils sont saignés. Ils sont enfin sacrifiés au bout de 4 mois. La pureté de chaque lot d'immunsérum est testée par immunoélectrophorèse en double dimension et on utilise comme antigène un sérum humain total.

Les immunsérums sont conservés à -20°C en présence d'azoture de sodium à 1'/. (p/v).

\* Dosage de l'Apo A-I -

L'immunsérum anti-Apo A-I est dilué dans le même tampon PBS que celui utilisé pour le dosage de l'Apo B, avec ou sans PEG, puis filtré. Les sérums et les étalons sont de même dilués dans du sérum physiologique filtré, et les dosages sont effectués selon un tableau identique à celui proposé (page 189) pour l'Apo B. La concentration de l'Apo A-I dans le sérum étant supérieure à celle de l'Apo B, 50 microlitres seulement des échantillons à doser sont prélevés.

Les lectures sont faites après un temps d'incubation de 45 minutes et les valeurs lues sur l'écran digital du néphélémètre sont directement proportionnelles à la concentration de l'Apo A-I.

\* Autres méthodes -

Les résultats sont comparés à ceux obtenus par électroimmunodiffusion adaptée selon la technique originale de LAURELL (214) (appendice technique page 277). Le cholestérol est les triglycérides des sérums analysés sont dosés sur autoanalyseur Technicon (294) (appendice technique page 259).

b) Résultats -

- Critères de pureté -

\* La composition en acides aminés des Apo HDL<sub>3</sub> est tout à fait comparable à celle proposée par SHORE et coll. (331) (tableau 30, page 205). Cette fraction peut être utilisée pour établir la gamme d'étalonnage.

\* L'Apo A-I isolée ne développe qu'un seul pic de précipitation par immunoelectrophorèse en double dimension contre un immunsérum total. De plus, sa composition en acides aminés est très proche de celle décrite dans la littérature (27,45)(tableau 31, page 206).

- Séparation chromatographique de l'Apo A-I -

La chromatographie d'échange d'ions sépare les Apo HDL en plusieurs pics I, II, III et IV selon le diagramme suivant :

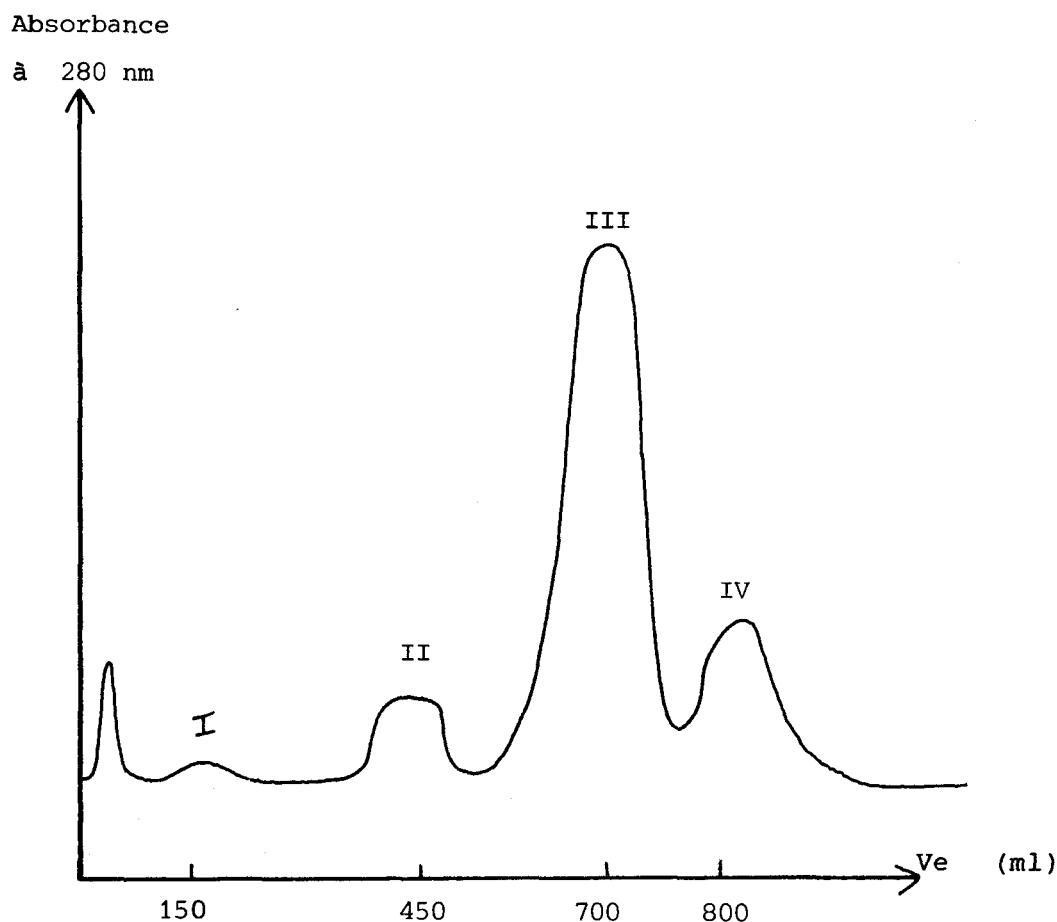


TABLEAU 30

COMPOSITIONS PROTEIQUES COMPAREES DES APO-HDL<sub>3</sub>  
(en moles/10<sup>3</sup> moles d'acides aminés)

|      | Selon Shore<br>et coll.(331) | Selon le présent<br>travail |
|------|------------------------------|-----------------------------|
| Asp  | 77                           | 77                          |
| Thr  | 51                           | 50                          |
| Sev  | 68                           | 70                          |
| Glu  | 185                          | 181                         |
| Pro  | 47                           | 48                          |
| Gly  | 44                           | 47                          |
| Ala  | 75                           | 71                          |
| Cys  | 7                            | -                           |
| Val  | 60                           | 64                          |
| Net  | 15                           | 22                          |
| Ilen | 8                            | 8                           |
| Len  | 134                          | 133                         |
| Tyr  | 38                           | 33                          |
| Phe  | 34                           | 33                          |
| Tryp | 92                           | 87                          |
| Lys  | 15                           | 14                          |
| His  | 46                           | 54                          |
| Arg  | 15                           | -                           |



TABLEAU 31

COMPOSITIONS PROTEIQUES COMPAREES DE L'APO A-I  
(en moles d'acides aminés/mole de protéine)

|      | Selon Baker<br>et coll.(27) | Selon le présent<br>travail |
|------|-----------------------------|-----------------------------|
| Asp  | 21                          | 19                          |
| Thr  | 10                          | 9                           |
| Ser  | 14                          | 13                          |
| Glu  | 47                          | 39                          |
| Pro  | 10                          | 10                          |
| Gly  | 10                          | 10                          |
| Ala  | 19                          | 18                          |
| Cys  | 0                           | 0                           |
| Val  | 13                          | 10                          |
| Net  | 3                           | 2                           |
| Ilen | 0                           | -                           |
| Len  | 39                          | 29                          |
| Tyr  | 7                           | 7                           |
| Phe  | 6                           | 5                           |
| Tryp | -                           | -                           |
| Lys  | 21                          | 18                          |
| His  | 5                           | 5                           |
| Arg  | 16                          | 14                          |



L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu urée (200) (appendice technique page 282) identifie les pics I, II, III et IV, ceux-ci correspondant respectivement aux Apo C, A-II et 2 formes d'A-I.

- Conditions opératoires du dosage -

\* linéarité -

La figure 34, page 208 montre que les pourcentages de dispersion relative de la lumière sont reliés de façon linéaire à différentes dilutions de la fraction HDL<sub>3</sub> correspondant à des concentrations d'Apo A-I allant de 1 à 5 mg/l.

\* Dilution optimale de l'immunsérum -

La zone de linéarité précédemment définie est obtenue avec une dilution d'immunsérum variable selon les lots, mais étant le plus souvent 1/75.

\* Temps d'incubation -

La durée de l'incubation est déterminée comme dans le cas du dosage de l'Apo B, et de même un temps optimal de 45 minutes est retenu.

\* Présence de PEG -

L'influence du PEG dans le milieu lors des dosages d'Apo A-I est également contrôlée selon le même protocole que pour l'Apo B, en analysant 7 sérums. Les moyennes obtenues avec et sans PEG sont très différentes ( $1,54 \pm 0,14$  et  $1,90 \pm 0,10$  g/l) (moyenne  $\pm$  écart type). Les concentrations trouvées en l'absence de PEG sont nettement plus élevées (+ 19 % en moyenne), mais comme pour l'Apo B elles sont très proches de celles que l'on obtient par la méthode de référence ( $1,91$  g/l en moyenne).

\* Sensibilité et précision -

La concentration minimale d'Apo A-I que l'on peut doser par cette technique dépasse largement la sensibilité exigée pour un tel dosage dans le sérum, et des dilutions au 1/250, 1/300 et 1/350 des échantillons sont pratiquées en routine.

La répétabilité est étudiée en faisant 30 mesures successives d'un sérum respectivement faible et fort en Apo A-I ( $0,39$  g/l et  $1,81$  g/l) ; les coefficients de variation (CV) se situent respectivement à 4,0 % et 2,8 %. La reproductibilité jour après jour est calculée en effectuant 8 mesures réparties



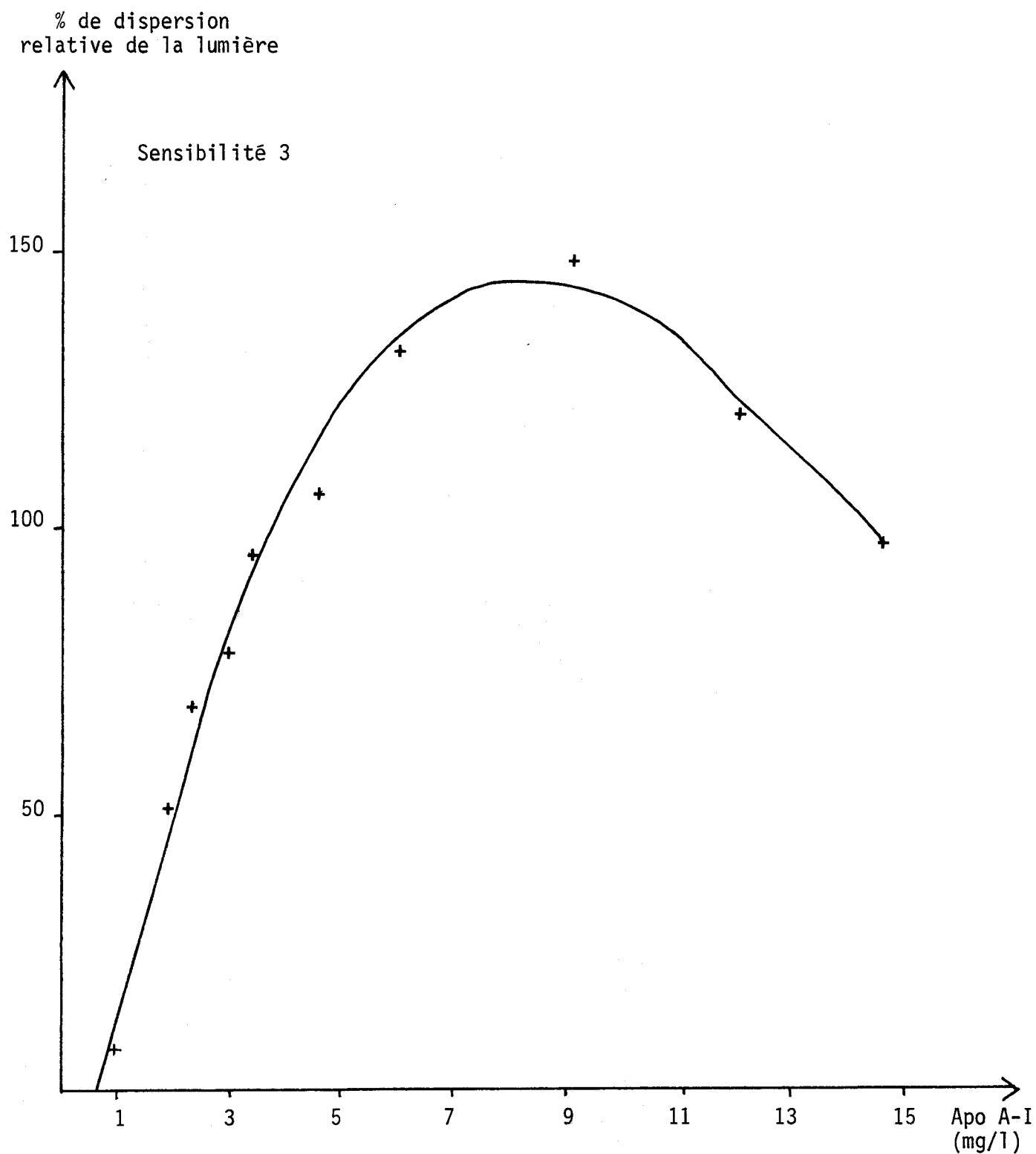


Figure 34

COURBE D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE  
LASER-IMMUNONEPHELEMETRIQUE DE L'APO A-I

sur 3 semaines. Nous trouvons une corrélation négative égale à  $r = -0,924$ , mais compte tenu du très petit nombre de valeurs ( $n=8$ ), nous ne pouvons conclure sur un plan statistique et affirmer une influence du temps.

- Comparaison avec l'électroimmunodiffusion -

L'étude comparative est faite sur 49 sérums normaux et hyperlipidémiques, ne contenant pas de chylomicrons et n'étant en outre que modérément hypertriglycéridémiques. Leur sélection est faite de façon à obtenir un échantillon de population régulièrement dispersé entre des valeurs faibles et fortes en Apo A-I (0,52 et 2,32 g/l).

Le tableau 32, page 211, montre que, en moyenne, les concentrations en Apo A-I fournies par les deux méthodes ne diffèrent pas significativement, et qu'une excellente corrélation existe entre-elles ( $r = 0,965$ ). L'intensité de la liaison est forte, la valeur du coefficient de détermination ( $r^2$ ) se situant à 93 % et il n'existe pas de biais additif (figure 35, page 210).

c) Discussion -

- L'Apo A-I est éluée par chromatographie d'échange d'ions d'Apo HDL en deux pics (pics III et IV schéma page 204), et le diagramme de séparation que nous obtenons est comparable à celui de BLATON et coll. (44). Cette hétérogénéité de l'Apo A-I est décrite depuis 1972 par EDELSTEIN et coll. (107) qui rapportent la séparation chromatographique sur DEAE cellulose de l'Apo A-I en 5 sous-fractions. Plus récemment HOUSER et coll. (183) obtenant par la même technique deux formes polymorphiques d'Apo A-I (Apo A-I<sub>1</sub> et Apo A-I<sub>2</sub>), démontrent que cette hétérogénéité n'est pas due à l'agrégation de l'apoprotéine intervenant lors de sa purification.

- La gamme d'étalonnage de la technique que nous décrivons est réalisée avec une fraction de HDL<sub>3</sub> dont on calcule théoriquement la concentration en Apo A-I.

En effet, nous avons soulevé auparavant (page 128) l'important problème que représente le comportement des apoprotéines à l'état purifié, celles-ci étant en fait de très mauvais standards. L'Apo A-I isolée a en effet une forte tendance à se polymériser, et l'électrophorèse de l'apoprotéine sur gel de polyacrylamide en milieu urée (200) (appendice technique page 282) met bien en évidence toute une série de bandes de hautes masses moléculaires.

Laser-immunonéphélémétrie  
(g/l)

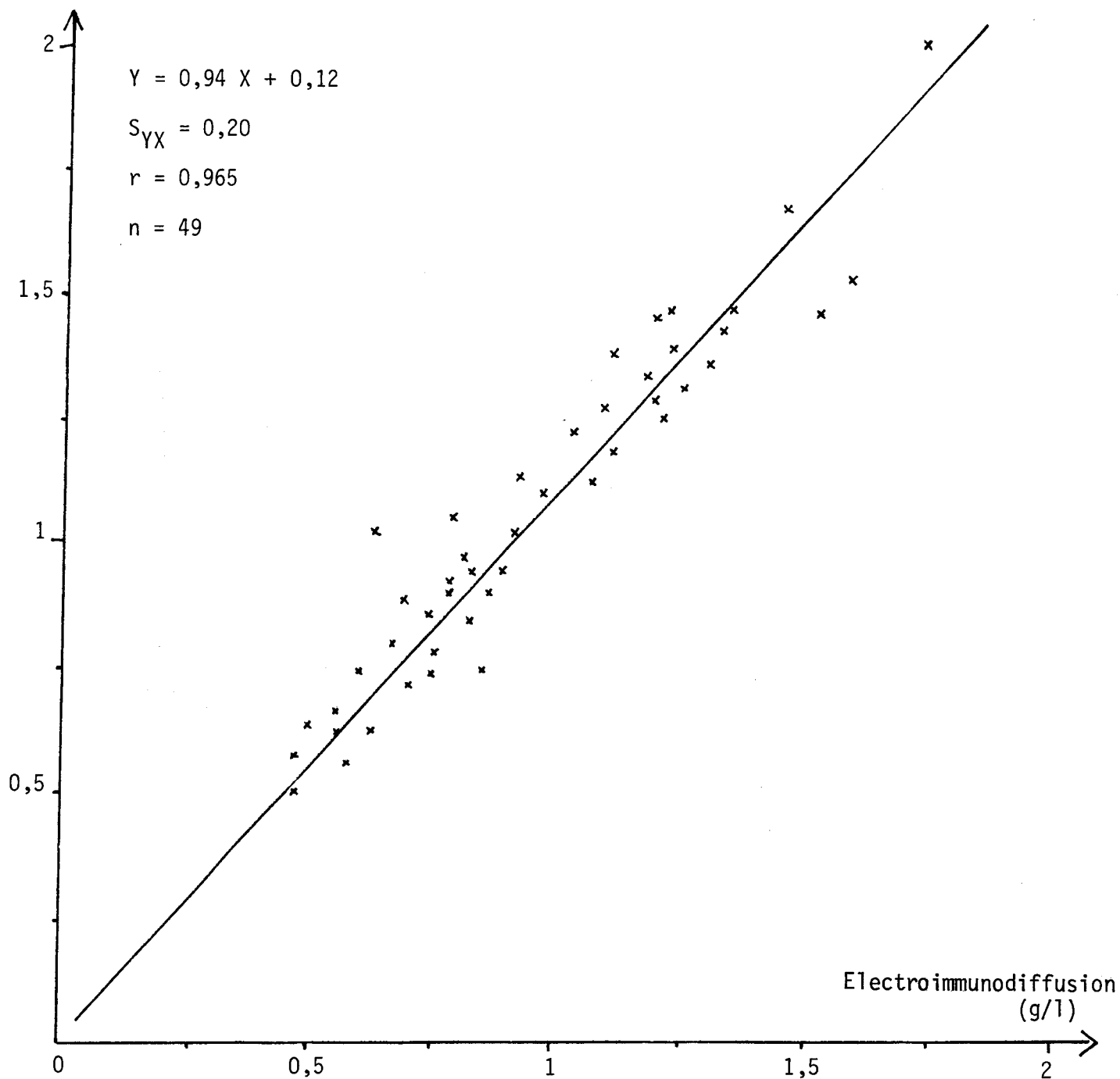


Figure 35

COMPARAISON DES TAUX D'APO A-I OBTENUS PAR  
IMMUNONEPHELEMETRIE-LASER ET ELECTROIMMUNODIFFUSION



TABLEAU 32

COMPARAISON STATISTIQUE DES RESULTATS OBTENUS POUR LE DOSAGE DE L'APO A-I  
PAR LES METHODES LASER-IMMUNONEPHELEMETRIQUE ET D'ELECTROIMMUNODIFFUSION

|                                   | ELECTROIMMUNODIFFUSION<br>(X) | LASER-IMMUNONEPHELEMETRIE<br>(Y) |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Moyenne $\pm$ Ecart-type<br>(g/l) | 1,42 $\pm$ 0,45               | 1,41 $\pm$ 0,44                  |
| $a_0$                             | 0,071                         |                                  |
| $a_1$                             | 0,94                          |                                  |
| $S_{YX}$                          | 0,20                          |                                  |
| $r$                               | 0,965                         |                                  |
| $n$                               | 49                            |                                  |

$a_0$  : Ordonnée à l'origine de la droite de régression (Y, X)

$a_1$  : Pente de la droite de régression (Y, X)

$S_{YX}$  : Ecart-type de la droite de régression (Y, X)

$r$  : Coefficient de corrélation

$n$  : Nombre de cas étudiés



- L'immunonéphélémétrie laser appliquée au dosage de l'Apo A-I chez l'homme offre une méthode rapide, simple, sensible et très spécifique. En outre, contrairement à beaucoup d'autres techniques, celle que nous utilisons permet de travailler avec le sérum natif.

- La question de savoir s'il faut traiter ou non les échantillons dont on veut doser les apoprotéines est constamment remise en cause ; il s'agit là d'un problème difficile à résoudre et de nombreux travaux ont été effectués afin d'étudier la disponibilité des sites antigéniques des LP représentés par leurs apoprotéines. C'est au niveau des HDL, et donc essentiellement pour le dosage des Apo A-I et Apo A-II que ce problème se pose le plus souvent (page 129).

Dans notre étude nous mettons en évidence une parfaite similitude des résultats obtenus par néphélémétrie et électroimmunodiffusion sur des sérums non traités. Ceci est en accord avec les travaux de CURRY et coll. (92) qui, décrivant une technique de référence de dosage de l'Apo A-I par électroimmunodiffusion, ne montrent aucune différence des taux, que les échantillons soient délipidés ou non.

Nous avons cependant contrôlé sur deux sérums l'effet de certains traitements préconisés dans la littérature afin de doser la totalité de l'Apo A-I, et plus particulièrement celui du chauffage à 52°C pendant 30 minutes (121), l'addition de décyl-sulfate de sodium (121) ou de tétraméthyl-urée (86) ou encore le chauffage à 37°C en milieu tampon barbital-sérumalbumine à 3 % (p/v) remplaçant la délipidation (313). Nous n'avons obtenu aucun changement des taux par rapport à ceux des sérums natifs non traités.

- Très récemment, alors que nous effectuions ce travail, SHAPIRO et BALLANTYNE (323) développaient de même dans le sérum natif le dosage de l'Apo A-I par néphélémétrie laser. La méthodologie qu'ils proposent est comparée à la nôtre dans le tableau 33, page 213.

Les auteurs établissent également une comparaison des taux obtenus par néphélémétrie et électroimmunodiffusion, mais s'ils trouvent une bonne corrélation entre les deux méthodes, les valeurs calculées d'après la première technique sont inférieures (de 8 %) à celles calculées d'après la seconde.

Enfin, ils s'assurent d'une complète réactivité du sérum natif en étudiant l'influence du chauffage à 52°C et le pré-traitement par l'isopropanol ou le Nonidet P40, détergent analogue au triton. Alors qu'ils n'obtiennent aucune différence des taux dans les échantillons natifs et chauffés, ils notent cependant une très nette diminution en présence de l'alcool ou du détergent et suggèrent une interférence de ces réactifs sur la formation du complexe antigène-anticorps.

TABLEAU 33

COMPARAISON ENTRE DEUX METHODES DE DOSAGE  
DE L'APO A-I PLASMATIQUE PAR IMMUNONEPHELEMETRIE LASER

|                                                           | Selon Shapiro<br>et coll.(323) | Selon le présent<br>travail                            |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Dilution du plasma                                        | $\frac{1}{200}$                | $\frac{1}{250}$ , $\frac{1}{300}$ , $\frac{1}{350}$    |
| Dilution de l'immunsérum en                               | PBS + PEG                      | PBS                                                    |
| Durée de l'incubation                                     | 2 - 3 heures                   | 45 minutes                                             |
| Répétabilité (CV)                                         | 6,7 <sup>1</sup> (n*= 14)      | 4,0 <sup>2</sup> (n = 30)<br>2,8 <sup>3</sup> (n = 30) |
| Comparaison statistique<br>RIE / nephélémétrie<br>(X) (Y) |                                |                                                        |
| - Coefficient de corrélation                              | 0,74 (n = 122)                 | 0,965 (n = 49)                                         |
| - Droite de régression                                    | Y = 0,58 X + 0,50              | Y = 0,94 X + 0,071                                     |

PBS : Tampon phosphate de sodium, pH 7,2

PEG : Polyéthylène glycol

\* n : nombre d'échantillons étudiés

1 2 3 : Plasmas dont les taux d'Apo A-I sont respectivement non précisé, 0,39 et 1,81 g/l.



- En conclusion, il faut remarquer que les concentrations d'Apo A-I que nous obtenons par cette technique sont légèrement supérieures à celles de la littérature. A cet égard, nous avons déjà rapporté les divergences des taux normaux chez l'homme (tableau 14, page 134), divergences dues essentiellement semble-t-il à l'utilisation par les auteurs, non seulement de méthodes aux principes très différents, mais à celle d'immunsérums d'affinité variable selon les laboratoires. De nombreux facteurs peuvent être responsables de cette différence d'affinité, et il semblerait que le protocole de préparation de l'antigène pur ainsi que celui de l'immunisation soient plus particulièrement en cause (page 129).

#### 4- APPLICATIONS -

##### 1') Introduction -

Hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie ont été pendant longtemps très souvent associées à un risque important de maladie coronarienne (77, 202). Cependant, depuis que l'on connaît le métabolisme et le rôle dans le transport du cholestérol des LP de basse et haute densités (155, 242), leurs apoprotéines majeures, Apo B et A-I respectivement, sont de plus en plus considérées comme étant les meilleurs indices d'athérogénécité (22, 4), et pour certains auteurs, plutôt que s'adresser au dosage des lipides (cholestérol et triglycérides), il est préférable de quantifier les apoprotéines spécifiques, l'Apo B appréciant l'ensemble (VLDL + LDL), et l'Apo A-I appréciant les HDL, et de déterminer ainsi un rapport LPB/LPA. Compte tenu du caractère disparate des études effectuées à ce jour dans ce domaine, nous nous sommes intéressés au dosage des Apo B et A-I dans des échantillons de 477 sujets provenant d'une population présumée saine, en étudiant simultanément les triglycérides, le cholestérol (VLDL + LDL) et le cholestérol -HDL (95). Ce travail a été effectué afin de préciser l'influence du sexe et/ou de l'âge sur la répartition des valeurs en appréciant par ailleurs la valeur prédictive des rapports Apo B/ Apo A-I et cholestérol-(VLDL+LDL)/cholestérol-HDL. Nous avons également examiné l'influence de l'index pondéral, de l'alcool, du tabac et des contraceptifs sur les différentes données.

## 2°) Matériel et méthodes -

### a) Matériel -

L'étude a été menée chez 206 hommes et 271 femmes en apparence sains, se présentant à jeun au Centre d'Examen de Santé (Professeur DUBOIS, hôpital Calmette, Lille). L'examen a permis de recueillir divers renseignements : âge, taille, poids, consommation tabagique et/ou alcoolique, prise de contraceptifs chez la femme. Le sang a été prélevé dans des tubes Vacutainer contenant de l'EDTA (1mg/ml). Les plasmas ont été conservés à +4°C en présence d'azote de sodium à 0,05 % (p/v).

### b) Méthodes -

#### - Méthodes analytiques -

Le dosage des triglycérides et du cholestérol total a été effectué par voie enzymatique à l'autoanalyseur Technicon (294) (appendice technique page 259). Le cholestérol-HDL a été mesuré par la technique de précipitation utilisant l'héparine -Mn<sup>2+</sup> (378) et le cholestérol-(VLDL +LDL) a été obtenu par différence. Les dosages d'Apo B et A-I ont enfin été réalisés par les techniques immunonéphélométriques (133, 132).

#### - Méthodes statistiques -

Les résultats sont exprimés en taux moyens (moyenne  $\pm$  écart type), et l'étude statistique comporte :

- \* la recherche expérimentale des lois de distribution (droites de HENRY et coefficients de PEARSON),
- \* des tests de comparaison classiques de deux moyennes (tests utilisant la loi normale ou la loi de STUDENT) ou de plusieurs moyennes (analyse de la variance),
- \* des études de liaison entre paramètres biologiques (corrélation, liaison, et régression).

## 3°) Résultats -

### a) Variations du cholestérol VLDL+LDL et de l'apoprotéine B en fonction du sexe et de l'âge (figures 36 et 37, pages 216 et 217).

L'étude de la distribution du cholestérol VLDL+LDL ne met pas en évidence de différence importante en fonction du sexe, la valeur moyenne étant de 1,38  $\pm$  0,33 g/l chez l'homme et de 1,31  $\pm$  0,35 g/l chez la femme ( p <0,05).



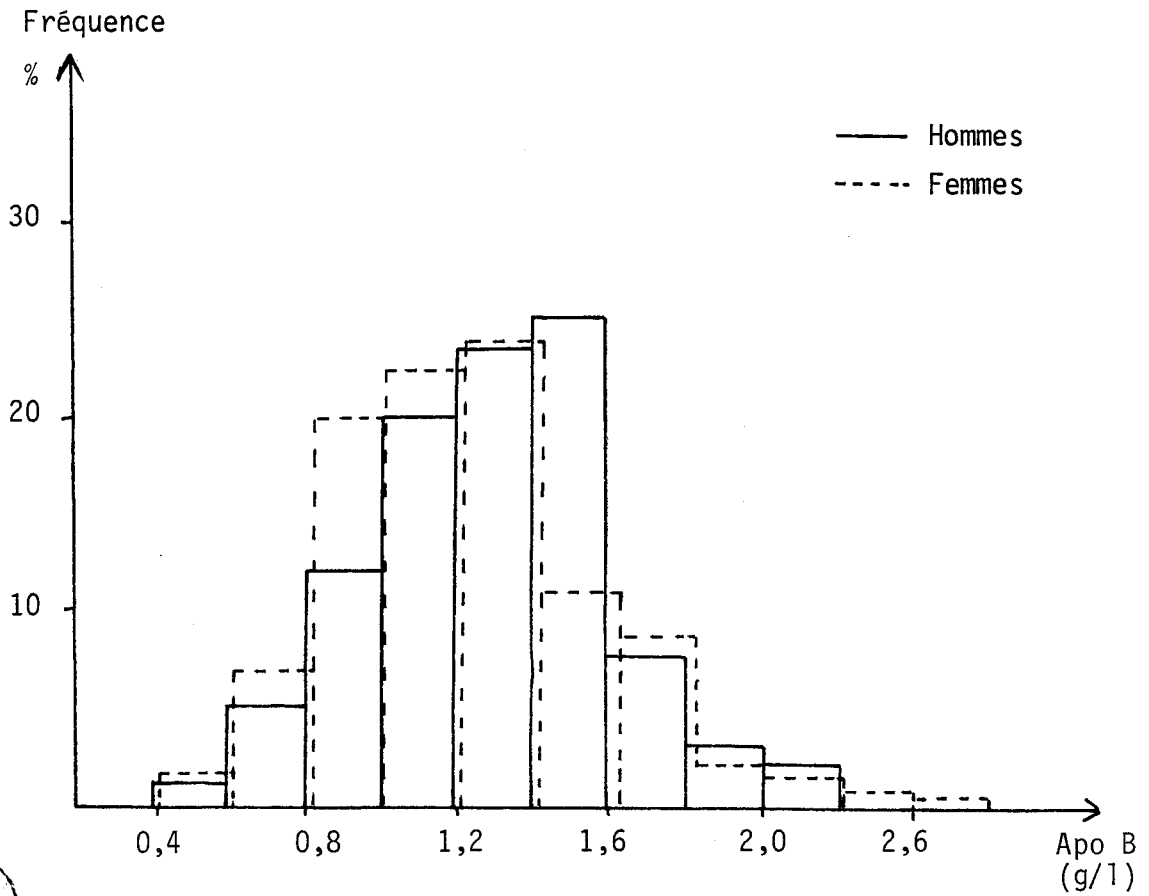
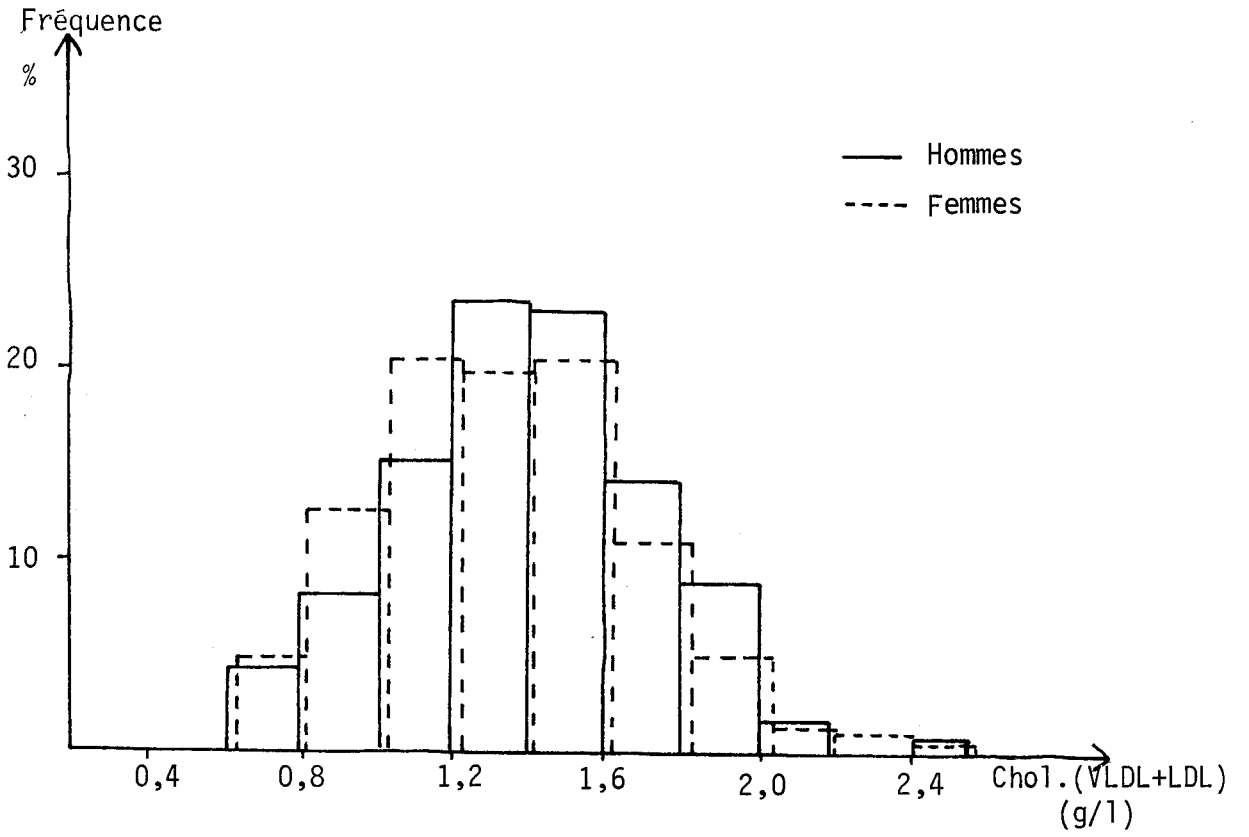
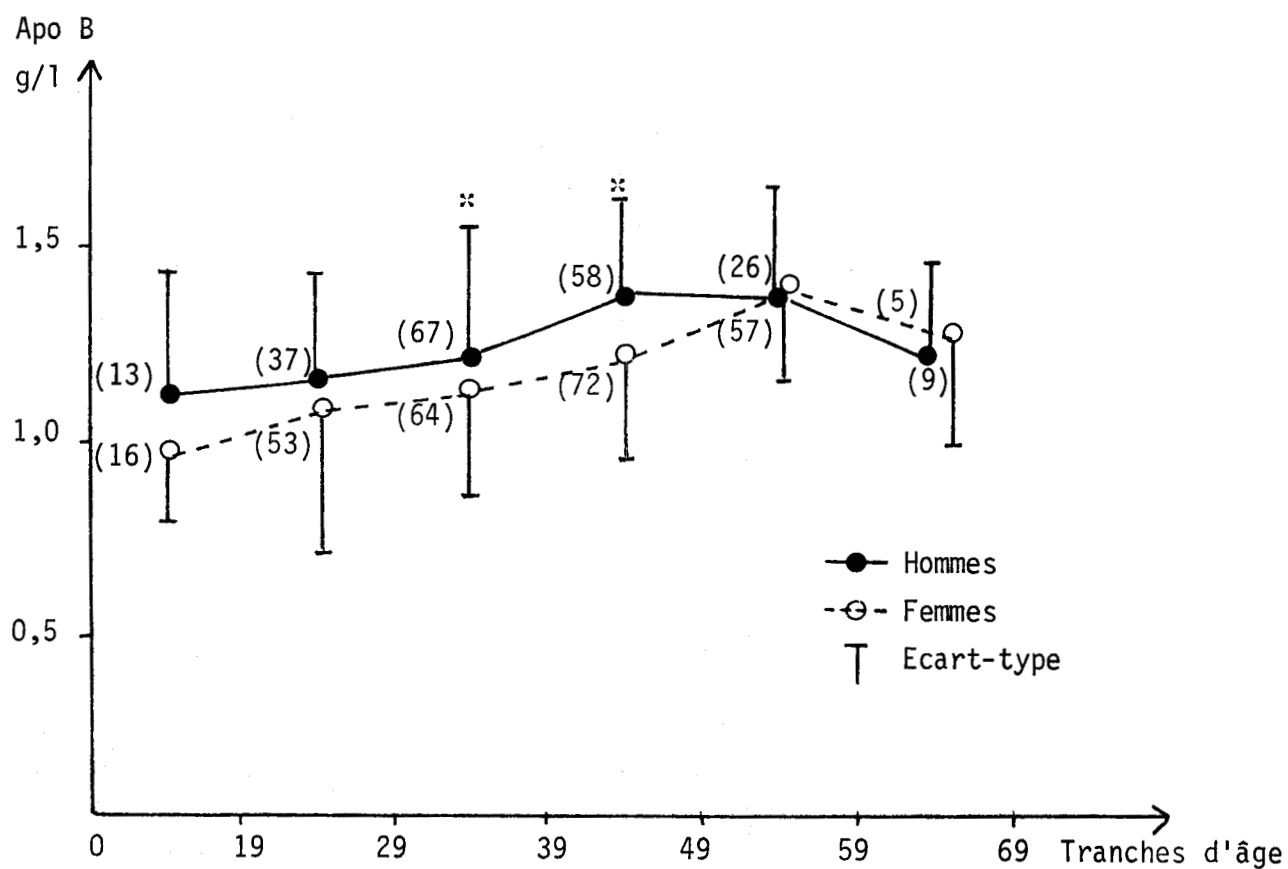
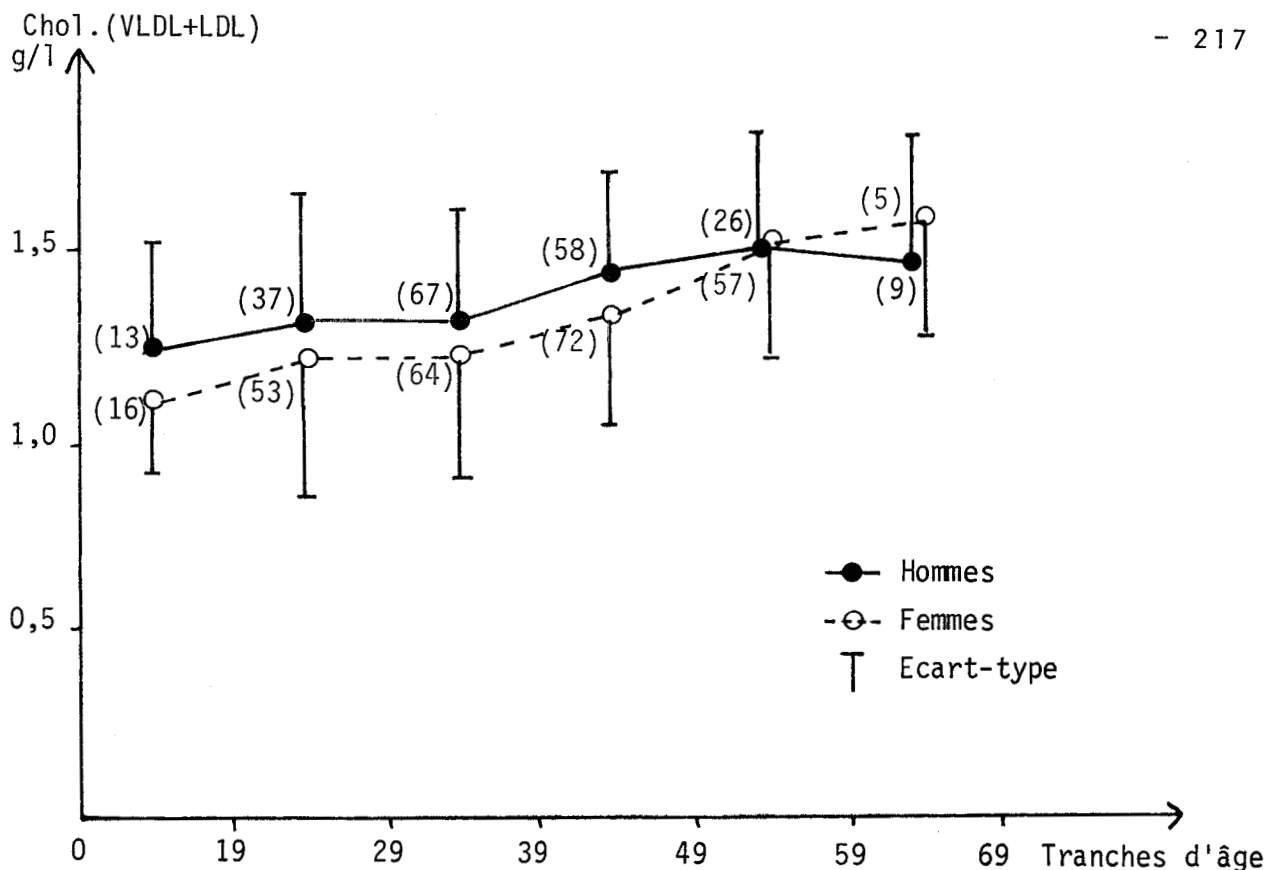


Figure 36

DISTRIBUTION DU CHOLESTEROL (VLDL + LDL) ET DE L'APO-B  
EN FONCTION DU SEXE



\*\* p < 0,001

( ) Nombre de sujets

Figure 37

VARIATIONS DU CHOLESTEROL(VLDL + LDL) ET DE L'APO B EN FONCTION DU SEXE ET DE L'AGE



Par contre, la distribution de l'Apo B objective un décalage plus important des deux populations en faveur des hommes vers les valeurs plus élevées, la moyenne étant de  $1,29 \pm 0,31$  g/l chez l'homme et de  $1,20 \pm 0,34$  g/l chez la femme ( $p < 0,01$ ). En fonction de l'âge d'autre part, on constate que les taux du cholestérol VLDL + LDL ou d'Apo B ont tendance à augmenter progressivement, les femmes gardant des valeurs inférieures tout au moins jusqu'à la ménopause où elles rejoignent les hommes.

Les corrélations entre le cholestérol VLDL + LDL et l'Apo B sont significativement positives dans les deux sexes avec chez l'homme un coefficient  $r$  de  $+ 0,74$  et chez la femme de  $+ 0,84$ . Enfin, les droites de régression apparaissent similaires dans les deux sexes et peuvent être confondues, la droite d'estimation commune ayant l'équation suivante :

$$- \text{cholestérol VLDL + LDL} = 0,65 \text{ Apo B} + 0,28$$

a) Variations du cholestérol-HDL et de l'apoprotéine A1 en fonction du sexe et de l'âge - (figures 38, 39 et 40, pages 213,220,221).

L'étude de la distribution du cholestérol HDL montre une différence importante selon le sexe, la population des femmes présentant un décalage vers les valeurs plus élevées. La valeur moyenne du cholestérol-HDL est en effet de  $0,58 \pm 0,14$  g/l chez l'homme et de  $0,70 \pm 0,15$  g/l chez la femme ( $p < 0,001$ ). A l'inverse, la distribution de l'Apo A-I objective une différence moindre en valeur absolue entre les deux sexes, le taux plasmatique moyen étant de  $1,64 \pm 0,28$  g/l chez l'homme et de  $1,80 \pm 0,30$  g/l chez la femme ( $p < 0,001$ ). D'autre part, en fonction de l'âge, abstraction faite du décalage entre les deux sexes, il n'y a pas de variation franche, bien qu'il y ait une discrète tendance à l'augmentation de l'Apo A-I jusqu'à la soixantaine tant chez l'homme que chez la femme.

Les corrélations entre le cholestérol-HDL et l'Apo A-I sont également significativement positives avec un coefficient  $r$  identique de  $+ 0,68$  dans les deux sexes, mais l'intensité de la liaison ( $r^2 = 47 \%$ ) n'est pas très élevée. Par contre, les droites de régression sont significativement différentes en fonction du sexe : les équations de ces droites sont les suivantes :

$$- \text{chez l'homme, cholestérol-HDL} = 0,40 \text{ Apo A-I} + 0,027$$

$$- \text{chez la femme, cholestérol-HDL} = 0,30 \text{ Apo A-I} + 0,11.$$

L'étude statistique des coefficients de régression montre que les pentes des deux droites ne sont pas significativement différentes et que l'ordonnée

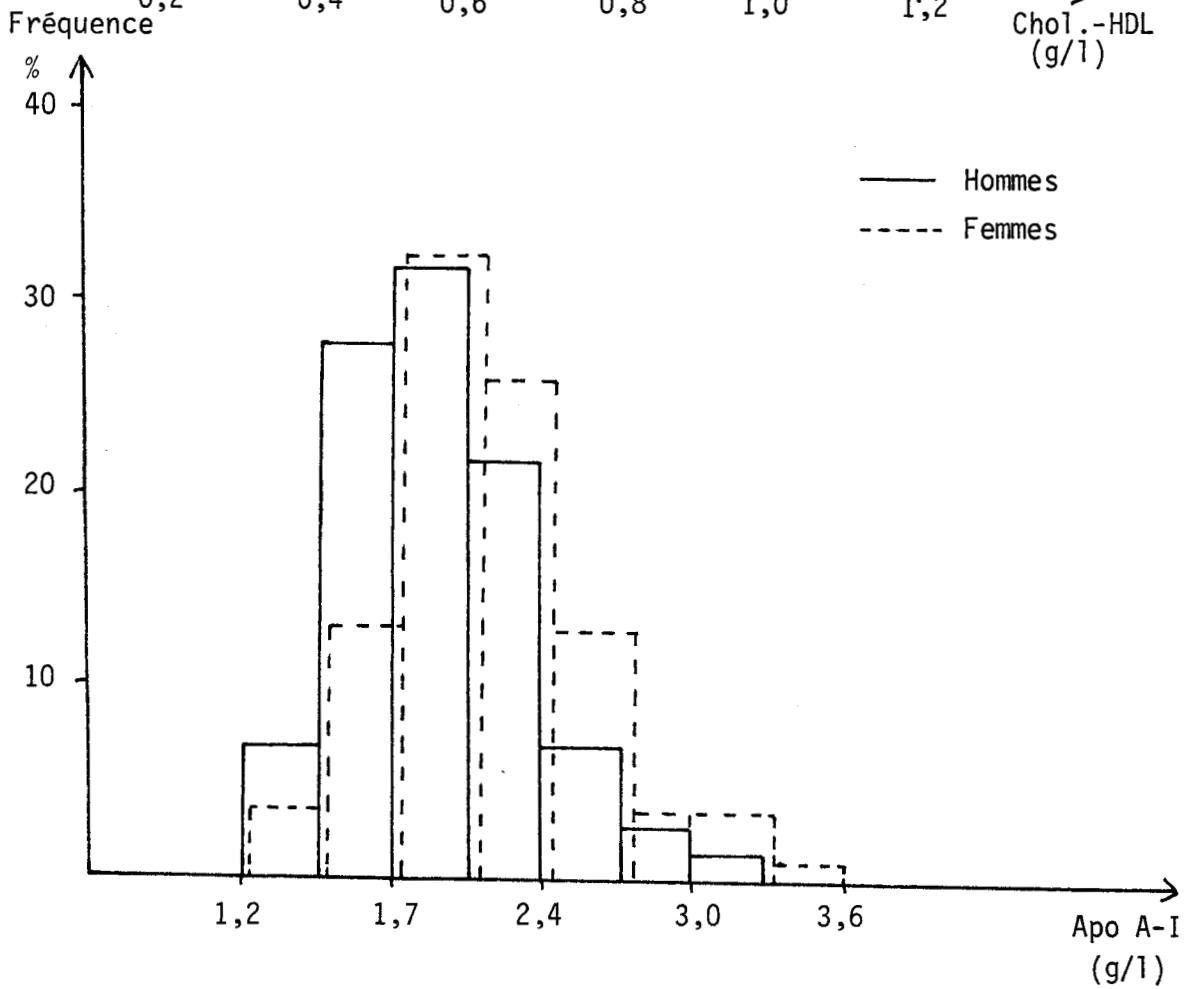
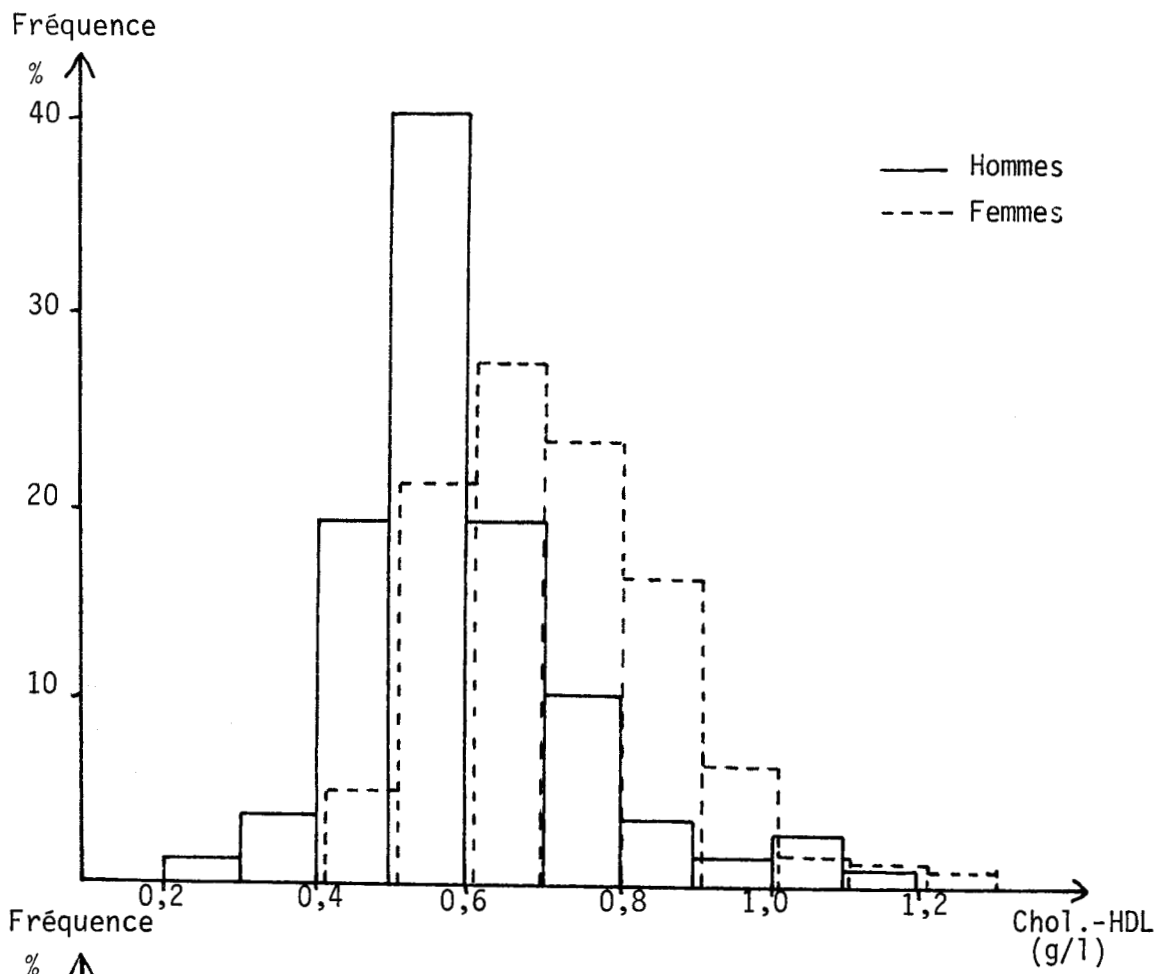


Figure 38

DISTRIBUTION DU CHOLESTEROL HDL ET DE L'APO AI EN FONCTION DU SEXE

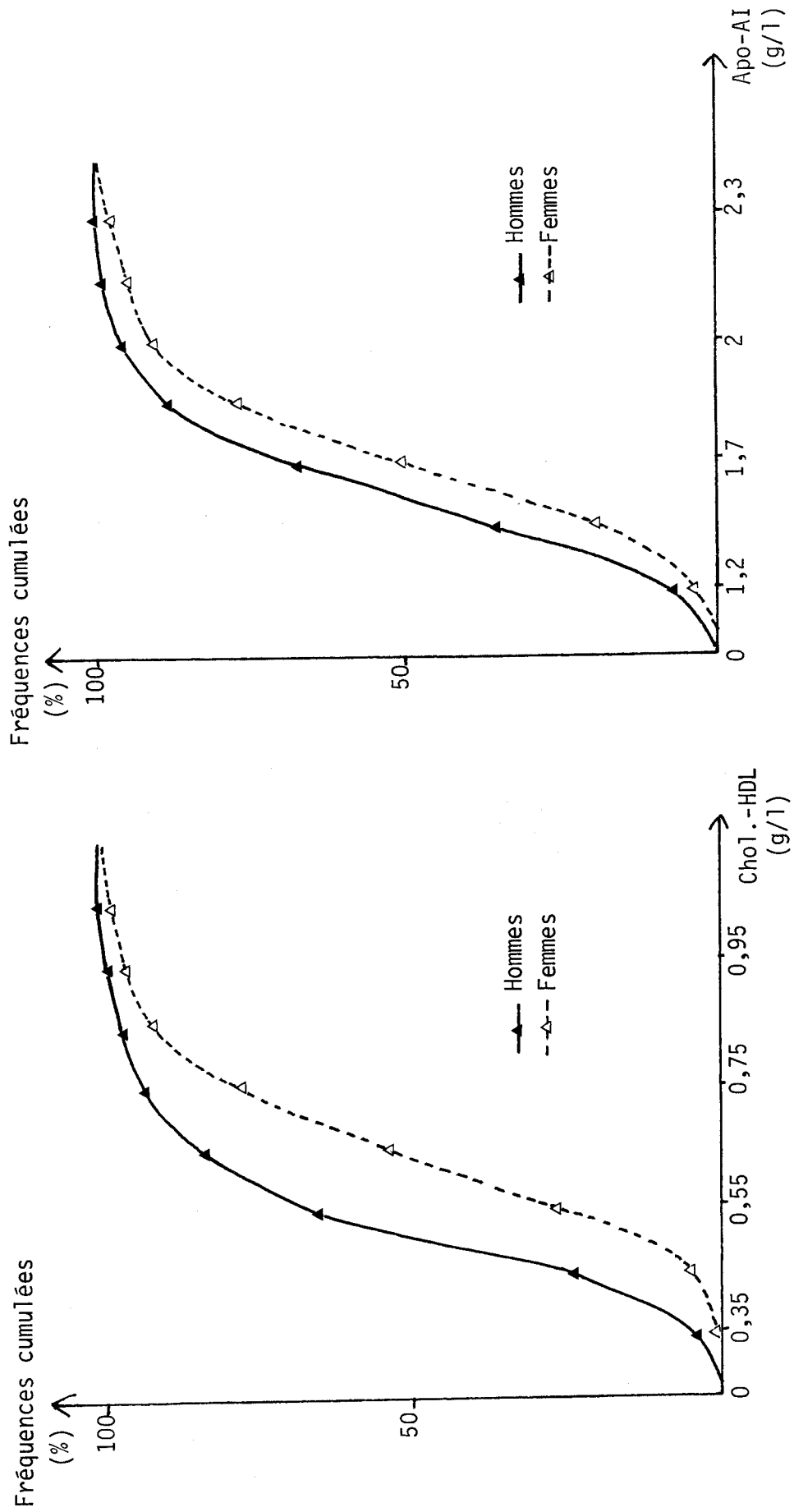


Figure 39

COURBES DE FREQUENCES CUMULEES DU CHOLESTEROL HDL ET DE L'APO A-I EN FONCTION DU SEXE

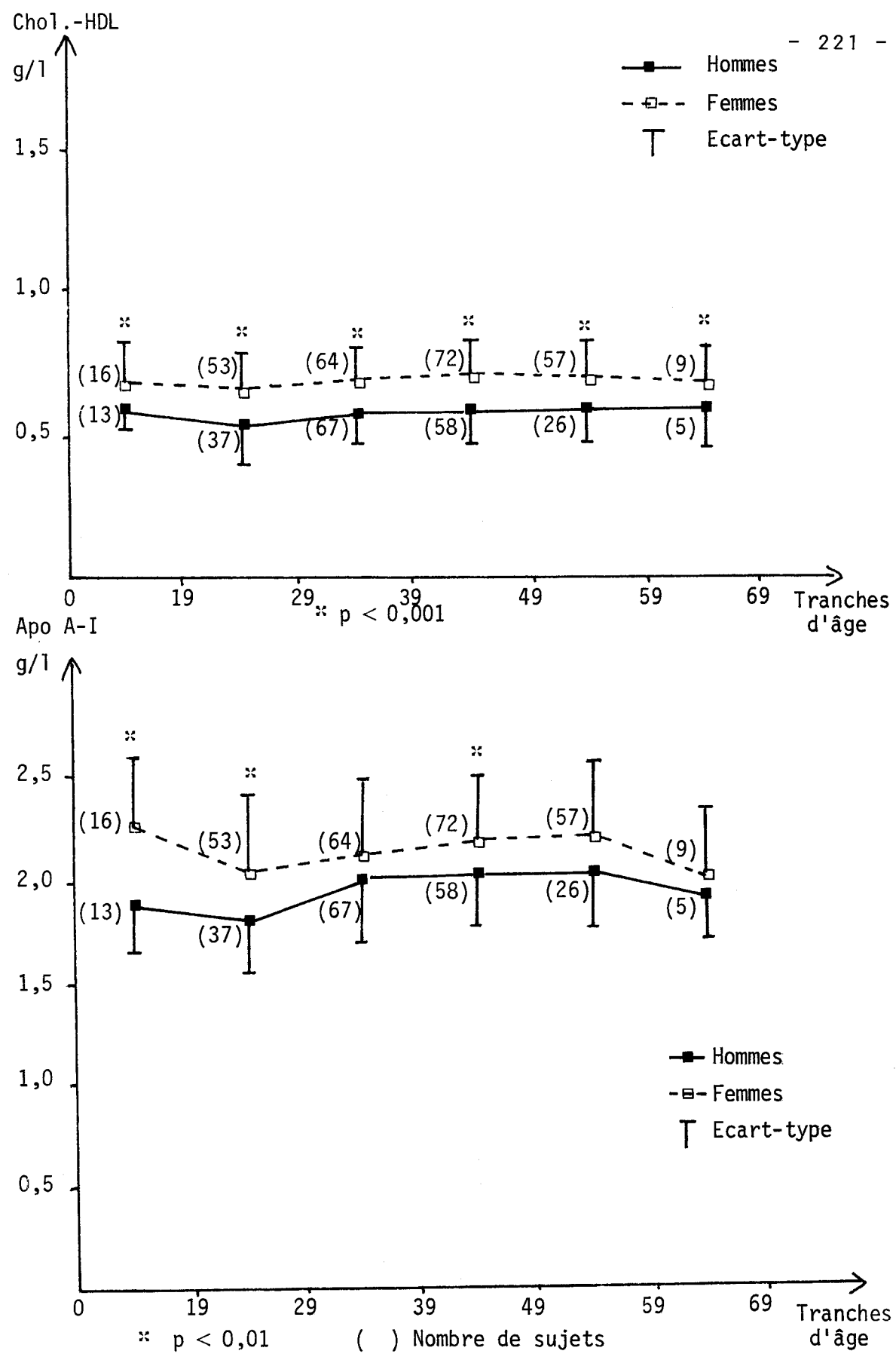


Figure 40

VARIATIONS DU CHOLESTEROL HDL ET DE L'APO A-I EN FONCTION DU SEXE ET DE L'AGE



à l'origine chez la femme mais non chez l'homme est statistiquement différente du zéro. Ces deux droites sont parallèles et le calcul statistique montre qu'il y a entre-elles un décalage d'environ + 9 %. Chez l'homme, la droite passe par l'origine et il y a donc proportionnalité des réponses ; chez la femme, l'ordonnée à l'origine est significativement différente de zéro ( $p < 0,001$ ), ce qui caractérise l'existence d'un biais additif.

c) Etude des rapports cholestérol VLDL + LDL / cholestérol HDL  
et Apo B / Apo A-I -

L'étude de la distribution de ces rapports montrent que la femme a des rapports plus faibles que l'homme (figures 41 et 42, pages 224 et 225) et que le décalage est plus marqué dans les deux sexes au niveau de celui des lipides.

D'autre part, d'après le tableau 34, page 223, et la figure 43, page 226, on note que ces deux rapports ne se modifient pas significativement chez l'homme en fonction de l'âge, alors qu'ils augmentent progressivement avec l'âge chez la femme de manière significative ( $p < 0,001$ ) pour aboutir après la ménopause à des valeurs voisines de celles que l'on observe chez l'homme.

Enfin, globalement, le rapport cholestérol VLDL + LDL / cholestérol HDL apparaît plus discriminant en moyenne que le rapport Apo B / Apo A-I, la différence entre les deux sexes étant plus significative par ce rapport ( $t = 6,52$  et  $4,64$ ).

d) Variations des triglycérides en fonction du sexe et de l'âge.  
Corrélations avec le cholestérol-HDL et l'Apo A-I.

La figure 44, page 227, objective les taux de triglycérides en fonction du sexe et de l'âge. La distribution a dans les deux sexes une allure dissymétrique avec un phénomène de traînée vers les valeurs élevées. Par la méthode de la droite de HENRY, il est aisé de démontrer qu'il s'agit de distributions Log-Normal. D'autre part, il n'y a pas de différence très significative ( $p < 0,005$ ) des valeurs moyennes de triglycérides entre les deux sexes ( $1,17 \pm 0,40$  g/l chez l'homme et  $1,08 \pm 0,44$  g/l chez la femme), et nous avons observé une augmentation progressive de la triglycéridémie avec l'âge (figure 44, page 227).

Les triglycérides apprécient essentiellement la concentration plasmatique en VLDL ; l'Apo A-I et le cholestérol-HDL apprécient la concentration en HDL. De ce fait, l'éventualité d'une relation VLDL-HDL peut donc être testée à l'aide

TABLEAU 34

RAPPORTS CHOLESTEROL(VLDL + LDL)/CHOLESTEROL-HDL ET APO B/APO A-I EN FONCTION DU SEXE ET DE L'AGE  
(Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-type)

| TRANCHES D'AGE                    | H O M M E S |                                 |                  | F E M M E S |                                 |                  |
|-----------------------------------|-------------|---------------------------------|------------------|-------------|---------------------------------|------------------|
|                                   | n           | Cho1. (VLDL + LDL)<br>Cho1.-HDL | Apo B<br>Apo A-I | n           | Cho1. (VLDL + LDL)<br>Cho1.-HDL | Apo B<br>Apo A-I |
| $\leq 19$                         | 13          | 2,47 $\pm$ 0,88                 | 0,73 $\pm$ 0,20  | 16          | 1,64 $\pm$ 0,42                 | 0,53 $\pm$ 0,10  |
| 20 - 29                           | 37          | 2,64 $\pm$ 0,94                 | 0,82 $\pm$ 0,23  | 53          | 1,95 $\pm$ 0,35                 | 0,68 $\pm$ 0,29  |
| 30 - 39                           | 67          | 2,39 $\pm$ 0,94                 | 0,78 $\pm$ 0,27  | 64          | 1,86 $\pm$ 0,88                 | 0,66 $\pm$ 0,24  |
| 40 - 49                           | 58          | 2,52 $\pm$ 0,69                 | 0,85 $\pm$ 0,20  | 72          | 1,97 $\pm$ 0,72                 | 0,69 $\pm$ 0,20  |
| 50 - 59                           | 26          | 2,57 $\pm$ 1,00                 | 0,82 $\pm$ 0,24  | 57          | 2,26 $\pm$ 0,79                 | 0,80 $\pm$ 0,20  |
| 60 - 69                           | 5           | 2,54 $\pm$ 0,78                 | 0,77 $\pm$ 0,24  | 9           | 2,43 $\pm$ 0,77                 | 0,83 $\pm$ 0,16  |
| TOTAL                             | 206         | 2,50 $\pm$ 0,87                 | 0,80 $\pm$ 0,24  | 271         | 2,00 $\pm$ 0,80                 | 0,70 $\pm$ 0,24  |
| Comparaison des<br>six moyennes : |             | NS                              | NS               |             | p < 0,001                       | p < 0,001        |

n : Nombre de cas étudiés



069

024



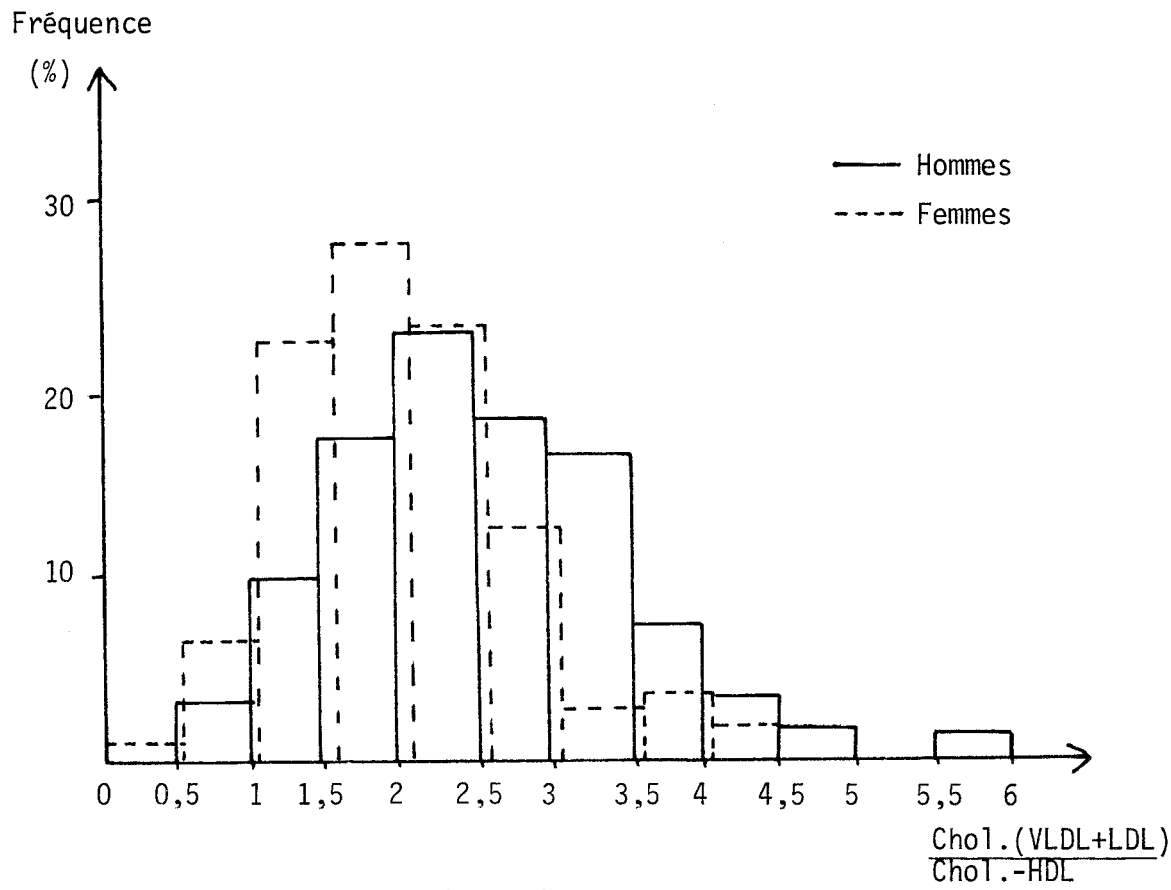
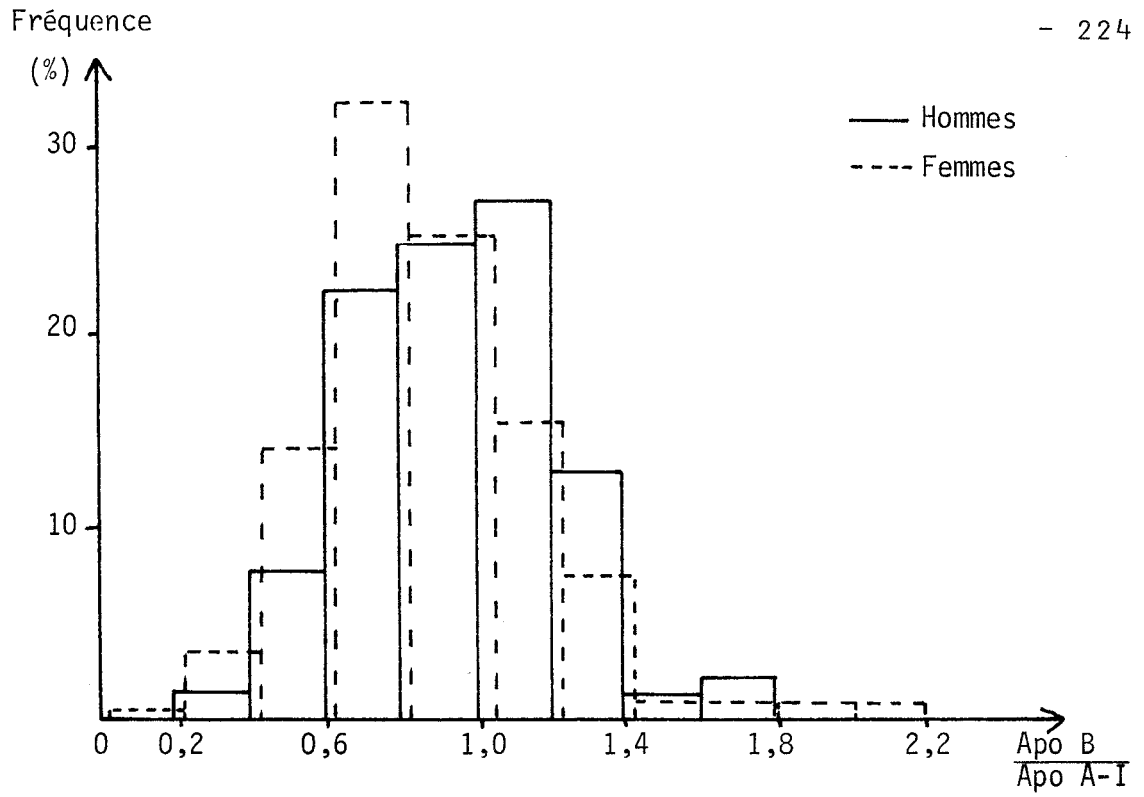


Figure 41

DISTRIBUTION DES RAPPORTS APO B/APO A-I ET  
CHOL.(VLDL+LDL)/CHOL.-HDL EN FONCTION DU SEXE



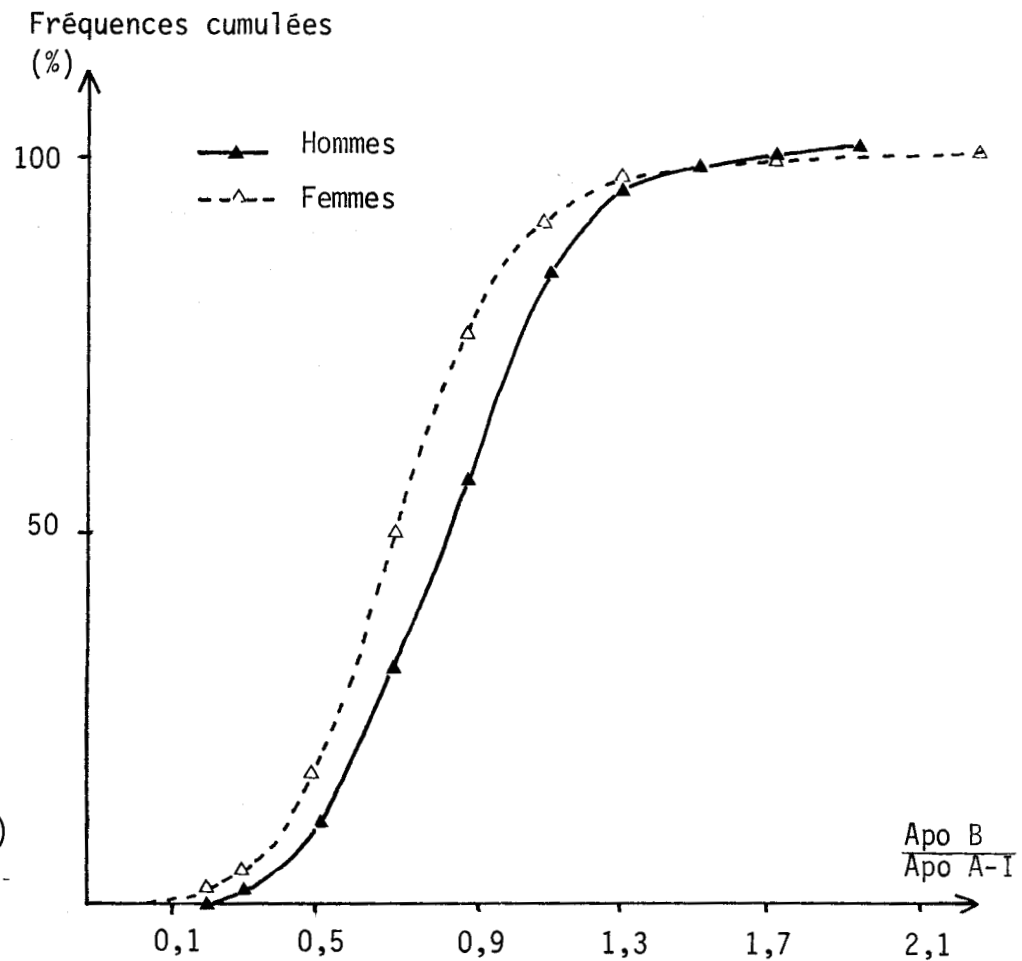
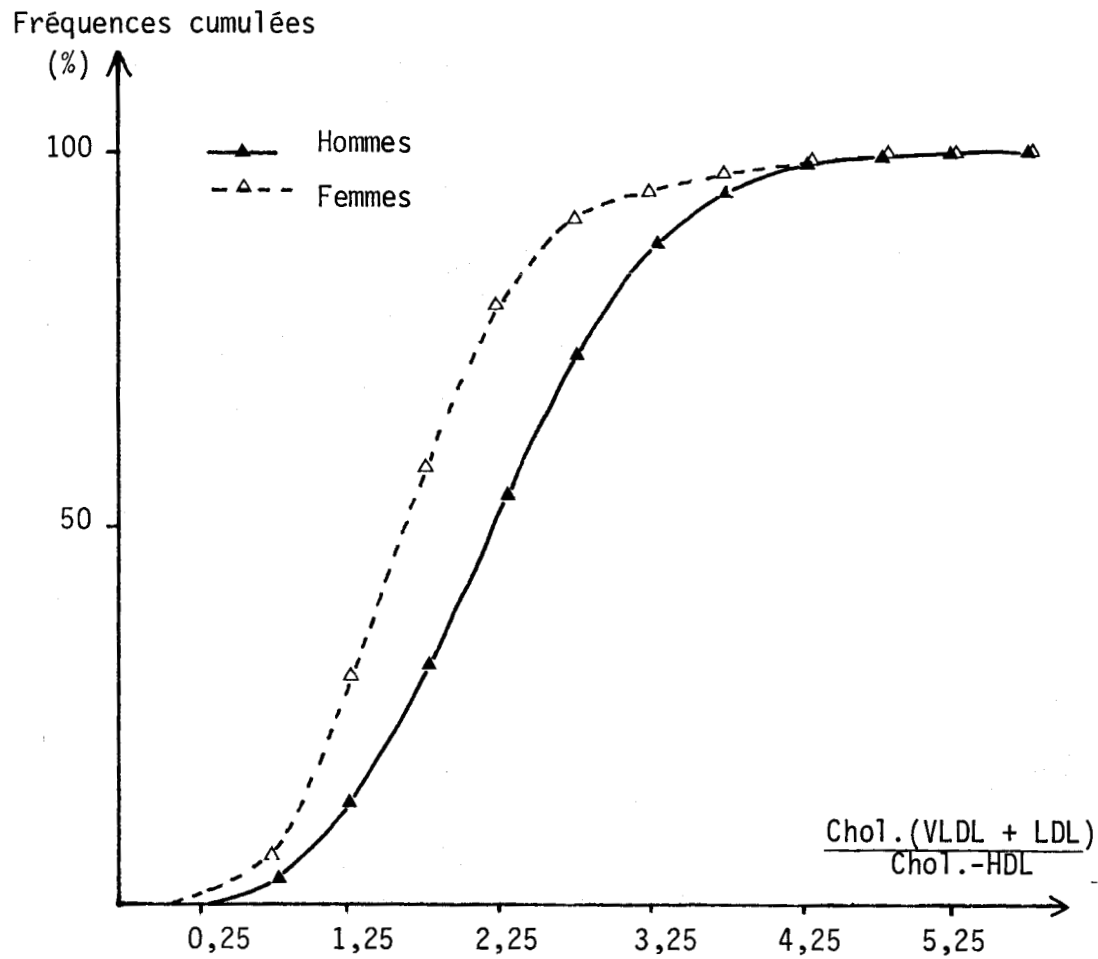


Figure 42

COURBES DE FREQUENCES CUMULEES DES RAPPORTS CHOL.(VLDL + LDL)/CHOL.-HDL ET APO B/APO A-I EN FONCTION DU SEXE



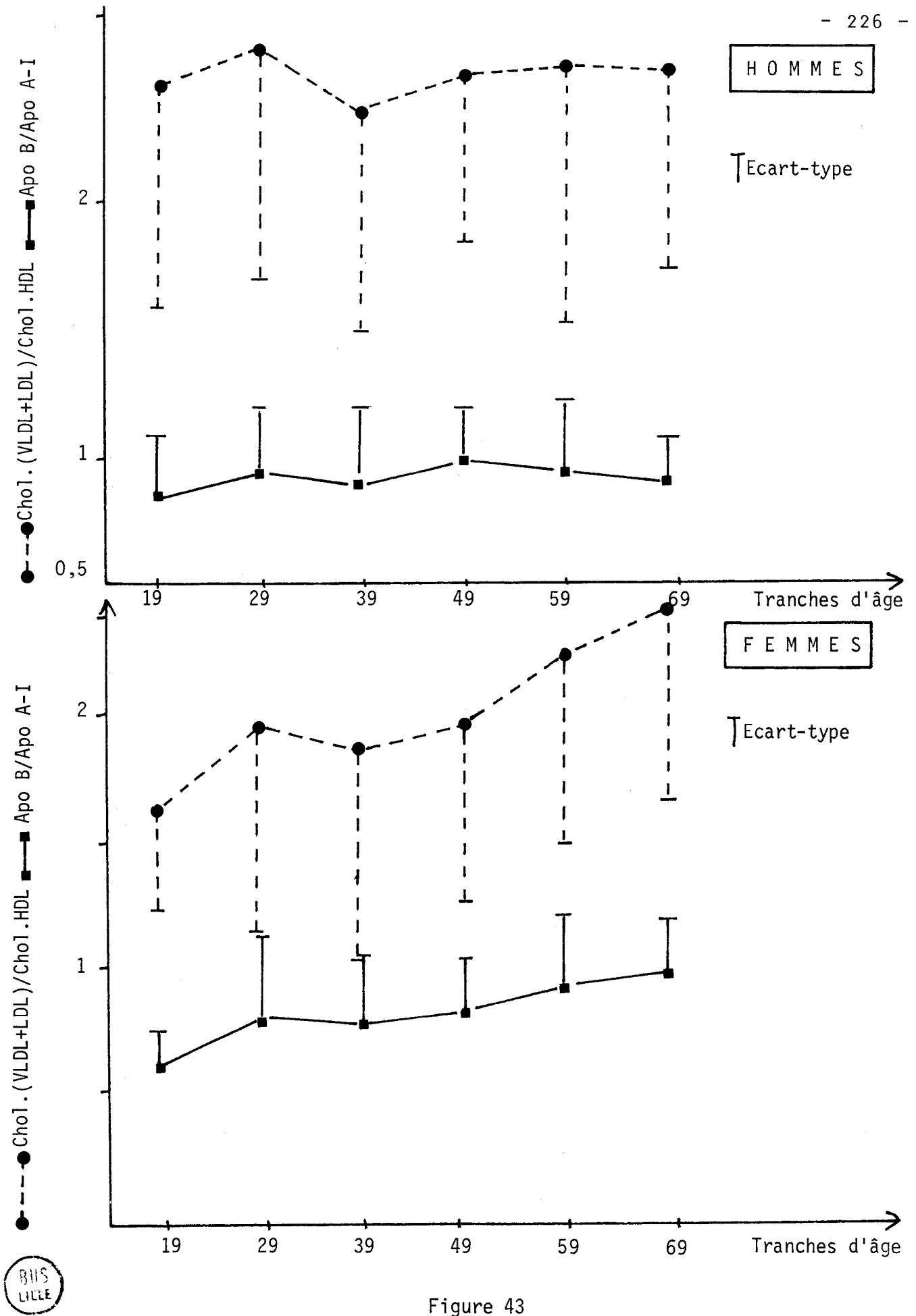


Figure 43

REPARTITION DES RAPPORTS CHOL.(VLDL + LDL)/CHOL.-HDL ET APO B/APO A-I EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE

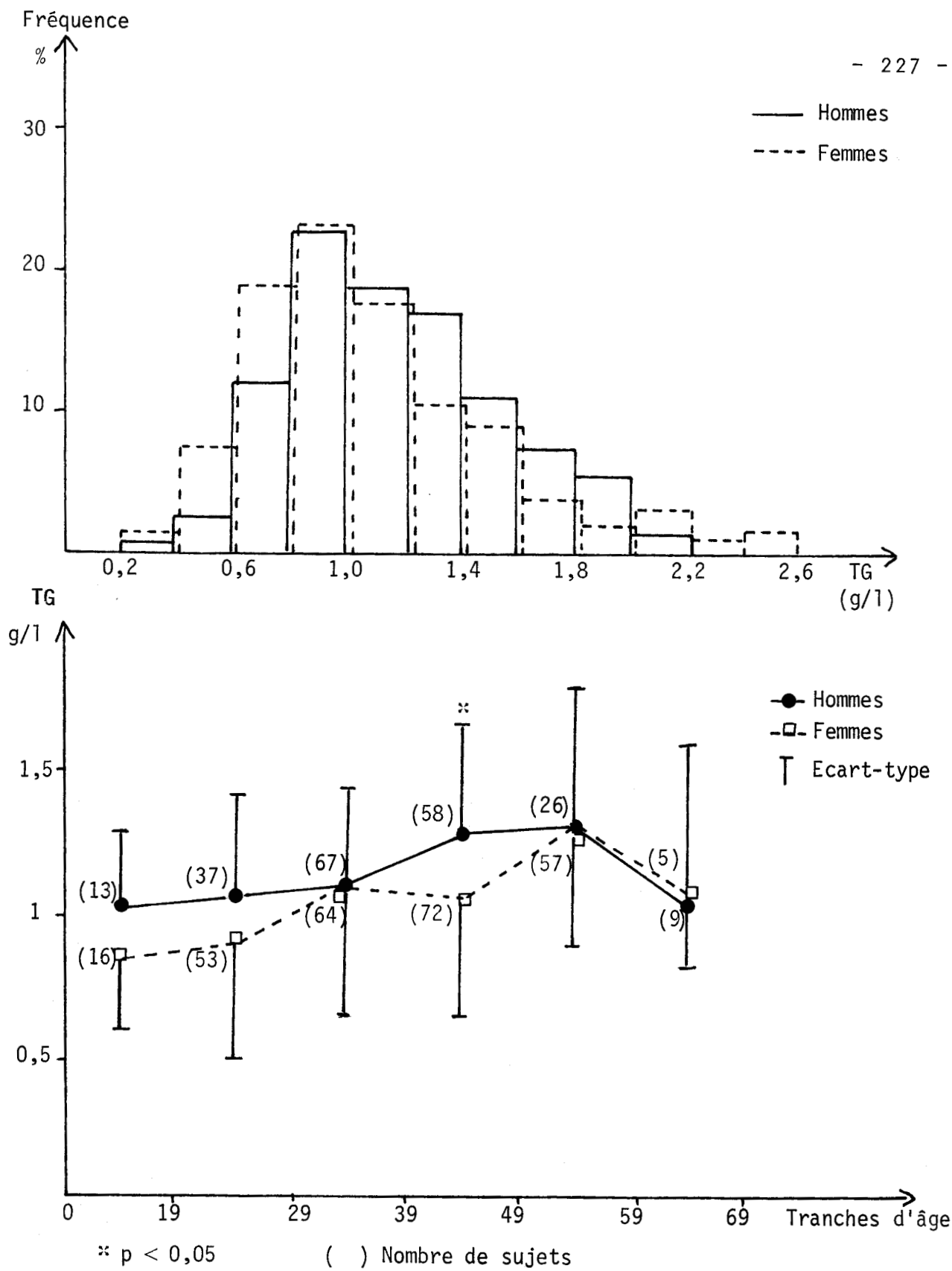


Figure 44

DISTRIBUTION ET VARIATIONS DES TRIGLYCERIDES (TG)  
 EN FONCTION DU SEXE ET DE L'AGE



du coefficient de corrélation établi soit entre Apo A-I et Log-triglycérides, soit entre cholestérol HDL et Log-triglycérides. Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons provenant de 454 sujets, sexes confondus, et tous les taux de triglycérides se répartissent régulièrement entre 0,45 à 2,25 g/l. Les corrélations obtenues entre le Log-triglycérides d'une part et le cholestérol HDL ou l'Apo A-I d'autre part sont significativement différentes de zéro et négatives ( $r = -0,273$ ,  $p < 0,001$  et  $r = -0,130$   $p < 0,01$  respectivement). En outre la corrélation apparaît meilleure sur la base du cholestérol-HDL que sur celle de l'Apo A-I.

e) Influence de l'index pondéral sur les différents paramètres en fonction du sexe -

Le poids idéal a été calculé selon la formule de LORENTZ et l'index pondéral (IP) correspond au rapport : poids réel/poids idéal. Dans cette étude, nous avons éliminé les sujets présentant une intoxication alcoolique. Ainsi, 453 sujets ont été retenus (199 hommes et 254 femmes) puis répartis en trois classes suivant leur index pondéral :  $IP \leq 0,99$ ,  $1 \leq IP \leq 1,19$  et  $IP \geq 1,20$  (tableau 35, page 229 ). Chez l'homme, on constate une diminution très significative du cholestérol -HDL et moins significative de l'Apo A-I lorsque l'index pondéral augmente. Il y a parallèlement une augmentation très significative des triglycérides, du cholestérol VLDL / LDL et de l'Apo B. Chez la femme, le cholestérol-HDL diminue de manière peu significative lorsque l'index pondéral augmente et l'Apo A-I ne varie pas significativement. Par contre, les triglycérides, le cholestérol VLDL + LDL et l'Apo B augmentent significativement avec l'index pondéral. De manière générale, on note enfin une corrélation négative significative entre l'index pondéral et le cholestérol-HDL tant chez l'homme ( $r = -0,18$ ,  $p < 0,01$ ) que chez la femme ( $r = 0,15$ ,  $p < 0,05$ ), alors que la corrélation négative entre l'index pondéral et l'Apo A-I n'est pas significative.

f) Influence de l'alcool sur le cholestérol-HDL et l'Apo A-I -

Afin de procéder à des études statistiques, nous avons en fonction de l'interrogatoire, déterminé un index de consommation alcoolique (IA). Cet index correspond au rapport de l'alcool consommé (g/jour) sur le poids corporel (Kg). Dans cette étude, 197 hommes et 244 femmes ont été retenus. Nous avons ainsi trouvé une corrélation très significativement positive entre IA et le

TABEAU 35

INFLUENCE DE L'INDEX PONDERAL (I.P.) SUR LES DIFFERENTS PARAMETRES EN FONCTION DU SEXE  
(Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-type)

| I. P.  | H O M M E S (199) |                                |                                |                                |                                |                              | F E M M E S (254) |                                |                                |                                |                              |                          |
|--------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------|
|        | n                 | VLDL + LDL (g/l)               |                                |                                | HDL (g/l)                      |                              | n                 | VLDL + LDL (g/l)               |                                |                                | HDL (g/l)                    |                          |
|        |                   | Chol                           | Apo B**                        | TG**                           | Chol                           | Apo AI**                     |                   | Chol                           | Apo B**                        | TG**                           | Chol                         | Apo AI**                 |
| < 0,99 | 46                | 1,20<br>$\pm$ 0,32             | 1,11<br>$\pm$ 0,30             | 1,00<br>$\pm$ 0,31             | 0,63<br>$\pm$ 0,14             | 1,70<br>$\pm$ 0,28           | 81                | 1,16<br>$\pm$ 0,27             | 1,07<br>$\pm$ 0,24             | 0,92<br>$\pm$ 0,33             | 0,71<br>$\pm$ 0,14           | 1,76<br>$\pm$ 0,28       |
| 1-1,19 | 110               | 1,38<br>$\pm$ 0,30<br>p<0,001  | 1,31<br>$\pm$ 0,29<br>p<0,001  | 1,17<br>$\pm$ 0,36<br>p<0,01   | 0,56<br>$\pm$ 0,11<br>p<<0,001 | 1,60<br>$\pm$ 0,26<br>p<0,05 | 110               | 1,34<br>$\pm$ 0,40<br>p<0,001  | 1,22<br>$\pm$ 0,37<br>p=0,001  | 1,08<br>$\pm$ 0,43<br>p<0,01   | 0,69<br>$\pm$ 0,13<br>NS     | 1,80<br>$\pm$ 0,30<br>NS |
| > 1,20 | 43                | 1,55<br>$\pm$ 0,32<br>p<<0,001 | 1,44<br>$\pm$ 0,23<br>p<<0,001 | 1,34<br>$\pm$ 0,46<br>p<<0,001 | 0,54<br>$\pm$ 0,09<br>p<<0,001 | 1,62<br>$\pm$ 0,26<br>NS     | 63                | 1,43<br>$\pm$ 0,32<br>p<<0,001 | 1,36<br>$\pm$ 0,31<br>p<<0,001 | 1,29<br>$\pm$ 0,55<br>p<<0,001 | 0,66<br>$\pm$ 0,14<br>p<0,05 | 1,71<br>$\pm$ 0,26<br>NS |

\* Triglycérides (TG), Apo B et Apo A-I mesurés dans le plasma entier

n : Nombre de cas étudiés



cholestérol-HDL tant chez l'homme ( $r = +0,316$ ,  $p < 0,001$ ) que chez la femme ( $r = +0,216$ ,  $p < 0,001$ ). La corrélation est du même ordre si on la calcule avec l'Apo A-I chez l'homme ( $r = +0,315$ ,  $p < 0,001$ ) ou chez la femme ( $r = + 0,293$ ,  $p < 0,001$ ). Enfin nous n'avons pas trouvé de corrélation entre cet index de consommation alcoolique corrigée et le cholestérol VLDL + LDL dans l'un ou l'autre sexe.

En conclusion, l'effet de l'alcool sur les HDL est indiscutable, provoquant une augmentation de la concentration plasmatique de ces LP. Par contre, dans les conditions de l'expérimentation, l'alcool n'a aucun effet significatif sur les LP de basse densité.

Le rapport LP-B / LP-A diminue donc sous l'effet de l'alcool, et le risque athérogène est diminué.

#### g) Influence du tabac sur le cholestérol-HDL et l'Apo A-I -

Afin d'analyser l'influence du tabac, nous avons été amené à éliminer l'intoxication alcoolique correspondant à une valeur IA > 1. Trois groupes de sujets des deux sexes ont été définis (tableau 36, page 231), distinguant les non fumeurs, les fumeurs moyens (15 cigarettes/jour) et les grands fumeurs (plus de 15 cigarettes/jour). L'étude a permis de mettre en évidence une diminution faiblement significative des taux de cholestérol-HDL et d'Apo A-I dans les deux sexes entre les grands fumeurs et les non fumeurs, et de conclure que le tabac contribue à diminuer la concentration des HDL plasmatique (10 % environ pour les grands fumeurs).

#### h) Influence des contraceptifs sur le cholestérol-HDL et l'Apo A-I -

Dans cette étude, 227 femmes ne prenaient pas de contraceptifs oraux (A) ; par contre 44 y étaient soumises, soit 16 % (B). Alors que sous l'effet des contraceptifs nous n'avons observé qu'une très faible baisse, non significative, de la concentration en Apo A-I, celle du cholestérol-HDL est par contre diminuée de façon très significative ( $p < 0,001$ ) (tableau 37, page 232).

#### i) Définition d'une population normale -

Afin de définir la population normale, nous avons exigé les valeurs suivantes : cholestérol total  $\leq 2,8$  g/l, triglycérides  $\leq 1,6$  g/l, index pondéral  $\leq 1,15$ , index de consommation d'alcool  $\leq 0,9$ , consommation tabagique  $\leq 15$  cigarettes/jour et aucun contraceptif oral chez la femme. Ainsi,

TABLEAU 36

INFLUENCE DU TABAC SUR LE CHOLESTEROL-HDL ET L'APO A-I EN FONCTION DU SEXE  
(Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-type)

|   | H O M M E S |                               |                                | F E M M E S |                                |                  |
|---|-------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|------------------|
|   | n           | CHOL-HDL<br>(g/l)             | APO A-I<br>(g/l)               | n           | CHOL-HDL<br>(g/l)              | APO A-I<br>(g/l) |
| A | 69          | <sup>**</sup> 0,59 $\pm$ 0,11 | <sup>***</sup> 1,73 $\pm$ 0,32 | 226         | <sup>***</sup> 0,71 $\pm$ 0,14 | 1,82 $\pm$ 0,30  |
| B | 45          | 0,56 $\pm$ 0,13               | 1,62 $\pm$ 0,30                | 29          | 0,66 $\pm$ 0,18                | 1,73 $\pm$ 0,34  |
| C | 50          | <sup>**</sup> 0,54 $\pm$ 0,12 | <sup>***</sup> 1,57 $\pm$ 0,32 | 11          | <sup>***</sup> 0,60 $\pm$ 0,16 | 1,64 $\pm$ 0,35  |

\* p < 0,05      \*\*\* p < 0,02

A : non fumeurs ; B : fumeurs moyens (< 15 cig/j) et C : grands fumeurs (> 15 cig/j)





TABLEAU 37

INFLUENCE DES CONTRACEPTIFS ORAUX  
 SUR LE CHOLESTEROL-HDL ET L'APO A-I  
 (Moyenne  $\pm$  Ecart-type)

|                       | A<br>(n = 227)  | B<br>(n = 44)   | VARIATION | SIGNIFICATION |        |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------|---------------|--------|
|                       |                 |                 |           | t             | p      |
| Cholestérol-HDL (g/l) | 0,71 $\pm$ 0,15 | 0,63 $\pm$ 0,12 | - 12 %    | 3,6           | <0,001 |
| Apo A-I (g/l)         | 1,80 $\pm$ 0,30 | 1,74 $\pm$ 0,28 | - 2,9 %   | 1,0           | NS     |

A : Femmes ne prenant pas de contraceptifs oraux

B : Femmes prenant des contraceptifs oraux

n = nombre de cas étudiés



sur la population ambulatoire examinée, 173 hommes et 106 femmes ont été retenus et nous ont permis d'établir les valeurs moyennes des différents paramètres en fonction du sexe dans ces deux populations considérées comme normales (tableau 38, page 234). Entre les deux sexes, les différences sont significatives pour le cholestérol-HDL, le rapport cholestérol VLDL + LDL sur cholestérol-HDL puis l'Apo A-I et le rapport Apo B sur Apo A-I. Tous sexes confondus, dans les plus mauvaises conditions, le cholestérol HDL doit être supérieur à 0,40 g/l, l'Apo A-I à 1,2 g/l, le cholestérol VLDL + LDL inférieur à 1,90 g/l et l'Apo B à 1,70 g/l.

#### 4°) Discussion -

Cette étude confirme un certain nombre de faits connus quant aux variations du cholestérol VLDL + LDL, du cholestérol-HDL ou des apoprotéines B et A-I en fonction du sexe et de l'âge (23). L'ensemble de ces résultats montre que la femme tout au moins jusqu'à la ménopause est mieux protégée que l'homme vis-à-vis de l'athérosclérose, les LPathérogènes (VLDL et LDL) étant en concentration plus faible et inversement les LP anti-athérogènes (HDL) en concentration plus élevée. Concernant le cholestérol VLDL + LDL et l'Apo B, on note une élévation progressive en fonction de l'âge tant chez l'homme que chez la femme, tandis que le cholestérol -HDL et l'Apo A-I sont relativement stables dans les deux sexes (12).

D'autre part, les corrélations entre le cholestérol VLDL + LDL et l'Apo B d'une part, entre le cholestérol HDL et l'Apo A-I d'autre part, sont dignes d'intérêt. En effet, si les droites de régression cholestérol VLDL + LDL et Apo B sont indépendantes du sexe, celles qui relient le cholestérol HDL et l'Apo A-I ne le sont pas ; elles sont parallèles certes mais non confondues, et pour une même quantité d'Apo A-I, on a 9 % de cholestérol-HDL en plus chez la femme. Ainsi chez la femme, l'équation de la droite de régression ne passe pas par l'origine ce qui semble indiquer que le cholestérol HDL n'est pas uniquement fonction de l'Apo A-I. En d'autres termes, au spectre des LP de haute densité semblent correspondre différentes LP contenant du cholestérol dont une fraction n'est pas prise en compte par le dosage de l'Apo A-I. Ceci semble corroborer l'hypothèse d'ALAUPOVIC (2) selon laquelle les HDL constituent un spectre inhomogène contenant différentes LP (LP-A, LP-C, LP-E, LP-D, LP-F,...) dont certaines (LP-C, LP-E) reflètent par ailleurs l'activité du processus lipolytique dans la mesure où elles sont l'expression de la dégradation des VLDL sous l'effet de la LPL (4). En effet, selon cette hypothèse, les LP dites

BIS  
LILLE

TABLEAU 38

DEFINITION D'UNE POPULATION NORMALE SANS FACTEURS DE RISQUE CHEZ L'HOMME ET CHEZ LA FEMME  
(Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-type)

|                                                      | HOMMES (73)     | FEMMES (106)    | P            |
|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| CHOL (VLDL + LDL) (g/l)                              | 1,32 $\pm$ 0,28 | 1,24 $\pm$ 0,31 | NS           |
| APO B (g/l)                                          | 1,19 $\pm$ 0,25 | 1,13 $\pm$ 0,20 | NS           |
| CHOL (HDL) (g/l)                                     | 0,58 $\pm$ 0,11 | 0,74 $\pm$ 0,13 | $\lll$ 0,001 |
| APO A-I (g/l)                                        | 1,65 $\pm$ 0,26 | 1,81 $\pm$ 0,58 | < 0,001      |
| $\frac{\text{CHOL (VLDL + LDL)}}{\text{CHOL (HDL)}}$ | 2,33 $\pm$ 0,67 | 1,74 $\pm$ 0,61 | $\lll$ 0,001 |
| $\frac{\text{APO B}}{\text{APO A-I}}$                | 0,75 $\pm$ 0,20 | 0,64 $\pm$ 0,18 | < 0,001      |

"secondaires" correspondant aux VLDL et contenant plusieurs apoprotéines se dissocient lors du processus lipolytique en libérant des LP "primaires" contenant du cholestérol et se caractérisant par une seule apoprotéine telle que l'Apo C ou l'Apo E (LP-C, LP-E) qui rejoignent alors le spectre de densité des HDL (263). Ainsi, l'élévation du cholestérol-HDL en accord avec différents travaux semble en partie refléter la qualité du processus lipolytique qui apparaît meilleur chez la femme que chez l'homme (255).

Comme cela était prévisible, une corrélation existe entre l'Apo A-I et le cholestérol-HDL, mais l'intensité de la liaison n'est pas élevée et 47 % seulement de la variabilité sont expliqués par la liaison. Les erreurs de méthode peuvent être en cause, mais il peut aussi s'agir d'une répartition variable d'un individu à l'autre des HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> au sein de l'ensemble HDL, ces sous-fractions n'ayant pas la même composition.

Compte tenu des différences observées au niveau du cholestérol-HDL entre les deux sexes, le rapport cholestérol VLDL + LDL / cholestérol-HDL apparaît ainsi dans notre étude plus discriminant que le rapport Apo B / Apo A-I. On est donc en droit de se poser la question tout au moins dans une population ambulatoire, de savoir si le rapport du cholestérol n'est pas plus digne d'intérêt que le rapport des apoprotéines dans l'évaluation approximative du risque athérogène. Il serait néanmoins intéressant d'évaluer le pouvoir de tels rapports dans des populations à haut risque, comme chez des patients relevant d'infarctus du myocarde.

Les corrélations obtenues par ailleurs entre le logarithme des triglycérides et le cholestérol-HDL ou l'Apo A-I, reflètent les mêmes interrelations. En effet, la corrélation est significativement négative dans les deux cas comme ceci a été démontré par différents auteurs précédemment (305). D'autre part, cette corrélation est meilleure avec le cholestérol-HDL que l'Apo A-I, l'élévation des triglycérides étant le reflet d'un ralentissement du processus lipolytique.

Cette étude met en exergue également l'influence de l'index pondéral sur les différents paramètres en fonction du sexe. En effet, on note chez l'homme et chez la femme une augmentation parallèle de l'index pondéral et de la concentration en VLDL appréciée indirectement par le taux de triglycérides et en LDL comme en témoigne notamment l'élévation de l'Apo B. Dans la genèse de cette augmentation des LP légères, on doit invoquer un double mécanisme mettant en jeu un ralentissement du processus lipolytique (163) et une production accrue de VLDL par le foie (279). Inversement, le cholestérol-HDL en premier lieu et l'Apo A-I accessoirement diminuent significativement tandis que l'index pondéral augmente (24). Néanmoins, si les variations des triglycérides ou de la concentration

en VLDL ET LDL sont similaires dans les deux sexes en fonction de l'index pondéral, il n'en est pas de même du cholestérol-HDL dont les valeurs ne diminuent que faiblement chez la femme. En d'autres termes, malgré une augmentation de l'index pondéral, la femme présente une diminution moindre du cholestérol-HDL compte tenu probablement d'un processus lipolytique globalement plus efficace. Ainsi, les modifications des LP en fonction de l'index pondéral sont une illustration supplémentaire des différences fondamentales existant entre les deux sexes au niveau du processus lipolytique. Il resterait évidemment à déterminer l'origine de ces différences : activité des enzymes lipolytiques, composition des LP.

Quant aux effets de l'alcool ou du tabac sur les paramètres étudiées, ils rejoignent l'ensemble des données de la littérature. L'alcool augmente de la même manière le cholestérol-HDL et l'Apo A-I, ceci semblant indiquer un effet propre de l'alcool sur la synthèse hépatique des HDL (394). Les corrélations obtenues entre la consommation d'alcool et la concentration plasmatique en HDL sont par ailleurs meilleures chez les hommes que chez les femmes. Ceci peut s'expliquer dans notre étude par une ingestion d'alcool plus fréquente et plus importante en moyenne chez les hommes.

Sous l'effet des contraceptifs oraux, nous obtenons une chute très importante du cholestérol-HDL, sans variation significative des Apo A-I ; ces résultats sont en accord avec ceux d'ALBERS et coll. (12). On peut alors supposer une modification de la charge en cholestérol des LP et/ou un effet de ces agents pharmacologiques sur la répartition plasmatique des HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>, entraînant en particulier une augmentation des HDL<sub>3</sub> dont le rapport cholestérol / protéines est inférieur à celui des HDL<sub>2</sub>.

Dans la littérature, les effets des contraceptifs oraux sur le métabolisme des lipides et des LP apparaissent très contradictoires (306). En définitive il semble qu'ils soient essentiellement fonction de la composition respective de ces composés en oestrogènes et progestatifs, c'est à dire de la formule chimique (376), les oestrogènes augmentant la concentration en HDL<sub>2</sub> (29) et les progestatifs diminuant le cholestérol-HDL (81). Ainsi, les femmes sous contraceptifs oraux comportant une association oestrogène-progestatif présentent des variations qui sont directement fonction de la teneur de l'un ou de l'autre des composés. Pour d'autres auteurs (376), les hormones entraînent une modification de la distribution des lipides dans les LP et de ce fait les résultats obtenus semblent divergents suivant que l'on apprécie la concentration en LP en termes de celle du cholestérol, des triglycérides, des phospholipides, des apoprotéines ou des LP totales.

Enfin, la définition d'une population normale se trouve confrontée avec des normes plus ou moins arbitraires qui sont fonction de la population étudiée. Néanmoins, les chiffres retenus gardent à notre avis une bonne valeur indicative tout au moins en routine. Ceci met en évidence par ailleurs les difficultés rencontrées en pratique courante en face de cas particuliers de dyslipidémies proches des valeurs limites, toutes modifications du bilan lipidique ou apoprotéique devant théoriquement être comparées avec une valeur basale.

#### 5- CONCLUSION -

Cette étude montre l'intérêt de doser les différents paramètres caractérisant les LP athérogènes ou anti-athérogènes, et pose par ailleurs l'important problème de définir quels sont précisément ces paramètres.

En effet, la définition d'un indice d'athérogénéité soulève actuellement une certaine polémique et certains auteurs préfèrent quantifier ces LP par le biais du cholestérol qu'elles contiennent (80) plutôt que par celui de leurs apoprotéines majeures (22, 48).

On peut rappeler d'emblée, que ce soit au niveau du dosage du cholestérol, et plus particulièrement de celui des HDL, ou au niveau de celui des apoprotéines, que les variations doivent être analysées en fonction des valeurs normales du laboratoire. L'estimation du cholestérol des LP de basse densité se fait par différence du cholestérol total et du cholestérol-HDL ; les erreurs de dosage s'ajoutent, et si dans notre étude, comparé au rapport Apo B/Apo A-I, celui du cholestérol VLDL + LDL/cholestérol HDL apparaît comme l'un des meilleurs indices de prédiction d'athérosclérose, il faut remarquer que sur le plan méthodologique la détermination des apoprotéines est meilleure, les coefficients de variation étant inférieurs à ceux obtenus pour le rapport des lipides (figure 43 page 226). De plus, la différence moyenne des taux du cholestérol-HDL entre des malades atteints d'infarctus du myocarde et des sujets sains servant de contrôle n'est que de 3,8 ml/dl (soit 0,09 mmole/litre). Cette différence est très faible et réclame pour être détectée avec précision une grande rigueur et une grande spécificité. Dans ce but il existe actuellement d'excellentes techniques d'appréciation du cholestérol-HDL que le biologiste doit pouvoir sélectionner.

Alors que le cholestérol ne représente que 15 à 20 % du poids total des HDL, les apoprotéines en constituent 50 % dont 70 % sont de l'Apo A-I. De ce fait, les apoprotéines peuvent représenter un meilleur critère de détermination, mais nous avons soulevé tout au long de ce travail les nombreuses difficultés de dosage des apoprotéines, celles-ci étant de très mauvais standards.

Certains auteurs, ayant montré que les HDL de sujets hypertriglycéridémiques étaient marquées par un enrichissement en triglycérides (175) et une baisse du cholestérol (308) pensent qu'il est délicat d'estimer une concentration de HDL sur la base de celle du cholestérol qu'elles contiennent, une modification de ce taux pouvant refléter simplement une variation de leur composition sans obligatoirement affecter la concentration de ces LP.

Cependant, la charge en cholestérol des LP paraît être plus intéressante à connaître que les LP transporteuses elles-mêmes. En effet, "l'ennemi" des parois artérielles est bien plus précisément le cholestérol transporté par les LDL ; de même, au niveau des HDL, c'est essentiellement leur richesse en cholestérol qui reflète un bon fonctionnement d'épuration cellulaire.

Très récemment, AVOGARO et coll. (22) comparent l'importance de l'information apportée par le dosage des lipides (cholestérol total, triglycérides, cholestérol-HDL) à celle fournie par celui des Apo B et A-I dans une population de 218 survivants d'infarctus du myocarde et de 160 sujets sains âgés de 30 à 80 ans. Ils montrent que, si déjà dans la 6<sup>è</sup> décennie les taux de cholestérol et triglycérides ne diffèrent plus de façon significative entre les deux groupes, ceux des apoprotéines sont par contre sélectifs beaucoup plus longtemps, l'Apo A-I n'étant identique dans les deux groupes qu'à partir de la 8<sup>è</sup> décennie, et l'Apo B étant toujours augmenté chez les patients, quel que soit leur âge. Ainsi, l'analyse des lipides perd sa valeur discriminative avec l'âge, tandis que celle des LP la conserve. Les rapports cholestérol total/ Apo B et Apo A-I / Apo B sont diminués chez les malades indépendamment de leur âge, et un rapport faible cholestérol total / Apo B suppose l'existence, à côté de variations quantitatives de changements qualitatifs au niveau des LP, pouvant révéler par ailleurs une baisse de l'affinité et/ou une saturation de la protéine porteuse de cholestérol d'Apo B.

Ainsi, comme ALAUPOVIC l'indique (4), il peut sembler logique de considérer la partie protéique comme "le seul marqueur biochimique distinct" des LP.

Cependant, selon la théorie de ce dernier, et si l'on classe les LP en familles, il apparaît évident que le dosage de l'Apo A-I ne reflète que partiellement la concentration en HDL et se limite à celle de la famille LP A-I.

Ce problème n'est pas résolu à l'heure actuelle, et de nombreux auteurs discutent encore la solution la plus instructive quant à l'établissement d'un indice d'athérogénécité : s'agit-il du rapport cholestérol-HDL/cholestérol (VLDL+LDL), ou du rapport Apo B/Apo A-I ?

Je pense qu'il est très difficile de faire ce choix, et que comme ALBERS et coll. (10) l'ont écrit, il semble utile d'évaluer à la fois le cholestérol et l'apoprotéine au niveau des HDL, vu que les deux paramètres diminuent chez les sujets athéroscléreux mais qu'en plus le rapport cholestérol-HDL/Apo A-I est significativement plus bas chez les sujets athéroscléreux que chez les témoins.



CONCLUSION GENERALE

APPENDICE TECHNIQUE

\* Pendant longtemps l'exploration des lipides circulants s'est bornée au dosage de la cholestérolémie et de la triglycéridémie ; on sait maintenant que la signification des résultats est fonction de la variété de LP qui véhiculent ces fractions lipidiques et que le terme "d'hyperlypoprotéïnémie" devrait donc remplacer celui "d'hyperlipidémie".

\* L'isolement des LP peut faire appel à l'ultracentrifugation de flottation, méthode de référence, qui a l'inconvénient de la complexité ; nous avons montré l'intérêt, tant sur les plans qualitatifs que préparatifs ou quantitatifs, de l'électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide qui est douée d'un grand pouvoir de résolution. Le "Lipidotest" que nous avons, par ailleurs, mis au point et utilisé fournit, en la matière, une première approche.

\* L'électrophorèse préparative en colonne d'acrylamide nous a permis d'isoler une LP particulière, la LP(a) dont on sait qu'il s'agit d'un déterminant génétique et dont nous avons confirmé qu'elle se distingue par sa composition des autres LP connues. Il n'est pas exclu qu'elle ait un potentiel athérogène mais ceci n'est pas démontré.

\* L'isolement des apoprotéines représente un progrès supplémentaire dans l'exploration des LP ; nous nous sommes intéressés à l'Apo A-I, constituant essentiel des HDL "anti-athérogènes" et l'Apo B retrouvée en majeure partie au niveau des LDL, puissamment athérogènes. Nous disposons actuellement, avec les techniques que nous avons mises au point, de méthodes de dosage plasmatique très fiables et relativement simples. Ces techniques ont été appliquées au sein d'une population présumée saine et cette étude nous a permis d'établir certaines corrélations entre le taux d'apoprotéines et les valeurs du cholestérol HDL et LDL ; elle nous a d'autre part conduit à établir des rapports entre les résultats obtenus et l'incidence de facteurs d'environnement réputés athérogènes.

\* Il n'est pas exclu enfin que l'isolement et le dosage d'autres apoprotéines aboutissent à de nouveaux critères de classification des hyperlipoprotéïnémies.

## DOSAGE DES PROTEINES ( 226)

---

### I - 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  $\text{Cu}^{2+}$  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.

### II - REACTIFS

#### 1) SOLUTION A

Solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2 % (p/v) dans la soude 0,1 M et contenant 0,02 % (p/v) de tartrate double de Na et de K.

#### 2) SOLUTION B

Solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{g}$  de sérumalbumine/ml est réalisée par dilution dans de l'eau bidistillée d'une solution mère de sérumalbumine bovine titrant 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

\*\* Sérumalbumine bovine Pentex - Laboratoire Miles

### III - 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.

### IV - 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.

## CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES LIPIDES

### I - 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.

### II - REACTIFS

#### 1) SOLVANTS CLASSES PAR FORCE D'ELUTION CROISSANTE

Ether de pétrole,  
Chloroforme,  
Ether éthylique,  
Méthanol,  
Eau.

L'addition d'acide acétique augmente considérablement la force d'élu-tion. 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

### III - MATERIEL ET METHODES

#### 1) PLAQUES DE 20 x 20 mm

- Dégraisser à l'éther éthylique.

- Mélanger dans 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 min, commencer à développer.

3) TECHNIQUE

- Réactiver des plaques 10 min 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..... 180 ml<br>Ether éthylique..... 20 ml<br>CH <sub>3</sub> COOH pur..... 2 ml                 | Chloroforme..... 115 ml<br>Méthanol..... 45 ml<br>Ammoniaque 7 N..... 7,5 ml |
| REVELATION | Rhodamine 6 G : taches fluorescentes sous rayonnement ultra-violet à 360 nm.<br>Iode : taches brunes             |                                                                              |
| ELUTION    | Repérage des taches.<br>Grattage du gel correspondant.<br>Eluer les lipides dans un mélange d'extraction choisi. |                                                                              |

## DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES (277)

### I - PRINCIPE

Les phospholipides sont dosés sans minéralisation.

### II - REACTIFS

1) METHANOL

2) CHLOROFORME

3) SOLUTION CHROMOGENE

a) Solution A

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

b) Solution B

Prélever 80 ml de la solution A, ajouter 400 ml d'HCl concentré et 10 ml de mercure.

Agiter pendant 30 min et filtrer.

c) Solution C

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

d) Solution chromogène proprement dit

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

### III 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 min de refroidissement à température ambiante, 5 ml de chloroforme sont ajoutés. Après agitation et repos de 30 min, 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  $\mu\text{g}$  de phosphore lipidique.

## DOSAGE DES HEXOSES ( 362)

---

### I - 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.

### II - REACTIFS

#### 1) SOLUTION D'ORCINOL

Dissoudre 1,5 g d'orcinol dans une solution aqueuse d' $H_2SO_4$  pur à 30 % (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 % D' $H_2SO_4$ CONCENTRE (v/v)

#### 3) SOLUTIONS D'OSSES 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.

### III - 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 %.

Les tubes sont maintenus 20 minutes exactement dans un bain-marie réglé à  $80^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

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.

## DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES ( 250)

### I - 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.

### II - 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.

### III - 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/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.

#### IV - 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.

SEPARATION DES APOPROTEINES PAR ELECTROPHORESE  
SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE  
DE DODECYLSULFATE DE SODIUM (379)

---

I - 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.

II - 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'-tétraméthyléthyléthyldiamine (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.)

III - APPAREILLAGE

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

\* O.S.I., 15 rue de Javel, 75739 PARIS CEDEX 15

- Tubes de verre de 75 mm de long, 7 mm de diamètre extérieur et 5 mm de diamètre intérieur.
- Dispositif d'agitation (Prolabo).

#### IV - 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.

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 aliquôte 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 extrémité 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'extrémité inférieure du tube.

#### 5) COLORATION ET DECOLORATION

Après démoulage, les gels sont colorés d'après une adaptation de la méthode de FAIRBANKS, 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<br>Solution<br>d'acrylamide | II<br>Tampon phosphate<br>0,05 M - SDS 2 %<br>pH 7,1 | III<br>Tampon phosphate<br>0,025 M - SDS 1 %<br>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                                                |



## V - RESULTATS

L'analyse d'un mélange de lysozyme, d'antitrypsine, de sérumalbumine, de RNA-polymérase  $\beta$ , 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.

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 $\beta$ | 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 (Figure <sup>45</sup>, page , 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. Elles possèdent des valeurs de RM de 0,29 et 0,75 respectivement, et pourraient ainsi correspondre à des protéines de masse moléculaire respective 95.000 et 31.000.



tube A : albumine pure  
tube B : Apo-B pure  
tube C : LP(a) délipidée

a : Apo-LP(a) ?  
b : Apo-LP(a) ?  
c : Apo-B  
d : Albumine



Figure 45

ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS  
de l'Apo Lp(a)

APPLICATION DE LA PRECIPITATION SELECTIVE DES LIPOPROTEINES  
PAR LES POLYANIONS ET DETERGENTS A LA QUANTIFICATION  
DES LDL ET HDL PLASMATIQUES (388)

---

## I - 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 (page     ).
- Le dosage du cholestérol est effectué par chromatographie gazeuse (appendice technique, page     ).

## II - REACTIFS

### 1) SOLUTION DE LAURYSULFATE 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 <sub>2</sub> 1 M..... | 19,8 g |
| . Eau distillée.....         | 100 ml |

### 3) HEPARINATE DE SODIUM (Prolabo)

## III - TECHNIQUE

- Pour la séparation des HDL, 3 ml de plasma sont mélangés avec 0,15 ml de solution de MnCl<sub>2</sub> 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 3000 g pendant 20 minutes. Le cholestérol est dosé sur le surnageant, soit C<sub>3</sub>.

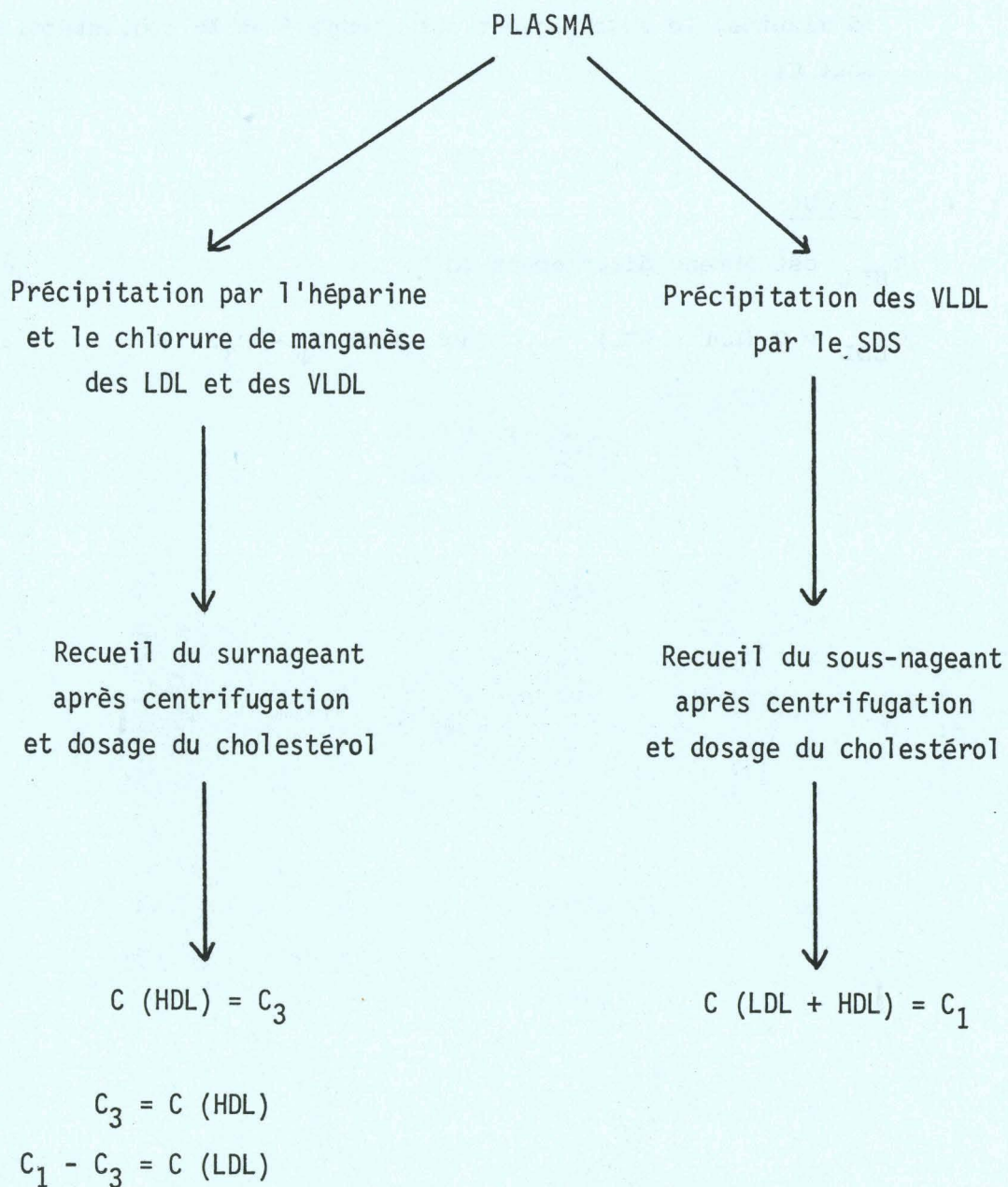


Schéma 1

PRECIPITATION SELECTIVE DES LIPOPROTEINES



- 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 3000 g pendant 15 minutes, le sous-nageant est récupéré et le cholestérol est dosé, soit  $C_1$ .

#### IV - CALCUL

$C_{HDL}$  est obtenu directement ( $C_3$ ).

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

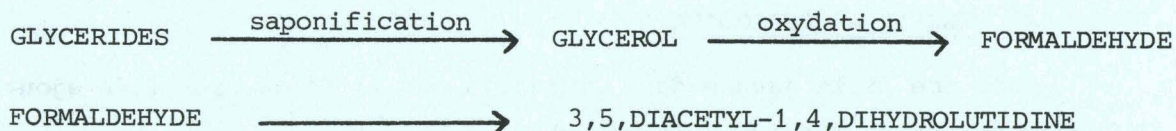
DOSAGE SIMULTANE DU CHOLESTEROL ET DES GLYCERIDES  
SUR AUTOANALYSEUR II (294)

---

I - PRINCIPE

A - DOSAGE DES GLYCERIDES

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



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 périodique. 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.

B - 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 prérefroidi 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<sub>2</sub>O distillée...q.s.p..... 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 2 M amené à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique 2 N.

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

Le réactif doit être préparé chaque jour.

6) MELANGE ADSORBANT

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 combinés 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                 |

## II - 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.

## III - DOSAGE

Le schéma de montage figure à la page suivante.

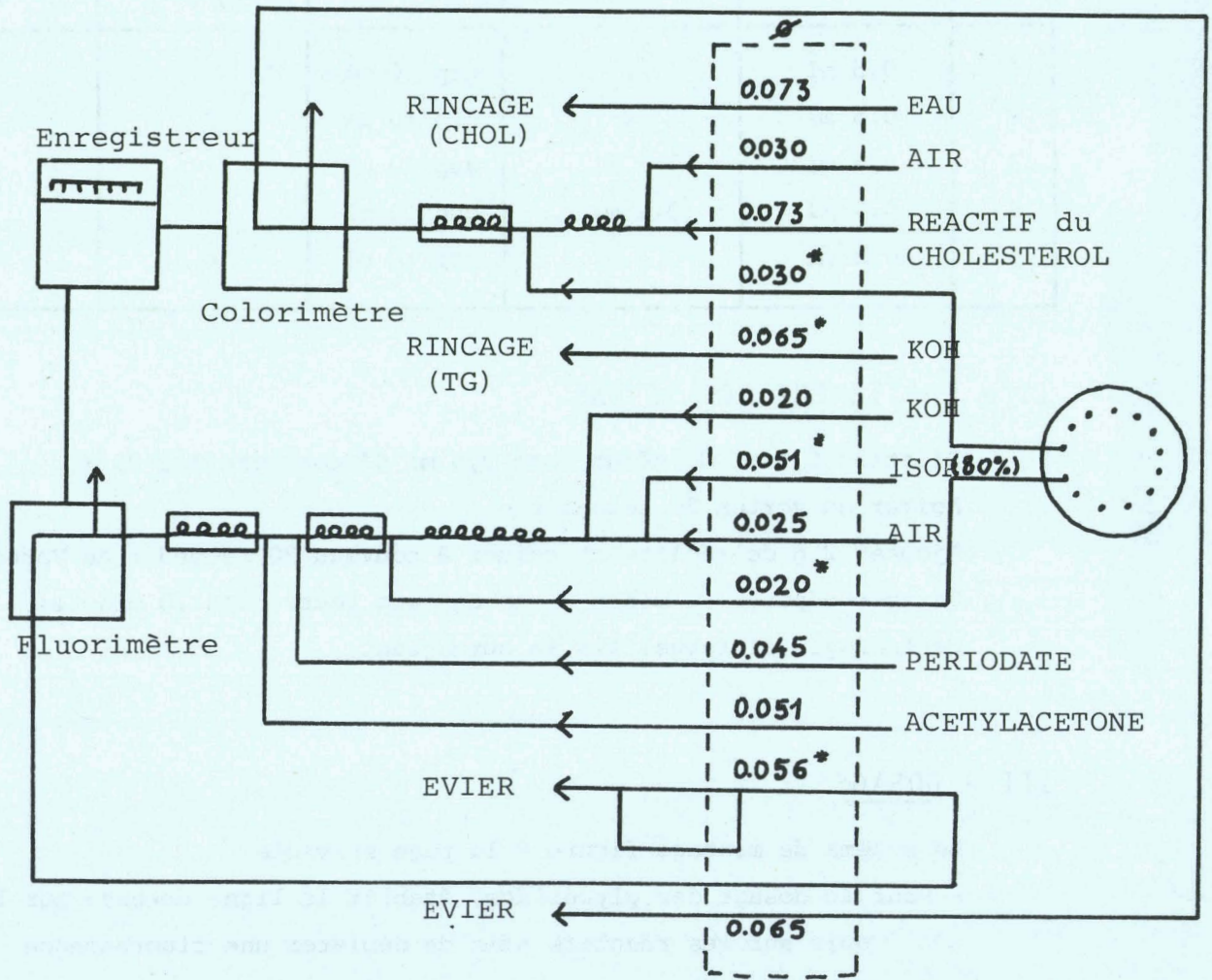
- Pour le dosage des glycérides, établir la ligne de base sur l'eau puis sur les réactifs afin de dépister une fluorescence parasite.

- 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

DOSAGE DU CHOLESTEROL TOTAL ET DU CHOLESTEROL LIBRE  
PLASMATIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ LIQUIDE (14)

---

I - 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 OV 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.

II - 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.

III - 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 $\alpha$ 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<sub>2</sub>).

#### IV - TECHNIQUE

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

|                                                | Etalonnage |              | Dosage |       |
|------------------------------------------------|------------|--------------|--------|-------|
|                                                | 5,2 mmol/l | 10,4 mmol/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

- . Agiter pendant 10 secondes.
- . Placer à 75° C pendant 20 min. Refroidir.
- . Dans chaque tube mesurer : Acétate d'éthyle : 1,5 ml  
Eau distillée : 3,5 ml
- . Agiter, centrifuger pendant 5 min 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

## V - 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 :

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

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

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

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

DOSAGE COLORIMETRIQUE A L'ORTHO-DIANISIDINE  
DES COMPLEXES APO B - ANTI APO B - ANTI IMMUNOGLOBINES  
MARQUEES A LA PEROXYDASE

---

I - PRINCIPE

En présence de peroxydase, d'eau oxygénée, et de méthanol, l'ortho-dianisidine, incolore sous la forme réduite, passe à la forme oxydée, développant une coloration jaune dont le maximum d'absorption est à 405 nm.

II - REACTIFS

1) TAMPON PBS + TWEEN

La composition est la suivante :

|                                    |        |            |
|------------------------------------|--------|------------|
| . Eau distillée.....               | 990 ml | Tampon PBS |
| . Tampon phosphate 1 M pH 7,2..... | 10 ml  |            |
| . NaCl.....                        | 9 g    |            |
| . Tween 20.....                    | 0,5 g  |            |

2) REACTIF DE REVELATION

Ajouter dans l'ordre :

- . 0,6 ml de tampon phosphate 1 M pH 6,
- . 0,6 ml d'eau oxygénée à 0,3 % (p/v),
- . 58,8 ml d'eau distillée,
- . 0,5 ml d'une solution d'orthodanisidine à 10 mg/ml de méthanol.

3) HCl 5 N

III - METHODE

Laver les tubes 3 fois avec 1,2 ml de tampon PBS + Tween ; puis dans chacun d'entre-eux incorporer 1 ml du réactif de révélation.

Faire un blanc réactif.

Laisser les tubes 1 heure à température ambiante.  
Stopper la réaction et ajouter 1 goutte d'HCl 5 N. Agiter.  
Lire à 405 nm et faire au moins 4 lectures par tube.

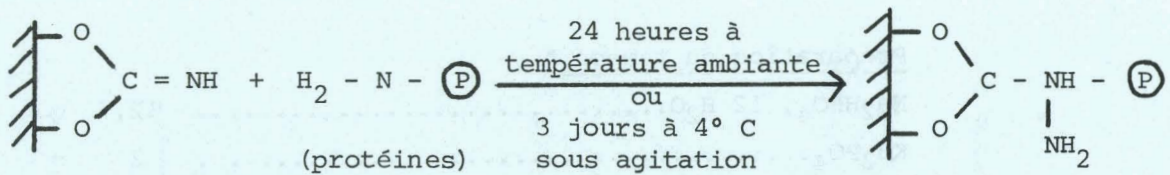
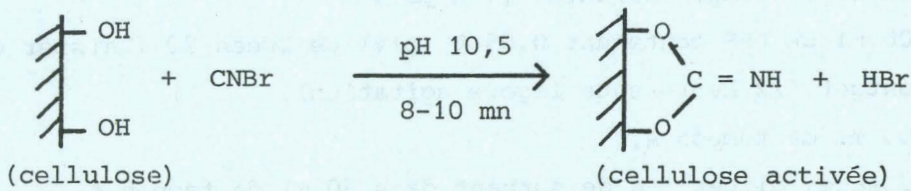
#### IV - RESULTATS

Une droite d'étalonnage  $C = k A$  ( $A =$  absorbance et  $C =$  concentration) permet de relier directement l'absorbance lue dans les tubes de dosage aux taux d'Apo B qu'ils contiennent.

PREPARATION DU SORBANT CELLULOSE- $\gamma$  GLOBULINES ANTI-APO B  
POUR LE DOSAGE DE L'APO B PAR LA METHODE "SANDWICH"

I - PRINCIPE

Le couplage cellulose-protéines est effectué par l'intermédiaire du bromure de cyanogène selon les schémas réactionnels suivants :



II - METHODE

1) ACTIVATION DE LA CELLULOSE

- Mélanger 1 g de cellulose microcristalline et 10 ml d'eau distillée.
- Ajouter sous agitation 30 ml d'une solution de CNBr à 1 g/30 ml.
- Ramener et maintenir le pH à 10,5 avec de la soude 1 M pendant 8 à 10 minutes.
- Laver immédiatement avec 400 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M froid.

2) COUPLAGE DES PROTEINES

- Mélanger 1 g de cellulose activée et 3 à 4 mg de protéines (correspondant à 0,2 ml de gamma-globulines précipitées et ramenées au volume initial de sérum).



- Diluer avec 40 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M.
- Laisser 24 heures à température ambiante ou 3 jours à 4° C sous agitation.

3) LAVAGES DU SORBANT

Laver sur entonnoir en verre fritté de porosité 15 microns, successivement avec :

- . 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M
- . 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M
- . 200 ml de tampon acétate 0,1 M pH 4
- . 200 ml de PBS contenant 0,05 % (p/v) de Tween 20 (Laisser en contact 1/2 heure sous légère agitation).
- . 200 ml de tampon A.

Pour le dosage, diluer 1 g de sorbant dans 40 ml de tampon A.

Le sorbant peut se conserver à - 20° C pendant 6 mois.

Préparation du tampon A

|                                                         |      |    |
|---------------------------------------------------------|------|----|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$ ..... | 12,7 | g  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....                          | 2    | g  |
| $\text{NaCl}$ .....                                     | 9    | g  |
| Tween 20.....                                           | 0,5  | ml |
| EDTA.....                                               | 4    | g  |
| $\text{NaN}_3$ .....                                    | 0,5  | g  |
| Eau distillée...q.s.p.....                              | 1    | l  |

PREPARATION DES ANTICORPS PURS ANTI-APO B PAR  
IMMUNOADSORPTION SUR SEPHAROSE ACTIVE (385)

---

I - PRINCIPE

Après couplage sur du sépharose de protéines Apo B par l'intermédiaire du bromure de cyanogène, selon le principe précédemment décrit, et lavages de l'immunoabsorbant ainsi préparé, on effectue une fixation réversible des anticorps spécifiques anti-Apo B sur l'immunoabsorbant par simple contact à température ambiante.

Après un lavage abondant destiné à éliminer toutes les substances fixées non spécifiquement, la dissociation des immuns-complexes est ensuite réalisée sur colonne ou en solution après centrifugation, à pH acide. La solution d'anticorps obtenue est très vite ramenée à un pH voisin de la neutralité.

II - REACTIFS

- Sépharose préactivé par du bromure de cyanogène (Pharmacia Fine Chemicals).
- HCl  $10^{-3}$  M.
- Tampon bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,1 M en solution NaCl 0,5 M.
- Solution aqueuse d'éthanolamine M, pH 8. Le pH est ajusté avec de l'HCl fumant concentré.
- Tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4. Le pH est ajusté avec de l'acide acétique concentré.
- Tampon tétraborate de sodium 0,1 M, NaCl M pH 8. Le pH est ajusté avec de l'HCl concentré.
- NaCl 0,5 M en eau distillée.
- Tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 :
  - .  $\text{PO}_4 \text{Na}_2 \text{H}$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$ ..... 27 g
  - .  $\text{PO}_4 \text{Na H}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ ..... 4 g
  - . NaCl..... 8 g
  - . Azide de Na..... 200 mg
  - . Eau distillée...q.s.p..... 1 l

- Tampon glycocolle 0,2 M - HCl concentré, pH 2,8.
- Solution de  $K_2HPO_4$  1 M en tampon PBS, pH 7,4 (se prépare extemporanément).

### III - METHODE

#### 1) PREPARATION DU SORBANT

- Mettre 1 g de Sépharose préactivé à gonfler dans 30 à 40 ml d'HCl  $10^{-3}$  M pendant 15 minutes.
- Déposer sur verre fritté de porosité 1-2 microns.
- Faire passer 170 ml d'HCl  $10^{-3}$  M puis 100 ml de tampon  $NaHCO_3$  0,1 M NaCl 0,5 M. Chacun de ces volumes doit être ajouté de façon discontinue et l'opération doit durer environ 15 minutes à chaque fois.

Le couplage des protéines Apo B doit alors être fait de suite.

#### 2) COUPLAGE DES PROTEINES APO B

- Mettre en contact 10 à 20 mg d'Apo B par gramme de gel sec.
- Agiter doucement (éviter l'agitation magnétique) 2 heures à température ambiante ou 1 nuit à 4° C.
- Laver avec 100 ml de tampon  $NaHCO_3$  0,1 M NaCl 0,5 M.
- Bloquer les sites actifs encore libres avec une solution d'éthanolamine M pH 8 à raison de 20 ml par gramme de gel sec par simple contact et agitation pendant 2 heures à température ambiante.
- Laver 3 fois alternativement avec :
  - 100 ml de tampon acétate de Na 0,1 M NaCl M pH 4
  - et 100 ml de tampon borate de Na 0,1 M NaCl M pH 8.
- Terminer par un lavage avec une solution de NaCl 0,5 M.

#### 3) PREPARATION DES ANTICORPS

- Mettre en contact 3 ml d'immunoabsorbant (correspondant à 1 g de gel sec) et 2 ml d'immunsérum de lapin anti-Apo B préalablement décomplémenté.
- Agiter doucement à température ambiante pendant 1,5 - 2 heures.

Toute la suite de la manipulation s'effectue à 4° C dans une petite colonne de verre.

- Laver abondamment avec du tampon PBS jusqu'à obtention dans l'éluat d'une densité optique nulle.
- Faire passer lentement 2 fois 30 ml de tampon glyco-colle-HCl 0,2 M pH 2,8. Les éluats sont récupérés directement sur une solution de  $K_2HPO_4$  1 M en tampon PBS pH 7,4, puis ajustés à pH neutre.
- Dialyser la solution d'anticorps contre du sérum physiologique puis contre le tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 8,5.
- Concentrer et répartir en fractions de faible volume.

Les anticorps purs se gardent en solution dans le tampon carbonate-bicarbonate à - 20° C en présence d'azote de sodium à 1 ‰ (p/v).

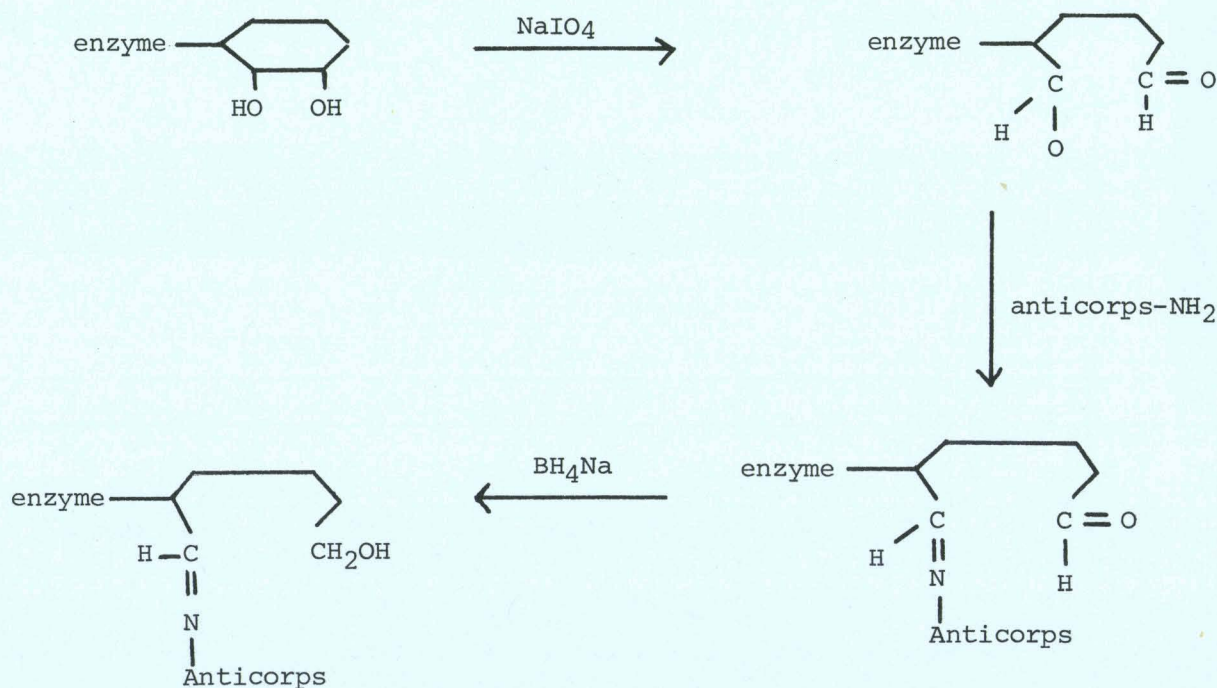
MARQUAGE DES ANTICORPS PURS ANTI-APO B  
A LA GLUCOSE-OXYDASE (248)

I - PRINCIPE

Le principe que nous utilisons fait appel à l'oxydation par le périodate de sodium des groupements  $\alpha$ -diol présents dans la molécule de glucose-oxydase.

Les fonctions aldéhydiques formées peuvent se conjuguer avec les groupes aminés des protéines, et former des bases de Schiff réduites enfin par du borohydrure de sodium.

Les schémas réactionnels sont les suivants :



II - REACTIFS

- Tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5,6 : mélanger volume à volume une solution d'acétate de Na 0,1 M et d'acide acétique 0,1 M. Ajuster à pH 5,6 si nécessaire (se prépare la veille).
- Solution de métapériodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) 0,1 M dans de l'eau distillée (se prépare extemporanément).

- Solution d'éthylène glycol 0,16 M dans de l'eau distillée.
- Tampon carbonate-bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,5 : mélanger volume à volume une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M et une solution de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. Ajuster à pH 8,5 si nécessaire.
- Borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) en poudre.
- Tampon phosphate-citrate 0,1 M pH 5,6 :
  - . Acide citrique..... 8,82 g
  - .  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ..... 14,952 g
  - . Eau distillée...q.s.p..... 1 1Ajuster le pH si nécessaire.

### III - METHODE

- Dissoudre 10 mg de glucose oxydase (Boehringer Mannheim, 210 U/mg Grade I) dans 1 ml de tampon acétate de Na pH 5,6.
- Ajouter 0,2 ml de la solution de métapériodate de Na et agiter (agitation magnétique) pendant 2 heures dans un bain de glace et à l'abri de la lumière.
- Ajouter 0,3 ml de la solution d'éthylène glycol et agiter pendant 1 heure à température ambiante.
- Dialyser contre 4 litres de tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 8,5 à 4° C.
- Ajouter 5 mg d'anticorps purs préalablement dialysés également contre du tampon carbonate-bicarbonate et laisser à température ambiante pendant 5 - 6 heures.
- Ajouter 4 mg de  $\text{NaBH}_4$ . Laisser à 4° C pendant 3 heures.
- Dialyser à 4° C pendant une nuit contre 4 litres de PBS et déposer sur colonne (2,5 x 100 cm) de Séphadex G-200 superfine équilibrée en tampon PBS.
- Rassembler les fractions correspondant au conjugué (éluat du 1er pic) et concentrer.
- Stabiliser dans une solution d'ovalbumine (10 mg/ml de solution d'anticorps) et conserver en fractions de faible volume à - 20° C, en présence d'azoture de Na (1 % - p/v) pendant 14 mois).

APPLICATION DE L'IMMUNODIFFUSION RADIALE SELON LA METHODE  
MANCINI (236) AU DOSAGE DE L'APO B DANS LE SERUM

---

I - PRINCIPE

Une diffusion simple de l'antigène est effectuée dans un gel d'agar auquel est incorporé préalablement un immunsérum monospécifique.

Une réaction antigène-anticorps se développe, et il y a formation d'un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est directement proportionnel à la concentration en antigène.

II - METHODE

Nous avons utilisé des plaques d'immunodiffusion M-Partigen  $\beta$ -lipoprotéine prêtes à l'emploi (Behringwerke). Les étalons LP-B et les sérums à doser sont dilués dans du sérum physiologique.

La gamme d'étalonnage est établie avec différentes dilutions réparties régulièrement entre 14 et 140 mg d'apo B/100 ml, et les sérums sont dosés purs ou dilués au 1/2.

5  $\mu$ l de chaque étalon et de sérum sont introduits dans les puits, et après 3 jours de diffusion en atmosphère humide, on mesure le diamètre de l'anneau de précipitation formé au moyen d'une loupe.

III - RESULTATS

Le taux d'Apo B des sérums étudiés (en mg pour 100 ml) est calculé directement à partir de la droite d'étalonnage établie en reportant les carrés des diamètres de précipitation (exprimés en  $\text{mm}^2$ ) des étalons en fonction des concentrations d'antigène.

IMMUNOELECTROPHORESE SELON LA METHODE DE LAURELL (214)  
APPLICATION AU DOSAGE DE LA Lp(a) LIPOPROTEINE ET  
DES APOPROTEINES B ET A I DANS LE SERUM

---

I - PRINCIPE

Une séparation électrophorétique de l'antigène est effectuée dans un gel d'agar auquel on incorpore préalablement un immunosérum 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.

II - 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 1 % (p/v) DANS LE TAMPON

- . Dissoudre par chauffage au bain-marie bouillant :

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Agarose Serva.....          | 1 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 |

III - 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 serpentín à circulation d'eau (Behring Institute, 10 rue Clément Marot, PARIS 75008).
- Siphon pour l'égalisation des niveaux du tampon.
- Redresseur de courant avec voltmètre.

IV - METHODE

1) CONFECTION DES PLAQUES

Sur les plaques dégraissées à l'éther, on coule une "couche d'imprégnation" (une goutte de la solution d'agarose à 1 % étalée au pinceau) destinée à retenir le gel lors des lavages. Le gel de séparation est ensuite préparé en incorporant à la solution d'agarose préalablement amenée à la température de 55° C, l'immunsérum spécifique anti-Lp(a), anti-Apo B ou anti-Apo A-I de façon à obtenir une concentration finale respective de 2,2 et 3 % en immunsérum.

30 ml de ce gel sont coulés par plaque, et celle-ci est portée au réfrigérateur pendant environ 10 minutes.

On creuse ensuite des puits de 3 mm de diamètre, espacés d'environ 6 mm.

## 2) LAVAGE ET DESSICATION DU GEL

### a) 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 min.

### b) 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.

### c) 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 desséché, la plaque est ramenée à température ambiante.

## 3) COLORATION

La coloration des pics de précipitation est obtenue par immersion de la plaque pendant 10 minutes dans la solution colorante.

## 4) DECOLORATION

La décoloration du fond nécessite le passage de la plaque dans 3 bains successifs de la solution décolorante ; chaque rinçage demande environ 10 minutes.

## V - RESULTATS

Les taux d'antigènes des sérums étudiés (en mg/100 ml) sont calculés directement à partir de la droite d'étalonnage établie en reportant les hauteurs en mm des pics étalons en fonction des quantités d'antigène incorporées.

### 1) PREPARATION DES ETALONS ET DES SERUMS A DOSER

#### a) Pour le dosage de la Lp(a)

Le taux de protéines de la solution lipoprotéique purifiée est déterminé par dosage selon la méthode de LOWRY ( ). Le coefficient de transformation en taux de LP est de 2,8.

Une gamme d'étalonnage est réalisée en incorporant différentes quantités connues de cette solution standard à un sérum 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 sérum.

Les sérums à doser sont purs ou dilués au 1/2 dans le tampon de migration.

b) Pour le dosage des apoprotéines

Une gamme d'étalonnage est réalisée en effectuant différentes dilutions dans le tampon de migration d'un sérum standard lyophilisé reconstitué en eau distillée et préalablement dosé en Apo B et A-I (pages et ).

Cette gamme correspond respectivement à des concentrations d'Apo B et d'Apo A-I régulièrement réparties entre 30 et 150 et 20 et 95 mg pour 100 ml de sérum.

Les sérums à doser sont dilués au 1/2 dans le tampon de migration.

2) MIGRATION

La migration se fait à + 4° C, à raison de 3 volts/cm, pendant 24 heures, 16 heures et 5 heures respectivement pour la Lp(a), l'Apo B et l'Apo A-I.

## DELIPIDATION DES HDL (60)

---

### I - PRINCIPE

La délipidation des HDL est réalisée par un mélange éthanol-éther saturé en eau à 4° C, qui va précipiter les protéines et garder en solution les différents lipides.

Afin d'éviter au maximum des pertes de protéines, celles-ci sont préalablement précipitées par lyophilisation.

Les solvants utilisés sont refroidis et conservés à - 20° C pendant toute la manipulation.

### II - METHODE

Des fractions de HDL correspondantes à 10 mg de protéines sont lyophilisées et délipidées par agitation dans 20 ml d'un mélange éthanol-éther :

- 3/1 (v/v) pendant 1 nuit,
- 3/2 (v/v) pendant 2 heures,
- 1/1 (v/v) pendant 2 heures,

puis dans de l'éther seul.

Entre chaque étape, les protéines sont sédimentées au fond des tubes par une centrifugation à 4°C et à 5000 tours/minute pendant 20 minutes.

Le solvant contenant les lipides est prélevé très doucement à la pipette.

Le dernier lavage à l'éther réclame certaines précautions, et il faut ajouter très lentement l'éther sur le culot protéique en ayant soin d'éviter au maximum sa remise en suspension, puis à centrifuger de suite.

Le précipité est repris dans le tampon de solubilisation et pour que celle-ci soit aussi quantitative que possible, il n'est que partiellement séché sous azote, l'éther restant étant éliminé ensuite par simple évaporation.

ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE  
EN MILIEU UREE DES APOPROTEINES DES HDL

---

(selon la méthode de KANE (200) décrite pour la séparation et le dosage des apoprotéines des VLDL)

I - REACTIFS

- 1) Tétraméthylurée (1, 1, 3, 3)
  - . Redistillée chaque mois, elle est stockée sous azote à l'obscurité à + 4° C.
  - . Dilué au 1/5 avec de l'eau distillée avant l'utilisation (la solution doit avoir un pH compris entre 6 et 7).
- 2) Acrylamide
- 3) Bis acrylamide
- 4) Urée (pure)
- 5) Tris
- 6) Glycocolle
- 7) Amidoschwarz
- 8) Persulfate d'ammonium
- 9) Riboflavine
- 10) TEMED (tétraméthyléthylènediamine)
- 11) Tubes de verre de 6 mm de diamètre interne et de 130 mm de hauteur.

II - TECHNIQUE

1) PREPARATION DES VLDL

10 à 20 ml de sérum sont soumis à une centrifugation de 15.000 tours/mn pendant 1 h 30 mn. Après élimination des chylomicrons éventuels, les VLDL sont séparées et lavées par ultracentrifugation menée pendant 18 heures à 40.000 tours/mn à une densité de 1.006 (ultracentrifugeur Beckman, rotor Ti 50).

## 2) PREPARATION DES GELS

### a) Gel inférieur

Mélanger à parties égales une solution aqueuse contenant 0,4 g/ml d'acrylamide et 0,011 g/ml de bis-acrylamide avec une solution tampon Tris 2 M contenant 0,003 ml/ml de TEMED, ajustée à pH 9,1 avec HCl.

Ajouter à cette solution 0,64 g/ml d'urée et filtrer.

Mélanger à parties égales le filtrat avec une solution de persulfate d'ammonium  $6,25 \times 10^{-3}$  M additionnée d'urée à raison de 0,64 g/ml.

Couler le gel immédiatement sur une hauteur de 80 mm et ajouter quelques gouttes d'eau au-dessus de la solution pour éviter la formation d'un ménisque lors de la polymérisation qui se fait en 45 mn environ à la température du laboratoire.

### b) Gel supérieur

Mélanger à parties égales une solution aqueuse contenant 0,133 g/ml d'acrylamide et 0,011 g/ml de bis-acrylamide avec une solution tampon Tris 0,24 M contenant 0,0013 ml/ml de TEMED, ajustée à pH 6,7 avec HCl.

Ajouter à cette solution 0,64 g/ml d'urée et filtrer (solution I).

Mélanger à parties égales une solution aqueuse contenant 0,0027 mg/ml de riboflavine et une solution de persulfate d'ammonium  $4,5 \times 10^{-3}$  M. Ajouter à cette solution 0,64 g/ml d'urée (solution II).

Mélanger à parties égales les solutions I et II et couler le gel immédiatement sur une hauteur de 15 mm. Après addition de quelques gouttes d'eau, la polymérisation est obtenue par exposition à la lumière ultraviolette.

## 3) DELIPIDATION DES VLDL

50 à 200  $\mu$ l d'une solution de VLDL contenant environ 1,5 mg de protéine/ml sont déposées au-dessus du gel supérieur et mélangées à un volume égal de tétraméthylurée. Après 15 minutes à température ambiante, on ajoute 1/10 de volume d'une solution de saccharose à 80 %.

## 4) ELECTROPHORESE

Le tampon du compartiment supérieur de la cuve est un tampon Tris 0,0425 M, glycolle 0,0465 M de pH 8,91.

Le tampon du compartiment inférieur est un tampon Tris 0,12 M amené à pH 8,07 avec HCl.

Pour pouvoir suivre le bon déroulement de l'électrophorèse un tube témoin est obtenu en déposant en haut du gel un volume de tétraméthylurée identique à celui des autres tubes, 50 µl de bleu de bromophénol à 0,001 % et 1/10 de volume de saccharose à 80 %.

La migration s'effectue sous une intensité constante de 1,25 mA par tube de gel jusqu'à ce que la bande témoin de bleu de bromophénol pénètre dans le gel inférieur puis sous une intensité constante de 2,5 mA par tube de gel. L'électrophorèse est arrêtée quand la bande témoin est à 10 mm du bas du tube.

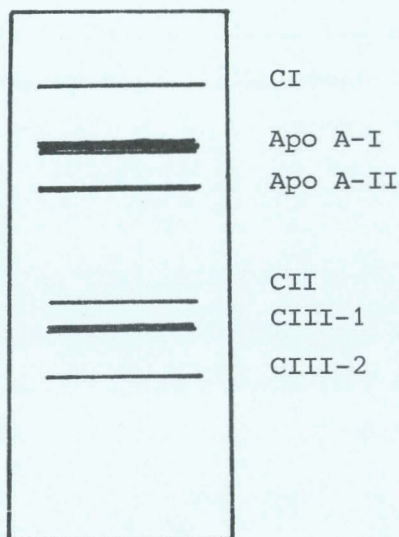
En fin de migration, les protéines résiduelles qui n'ont pas pénétré dans le gel sont éliminées par lavage à l'eau.

Démouler les gels. Fixer et colorer les protéines par immersion dans une solution de méthanol-eau-acide acétique (5/5/1) contenant 1 % d'amidoschwarz. La décoloration est obtenue à l'aide d'une solution d'acide acétique à 7 % (v/v).

Intégrer les bandes à l'aide d'un densitomètre approprié.

### III - RESULTATS

La figure ci-dessous donne un exemple de la séparation obtenue.



## BIBLIOGRAPHIE



- 1- ADAIR G.S. and ADAIR M.E., J. Physiol. 1943, 102 : 17 pages.
- 2- ALAUPOVIC P., Atherosclerosis 1971, 13 : 141-146.
- 3- ALAUPOVIC P., in Proc. 19th colloque Protides of the Biological Fluids, ed. H. Peeters, Pergamon Press, Oxford, N.Y., 1972, 9-19.
- 4- ALAUPOVIC P., Gazette Médicale de France, "Lipoprotéines et athérome", colloque des 5 et 6 mai 1976, Dijon, pp. 11-21.
- 5- ALAUPOVIC P., CURRY M., McCONATHY W. and FRESMIRE J., in Report of the high density lipoprotein methodology workshop, V International Symposium on Atherosclerosis, Houston, Nov. 6-9 1979.
- 6- ALAUPOVIC P., FURMAN R.H., FALOR W.H., SULLIVAN M.L. and al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968, 149 : 791-807.
- 7- ALBERS J.J. and ALADJEM F., Biochemistry 1971, 10 : 3436-3441.
- 8- ALBERS J.J., CABANA V.G. and HAZZARD W.R., Metabolism 1975, 24 : 1339-1351.
- 9- ALBERS J.J., CABANA C.G., WARNICK G.R. and HAZZARD W.R., Metabolism 1975, 24 : 1047-1054.
- 10-ALBERS J.J., CHEUNG M.C. and HAZZARD W.R., Metabolism 1978, 27 : 479-485.
- 11-ALBERS J.J. and HAZZARD W.R., Lipids 1974, 9 : 15-26.
- 12-ALBERS J.J., WAHL P.W., CABANA V.G., HAZZARD W.R. and HOOVER J.J., Metabolism 1976, 25 : 633-644.
- 13-ALBERS J.J., WARNICK G.R., WIEBE D., KING P. and STEINER P., Clin. Chem. 1978, 24 : 853-856.
- 14-AMBERT J.P., CAHOUR A. et HARTMANN L., Clin. Chim. Acta 1976, 68 : 31-41.
- 15-ANDERSON J.M. and DIETSCHY J.M., J. Biol. Chem. 1977, 252 : 3652-3659.

- 16- ANDERSON D.W., NICHOLS A.V., PAN S.S. and LINDGREN F.T., *Atherosclerosis* 1978, 29 : 161-179.
- 17- ASSMANN G. and BREWER H.B., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1974, 71 : 1534-1538.
- 18- ASSMANN G., HERBERT P.N., FREDICKSON D.C. and FORTE T., *J. Clin. Invests* 1977, 60 : 242-252.
- 19- ASSMANN G. SMOOTZ E., ADLER K., CAPUSO A. and OETTE K., *J. Clin. Invest.* 1977, 59 : 565-575.
- 20- AKTIN E. and MENG H.C., *Diabetes* 1972, 21 : 149-151.
- 21- ATKINSON D., TALL A.R., SMALL D.M. and MAHLEY R.W., *Biochemistry* 1978, 17 : 3930-3933.
- 22- AVOGARO P., BITTOLO BON G., CAZZOLATO G. and QUINCI G.B., *Lancet* 1979, 28 : 901-903.
- 23- AVOGARO P., CAZZOLATO G., BITTOLO BON G., BELUSSI F. and QUINCI G.B., *Clin. Chim. Acta* 1979, 95 : 311-315.
- 24- AVOGARO P., CAZZOLATO G., BITTOLO BON G., QUINCI G.B. and CHINELLE M., *Atherosclerosis* 1978, 31 : 85-91.
- 25- AVRAMEAS S. and TERNYNCK T., *Immunochemistry* 1971, 8 : 1175.
- 26- AYRAULT-JARRIER M., ALIX J.F. et POLONOVSKI J., *Biochimie* 1978, 60 : 65-70.
- 27- BAKER H.N., JACKSON R.L. and GOTTO A.M., *Biochemistry* 1973, 12 : 3866-3871.
- 28- BALLANTYNE F.C., WILLIAMSON J., SHAPIRO D., CASLAKE M.J. and PERRY B., *Clin. Chem* 1978, 24 : 788-792.
- 29- BARCLAY M., BARCLAY R.K., SKIPSKI V.P., TEREBUS-KERISH O., MUELLER C.H., SHAH E. and ELKINS W.L., *Biochem. J.* 1965, 96 : 205-209.
- 30- BARR D.P., RUS E.M. and EDER H.A., *Am. J. Med.* 1951, 11 : 480-493.

- 31- BARTER P.J., J. Lipid. Res. 1974, 15 : 11-19.
- 32- BASU M.K., GHOSH S. and SCHWEPPE J.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1979, 160 : 324-327.
- 33- BASU S.K., GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.G.W. and BROWN M.D.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1976, 73 : 3178-3182.
- 34- BASU S.K., GOLSTEIN J.L. and BROWN M.S., J. Biol. Chem. 1978, 253 : 3852-3856.
- 35- BEAUMONT J.L., CARLSON L., COOPER G., FEJFAR E. and al. Bull. Med. Hlth. Org. 1970, 43 : 891-915.
- 36- BEDFORD D.K., SHEPARD J. and MORGAN H.G., Clin. Chim. Acta 1976, 70 : 267.
- 37- BEISIEGEL U. and UTERMANN G., Eur. J. Biochem. 1979, 93 : 601-608.
- 38- BELFRAGE P., BERG B., HAGERSTRAND I., NILSSON-EHLE P., TORNQUIST H. and WIEBE T., Eur. J. Clin. Invest. 1977, 7 : 127-131.
- 39- BERGMAN E.N., HAVEL R.J., WOLFE B.M. and BOHMER T., J. Clin. Invest. 1971, 50 : 1831-1839.
- 40- BERNFELD P., Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 1955, 14 : 182.
- 41- BIER D.M. and HAVEL R.J., J. Lipid Res. 1970, 11 : 565-570.
- 42- BLATON V. and PEETERS H., Protides of the Biological Fluids 1966, 14 : 659-665.
- 43- BLATON V. and PEETERS H., Protides of the Biological Fluids 1976, 15 : 585-589.
- 44- BLATON V., VERCAEMST R., ROSSENEU M., MORTELMANS J. and coll., Biochemistry 1977, 16 : 2157-2163.
- 45- BLATON V., VERCAEMST R., VANDECATEELE N., CASTER H. and PEETERS H., Biochemistry 1974, 13 : 1127-1135.

- 46- BLIX G., TISELUS A. and SVENSON H., J. Biol. Chem. 1941, 137 : 485-494.
- 47- BLUM C.B., LEVY R.I., EISENBERG S., HALL M., GOEBEL R.H. and BERMAN M., J. Clin. Invest. 1977, 60 : 795-807.
- 48- BRADBY G.V., VALENTE A.J. and WALTON K.W., Lancet 1978, II : 1271-1274.
- 49- BRADLEY W.A., ROHDE M.F., GOTTO A.M. and JACKSON R.L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978, 81 : 928-935.
- 50- BRADLEY D.D., WINGER J., PETITTI D.B., KRAUSS R.M. AND RAMCHARAN S., N. Engl. J. Med. 1978, 299 : 17-20.
- 51- BREWER J.H., FAIRWELL T., LARUE A., RONAN R., HOUSER A. and BRONZERT J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979, 80 : 623-630.
- 52- BREWER H.B., LUX S.E., RONAN R. and JOHN K.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1972, 69 : 1304-1380.
- 53- BREWER H., SHULMAN R., HERBERT P., RONAN R. and WEHRLY K., J. Biol. Chem. 1974, 249 : 4975-4984.
- 54- BRONZERT T.J. and BREWER H.B., Clin. Chem. 1977, 23 : 2089-2098.
- 55- BROWN M.S., ANDERSON R.G.W. and GOLDSTEIN J.L., Transport of macromolecules in cellular systems, 1978, pp. 197-212, ed. S.C. Silverstein, Berlin: Dahlem Konferenzen.
- 56- BROWN M.S., DANA S.E. and GOLDSTEIN J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. 1973, 70: 2162-2166.
- 57- BROWN M.S., FAUST J.R. and GOLDSTEIN J.L., J. Clin. Invest. 1975, 55 : 783-793.
- 58- BROWN M.S. and GOLDSTEIN J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. 1974, 71 : 788-792.
- 59- BROWN M.S. and GOLSTEIN J.L., Science 1976, 191 : 150-154.

- 60- BROWN W., LEVY R. and FREDRICKSON D., J. Biol. Chem. 1969, 244 : 5687-5694.
- 61- BURSTEIN M., Life Sci. 1962, 1 : 739-744.
- 62- BURSTEIN M. et MERFIN R., Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 1968, 13 : 274-277.
- 63- BURSTEIN M. et MORGIN R., Nouv. Rev. Fr. Hématol. 1971, 11 : 173-183.
- 64- BURSTEIN M. et PRAWERMAN A., Pathol. Biol. 1959, 7 : 1035.
- 65- BURSTEIN M. and SAMAILLE J., J. Physiol. 1957, 49 : 83-86.
- 66- BURSTEIN M. et SCHOLNICK H.R., Nouv. Rev. Fr. Hématol. 1970, 10 : 181-200.
- 67- BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R. and MORFIN R., J. Lipid. Res. 1970, 11 : 583-595.
- 68- BURSTEIN M. and SCHOLNICK H.R., Biomedicine 1973, 19 : 16-19.
- 69 - BURSTEIN M. and SCHOLNICK H.R., Advan. Lipid Res. 1973, 11 : 67-108.
- 70- CANAL J., in Immunochimie clinique ; Dosage immunologique des lipoprotéines sériques. Aspects théoriques et pratiques. Lyon 1974, Simep Edition.
- 71- CANAL J. et GIRARD M.L., Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50 : 1523-1536.
- 72- CANAL J., LEGRAND J. et GIRARD M.L., Symposium sur l'automatisation du dosage des protéines par immunoprécipitation, Paris, 30 novembre 1973, Technicon France.
- 73- CAREW T.E., CHAPMAN J. and STEINBERG D., Abstr. Circulation 1977, N°380, pp. IIII-99.
- 74- CARLIER Y., BOUT D., FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., and coll., J. Immunol. Methods 1978, 21 : 317-324.
- 75- CARLSON L.A., Clin. Chim. Acta 1960, 5 : 528-538.

- 76- CARLSON L.A. and BALLANTYNE D., *Atherosclerosis* 1976, 23 : 563-568.
- 77- CARLSON L.A. and BOTTINGER I.E., *Lancet* 1972, I : 865.
- 78- CARLSON L.A. and WAHLBERG G., *Atherosclerosis* 1978, 31 : 77-84.
- 79- CASLAKE M.J., FARISH E. and SHEPHERD J., *Metabolism* 1978, 27 : 437-447.
- 80- CASTELI W., DOYLE J.T., GORDON T., HAMES C.G., HJORTLAND M., HULLEY S.B., KAGAN A. and ZUREL W.J., *Circulation* 1977, 55 : 767-772.
- 81- CASTELLI W.P., KANNEL W.B., GARRISON R.J., FEINLEIB M., McNAMARA P.M., *Circulation* 1977, 56 : 4-10.
- 82- CATAPANO A.L., JACKSON R.L., GILLIAM E.B., GOTTO A.M. and SMITH L.C., *J. Lipids Res.* 1978, 19 : 1047-1052.
- 83- CHAIT A., BIERMAN E.L. and ALBERS J.J., *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 529: 292-299.
- 84- CHAJEK T., EISENBERG S., *J. Clin. Invest.* 1978, 62 : 1654-1665.
- 85- CHAJEK T., FRIEDMAN G., STEIN O. and STEIN Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1977, 488 : 270-279.
- 86- CHEUNG M.C. and ALBERS J.J., *J. Clin. Invest.* 1977, 60 : 43-50.
- 87- CHEUNG M.C. and ALBERS J.J., *Lipid Res.* 1979, 20 : 200-207.
- 88- CLARKE H.G., FREEMAN T., in Peeters H. (ed.) *Prot. Biol. Fluids*, 1967, 14 : 503-509.
- 89- COHN E.J., GURD F.R.N., SURGENOR D.M., BARNES B.A. and al., *J. Amer. Chem. Soc.* 1950, 72 : 465-474.
- 90- CONLON D.R., BLANSTEIN L.A., PASAKARNIS P.A., STEINBERG C.M. and D'HAMELIO J.C., *Clin. Chem.* 1979, 25 : 1965-1969.

- 91-CUNNINGHAM V.J. and ROBINSON D.S., Biochem. J. 1969, 112 : 203-206.
- 92- CURRY M.D., ALAUPOVI P. and SUENRAM C.A., Clin. Chem. 1976, 22 : 315-322.
- 93- CURRY M.D., GUSTAFSON A., ALAUPOVIC P. and McCONATHY W.J.? Clin. Chem. 1978, 24 : 280-286.
- 94- CURRY M.D., McCONATHY W.J. and ALAUPOVIC P., Biochim. Biophys. Acta 1977, 491 : 232-241.
- 95- DEDONDER E., FIEVET C., CAMPOS E., MOULIN S. and coll., Atherosclerosis (à paraître).
- 96- DE GENNES J.L., Presse Med. 1971, 79 : 791-795.
- 97- DELAHUNTY T., BAKER H.N., GOTTO A.M. and Jackson R.L., J. Biol. Chem. 1975, 250 : 2718-2724.
- 98- DE LALLA O.F. and GOFMANN J.W., in "Methods of Biochemical Analysis" Gluck D., Ed. Interscience, New-York 1954, 459-478.
- 99- DELLAMONICA C., BALTASSAT P. et COLLOMBEL C., Lyon Pharmaceutique 1977, 28: 289-303.
- 100-DESREUMAUX C., Thèse de 3ème cycle, option Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Lille, Janvier 1977.
- 101-DESREUMAUX C., BUASSA-bu-TSUMBU, FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J. and SEZILLE G., Ann. Biol. Clin. 1976, 34 : 309-316.
- 102-DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J. and SEZILLE G., J. Chromatogr. 1977, 130 : 336-341.
- 103- DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., JAILLARD J. and SEZILLE G., Biochimie 1977, 59 : 543-546.

- 104-DESREUMAUX C., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J.,  
in "Protides on the Biological Fluids", Pergamon Press Oxford and  
New-York, 1978, 289-292.
- 105- DUCIMETIERE P., CLAUDE J.R. and RICHARD J.L., Arterial Wall 1977, 7 :  
71-76.
- 106- DURRINGTON N., WHICHER J.T., WARREN C., BOLTON C.H. and HARTOG M., Clin.  
Chim. Acta 1976, 71 : 95-108.
- 107- EDELSTEIN C., LIM C.T. and SCANU A.M., J. Biol. Chem. 1972, 242 :  
5842-5849.
- 108- EHNHOLM C., GAROFF H., RENKONEN O. and SIMONS K., Biochemistry 1972,  
11 : 3229-3232.
- 109- EHNHOLM C., GAROFF H., SIMONS K. and ARO H., Biochim. Biophys. Acta  
1971, 236 : 431-439.
- 110- EISENBERG S., Atherosclerosis Review, 1976, Vol.1, pp. 23-61. Ed. by  
R. Paoletti and A.M. Gotto, Raven Press, New York.
- 111- EISENBERG S., Metabolims of very low density lipoprotein ; in Greten,  
Lipoprotein metabolism, pp. 32-43 (Springer, Heidelberg 1976).
- 112- EISENBERG S., Prog. Pharmacol. 1979, 15 : 139-165.
- 113- EISENBERG S., BILHEIMER D.W. and LEVY R.I., Biochim. Biophys. Acta 1972,  
280 : 94-104.
- 114- EISENBERG S., BILHEIMER D.W., LINDGREN F.T. and LEVY R.I., Biochim. Biophys.  
Acta 1973, 326 : 361-377.
- 115- EISENBERG S., BLACKBERG L. and OLIVECRONA T. unpublished observations.
- 116- EISENBERG S. and RACHMILEWITZ D., J. Lipid Res. 1975, 16 : 451-461.
- 117- EISENBERG S. and SCHURR D., J. Lipid Res. 1976, 17 : 578-587.



- 118- ENGER S.C., HERBJORNSSEN K., ERIKSSEN J. and FRET LAND A., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1977, 37 : 251-255.
- 119- FAINARU M., FELKER T.E., HAMILTON R.L. and HAVEL R.J., Metabolism 1977, 26 : 999-1004.
- 120- FAINARU M., GLANGEAUD M.C. and EISENBERG S., Biochim. Biophys. Acta 1975, 386 : 432-443.
- 121- FAINARU M., HAVEL R.J. and FELKER T.E., Biochim. Biophys. Acta 1976, 446 : 56-68.
- 122- FAINARU M., HAVEL R.J. and IMAIZUMI K., Biochem. Med. 1977, 17 : 347-355.
- 123- FARISH E., SHEPHERD J., LAWRIE T.D.V. and MORGAN H.G., Clin. Chim. Acta 1975, 62 : 97-101.
- 124- FELKER T.E., FAINARU M., HAMILTON R.L. and HAVEL R.J., J. Lipid Res. 1977, 18 : 465-473.
- 125- FELLIN R., AGOSTINI B., ROST W. and SEIDEL D., Clin. Chim. Acta 1974, 54 : 325-333.
- 126- FELTS J.M. and ITAKURA H., Circulation 1975, 52 (Suppl.II) : 38.
- 127- FIELDING C.J. and FIELDING P.D., The activation of lipoprotein lipase by lipase coprotein (Apo C-2) ; in Polonovski, Cholesterol metabolims and lipolytic enzymes, pp.165-172 (Masson, New-York 1977).
- 128- FIELDING C.J. and HAVEL R.J. R.J., Archs. Pathol. 1977, 101 : 225-229.
- 129- FIELDING C.J. and HIGGINS J.M., Biochemistry 1974, 13 : 4324.
- 130- FIELDING C.J., SHORE V.G. and FIELDING P.E., Biochim. Biophys. Acta 1972, 270 : 513-518.
- 131- FIELDING C.J., SHORE V.G. and FIELDING P.E., Biochim. Biophys. Res. Commun. 1972, 46 : 1493-1498.

- 132- FIEVET C., DEDONDER E., DEWAILLY P., SEZILLE G. and JAILLARD J., Clin. Chim. Acta (à paraître).
- 133- FIEVET C., DEDONDER E., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., and SEZILLE G., Clin. Chim. Acta 1979, 95 : 405-408.
- 134- FILIPOVIC I. and BUDDERCKE E., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979, 88 : 485-490.
- 135- FILIPOVIC I., SCHWARZMANN G., MRAZ W., WIEGANDT H. and BUDDERCKE E., Eur. J. Biochem. 1979, 93 / 51-55.
- 136- FOLCH J., LEES M. and SLOANE-STANLEY G.H., J. Biol. Chem. 1957, 226 : 497-509.
- 137- FREDRICKSON D.S. and LEES R.S., Circulation 1965, 31 : 321-327.
- 138- FRIEDBERG S. and REYNOLDS J.A., Biol. Chem. 1976, 251 : 4005-4008.
- 139- FRINGS C.S., FOSTER L.B. and COHEN P.S., Clin. Chem. 1971, 17 : 111-114.
- 140- FRUCHART J.C., BUASSA-bu-TSUMBU, JAILLARD J. et SEZILLE G., Clin. Chim. Acta 1975, 63 : 399-402.
- 141- FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G. and coll., Clin. Chem. 1978, 24 : 455-459.
- 142- GIANTURCO S.H., GOTTO A.M., JACKSON R.L., PATSCH J.R., SYBERS H.D., TAUTON O.D., YESHURUN D.L. and SMITH L.C., J. Clin. Invest. 1978, 61 : 320-328.
- 143- GLICKMAN R.M. and GREEN P.H.R., Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74 : 2569-2573.
- 144- GLOMSET J.A., Biochim. Biophys. Acta 1963, 70 : 389-395.
- 145- GLOMSET J.A., J. Lipid Res. 1968, 9 : 155-167.

- 146- GLOMSET J.A., Am. J. Clin. Nutr. 1970, 23 : 1129-1136.
- 147- GLOMSET J.A., Prog. Biochem. Pharmacol. 1979, 15 : 41-66.
- 148- GLOMSET J.A., JANSSEN E.T., KENNEDY R. and DOBBINS J., J. Lipid Res. 1966, 7 : 639-648.
- 149- GLUECK C.J., GARTSIDE R., FALLOT R.W., SIELSKI J. and STEINER P.M., J. Lab. Clin. Med. 1976, 88 : 941-957.
- 150- GLUECK C.J., GARTSIDE P.S., STEINER P.M., MILLER M., TODHUNTER T., HAAF J., PUCKE M., TERRANA M., FALLAT R.W. and KASHYAP M.L., Atherosclerosis 1977, 27 : 387-406.
- 151- GLUECK C.J., GARTSIDE P.M. and TSANG R.C., Metabolism 1977, 26 : 469-472.
- 152- GOFMAN J.W., LINDGREN F.T. and ELLIOT H., J. Biol. Chem. 1949, 179 : 973-979.
- 153- GOFMAN J.W., YOUNG W. and TANDY R., Circulation 1966, 34 : 679-697.
- 154- GOLDSTEIN J.L. and BROWN M.S., Pro. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 1973, 70 : 2804-2808.
- 155- GOLDSTEIN J.L. and BROWN M.S., Archs. Path. 1975, 99 : 181-184.
- 156- GOLDSTEIN J.L. and BROWN M.S., John Hopkins Med. J. 1978, 143 : 8-16.
- 157- GOLDSTEIN J.L., HO Y.K., BASU S.K. and BROWN M.S., Proc. Natl. Aca. Sci. 1979, 76 : 333-337.
- 158- GORDON T., CASTELLI W.P., HJORTLAND M.C., KANNEL W.B. and DAWBER T.R., Am. J. Med. 1977, 62 : 707-714.
- 159- GREEN P.H.R., GLICKMAN R.M., RILEY J.W. and QUINET E., J. Clin. Invest. 1980, 65 : 911-919.

- 160- GREEN P.H.R., TALL A.R. and GLICKMAN R.M., J. Clin. Invest. 1978, 61 : 528-534.
- 161- GROSZEK E. and GRUNDY S.M., Atherosclerosis 1978, 31 : 241-250.
- 162- GROW T.E. and FRIED M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977, 75 : 117-124.
- 163- GRUNDY S.M., MOK H.Y.I., ZECH L., STEINBERG D. and BERMAN M., J. Clin. Invest. 1979, 63 : 1274-1283.
- 164- GURD F.R.N., ONCLEY J.L., EDSALL J.T. and COHN E.J., 'Discussions Favaday Soc.' 1949, 6 : 70-74.
- 165- HALL F.F., RATLIFF C.R., WESTFALL C.L. and CULP T.W., Biochem. Med. 1972, 6 : 464-470.
- 166- HAMILTON R.L., Adv. Exp. Med. Biol. 1972, 26 : 7-24.
- 167- HAMILTON R.L., WILLIAMS M.C., FIEDLING C.J. and HAVEL R.J., J. Clin. Invest. 1976, 58 : 667-680.
- 168- HATCH H.S. and LEES R.S., Adv. Lipid Res. 1968, 6 : 1-68.
- 169- HAVEL R.J., Lipoprotein and lipid transport ; in Kritchevsky, Paoletti and Holmes, Lipids, lipoproteins and drugs, pp.37-60 (Plenum Press, New-York 1975).
- 170- HAVEL R.J., EDER H.A. and BRAGDON J.H., J. Clin. Invest. 1955, 34 : 1345-1353.
- 171- HAVEL R.J., KANE J.P. and KASHYAP M.L., J. Clin. Invest. 1973, 52 : 32-38.
- 172- HAVEL R.J., SHORE V.G., SHORE B. and BIER D.M., Circulation Res. 1970, 27 : 595-600.
- 173- HELENIUS A. and SIMONS K., Biochemistry 1971, 10 : 2542-2547.

- 174- HELSKELL C.L., FISK R.T., FLORSHEIM W.H., TACHI A. and coll., Amer. J. Clin. Path. 1961, 35 : 222-226.
- 175- HERBERT P.N. and HENDERSON L.O., Lancet 1979, 1368-1369.
- 176- HEUCK C.C. and SCHLIERF G., Clin. Chem. 1979, 25 : 221-226.
- 177- HEUCK C.C. and SCHILERF G., Clin. Chem. 1979, 25 : 782-785.
- 178- HOFF H.F., Artery 1979, 6 : 178-187.
- 179- HOFF H.F., BRADLEY W.A., HEIDEMAN C.L., GAUBATZ J.W., KARAGAS M.D. and GOTTO A.M., Biochim. Biophys. Acta 1979, 573 : 361-374.
- 180- HOFF H.F., GAUBATZ J.W. and GOTTO A.M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978, 85 : 1424-1430.
- 181- HOFF H.F., HEIDEMAN C.L., GAUBATZ J.W., SCOTT D.W., TITUS J.L. and GOTTO A.M., Lab. Invest. 1978, 38 : 560-567.
- 182- HOLMQUIST L. and CARLSON K., Biochim. Biophys. Acta 1977, 493 : 400-409.
- 183- HOUSER A., LARUE A., FAIRWELL T., OSBORNE J.C. and BREWER H.B. (manuscript in preparation).
- 184- HUANG S.S. and LEE D.M., Biochim. Biophys. Acta 1979, 577 : 424-441.
- 185- ILLINGWORTH D.R., Biochim. Biophys. Acta 1975, 388 : 38-51.
- 186- IMAIZUMI T., FAINARU M. and HAVEL R.J., J. Lipid Res. 1978, 19 : 712-722.
- 187- INNERARITY T.L. and MAHLEY R.W., Biochemistry 1978? 17 : 1440-1447.
- 188- INNERARITY T.L., MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H. and BERSOT T.P., J. Biol. Chem. 1978, 253 : 6289-6295.
- 189- INNERARITY T.L., PITAS R.E. and MAHLEY R.W., J. Biol. Chem. 1979, 254 : 4186-4190.

- 190- IKAI A. and HASEGAWA M., J. Biochem. 1978, 83 : 755-759.
- 191- JACKSON R., BAKER H., GILLIAM E. and GOTTO A.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74 : 1942-1945.
- 192- JACKSON R.L. and GOTTO A.M., Biochim. Biophys. Acta 1972, 285 : 36-47.
- 193- JACKSON R.L., MORRISETT J.D., POWNALL H.J. and GOTTO A.M., J. Biol. Chem. 1973, 248 : 5218-5224.
- 194- JAILLARD J., SEZILLE G., DEWAILLY P., FRUCHART J.C., Ann. Med. interne, 1977, 128 : 739-744.
- 195- JANDACEK R.J., WEBB M.R. and MATTSON F.H., J. Lipid Res. 1977, 18 : 203-210.
- 196- JURGENS G. and KOSTNER G.M., Immunogenetics 1975, 1 : 560-569.
- 197- KAHAN J. and SUNDBLAD L., in Technicon International Symposia 1966 : Automation in Analytical Chemistry, 1967, Vol.2, pp.361-364, Mediad Incorporated, New-York.
- 198- KAHAN J. and SUNDBLAD L., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1969, 245 : 61-68.
- 199- KALLBERG M., LINDEN L. and GUSTAFSON A., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1976, 36 : 59-65.
- 200- KANE J.P., Anal. Biochem. 1973, 53 : 350-364.
- 201- KANE J.P., SATA T., HAMILTON R.L. and HAVEL R.J., J. Clin. Invest. 1975, 56 : 1633-1634.
- 202- KANNEL W.B., CASTELLI W.P., GORDON T. and McNAMARA T., Ann. Intern. Med. 1971, 74 : 1.
- 203- KANNEL W.B., DAWBER T.R., FRIEDMAN G.T., GLENNON W.E. and McNAMARA P.M., Ann. Intern. Med. 1964, 61 : 888-899.

- 204- KARLIN J.B., JUHN D.J., GOLDBERG R. and RUBENSTEIN A.H., Ann. Clin. Lab. Sci. 1978, 8 : 142-153.
- 205- KASHYAP M.L., SRIVASTAVA L.S., CHEM C.Y., PERISUTTI C., CAMPBELL M., LUTHMER R.F. and GLUECK C.J., J. Clin. Invest. 1977, 60 : 171-180.
- 206- KINNUNEN P.K.J., JACKSON R.L., SMITH L.C., GOTTO A.M. and SPARROW J.T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74 : 4848-4851.
- 207- KORN E.D. and QUIGLEY T.W., Biochem. Biophys. Acta 1955, 18 : 143.
- 208- KOSTNER G.M., Biochim. Biophys. Acta 1974, 336 : 383-395.
- 209- KOSTNER G.M., AVOGARO P., BITTOLO BON G., CAZZOLATO G. and QUICI G.B., Clin. Chem. 1979, 25 : 939-942.
- 210- KOSTNER G.M. and HOLASEK A., Biochim. Biophys. Acta 1977, 488 : 417-431.
- 211- KOSTNER G.M., PATSCH J.R., SAILER S., BRAUNSTEINER H. and HOLASEK A., Eur. J; Biochem. 1974, 15 : 611-621.
- 212- KUSHWAHA R.S., HAZZARD W.R., WAHL P.W. and HOOVER J.J., Ann. Intern. Med. 1977, 87 : 509-516.
- 213- LAROSA J.C., LEVY R.I., BROWN W.V. and FREDRICKSON D.S., Am. J. Physiol. 1971, 220 : 785-791.
- 214- LAURELL C.B., Anal. Biochem. 1966, 15 : 45-52.
- 215- LEE D.M. and ALAUPOVIC P., Atherosclerosis 1974, 19 : 501-520.
- 216- LEES R.S., Science 1970, 169 : 493-495.
- 217- LEES R.S. and HATCH F.T., J. Lab. Clin. Med. 1963, 61 : 518-528.
- 218- LEVY R.I. and FREDRICKSON D.S., J. Clin. Invest. 1965, 44 : 426-441.



- 219- LEVY R.I., LEES R.S. and FREDRICKSON D.S., J. Clin. Invest. 1966, 45 : 63-77.
- 220- LINDEN L., KALLBERG M., GUSTAFSON A. and DAHLEN G., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1976, 36 : 51-58.
- 221- LINDGREN F.T. and NICHOLS A.V., in "Plasma Lipoproteins", Putman ed. Academic Press, London, 1960, II : 1-58.
- 222- LOPEZ S.A., SRINIVASAN S.R., DUGAN, R.S., RALHAKRISHNANURTHY B. and BERENSON G.S., Clin. Chim. Acta 1971, 31 : 123-132.
- 223- LOPES-VIRELLA M.F., STONE P., ELLIS S. and COLWELL J.A., Diabetologia 1977, 13 : 285-291.
- 224- LOPES-VIRELLA M.F., STONE P., ELLIS S. and COLWELL J.A., Clin. Chem. 1977, 23 : 882-884.
- 225- LORENZELLI L. and BEAUMONT J.L., Biomedicine 1978, 29 : 84-86.
- 226- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., J. Biol. Chem. 1951, 193 : 265-275.
- 227- LUZZATI V., TARDIEU A. and AGGERBECK L.P., J. Mol. Biol. 1979, 131 : 435-473.
- 228- McCONATHY W. and ALAUPOVIC P., Febs Lett. 1973, 37 : 178-182.
- 229- McCONATHY W.J. and ALAUPOVIC P., Febs Lett. 1974, 41 : 174-178.
- 230- McCONATHY W.J. and ALAUPOVIC P., Biochemistry, N.Y. 1976, 15 : 515-520.
- 231- MACHEBEUF M., Bull. Soc. Chim. Biol. 1929, 11 : 268-293.
- 232- MAHLEY R.W. and INNERARITY T.L., J. Biol. Chem. 1977, 252 : 3980-3986.
- 233- MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H. and INNERARITY T.L., Biochim. Biophys. Acta 1979, 575 : 81-91.



- 234- MAHLEY R.W., WEISGRABER K.H., INNERARITY T.L. and BERSOT T.P., *Circulation* 1977, 56 : suppl. III, p.57.
- 235- MAHLEY R.W. WEISGRABER K.H., INNERARITY T., BREWER H.B. and ASSMAN G., *Biochemistry* 1975, 1' : 2817-2823.
- 236- MANCINI G., CARBONARA A.O. and HEREMANS J.F., *Immunochemistry* 1965, 2 : 235-254.
- 237- MAO S.J.T., GOTTO A.M. and JACKSON R.L., *Biochemistry* 1975, 14 : 4127-4131.
- 238- MARCEL Y.L., BERGSETH and NESTRUCK A.C., *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 573 : 175-183.
- 239- MARGOLIS S. and CAPUZZI D., in "Blood Lipids and Lipoproteins" by Nelson G., Wiley-Interscience, 1972, 825-80.
- 240- MEAD M.G. and DANGERFIELD W.G., *Clin. Chim. Acta* 1974, 51 : 173-176.
- 241- MIDDELHOFF G., ROSSENEU M., PEETERS H. and BROWN W.V., *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 441 : 57-67.
- 242- MILLER N.E., *Lipids* 1978, 13 : 914-919.
- 243- MILLER N.E. and MILLER G.J., *Lancet* 1975, I : 1033.
- 244- MILLER N.E., WEINSTEIN D.B., CAREW T.E., KOSCHINSKY T. and STEINBERG, *J. Clin. Invest.* 1977, 60 : 78-88.
- 245- MILLER N.E., WEINSTEIN D.B. and STEINBERG D., *J. Lipid Res.* 1977, 10 : 438-450.
- 246- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides. Monographie N°1 : Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Faculté des Sciences, Lille* 1963.
- 247- MULLER K., LAGNER P., GLATTER O. and KOSTNER G., *Eur. J. Biochem.* 1978, 82 : 73-90.

- 248- NAKANE P. and KAWAOI A., J. Histochem. Cytochem. 1974, 22 : 1084-1091.
- 249- NESTEL P.J., REARDON M. and BILLINGTON T., Biochim. Biophys. Acta 1979, 573 : 403-407.
- 250- NIAZI S. and STATE D., Cancer Research 1948, 8 : 653.
- 251- NICHOLS A.V., Adv. Biol. Med. Phys. 1967, 11 : 110-158.
- 252- NIKKILA E.A., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1953, 5 : 1-101.
- 253- NIKKILA E.A., Eur. J. Clin. Invest. 1978, 8 : 111-113.
- 254- NIKKILA E.H., Metabolic and endocrine control of plasma high density lipoprotein density lipoproteins and atherosclerosis (Elsevier/North Holland, Amsterdam 1978).
- 255- NIKKILA E., TASKINEN M.R. and KEKKI M., Atherosclerosis 1978, 29 : 497.
- 256- NILSSON-EHLE P., EGELRUD T., BELFRAGE P., OLIVECRONA T. and BORGSTROM B., J. Biol. Chem. 1973, 248 : 6734-6737.
- 257- NISHIDA T.J. and COGAN U., J. Biol. Chem. 1970, 245 : 4689-4697.
- 258- NOBLE R.P., J. Lipid Res. 1968, 9 : 693-700.
- 259- NORUM K.R., GLOMSET J.A., NICHOLS A.V., FORTE T., ALBERS J.J., KING W.C., MITCHELL C.D., APPLGATE K.R., GONG E.L., CABANA V. and GJONE E., Scand. Clin. Lab. Invest. 1975, 35 (suppl. 142) : 31-55.
- 260- OLIVECRONA T., BENGTSOON G., MARKLUND S.E., LINDAHL U. and HOOK M., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 1977, 36 : 60-65.
- 261- OLIVER M.F., NIMMO I.A., COKE M., CARLSON I.A. and OLSSON A.G., Eur. J. Clin. Invest. 1975, 5 : 507-514.
- 262- OLOFSSON S.O., MCCONATHY W.J. and ALAUPOVIC P., Biochemistry 1978, 17 : 1032-1036.

- 263- OSBORNE J.C. and BREWER H.B., *Advances in Protein Chemistry* 1977, 31 : 253-337.
- 264- OSBORNE J.C., BRONZERT T.J. and BREWER H.B., *J. Biol. Chem.* 1977, 252 : 5756-5760.
- 265- OSBORNE J.C., PALUMBO G., BREWER H.B. and EDELHOCH H., *Biochemistry* 1975, 14 : 3741-3746.
- 266- OSE L., KALAGER T. and GRUNDT I.K., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1976, 36 : 75-79.
- 267- OUCHTERLONY O., *Progr. Allergy* 1958, 5 : 1-78.
- 268- PATSCH J.R., GOTTO, OLIVECRONA T. and EISENBERG S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978, 75 : 4519-4523.
- 269- PATSCH W., PATSCH J.R., KOSTNER G.M., SAILER S. and BRAUNSTEIN H., *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 4911-4915.
- 270- PEDERSEN K.O., "Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions", 1945, Almquist and Wiksells, Uppsala.
- 271- PHAIR R.D., HAMMOND M.G., BOWDEN J.A., FRIED M., FISHER W.R. and BERMAN M., *Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol.* 1975 , 34 : 2263.
- 272- PITAS R.E., INNERARITY T.L., ARNOLD K.S., and MAHLEY R.W., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76 : 2311-2315.
- 273- QUARFORDT S.H. and GOODMAN D.S., *Biochim. Biophys. Acta* 1969, 176 : 863-872.
- 274- RACHMILEWITZ D. and FAIRANU M.? *Metabolism* 1979, 28 : 739-743.
- 275- RACHMILEWITZ D., STEIN O., ROHEIM P.S. and STEIN Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 270 : 414-425.
- 276- RAGLAND J.B., BERTRAM P.D. and SABESIN S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, 80 :81-88.

- 277- RAHEJA R., KAUR C., SINGH A. and BHATIA I., J. Lipid Res. 1973, 14 : 695-697.
- 278- RAPOPORT J., AVRIRAM M., CHAIMOVITZ C. and BROOK J.G., N. Engl. J. Med. 1978, 299 : 1326-1329.
- 279- REAVEN G.M. and BERSTEIN R.M., Metabolims 1978, 27 : 1047-1054.
- 280- REMAN F.C. and VERMOND A., Clin. Chim. Acta 1978, 87 : 387-394.
- 281- RHOADS G.G., GULBRANDSEN C.L. and KAGAN A., N. Engl. J. Med. 1976, 294 : 293-298.
- 282- RICHIE R.F. and CLARK C., in Automated immunoprecipitation reactions. New methods, techniques and evaluations, 1972, pp. 13-16, Technicon Instruments Corporation, New-York.
- 283- RICHTER W., Intern. Arch. Allergy 1972, 43 : 700.
- 284- RIESEN W.F., MORDASINI R.C. and MIDDELHOFF G.W., Febs Lett. 1978, 91 : 35-39.
- 285- RIMINGTON C., Biochem. J. 1931, 25 : 1062.
- 286- RITCHIE R.F., J. Lab. Med. 1967, 70 : 512-517.
- 287- ROBINSON D.S., The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport ; in Florkin and Stotz, Comprehensive biochemistry, Vol.18, pp.51-116 (Elsevier, Amsterdam 1970).
- 288- ROHEIM P.S., HIRSH H., EDELSTEIN D. and RACHMILEWITZ D., Biochim. Biophys. Acta 1972, 278 : 517-529.
- 289- ROHEIM P.S., RACHMILEWITZ D., STEIN O. and STEIN Y., Biochim. Biophys. Acta 1971, 248 : 315-329.
- 290- ROSSENEU M., BLATON V., VERCAEMST R., SOETEWY F. and PEETERS H., Eur. J. Biochem. 1977, 74 : 83-88.

- 291- RUBENSTEIN B., Can. J. Biochem. 1978, 56 : 977-980.
- 292- RUDEL L., LEE J., MORRIS M. ad FELTS J., Circulation 1972, 46 : 11-17.
- 293- RUDMAN R., GARDIA L. and HOWARD C.H., J. Clin. Invest. 1970., 49 : 365-372.
- 294- RUSH R.L., LEON L.P. and TUNEL J., in "Advances in Automated Analysis"  
1970, 1 : 503-507.
- 295- SATA T., HAVEL R.J. and JONES A.L., J. Lipid Res. 1972, 13 : 757-768.
- 296- SCANU A.M., Biochem. Biophys. Acta 1972, 265 : 47-508.
- 297- SCANU A.M. and EDELSTEIN C., Anal. Biochem. 1971, 44 : 576-588.
- 298- SCANU A.M., EDELSTEIN C. and KEIM P., in "The plasma proteins", Putnam  
ed. 1975, 1 : 317-391.
- 299- SCANU A. and GRANDA J.L., Biochemistry 1966 : 446-455.
- 300- SCANU A.M. and RITTER M.C., Adv. Clin. Chem. 1973, 16 : 111-151.
- 301- SCHAEFER E.J., BLUM C.B., LEVY R.I., JENKINS L.L., ALAUPOVIC P.,  
FOSTER D.M. and BREWER H.B., N. Engl. J. Med. 1978, 199 : 905-910.
- 302- SCHAEFER E.J., EISENBERG S. and LEVY R.I., J. Lipid Res. 1978, 19 : 667-687.
- 303- SCHAEFER E.J., JENKINS L.L. and BREWER H.B., Biochem. Biophys. Res. Commun.  
1978, 80 : 405-412.
- 304- SCHAEFER E.J. and LEVY R.I., Prog. Biochem. Pharmacol. 1979, 15 : 200-215.
- 305- SCHAEFER E.J., LEVY R.I., ANDERSON D.W., DANNER R.N., BREWER H.B. and  
BLACKWELDER W.C., Lancet 1978, II : 391-392.
- 306- SCHENKER J.G., PINSON A., POLISHUK W.Z., Fertil. Steril. 1971, 22 : 604.

- 307- SCHNEIDER H., MORROD R.S., COLIN J.R. and TATTRIE N.H., Chem. Phys. Lipids 1973, 10 : 328-353.
- 308- SCHONFELD G. , BAILEY A. and STEENLAM R., Lipids 1978, 13 : 951-959.
- 309- SCHONFELD G., BRADSHAW R.A. and CHEN J., J. Biol. Chem. 1976, 251 : 3921-3926.
- 310- SCHONFELD G., CHEN J.S., McDONNELL W.F. and JENG I., J. Lipids Res. 1977, 18 : 645-655.
- 311- SCHONFELD G., CHEN J.S. and ROY R.G., J. Biol. Chem. 1977, 252 : 6651-6654.
- 312- SCHONFELD G., CHEN J.S. and ROY R.G., J. Biol. Chem. 1977, 252 : 6655-6659.
- 313- SCHONFELD G., FRICK M.S. and BAILEY A.P., J. Lipid Res. 1976, 17 : 25-29.
- 314- SCHONFELD G., LEES R.S., GEORGE P.K. and PFLEGER B., J. Clin. Invest. 1974, 53 : 1458-1467.
- 315- SCHONFELD G. and PFLEGER B., J. Clin. Invest. 1974, 54 : 236-246.
- 316- SCHONFELD G., WEIDMAN S.W., WITZTUM J.L. and BOWEN R.M., Metabolism 1976, 25 : 261-275.
- 317- SCHROEDER F. and GOH E.H., J. Biol. Chem. 1979, 254 : 2464-2470.
- 318- SCOW R.O., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 1977, 36 : 182-185.
- 319- SEIDEL D., ALAUPOVIC P., FURMAN R.H. and McCONATHY W.J , J. Clin. Invest. 1970, 49 : 2396-2407.
- 320- SEIDEL D., SCHMITT E.A. and ALAUPOVIC P., Ger. Med. Mon. 1970, 15 : 671-675.
- 321- SEGAL A.W., PUTMAN D. and MINCHIN-CLARKE H.G., Atherosclerosis 1973, 18 : 499-504.

- 322- SEZILLE G., FRUCHART J.C., JAILLARD J., DEWAILLY P. and DESREUMAUX C.,  
Biomedicine Express 1975, 23 : 315-317.
- 323- SHAPIRO D., BALLANTYNE F.C. and SHEPHERD J., Clin. Chim. Acta 1980,  
103 : 7-13.
- 324- SHELBURNE F.A. and QUARFORDT S.H., J. Biol. Chem. 1974, 249 : 1428-1433.
- 325- SHEPHERD J., GOTTO A.M. and TAUNTON O.D., Biochim. Biophys. Acta, (in  
Press).
- 326- SHEPHERD J., PACKARD C.J., PATSCH J.R., GOTTO A.M. and TAUNTON O.D., Eur.  
J. Clin. Invest. 1978, 8 : 115-120.
- 327- SHEPHERD J., PACKARD C.J., PATSCH J.R., GOTTO A.M. and TAUNTON O.D., J.  
Clin. Invest. 1978, 61 : 1582-1592.
- 328- SHEPHERD J., PACKARD C.J., PATSCH J.R., GOTTO A.M. and TAUNTON O.D., J.  
Clin. Invest. 1979, 63 : 858-867.
- 329- SHEPHERD J., PATSCH J.R., PACKARD C.J., GOTTO A.M. and TAUNTON O.D., J.  
Lipids Res. 1978, 19 : 383-389.
- 330- SHORE V.G., SAE A.S.W. and SHORE B., Biochim. Biophys. Acta 1978,  
529 : 319-330.
- 331- SHORE V. and SHORE B., Biochemistry 1967, 6 : 1962.
- 332- SHORE V. and SHORE B., Biochemistry 1968, 7 : 2773-2777.
- 333- SHORE V. and SHORE B., in "Blood lipids and lipoproteins", ed. G.J. Nelson,  
Wiley Interscience N.Y., 1972, 789-824.
- 334- SHORE B. and SHORE V., Biochem. Res. Commun. 1974, 58 : 107-109.
- 335- SHULMAN R.S., HERBERT P., WEHRLY K. and FREDRICKSON D.S., J. Biol. Chem.  
1975, 250 : 182-190.

- 336- SIGURDSSON G., NICOLL A. and LEWIS B., J. Clin. Invest. 1975, 56 : 1481-1490.
- 337- SIMONS K., EHNHOLM C., RENKONEN O. and BLOTH B., Acta Path. Microbiol. Scand. 1970, 78 : 459-466.
- 338- SING C.F., CHAMBERLAIN M.A., BLOCK W.D.C. and FEILER S., Amer. J. Hum. Gent. 1975, 27 : 333-347.
- 339- SKIPSKI V.P., BARCLAU M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J. and ARCHIBALD F.M., Biochem. J. 1967, 104 : 340-352.
- 340- SMALL D.M., N. Engl. J. Med. 1977, 297 : 873-877.
- 341- SMITH L.C. and SCOW R.O., Prog. Biochem. Pharmacol. 1979, 15 : 109-138.
- 342- SNIDERMAN A.D., CAREW T.E., CHANDLER J.G. and STEINBERG D., Science 1974, 183 : 526-528.
- 343- SNIDERMAN A., THOMAS D., MARPOLE D. and TENG B., J. Clin. Invest. 1978, 61 : 867-873.
- 344- SOUTAR A.K., GARNER C.W., BAKER N.H., SPARROW J.T., JACKSON R.L., GOTTO A.M. and SMITH L.C., Biochemistry 1975, 14 : 3057-3064.
- 345- SOUTAR A.K., SIGLER G.F., SMITH L.C., GOTTO A.M. and SPARROW J.T., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1978, 38 : 53-58.
- 346- SPARROW J.T., POWNALL H.J., HSU F.J., BLUMENTHAL L.D., CULWELL A.R. and GOTTO A.M., Biochemistry 1977, 16 : 5427-5431.
- 347- STAMLER J., Lectures on Preventive Cardiology, New-York 1967.
- 348- STARR J.I., JUHN D.J. and MAKO M.E., J. Clin. Invest. 1973, 52 : 81a.
- 349- STEIN Y., EBIN V., BAR-ON H. and STEIN O., Biochim. Biophys. Acta 1977, 486 : 286-297.



- 350- STEIN Y., GLANGEAUD M.C., FAINARU M. and STEIN O., *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 380 : 106-118.
- 351- STEIN E.A., McNEELEY S. and STEINER P., *Clin. Chem.* 1979, 25 : 1934-1938.
- 352- STEIN O. and STEIN Y., *Lab. Invest.* 1967, 17 : 436-446.
- 353- STEIN O. and STEIN Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 326 : 232-244.
- 354- STEIN O. and STEIN Y., in *Handbook of internal medicine, VOL.7*, pp.197-218 (Springer, Berlin 1976).
- 355- STEINBERG D., *Prog. Biochem. Pharmacol.* 1979, 15 : 166-169.
- 356- SWAMINATHAN N. and ALADJEM F., *Biochemistry* 1976, 15 : 1516-1522.
- 357- SWANEY J.B. and O'BRIEN K., *J. Biol. Chem.* 1978, 253 : 7069-7077.
- 358- TALL A.R., HOGAN V., ASKINAZI L. et al., *Biochemistry* 1978, 17 : 322-326.
- 359- TALL A.R. and SMALL D.M., *N. Engl. J. Med.* 1978, 299 : 1232-1236.
- 360- TAN M.H., *Clin. Med. Ass. J.* 1978, 118 : 675-680.
- 361- TARDIEU A., *Eur. J. Biochem.* 1979, 96 : 621-624.
- 362- TILLMANS J. and PHILLIPPI K., *Biochem. Z.* 1929, 215 : 36.
- 363- TRAMS E.G. and BROWN E.A., *J. Theor. Biol.* 1966, 12 : 311-326.
- 364- TURNER P., MILLER N., CHRYSTIE I., COLTART J., MISTRY P., NICOLL A. and LEWIS B., *Lancet* 1979, 645-657.
- 365- TYROLER H.A., HAMES C.E., KRISHAN I., HEYDEN S., COOPER G. and CASSEL J.C., *Presse Med.* 1975, 4 : 541-549.
- 366- UTERMANN G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1975, 356 : 1113-1121.

- 367- UTERMANN G. and BEISIEGEL U., Eur. J. Biochem. 1979, 99 : 333-352.
- 368- UTERMANN G., HEES M., STEIMMETZ A., Nature 1977, 269 : 604-607.
- 369- UTERMANN G. and WIEGANDT H., Humangenetik 1969, 8 : 39-46.
- 370- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAGE E. and ROSS G.T., J. Clin. Endocrinol. 1971, 33 : 988-991.
- 371- VERDERY R. and NICHOLS A.V., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974, 57 : 1271-1278.
- 372- VIKARI J., Scand. J. Clin. Invest. 1976, 36 : 265-268.
- 373- VOGEL W.C. and BIERMAN E.L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968, 127 : 77-80.
- 374- VOGEL W.C. and ZIEVE L., K. Lipid Res. 1964, 5 : 177-183.
- 375- VOGELBERG K.H., UTERMANN G. and GRIES F.A., Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1973, 11 : 291-296.
- 376- WALLACE R.B., HOOVER J., BARRETT-CONNOR E., RIFKIND B.M., HUNNINGHAKE D.B., MACKENTHUN A. and HEISS G., Lancet 1979, 111-114.
- 377- WALTON K.W., HITCHENS J., MAGANANI H.N. and KHAN M., Atherosclerosis 1974, 20 : 323-346.
- 378- WARNICK G.R., CHEUNG M.C. and ALBERS J.J., Clin. Chem. 1979, 25 : 596-604.
- 379- WEBER K. and OSBORNE M., J. Biol. Chem. 1969, 244 : 4406-4412.
- 380- WEIDMAN S.W., SWANEZ B., FALKO J.M., WITZTUM J.L. and coll., J. Lab. Clin. Med. 1979, 93 : 549-569.
- 381- WEISGRABER K.H., BERSOT T.P. and MAHLEY R.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978, 85 : 287-292.

- 382- WEISGRABER K.H., INNERARITY T.L. and MAHLEY R.W., J. Biol. Chem. 1978, 253 : 9053-9062.
- 383- WERNER M., J. Chromatogr. 1966, 25 : 63-70.
- 384- WICHMAN A., Biochem. J. 1979, 181 : 691-698.
- 385- WIDE L., AXEN R. and PORATH J., Immunochemistry 1967, 4 : 381.
- 386- WILLE L.E., Artery 1978, 4 : 330-347.
- 387- WILSON D.E. and DONE G.A., Clin. Chem. 1974, 20 : 394-399.
- 388- WILSON D.E. and SPIGER M., J. Lab. Clin. Med. 1973, 82 : 473-482.
- 389- WINDMUELLER H.G., HERBERT P.N. and LEVY R.I., J. Lipid Res. 1973, 14 : 215-223.
- 390- WITZTUM J. and SCHONFELD G., Diabetes 1979, 28 : 326-336.
- 391- WITZTUM J., SCHONFELD G., WEIDMAN S.W., GIESE W.E. and DILLINGHMA M.A., Metabolism 1979, 28 : 221-229.
- 392- WOOD P.D. and HASKELL W.L., Lipids 1979, 14 : 417-427.
- 393- WULFERT E., 2ème Colloque International "Lipoprotéines et Athérome" 5 et 6 mai 1979, Dijon, France, pp.35-43.
- 394- YANO K., RHOADS G.G. and KAGAN A., N. Engl. J. Med. 1977, 297 : 405-409.
- 395- YOKOYAMA S., MURASE T. and AKANUMA Y., Biochim. Biophys. Acta 1978, 530 : 258-266.
- 396- ZILVERSMITT dans "Le Pharmacien Biologiste" par Collombel C., 1978, XII/117 : 469/31-483/45.