

50376
1989
317

50376
1989
317

N° d'ordre 419

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE OPTION BIOCHIMIE

présentée par
Norddine GHALIM

**ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE
DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES HUMAINES
Lp AI, Lp AI:AII ET Lp AIV**



Soutenue et présentée le 22 Septembre 1989

Jury :	Professeur Jean MONTREUIL	Président
	Professeur Jean KREMBEL	Rapporteur
	Professeur Patrick DURIEZ	Rapporteur
	Docteur Pascal PUCHOIS	Rapporteur
	Docteur Gérard LUC	Examineur
	Professeur Gérard AILHAUD	Examineur
	Professeur Jean-Charles FRUCHART	Examineur

SCD LILLE 1



D 030 319856 8

50376
1989
317

50376
1989
317

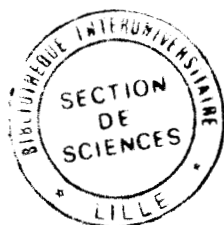
A mes parents

A ma soeur et mes frères

Et tous ceux qui me sont chers



**Ce travail a été réalisé dans le Service de Recherche sur
les Lipoprotéines et l'Athérosclérose (SERL1A), Unité
INSERM 325 à l'Institut Pasteur de Lille,
sous la direction de Monsieur le Professeur
Jean-Charles FRUCHART**



A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL :

Vous me faites le grand honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de mon profond respect.

A Mon Maître de thèse, Monsieur le Professeur Jean-Charles FRUCHART:

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre Laboratoire. Ce jour est pour moi l'occasion de vous exprimer mon profond respect et ma sincère reconnaissance pour votre soutien et votre confiance.

A Monsieur le Professeur Gérard ALLHAUD :

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger parmi mes juges. Que ce travail soit pour vous le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean KREMBEL :

Je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Patrick DURIEZ :

Vous avez accepté avec gentillesse de juger ce travail. Je vous prie de recevoir l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Pascal PUCHOIS :

Vos conseils judicieux et vos encouragements dans les moments difficiles m'ont beaucoup aidé. Je vous exprime aujourd'hui mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Gérard LUC :

J'ai pu apprécier votre disponibilité et votre aide. Je tiens aujourd'hui à vous exprimer ma profonde gratitude et mes chaleureux remerciements.



**A Madame le Docteur Graciela CASTRO
et A Monsieur le Docteur Armin STEINMETZ :**

Vos conseils et vos compétences scientifiques ont été pour moi d'un grand intérêt.
Je tiens à vous signifier ma sincère gratitude.

**Mes vifs remerciements également à l'ensemble du personnel du
Service de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose
(SERL1A) à l'Institut Pasteur de Lille.**

Articles et communications :

- 1 - Bonneterre J., Ghalim N., Nguyen M., Puchois P., Demaille A., Demarquilly C. and Fruchart J.C.,
Variations in lipoproteins during aminoglutethimide therapy.
Breast Cancer Research and Treatment, 1987, 10, 197-200.
- 2 - Hachem H., Favre G., Ghalim N., Puchois P., Fruchart J.C. and Soula G.,
Quantitative abnormalities of lipoprotein particles in multiple myeloma.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1987, 25, 675-679.
- 3 - Kabbaj O., Saile R., Ghalim N., Parra H.J., Puchois P., Fruchart J.C., Métais P. and Féraud G.,
Analyse quantitative des apolipoprotéines et des particules lipoprotéiques chez les traumatisés crâniens.
Ann. Biol. Clin., 1989, 47, 35-40.
- 4 - Barkia A., Barbaras R., Ghalim N., Puchois P., Ailhaud G. and Fruchart J.C.,
Effect of different apo-AI containing lipoprotein particles on reverse cholesterol transport in fat cells.
Horm. Met. Res., Supplément séries, 1988, 19, 10-12.
- 5 - Ghalim N., Barkia A., Puchois P., Barbaras R., Ailhaud G. and Fruchart J.C.,
Antiatherogenic effect of apolipoprotein AI containing lipoproteins.
Cholesterol Transport Systems and their Relation to Atherosclerosis.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989, 89-91.
- 6 - Fruchart J.C., Puchois P., Fiévet C., Ghalim N., Luyeye I. and Parra H.J.,
Polyclonal and monoclonal antibody mapping of lipoprotein particles. Clinical applications.
Recent aspects of diagnosis and treatment of lipoprotein disorders : impact on prevention of atherosclerotic diseases.
Alan R. Liss, Inc., 1988, 175-182.
- 7 - Barkia A., Puchois P., Ghalim N., Barbaras R., Torpier G., Ailhaud G. and Fruchart J.C.,

Differential role of apolipoprotein AI containing particles in cholesterol efflux from adipose cells.
Arteriosclerosis (accepté pour publication).

- 8 - Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J.C. and Ailhaud G.,
Human apolipoprotein AIV binds to apolipoprotein AI/AII receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells.
J. Biol. Chem. (accepté pour publication).
- 9 - Parra H.J., Mezdour H., Ghalim N., Bard J.M. and Fruchart J.C.,
Differential electroimmunoassay on ready-to-use plates for human Lp-AI lipoprotein particles.
Clin. Chem. (accepté pour publication).
- 10 - Ghalim N., Puchois P., Zylberberg G., Fiévet P., Demarquilly C. and Fruchart J.C.,
Effect of alcohol intake on human apolipoproteins AI containing lipoproteins subfractions.
Arch. Int. Med. (accepté, en cours de révision).
- 11 - Ghalim N., Hugot-Puchois A., Puchois P., Parra H.J. and Fruchart J.C.,
L'alcool a-t-il un effet athérogène ou antiathérogène ?
Analyse des données épidémiologiques et biochimiques.
Presse Médicale (soumis pour publication).
- 12 - Puchois P., Barkia A., Ghalim N., Lesage X. and Fruchart J.C.,
Apoproteins AI, AII, AIV, B, E, CIII, levels in liver insufficiency.
Gastroenterology (soumis pour publication).
- 13 - Barkia A., Ghalim N., Lesage X., Fruchart J.C. and Puchois P.,
Variation of pro-apo-AI level with respect to total apo-AI concentration.
Clin. Chem. Acta (soumis pour publication).
- 14 - Ghalim N., Puchois P. and Fruchart J.C.,
Alcohol consumption and apo-AI containing lipoprotein particles.
IX International Symposium on DRUGS AFFECTING LIPID METABOLISM
Florence (Italy), October 22-25, 1986.
- 15 - Puchois P., Ghalim N., Zylberberg R. and Fruchart J.C.,
Effect of alcohol consumption on lipoprotein particles wich contain

apo-AI and apo-AII (Lp-AI:II) and apo-AI but not apo-AII (Lp-AI).
Circulation, 1986, 74 (suppl. II), 383.

- 16 - Puchois P., Ghalim N., Barkia A. and Fruchart J.C.,
Exemple d'applications de l'immunométrie.
6^{èmes} journées nationales de la Société Française de la Biologie Clinique et 6^{èmes} journées lilloises de biologie clinique.
Le Touquet, 1987, 21-23 mai.
- 17 - Puchois P., Barkia A., Barbaras R., Ghalim N., Ailhaud G. and Fruchart J.C.,
Effect of different apolipoprotein AI containing lipoprotein particles on cholesterol efflux from adipose cells.
The American Heart Association, 60th scientific sessions, Anaheim, November 16-19, 1987.
- 18 - Puchois P., Steinmetz A., Ghalim N., Barbaras R., Ailhaud G. and Fruchart J.C.,
Characterisation of lipoproteins containing apo-AI but not apo-AII from human interstitial fluid.
The American Heart Association, 61th scientific sessions, November 14-17, 1988.
- 19 - Ghalim N., Castro G., Barbaras R., Ailhaud G., Vu Dac N., Fruchart J.C. and Steinmetz A.,
Isolation and function of Lp-AIV from human plasma.
53rd Annual Meeting of the European Atherosclerosis Society (EAS) Vienna, April 20-22, 1989.
- 20 - Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Castro G., Kaffarnik H., Fruchart J.C. and Ailhaud G.,
Role of human apolipoprotein AIV in promoting cholesterol efflux from adipose cells.
The American Heart Association, 62nd scientific sessions, New-Orleans Convention Center, New-Orleans, LA, November 13-16, 1989.
- 21 - Barbaras R., Puchois P., Steinmetz A., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J.C., Pradines-Figuères A. and Ailhaud G.,
HDL receptor and cholesterol efflux from adipose cells.
X International Symposium on drugs affecting lipid metabolism, Houston, Texas, November 8-11, 1989.

ABREVIATIONS

Apo	: Apolipoprotéine
CE	: Cholestérol Estérifié
CETP	: Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol
CL	: Cholestérol Libre
CM	: Chylomicrons
CT	: Cholestérol Total
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbant Assay
HDL	: Lipoprotéines de Haute Densité
HMG-CoA	: Hydroxy-Méthyl Gluthanyl-Coenzyme A
HTGL	: Triglycéride Lipase Hépatique
IDL	: Lipoprotéines de Densité Intermédiaire
LCAT	: Lécithine Cholestérol Acyltransferase
LDL	: Lipoprotéines de Basse Densité
LPL	: Lipoprotéine Lipase
Lp	: Particule lipoprotéique
PC	: Phosphatidylcholine
PTP	: Protéine de Transfert des Phospholipides
Sph	: Sphingomyéline
TG	: Triglycérides
VHDL	: Lipoprotéines de très Haute Densité
VLDL	: Lipoprotéines de très Basse Densité

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
1ère Partie : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
I - DEFINITION ET CLASSIFICATION PHYSICO-CHIMIQUE DES LIPOPROTEINES	6
II - LES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE : HDL	9
1 - Définition	9
2 - Structure	9
3 - Hétérogénéité des HDL	11
4 - Relation avec l'athérosclérose	13
a - Cholestérol des HDL	13
b - HDL ₂ et HDL ₃	13
c - Apo AI et apo AII	14
5 - Métabolisme des HDL	15
6 - HDL et transport "reverse" du cholestérol	17
III - CLASSIFICATION DES LIPOPROTEINES SELON LEUR CONTENU EN APOLIPOPROTEINES	23
1 - Concept des particules lipoprotéiques	23
2 - Justification de cette classification	23
IV - Lp AI ET Lp AI:AII	26
1 - Définition	26
2 - Mise en évidence de la Lp AI et de la Lp AI:AII	26
3 - Méthodes permettant la préparation de la Lp AI et de la Lp AI:AII	29
4 - Caractérisation de la Lp AI et de la Lp AI:AII	30
a - Les apolipoprotéines	30
b - Les lipides	38
c - Les enzymes	39
d - Les protéines de transfert des lipides	40
5 - Lp AI de mobilité électrophorétique pré-bêta	40
6 - Dosage de la Lp AI et de la Lp AI:AII	43
a - Chromatographie d'immunoaffinité	44
b - Immunoprécipitation en milieu liquide	44
c - Electroimmunodiffusion à double phase	44
d - Immunoenzymologie à double détermination d'antigènes	46
e - Dosage de la Lp AI pré-bêta	46
7 - Concentration physiologique de la Lp AI et de la Lp AI:AII	47
8 - Intérêt du dosage de la Lp AI et de la Lp AI:AII	47
9 - Métabolisme et rôle physiologique de la Lp AI et de la Lp AI:AII	49
10 - Conclusion	53
V - L'APOLIPOPROTEINE AIV ET SON ROLE	

DANS LE TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL	54
1 - Structure, synthèse et concentration plasmatique de l'apo AIV	54
2 - Distribution de l'apo AIV	55
3 - Rôle de l'apo AIV dans le transport "reverse" du cholestérol	57
a - Activation de la LCAT par l'apo AIV	57
b - L'interaction de l'apo AIV avec les cellules et la stimulation de l'efflux du cholestérol	58
VI - RECEPTEURS AUX APOLIPOPROTEINES AI/AII DES CELLULES ADIPEUSES (ob 17)	60
2ème Partie : TRAVAUX PERSONNELS ET CONTRIBUTIONS	62
CHAPITRE I - PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES : Lp AI, Lp AI:AII et Lp AIV	63
Introduction	64
Matériels et méthodes	66
1 - PREPARATION DES IMMUNOADSORBANTS	67
2 - COLONNE DE SEPHADEX G25 COARSE	69
3 - PRELEVEMENTS SANGUINS ET DU LIQUIDE INTERSTITIEL	69
4 - DETERMINATION DE LA CAPACITE DES IMMUNOADSORBANTS	70
5 - PREPARATION DES HDL ₂ ET DES HDL ₃	71
6 - FRACTION PLASMATIQUE DEPOURVUE D'APOLIPOPROTEINE B	71
7 - LIPOPROTEINES RETENUES PAR LES IMMUNOADSORBANTS ANTI-APO AI, ANTI-APO AII ET ANTI-APO AIV	71
8 - PARTICULES LIPOPROTEIQUES	71
9 - DOSAGE DES PROTEINES	74
10 - DOSAGE DES LIPIDES	74
11 - DOSAGE DES APOLIPOPROTEINES	75
12 - IMMUNODIFFUSION D'OUCHTERLONY ET ELECTROIMMUNODIFFUSION	75
13 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION .ET MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	76
14 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS, IMMUNOELECTROTRANSFERT, ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	76
15 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LCAT	78
Résultats et discussions	79
I - LIPOPROTEINES RETENUES PAR L'IMMUNOADSORBANT ANTI-APO AI, ANTI-APO AII ET ANTI-APO AIV	80
A - Résultats	80
B - Discussion	87
II - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AI ET NON L'APO AII (Lp AI) ET PARTICULES LIPOPROTEIQUE CONTENANT L'APO AI ET L'APO AII	

(Lp AI:AIi)	90
1 - Lp AI et Lp AI:AIi préparées à partir des fractions plasmatiques dépourvues d'apo B	90
A - Résultats	90
B - Discussion	103
2 - Lp AI et Lp AI:AIi préparées à partir du plasma, des HDL ₂ et des HDL ₃	107
Résultats et discussion	107
3 - Lp AI et Lp AI:AIi du liquide interstitiel	111
A - Introduction	111
B - Résultats	113
C - Discussion	120
III - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AIV (Lp AIV)	123
A - Résultats	123
1 - Lp AIV préparée à partir du plasma	123
2 - Lp AIV préparée à partir de la fraction plasmatique dépourvue d'apo B	125
B - Discussion	135
Conclusion	138
CHAPITRE II - METHODE DE DOSAGE DE LA Lp AI	140
Introduction	141
Article n°1 : Differential electroimmunoassay on ready-to-use plates for human Lp AI lipoprotein particles	143
Conclusion	163
CHAPITRE III - ALCOOL ET PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE	166
Introduction	167
Article n°2 : L'alcool a-t-il un effet athérogène ou anti-athérogène ? Analyse des données épidémiologiques et biochimiques	169
Article n°3 : Effect of alcohol intake on human apolipoproteins A-I containing lipoproteins subfractions	203
Conclusion	228

CHAPITRE IV - Lp AI, Lp AI:AII ET Lp AIV DANS L'ETAPE INITIALE DU TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL (EFFLUX)	230
Introduction	231
Article n°4 : Effect of different apo A-I containing lipoprotein particles on reverse cholesterol transport in fat cells	233
Article n°5 : Differential role of apolipoprotein A-I containing particles in cholesterol efflux from adipose cells	237
Article n°6 : Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells	258
Relation entre l'activité de la LCAT et l'efflux du cholestérol.....	276
Conclusion	278
CHAPITRE V - APPLICATIONS CLINIQUES	280
Introduction	281
Article n°7 : Variations in lipoproteins during aminogluthethimide therapy	284
Article n°8 : Quantitative abnormalities of lipoprotein particles in multiple myeloma	289
Article n°9 : Analyse quantitative des apolipoprotéines et des particules lipoprotéiques chez les traumatisés crâniens	295
Conclusion	302
CONCLUSION GENERALE	305
FICHES TECHNIQUES	308
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	336

INTRODUCTION GENERALE

Dans le plasma, les lipides sont intégrés dans différents complexes macromoléculaires, formés de lipides et de protéines (apolipoprotéines). Ces complexes, appelés lipoprotéines, permettent le transport des lipides sous une forme soluble. Autour d'un noyau sphérique, formé par des lipides apolaires (triglycérides, cholestérol estérifié) sont disposés des lipides polaires (phospholipides, cholestérol libre) et des apolipoprotéines. Les interactions entre les radicaux hydrophobes et hydrophiles concourent à la stabilité des lipoprotéines.

Il est maintenant établi que l'augmentation de la concentration en apolipoprotéine B ou en cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL) constitue un facteur de risque athérogène (3, 12). A l'inverse, l'augmentation de la concentration en apolipoprotéine AI ou en cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL) joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose (7, 8).

Plusieurs auteurs suggèrent que les HDL agissent in vivo en captant le cholestérol libre des cellules périphériques et en assurant son retour vers le foie permettant son élimination dans la bile sous forme d'acides biliaires. En effet, les HDL contiennent l'essentiel de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), enzyme responsable de l'estérification du cholestérol (111) et son activateur potentiel (l'apolipoprotéine AI) ainsi que la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (115). Les esters de cholestérol, produits par la LCAT et accumulés dans le noyau des HDL, sont transférés grâce à la CETP aux lipoprotéines de basse et très basse densité, qui sont captées via les récepteurs apo-B/E et apo E du foie. Cependant, les HDL elles-mêmes peuvent court-circuiter partiellement ce transfert. Les HDL riches en apo E peuvent redistribuer le cholestérol d'une part aux cellules qui l'utilisent d'une façon préférentielle, d'autre part au foie pour son élimination (44).

Toutefois, il est maintenant admis que les HDL comprennent deux principaux types de particules lipoprotéiques : celles qui contiennent les apolipoprotéines AI et AII (Lp AI: AII) et celles

qui contiennent l'apo AI mais non l'apo AII (Lp AI). D'après les variations différentes de la concentration de la Lp AI et de la Lp AI:AII sous l'effet de certaines drogues (acide nicotinique, probucol) (73), il a été proposé que ces deux particules aient des fonctions métaboliques différentes. Chez des sujets à coronaires lésées, la diminution de la concentration en apo AI a été attribuée à celle de la Lp AI (120). Il a été montré in vitro, que l'efflux du cholestérol des cellules n'était observé qu'en présence de la Lp AI et non de la Lp AI:AII (165). Ces deux observations permettent d'attribuer à la Lp AI un rôle anti-athérogène en intervenant dans le transport "reverse" du cholestérol.

A côté des apolipoprotéines AI et AII, l'apo AIV est également détectée dans les HDL. 25 % de sa concentration plasmatique totale sont associés aux HDL (137) et localisés essentiellement dans les particules de petite taille (137, 141). Il a été montré que l'apo AIV active la LCAT (79, 80) et que sa fixation sur des cellules est spécifique et saturable (157). L'apo AIV jouerait donc un rôle dans le transport "réverse" du cholestérol au même titre que l'apo AI.

L'intérêt manifesté au cours de ces dernières années pour la Lp AI, la Lp AI:AII et l'apo AIV a été à l'origine de ce travail.

Dans la première partie, nous exposerons l'ensemble des travaux effectués sur la Lp AI, la Lp AI:AII, l'apo AIV et leur rôle dans le transport "reverse" du cholestérol.

Dans un premier chapitre, nous rapporterons l'analyse qualitative et l'hétérogénéité moléculaire de la Lp AI, de la Lp AI:AII (isolées à partir du plasma natif, des HDL₂, des HDL₃ et du liquide interstitiel) et de la Lp AIV du plasma.

Dans un deuxième chapitre, nous décrirons la mise au point d'une méthode simple et rapide d'électroimmunodiffusion différentielle sur plaque prête à l'emploi pour le dosage de la

Lp AI, véritable fraction anti-athérogène des HDL.

Dans un troisième chapitre, nous exposerons et discuterons les principaux travaux étudiant l'effet de la consommation d'alcool sur les maladies cardiovasculaires. Nous rapporterons les variations de la concentration de la Lp AI et de la Lp AI: AII sous l'effet de l'alcool, afin d'attribuer à sa consommation un effet athérogène ou anti-athérogène.

Dans un quatrième chapitre, en collaboration avec l'équipe du Professeur Ailhaud (Faculté des Sciences de Nice), nous analyserons l'activité de ces trois types de particules dans l'étape initiale du transport "reverse" du cholestérol (efflux).

Dans un cinquième chapitre, nous suivrons la modification des lipoprotéines chez des sujets cancéreux, lors d'une étude pharmacologique concernant l'effet du traitement par l'aminoglutéthimide. Nous étudierons les variations des apolipoprotéines et des particules lipoprotéiques, la Lp AI et la Lp AI: AII, dans deux applications cliniques, chez des sujets atteints de myélome multiple d'une part et chez des traumatisés crâniens d'autre part.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I - DEFINITION ET CLASSIFICATION PHYSICO-CHIMIQUE DES LIPOPROTEINES

Les lipoprotéines humaines sont des complexes macromoléculaires pseudo-micellaires, solubles dans l'eau, constitués d'une part de lipides et d'autre part de protéines spécifiques appelées apolipoprotéines. Leur rôle physiologique est d'assurer le transport et la distribution :

- de graisses d'origine exogène (alimentaire) ou endogène (synthèse cellulaire)
- de substances liposolubles (vitamines, carotènes, médicaments, etc...).

La structure des lipoprotéines est en perpétuel remaniement du fait de nombreux échanges intermoléculaires. Très schématiquement, on considère que le noyau central est constitué de lipides hydrophobes comme le cholestérol estérifié et les triglycérides, alors que les constituants de surface sont le cholestérol libre, les phospholipides et les apolipoprotéines (figure 1).

Habituellement, les lipoprotéines sont classées en fonction de critères physico-chimiques (tableau 1) : densité hydratée, mobilité électrophorétique, taille, interaction avec les polyanions et autres agents précipitants. Les fractions obtenues par ultracentrifugation, électrophorèse et précipitation ont été très souvent apparentées entre elles. On distingue :

- les chylomicrons ou CM : synthétisés dans l'intestin, ils transportent essentiellement des triglycérides d'origine exogène ;
- les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL : sécrétées par le foie, elles assurent le transport des triglycérides endogènes (alimentaires) ;
- les lipoprotéines de basse densité ou LDL : synthétisées à partir des VLDL, elles transportent la majorité du cholestérol dans le plasma humain normal ;
- les lipoprotéines de haute densité ou HDL : d'origine intestinale et hépatique, elles captent le cholestérol au niveau

des cellules et le ramènent au foie où il est catabolisé ;
- les lipoprotéines de très haute densité ou VHDL.

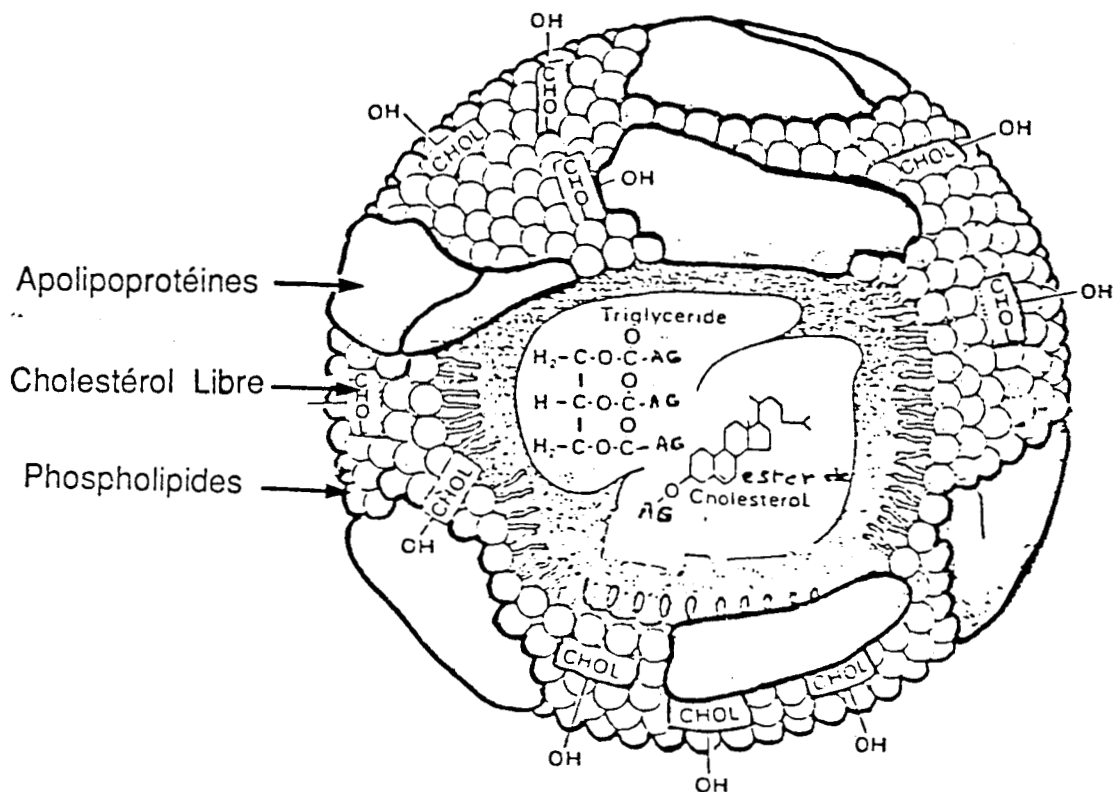


FIGURE 1 : STRUCTURE GENERALE D'UNE LIPOPROTEINE

TABLEAU 1 : REPARTITION DES LIPOPROTEINES EN CLASSES SUR LA BASE DE LEUR DENSITE HYDRATEE ET DE LEUR MOBILITE ELECTROPHORETIQUE

lipoprotéines		densité	diamètre nm	P.M	M.E
chylomicrons		< 0.94	$10^2 - 10^3$	$5 \cdot 10^9$	origine
VLDL		0.94 - 1.006	30 - 70	$7.5 \cdot 10^6$	prébêta
LDL	1	1.006 - 1.019			
	2	1.019 - 1.063	15 - 25	$2.5 \cdot 10^6$	bêta
HDL	1*	1.063 - 1.085			
	2	1.085 - 1.125	6 - 14	$3.9 \cdot 10^5$	alpha
	3	1.125 - 1.21	4.5 - 10	$1.9 \cdot 10^5$	
VHDL		1.21 - 1.25		$1.5 \cdot 10^5$	

P.M : Poids moléculaire

M.E : Mobilité électrophorétique (agarose)

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

II - LES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE : HDL

1 - DEFINITION

.. Dans un sens strict, le terme "HDL" n'est pas équivalent à celui de "lipoprotéines alpha". Ces deux termes sont qualifiés et définis par deux propriétés physiques différentes des lipoprotéines plasmatiques : la densité hydratée et la mobilité électrophorétique. Il est aussi impropre d'appliquer ces termes aux lipoprotéines non précipitées par les polyanions.

Le terme HDL est attribué à la fraction lipoprotéique isolée par ultracentrifugation entre les densités 1,063 et 1,21. Les lipoprotéines de cette préparation sont plus petites et plus denses que celles des autres classes lipoprotéiques (CM, VLDL, LDL). Elles ont un diamètre compris entre 7,5 - 15 nm et une masse moléculaire de 200 à 400 k.Da.

2 - STRUCTURE

La masse totale des HDL compte pour 47 à 52 % de protéines et de 48 à 53 % de lipides (25 % de phospholipides, 20 % de cholestérol, 5 % de triglycérides). Les HDL transportent approximativement le 1/4 du cholestérol total plasmatique dans le plasma humain normal. Les phospholipides majeurs trouvés dans les HDL sont la phosphatidylcholine et la sphingomyéline. La partie protéique des HDL est essentiellement représentée par l'apo AI et l'apo AII qui constituent à elles deux approximativement 80 à 90 % de la masse protéique totale. D'autres protéines comprenant les apo AIV, C, D, E, la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) et les protéines de transfert de lipides, y sont également présentes. Le tableau 2 indique les propriétés et fonctions des apolipoprotéines des HDL.

La LCAT réalise la conversion du cholestérol libre en cholestérol estérifié par transfert des acides gras des lécithines vers le cholestérol libre. Elle est activée par l'apo AI, mais aussi par l'apo AIV et plus faiblement par l'apo CI et l'apo E (42).

TABLEAU 2 : Propriétés et fonctions des apolipoprotéines des HDL

Apoprotéines	AI	AII	AIV	CI	CII	CIII	D	E
Concentrations plasmatiques (mg/ml)	1-1.2	0.3-0.5	0.13-0.37	0.04-0.06	0.03-0.05	0.12-0.14	0.06-0.07	0.03-0.07
Poids moléculaire k.Da	28	2x8.5	46	6.6	8.8	8.9	33	34
Nombre d'acides aminés	243	2x77	376	57	80	80	169	299
Sites de synthèse	foie, intestin	foie	intestin, foie (négligeable)	foie	foie, intestin	foie	gonades, reins, placenta, foie, intestin...	foie, intestin, macrophages, muscles...
Fonctions	activateur de la LCAT ligand pour le récepteur "HDL" activateur du transport "reverse" du cholestérol	ligand pour le récepteur "HDL" inhibiteur du transport "reverse" du cholestérol	activateur de la LCAT	activateur de la LCAT ?	activateur de la LPL	inhibiteur de la LPL	rôle possible dans le métabolisme des esters de cholestérol	ligand pour les récepteurs apo E et apo B/E

La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) permet de transférer les esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines de basse et très basse densité (LDL, VLDL).

La structure des HDL est extrêmement complexe, comprenant en particulier de nombreuses protéines dont l'action métabolique est importante.

3 - HETEROGENEITE DES HDL

Les HDL sont hétérogènes par leur composition chimique, leur densité hydratée, leur taille et leur charge.

L'ultracentrifugation séquentielle des HDL permet de séparer deux principales fractions : les moins denses, HDL₂ ($d = 1,063 - 1,125$) et les plus denses, HDL₃ ($d = 1,125 - 1,21$). Les lipoprotéines de ces fractions diffèrent par leurs propriétés physiques et par leur composition chimique. La masse totale des HDL₂ et des HDL₃ est constituée respectivement de 44 et 53 % de protéines, 18 et 16 % de cholestérol estérifié, 6 et 3 % de cholestérol libre, 3 et 2 % de triglycérides et 28 et 25 % de phospholipides (1).

Des études réalisées in vitro (9) ont montré que les HDL₂ et les HDL₃ sont interconvertibles grâce à différents facteurs comprenant la LCAT, la lipoprotéine lipase (LPL), la triglycéride lipase hépatique (HTGL), les protéines de transfert par l'échange de lipides et le transfert et/ou l'échange des apolipoprotéines.

La concentration des HDL₂ augmente avec l'exercice physique et elle est plus élevée chez la femme en période d'activité génitale que chez l'homme de même âge (9). En effet, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés sous l'effet de la LPL. Les éléments de surface des VLDL se détachent pour s'associer aux HDL naissantes (HDL discoïdales). Ces HDL donneront les HDL₃ qui peuvent accepter le cholestérol libre d'origine cellulaire et qui seront

transformées en HDL₂ sous l'action de la LCAT. L'augmentation de l'activité de la LPL du muscle squelettique et du tissu adipeux, s'accompagne donc d'une diminution de la concentration des VLDL et ensuite d'une augmentation de la concentration des HDL₂ mais pas de celle des HDL₃. Les œstrogènes augmentent l'activité de la LPL mais diminuent l'activité de la HTGL. Ainsi, les HDL₂ ne seront pas appauvries en lipides neutres et en éléments de surface et ne pourront pas être transformées en HDL₃ (9).

Avec l'ultracentrifugation zonale ou en gradient de densité, les HDL paraissent beaucoup plus hétérogènes.

Anderson et coll. (2) ont suggéré que les HDL peuvent être séparées en trois fractions : HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL₃. Les HDL_{2b} ($d = 1,09$) et HDL₃ ($d = 1,145$) correspondent respectivement aux HDL₂ et HDL₃ classiques, alors que les HDL_{2a} ($d = 1,11$) semblent être constituées d'un mélange de lipoprotéines des deux sous fractions HDL₂ et HDL₃. Laggner et coll. (4) ont isolé à partir des HDL trois fractions appelées II, III, IV. Les fractions II et III correspondent respectivement aux HDL₂ et HDL₃. La fraction IV a un rapport massique protéines/lipides plus grand que ceux des deux autres fractions. En 1980, Patsch et coll. (5) ont fractionné les HDL₂ en trois fractions et les HDL₃ en cinq fractions.

En utilisant l'ultracentrifugation en gradient de densité, Curtiss et Edgington (6) ont pu séparer les HDL en cinq fractions (1 à 5). La fraction la plus légère se distingue des autres fractions par la présence d'apo B, par sa richesse en apo E et par sa pauvreté en apo AII et apo D. Les fractions 1 et 2 se caractérisent par la présence prédominante de lipoprotéines de grande taille, alors que les fractions 4 et 5 contiennent principalement des lipoprotéines de petite taille. En étudiant l'immunoréactivité de trois anticorps monoclonaux anti-apo AI, AI₄, AI₇ et AI₉, ces auteurs ont constaté que l'apo AI des lipoprotéines les moins denses expriment l'épitope AI₉, alors que

celle des lipoprotéines les plus denses expriment l'épitope AI₇.

Les différentes fractions de densité des HDL sont ainsi hétérogènes en fonction de leur caractères physico-chimiques (composition chimique, densité hydratée taille) et de leur réactivité immunologique.

4 - RELATION AVEC L'ATHEROSCLEROSE

a - Cholestérol des HDL

Le rôle anti-athérogène des HDL a été suggéré par des arguments d'ordres épidémiologique et clinique. Les rares hyper-alphalipoprotéïnémies ou hyper HDL-émies encore appelées "syndromes de longévité" représentent un statut "d'anti-risque ou de protection". Dans l'étude prospective de Framingham, Gordon et coll. (7) ont examiné tous les deux ans 5127 hommes et femmes afin de détecter une athérosclérose. Ces patients étaient initialement dépourvus de toute pathologie vasculaire. Plusieurs facteurs ont été mesurés à chaque examen, ce qui a permis de suivre dans le temps l'évolution de tel ou tel facteur. La fréquence des coronarites augmentait de 25 à 105 % chez les hommes et de 14 à 164 % chez les femmes, quand le cholestérol des HDL diminuait respectivement de 0,65 à 0,25 g/l et de 0,74 à 0,34 g/l. De nombreuses études cliniques ont confirmé le rôle protecteur des HDL vis à vis de l'athérosclérose (8).

La concentration du cholestérol des HDL paraît donc un facteur de risque de l'athérosclérose, celle-ci étant en corrélation négative avec la survenue des accidents coronariens.

b - HDL₂ et HDL₃

Vergani et Bettale (10) ont étudié une famille atteinte de maladie cardiovasculaire. L'hypo-alphalipoprotéïnémie est le seul trait anormal de cette famille. Pour les membres affectés, ces auteurs ont remarqué une diminution de la concentration du

cholestérol des HDL, de l'apo AI et de l'apo AII. L'ultracentrifugation zonale a montré que le pic correspondant aux HDL₂ était absent alors que celui des HDL₃ était normalement présent.

Gofman et coll. (11) ont rapporté, chez des sujets ayant survécu à un infarctus du myocarde, une diminution significative de la concentration des HDL₃ mais avec un degré de signification moindre que celui montré par la diminution de la concentration des HDL₂. Dans les mêmes circonstances, Avogaro et coll. (12) ont rapporté une diminution concomitante des deux sous-fractions, avec une augmentation de la concentration des IDL et des LDL.

Enfin, dans une revue récente de la littérature, Miller (13) rapporte plusieurs études où la concentration des HDL₂ et parfois des HDL₃ est diminuée chez les insuffisants coronariens.

c - Apo AI et Apo AII

L'apo AI est un paramètre de choix dans le dépistage de l'athérosclérose coronarienne (15, 16). Différentes études de l'efflux du cholestérol, à partir des cellules en culture indiquent que les principales lipoprotéines provoquant l'efflux du cholestérol cellulaire contiennent de l'apo AI (28, 165). L'apo AI peut donc être un agent important contre l'accumulation du cholestérol dans les tissus et pour son maintien à une concentration normale dans le plasma. L'évaluation de l'apo AII dans le dépistage de l'athérosclérose coronarienne a été très discutée. C'est ainsi que Riesen et coll. (17) et Wieland et coll. (18) mettent en évidence une diminution parallèle de l'apo AI et de l'apo AII chez des sujets présentant des lésions coronariennes ou ayant subi un infarctus du myocarde, alors que Kladetzky et coll. (19) et Kora et coll. (20) n'ont pas pu, dans les mêmes circonstances, montrer de variations significatives de l'apo AII. Par contre, ce facteur se révèle être le plus discriminant de tous les constituants des HDL analysés chez les buveurs excessifs où

les HDL sont augmentées (21) et en cas d'insuffisance hépatocellulaire sévère consécutive à une cirrhose alcoolique où les HDL sont effondrées (22).

5 - METABOLISME DES HDL

Les HDL occupent une position centrale dans le transport des lipides plasmatiques (figure 2).

Les HDL naissantes peuvent être sécrétées par le foie (23) ou par l'intestin (24) (figure 3). Le foie sécrète deux sortes de HDL. Les HDL discoïdales qui sont constituées d'une double couche de phospholipides avec très peu de cholestérol libre, presque pas de cholestérol estérifié et un anneau d'apolipoprotéines qui protège les chaînes hydrophobes des phospholipides de l'eau. Les HDL discoïdales contiennent les apolipoprotéines AI et E (24, 25). Les HDL sphériques sont de petite taille (environ 8 nm) et sont qualifiées "HDL₃-like". Elles contiennent de l'apo AI, des phospholipides et une faible quantité de cholestérol estérifié qui constitue le noyau. L'intestin sécrète aussi des HDL discoïdales et sphériques. Cependant, les lipoprotéines issues de l'intestin ne contiennent que de l'apolipoprotéine AI, l'intestin ne synthétisant pas de l'apolipoprotéine AII et ne synthétisant pas en quantité suffisante de l'apolipoprotéine E (26).

Les HDL discoïdales ainsi sécrétées se caractérisent par leur très faible concentration en cholestérol libre (24, 27), et leurs particules contenant de l'apolipoprotéine AI seront les accepteurs primaires du cholestérol cellulaires (28). Elles peuvent ainsi initier un mouvement de cholestérol du tissu périphérique vers le plasma (29). Ces HDL discoïdales, enrichies en cholestérol, contiennent des phospholipides et du cholestérol libre à sa surface. Les apolipoprotéines AI forment des anneaux. De tels disques constituent un excellent substrat pour l'enzyme LCAT (30) qui estérifie le cholestérol. Le cholestérol estérifié, étant totalement hydrophobe, glisse entre les deux couches de phospholipides et cette réaction convertit les HDL discoïdales en

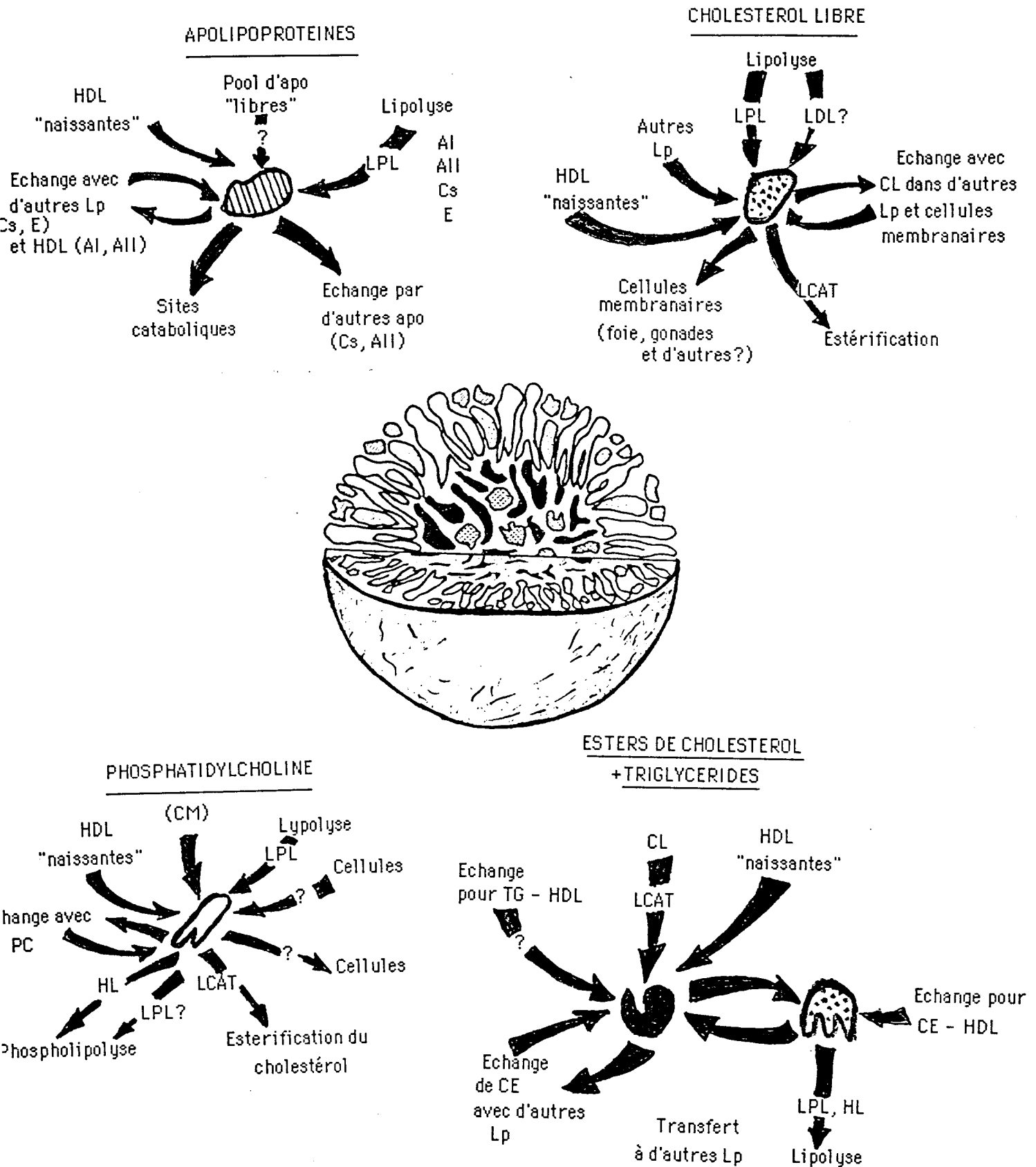


FIGURE 2 : POSITION CENTRALE DES HDL DANS LE SYSTEME DE TRANSPORT DES LIPIDES PLASMATIQUES D'APRES EISENBERG

HDL sphériques, plus petites que les particules HDL₃-like.

Quand la phosphatidylcholine et le cholestérol libre ne sont pas disponibles, les petites HDL₃ peuvent alors accepter d'autres molécules de phospholipides provenant de la lipolyse des chylomicrons et des VLDL (29, 31).

Ces HDL riches en phospholipides, appelées HDL_{2a} (9,2 - 10 nm), peuvent alors capter le cholestérol libre des cellules et la LCAT intervient pour produire les esters de cholestérol qui vont s'accumuler au centre. Le noyau de ces particules augmente en volume et le surplus de la surface diminue pour produire de nouvelles particules, les HDL_{2b} (10,5 - 11 nm), qui ont plus de cholestérol estérifié et un plus grand noyau que les HDL_{2a} (1, 29). Une partie de ces particules peut acquérir de l'apolipoprotéine E en périphérie ou la recevoir des tissus synthétisant l'apolipoprotéine E (26, 32) (via les macrophages) (33). De telles particules doivent augmenter en taille sous l'action de la LCAT pour produire les HDL₁ appelées encore HDL_C. Les HDL_C ont une taille proche de celle des LDL (34, 35, 36).

Les HDL contenant de l'apolipoprotéine E peuvent être rapidement reconnues par les récepteurs apo B/E et apo E du foie, et être épurées (37). Ainsi, une fraction du cholestérol des tissus périphériques pourrait être métabolisé par le foie via ce processus.

Une autre fraction des HDL_{2b} peut échanger une partie de son cholestérol estérifié contre des triglycérides, qui seront hydrolysés par la lipoprotéine lipase ou la lipase hépatique et qui donneront naissance à des HDL de petite taille (7,8 - 9,2 nm).

6 - HDL ET TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL

Le cholestérol non estérifié est essentiel à la vie cellulaire. Il constitue en effet un composant structural

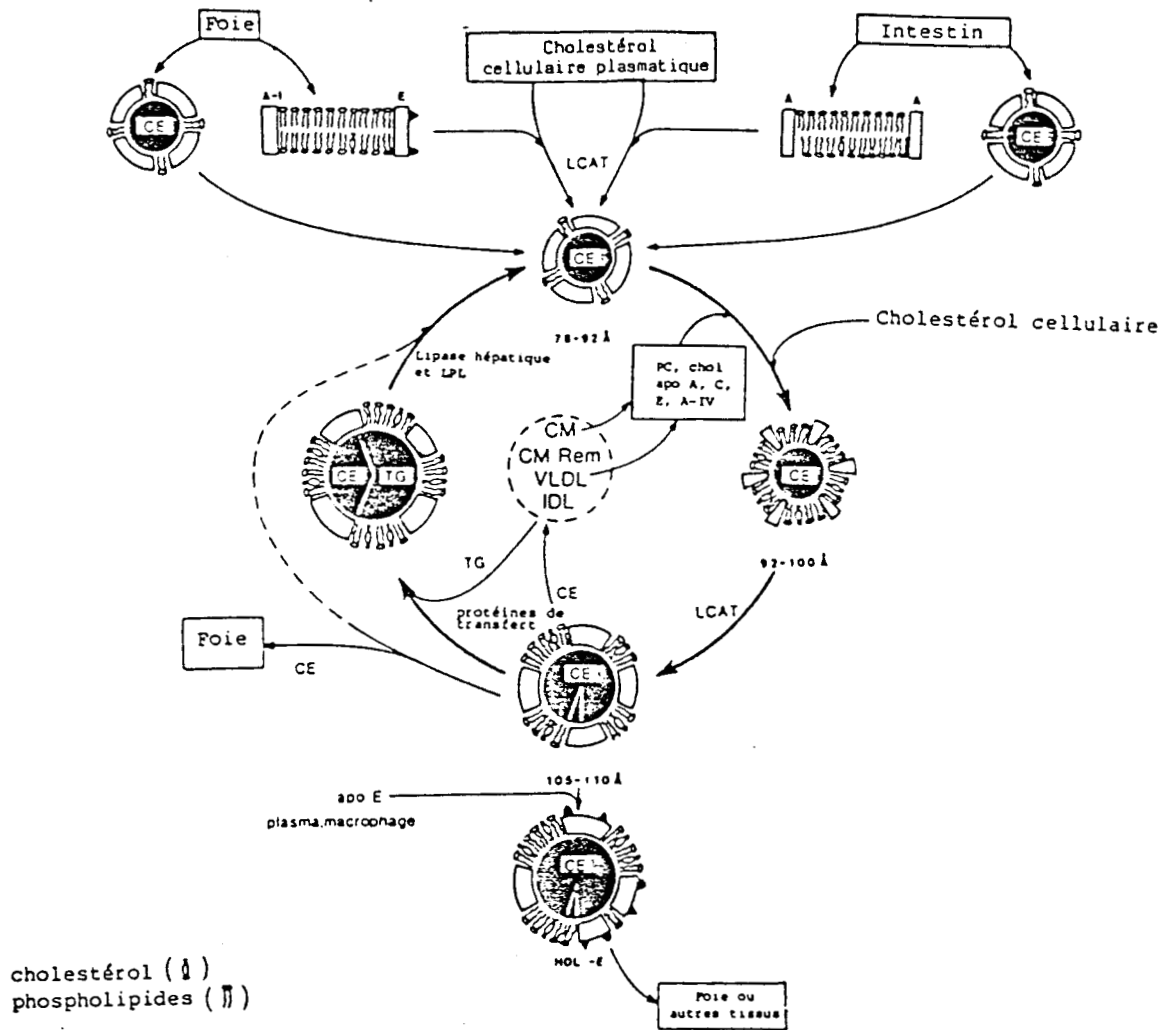


FIGURE 3 : LE METABOLISME DES HDL

important des différentes membranes cellulaires, avec une plus grande concentration dans la membrane plasmique. Il peut provenir de sources endogènes et exogènes. La biosynthèse de novo et/ou la mobilisation des "pools" de réserve du cholestérol estérifié fournissent le cholestérol endogène, tandis que le cholestérol exogène provient des lipoprotéines circulantes.

Les LDL véhiculent près de 70 % du cholestérol plasmatique chez le sujet humain normal. La majeure partie du catabolisme des LDL passe par le récepteur apo B/E, présent dans de nombreux tissus, parfaitement caractérisé grâce aux remarquables travaux de Brown et Goldstein (38). Après reconnaissance spécifique (apo B 100), le complexe (LDL/récepteur) est internalisé, puis dissocié ; le récepteur est rapidement recyclé vers la membrane, tandis que le cholestérol estérifié, ainsi que l'apo B de la LDL sont hydrolysés. L'accumulation du cholestérol d'origine exogène par la cellule, entraîne une répression de l'expression du gène du récepteur LDL et une diminution de la synthèse endogène du cholestérol par répression de l'expression des gènes de la 3-hydroxy-3 méthylglutanyl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase et la (HMG-CoA) synthétase (39).

Le cholestérol libre est en mouvement bidirectionnel entre les lipoprotéines présentes dans le milieu extracellulaire et la membrane plasmique de divers types cellulaires. Le terme "efflux" s'applique au mouvement du cholestérol libre des cellules vers le milieu extracellulaire. Le terme "influx" définit le mouvement du cholestérol dans la direction opposée. La résultante des échanges précédents est l'efflux net, qui peut être positif lorsqu'il y'a élimination du cholestérol cellulaire en excès ou négatif dans le cas contraire. L'épuration du cholestérol cellulaire est un facteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Lorsque les cellules périphériques ne dégradent pas le cholestérol, le mécanisme d'épuration implique l'efflux des molécules de cholestérol libre. Ces molécules entrent dans le chemin métabolique du transport "reverse" du cholestérol. Il semblerait que le cholestérol soit pris en charge par des

particules acceptrices présentes dans le milieu extracellulaire (figure 4).

Les HDL ont été plus ou moins impliquées dans ce processus. Selon les tissus, l'interaction des HDL avec les cellules peut être la première étape de leur catabolisme en apportant du cholestérol aux cellules, ou peut au contraire faciliter la sortie du cholestérol de ces cellules et être responsable du transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Récemment, Oram et coll. (40) ont proposé un modèle pour expliquer le mécanisme moléculaire du transport "reverse" du cholestérol. L'apo AI, en se fixant sur le récepteur des HDL, provoquerait (par l'intermédiaire d'un second messenger) une translocation du cholestérol intracellulaire vers la membrane, alors que l'apo AII, en se fixant sur ce récepteur, pourrait inhiber cette translocation.

Les complexes artificiels (apo AI/phospholipides), lorsqu'ils sont dans le milieu de culture de fibroblastes, sont capables d'induire un certain degré d'efflux de cholestérol cellulaire (41). En outre, les petites particules de HDL sont les substrats préférentiels de la LCAT, qui, en estérifiant le cholestérol libre, font ainsi augmenter le volume des particules au détriment des composants de surface. Ceci crée les conditions d'un appel de cholestérol des membranes cellulaires vers les HDL (42). Les esters de cholestérol produits par la LCAT sont alors transférés aux lipoprotéines de basse et très basse densité (43), grâce à la participation des protéines de transfert, telle la CETP. Cependant, les HDL elles-mêmes peuvent court-circuiter partiellement ce transfert. Les HDL riches en apo E peuvent redistribuer le cholestérol d'une part aux cellules, qui l'utilisent de façon préférentielle, en particulier pour la stéroïdogénèse (chez l'animal), d'autre part au foie pour l'élimination, après interaction avec le récepteur apo B/E ou un autre récepteur spécifique (44).

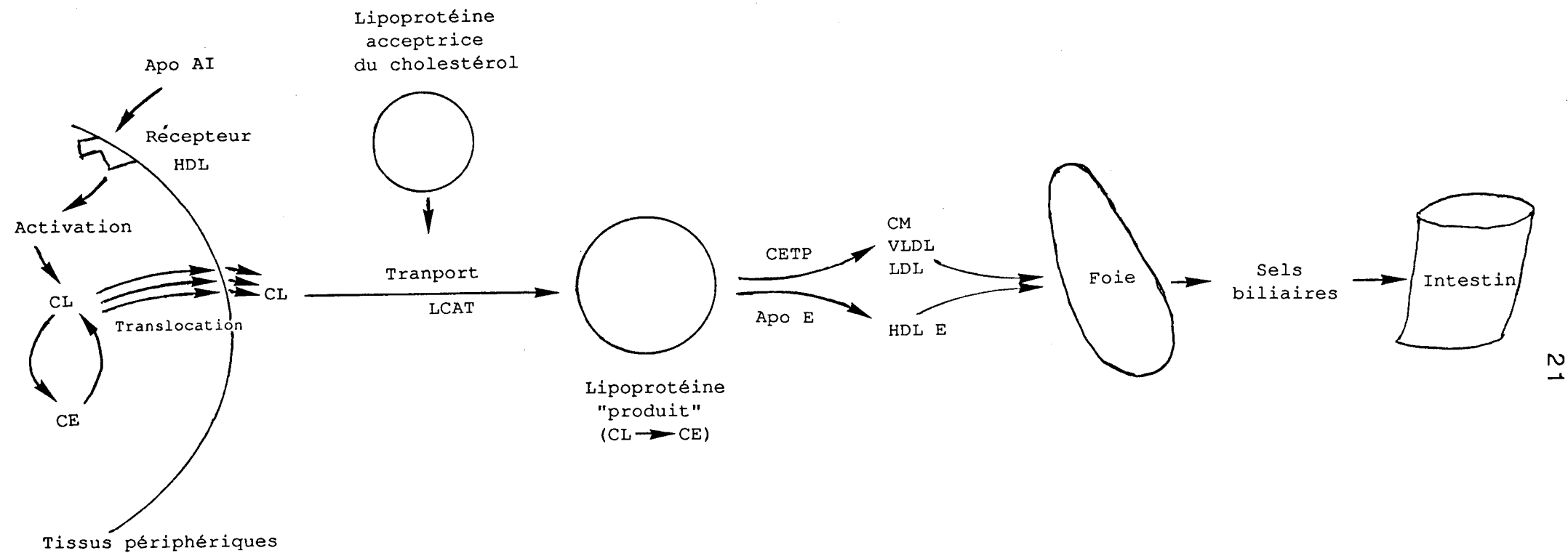


FIGURE 4 : TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL

Il a été montré que les HDL₃ ont la capacité de stimuler l'efflux de cholestérol cellulaire, alors que les HDL₂ n'ont aucun effet (41), les petites particules des HDL étant les substrats préférentiels de la LCAT (41). Les HDL qui provoquent normalement un efflux net du cholestérol cellulaire peuvent provoquer un effet contraire si elles sont artificiellement enrichies en cholestérol (45). Selon que le rapport cholestérol libre/phospholipides des liposomes artificiels soit supérieur ou inférieur à 0,2, elles enrichissent ou appauvrissent les cellules en cholestérol (46). Les HDL₂ ont une taille supérieure à celle des HDL₃ et ont une teneur en cholestérol libre et un rapport cholestérol libre/phospholipides plus élevés que ceux des HDL₃ ; elles sont incapables de produire l'efflux du cholestérol.

Les HDL jouent un rôle essentiel dans le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

- Ce chemin métabolique est complexe, faisant intervenir différentes protéines :
 - * apo AI comme ligand à un récepteur ;
 - * LCAT et CETP dans le métabolisme du cholestérol au sein des lipoprotéines.
- Ce chemin est complexe, faisant également intervenir des critères physico-chimiques :
 - * taille ;
 - * rapport cholestérol libre/phospholipides.

III - CLASSIFICATION DES LIPOPROTEINES SELON LEUR CONTENU EN APOLIPOPROTEINES

1 - CONCEPT DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES

Dans ce nouveau concept, les lipoprotéines sont considérées comme un ensemble de familles lipoprotéiques qui sont caractérisées et distinguées par leur composition en apolipoprotéines (47) (figure 5). Il permet de distinguer :

- les particules lipoprotéiques simples ou primaires, formées de lipides associés à une seule apolipoprotéine (48, 49) ;
- les particules complexes ou secondaires, composées de lipides associés à deux ou plusieurs apolipoprotéines (48, 49).

Les lipoprotéines sont nommées selon leur composition en apolipoprotéines. Par exemple, une lipoprotéine qui contient l'apo AI, l'apo CIII et l'apo E est appelée : Lp AI:CIII:E.

Ce concept reconnaît aux apolipoprotéines un rôle essentiel comme composants structuraux et fonctionnels des lipoprotéines. De plus, il souligne la nécessité de considérer les apolipoprotéines et les lipides comme des composants d'une particule lipoprotéique plutôt que comme des entités indépendantes.

Ainsi, la particule lipoprotéique, définie qualitativement par son contenu en apolipoprotéines, possède des fonctions spécifiques : elle pourrait représenter l'unité de base du métabolisme lipidique, et devrait permettre à l'avenir d'affiner l'exploration physiopathologique des lipoprotéines.

2 - JUSTIFICATION DE CETTE CLASSIFICATION

Les classifications antérieures des lipoprotéines sont basées sur les densités hydratées ou les mobilités électrophorétiques. Elles ne sont pas en mesure de décrire l'importance des apolipoprotéines dans le métabolisme des lipoprotéines (50).

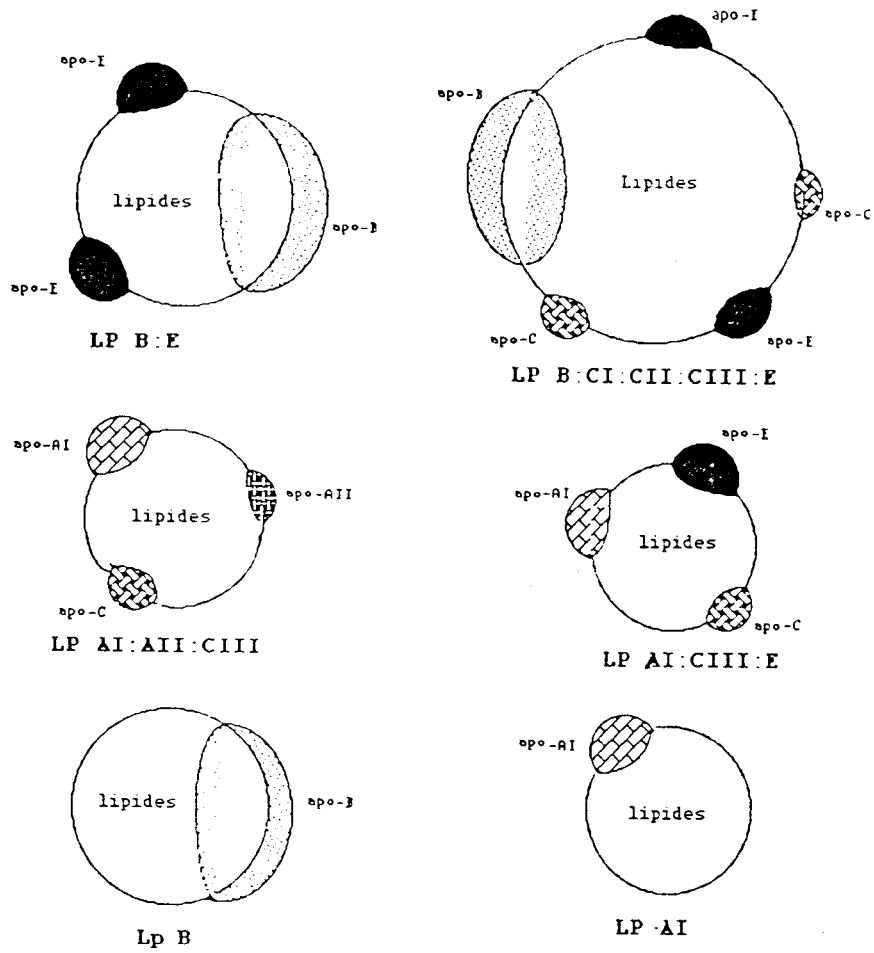


FIGURE 5 : CLASSIFICATION DES LIPOPROTEINES
BASEE SUR LEUR CONTENU EN APOLIPOPROTEINES

Les apolipoprotéines sont indispensables à l'organisation, à la sécrétion et au métabolisme des lipoprotéines. Elles sont différentes entre elles par leur structure primaire et conformationnelle, mais aussi par leur rôle biologique : certaines semblent être uniquement nécessaires au transport des lipides, tandis que d'autres sont connues pour être soit des cofacteurs activateurs ou inhibiteurs des enzymes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines. Enfin, d'autres servent de "ligands" pour les récepteurs cellulaires spécifiques des lipoprotéines (tableau 2).

Il est établi que l'ultracentrifugation est reconnue responsable de changements structuraux des lipoprotéines, notamment la perte d'apolipoprotéines (51, 52). En effet, Kunitake et Kane (53) ont indiqué que les HDL soumises à des ultracentrifugations répétées perdent jusqu'à 35 % de leurs apo AI. Castro et Fielding (54) ont montré que lors de l'ultracentrifugation, une grande partie des apo E des VLDL et des LDL se dissocient des lipoprotéines contenant l'apo B, pour se retrouver dans les HDL. Mac Vicar et coll. (55) ont isolé les lipoprotéines contenant l'apo AI par chromatographie sélective d'immunoaffinité. Ces lipoprotéines contiennent d'autres apolipoprotéines qui ne sont pas retrouvées dans les HDL.

Peut-on concevoir que les lipoprotéines isolées par ultracentrifugation correspondent réellement à de véritables entités pouvant avoir une signification métabolique in vivo ?.

L'existence à l'intérieur d'une même classe de densité de sous-fractions ayant des rapports non équimolaires (56, 57, 58) traduit le fait que les particules lipoprotéiques d'une même densité n'ont pas la même composition en apolipoprotéines. En effet, de nombreuses particules lipoprotéiques distinctes en fonction de leur composition en apolipoprotéines ont été mises en évidence au sein des différentes classes de densité (47).

IV - Lp AI ET Lp AI:AII

1 - DEFINITION

Suite au concept original proposé par Alaupovic (48), il est maintenant reconnu que les HDL contiennent deux principaux types de particules lipoprotéiques : celles contenant à la fois l'apo AI et l'apo AII (Lp AI:AII) et celles contenant l'apo AI et non l'apo-AII (Lp AI).

La Lp AI est représentée par un mélange hétérogène de particules lipoprotéiques contenant l'apo AI associée ou non à d'autres apolipoprotéines sauf l'apo AII. De façon similaire, la Lp AI:AII est représentée par un mélange hétérogène de particules lipoprotéiques contenant l'apo AI et l'apo AII associées ou non à d'autres apolipoprotéines (figure 6).

2 - MISE EN EVIDENCE DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

L'existence de lipoprotéines contenant l'apo AI et non l'apo AII a été rapportée pour la première fois en 1971 par Borut et Aladjem (59) et Albers et Aladjem (60). Par immunoprécipitation des HDL₂ et HDL₃, ces auteurs ont trouvé qu'approximativement 90 % des lipoprotéines de ces fractions de densité contenaient l'apo AI et l'apo AII, alors que 10 % ne contenaient que l'apo AI.

La présence dans les HDL de fractions ayant des rapports molaires apo AI/apo AII différents a été rapportée par plusieurs auteurs (56, 57, 58, 61).

En analysant les 4 fractions des HDL obtenues après ultracentrifugation isopycnique, Cheung et Albers (58), en 1979, ont constaté que leur rapport molaire apo AI/apo AII varie entre 2,6 et 5,6 :

- entre les densités 1,077 et 1,082, le rapport molaire apo AI/apo AII est de 5,6 ;

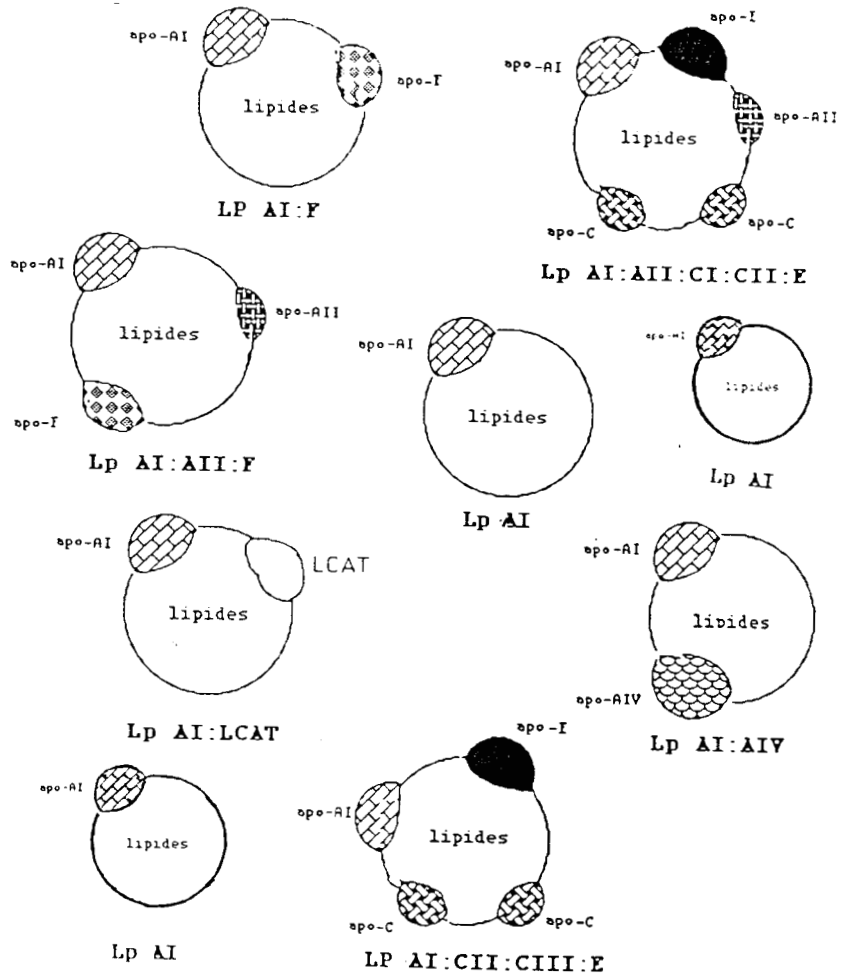


FIGURE 6 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DE L'HETEROGENEITE
DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

- entre les densités 1,093 et 1,150, le rapport molaire apo AI/apo AII est de 2,8 ;
- entre les densités 1,106 et 1,150, le rapport molaire apo AI/apo AII est de 2,8 ;
- entre les densités 1,115 et 1,200, le rapport molaire apo AI/apo AII est de 2,6.

Cette variation du rapport molaire apo AI/apo AII de ces lipoprotéines peut être expliquée de trois manières :

- les HDL peuvent contenir des particules possédant l'apo AI et l'apo AII avec des rapports molaires différents ;
- les HDL peuvent contenir des particules possédant l'apo AI et l'apo AII avec un rapport molaire fixe ainsi que des particules de proportions variables contenant l'apo AI et non l'apo AII ou l'apo AII et non l'apo AI ;
- les HDL peuvent contenir des particules possédant l'apo AI et l'apo AII avec des rapports molaires différents et des particules de proportions variables contenant uniquement l'apo AI ou uniquement l'apo AII.

Dans une étude d'immunoréactivité de l'apo AI, Børresen et Berg (62) ont noté la présence des arcs d'immunoprécipitation dans les régions de mobilité électrophorétique alpha et pré-bêta. Cette fraction ne pourrait en aucun cas représenter la Lp AI. Elle a été engendrée par les effets de la congélation et de changement de la température effectués sur le plasma. Cette fraction a été appelée "apo AI libre".

Schonfeld et coll. (63) avaient démontré, en utilisant des méthodes alternatives de chromatographie de tamisage moléculaire, l'existence dans le plasma d'une fraction de petite taille (MM = 50 k.Da) contenant uniquement l'apo AI. Cette fraction n'a pas été identifiée.

La mise en évidence dans le plasma de la Lp AI et de la Lp AI:AII a été par la suite réalisée par divers procédés physico-chimiques ou immunologiques : chromatographie d'ad-

sorption, chromatographie d'immunoaffinité, immunoprécipitation en milieu liquide, immunodiffusion d'Ouchterlony, électroimmuno-diffusion et chromatofocalisation (64, 65, 66).

3 - METHODES PERMETTANT LA PREPARATION DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

La Lp AI et la Lp AI:AII peuvent être isolées par plusieurs procédés.

Norfeldt et coll. (64) ont isolé la Lp AI et la Lp AI:AII à partir des HDL en utilisant plusieurs séries de chromatographies nécessitant le sephadex QAE, l'hydroxy-apatite, un immunoabsorbant anti-apo D et enfin une ultracentrifugation. La Lp AI et la Lp AI:AII préparées par cette méthode possédaient respectivement un diamètre moyen de 8,7 nm et 7,9 nm et présentaient une densité hydratée comparable à celle des HDL₂.

Par chromatofocalisation, Nestruck et coll. (65) ont subdivisé les HDL en 6 fractions lipoprotéiques. Toutes les fractions flottent à la densité 1,21 et possèdent une mobilité électrophorétique alpha. L'analyse de la composition apolipoprotéique de ces fractions a révélée que :

- 2 fractions contiennent uniquement l'apo AI ;
- 1 fraction contient l'apo AI et l'apo AII ;
- 1 fraction contient l'apo AI, l'apo AII et l'apo D ;
- et 2 fractions contiennent l'apo AI, l'apo AII, l'apo D et les apo C.

Les Lp AI et les Lp AI:AII ressemblent respectivement aux HDL₂ et aux HDL₃.

Puisque la Lp AI et la Lp AI:AII sont distinctes par l'absence ou la présence de l'apo AII, la chromatographie d'immunoaffinité, qui fait appel à des anticorps monospécifiques, est certainement la méthode de choix pour préparer ces deux particules. En effet,

c'est une méthode douce qui permet de préserver au mieux la structure des lipoprotéines (54, 66).

Avec des immunoadsorbants anti-apo AI et anti-apo AII, Cheung et Albers (66) ont isolé la Lp AI et la Lp AI:AII à partir du plasma de sujets normolipémiques. La Lp AI est composée de deux populations de particules, de masse moléculaire et de diamètre différents : 301 k.Da et 10,8 nm pour la Lp AI[1], 164 k.Da et 8,5 nm pour la Lp AI[2]. De même, la Lp AI:AII est représentée par trois populations de particules différentes, distinctes par leur masse moléculaire et par leur diamètre : 228 k.Da et 9,6 nm pour la Lp AI:AII[1], 180 k.Da et 8,9 nm pour la Lp AI:AII[2] et enfin 125 k.Da et 8 nm pour la Lp AI:AII[3].

4 - CARACTERISATION DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

Outre l'apo AI, qui est un constituant majeur de la Lp AI et de la Lp AI:AII, et l'apo AII, qui est un constituant majeur de la Lp AI:AII, on trouve également les apolipoprotéines C, D, E et AIV. La Lp AI et la Lp AI:AII contiennent aussi des enzymes (LCAT) et des protéines de transfert du cholestérol estérifié (CETP) (figure 6).

La distribution et les interactions de ces différents composants dans la Lp AI et dans la Lp AI:AII (apolipoprotéines, lipides, enzymes et protéines de transfert) pourraient expliquer leurs modes d'actions métaboliques.

a - Les apolipoprotéines

- Apolipoprotéine AI

L'apo AI joue un rôle essentiel dans le transport "reverse" du cholestérol. En effet, elle est l'activateur principal de la LCAT. Elle est reconnue par les récepteurs cellulaires aux HDL. Sa fixation à ces récepteurs provoque l'efflux du cholestérol cellulaire (165). Une étude récente a suggéré qu'une population lipoprotéique contenant l'apo AI (Lp AI pré-béta1) pourrait être

l'accepteur primaire du cholestérol cellulaire (28).

L'apo AI est essentiellement associée aux lipoprotéines de mobilité électrophorétique alpha. Néanmoins, elle a été aussi trouvée associée aux lipoprotéines de mobilité électrophorétique pré-bêta. Cette sous-population est appelée Lp AI pré-bêta et sa mise en évidence a été rapporté en 1985 par Kunitake et coll. (70). Récemment, Castro et Fielding (28) ont rapporté que la Lp AI pré-bêta renferme deux sous-populations, la Lp AI pré-bêta1 et la Lp AI pré-bêta2, et que chez les sujets normolipémiques, leur apolipoprotéine AI représente respectivement 2,8 % et 2,3 % de l'apo AI totale plasmatique.

A côté des deux populations représentant la Lp AI (Lp AI[1], Lp AI[2]) identifiées par Cheung et Albers (66), l'apo AI a été trouvée aussi dans des particules de 7,6 nm de diamètre ne représentant pas plus de 1 % de la totalité de la Lp AI. En effet, Chen et coll. (71) ont rapporté l'existence dans les HDL de particules contenant l'apo AI et possédant un diamètre de 6 nm chez des sujets déficients en LCAT. Toutefois, cette population de particules de petite taille chez les sujets normaux peut être analogue aux HDL naissantes.

L'apo AI des HDL₃ se trouve en plus grande quantité dans la Lp AI:AII que dans la Lp AI, alors que la situation est inversée dans les HDL₂. Nestruck et coll. (65) ont été les premiers à rapporter que la Lp AI ressemble aux HDL₂ et la Lp AI:AII aux HDL₃. Atmeh et coll. (73) ont constaté que 70 % de l'apo AI des HDL₂ étaient retrouvés dans la LpAI alors que les 30 % restants sont associés à l'apo AII pour former la Lp AI:AII dans un rapport molaire apo AI/apo AII de 1,11. En revanche, dans les HDL₃, l'apo AI est retrouvée plus associée à l'apo AII, dans un rapport molaire de 1,15, 46 % de l'apo AI sont trouvés dans la Lp AI et 54 % dans la Lp AI:AII. Par la suite, Koren et coll. (74) ont confirmé ces résultats.

Dans la population étudiée par Cheung et Albers (66), le pourcentage de l'apo AI plasmatique non associé à l'apo AII est corrélé au cholestérol des HDL ($r = 0,70$), au cholestérol des HDL₂ ($r = 0,79$) et il n'y a aucune corrélation avec le cholestérol des HDL₃.

L'apo AI pourrait avoir une position plus superficielle dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII. Récemment en effet, Cheung et Wolf (75) ont indiqué que la Lp AI et la Lp AI:AII, préparées par chromatographie d'immunoaffinité et soumises à l'ultra-centrifugation perdent sélectivement leur apo AI. Cette perte est plus prononcée pour la Lp AI que pour la Lp AI:AII : 14 % contre 4 %.

L'apo AI Milano est un variant génétique où l'arginine 173 de l'apo AI est substituée par une cystéine. Cette apolipoprotéine est capable de former un pont disulfure avec les 77 acides aminés de l'apo AII pour donner le complexe (AI_M/AII_S) et peut aussi former des dimères d'apo AI (AI_M/AI_M). En analysant la Lp AI et la Lp AI:AII de deux sujets Milano, Cheung et coll. (76) ont constaté que le complexe (AI_M/AII_S) se retrouve dans la Lp AI:AII, alors que le dimère (AI_M/AI_M) se retrouve exclusivement dans la Lp AI. La Lp AI:AII a un diamètre de 7,8 à 9,7 nm et contient deux molécules d'apo AI et une ou deux molécules d'apo AII par particule. La Lp AI renferme deux populations particulières, la première avec un diamètre de 8,2 à 8,8 nm et contenant trois molécules d'apo AI par particule, la deuxième avec un diamètre de 9,7 à 12,7 nm et contenant quatre molécules d'apo AI par particule. Une faible population de particules ayant un diamètre de 7,2 à 8,2 nm et contenant deux molécules d'apo AI a aussi été détectée.

- Apolipoprotéine AII

L'apolipoprotéine AII est synthétisée dans le foie et pas dans l'intestin (Brewer, Congrès de Milan, 1989). C'est une protéine de

structure des HDL. Elle est reconnue par le récepteur aux HDL. Sa présence dans un milieu de culture cellulaire à côté de l'apo AI se traduit par un effet antagoniste sur l'efflux du cholestérol (165). L'apo AII est associée aux lipoprotéines de mobilité électrophorétique alpha. Aucune mobilité électrophorétique pré-bêta des lipoprotéines contenant l'apo AII n'a été rapportée. Cette apolipoprotéine a toujours été trouvée associée à l'apo AI, à l'exception de deux études récentes qui ont montré l'existence de particules contenant l'apo AII et non l'apo AI.

Alaupovic et coll. (77) ont isolé des lipoprotéines contenant l'apo AII et non l'apo AI. Ces particules lipoprotéiques ont été appelées Lp AII:B. Elles contiennent les apolipoprotéines AII, B, CI, CII, CIII, D et E. Les Lp AII:B comptent respectivement 90 % et 45 à 60 % de la totalité des lipoprotéines contenant l'apo B, des VLDL chez des sujets atteints de la maladie de Tangier et des VLDL chez des sujets ayant une hyperlipoprotéïnémie de type V (hypertriglycéridémies exogènes et endogènes). Les Lp AII:B ont été détectées aussi chez des sujets normolipémiques.

März et Groß (78) ont montré l'existence de particules contenant l'apo AII et non l'apo AI par immunoélectrophorèse bidimensionnelle à gel intermédiaire. Ces auteurs ont rapporté que ces particules ne contiennent pas les apolipoprotéines B, CII, CIII et E et qu'elles sont localisées essentiellement entre les densités 1,065 et 1,216.

- Apolipoprotéine AIV

Aucun rôle physiologique précis de l'apo AIV n'est encore connu. Cependant, du fait qu'elle est un activateur de la LCAT (79, 80), il est suggéré qu'elle participe également au transport "reverse" du cholestérol. L'apo AIV des HDL est localisée dans les particules de petite taille (137). Il a été démontré qu'un repas gras augmente le nombre de ces particules. Il est présumé que le noyau de ces particules s'enrichie en cholestérol estérifié par l'action de la LCAT. Ainsi, ces particules entrent dans la famille des HDL de grande taille (1, 29).

James et coll. (81) ont constaté que le contenu en apo AIV de la LpAI est plus important que celui de la Lp AI:AII. Sachant que l'apo AIV est associée aux particules des HDL de petite taille, cette apolipoprotéine pourrait être localisée dans la population "particulaire" de Lp AI de petite taille où elle pourrait avoir une position superficielle. En effet, James et coll. (81) ont rapporté que la Lp AI préparée à partir du plasma contient plus d'apo AIV que celle préparée à partir des HDL. Il est établi que l'ultracentrifugation altère la distribution de l'apo AIV (137).

On peut expliquer l'association préférentielle de l'apo AIV aux particules contenant l'apo AI et non l'apo AII par le fait que l'activité de la LCAT (qui se retrouve essentiellement dans la LpAI (113)) fait appel aux particules AIV de la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine qui constituent une sorte de réserve de phospholipides, éléments essentiels pour le maintien de l'activité de la LCAT.

- Apolipoprotéines CI, CII, CIII

Ces apolipoprotéines sont retrouvées principalement dans les chylomicrons, VLDL et HDL. L'apo CI, à l'état natif ou sous forme de peptide synthétique, active la LCAT, mais la signification physiologique de cette activation n'est pas connue (82). L'apo CII est un activateur spécifique de la LPL. Elle est transférée des HDL₂ aux lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, VLDL) afin d'accélérer le processus de lipolyse (83). L'apo CIII semble avoir une action inhibitrice dans l'activation de la LPL par l'apo CII (84). De plus, sa présence au niveau des "remnants" des lipoprotéins riches en triglycérides inhibe leur captation hépatique (85).

A partir des HDL, Kostner et Alaupovic (86) ont séparé par chromatographie d'adsorption sur colonne d'hydroxyapatite les lipoprotéines contenant principalement les apo CI, CII, CIII, des lipoprotéines contenant les apo AI et AII. La fraction éluée à faible concentration en sels du tampon phosphate est princi-

pablement constituée d'apo AI et AII, alors que celle élue à forte concentration en sels contient surtout les différentes apolipoprotéines CI, CII, CIII. La fraction des HDL₃ élue par un tampon phosphate contient uniquement les apolipoprotéines CI, CII, CIII.

Gibson et coll. en 1982 (87) ont isolé la Lp AI:E:CII à partir des HDL, en utilisant un immunoabsorbant anti-apo E.

L'apo CII et l'apo CIII des HDL ont des voies métaboliques similaires (88). Cependant, Ohta et coll. (89) ont constaté que le rapport apo CII/apo CIII est plus élevé dans la Lp AI que dans la LpAI:AII, suggérant ainsi que ces apolipoprotéines ont des voies métaboliques différentes dans les deux particules lipoprotéiques.

- Apolipoprotéine D

Appelée encore "thin-line protein" ou apo AIII (90), elle est trouvée essentiellement dans les HDL (surtout les HDL₃). Cette apolipoprotéine a été impliquée dans le transfert des lipides (91), mais l'utilisation d'anticorps dirigés contre elle s'est montrée sans effet sur cette activité (92).

L'étude de Fielding et Fielding (72) sur le complexe lipoprotéique transportant la LCAT montre que 80 % de l'apo D sont éliminés lors du passage du plasma sur un immunoabsorbant anti-apo AII. Ces auteurs ont montré que la totalité de la LCAT plasmatique reste adsorbée sur l'immunoabsorbant anti-apo D ou anti-apo AI, démontrant ainsi l'existence de la particule lipoprotéique Lp AI:D:LCAT selon une stœchiométrie 1-2-1. D'un autre côté, ils ont montré que 80 % d'apo-D plasmatique mais sans LCAT restent fixés sur l'immunoabsorbant anti-apo AII ; sachant que 100 % de l'apo AII sont liés à l'apo AI, ces auteurs concluent à l'existence d'une deuxième particule, la Lp AI:AII:D selon une stœchiométrie 4-2-1.

Cheung et Albers (66) ont constaté que 64 % de l'apo D plasmatique sont retrouvés dans la Lp AI:AII, 31 % dans la Lp AI

et que 14 à 21 % ne sont pas associés avec l'apo AI chez trois sujets féminins. Sachant que la majorité de l'apo D est retrouvée dans les HDL₃, ces auteurs ont supposé que dans la LpAI, cette apolipoprotéine doit être localisée préférentiellement dans la population "particulaire" de petite taille Lp AI[2] plutôt que dans celle de grande taille Lp AI[1]. Par la suite, Cheung et coll. (113) ont constaté que l'apo D est associée avec les particules Lp AI et Lp AI:AI de toute taille.

- Apolipoprotéine E

L'apo E est en grande partie synthétisée dans le foie où elle est sécrétée avec les HDL et transférée ensuite vers les VLDL. Elle est aussi synthétisée par le rein, les monocytes, les macrophages et le tissu nerveux (93, 94). La protéine sécrétée, constituée de 299 résidus d'acides aminés est fortement sialylée mais subit dans le plasma une désialylation importante (95). Sa concentration plasmatique s'élève durant le développement du tissu nerveux (96, 97), au cours des maladies nerveuses (97, 98) ou lors de la régénération du tissu nerveux (99), mais le rôle exact de l'apo E dans le système nerveux n'est pas encore connu.

La concentration plasmatique de l'apo E ne paraît pas être corrélée à une athérosclérose coronarienne. Cependant, son absence dans le plasma se manifeste cliniquement comme une dyslipoprotéïnémie de type III favorisant la présence de xanthomes et l'apparition d'athérosclérose prématurée (100). Le polymorphisme génétique de l'apo E joue un rôle important dans l'athérosclérose (101). Trois allèles communs désignés E4, E3 et E2 codent pour les trois isoformes majeurs de l'apo E, respectivement E4, E3 et E2. Le modèle génétique des trois allèles accorde six phénotypes d'apo-E, révélés par isoélectrofocalisation : trois homozygotes (E4/4, E3/3, E2/2) et trois hétérozygotes (E4/3, E4/2, E3/2). Sing et Davignon (102) et Utermann (103) ont montré que les sujets ayant un phénotype E2/2 ont une concentration plasmatique en apo B plus faible que les sujets ayant un phénotype E4/4 et E4/3.

Cette apolipoprotéine joue un rôle important dans la régulation du cholestérol cellulaire. Elle facilite la captation hépatique et extrahépatique des lipoprotéines qui la portent, via les récepteurs apo B/E et apo E du foie (37).

Les travaux de Castro et Fielding (54) ont montré que chez des sujets normaux, la totalité de l'apo E plasmatique est présente dans les particules lipoprotéiques contenant principalement l'apo AI ou l'apo B et que la Lp E provient de la dissociation des lipoprotéines contenant l'apo B, dissociation engendrée par l'ultracentrifugation ou la précipitation par les polyanions. Dans la déficience héréditaire de la LCAT, la majorité de l'apo E plasmatique n'a pas été trouvée associée avec les lipoprotéines contenant l'apo AI ou l'apo B (104). Chez les diabétiques, 62 % de la totalité de l'apo E plasmatique sont retrouvés dans la particule Lp E qui ne contient ni l'apo AI ni l'apo B (105).

Cheung et Albers (66) ont constaté que 69 % de l'apo E plasmatique sont associés à l'apo AI, 62 % sont retrouvés dans la Lp AI: AII et 7 % dans la Lp AI. La même constatation a été rapportée par Ohta et coll. (89) en caractérisant la Lp AI et la Lp AI: AII selon le sexe. Ces auteurs ont rapporté que l'apo E est plus abondante dans la Lp AI: AII que dans la Lp AI et ceci chez les deux sexes.

L'apo E pourrait être plus stable dans la Lp AI: AII que dans la Lp AI. En effet, l'apo E forme avec l'apo AII le complexe (E/AII) décrit par Weisgraber et Mahley (106). Ces auteurs ont isolé à partir des HDL, en utilisant la chromatographie sur héparine sépharose, quatre sous-fractions dont deux contiennent l'apo B, une contient l'apo AI, l'apo AII et les apo C et une contient l'apo AI, l'apo AII, l'apo E et le complexe (E/AII). Ce complexe est formé par un pont disulfure qui relie l'apo E à une seule chaîne polypeptidique de 77 acides aminés de l'apo AII. Le complexe (E/AII) a un poids moléculaire de 47 k.Da. Ce complexe pourrait être plus stable lors d'une apolipoprotéine E4 que d'une apolipoprotéine E2 du fait de la présence de deux cystéines supplémentaires dans l'apo E4 par rapport à l'apo E2. En plus de

cette stabilité, l'apo E pourrait avoir une position moins superficelle dans la Lp AI:AII que dans la Lp AI. Récemment en effet, Cheung et Wolf (75) ont rapporté que la Lp AI:AII et la Lp AI soumises à l'ultracentrifugation perdent respectivement 4 % et 14 % d'apo E totale contenue dans ces particules.

- Autres apolipoprotéines

Grâce à des immunoabsorbants spécifiques des apolipoprotéines F, AI et AII, Koren et coll. (107) ont mis en évidence l'existence de l'apo F dans la Lp AI et dans la Lp AI:AII. 10 % de l'apo F totale sont trouvés dans la Lp F:AI et 50 % dans la Lp F:AI:AII. Aucune association de l'apo F avec les apo CI, CII, CIII, E et D n'a été observée. La Lp F:AI:AII est de composition stœchiométrique 2-1-1 ; la totalité de ses lipides compte pour 45 % de cholestérol esterifié et 28 % de cholestérol libre. Ces auteurs suggèrent que les particules contenant l'apo F soient impliquées dans le transfert et/ou l'estérification du cholestérol.

b - Les lipides

Le contenu en cholestérol total, triglycérides et phospholipides de la Lp AI est pratiquement identique à celui de la Lp AI:AII (66). Le rapport lipides/protéines de la Lp AI est légèrement plus élevé que celui de la Lp AI:AII (66). Ces deux particules ne diffèrent significativement que par leur contenu en cholestérol libre et esterifié, la Lp AI:AII étant riche en cholestérol esterifié. En effet, Van Tol (108) a constaté que le rapport cholestérol libre/cholestérol esterifié est plus élevé dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII. Récemment, Ohta et coll. (89) ont rapporté que chez des sujets masculins le contenu en phospholipides de la Lp AI est significativement plus faible que celui de la Lp AI:AII. Ces résultats pourraient être en accord avec l'affinité de l'apo AII pour les phospholipides qui est supérieure à celle de l'apo AI.

Des variations dans la concentration des constituants lipidiques de la Lp AI selon le sexe et l'âge, ont été récemment

rapportées par Ohta et coll. (89, 127). Dans la Lp AI, les concentrations du cholestérol total, du cholestérol estérifié, des phospholipides et de l'apo AI sont plus élevées chez la femme que chez l'homme, alors qu'elles sont plus faibles chez l'homme pendant la puberté. La concentration plasmatique des HDL₂, plus élevée chez la femme que chez l'homme, et la faible concentration du cholestérol des HDL chez l'homme au cours de sa puberté vont dans le sens des résultats trouvés par Ohta et coll. (89, 127). En effet, la Lp AI est retrouvée principalement dans les HDL₂ (73, 74) et la concentration en apo AI est corrélée avec celle en cholestérol des HDL (15, 16).

c - Les enzymes

La lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est l'enzyme responsable de la formation des esters de cholestérol, en catalysant le transfert du groupement acyl de la position Sn-2 de la lécithine sur le groupement hydroxyl en position 3 du cholestérol. Le substrat naturel préférentiel de cette enzyme est présenté par les HDL et plus particulièrement les HDL discoïdales et les HDL₃ dont l'apo AI est l'activateur principal (109). La LCAT est également activée par l'apo AIV et plus faiblement par l'apo E et l'apo CI (42). L'apo AII joue un rôle modulateur de la réaction enzymatique en présence de l'apo AI (110). L'activation de la LCAT est importante pour le déroulement du transport "reverse" du cholestérol. Son inhibition ou son déficit génétique se traduit par une accumulation du cholestérol dans les tissus (42, 111). La LCAT est constituée de 416 acides aminés, elle a une masse moléculaire de 68 k.Da dont 25 % sont représentés par des sucres (112).

Cheung et coll. (113) ont constaté que 69 % et 17 % de l'activité de la LCAT plasmatique sont associés respectivement à la Lp AI et à la Lp AI:AII. La majorité de cette activité est associée à la population de particules de Lp AI ayant un diamètre de 11,6 nm et de Lp AI:AII ayant un diamètre de 11,1 nm.

d - Les protéines de transfert de lipides

Les protéines de transfert des esters de cholestérol (CETP) assurent le transfert des esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines de basse et très basse densité (LDL, VLDL) (115). Cette activité implique, probablement, la formation d'un complexe ternaire : donneur/CETP/accepteur.

Marcel et coll. (116), en 1981 ont fractionné les HDL en fonction de leur contenu en apo E en utilisant une chromatographie d'immunoaffinité sur une colonne d'héparine. Ces auteurs ont obtenu trois fractions hétérogènes en fonction de leur contenu en CETP. En effet, la fraction non retenue et la première fraction éluée possèdent une grande activité de transfert du cholestérol estérifié, alors que la deuxième fraction éluée montre un transfert de départ plus élevé que celui des deux autres mais une activité faible.

81 % de l'activité de la CETP plasmatique sont associés à la Lp AI alors que 7 % sont associés à la Lp AI:AI (113). La majorité de cette activité est associée à la population de particules de Lp AI ayant un diamètre de 10 nm et de Lp AI:AI ayant un diamètre de 10,6 nm.

Nous constatons donc l'extrême complexité des particules lipoprotéiques Lp AI et Lp AI:AI. Ces deux particules sont à l'évidence extrêmement hétérogènes sur le plan structural. Le rôle métabolique de certaines de ces sous-fractions est entrevu, mais la plupart reste à définir.

5 - Lp AI DE MOBILITE ELECTROPHORETIQUE PRE-BETA

Levy et Fredrickson (117) d'une part et Albers et Aladjem (60) d'autre part, ont détecté des arcs d'immunoprécipitation ayant une mobilité électrophorétique pré-bêta dans les fractions de l'ultracentrifugation en utilisant respectivement des anticorps anti-HDL et des anticorps anti-apo AI. Aucune attention n'a été

Tableau 3 : CARACTERISATION DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES
Lp AI ET Lp AI:All

Auteurs	Réf.	Nombre de sujets	Méthodes de préparation	Lp AI								Lp AI:All								
				% masse		Lipides % moles			Diamètre moyen (nm)	Autres données	Rapport Molaire (AI/All)	Lipides			% moles		Diamètre moyen (nm)	Autres données		
				Prot	C T	CE	CL	TG				P h	C T	CE	CL	TG			P h	
Cheung et Albers en 1982	58	2 hommes 2 femmes	HDL Ultracentrifugation (CsCl) ; immunoprécipitation										2 / 1							
Nordfeldt et coll. en 1981	64	5 hommes 23 - 40 ans	HDL Séphadex QAE et hydroxyapatite			4,95			2,5	48	8,7	pHi = 5,05 - 5,55 M.E : alpha d = d (HDL2)		1,3/1	48,3			4,8	49,6	7,9 pHi = 5,1 - 5,30 ME : alpha d = d (HDL2)
Nestruck et coll. en 1983	65	7 sujets normaux	HDL Chromatofocalisation	Lp AI Lp AI			35 38,7	17,8 12,7	5,8 5,5	36,7 38,9	8 7,6	pHi = 5 pHi = 4,95 ; 207 k.Da M.E : alpha d = d (HDL2)	Lp AI:All [1] Lp AI:All:D [2] Lp AI:All:D:E [3] Lp AI:All:D:E (4)			40,9 42,1 43 42,1	11,1 11 10,2 12,6	5,6 5,4 5,7 5,7	38 37,2 36,9 35,5	6,6 6,1 6,3 6 pHi [1] = 4,83 pHi [2] = 4,66 pHi [3] = 4,50 ; 150 k.Da pHi [4] = 4,45 ; 150 k.Da M.E : alpha d = d (HDL3)
Atmeh et coll. en 1983	73	3 femmes normales en période de pré-ménopause	HDL Ultracentrifugation ; Immunoaffinité	Lp AI (HDL2)	44		18,7	6,1		31,2		MM = 212 k.Da	Lp AI:All (HDL2) Lp AI:All (HDL3) Lp AI:All (HDL)	1,11/1 1,15/1 1,18/1						
Mc Vicar et coll. en 1984	55	3 sujets normaux	Plasma Immunoaffinité sélective	Lp AI + Lp AI:All (mélange)	66,5		11,1	1,3	4,2	19,5	8 - 12									
Cheung et Albers en 1984	66	4 hommes 6 femmes	Plasma Immunoaffinité	Lp AI [1] Lp AI [2] Lp AI		33			6	61	10,8 [1] 8,5 [2] 7,6	MM [1] = 301 k.Da MM [2] = 164 k.Da	Lp AI:All [1] Lp AI:All [2] Lp AI:All [3]	2 / 1	33		6	61	9,6 [1] 8,9 [2] 8 [3] MM [1] = 228 k.Da MM [2] = 180 k.Da MM [3] = 125 k.Da	
Chen et coll. en 1984	71	2 femmes déficientes en LCAT	Plasma Ultracentrifugation prép. ; Ultracentrifugation zonale	Lp AI	2 37 - 38 3 - 9 1 - 2 1 - 2	molécules d'apo-AI Ph CL CE TG				6 - 6,2										

Tableau 3 : CARACTERISATION DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES
(suite) Lp AI ET Lp AI:AI

Auteurs	Réf.	Nombre de sujets	Méthodes de préparation	Lp AI										Lp AI:All									
					% masse		Lipides		% moles		Diamètre moyen (nm)	Autres données		Rapport Molaire (AI/All)	Lipides			% moles		Diamètre moyen (nm)	Autres données		
					Prot	C T	CE	CL	TG	P h					C T	CE	CL	TG	P h				
Kunitake et coll. en 1985	70	1 femme 2 hommes	Plasma Immunoaffinité ; Immunoélectrophorèse	Lp AI Lp AI (pré-béta)	66 91,3		12,13 1,8	1,7 0,3	3,23 0	18,3 6,6		M.E : alpha M.E : pré-béta; MM = 80 k.DDa											
Koren et coll. en 1987	74		Plasma Immunoaffinité										Lp AI:All Lp AI:All	1 / 1		33,7	8,7	5	52,6	HDL2 HDL3			
Cheung et coll. en 1987	114	2 femmes 2 hommes	Plasma Immunoaffinité	Lp AI Lp AI							7,21 10,93		Lp AI:All							8,55			
Van Tol en 1988	108		Plasma Immunoaffinité	Lp AI	+ Prot (HDL2)		8 molécules d'apo AI						Lp AI:All	1 / 1	4 molécules d'apo AI 4 molécules d'apo All					Prot : + Prot (HDL3)			
Cheung et Wolf en 1988	75			Lp AI [1] Lp AI [2]							10,5 8,5												
Ohta et coll. en 1988	127	10 femmes (F) 10 hommes (H)	Plasma Immunoaffinité	Lp AI (F) Lp AI (H)	36,3 36,3				7,2 12,6	56,6 51,1	F + H 11,1 ± 0,4 8,8 ± 0,2		Lp AI:All (F) Lp AI:All (H)		34,8 34,9			6,4 8,3	58,9 56,9	F + H 10,1 ± 0,5 9 ± 0,3 8,1 ± 0,3			
Castro et Fielding en 1988	28	10 sujets normaux	Plasma Electrophorèse bidimensionnelle suivie d'immunoélectrotransfert	Lp AI Lp AI pré-béta1 Lp AI pré-béta2								Mobilité = alpha Mobilité = pré-béta 2,8 % d'apo AI totale plasmatique Mobilité = pré-béta 2,3 % d'apo AI totale plasmatique	Lp AI:All							Mobilité = alpha			

prêtée à ces fractions et ces auteurs ont pensé que cela pouvait être un artefact de l'ultracentrifugation.

Une fraction lipoprotéique isolée à partir du plasma et contenant l'apo AI et non l'apo AII a été identifiée par Kunitake et coll. (70). Cette fraction diffère de la charge des HDL et se caractérise par une mobilité électrophorétique pré-bêta en électrophorèse dans un gel d'agarose. 0 à 25 % de l'apo AI plasmatique étaient présents dans cette fraction. Celle-ci contient 90 % de protéines et 10 % de lipides. Elle ne contient ni l'apo AII ni l'apo B. Les lipides qui la constituent sont le cholestérol estérifié, le cholestérol libre et les phospholipides. Elle ne contient pas de triglycéride. La masse moléculaire de cette fraction est de 80 k.Da. Cette fraction a été appelée Lp AI pré-bêta.

6 - DOSAGE DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

Bien que le dosage de l'apolipoprotéine AI puisse rendre compte de l'augmentation ou de la diminution de la famille lipoprotéique caractérisée par cette apolipoprotéine, il ne permet pas de distinguer à l'intérieur de cette famille des changements de la répartition de la Lp AI et de la Lp AI:AII. La diminution ou l'augmentation de la concentration en apolipoprotéines AI ne traduit pas forcément celle de ces deux particules lipoprotéiques.

Le dosage de la Lp AI et de la Lp AI:AII revient à déterminer les concentrations plasmatiques des apolipoprotéines AI associées ou non associées aux apolipoprotéines AII.

Alors que des travaux antérieurs (59, 60, 72) considéraient que seulement 8 à 10 % de l'apo AI plasmatique ou des HDL ne sont pas associés à l'apo AII, les travaux d'Atmeh et coll. (73) ont indiqué que 45 % de l'apo AI plasmatique ne sont pas associés à l'apo AII, ceci chez 8 sujets féminins normaux en période de préménopause. En accord avec ces derniers, Koren et coll. (74) ont rapporté que 45 % et 42 % de l'apo AI plasmatique ne sont pas associés à l'apo AII, chez 50 sujets féminins et 50 sujets

masculins respectivement.

Les méthodes permettant le dosage de l'apo AI dans chacune de ces deux particules font appel principalement à des procédés immunologiques.

a - Chromatographie d'immunoaffinité

Grâce à un immunoadsorbant anti-apo AII, il est possible de déterminer après chromatographie les quantités d'apo AI retenues et non retenues par cet immunoadsorbant (89, 127).

b - Immunoprécipitation en milieu liquide

Après immunoprécipitation complète en milieu liquide des particules lipoprotéiques contenant l'apo AI et l'apo AII par des anticorps anti-apo AII, la concentration en apo AI non associée à l'apo AII est déterminée directement par le dosage de l'apo AI présente dans le surnageant, alors que la concentration en apo AI associée à l'apo AII est déterminée par différence entre celle de l'apo AI totale et celle de l'apo AI présente dans le surnageant. En utilisant cette technique, Atmeh et coll. (73) et Koren et coll. (74) ont trouvé approximativement 46 % d'apo AI plasmatique totale non associée à l'apo AII.

c - Electroimmunodiffusion à double phase

La quantification de la Lp AI et de la Lp AI:AII est possible à l'aide d'un gel d'agarose en double phase. La partie inférieure du gel contient des anticorps anti-apo AII et la partie supérieure des anticorps anti-apo AI. Après électroimmunodiffusion, les immunoprécipités obtenus dans les parties inférieure et supérieure correspondent respectivement à la Lp AI:AII et à la Lp AI. En utilisant cette technique, Atmeh et coll. (73) ont rapporté que 44,5 % de l'apo AI plasmatique sont sous la forme Lp AI et 55 % sous la forme Lp AI:AII.

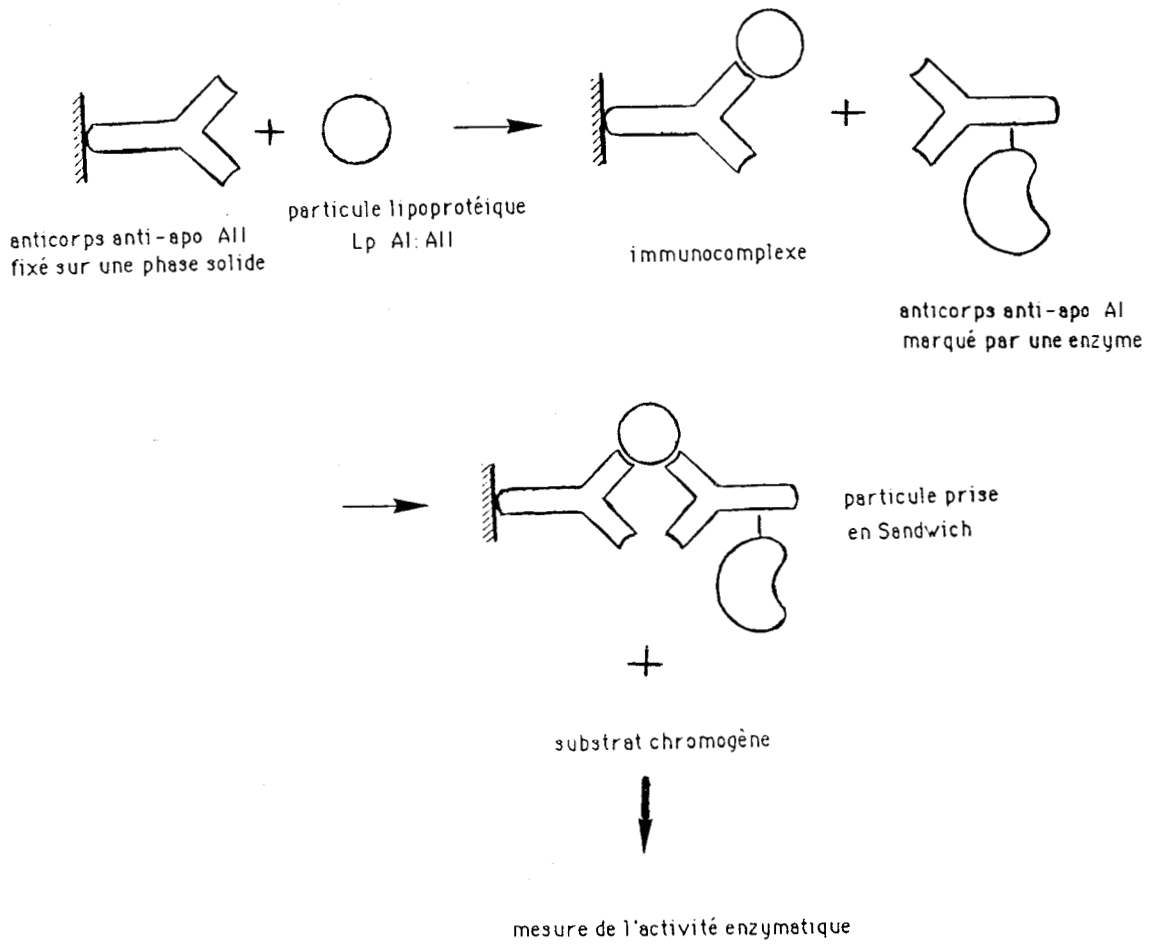


FIGURE 7 : LA METHODE ELISA A DOUDLE DETERMINATION D'ANTIGENE

d - Immunoenzymologie à double détermination d'antigènes

Les techniques immunoenzymatiques ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ont été décrites pour la première fois en 1971 (67) et depuis leur découverte, elles ont pris une place importante dans le dosage des protéines (68). Elles ont été adaptées pour la première fois par Fruchart et coll. (69) pour le dosage des apolipoprotéines. Elles présentent de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes immunologiques : simplicité, rapidité, possibilité d'automatisation.

La technique immunoenzymatique à double détermination d'antigène est décrite de la manière suivante : un peu à l'image d'un immunoabsorbant, les anticorps anti-apo AII sont fixés sur les parois d'une plaque de microtitration et retiennent toutes les lipoprotéines qui contiennent l'apo AII ; l'analyse quantitative de l'apolipoprotéine AI présente dans la particule Lp AI:AII retenue est alors directement réalisée sur la plaque, par addition de son anticorps correspondant, marqué par une enzyme (figure 7). La concentration en apo AI présente dans la particule Lp AI est obtenue par différence entre celle de l'apo-AI totale et celle de l'apo-AI présente dans la Lp AI:AII. En utilisant cette technique, Koren et coll. (74) ont rapporté que 44,9 % et 55,1 % de l'apo AI plasmatique sont respectivement sous la forme Lp AI et Lp AI:AII, chez 50 sujets féminins et 42,3 % et 57,7 % chez 50 sujets masculins.

e - Dosage de la Lp AI pré-bêta

Il est intéressant de noter la méthode de dosage propre à la Lp AI pré-bêta rapportée récemment par Ishida et coll. (118) : après électrophorèse du plasma sur gel d'agarose, les lipoprotéines sont transférées sur feuille de nitrocellulose ; la Lp AI pré-bêta est alors quantifiée en utilisant successivement des anticorps anti-apo AI et de la protéine A radiomarquée.

7 - CONCENTRATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AI

La concentration plasmatique de ces deux particules a été rapportée par Atmeh et coll. (73) sur 8 sujets féminins normaux en période de préménopause. La Lp AI:AI a une concentration de $0,86 \pm 0,05$ mg/ml et la Lp AI une concentration de $0,69 \pm 0,10$ mg/ml. En accord avec ces auteurs, Koren et coll. (74) ont rapporté une concentration en Lp AI:AI de $0,79 \pm 0,14$ mg/ml chez 50 sujets féminins et 50 sujets masculins et une concentration en Lp AI de $0,64 \pm 0,21$ mg/ml chez les femmes et de $0,58 \pm 0,20$ mg/ml chez les hommes.

8 - INTERET DU DOSAGE DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AI

Certains travaux ont indiqué que la Lp AI et la Lp AI:AI seraient métaboliquement distinctes et que leur évaluation pourrait constituer un nouveau moyen d'investigation pour explorer les troubles du métabolisme des lipoprotéines:

En utilisant la technique ELISA à double détermination d'antigènes chez des sujets coronarographiés, Puchois et coll. (120) ont constaté que la diminution de la concentration plasmatique en apo AI chez des sujets à coronaires lésées traduit celle de la Lp AI qui diminue de façon très significative, la Lp AI:AI n'étant pas modifiée (figure 8).

Une étude récente réalisée par Luc et coll. (128) chez les octogénaires, a signalé une augmentation de la concentration en Lp AI de 27 % pour les femmes et de 31 % pour les hommes, alors que celle en Lp AI:AI diminue de 31 % chez les femmes et de 29 % chez les hommes (tableau 4).

Le dosage de ces deux particules chez des sujets soumis à une thérapeutique hypolipémiante montre une distinction entre les fibrates qui augmentent considérablement la Lp AI:AI mais diminuent la Lp AI, et les résines ou les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (129) qui augmentent les deux particules (figure 9).

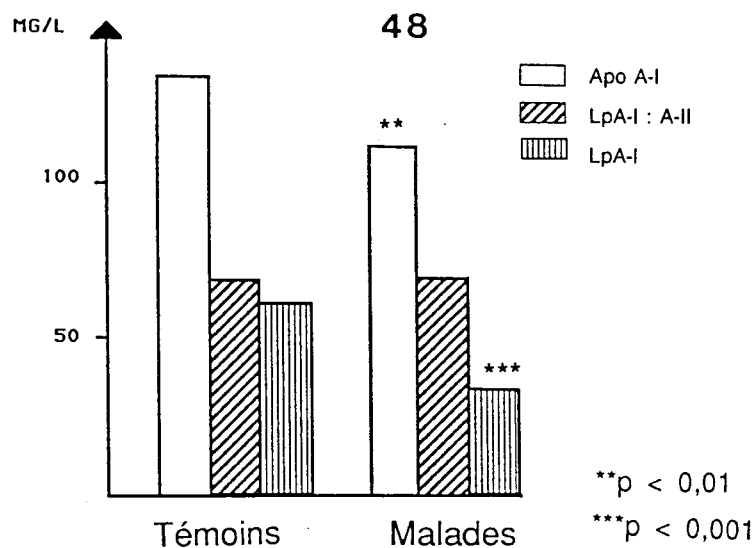


FIGURE 8 : VARIATION DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AI
CHEZ LES SUJETS A CORONAIRES LESEES

	Normolipémiques (n = 68)		Octogénaires (n = 68)	
	Femmes	Hommes	Femmes	Hommes
Age (années)	37,5 ± 6,7	38,2 ± 6,9	83,9 ± 3,3	84,8 ± 4,5
Lp AI (mg/ml)	0,52 ± 0,12	0,48 ± 0,12	0,66 ± 0,15	0,63 ± 0,18
Lp AI:AI (mg/ml)	0,86 ± 0,17	0,78 ± 0,19	0,59 ± 0,19	0,55 ± 0,18

TABLEAU 4 : Lp AI ET Lp AI:AI
CHEZ LES OCTOGENAIRES

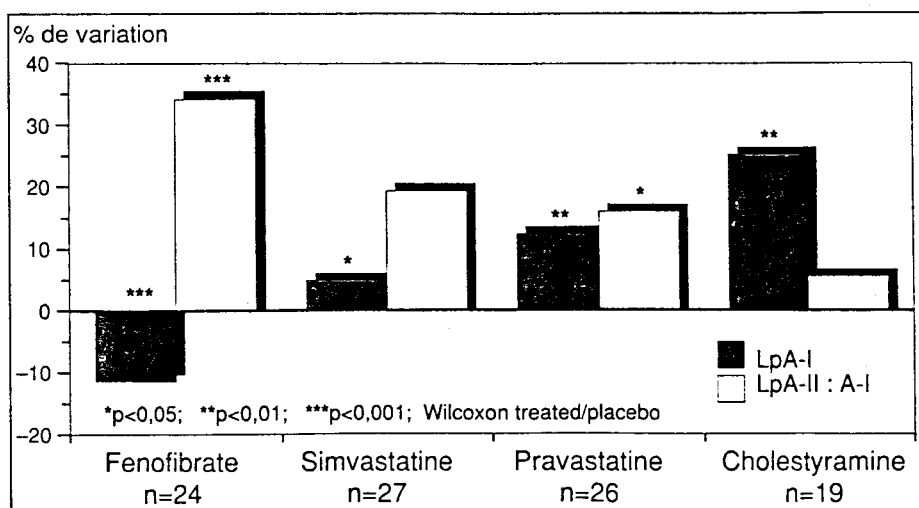


FIGURE 9 : EFFETS DES MEDICAMENTS
SUR LES PARTICULES CONTENANT L'APO AI

La Lp AI pré-bêta représente 4 % de l'apo AI totale plasmatique (118). IL semble que ce pourcentage varie en fonction de la concentration en cholestérol des HDL et de l'état pathologique. En effet Kunitake et coll. (70) et Ishida et coll. (118) ont rapporté que la Lp AI pré-bêta est pratiquement inexistante chez des sujets ayant une concentration faible en cholestérol des HDL. Ishida et coll. (118) ont trouvé que ce pourcentage est augmenté dans l'hypercholestérolémie familiale, dans l'hypertriglycémie et en cas de déficience en LCAT.

9 - METABOLISME ET ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

En 1983, Zech et coll. (119) ont suggéré que l'apo AI et l'apo AII ne possèdent des métabolismes communs que lorsqu'elles se trouvent sur la même particule. Des travaux ont montré que sous l'effet de certaines drogues (acide nicotinique, probucol) (73) ou dans certains états pathologiques (120), les valeurs des concentrations plasmatiques des deux particules Lp AI et Lp AI:AII varient différemment, ce qui a permis de suggérer que ces deux particules lipoprotéiques doivent avoir des origines, des voies métaboliques et des fonctions différentes.

D'après la reconnaissance des sites de synthèse de l'apo AI et de l'apo AII et des voies métaboliques de différentes classes de lipoprotéines, il est possible de supposer que la Lp AI et la Lp AI:AII ont des origines différentes et que la première peut être le produit du catabolisme des chylomicrons, alors que la deuxième peut être sécrétée par le foie. Récemment en effet, Brewer a rapporté lors du congrès de Milan en 1989, que la Lp AI est synthétisée par l'intestin, mais pas la Lp AI:AII.

Un mécanisme de formation de la Lp AI peut être tiré des travaux de Ritter et Scanu (121) et Kwok et coll. (122) qui ont démontré que les HDL₃ perdent sélectivement l'apo AII quand elles sont exposées aux fibroblastes humains ou aux leucocytes circulants humains.

La Lp AI peut provenir d'une protéolyse spécifique de l'apo AII présente dans la Lp AI:AII (121), alors que la Lp AI:AII peut provenir de la Lp AI qui acquiert l'apo AII (figure 10). In vitro, l'apo AII peut déplacer l'apo AI des HDL (123). En effet, son affinité pour les phospholipides, qui est supérieure à celle de l'apo-AI, lui permet de se substituer à celle-ci.

L'interconversion des sous-populations de tailles différentes à l'intérieur de la Lp AI ou de la Lp AI:AII ne peut être que le résultat de l'addition ou de la perte :

- des lipides sous l'action de la LCAT, de la LPL, de la lipase hépatique et des protéines de transfert des lipides ;
- des apolipoprotéines sous l'effet du transfert et de l'échange qui existent entre les lipoprotéines (figure 10).

Chen et coll. (71) ont isolé à partir des HDL chez deux patients déficients en LCAT des lipoprotéines de petit diamètre, 6 à 6,2 nm, et contenant deux molécules d'apo AI par particule. Quand ces lipoprotéines sont incubées avec du cholestérol libre et de la LCAT, elles se transforment en particules de plus grand diamètre, 6,6 à 8,6 nm, et contiennent trois molécules d'apo AI par particule. Cette transformation s'explique par la fusion de deux particules suivie de la libération d'une molécule d'apo AI.

Nichols et coll. (124) ont rapporté récemment que la Lp AI contient deux populations de lipoprotéines. La première, avec un diamètre de 9,8 à 12 nm, située dans l'intervalle des HDL_{2b} contient quatre molécules d'apo AI par particule. La deuxième, avec un diamètre de 8,2 à 8,8 nm, située dans l'intervalle des HDL_{3a} contient trois molécules d'apo AI par particule. L'incubation des protéoliposomes constitués de deux molécules d'apo AI, de cholestérol libre et de phosphatidylcholine avec de la LCAT, conduit à la formation de complexes particuliers contenant chacun trois molécules d'apo AI. Nichols et coll. (124) concluent que la formation des Lp AI à trois molécules d'apo-AI

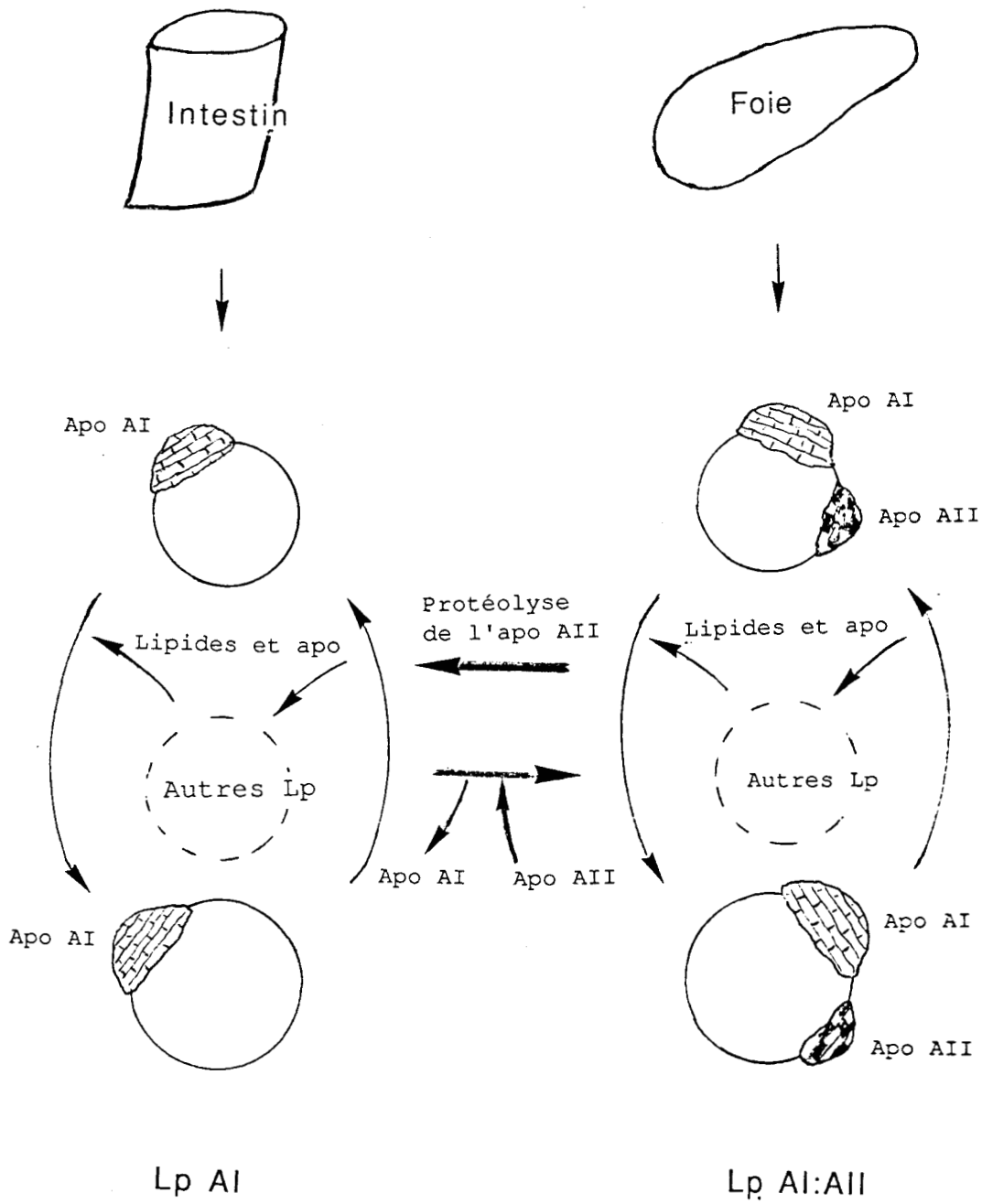


FIGURE 10: METABOLISME DE LA Lp AI ET DE LA Lp AI:AII

par particule est le résultat de la transformation par action de la LCAT de deux particules contenant chacune deux molécules d'apo AI. Cette transformation est suivie d'une fusion de ces deux particules avec la libération d'une molécule d'apo AI.

Cheung et coll. (125) ont rapporté que, aussi bien in vitro qu'in vivo, 30 à 50 % des apolipoprotéines radiomarquées contenues dans la Lp AI sont transférées de la Lp AI vers la Lp AI:AII ; en revanche, moins de 20 % sont transférées dans le sens contraire. Le transfert des apolipoprotéines a été aussi constaté au sein des sous-populations lipoprotéiques à l'intérieur de la Lp AI:AII. Leurs apolipoprotéines sont transférées des particules de grande taille vers celles de petite taille et non dans le sens contraire.

La Lp AI pré-bêta pourrait être un intermédiaire transitoire dans la formation de la Lp AI alpha à partir des chylomicrons. Les différences dans la composition lipidique et la structure protéique de la particule Lp AI pré-bêta par rapport à la Lp AI de mobilité électrophorétique alpha, peuvent refléter des rôles métaboliques importants et, par conséquent, une affinité différente par rapport à la Lp AI alpha pour le récepteur aux HDL. La pauvreté des lipides de la Lp AI pré-bêta devrait conférer à cette particule une surface susceptible de capter le cholestérol libre des cellules périphériques. En effet Castro et Fielding (28) ont rapporté que la fraction Lp AI pré-bêta 1 était l'accepteur primaire du cholestérol cellulaire.

Récemment, Van Tol et coll. (126) ont rapporté que les HDL du rat contiennent en majorité la Lp AI, la Lp E et la Lp AI:E. Par ailleurs, la Lp E est reconnue par le récepteur hépatique spécifique de l'apo E, la Lp AI par le récepteur hépatique ou rénal spécifique aux HDL et la Lp AI:E par le récepteur aux HDL.

Barbaras et coll. (165) ont montré récemment, in vitro, que l'efflux du cholestérol des cellules n'est observé qu'en présence de la Lp AI et non de la Lp AI:AII, suggérant ainsi, à côté d'autres travaux (120), l'effet anti-athérogène accordé à la Lp AI et non à la Lp AI:AII.

10 - CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre que les HDL contiennent deux types de particules lipoprotéiques, la Lp AI et la Lp AI: AII, entités elles mêmes extrêmement hétérogènes. Certains auteurs soulignent l'intérêt du dosage de ces deux particules et montrent que leur évaluation semble refléter plus fidèlement la complexité du métabolisme des lipoprotéines de haute densité. Ils suggèrent que la Lp AI constitue la fraction anti-athérogène des HDL. Toutefois, la mise au point d'une méthode qui pourrait déterminer facilement sa concentration plasmatique est nécessaire afin d'évaluer au mieux le risque de développement des maladies cardiovasculaires.

V - L'APOLIPROTEINE AIV ET SON ROLE DANS LE TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL

L'apolipoprotéine AIV a été décrite pour la première fois par Swaney et coll. (130) en 1974 dans les HDL plasmatiques du rat. Elle a été plus tard montrée par d'autres auteurs comme étant un composant apolipoprotéique de la lymphe, des chylomicrons, des VLDL, des LDL et elle se trouve en grande quantité dans la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine de différents mammifères, y compris l'homme (131, 132).

1 - STRUCTURE, SYNTHÈSE ET CONCENTRATION PLASMATIQUE DE L'APO AIV

L'apo AIV est une glycoprotéine de masse moléculaire 46 k.Da. Elle est synthétisée comme préapolipoprotéine (133, 134). L'apo AIV circulante est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 376 acides aminés (chez l'homme) et de 371 acides aminés (chez le rat). Le polypeptide contient plusieurs segments répétés de 22 résidus d'acides aminés ayant un potentiel d'alpha-hélicité (135, 136).

L'apo AIV est une protéine polymorphique ; quatre isoprotéines de point isoélectrique (5,28 - 5,32 - 5,36 - 5,40) ont été identifiées dans le plasma et la lymphe (137).

Chez l'homme, l'intestin est la source majeure de la synthèse de cette apolipoprotéine (138). La synthèse hépatique de l'apo AIV est négligeable (moins de 2 %) (135). Chez le rat, approximativement 50 % de l'apo AIV plasmatique totale sont synthétisés par l'intestin de même que l'apo AI, alors que dans le foie elle est synthétisée à un pourcentage inférieur à la moitié de celui de l'apo AI (139, 140).

La concentration plasmatique de l'apo AIV chez le rat est de 0,10 à 0,24 mg/ml. Chez l'homme, elle est de 0,13 à 0,37 mg/ml.

En utilisant la radioimmunologie pour le dosage de l'apo AIV, Ghiselli et coll. (141) ont rapporté une concentration de $0,17 \pm 0,02$ mg/ml chez les normolipémiques alors que Bisgaier et coll. (137) ont rapporté une concentration de $0,37 \pm 0,04$ mg/ml. Ces derniers auteurs expliquent cette concentration élevée par une meilleure exposition des épitopes de l'apo AIV en utilisant le sodium dodécyl sulfate (SDS). Des concentrations similaires à celle rapportée par Ghiselli et coll. ont été obtenues par Steinmetz et coll. (79) ($0,14 \pm 0,02$ mg/ml) en utilisant la technique de Laurell, par Rosseneu et coll. (142) ($0,14 \pm 0,05$ mg/ml) en utilisant la technique ELISA non compétitive, et par Fidge et coll. (144) ($0,16 \pm 0,05$ mg/ml) en utilisant la technique ELISA compétitive.

Aucune corrélation entre la concentration de l'apo AIV et celle du cholestérol total ou des triglycérides ou du cholestérol des HDL n'a été trouvée (137, 141). La concentration de l'apo AIV apparaît ne pas être corrélée avec le degré de l'hyperlipidémie (143) : ce qui signifie que la majorité de l'apo AIV n'est pas associée avec les lipoprotéines plasmatiques. La concentration de l'apo AIV diminue dans l'abêta-lipoprotéïnémie où elle est retrouvée à 37 % de sa concentration chez les sujets normaux (137). Dans l'abêta-lipoprotéïnémie, la faible concentration de l'apo AIV est expliquée par l'affaiblissement de la formation des chylomicrons intestinaux qui affecte son transport lymphatique. Dans la maladie de Tangier, l'apo AIV est retrouvée à 56 % de sa concentration normale (137). Dans la déficience héréditaire de l'apo E (145) et dans l'insuffisance rénale (146), il existe des lipoprotéines riches en apo AIV. Ces lipoprotéines ont les caractéristiques des "remnants" des chylomicrons, suggérant ainsi que l'apo AIV peut être impliquée dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.

2 - DISTRIBUTION DE L'APO AIV

Il a été décrit que l'ultracentrifugation altère grossièrement la distribution de l'apo AIV. En effet, plusieurs auteurs (137, 143, 147, 148) suggèrent que l'apo AIV se détache des

lipoprotéines et se retrouve après ultracentrifugation dans la fraction de densité supérieure à 1,21. Cependant, Ohta et coll. (149) ont constaté que l'apo AIV plasmatique et l'apo AIV lymphatique trouvées dans la fraction de densité supérieure à 1,21 sont associées avec des lipides.

70 % de la concentration de l'apo AIV plasmatique sont retrouvés dans la fraction dépourvue de lipoprotéine, alors que 25 % sont associés aux HDL (137, 141). L'apo AIV associée aux HDL est localisée préférentiellement dans les particules de petite taille (diamètre: 7,8 à 8 nm) qui contiennent aussi l'apo AI (137). Chez le rat, la concentration de l'apo AIV est partagée également dans les HDL et dans la fraction dépourvue de lipoprotéine.

Chez l'homme, la concentration plasmatique de l'apo AIV augmente après un repas riche en graisses (137, 147). Chez le rat, elle augmente avec l'addition d'huile d'olive ou de cholestérol dans l'alimentation (150). Fidge (151) avait remarqué que l'augmentation de la concentration de l'apo AIV plasmatique après un repas gras affecte les chylomicrons et que l'apo AIV est transférée des chylomicrons vers la fraction dépourvue de lipoprotéine puis de cette fraction vers les HDL.

De Lamatre et coll. (148) et Weinberg et Spector (152) ont expliqué que le transfert de l'apo AIV de la fraction dépourvue de lipoprotéine vers les HDL est associée à la formation de cholestérol estérifié. Chez le rat, De Lamatre et coll. (150) ont montré que la concentration de l'apo AIV dans les HDL diminue pendant que celle de l'apo AIV dans la fraction dépourvue de lipoprotéine augmente et que ce changement est plus prononcé quand le cholestérol est ajouté à 2 % de sa concentration dans la nourriture.

La distribution de l'apo AIV est affectée par l'enzyme LCAT (153). En effet, une incubation du plasma pendant 6 heures à 37°C fait déplacer l'apo AIV de la fraction dépourvue de lipoprotéine vers les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides.

L'incubation du plasma avec l'inhibiteur de la LCAT : 5,5 - dithiobis (acide 2 nitrobenzoïque) (DTNB), bloque l'estérification du cholestérol libre et reste sans effet sur la distribution de l'apo AIV. On peut expliquer le déplacement de l'apo AIV de la fraction dépourvue de lipoprotéine vers les lipoprotéines plasmatiques par le fait que l'activité de la LCAT entraîne une diminution des phospholipides des HDL. Les particules AIV de la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine, constituent une sorte de réserve de phospholipides nécessaires au maintien de l'activité LCAT. La LCAT entraîne la formation de zones de continuité dans la surface des HDL, ce qui peut entraîner la fixation des particules AIV.

3 - ROLE DE L'APO AIV DANS LE TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL

En dépit du fait que l'apo AIV est principalement synthétisée par l'intestin comme composant des chylomicrons, aucune fonction physiologique précise de l'apo AIV humaine n'est encore connue. Cependant, deux traits majeurs facilitant le transport "reverse" du cholestérol des cellules périphériques vers le foie ont été attribués à l'apo AIV :

- l'activation de la LCAT qui est l'enzyme plasmatique responsable de l'estérification du cholestérol ;
- l'interaction de l'apo AIV avec les cellules et la stimulation de l'efflux du cholestérol.

a - Activation de la LCAT par l'apo AIV

Steinmetz et Utermann (79) et Chen et Albers (80) ont montré que l'apo AIV est un activateur de la LCAT. Stein et coll. (154) ont montré que l'apo AIV du rat provoque l'efflux de cholestérol des fibroblastes humains.

b - L'interaction de l'apo AIV avec les cellules et la stimulation de l'efflux du cholestérol

La ressemblance entre la structure du gène de l'apo AI, de l'apo AIV et de l'apo E laisse supposer que ces gènes sont des membres d'une même famille (155). Une autre ressemblance existe aussi dans la structure primaire de ces apolipoprotéines (155, 156) ainsi que dans l'activation in vitro de l'enzyme LCAT (79, 80). Stein et coll. (154) ont démontré que ces trois apolipoprotéines isolées du rat sont capables de provoquer l'efflux du cholestérol de fibroblastes humains chargés préalablement du cholestérol.

A l'aide de complexes artificiels contenant des phospholipides et de l'apo AIV, Ghiselli et coll. (157) ont pu obtenir une fixation spécifique et saturable de l'apo AIV sur les cellules hépatiques de rat. Ces auteurs ont conclu qu'un site hépatique de fixation spécifique pour l'apo AIV pourrait être impliqué dans le transport "reverse" du cholestérol.

Dvorin et coll. (158) ont montré que le complexe (apo AIV du rat/acide palmitoléique) est capté par des cultures primaires d'hépatocytes de rat. Dans des expériences de compétition, ces auteurs ont prouvé que l'apo AIV du rat est un des ligands responsable de la fixation des HDL sur les hépatocytes. Ces auteurs ont pu aussi montrer que l'apo AIV se fixe sur un site récepteur différent de celui du site récepteur apo B/E et de celui du site récepteur apo E.

Récemment, Savion et coll. (159) ont montré que les HDL humaines se fixent aux cellules endothéliales de l'aorte de bœuf. Cette fixation peut être déplacée par l'addition d'un sérum humain dépourvu de lipoprotéine. Ce déplacement a été attribué à l'apo AI et à l'apo AIV trouvées dans ce sérum dépourvu de lipoprotéine. Les auteurs ont conclu que l'apo AI et l'apo AIV présentes dans le plasma sous forme libre contrôlent la fixation des HDL sur les cellules endothéliales et peuvent réguler le phénomène de l'efflux du cholestérol provoqué par les HDL. Cependant l'efflux de

cholestérol demande des complexes (apolipoprotéines/phospholipides) ; les apolipoprotéines libres ne provoquent pas d'efflux sauf quand elles sont insérées dans des liposomes.

Toutefois, il n'est pas encore démontré de façon évidente si l'efflux de cholestérol provoqué par l'apo AIV demande une interaction spécifique de protéine-protéine, comme ce qui a été prouvé pour l'apo AI (166).

VI - RECEPTEUR AUX APOLIPOPROTEINES AI/AII DES CELLULES ADIPEUSES (ob 17)

Le ou les récepteurs aux HDL contrairement au récepteur au LDL, peuvent être trouvés dans différents types cellulaires, avec des conséquences fonctionnelles différentes.

L'interaction HDL-récepteurs a été étudiée dans différents types de tissus :

- tissus stéroïdiens : les HDL apportent du cholestérol pour le métabolisme cellulaire ;
- tissus périphériques : les HDL sont responsables du transport "reverse" du cholestérol ;
- cellules hépatiques : Les HDL apportent le cholestérol en vue de sa dégradation.

Après traitement au tétranitrométhane (TNM), la liaison des HDL aux cellules musculaires lisses, aux fibroblastes et aux hépatocytes est significativement réduite (160). L'efflux de cholestérol des fibroblastes est également diminué. Le TNM modifie les résidus tyrosine des HDL par nitration, sans modifier de façon importante leurs propriétés physiques et altère la reconnaissance du ligand par le récepteur. L'hypothèse selon laquelle l'association des HDL aux cellules serait due à une interaction entre lipides cellulaires de surface et lipides de surface des HDL (162) est incompatible et ne peut expliquer ces résultats.

Bien que le tissu adipeux ne soit pas impliqué dans la formation de plaques d'athéromes, il paraît être privilégié pour étudier la mobilisation du cholestérol. Les cellules adipeuses isolées du tissu adipeux ont une viabilité n'exédant pas quelques heures, empêchant toute étude et toute réponse à long terme. Cependant, l'équipe du Professeur Ailhaud (161) a mis au point des cultures de cellules préadipocytaires de souris en lignée établie et ce type de cellules paraît être un bon modèle pour l'étude du métabolisme du cholestérol sur les cellules adipeuses. Ces auteurs ont montré que les cellules adipeuses ob 17 possèdent des sites

récepteurs de LDL reconnaissant l'apo B, distincts des sites récepteurs reconnaissant les apolipoprotéines AI et AII. Les cellules adipeuses ne présentent pas d'autorégulation de leur nombre de récepteurs aux LDL et sont aptes à accumuler du cholestérol et à le mobiliser. Ces cellules, exposées aux LDL, accumulent du cholestérol en fonction du temps, avec un plateau entre 24 et 48 heures. Ces mêmes cellules se déchargent par exposition aux HDL₃ pour revenir à une concentration en cholestérol intra-cellulaire identique à celle des cellules témoins (163). Dans un travail récent, rapporté par Barbaras et coll. (164), des cellules préadipocytaires de souris ob 1771, préalablement chargées en cholestérol après exposition au LDL, sont exposées à l'apo AI ou à l'apo AII insérées dans des liposomes artificiels. L'apo AI est capable de provoquer un efflux de cholestérol, alors qu'aucune activité n'est observée en présence de l'apo AII qui, au contraire, se comporte comme antagoniste puisque sa présence, en même temps que l'apo AI, entraîne la réduction de l'efflux produit par cette apolipoprotéine. Barbaras et coll. (165) ont montré récemment que l'incubation in vitro de la Lp AI:AII avec des cellules adipeuses de la lignée ob 1771, ne provoque pas d'efflux de cholestérol, alors que l'incubation de la Lp AI avec ces cellules provoque l'efflux.

La collaboration de notre équipe avec celle du Professeur Ailhaud a permis de prouver l'existence du récepteur apo AI/AII (166) et de le purifier 1400 fois à partir de membranes d'adipocytes de souris (167). Après pontage covalent artificiel de l'apolipoprotéine AI avec le récepteur, les membranes cellulaires sont solubilisées. Les protéines sont ensuite chromatographiées par colonne de DEAE-cellulose. La fraction éluée possédant l'activité de liaison est chromatographiée par immunoaffinité. Le récepteur apo AI/AII est retenu avec un anticorps polyclonal (ou un mélange d'anticorps monoclonaux) dirigés contre l'apo AI (ou l'apo AII). Le récepteur HDL des cellules adipeuses est une protéine de masse moléculaire 75 k.Da. Un antisérum contre cette protéine a été obtenu et des travaux sont en cours pour la séquencer.

TRAVAUX PERSONNELS
ET
CONTRIBUTIONS

CHAPITRE I

PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES : Lp AI, Lp AI:AI ET Lp AIV

Introduction

La chromatographie d'immunoaffinité, qui fait appel à des anticorps monospécifiques, apparaît être la méthode de choix pour préparer les particules lipoprotéiques. En effet, elle est facile à mettre en œuvre, elle est appropriée au fractionnement des lipoprotéines en fonction de leurs propriétés antigéniques et c'est la méthode qui permet de préserver au mieux la structure des lipoprotéines (54). Elle permet aussi la préparation de particules lipoprotéiques simples par passages successifs d'une solution de lipoprotéines sur différents immunoadsorbants.

Il est reconnu que les apolipoprotéines AI et B sont les constituants protéiques majeurs respectivement des HDL et des LDL (9). Ceci permet d'assimiler les lipoprotéines contenant l'apo AI aux lipoprotéines anti-athérogènes et les lipoprotéines contenant l'apo B aux lipoprotéines athérogènes (3, 12). Etant donné que la présence de l'apo B confère à la particule lipoprotéique son caractère "athérogène", nous avons tout d'abord éliminé les lipoprotéines contenant l'apo B par chromatographie d'immunoaffinité en utilisant un mélange d'anticorps monoclonaux reconnaissant la totalité de l'apo B. A partir de ces fractions plasmatiques ne contenant pas l'apo B, nous avons préparé les particules contenant l'apo AI et non l'apo AII (Lp AI), les particules contenant l'apo AI et l'apo AII (Lp AI:AII) et les particules contenant l'apo AIV (Lp AIV).

Grâce à la chromatographie séquentielle, nous avons pu préparer les particules lipoprotéiques : Lp AI et Lp AI:AII sans apo E (Lp AI-E, Lp AI:AII-E) ; Lp AI et Lp AI:AII avec apo E (Lp AI:E, Lp AI:AII:E) ; Lp AIV avec apo AI et sans apo AI (Lp AIV:AI, Lp AIV-AI) et les sous-populations de ces dernières selon la présence ou non d'apo E. Nous avons séparé les particules sans apo E de celles contenant l'apo E afin d'étudier leur effet sur l'efflux du cholestérol ; en effet la présence d'apo E peut permettre à la particule d'être reconnue par le récepteur apo B/E.

Matériels et méthodes

1 - PREPARATION DES IMMUNOADSORBANTS

Les anticorps anti-apo AI, anti-apo AII, anti-apo B et anti-apo E utilisés pour la préparation des immunoadsorbants, sont des anticorps monoclonaux produits chez la souris dans le Service des anticorps monoclonaux du SERLIA. Tous ces anticorps ont été caractérisés (168, 169, 170).

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par fusion des cellules de myélome non sécrétant d'immunoglobulines avec des cellules lymphoïdes immunisées contre l'apolipoprotéine. L'hybridome retient de la cellule myéломateuse l'immortalité et la capacité de proliférer in vitro. De la cellule lymphocytaire immunisée, il conserve la capacité de synthétiser l'anticorps spécifique de l'apolipoprotéine utilisée pour l'immunisation. Le clonage permet de sélectionner l'hybride sécrétant l'anticorps désiré parmi de nombreux hybridomes sécrétant les anticorps produits par la souris immunisée. L'hybridome cloné (et donc homogène) produit des quantités importantes d'anticorps tous identiques, dits monoclonaux.

Les immunoadsorbants sont préparés selon un procédé décrit par Koren (171). Le sépharose 4B est constitué de billes de 60 à 140 μm . Il permet la chromatographie du plasma. Le gel préactivé au Bromure de Cyanogène (BrCN) (Pharmacia) est mis à gonfler dans l'HCl 10^{-3} M, puis lavé plusieurs fois avec cette solution pour éliminer les agents protecteurs. Le gel est ensuite lavé par le tampon de couplage NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 8,3. Les anticorps anti-apolipoprotéine, préalablement dialysés contre le tampon de couplage, sont mis en contact avec le gel et sous agitation lente pendant une nuit à 4°C. Les anticorps sont couplés à 5 mg par 1 g de gel sec. A la fin du couplage, les sites réactifs restants du gel sont bloqués avec l'éthanolamine 1 M pH = 8. Le produit est ensuite lavé plusieurs fois avec le tampon de couplage et un tampon de désorption, acétate de sodium 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 8. Le gel est coulé à un débit de 20 ml/h dans une colonne (Pharmacia) de 1,6 cm de diamètre intérieur et de 20 cm de

hauteur, en utilisant une pompe péristaltique. Le gel est lavé avec du PBS 0,1 M contenant NaN_3 (azide de sodium) et EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) à 0,01 %.

1 a - IMMUNOADSORBANT ANTI-APO B, ANTI-APO AI, ANAI-APO AII et ANTI-APO E

Ces immunoadsorbants sont préparés avec les anticorps monoclonaux anti-apo B (B₀₂, B₀₄, B₀₆, B₀₇), anti-apo AI (A₀₅, A₁₇, A₃₀), anti-apo AII (G₀₅, G₀₃, G₁₁) et anti-apo E (E₀₁) produits chez la souris dans le service des anticorps monoclonaux du SERLIA.

1 b - IMMUNOADSORBANT ANTI-APO AIV

L'immunoadsorbant anti-apo AIV est préparé avec des anticorps polyclonaux produits chez le lapin.

Préparation d'un immunosérum anti-apo AIV

L'immunosérum est préparé selon la méthode de Vaitukaitus (172). Un mélange constitué de 0,5 mg d'apo AIV pure, de 0,5 ml de sérum physiologique et de 0,5 ml d'adjuvant de Freud a été injecté par piqûres de 40 points sur le dos d'un lapin préalablement rasé. Après 2 semaines, un rappel a été fait par injections intramusculaires de 0,5 mg d'apo AIV. 4 semaines après la première immunisation, un test a été réalisé et l'immunosérum est récupéré au bout de la 6^{ème} semaine.

Précipitation des immunoglobulines au sulfate d'ammonium

Nous avons préféré travailler avec les immunoglobulines isolées par précipitation au sulfate d'ammonium (40 %) plutôt qu'avec l'antisérum total, ceci pour éliminer la plus grande partie des protéines sériques, afin de minimiser les adsorptions non spécifiques et prolonger la durée de vie de la colonne d'affinité (colonne anti-apo AIV).

Purification des anticorps anti-apo AIV

Afin d'obtenir une grande pureté des particules contenant l'apo AIV, il était nécessaire de séparer les immunoglobulines spécifiques des apo AIV des autres immunoglobulines non immunes du lapin. Pour cela nous avons fait appel à la chromatographie d'immunoaffinité sur sépharose 4B (173) activé au bromure de cyanogène, utilisant l'apo AIV comme ligand.

2 - COLONNE DE SEPHADEX G 25 COARSE

Nous avons utilisé le séphadex G 25 Coarse pour séparer les lipoprotéines de l'agent éluant (NaSCN 3 M). Ce gel est préparé par réticulation du dextran avec l'épichloridrine. La taille des particules, assez importante, (100 à 300 μ m) permet un débit relativement important. Dans ce gel, les molécules de masse moléculaire supérieure à 5 k.Da sont exclues. Les lipoprotéines ne pénètrent donc pas dans le gel. L'effet de gel filtration permet de séparer les lipoprotéines de leur éluant (NaSCN qui entre dans les billes du gel) lors de l'élution de la fraction retenue. 20 g de gel sont mis à gonfler pendant 3 heures dans l'eau distillée puis lavés sur verre fritté (n° 3) à l'eau distillée. Le gel est ensuite coulé dans une colonne de 2,6 cm de diamètre intérieur et de 40 cm de hauteur, puis lavé avec du PBS 0,1 M.

3 - PRELEVEMENTS SANGUINS ET DU LIQUIDE INTERSTITIEL

Les échantillons sanguins ont été obtenus chez des sujets masculins normolipémiques volontaires (âge moyen 32 ans) de notre laboratoire. Au moment du prélèvement, les sujets étaient à jeûn depuis plus de 12 heures. Le sang a été recueilli sur tube plongé dans de la glace pilée et contenant un mélange de conservateurs, d'antiprotéases et d'EDTA (fiche technique n° 1). Après centrifugation à 3000 trs/mn à 4°C et pendant 15 mn, le plasma a été séparé des éléments cellulaires et utilisé immédiatement pour la purification des particules lipoprotéiques après addition de la benzamidine et du PMSF à 1 mM (concentration finale).

Le liquide interstitiel est obtenu selon la technique de Küstala (174) par succion douce sur la peau de l'avant-bras chez des sujets ne présentant pas d'athérosclérose coronarienne. L'opération dure environ 3 heures et le volume du liquide interstitiel récupéré est approximativement de 500 μ l.

4 - DETERMINATION DE LA CAPACITE DES IMMUNOADSORBANTS

Pour déterminer la capacité des immunoadsorbants, nous avons procédé de la façon suivante :

20 ml de plasma des sujets normolipémiques ont été chromatographiés sur les immunoadsorbants à un débit faible, 10 ml/h. Les immunoadsorbants ont alors été lavés avec du PBS 0,1 M contenant l'azide de sodium et l'EDTA à 0,01 % pH 7,4 jusqu'à obtention d'une densité optique nulle. Un deuxième lavage est effectué sur la colonne avec une solution de NaCl 0,5 M pH 7,4 afin d'éliminer les protéines de fixation non spécifiques.

Les lipoprotéines retenues ont été éluées par 30 ml de thiocyanate (NaSCN) 3 M passés sur chaque immunoadsorbant. Nous utilisons le NaSCN 3 M puisqu'il nous est apparu comme étant l'éluant le plus puissant et ceci correspond aussi aux constatations d'autres auteurs (66, 75). Les éluats des colonnes sont passés directement sur la colonne de séphadex G 25 - Coarse, branchée à la sortie de l'immunoadsorbant, pour éviter l'interaction prolongée de NaSCN 3 M avec les lipoprotéines éluées. Par ce procédé, les lipoprotéines sont séparées du NaSCN dans le gel de Séphadex immédiatement après avoir été dissociées de l'immunoadsorbant puis dialysées contre du PBS 0,1 M. Les immunoadsorbants sont ensuite rééquilibrés avec du PBS.

La capacité des immunoadsorbants est déterminée par un dosage immunoenzymatique des apolipoprotéines des différentes fractions retenues par les immunoadsorbants diluées dans un tampon PBS 0,1 M, contenant 1 g de sérum albumine bovine (SAB)/100 ml. Nous travaillons habituellement aux 3/4 de la capacité des

immunoabsorbants.

5 - PREPARATION DES HDL₂ ET DES HDL₃

Les HDL₂ et les HDL₃ sont préparées par ultracentrifugation séquentielle entre les densités 1,063 et 1,125 pour les HDL₂ et les densités 1,125 et 1,21 pour les HDL₃ (fiches techniques 6 et 7).

6 - FRACTION PLASMATIQUE DEPOURVUE D'APOLIPOPROTEINE B

6 à 8 ml de plasma frais ont été chromatographiés sur la colonne anti-apo B à un débit faible, 10 ml/h. La colonne a été lavée avec du PBS jusqu'à obtention d'une densité optique nulle. La fraction non spécifique est éluée par un simple lavage avec une solution de NaCl 0,5 M pH 7,4. La colonne est ensuite rééquilibrée en tampon PBS. La fraction retenue est éluée avec 40 ml de NaSCN 3 M à un débit de 50 ml/h.

Nous avons gardé un aliquot de la fraction non retenue par la colonne anti-apo B pour le dosage des apolipoprotéines. Le reste est divisé en 3 fractions de même volume pour la préparation des lipoprotéines retenues par les immunoabsorbants anti-apo AI, anti-apo AII et anti-apo AIV.

7 - LIPOPROTEINES RETENUES PAR LES IMMUNOABSORBANTS ANTI-APO AI, ANTI-APO AII ET ANTI-APO AIV (figure 11)

Les 3 fractions ont été chromatographiées respectivement sur l'immunoabsorbant anti-apo AI, anti-apo AII et anti-apo AIV. La fraction retenue par chaque immunoabsorbant a été éluée avec 30 ml de NaSCN.

8 - PARTICULES LIPOPROTEIQUES

Les particules lipoprotéiques ont été préparées à partir du

plasma de 3 autres sujets masculins normolipémiques (âge 38, 28 et 29 ans). Les fractions retenues par les immunoabsorbants anti-apo AI, anti-apo AII et anti-apo AIV ont été préparées comme précédemment mais à partir de 17 ml de plasma (figure 11).

8 a - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AI ET NON
L'APO AII : Lp AI

Pour éliminer les lipoprotéines contenant l'apo AII, la fraction retenue par l'immunoabsorbant anti-apo AI est chromatographiée sur l'immunoabsorbant anti-apo AII. La fraction non retenue et ne contenant pas l'apo AII correspond à la Lp AI.

8 b - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AI ET
L'APO AII : Lp AI:AII

Pour éliminer les lipoprotéines contenant l'apo AII et non l'apo AI, la fraction retenue par l'immunoabsorbant anti-apo AII est chromatographiée sur l'immunoabsorbant anti-apo AI. La fraction retenue correspond à la Lp AI:AII.

8 c - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AIV : Lp AIV

Les particules lipoprotéiques contenant l'apo AIV représentent la fraction retenue par la colonne anti-apo AIV.

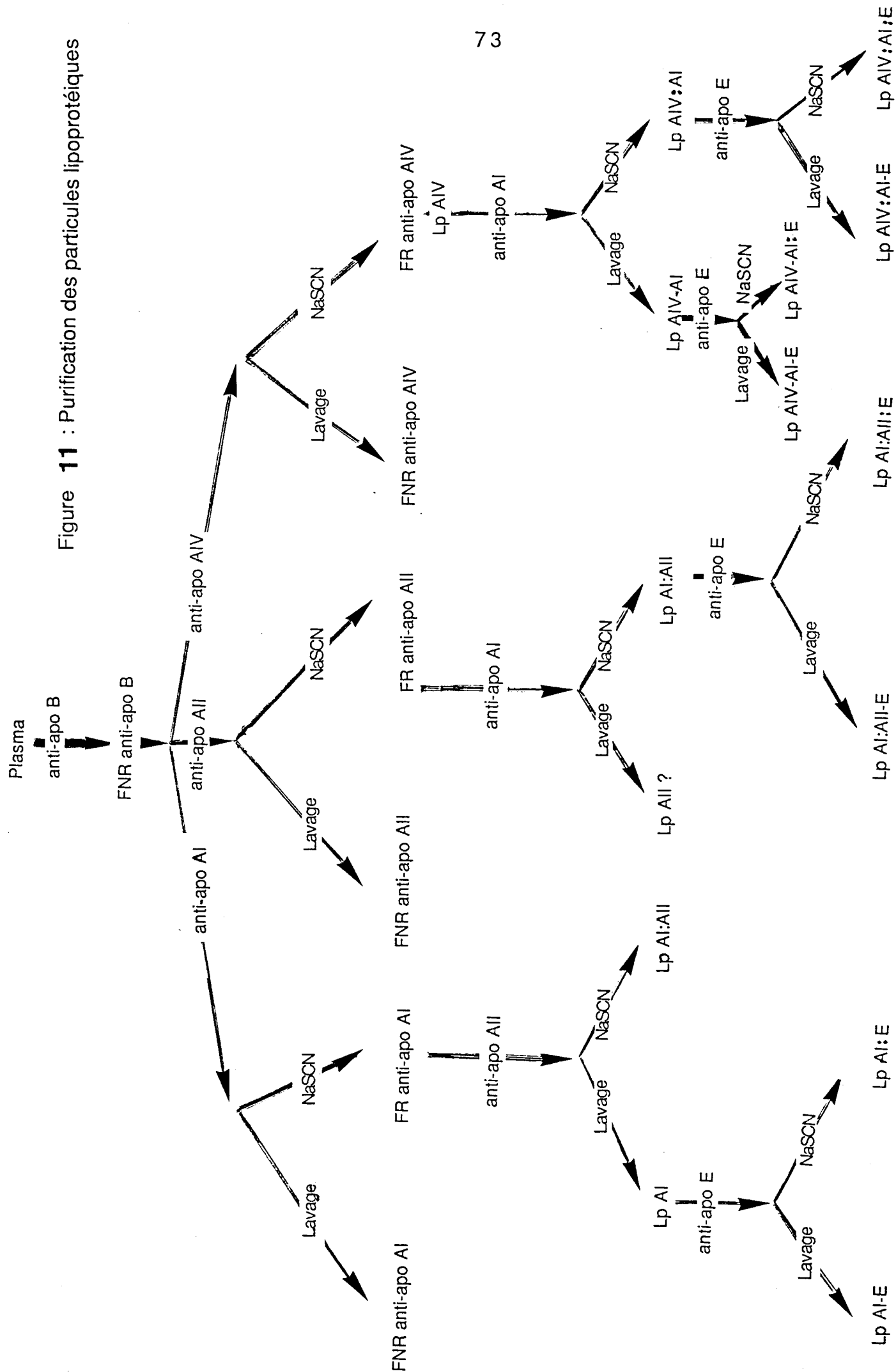
8 d - Lp AIV AVEC OU SANS APO AI : Lp AIV:AI, Lp AIV-AI

Les particules lipoprotéiques contenant l'apo AIV sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AI. Les particules non retenues par cet immunoabsorbant et ne contenant pas l'apo AI correspondent aux Lp AIV-AI. Les particules retenues correspondent aux Lp AIV:AI.

8 e - PARTICULES LIPOPROTEIQUES AVEC OU SANS APO E

Les particules lipoprotéiques préparées précédemment sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo E pour la

Figure 11 : Purification des particules lipoprotéiques



préparation des particules avec ou sans apo E.

9 - DOSAGE DES PROTEINES

La concentration en protéines des lipoprotéines et des particules lipoprotéiques isolées a été déterminée par la méthode de Lowry (175) (fiche technique n° 2) en utilisant comme étalon la sérum albumine bovine (SAB) (Sigma Chemical Co).

10 - DOSAGE DES LIPIDES

10 a - LIPIDES TOTAUX

Le cholestérol (176), les triglycérides (177) et les phospholipides (178) des lipoprotéines et des particules lipoprotéiques ont été dosés par des méthodes enzymatiques adaptées sur analyseur centrifuge. (cholestérol et triglycérides : kits Bøhringer Mannheim, phospholipides : kit BioMérieux).

10 b - ANALYSE DES ACIDES GRAS

L'analyse des acides gras des différentes classes de lipides est faite de la façon suivante :

Les lipides des particules lipoprotéiques sont extraits par la méthode de Folch (fiche technique n° 13), puis séparés par chromatographie sur couche mince, et soumis ensuite à une transméthylation. Les esters méthyliques sont repris par 15 μ l d'hexane et 0,3 μ l sont injectés sur une colonne CP Sil 88 (Cyanopropyl-polysiloxane). Le chromatographe utilisé est de type Varian 6000 (USA), équipé d'un détecteur à ionization de flamme. L'analyse s'effectue à 195°C avec une pression d'azote de 1 kg/cm².

Identification des acides gras :

Les temps de rétention des pics inconnus sont comparés avec ceux obtenus par les esters méthyliques d'acides gras témoins

commerciaux. Les proportions relatives des différents acides gras sont exprimées en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus.

10 c - ANALYSE DES DIFFERENTES CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

La séparation des phospholipides a été faite par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de gel de silice en gradient discontinu d'humidité (179). Les différentes classes de phospholipides sont récupérées comme indiqué dans la fiche technique n° 12. La densité optique est lue à 310 nm.

11 - DOSAGE DES APOLIPOPROTEINES

Le dosage des apolipoprotéines AI, AII, AIV, B, CIII et E a été réalisé par la méthode immunoenzymatique ELISA adaptée sur microplaque. Le dosage des particules lipoprotéiques a été fait par la méthode ELISA à double détermination d'antigène

Les anticorps spécifiques d'une apolipoprotéine, fixés sur les parois d'une plaque de microtitration, retiennent les lipoprotéines qui la contiennent. L'analyse quantitative des autres apolipoprotéines présentes sur les lipoprotéines retenues est alors directement réalisée sur la plaque par addition de leurs anticorps correspondants, marqués par une enzyme (fiche technique n° 9).

12 - IMMUNODIFFUSION D'OUCHTERLONY ET ELECTROIMMUNODIFFUSION

Les analyses par double diffusion de Lp AI et Lp AI:AII ont été réalisées dans un gel d'agarose à 1 % en tampon véronal pH = 8,6. Les réactions d'identité, de partielle identité et de non identité, entre les différents antigènes ont été interprétées selon les recommandations d'Ouchterlony (180).

L'électroimmunodiffusion a été fait selon la méthode décrite par Axelsen et coll. (181). Le gel inférieur contient un anticorps polyclonal anti-apo AII et le gel supérieur contient un anticorps

polyclonal anti-apo AI. Le pic d'immunoprécipité dans le gel inférieur correspond à la Lp AI:AI_{II} et celui dans le gel supérieur correspond à la Lp AI.

13 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION ET MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La taille des particules lipoprotéiques a été déterminée par chromatographie de gel filtration et par microscopie électronique.

13 a - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION DE LA Lp AI SUR DU SEPHACRYL S 300

Après dialyse de la Lp AI contre une solution de NaCl 0,15 M, les particules sont concentrées à 2 mg/ml. Une aliquote de 2 ml a été chromatographiée sur une colonne de gel filtration à un débit de 8 ml/h. L'absorbance est mesurée à 280 nm. La colonne de gel filtration, diamètre intérieur 2,6 cm, hauteur 100 cm, contient du Séphacryl S 300 (Pharmacia) et la solution d'élution était le NaCl 0,15 M contenant de l'azide et l'EDTA à 0,1 %.

13 b - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La taille des particules lipoprotéiques a été déterminée par mesure du diamètre de 500 particules. Les particules, 0,2 à 0,4 mg/ml, ont été colorées au phosphotungstate de sodium à 1 % pH = 7. L'observation a été faite avec un microscope électronique Philips EM 420.

14 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS, IMMUNOELECTROTRANSFERT, ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

Les différentes protéines des particules lipoprotéiques ont été mises en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par immunoélectrotransfert.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SIGMA) des lipoprotéines et des particules lipoprotéiques a été effectuée en

présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et en utilisant un gradient de gel de 5 à 19 %. Dans chaque puits, nous déposons approximativement 80 à 120 μ g de protéines. Pour un gel (18 x 16 x 0,15 cm), l'électrophorèse s'effectue à 10°C à 30 mA et pendant 5 heures. Le gel est coloré pendant 1/2 heure dans la solution suivante : 0,85 g de bleu de Coomassie G250, 50 ml d'acide acétique, 250 ml d'H₂O et 250 ml de méthanol. Le gel est ensuite décoloré pendant au moins 24 h dans la solution suivante : 250 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique et 450 ml d'H₂O.

Après électrophorèse, les protéines des lipoprotéines et des particules lipoprotéiques sont transférées sur une feuille de nitrocellulose de porosité 0,45 μ m (LKB). Le transfert s'effectue pendant 30 mn à 50 V puis 90 mn à 100 V à 4°C. Les protéines sont mises en évidence par addition de leur anticorps correspondant, puis par un deuxième anticorps marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur). L'enzyme est révélée par addition du 4-chloro 1-naphtol (SIGMA) et d'eau oxygénée.

La distribution de l'apo AI et de l'apo AIV dans le plasma a été analysée en électrophorèse bidimensionnelle : 20 μ l de plasma sont déposés dans un puit (1,5 cm de longueur) de gel; le gel est coulé sur du Gelbond; le gel est constitué de 0,75 % d'agarose dans 50 mM de tampon barbital à pH = 8,6. La première dimension est faite en électrophorèse de gel d'agarose à 0°C. Elle est suivie par l'albumine colorée avec du bleu de bromophénol et arrêtée à 7,5 cm du point de dépôt. La deuxième dimension est faite en électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide avec un gradient de 2 à 15 % (18 x 16 x 0,15 cm) dans un tampon tris-glycine pH = 8,3, à 0°C et à 300 V pendant 1 heure, puis 400 V pendant 4 heures. Les protéines sont transférées sur une feuille de nitrocellulose puis révélées par la méthode immunoenzymatique contre des anticorps anti-apo AI et des anticorps anti-apo AIV.

15 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LCAT DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES

La LCAT est l'une des enzymes majeures du métabolisme des lipoprotéines. Elle est responsable de l'estérification du cholestérol. Son activité semble être importante pour le déroulement normal du transport "réverse" du cholestérol.

L'activité de la LCAT des particules lipoprotéiques est déterminée par mesure de la conversion du ^{14}C -cholestérol en ^{14}C -ester de cholestérol après leur incubation avec des protéoliposomes constitués de phosphatidyl-choline, de ^{14}C -cholestérol et d'apolipoprotéine AI. Après 14 heures d'incubation, les esters de cholestérol sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 (20 x 20 cm) (MERCK). Le gel contenant les taches correspondant au ^{14}C -cholestérol et au ^{14}C -ester de cholestérol est découpé et ensuite mis dans des fioles contenant comme liquide de scintillation le Lipofluor TM (J.T. Baker), puis la radioactivité est mesurée.

$\% \text{ d'estérification} = [\text{ester de cholestérol} / (\text{cholestérol} + \text{ester de cholestérol})] \times 100.$

L'activité de la LCAT est exprimée en $\% \text{ d'estérification}/\mu\text{g de protéines/heure}.$

Résultats et discussions

I - LIPOPROTEINES RETENUES PAR L'IMMUNOADSORBANT ANTI-APO AI, ANTI-APO AII ET ANTI-APO AIV

A - Résultats

1 - FRACTIONS PLASMATIQUES DEPOURVUES D'APO B

3 échantillons plasmatiques de 3 sujets masculins normo-lipémiques (âge 29, 28 et 37 ans) ont été chromatographiés sur l'immunoabsorbant anti-apo B. Pour minimiser les pertes, nous avons dosé les apolipoprotéines des fractions non retenues par cet immunoabsorbant avant leur concentration.

Le tableau 5 indique la moyenne des pourcentages des apolipoprotéines plasmatiques non retenues. Le pourcentage en apo AIV est déterminé uniquement pour le 1er sujet. Le pourcentage d'apo E et d'apo CIII présent dans la fraction non retenue est plus faible que celui des apolipoprotéines AI, AII et AIV. Les quantités d'apolipoprotéines non retrouvées dans la fraction non retenue sont probablement associées aux particules contenant l'apo B.

La mobilité électrophorétique de la fraction plasmatique dépourvue d'apo B est montrée sur la figure 12. Cette fraction a une mobilité électrophorétique alpha. La légère différence de mobilité peut être due à la présence des sels.

2 - LIPOPROTEINES RETENUES PAR L'IMMUNOADSORBANT ANTI-APO AI

Quand les fractions plasmatiques ne contenant pas l'apo B ont été chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AI, toutes les lipoprotéines contenant l'apo AI ont été retenues. Aucune trace d'apo AII n'a été détectée dans le lavage. De ce fait, la totalité de l'apo AII des fractions plasmatiques dépourvues d'apo B chez ces sujets est associée aux particules contenant l'apo AI.

Le tableau 6 indique la composition apolipoprotéique et

lipidique des fractions retenues par cet immunoabsorbant. Les valeurs sont corrigées par rapport à 1,25 mg/ml de protéines totales. Le rapport molaire apo AI/apo AII = 3,1 pour le 1^{er} sujet, 3,8 pour le 2^{ème} sujet et 2,8 pour le 3^{ème} sujet. Ces valeurs sont en accord avec celles du plasma total. Les lipoprotéines des 1^{er} et 2^{ème} sujets contiennent le même pourcentage de triglycérides que celui rapporté pour les HDL dans la bibliographie (1). Les lipoprotéines du 3^{ème} sujet ont plus de triglycérides que celles des autres sujets.

Le tableau 7 indique la composition en apolipoprotéines de ces lipoprotéines exprimée en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines. Les lipoprotéines sont essentiellement représentées par l'apo AI et l'apo AII. Les autres apolipoprotéines, AIV, D, E et CIII sont aussi retrouvées.

Les protéines totales représentent 63,6 % de la masse totale de ces lipoprotéines (tableau 8). Ces lipoprotéines contiennent plus de protéines que les HDL où elles représentent 47 à 52 % de la masse totale (1).

L'analyse des différentes classes de phospholipides est exprimée dans le tableau 9. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la totalité des différentes classes de phospholipides déterminées. La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus abondant.

3 - LIPOPROTEINES RETENUES PAR L'IMMUNOABSORBANT ANTI-APO AII

Après passage des fractions ne contenant pas l'apo B sur l'immunoabsorbant anti-apo AII, le lavage ne contenait aucune trace d'apo AII mais il contenait de l'apo AI. L'apo AI non retenue est associée aux particules lipoprotéiques contenant l'apo AI et non l'apo AII (Lp AI).

La composition lipidique et protéique des lipoprotéines retenues par cet immunoabsorbant est indiquée dans le tableau 6. Les valeurs sont corrigées par rapport à 1,25 mg/ml de protéines

totales. Le rapport molaire apo AI/apo AII = 2,1 pour le 1^{er} sujet, 2,3 pour le 2^{ème} sujet et 1,6 pour le 3^{ème} sujet.

Comme ce qui a été constaté pour les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI, les lipoprotéines du 3^{ème} sujet ont plus de triglycérides que celles des deux autres sujets. La quantité en triglycérides est plus élevée dans les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI que dans celles retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AII.

L'apo AI et l'apo AII constituent à elles deux 85 % de la totalité des apolipoprotéines (tableau 7).

La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus abondant dans ces lipoprotéines (tableau 9).

4 - LIPOPROTEINES RETENUES PAR L'IMMUNOABSORBANT ANTI-APO AIV

L'apo AIV constitue 76 % de la totalité des apolipoprotéines des lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AIV ; l'apo AI est représentée par 17 % (tableau 7).

La quantité de ces lipoprotéines en triglycérides est variable selon les sujets. Les triglycérides du 1^{er} sujet représentent 34 % de la masse totale des lipides et des protéines ; ceux du 2^{ème} sujet 8 % et ceux du 3^{ème} sujet 15 % (tableau 6).

Les protéines totales représentent 69 % de la masse totale de ces lipoprotéines (tableau 8).

Tableau 5 : Pourcentage des apolipoprotéines plasmatiques non retenues par l'immunoabsorbant anti-apo B

Apolipoprotéines	Apo AI	Apo AII	Apo E	Apo CIII	Apo AIV
Pourcentage	99,1	91,7	64,6	51,9	93,4 *
±	±	±	±	±	
Ecart-type	0,2	7,3	19,2	17,6	

* : Une seule détermination

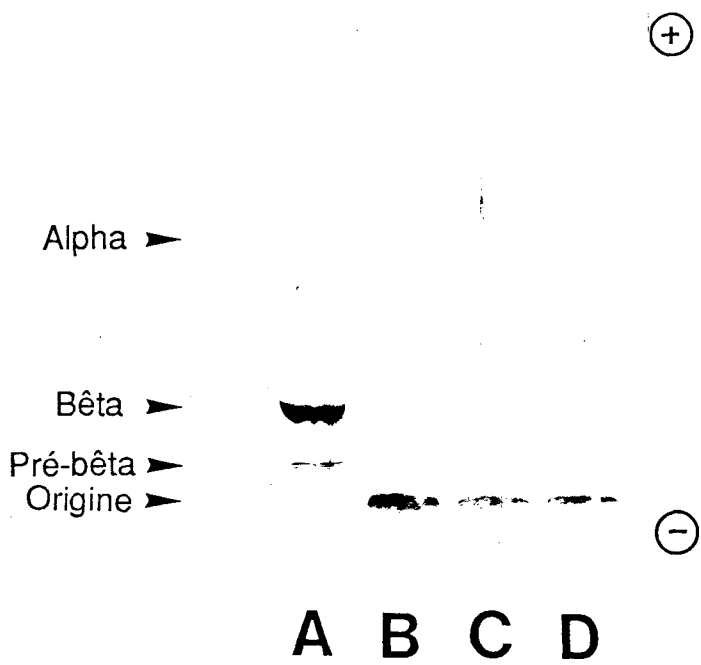


Figure 12: Mobilité électrophorétique

- A : Plasma
- B : Lipoprotéines non retenues par la colonne anti-apo B
- C : Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI
- D : Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AII

Tableau 6 : Composition lipidique et protéique des lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI, anti-apo AII, anti-apo AIV

		Apo AI	Apo AII	Apo AIV	Apo D	Apo E	Apo CIII	Cholestérol	Triglycérides	Phospholipides	Protéines
		mg/ml									
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI	Sujet 1	0,611	0,119	0,005	0,092	0,009	-	0,128	0,053	0,257	1,25
	Sujet 2	0,58	0,094	trace	0,011	0,003	0,011	0,181	0,025	0,308	1,25
	Sujet 3	0,757	0,16	-	-	0,024	0,019	0,363	0,262	0,567	1,25
	Moyenne	0,649	0,124	0,005	0,052	0,012	0,015	0,224	0,113	0,377	1,25
	± écart type	± 0,094	± 0,033		± 0,057	± 0,01	± 0,005	± 0,123	± 0,129	± 0,166	
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AII	Sujet 1	0,147	0,043	0,04	0,019	0,003	-	0,086	0,031	0,17	1,25
	Sujet 2	0,282	0,075	0,064	0,01	0,003	0,003	0,156	0,024	0,268	1,25
	Sujet 3	0,595	0,226	-	-	0,003	0,018	0,257	0,119	0,436	1,25
	Moyenne	0,341	0,115	0,052	0,0145	0,003	0,0105	0,166	0,058	0,291	1,25
	± écart type	± 0,229	± 0,097	± 0,016	± 0,006	± 0	± 0,0106	± 0,086	± 0,052	± 0,19	
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AIV	Sujet 1	0,012	0,003	0,043	trace	0,004	-	0,052	0,726	0,088	1,25
	Sujet 2	0,038	0,007	0,184	trace	0,004	0,002	0,068	0,124	0,087	1,25
	Sujet 3	-	-	-	trace	-	0,002	0,111	0,277	0,165	1,25
	Moyenne	0,025	0,005	0,1135		0,004	0,002	0,077	0,376	0,113	1,25
	± écart type	± 0,018	± 0,002	± 0,099		± 0	± 0	± 0,03	± 0,313	± 0,044	

- : Non déterminé

Tableau 7 : Composition en apolipoprotéines des lipoprotéines exprimée en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines

	Apo AI	Apo AII	Apo AIV	Apo D	Apo E	Apo CIII
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI	75,8	14,5	0,6	6	1,4	1,7
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AII	63,6	21,5	9,7	2,7	0,56	1,9
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AIV	16,7	3,3	75,9	trace	2,7	1,3

Tableau 8 : Composition lipidique et protéique des lipoprotéines exprimée en mg pour 100 mg de lipides et de protéines

	Cholestérol	Triglycérides	Phospholipides	Protéines
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI	11.4	5.8	19.2	63.6
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AII	9.4	3.3	16.5	70.8
Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AIV	4.3	20.7	6.2	68.8

Tableau 9 : Analyse des différentes classes de phospholipides

		Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AI	Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AII	Lipoprotéines retenues par la colonne anti-apo AIV
%	Sujet			
Sphingomyéline	1	17.17	0.45	9
	2	18.49	15.26	*
Phosphatidyl- Choline	1	38.2	38.9	3.15
	2	72.5	64.79	*
Phosphatidyl- Inositol+Sérine	1	-	9.05	22.97
	2	7.7	10.8	*
Phosphatidyl- Ethanolamine	1	17.7	30.55	45.5
	2	-	9.15	*
Acide phosphatidique	1	8.5	21.04	19.38
	2	1.23	-	*
Phosphatidyl- glycérol	1	17.9	-	
	2	-	-	*

* : Non déterminé

- : Valeur nulle

B - Discussion

Le pourcentage des apolipoprotéines non retrouvées dans les fractions plasmatiques dépourvues d'apo B pourrait représenter les apolipoprotéines associées aux particules contenant l'apo B. Nous avons trouvé que 65 % d'apo E plasmatique ne sont pas retenus par l'immunoabsorbant anti-apo B. Cheung et Albers (66) ont rapporté que 69 % d'apo E plasmatique sont associés aux particules contenant l'apo AI. Castro et Fielding (54) avaient rapporté que chacun des immunoabsorbants anti-apo AI et anti-apo B retient approximativement la moitié de l'apo E plasmatique des sujets normolipémiques. Ces auteurs ont conclu que chez les sujets normaux la totalité de l'apo E plasmatique est associée aux lipoprotéines contenant principalement l'apo AI ou l'apo B. Les fractions plasmatiques ne contenant pas de l'apo B contiennent 52 % d'apo CIII plasmatique. Le reste pourrait être associé aux particules contenant de l'apo B. Il a été rapporté que 53 % d'apo CIII plasmatique sont présents dans les lipoprotéines dépourvues d'apo B (9). 92 % d'apo AII ne sont pas retenus par l'immunoabsorbant anti-apo B. Le pourcentage de l'apo AIV est déterminé uniquement pour le 1^{er} sujet ; 7 % d'apo AIV ne sont pas retrouvés dans les lipoprotéines ne contenant pas l'apo B. Ghiselli et coll. (141) ont rapporté que 8 % d'apo AIV plasmatique des sujets normolipémiques sont associés aux lipoprotéines de basse et de très basse densité.

Quand les fractions plasmatiques dépourvues d'apo B des 3 sujets ont été chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AI, nous n'avons détecté aucune trace d'apo AII dans le produit de lavage. L'apo AII a toujours été trouvée associée à l'apo AI, à l'exception des travaux rapportés par März et Groß (78) et Alaupovic et coll. (77) qui ont montré l'existence de particules contenant l'apo AII et non l'apo AI dans le plasma des sujets normolipémiques. Nous pouvons conclure à l'absence de la Lp AII dans les fractions plasmatiques dépourvues d'apo B de ces sujets. 99 % et 92 %, respectivement d'apo AI et d'apo AII totales plasmatiques ne sont pas retenues par l'immunoabsorbant anti-apo B. Ces résultats pourraient être en faveur de l'existence

des particules Lp AII:B décrites par Alaupovic et coll. (77). Une telle supposition pourrait être affirmée par l'absence de l'apo AI et la présence de l'apo AII dans la fraction retenue par l'immunoabsorbant anti-apo B.

L'apo AI et l'apo AII constituent à elles deux 90 % et 85 % de la totalité des apolipoprotéines, respectivement des lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI et celles retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AII. Les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI n'ont pas le même rapport molaire apo AI/apo AII que celles retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AII. En moyenne, les premières ont un rapport molaire égal à 3, reflétant celui du plasma total, alors que les autres ont un rapport molaire égal à 2. L'apo AIV représente 78 % de la totalité des apolipoprotéines des lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AIV. Dans ces lipoprotéines, l'apo AI est représentée par 17 %. Les lipoprotéines contenant à la fois l'apo AIV et l'apo AI pourraient représenter les particules lipoprotéiques associées aux HDL (137).

Les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI ou anti-apo AII contiennent plus de protéines que les HDL où elles représentent 47 à 52 % de la masse totale (1). Mc Vicar et coll. (55) ont préparé des lipoprotéines contenant l'apo AI par immunoaffinité sélective ; ces lipoprotéines contiennent 66,5 % de protéines par rapport à la masse totale des lipides et des protéines (tableau 3). Les particules lipoprotéiques (Lp AI) préparées par Kunitake et coll. (70) contiennent 66 % de protéines. Van Toll (108) a rapporté que la Lp AI et la Lp AI:AII contiennent plus de protéines que les HDL₂ et les HDL₃ respectivement. En électrophorèse en gel de polyacrylamide (les profils électrophorétiques ne sont pas rapportés ici), ces lipoprotéines contiennent d'autres bandes protéiques normalement absentes dans les HDL. Parmi ces bandes, nous avons caractérisé la protéine riche en proline (PRP).

La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus abondant

dans les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI et dans les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AII. En effet, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline (182, 183) représentent respectivement 70 à 80 % et 10 à 15 % de la totalité des différentes classes des phospholipides des HDL. Pour les lipoprotéines retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AIV, le dosage des différentes classes de phospholipides n'a été fait que sur le premier sujet. La faible quantité de ces lipoprotéines ne nous a pas permis de faire de telles analyses. Dans ces lipoprotéines et pour le sujet 1, la phosphatidyléthanolamine représente 45,5 % de la totalité des phospholipides.

II - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AI ET NON L'APO AII (Lp AI) ET PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AI ET L'APO AII (Lp AI:AII)

1 - LpAI ET LpAI:AII PREPAREES A PARTIR DES FRACTIONS PLASMATIQUES DEPOURVUES D'APO B

3 fractions lipoprotéiques de 3 sujets masculins normolipémiques dépourvues d'apo B et qui ont été retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AI, sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AII. Les lipoprotéines non retenues et ne contenant pas l'apo AII correspondent aux particules Lp AI. 3 autres fractions lipoprotéiques de ces mêmes sujets ne contenant pas l'apo B mais retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AII sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AI. Les lipoprotéines retenues correspondent aux particules Lp AI:AII. Les particules contenant ou non l'apo E ont été obtenues par chromatographie des Lp AI et des Lp AI:AII sur l'immunoabsorbant anti-apo E (figure 11).

A - Résultats

a - Analyse par double diffusion d'Ouchterlony et par électroimmunodiffusion à double phase des particules Lp AI et Lp AI:AII

L'électroimmunodiffusion à double phase (figure 13) montre un pic de précipitation de la Lp AI dans la partie supérieure du gel contenant un anticorps polyclonal anti-apo AI et un pic de précipitation de la Lp AI:AII dans la partie inférieure du gel contenant un anticorps polyclonal anti-apo AII.

En immunodiffusion d'Ouchterlony (figure 13), la Lp AI montre un arc de précipitation contre l'anticorps anti-apo AI et l'absence de précipitation contre l'anticorps anti-apo AII. La Lp AI:AII montre une identité complète contre les anticorps anti-apo AI et anti-apo AII, indiquant la présence des deux apolipoprotéines AI et AII sur la même particule.

b - Composition lipidique et protéique des particules lipoprotéiques

1 - Lipides totaux des Lp AI, Lp AI-E et Lp AI:E

Les résultats sont reportés dans la figure 14. Les Lp AI sont représentées par 62 % de protéines et 38 % de lipides ce qui leur donne un rapport lipides/protéines = 0,61. Les triglycérides constituent $4,1 \pm 1,2$ % de la masse totale des Lp AI, les phospholipides $22,9 \pm 2,1$ % et le cholestérol total $10,9 \pm 4,1$ %. Les Lp AI:E contiennent plus de triglycérides et moins de protéines que les Lp AI-E. Les triglycérides constituent $17,5 \pm 5,95$ % et $4,84 \pm 0,68$ % respectivement de la masse totale des Lp AI:E et de la masse totale des Lp AI-E. Les protéines constituent $55,86 \pm 6,17$ % et $68,8 \pm 2,61$ % respectivement de la masse totale des Lp AI:E et de la masse totale des Lp AI-E. Le rapport lipides/protéines des Lp AI:E = 0,78 et celui des Lp AI-E = 0,45.

2 - Lipides totaux des Lp AI:AI, Lp AI:AI-E et Lp AI:AI:E

Les résultats sont reportés dans la figure 15. Les Lp AI:AI sont représentées par 65,8 % de protéines et 34,2 % de lipides. Les triglycérides constituent $3,8 \pm 1,3$ % de la masse totale des Lp AI:AI, les phospholipides $19,2 \pm 4,9$ % et le cholestérol total $11 \pm 2,7$ %. Les Lp AI:AI:E contiennent moins de cholestérol total et de phospholipides et plus de triglycérides et de protéines que les Lp AI:AI-E.

3 - Analyse des phospholipides et des acides gras

L'analyse des phospholipides est indiquée dans le tableau 10. Après séparation des phospholipides sur couche mince, nous n'avons récupéré que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, car ce sont les phospholipides majeurs des HDL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la densité optique lue à 310 nm de chacun d'entre eux, par rapport à la somme de leur densité

optique. Le rapport phosphatidylcholine/sphingomyéline est plus élevé dans les Lp AI que dans les Lp AI:AII, et dans les Lp AI-E que dans les Lp AI:AII-E. Cette composition chimique pourrait être en faveur de l'effet anti-athérogène accordé à la Lp AI et non à la Lp AI:AII (165). En effet, le cholestérol possède un grand degré de solubilité dans la phosphatidylcholine (187).

Les proportions relatives des différents acides gras de la Lp AI:AII-E et de la Lp AI-E sont exprimées dans les figures 16a et 16b. Cette analyse est faite chez un seul sujet. Les résultats sont exprimés en pourcentage des surfaces de chaque pic après chromatographie en phase gaz par rapport à la surface totale des pics retenus. Les acides gras polyinsaturés des phospholipides sont plus représentés dans la Lp AI-E que dans la Lp AI:AII-E (53,3 % contre 18,7 %).

c - Composition en apolipoprotéines des particules lipoprotéiques

1 - Lp AI, Lp AI-E et Lp AI:E

Les résultats sont reportés dans la figure 17 et exprimés en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines. Les Lp AI-E sont essentiellement constituées d'apo AI où elles représentent $98,06 \pm 1,74$ % de la masse totale des apolipoprotéines. L'apo AI représente $68,16 \pm 9,47$ % de la masse totale des apolipoprotéines des Lp AI:E et l'apo E représente $27,5 \pm 10,32$ %.

2 - Lp AI:AII, Lp AI:AII-E et Lp AI:AII:E

Les résultats sont reportés dans la figure 18 et exprimés en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines. Les Lp AI:AII:E contiennent plus d'apo AII que d'apo AI, alors que les Lp AI:AII-E contiennent plus d'apo AI que d'apo AII. Les premières particules comptent pratiquement autant d'apo AI que d'apo E ($26,9$ % contre $24,43$ %). Les apolipoprotéines AIV et CIII sont présentes en très faibles quantités.

d - Caractérisation des particules par électrophorèse en présence de SDS et par immunoélectrotransfert

Les profils électrophorétiques de la Lp AI et de la Lp AI:AII (dépôt de 60 µg de protéines pour chaque particule) (figure 19) montrent de haut en bas :

- une protéine diffuse de masse moléculaire 170 k.Da présente uniquement dans la Lp AI:AII;
- la protéine riche en proline (PRP) de masse moléculaire 74 k.Da présente dans les deux particules;
- une protéine de masse moléculaire 59 k.Da (cette protéine est plus intense dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII);
- entre l'apo AIV, qui est plus intense dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII et la protéine de 59 k.Da, il existe une protéine et plus intense dans la Lp AI:AII que dans la Lp AI;
- une protéine de 43 k.Da est plus intense dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII ; cette protéine pourrait représenter l'apo H;
- dans la région comprise entre 43 k.Da et 30 k.Da, il existe des bandes protéiques mineures. L'apo E existe dans cette région; elle a été identifiée par immunoélectrotransfert (figure 20);
- la bande protéique qui existe juste au-dessus de l'apo AI pourrait être l'apo D. Elle est reconnue grâce à sa migration large;
- l'apo AII est présente uniquement dans la Lp AI:AII ; elle est réduite par le β-Mercapto-éthanol ce qui donne une bande protéique de 8,5 k.Da;

e - Immunoélectrotransfert

Les protéines de la Lp AI et de la Lp AI:AII sont séparées en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et dans un gradient de gel allant de 5 à 19 %. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une feuille de nitrocellulose de porosité 0,45 µm, puis révélées avec des anticorps polyclonaux anti-apo CIII, anti-apo AIV et anti-PRP produits chez le lapin et

contre les anticorps monoclonaux anti-apo AII (G₀₂) et anti-apo E (E₀₁) produits chez la souris. La figure 20 montre l'existence des apolipoprotéines CIII, AIV, E, et de la protéine riche en proline dans la Lp AI et dans la Lp AI:AII et de l'apolipoprotéine AII dans la Lp AI:AII.

f - Activité de la Lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT)

L'activité de la LCAT des particules Lp AI, Lp AI:AII, Lp AI-E et Lp AI:AII-E a été déterminée en pourcentage d'estérification de cholestérol pour 100 µg de protéines et pendant 14 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés en calculant le pourcentage de l'activité de la LCAT des particules par rapport à celle de la Lp AI ou de la Lp AI-E. L'activité de la LCAT de la Lp AI:AII représente $26,5 \pm 0,7$ % de celle de la Lp AI. L'activité de la LCAT de la Lp AI:AII-E représente 27 ± 3 % de celle de la Lp AI:AII-E. [Résultats : paragraphe III ("Particules lipoprotéiques contenant l'apo AIV") (figure 30a et 30b)].

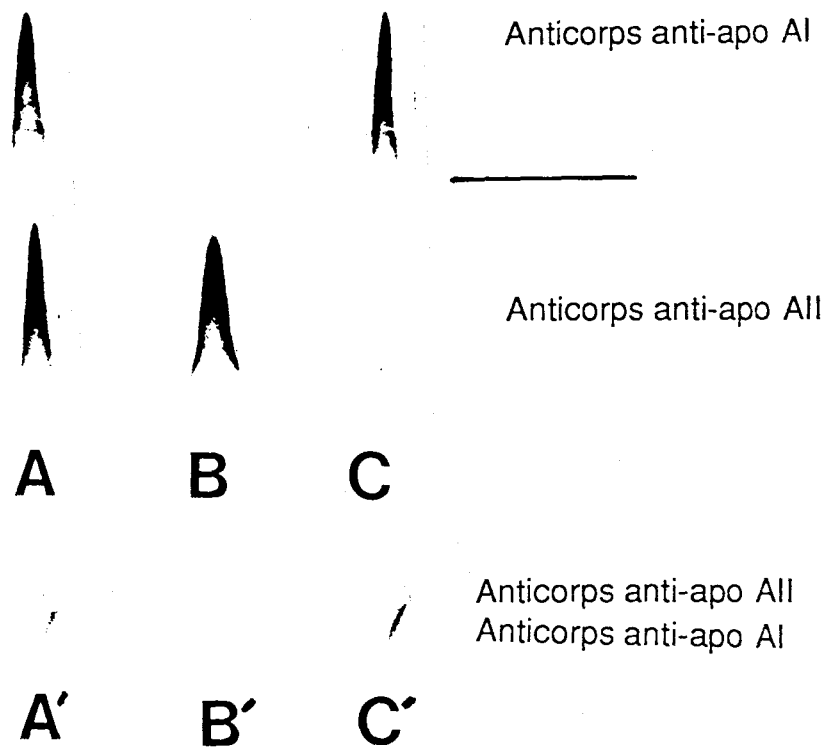


Figure 13 : Analyse par électro-immunodiffusion à double phase et par double diffusion d'Ouchterlony des particules lipoprotéiques Lp AI et Lp AI:AI

A et A' : Plasma
 B et B' : Lp AI:AI
 C et C' : Lp AI

Figure 14 : Composition lipidique et protéique des particules Lp AI, Lp AI-E et Lp AI:E exprimée en mg pour 100 mg de lipides et de protéine

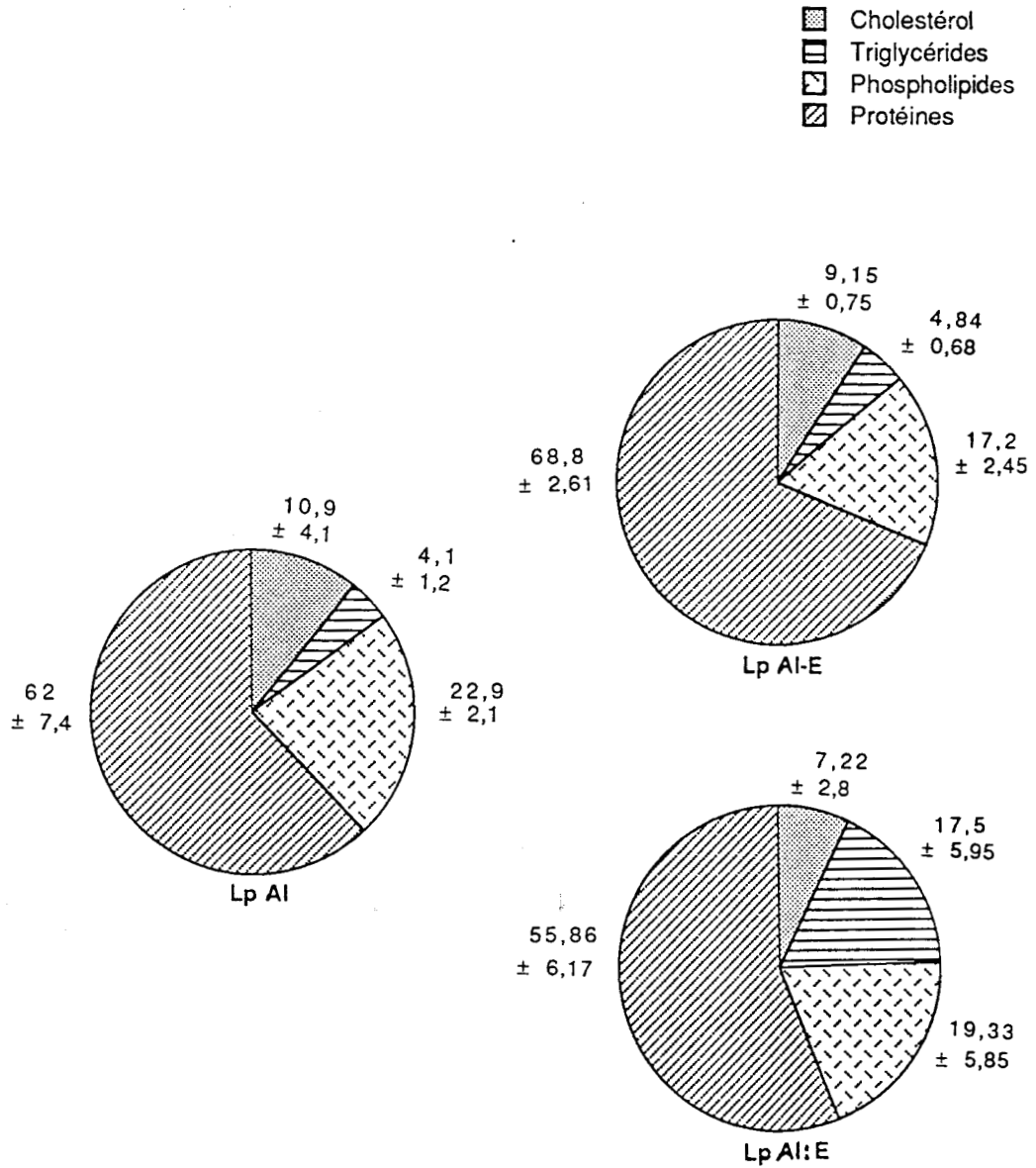


Figure 15 : Composition lipidique et protéique des particules
Lp AI:All, Lp AI:All-E et Lp AI:All:E exprimée
en mg pour 100 mg de lipides et de protéines

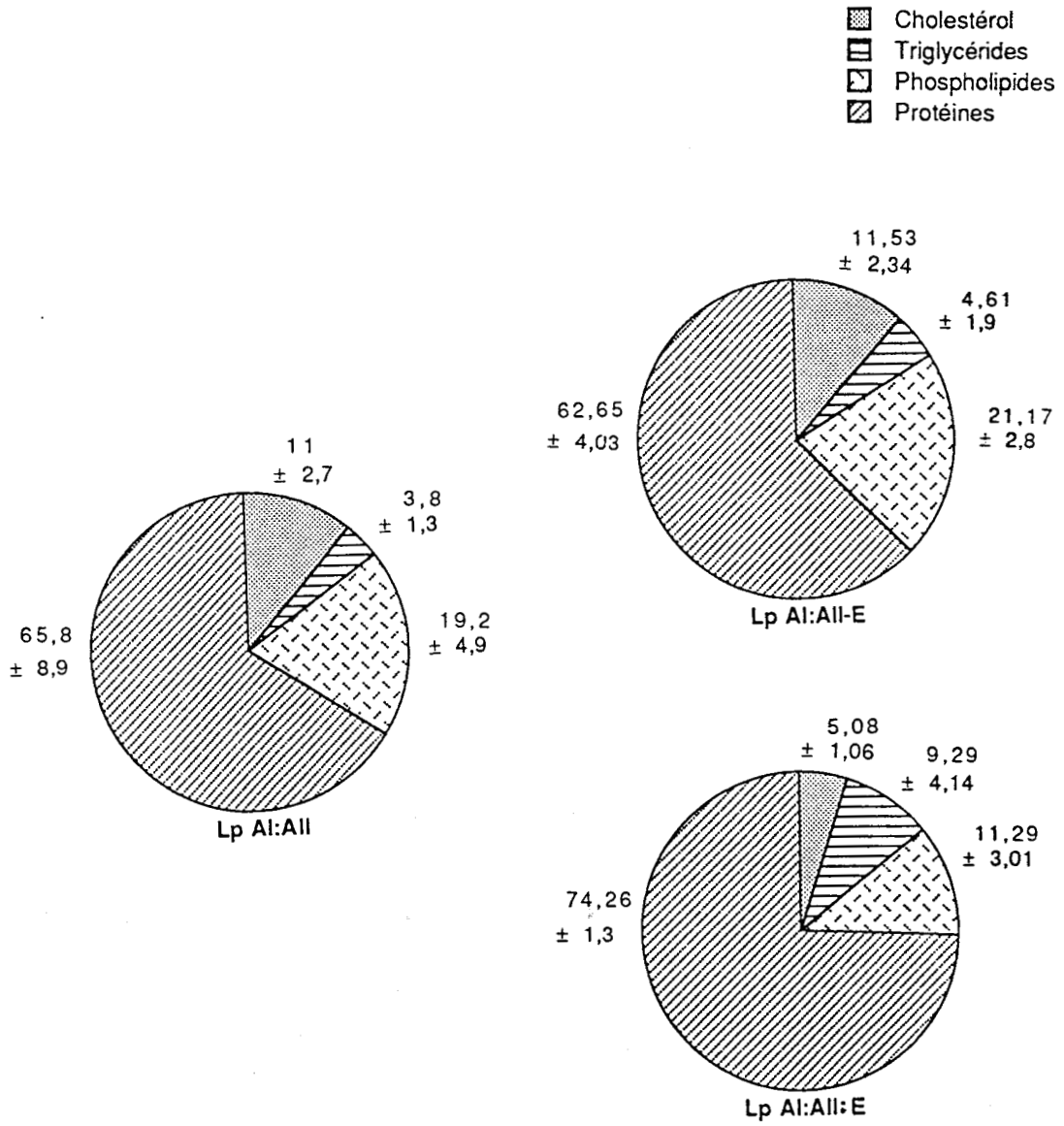


Tableau 10: Analyse des phospholipides

%	Lp AI:All	Lp AI	Lp AI:All-E	Lp AI-E
Phosphatidyl-Choline (PC)	66,1 ± 15,8	87,0 ± 15,7	78,31 ± 10,41	82,53 ± 14,0
Sphingomyéline (Sph)	33,9 ± 15,8	13,0 ± 15,7	21,69 ± 10,41	17,46 ± 14,0
PC/Sph	2,7 ± 2,3	6,5 ± 6,0	5,99 ± 5,01	24,48 ± 29,47

Figure 16 : Analyse des acides gras

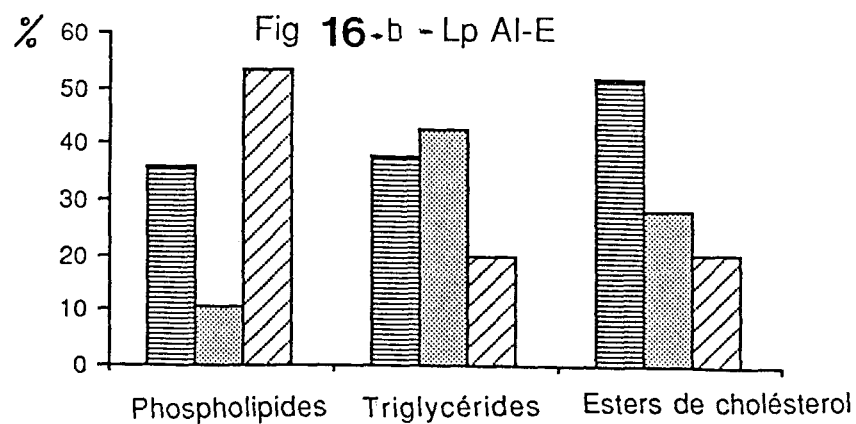
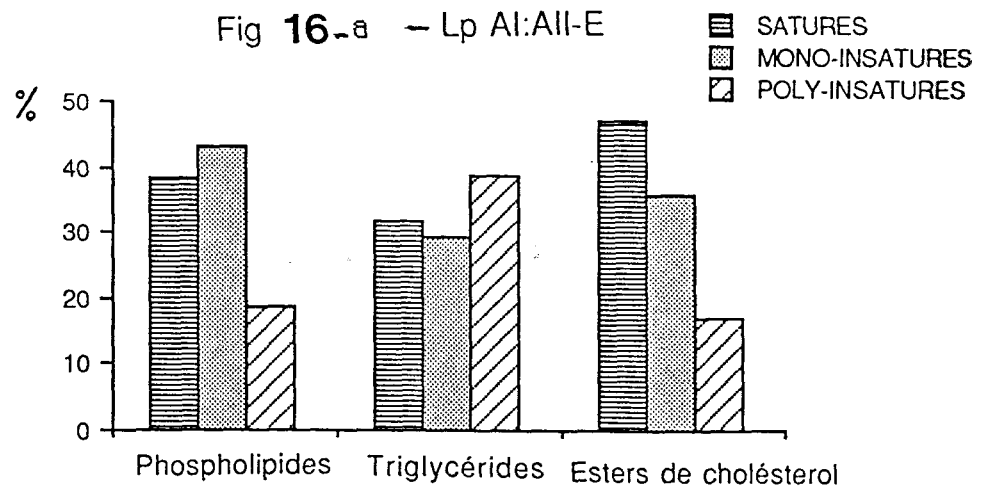


Figure 17 : Composition en apolipoprotéines des particules Lp AI, Lp AI-E et Lp AI:E exprimée en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines

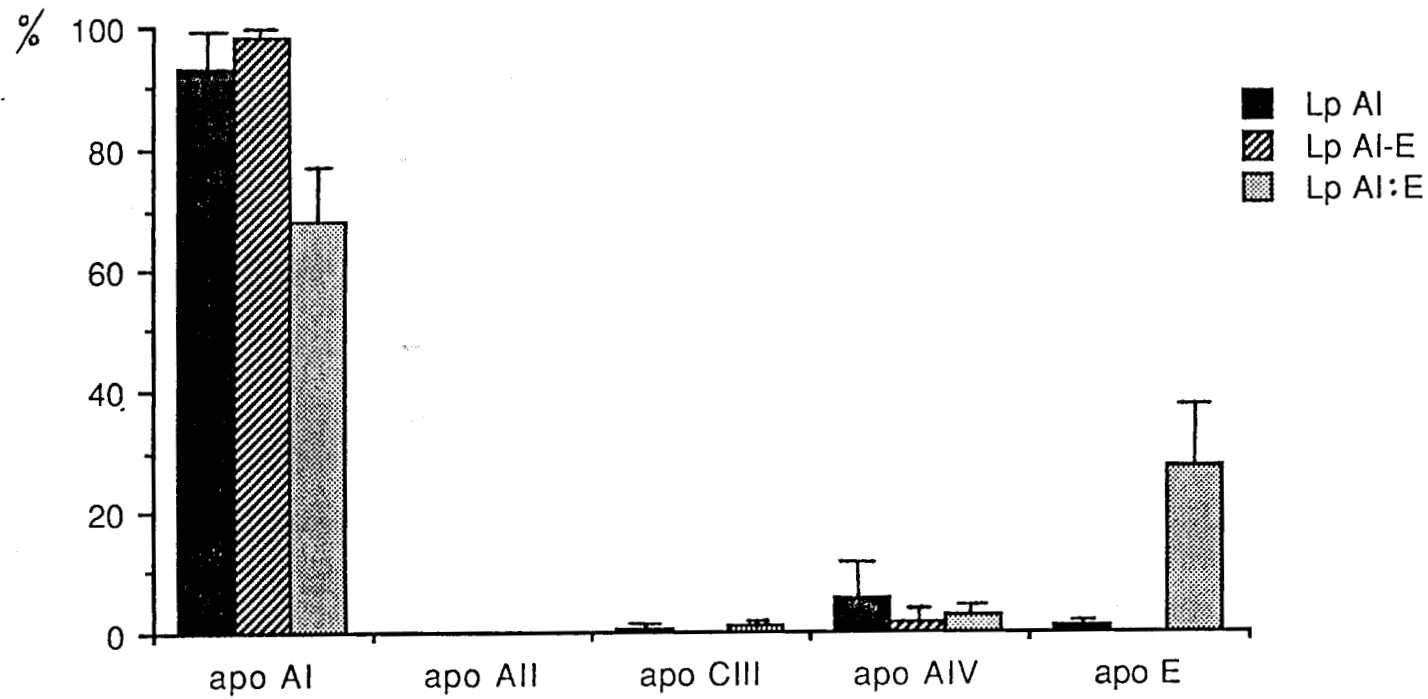
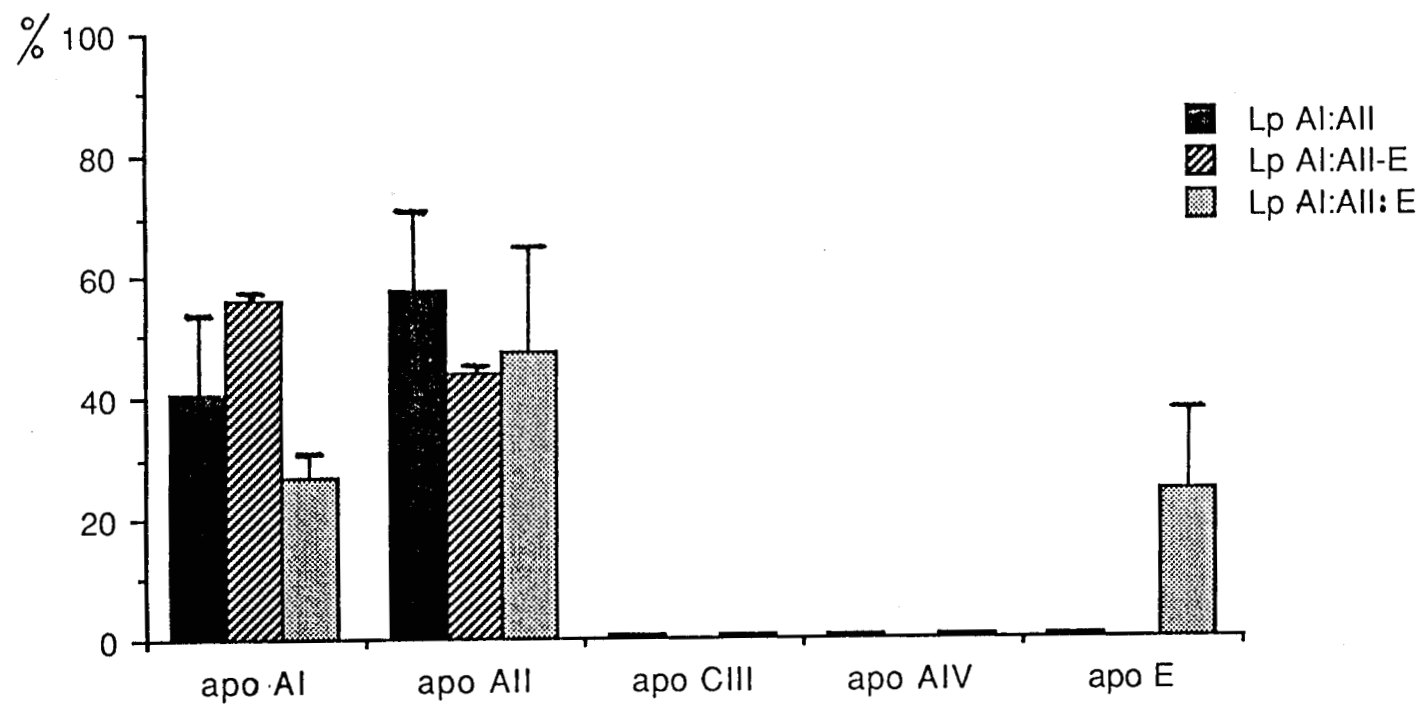


Figure 18 : Composition en apolipoprotéines des particules
Lp AI:All, Lp AI:All-E et Lp AI:All:E exprimée en mg
pour 100 mg d'apolipoprotéines



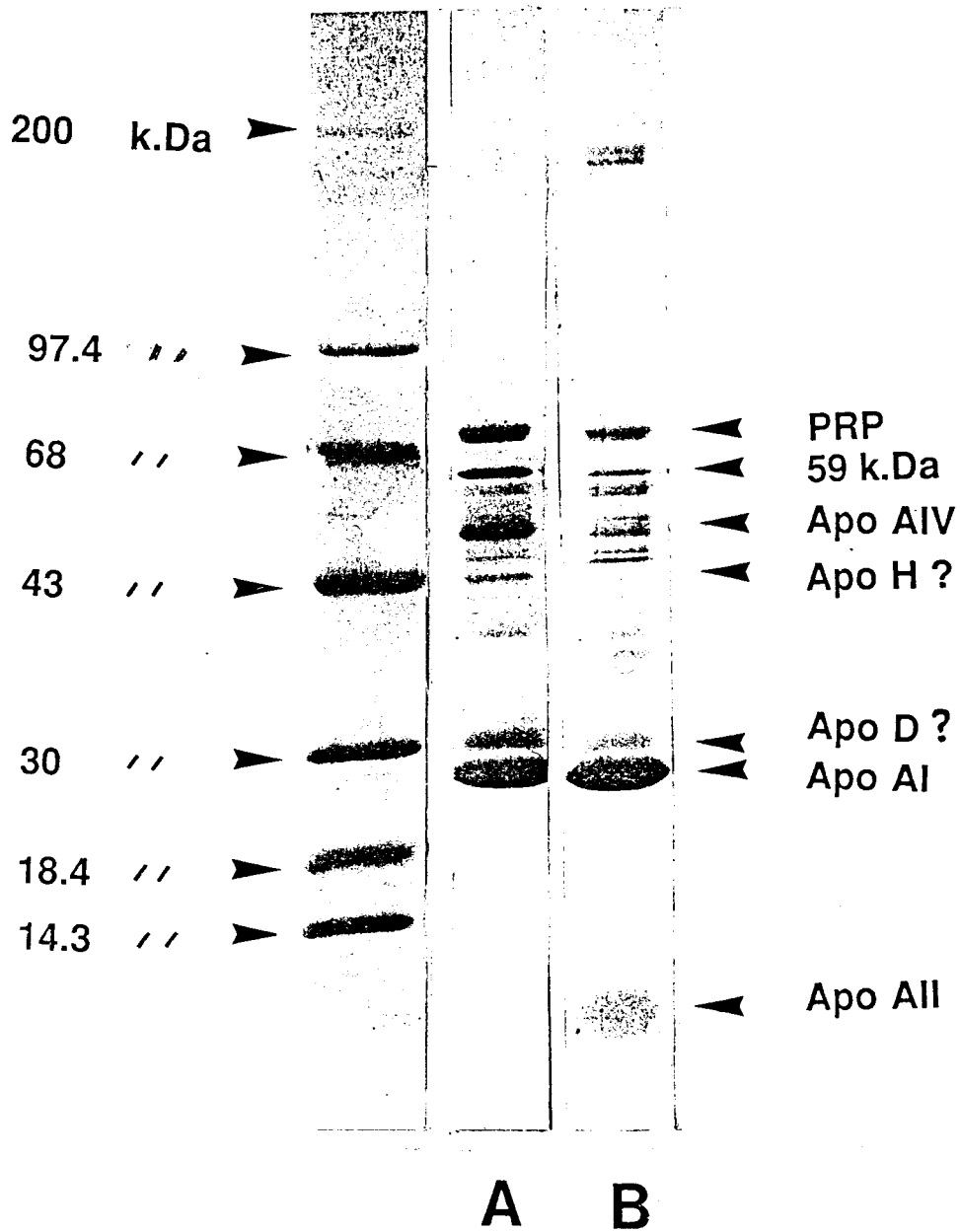


Figure 19 Profil électrophorétique
Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
Gradient 5 à 19 %

A : Lp AI
B : Lp AI:All

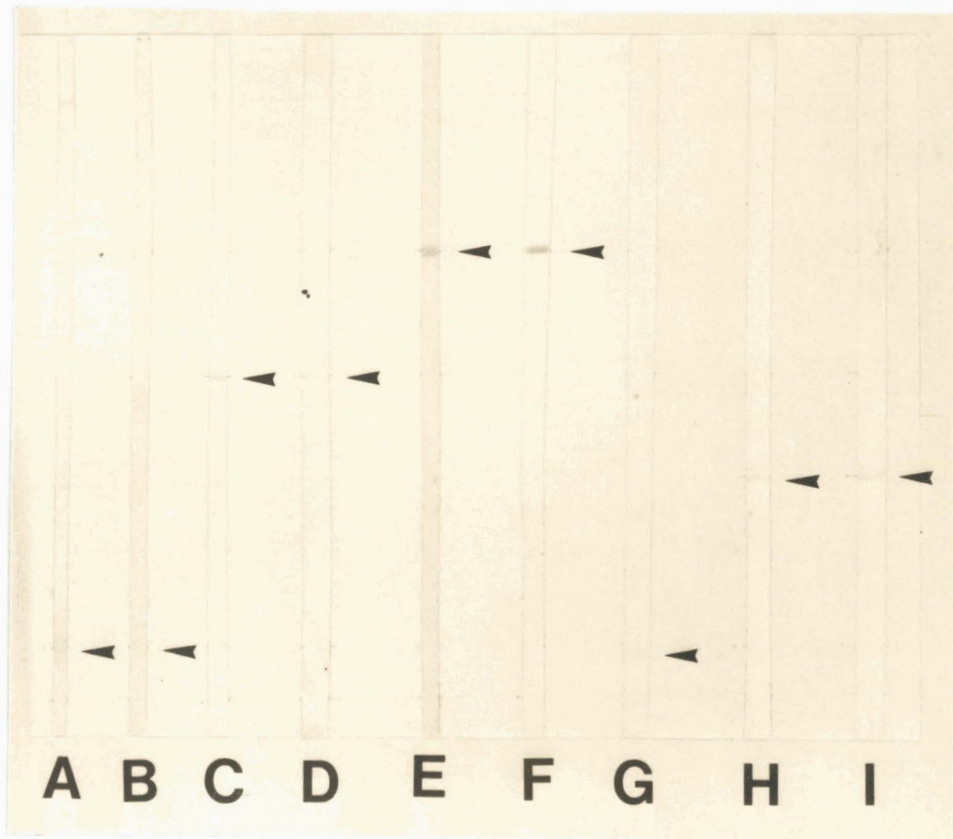


Figure 20 : Immunoélectrotransfert

- A : Lp AI contre l'anticorps anti-apo CIII
- B : Lp AI:All contre l'anticorps anti-apo CIII
- C : Lp AI contre l'anticorps anti-apo AIV
- D : Lp AI:All contre l'anticorps anti-apo AIV
- E : Lp AI contre l'anticorps anti-PRP
- F : Lp AI:All contre l'anticorps anti-PRP
- G : Lp AI:All contre l'anticorps anti-apo All
- H : Lp AI contre l'anticorps anti-apo E
- I : Lp AI:All contre l'anticorps anti-apo E

B - Discussion

Norfeldt et coll. (64) ont été les premiers à rapporter la caractérisation physico-chimique de la Lp AI et de la Lp AI:AII en les préparant par chromatographies sur du Séphadex QAE et sur hydroxyapatite. Ces deux particules étaient riches en cholestérol et en phospholipides, elles avaient une mobilité électrophorétique comparable à celles des HDL₂. Par contre, Nestruck et coll. (65) en utilisant la chromatofocalisation ont rapporté que, par leurs propriétés physico-chimiques, la Lp AI et la Lp AI:AII ressemblent respectivement aux HDL₂ et aux HDL₃. Par la suite, Atmeh et coll. (73) et Koren et coll. (74) ont rapporté que la Lp AI et la Lp AI:AII se retrouvent principalement et respectivement dans les HDL₂ et dans les HDL₃.

La chromatographie d'immunoaffinité est la méthode la plus utilisée pour la préparation de ces deux particules. Elle est appropriée au fractionnement des lipoprotéines en fonction de leur contenu en apolipoprotéines à partir des propriétés antigéniques de ces protéines. C'est une méthode facile à mettre en œuvre et elle permet de préserver au mieux la structure des lipoprotéines. En effet, en utilisant cette technique, Castro et Fielding (54) ont montré que l'apo E plasmatique est associée aux particules lipoprotéiques contenant principalement l'apo AI ou l'apo B. Ces auteurs ont montré que la Lp E provient d'une dissociation engendrée par l'ultracentrifugation ou la précipitation par les polyanions. Nous avons utilisé cette méthode pour préparer la Lp AI et la Lp AI:AII et les deux sous-populations de chacune d'entre elles, selon qu'elles contiennent ou non de l'apolipoprotéine E.

L'analyse de ces deux particules en immunodiffusion d'Ouchterlony montre l'absence d'arc de précipitation entre la LpAI et l'anticorps anti-apo AII et des arcs à identité complète entre la Lp AI:AII et les anticorps anti-apo AI et anti-apo AII, démontrant ainsi la présence des deux apolipoprotéines AI et AII sur la même particule.

Le contenu en cholestérol, triglycérides et phospholipides de la Lp AI ne diffère pas de celui de la Lp AI:AI. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études (66). Par contre, Ohta et coll. (127) ont rapporté que chez des sujets masculins, la quantité en phospholipides dans la Lp AI est significativement plus faible que dans la Lp AI:AI, alors que chez des sujets féminins, la Lp AI et la Lp AI:AI possèdent le même contenu en phospholipides. Le rapport lipides/protéines de la Lp AI est légèrement plus élevé que celui de la Lp AI:AI, ce qui est en accord avec d'autres auteurs (66). De ce fait, la Lp AI pourrait ressembler aux HDL₂ et la Lp AI:AI aux HDL₃.

Le profil électrophorétique (électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS) de la Lp AI et de la Lp AI:AI montre l'existence de bandes protéiques de masse moléculaire supérieure à celle de l'apo AI. La protéine diffuse située juste au-dessous du témoin de masse moléculaire 200 k.Da et présente uniquement dans la Lp AI:AI pourrait avoir une masse moléculaire de 170 k.Da. Cette protéine a aussi été trouvée par Cheung et Wolf (75). Ceux-ci ont pensé qu'elle pourrait représenter des immunoglobulines. Cependant, les particules ayant été traitées au β -Mercapto-éthanol, cette bande ne pourrait pas représenter des immunoglobulines. L'immunoélectrotransfert montre que parmi les bandes protéiques de masse moléculaire supérieure à celle de l'apo AI il y a la protéine riche en proline (PRP), l'apo AIV et l'apo E. Pour identifier la PRP, nous avons utilisé des anticorps produits chez le lapin contre cette protéine et préparés en 1976 par le Professeur R.J. Havel (Université de California, San Fransisco). Havel et coll.(184) et Funakoshi et coll.(185) ont rapporté que la PRP contient 10 % de proline par rapport à sa masse totale. Sa concentration plasmatique est de $0,22 \pm 0,4$ mg/ml et sa masse moléculaire est de 74 k.Da en électrophorèse en gel de polyacrylamide, mais de 352 k.Da en gel filtration, ce qui signifie qu'elle existe en pentamère. Sa concentration plasmatique augmente dans les phénomènes d'infection et inflammatoires (184, 185). La bande de migration diffuse située juste au-dessus de l'apo AI pourrait être l'apo D. En effet, la majorité de l'apo D

plasmatique est associée aux particules Lp AI et Lp AI:AII (66). Au même niveau que l'apo AII, réduite par le β -Mercapto-éthanol, l'immunoélectrotransfert révèle l'existence de l'apo CIII dans les deux particules. La masse moléculaire de la CETP est de 74 k.Da. Cette protéine pourrait être localisée avec la bande protéique de la PRP. Dans la région correspondant à 68 k.Da, il n'y a pas de bande protéique, ce qui implique que ces préparations ne sont pas contaminées par l'albumine. La LCAT, dont la masse moléculaire est de 68 k.Da, doit se trouver dans cette région, mais sa faible quantité ne pourrait pas être révélée par le bleu de Coomassie. Toutefois, en immunoélectrotransfert, nous avons remarqué l'existence de la CETP et de la LCAT dans ces deux particules (les profils ne sont par rapportés ici).

Cheung et Albers (66) ont rapporté que 48 % de la masse de la LCAT plasmatique se trouvent dans la Lp AI:AII et 28 % dans la Lp AI. Bien que ces résultats indiquent que le contenu en LCAT de la Lp AI:AII soit plus important que celui de la LpAI, l'activité de la LCAT est plus grande dans la Lp AI que dans la Lp AI:AII. Nos résultats indiquent que l'activité de la LCAT dans la LpAI est 3,8 fois plus grande que celle dans la Lp AI:AII ce qui est en accord avec les résultats de Cheung et coll. (113) qui constatent que 69 % et 17 % de l'activité de la LCAT plasmatique sont associés respectivement à la Lp AI et à la Lp AI:AII (ce qui donne 4 fois l'activité de la LCAT dans la Lp AI par rapport à la Lp AI:AII).

Lorsque la Lp AI et la Lp AI:AII sont subdivisées en deux sous-populations contenant ou non l'apo E, les particules possédant l'apo E contiennent plus de triglycérides que celles ne possédant pas l'apo E. Cette composition chimique pourrait attribuer aux Lp AI:E et aux Lp AI:AII:E des tailles plus grandes que celles, respectivement, des Lp AI-E et des Lp AI:AII-E. Gibson (186) a rapporté que 90 % des HDL contenant l'apo E sont retrouvés dans les HDL₂, ce qui est en accord avec ces résultats, puisque les HDL₂ contiennent plus de triglycérides et ont une taille plus grande que les HDL₃. La Lp AI-E pourrait avoir une taille plus

petite que la Lp AI:E et de ce fait, ressembler aux HDL₃ plutôt qu'aux HDL₂. Le rapport phosphatidylcholine/sphingomyéline dans la Lp AI-E est plus grand que celui dans la Lp AI et dans la Lp AI:AII-E. Cette constatation pourrait être favorable à la captation du cholestérol cellulaire par la Lp AI-E. En effet, il est reconnu que le cholestérol possède un grand degré de solubilisation dans la phosphatidylcholine et que les liposomes relativement riches en phosphatidylcholine captent le cholestérol cellulaire, alors que celles qui en sont pauvres donnent au contraire le cholestérol aux cellules (187). Les acides gras poly-insaturés des phospholipides sont plus présents dans la Lp AI-E que dans la Lp AI:AII-E. Cette constatation ne fait que renforcer la possibilité que les particules Lp AI-E sont de bons accepteurs du cholestérol, puisqu'il est reconnu que la quantité du cholestérol capté par des liposomes est influencée non seulement par leur contenu en phosphatidylcholine mais aussi par la composition des groupements acyles de la phosphatidylcholine (187). L'introduction des chaînes d'acides gras poly-insaturés dans la phosphatidylcholine résulte dans l'augmentation de la captation du cholestérol (187, 188).

2 - Lp AI ET Lp AI:AII PREPAREES A PARTIR DU PLASMA, DES HDL₂ ET DES HDL₃

Il a été montré que les HDL₃ provoque l'efflux du cholestérol cellulaire alors les HDL₂ sont incapable de le produire (41). Malgré que ces dernières sont majoritairement constituées de Lp AI (73), elles sont inefficaces dans la stimulation de l'efflux. Nous avons préparé la Lp AI et la Lp AI AII à partir des HDL₂ et des HDL₃ pour les comparer à leurs homologues plasmatiques et d'examiner l'effet ou l'absence d'effet des propriétés physiques de ces particules sur leurs fonctions biologiques.

Résultats et discussions

a - Lp AI et Lp AI:AII du plasma

Ces particules lipoprotéiques ont été préparé à partir d'une fraction plasmatique d'un sujet normolipémique, épuisée en apo E. La composition lipidique et apolipoprotéique des Lp AI-E et des Lp AI:AII-E plasmatiques est reportée dans le tableau 11. Les résultats sont exprimés en mole/mole d'apo AI. Les Lp AI-E sont plus riches en cholestérol libre et en phospholipides que les Lp AI:AII-E. L'efflux du cholestérol cellulaire est provoqué par les Lp AI et non par les Lp AI:AII (165), suggérant ainsi l'effet anti-athérogène des Lp AI. Les Lp AI provoquent l'efflux du cholestérol cellulaire et capteraient celui-ci pour entrer dans le chemin métabolique du transport "reverse" du cholestérol. Dans les deux types de particules, la quantité des apolipoprotéines B et CIII est très faible. Cette constatation est en accord avec les résultats rapportés pour les particules dépourvues d'apo B. Le rapport molaire apo AI/apo AII des Lp AI:AII-E est égal à une unité, ce qui est semblable aux résultats d'autres auteurs (73, 74) sur les particules totales Lp AI et Lp AI:AII.

b - Lp AI et Lp AI:AIH des HDL₂ et des HDL₃

Les résultats sont indiqués dans l'article n° 5 ("Rôles différenciés des particules contenant l'apo AI dans l'efflux du cholestérol à partir des cellules adipeuses"). Nous rapportons encore, sur d'autres préparations de Lp AI et de Lp AI:AIH à partir des HDL₂ et des HDL₃, l'effet de l'ultracentrifugation. Nous avons remarqué que les particules préparées à partir des HDL₂ et des HDL₃ ont moins de protéines que celles préparées à partir du plasma. Le profil électrophorétique (figure 21) montre l'absence de la PRP dans la Lp AI et dans la Lp AI:AIH des HDL₂ et des HDL₃, ainsi que d'autres protéines présentent normalement dans la Lp AI:AIH plasmatique.

La Lp AI-E plasmatique, des HDL₂ et des HDL₃ possèdent un contenu en cholestérol libre et en phospholipides plus élevé que celui de la Lp AI:AIH-E correspondante. Le rapport molaire apo AI/apo AIH des Lp AI:AIH-E est toujours égal à une unité. Les particules Lp AI et Lp AI:AIH perdent certaines de leurs protéines lors de l'ultracentrifugation. La Lp AI, quelque soit son origine, provoque l'efflux du cholestérol cellulaire (chapitre IV, article n° 5).

TABEAU 11 : Composition lipidique et apolipoprotéique des particules Lp AI-E et Lp AI:All-E isolées à partir du plasma, exprimée en mole/mole d'apo AI

mole/mole apo AI	Lp AI-E	Lp AI:All-E
Cholestérol estérifié	14,38	13,66
Cholestérol libre	21,49	9,47
Phospholipides	59,62	38,45
Triglycérides	13,84	4,56
Apo All	indéetectable	1,17
Apo CIII (10^{-3})	81,66	20
Apo B (10^{-3})	0,81	0,065

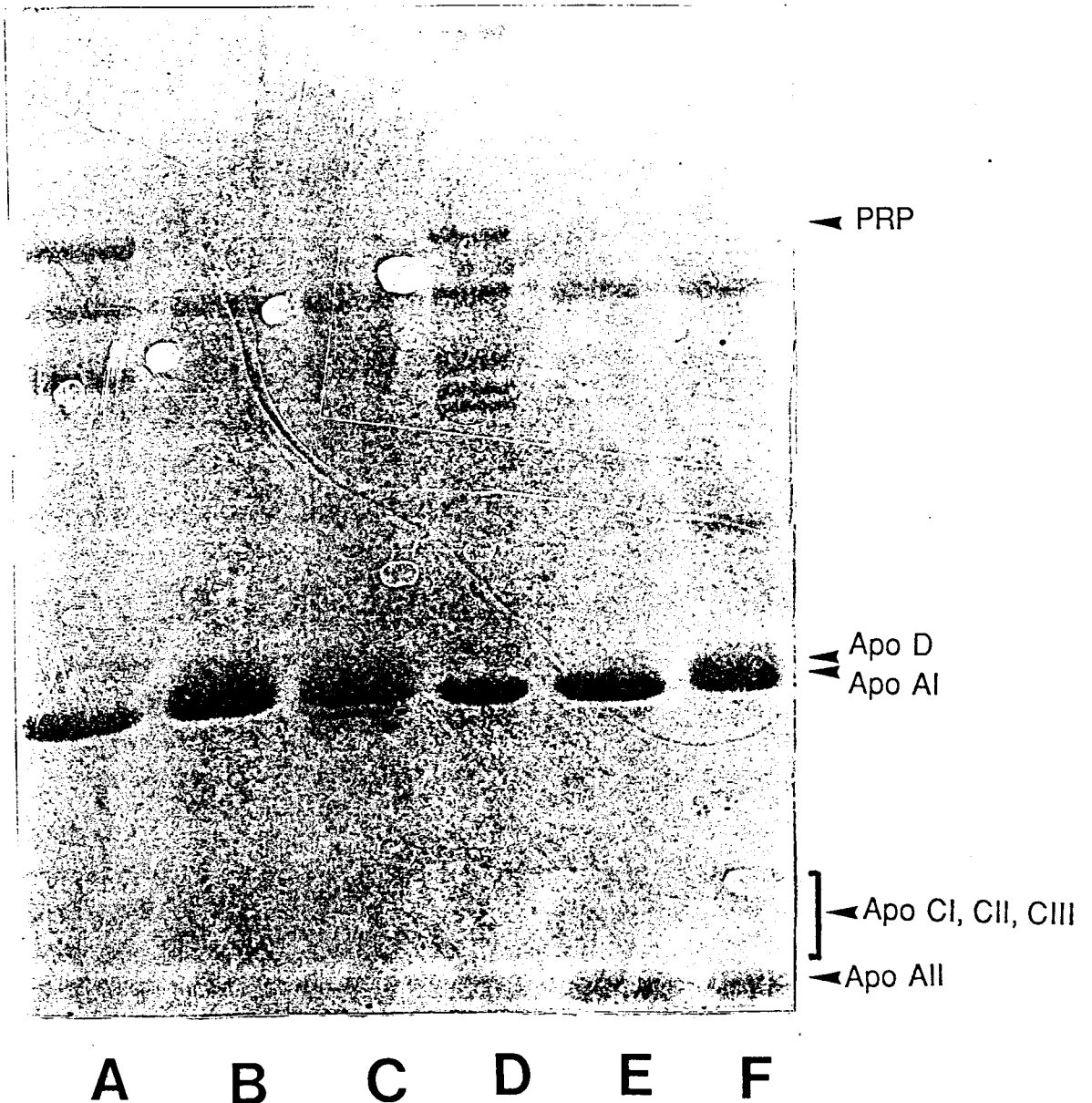


Figure 21: Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS

Effet de l'ultracentrifugation sur les particules
Lp AI et Lp AI:All

A : Lp AI du plasma	D : Lp AI:All du plasma
B : Lp AI des HDL2	E : Lp AI:All des HDL2
C : Lp AI des HDL3	F : Lp AI:All des HDL3

3 - Lp AI et Lp AI:AIII DU LIQUIDE INTERSTITIEL

A - Introduction

Il est suggéré que les HDL protègent contre l'athérosclérose en intervenant dans le transport "reverse" du cholestérol. Ce caractère anti-athérogène est attribué uniquement à la Lp AI et non à la Lp AI:AIII. Cette attribution a été le résultat d'études réalisées in vitro (165) dans lesquelles des cellules (préalablement chargées avec du cholestérol) incubées en présence de l'une ou de l'autre de ces deux particules (isolées à partir du plasma) se déchargent de leur cholestérol uniquement quand elles sont en présence de la Lp AI.

La majorité des cellules humaines in vivo sont en contact direct avec le liquide interstitiel plutôt qu'avec le plasma. Les cellules périphériques acquièrent le cholestérol par l'intermédiaire des récepteurs qui exigent un contact direct entre les lipoprotéines interstitielles et la membrane plasmique (38). D'une manière similaire, la première étape du transport "reverse" du cholestérol "efflux" aura lieu à travers une interaction directe ou indirecte entre les lipoprotéines interstitielles et la membrane plasmique. Peu d'études sur les lipoprotéines du liquide interstitiel ont été réalisées, ceci étant dû à la difficulté d'obtenir des quantités adéquates du liquide interstitiel.

Dans cette étude, nous avons dosé les lipides, les apolipoprotéines et les particules Lp AI et Lp AI:AIII dans le liquide interstitiel et le plasma correspondant, chez 11 sujets masculins ne présentant pas d'insuffisance coronarienne. Nous avons purifié et caractérisé la Lp AI et la Lp AI:AIII du liquide interstitiel chez 3 sujets. Pour obtenir le liquide interstitiel, nous avons utilisé une technique (174) employée principalement dans la recherche en dermatologie, en appliquant une succion douce sur la peau de l'avant bras. Pour éviter les dilutions, le liquide interstitiel (approximativement 500 μ l) a été récupéré directement dans des tubes Eppendorf contenant un lyophilisat de 27 μ l d'EDTA

à 12 %. Pour les calculs statistiques, nous avons utilisé le test de Wilcoxon.

B - Résultats

a - Relation entre le liquide interstitiel et le plasma

Les concentrations en lipides et en apolipoprotéines du liquide interstitiel et du plasma correspondant sont indiquées dans le tableau 12. Le pourcentage du cholestérol interstitiel par rapport à celui du plasma est de 16 %. Les pourcentages de l'apo AI et de l'apo AIV du liquide interstitiel par rapport à ceux du plasma sont respectivement 23 % et 26 %. Le rapport des concentrations en apolipoprotéines B, CIII et E du liquide interstitiel sur celles du plasma est plus faible que celui des concentrations en apolipoprotéines AI, AII et AIV (tableau 14). Le rapport de la concentration en apo AI sur celle en apo B dans le plasma est plus faible que celui dans le liquide interstitiel ($0,95 \pm 0,22$ contre $1,29 \pm 0,39$ ($p < 0,05$)) (tableau 15). Par contre, le rapport de la concentration en apo AI sur celle en apo AII dans le liquide interstitiel est similaire à celui dans le plasma.

62 et 38 % de l'apo AI plasmatique totale sont associés respectivement aux particules Lp AI:AII et Lp AI, alors que 58,5 et 41,5 % de l'apo AI interstitielle totale sont associés respectivement aux particules Lp AI:AII et Lp AI. Le rapport de la concentration en Lp AI sur celle en Lp AI:AII dans le plasma est plus faible que celui dans le liquide interstitiel (tableau 15).

L'activité de la LCAT dans le liquide interstitiel et dans le plasma correspondant a été déterminée sur 15 μ l et pendant une incubation d'une demi-heure (fiche technique n° 16). L'activité de la LCAT dans le liquide interstitiel représente 36 ± 13 % de celle du plasma (tableau 13).

b - Lp AI et Lp AI:AII du liquide interstitiel

La Lp AI et la Lp AI:AII interstitielles ont été préparées à partir d'environ 1 ml du liquide interstitiel de 3 sujets normolipémiques. La Lp AI et la Lp AI:AII plasmatiques ont été

préparées à partir du plasma du 3^{ème} sujet. Après chromatographie du liquide interstitiel ou du plasma sur l'immunoabsorbant anti-apo AII, la fraction retenue correspond à la Lp AI:AII. La fraction non retenue et ne contenant pas l'apo AII a été chromatographiée sur l'immunoabsorbant anti-apo AI pour obtenir la Lp AI.

Les compositions en apolipoprotéines et en lipides de la Lp AI et de la Lp AI:AII interstitielles et plasmatiques sont indiquées dans le tableau 16. Dans la Lp AI interstitielle et dans la Lp AI plasmatique, le cholestérol représente respectivement $24,7 \pm 9,2$ % et 39 % de la masse totale des lipides, alors que les phospholipides représentent respectivement $62,1 \pm 11$ % et 51,2 %. L'apo AIV est retrouvée à $24,20 \pm 13$ % et 5,70 % de la masse totale des apolipoprotéines, respectivement dans la Lp AI interstitielle et dans la Lp AI plasmatique. Dans la LpAI:AII des deux premiers sujets, aucune trace d'apo AIV n'a été détectée. Chez le 3^{ème} sujet, l'apo AIV a été trouvée à 0,12 % de la masse totale des apolipoprotéines de la Lp AI:AII. Le rapport molaire apo AI/apo AII de la Lp AI:AII interstitielle et de la Lp AI:AII plasmatique sont respectivement 1,5/1 et 0,97/1.

Les différentes populations selon la taille de la Lp AI plasmatique, de la Lp AI et de la Lp AI:AII interstitielles sont indiquées dans les figures 22, 23 et 24. La figure 22 montre le profil de chromatographie de gel filtration de la Lp AI plasmatique sur une colonne de Sephacryl S-300 à 8 ml/h. La Lp AI renferme plusieurs populations de particulaires de tailles différentes. Le pic situé avant la thyroglobuline pourrait représenter des agrégats de Lp AI. La Lp AI et la Lp AI:AII interstitielles sont elles aussi hétérogènes en fonction de la taille. Dans les populations de faible diamètre, la Lp AI est présente en plus grand nombre que la Lp AI:AII.

Tableau 12

	Cholestérol	Triglycérides	Phospholipides	Apo AI	Apo AII	Apo AIV	Apo B	Apo CIII	Apo E	Lp AI: AII	Lp AI
Plasma (mg/ml)	1,802 ± 0,322	1,156 ± 0,401	1,85 ± 0,275	0,873 ± 0,152	0,232 ± 0,059	0,08 ± 0,012	0,958 ± 0,266	0,028 ± 0,010	0,027 ± 0,012	0,54 ± 0,128	0,333 ± 0,158
Liquide interstitiel (mg/ml)	0,293 ± 0,102	0,212 ± 0,069	0,277 ± 0,100	0,2 ± 0,042	0,062 ± 0,02	0,021 ± 0,006	0,164 ± 0,047	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,002	0,117 ± 0,044	0,083 ± 0,038

Tableau 13 : Activité de la LCAT

Plasma (nmole/ml/h)	117,44 ± 15,83
Liquide interstitiel (nmole/ml/h)	41,14 ± 11,18
Liquide interstitiel / plasma	0,36 ± 0,13

Tableau 14 : Concentration dans le liquide interstitiel /
Concentration dans le plasma

Cholestérol	0,16 ± 0,05
Apo AI	0,23 ± 0,06
Apo AII	0,26 ± 0,07
Apo AIV	0,26 ± 0,04
Apo B	0,17 ± 0,07
Apo CIII	0,12 ± 0,04
Apo E	0,17 ± 0,05

Tableau 15 :

	Plasma	Liquide interstitiel
apo AI/apo B	0,95 ± 0,22	1,29 ± 0,39 *
Lp AI/Lp AI:AI	0,68 ± 0,41	0,89 ± 0,6

* p < 0,05

Tableau 16 : Composition en apolipoprotéines et en lipides de la Lp AI et de la Lp AI:All du liquide interstitiel (3 sujets) comparées à celles du plasma (1 sujet)

	mg/100 mg d'apolipoprotéines						mg/100 mg de lipides		
	Apo AI	Apo AII	Apo B	Apo CIII	Apo E	Apo AIV	Cholestérol	Triglycérides	Phospholipides
Lp AI Liquide interstitiel	72,7 ± 13	/	0,92 ± 0,28	1,3 ± 0,99	0,66 ± 0,53	24,2 ± 13	24,7 ± 9,2	13,3 ± 3	62,1 ± 11
Lp AI Plasma	91,7	/	1,44	1,68	0,86	5,7	39	9,7	51,2
Lp AI:All Liquide interstitiel	77,85 ± 13	21,17 ± 13	0,44 ± 0,12	0,14 ± 0,08	0,32 ± 0,43	0,04 ± 0,06	31,1 ± 3,4	14,8 ± 1,4	54 ± 4,8
Lp AI:All Plasma	57,81	39,31	0,46	0,07	0,95	1,38	30,6	9,6	59,6

/ : Valeur nulle

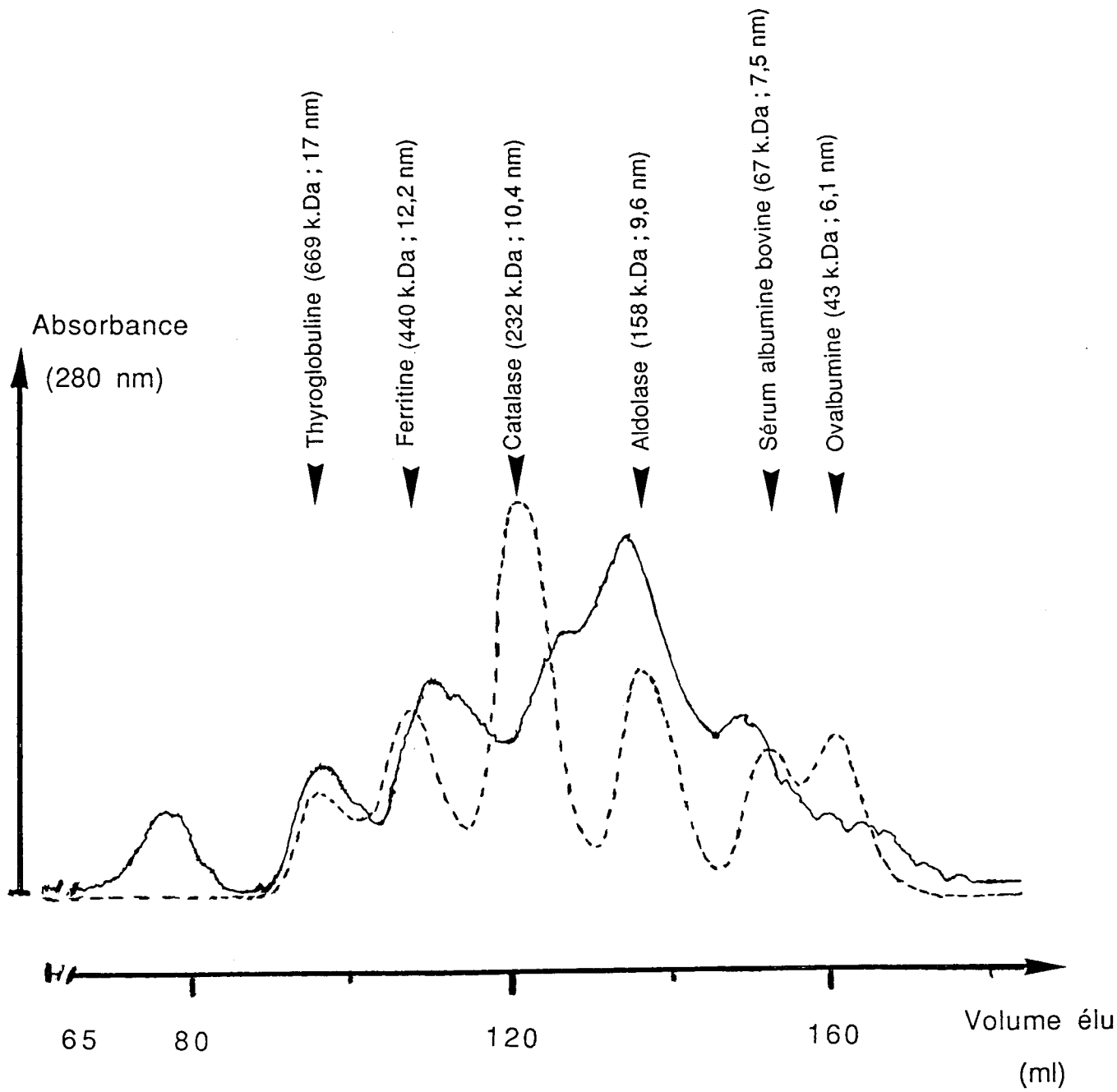


Figure **22** : Profil de chromatographie de gel filtration de la Lp AI plasmatique

— : Lp AI

----- : Témoins de masse moléculaire

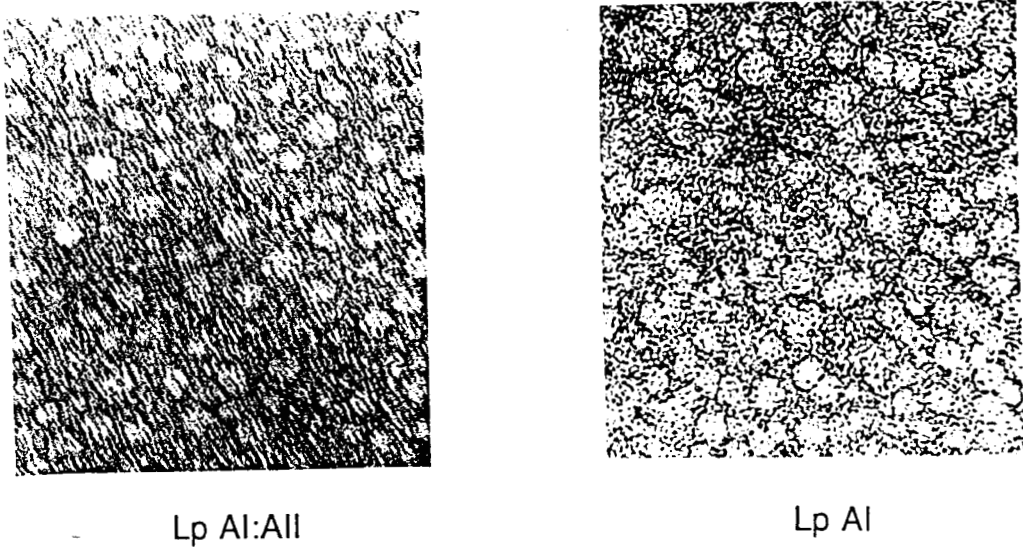


Figure 23 : Microscopie électronique des particules Lp Al:AlI et Lp Al du liquide interstitiel
Agrandissement : 300 000 fois

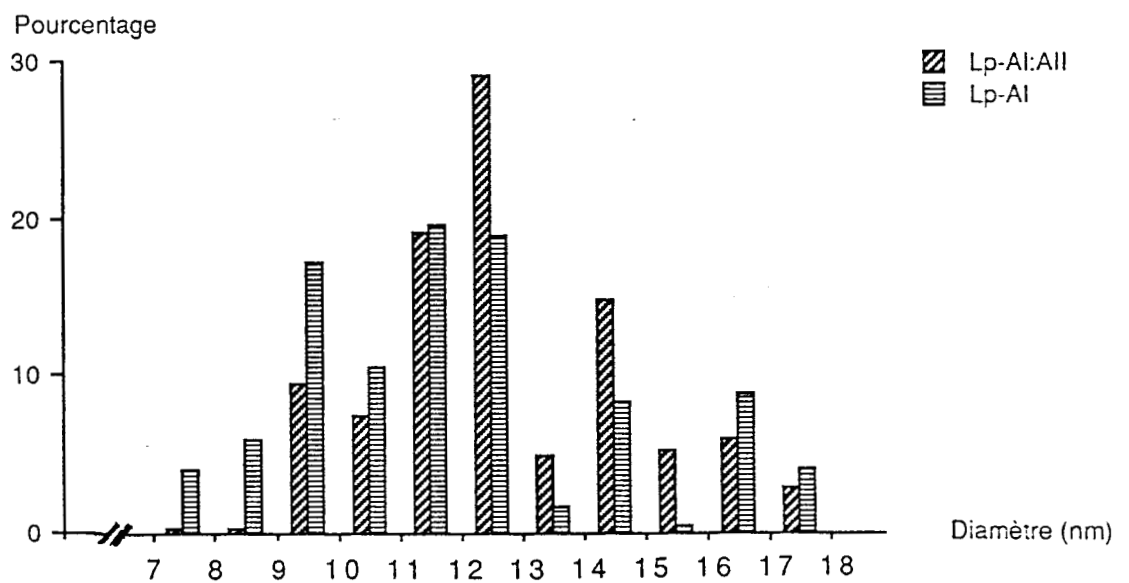


Figure 24 : Diagramme de répartition des tailles des Lp Al:AlI et des Lp Al du liquide interstitiel en fonction de leur pourcentage respectif
nombre = 300

C - Discussion

Plusieurs auteurs ont travaillé sur les lipoprotéines de la lymphe périphérique. Reichl et coll. (189-193) ont rapporté plusieurs études sur la caractérisation des lipoprotéines de la lymphe qui pourrait refléter la composition du liquide interstitiel (194). D'autres auteurs ont étudié la composition de la lymphe du canal thoracique (195, 196). La composition de la lymphe périphérique est différente selon le milieu dans lequel elle se trouve et selon la proportion du débit pour un canal donné (197). La composition de la lymphe du canal thoracique est également influencée par un repas riche en graisses. Les lipoprotéines passent à travers les capillaires artériels pour aller dans le liquide interstitiel, dans lequel baignent les cellules, et dans les canaux lymphatiques. Une petite quantité de lipoprotéines du liquide interstitiel retourne directement dans le plasma, tandis qu'une proportion importante retourne dans la circulation en passant par le système lymphatique.

Les pourcentages des concentrations interstitielles en apolipoprotéines B, CIII et E par rapport à celles du plasma sont plus faibles que ceux des concentrations en apolipoprotéines AI, AII et AIV. Vermeer et coll. (198), en 1979, ont démontré la présence de l'apo AI et de l'apo B dans le liquide interstitiel, obtenu par la même technique que la nôtre et ayant des pourcentages plasmatiques similaires aux nôtres (24 ± 2 % pour l'apo AI et 16 ± 2 % pour l'apo B). Vessby et coll. (199), en 1987, ont obtenu les mêmes résultats (22 ± 5 % pour l'apo AI et 16 ± 7 % pour l'apo B). Par contre, dans la lymphe, Reichl et coll. (200) ont rapporté des pourcentages faibles, $12,5 \pm 4,79$ %, pour l'apo AI et $6,4 \pm 1,58$ % pour l'apo B, alors que le pourcentage de l'apo E a été trouvé plus élevé, $38,4 \pm 6,5$ %. Vessby et coll. (199) ont rapporté un pourcentage de cette apolipoprotéine dans le liquide interstitiel égal à 14 ± 10 %.

Le rapport de la concentration en apo AI sur celle en apo B dans le liquide interstitiel est plus élevé que celui dans le plasma ($p < 0,05$). Le rapport de la concentration en Lp AI sur

celle en Lp AI:AII dans le liquide interstitiel est lui aussi plus élevé que celui dans le plasma. Ces deux constatations sont en faveur d'un efflux du cholestérol des cellules périphériques, les particules le permettant étant en concentration relative plus importante que les particules athérogènes.

L'activité de la LCAT dans le liquide interstitiel représente 36 % de celle du plasma. Des activités plus faibles ont été rapportées dans la lymphe : 1 à 10 % dans la lymphe périphérique (201) et 10 à 30 % dans la lymphe du muscle cardiaque (203). Cette activité, faible par rapport à celle du plasma, n'est pas dû au fait que les lipoprotéines interstitielles sont des substrats inadéquats pour la LCAT. En effet, quand une LCAT semi-purifiée est ajoutée aux lipoprotéines lymphatiques, l'enzyme fait diminuer le contenu en cholestérol libre et en phospholipides des HDL lymphatiques, pendant qu'une augmentation du contenu en esters de cholestérol et apo E dans les fractions de densité plus basse que celle des HDL a été observée (204). L'activité de la LCAT dans le liquide interstitiel pourrait être nécessaire uniquement à l'efflux du cholestérol cellulaire. Quand les particules acceptrices du cholestérol reviennent dans la circulation, elles seraient converties en HDL riches en cholestérol estérifié et en apo E sous l'action de la LCAT plasmatique.

Aucune trace d'apo AIV n'a été détectée dans les particules interstitielles Lp AI:AII chez deux sujets. Chez le 3^{ème} sujet, elle représente 0,12 % de la masse totale des apolipoprotéines de la Lp AI:AII interstitielle.

Le rapport molaire apo AI/apo AII dans la Lp AI:AII interstitielle est plus grand que dans la Lp AI:AII plasmatique. Le cholestérol représente $24,7 \pm 9,2$ % de la masse totale des lipides de la LpAI interstitielle, alors qu'il est de 39 % dans la Lp AI plasmatique. Par contre, le contenu en phospholipides par rapport à la masse totale des lipides est plus grand dans la Lp AI interstitielle que dans la Lp AI plasmatique.

La Lp AI interstitielle contient une faible quantité de

cholestérol et d'apo E, comparée aux particules contenant l'apo E de la lymphe périphérique (200).

La Lp AI interstitielle, contient l'apo AI et l'apo AIV, qui toutes les deux provoquent l'efflux du cholestérol (chapitre IV), pourrait probablement être le médiateur le plus puissant dans l'efflux du cholestérol des cellules périphériques.

Le liquide interstitiel tel qu'il est prélevé est-il intéressant pour préciser le risque d'athérosclérose ?

- le liquide interstitiel de la peau peut renseigner sur la survenue des xanthomes. Mais peut-il être le reflet du liquide interstitiel artériel ?

- une étude du liquide interstitiel entre des sujets à coronaires malades et des sujets normaux apportera des arguments pour l'intérêt ou non du liquide interstitiel du derme.

III - PARTICULES LIPOPROTEIQUES CONTENANT L'APO AIV (Lp AIV)

A - Résultats

1 - Lp AIV PREPAREE A PARTIR DU PLASMA

Plusieurs auteurs suggèrent que l'apo AIV se détache des lipoprotéines et se retrouve après ultracentrifugation dans la fraction de densité supérieure à 1,21 (137, 143). Cependant, avec la chromatographie de tamisage moléculaire (141), la majorité de l'apo AIV existe dans la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine et 25 % de sa concentration plasmatique totale sont associés aux HDL.

Nous avons utilisé la chromatographie d'immunoaffinité pour purifier les particules AIV et connaître les quantités d'apolipoprotéines associées avec ces particules. 2 à 4 ml de plasma de 3 sujets masculins normolipémiques sont chromatographiés sur la colonne anti-apo AIV. Aucune trace d'apo AIV dans les fractions non retenues par cette colonne n'a été détectée.

a - Apolipoprotéines associées aux particules AIV

Le tableau 17 indique les quantités d'apolipoprotéines AI, AII, B, CIII et E associées aux particules AIV et exprimées en pourcentage par rapport à leur concentration plasmatique totale.

b - Composition en apolipoprotéines et en lipides des particules AIV

La composition en apolipoprotéines des particules AIV est reportée dans le tableau 18. L'apo AIV compte en moyenne pour 66,41 % de la masse totale des apolipoprotéines. L'apo B représente 19,18 %, l'apo AI, 7,01 %, l'apo E, 3,99 %, l'apo AII, 3,08 % et l'apo CIII, 0,17 %.

La composition lipidique et protéique des particules AIV est reportée dans le tableau 19. Les protéines constituent en moyenne

80,5 % de la masse totale des particules AIV ; le cholestérol, les triglycérides et les phospholipides représentent respectivement 5,7 %, 5,9 % et 7,8 % de la masse totale des particules AIV.

c - Electrophorèse en gel de polyacrylamide et immunoélectrotransfert

Le profil électrophorétique des particules AIV (électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS) est représenté sur la figure 25 (dépot 80 µg de protéines de Lp AIV d'un sujet normal et de Lp AIV d'un sujet atteint de la maladie de Tangier). Le profil électrophorétique montre :

- la présence d'une bande protéique diffuse de masse moléculaire 260 k.Da ;
- la PRP qui existe dans les deux particules ;
- entre l'apo AIV et la PRP, la bande protéique de 59 k.Da, déjà observée dans la Lp AI et dans la Lp AI:AI, existe dans les deux particules ;
- l'apo H et l'apo D sont présentes dans les deux particules ;
- l'apo AI est présente uniquement dans la Lp AIV du sujet normal.

L'immunoélectrotransfert (figure 26) montre qu'en plus de l'apo AIV, il existe l'apo H, l'apo E, l'apo AI, la LCAT et la CETP.

d - Distribution de l'apo AIV dans le plasma

La distribution de l'apo AIV dans le plasma est reportée dans la figure 27 (l'apo AI est indiquée comme référence). Cette distribution est faite en électrophorèse bidimensionnelle sur 20 µl de plasma. La première dimension est faite en gel d'agarose et la deuxième en électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide avec un gradient de 2 à 15 %. L'apo AIV migre en position pré-bêta et renferme deux populations de particules de 75 et 200 k.Da. La majorité de l'apo AI migre en position alpha et une faible quantité migre en position pré-bêta (pré-bêta 1 et pré-bêta 2).

2 - Lp AIV PREPAREE A PARTIR DE LA FRACTION PLASMATIQUE DEPOURVUE D'APO B

Ces particules AIV ont été préparées à partir du même plasma des sujets étudiés dans le paragraphe II et en même temps que les particules Lp AI et Lp AI:AI (figure 11). 3 fractions lipoprotéiques dépourvues d'apo B des mêmes échantillons plasmatiques des sujets étudiés dans le paragraphe II et qui ont été retenues par l'immunoabsorbant anti-apo AIV, sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo AI. Les lipoprotéines retenues et non retenues sont chromatographiées sur l'immunoabsorbant anti-apo E. De cette façon, nous avons récupéré les Lp AIV ne contenant pas l'apo AI (Lp AIV-AI), les Lp AIV contenant l'apo AI et non l'apo E (Lp AIV:AI-E), les Lp AIV contenant l'apo AI et l'apo E (Lp AIV:AI:E) et les Lp AIV ne contenant ni l'apo AI, ni l'apo E (Lp AIV-AI-E).

a - Composition lipidique et protéique

Les résultats sont reportés dans la figure 28. Les particules AIV (Lp AIV) ont un rapport lipides/protéines = 0,35. Les sous-populations ont des rapports lipides/protéines différents : la Lp AIV-AI a un rapport = 0,33, la Lp AIV:AI-E a un rapport = 0,67 et la Lp AIV:AI:E a un rapport = 0,96. La Lp AIV:AI:E a un contenu en triglycérides plus élevé que celui des autres sous-populations.

b - Composition en apolipoprotéines

Les résultats sont reportés dans la figure 29 et exprimés en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines. Les Lp AIV-AI-E sont essentiellement constituées d'apo AIV où elles représentent $98,9 \pm 0,7$ % de la masse totale des apolipoprotéines. Par contre, la Lp AIV:AI-E et la Lp AIV:AI:E contiennent plus d'apo AI que d'apo AIV. L'apo AI et l'apo AIV constituent respectivement $69,7 \pm 6,3$ % et $9,5 \pm 8,3$ % de la masse totale des apolipoprotéines de la Lp AIV:AI-E. Dans la Lp AIV:AI:E, ces deux apolipoprotéines

constituent respectivement $41,4 \pm 7,9 \%$ et $16,8 \pm 9,6 \%$ de la masse totale des apolipoprotéines.

c - Activité de la LCAT

L'activité de la LCAT des particules Lp AIV et ses sous-populations, la Lp AIV:AI-E et la Lp AIV-AI-E est indiquée dans les figures 30a et 30b. Ces activités ont été déterminées en même temps que celles des Lp AI et Lp AI:AI. L'activité de la LCAT de la Lp AIV représente $41 \pm 3 \%$ de celle de la Lp AI, alors que l'activité de la LCAT de la Lp AIV:AI-E et de la Lp AIV-AI-E représentent respectivement $131 \pm 14 \%$ et 163% * de celle de la Lp AI-E (* une seule détermination).

Tableau 17 : Pourcentage des apolipoprotéines plasmatiques associées avec les particules AIV

%	Sujet 1	Sujet 2	Sujet 3	Moyenne ± Ecart type
Apo AI	1,32	0,9	0,48	0,9 ± 0,42
Apo AII	1,98	2,66	1,77	2,13 ± 0,46
Apo B	1,78	1,55	2,08	1,80 ± 0,26
Apo CIII	1,37	1,07	1,04	1,16 ± 0,18
Apo E	14,13	6,57	9,86	10,18 ± 3,79

Tableau 18 : Composition en apolipoprotéines des particules AIV exprimée en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines

%	Apo AIV	Apo AI	Apo AII	Apo B	Apo CIII	Apo E
Sujet 1	64,28	8,46	2,23	21,55	0,23	3,2
Sujet 2	71,78	6,86	3,74	14,35	0,12	3,12
Sujet 3	63,17	5,71	3,61	21,66	0,18	5,65
Moyenne ± Ecart-type	66,41 ± 4,68	7,01 ± 1,38	3,08 ± 0,74	19,18 ± 4,18	0,17 ± 0,05	3,99 ± 1,43

Tableau 19 : Composition lipidique et protéique des particules AIV exprimée en mg pour 100 mg de lipides et de protéines

%	Cholestérol	Triglycérides	Phospholipides	Protéines
Sujet 1	5,4	7,4	8,5	78,7
Sujet 2	5,1	1,7	7,7	85,5
Sujet 3	6,5	8,7	7,4	77,4
Moyenne ± Ecart-type	5,7 ± 0,7	5,9 ± 3,7	7,8 ± 0,6	80,5 ± 4,3

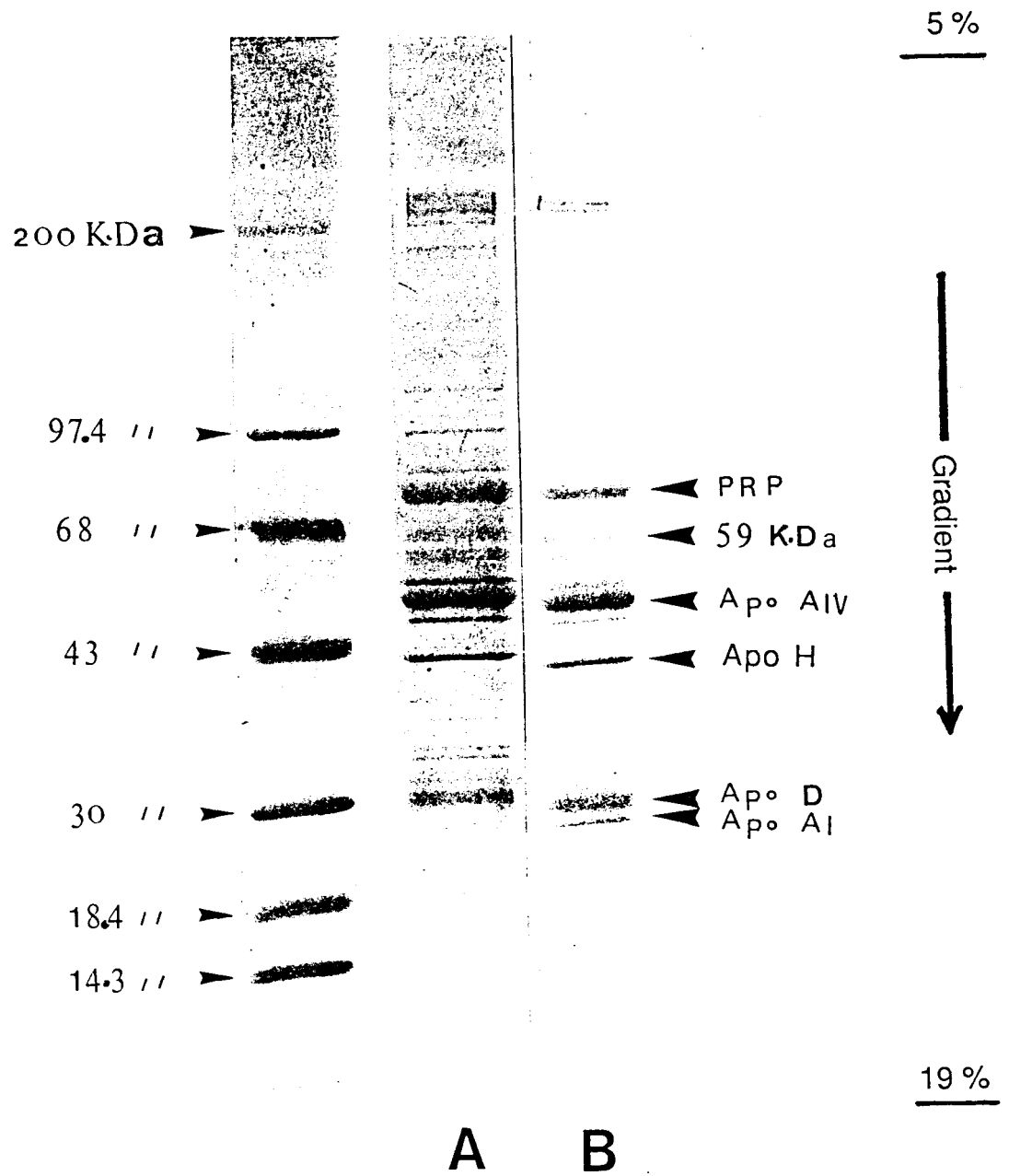


Figure 25 Profil électrophorétique
Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

A : Lp AIV d'un sujet atteint de la maladie de Tangier
B : Lp AIV d'un sujet normal



Figure 26 : Immunoélectrotransfert

Particules AIV contre :

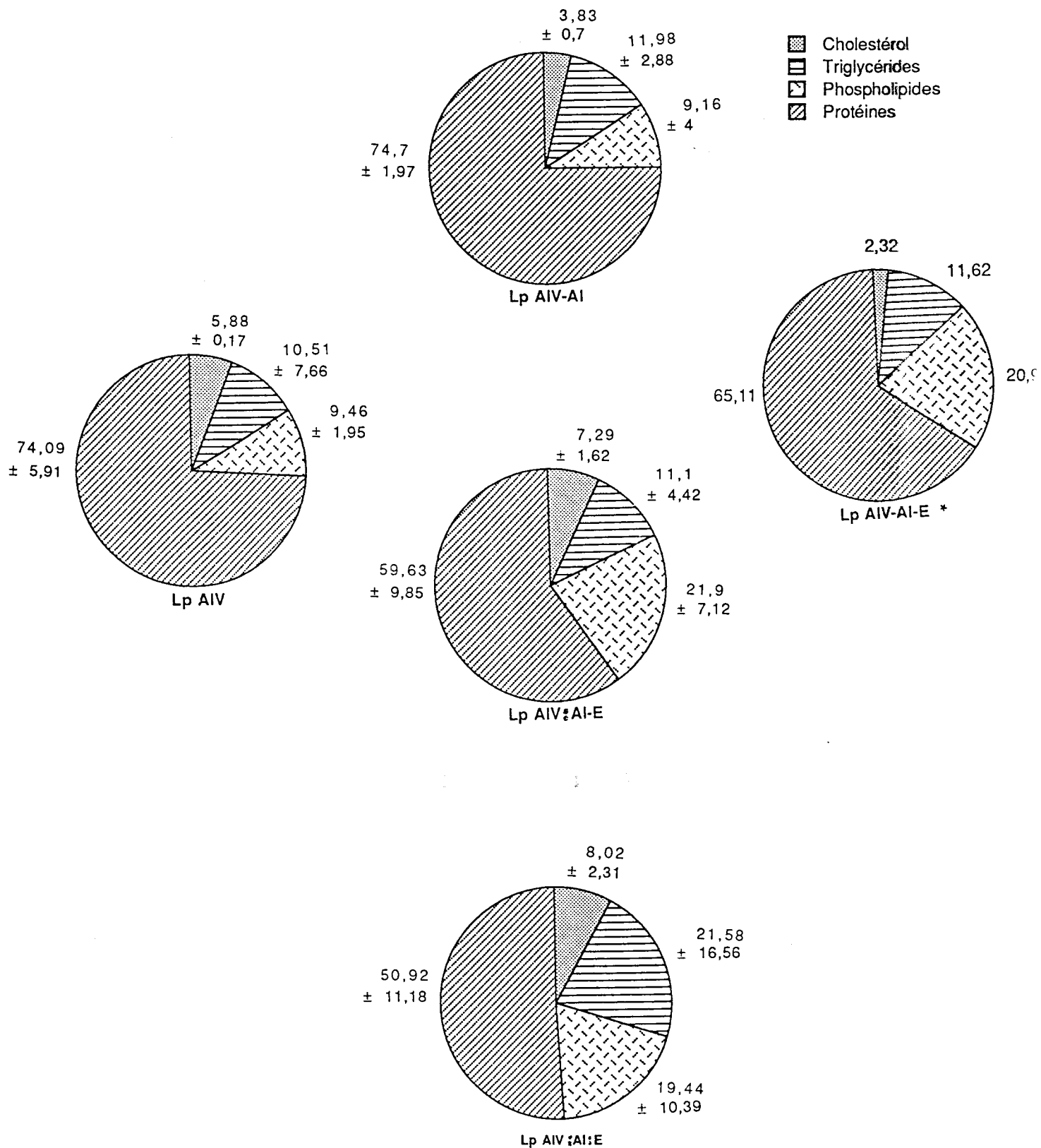
- A : anticorps anti-apo AIV
- B : anticorps anti-apo H
- C : anticorps anti-apo E
- D : anticorps anti-apo AI
- E : anticorps anti-LCAT
- F : anticorps anti-CETP



Figure 27 : Distribution de l'apo AI et de l'apo AIV dans le plasma d'un sujet normolipémique déterminée par électrophorèse bidimensionnelle

A : apo AI, 1 : Lp AI pré-bêta 1, 2 : Lp AI pré-bêta 2
B : apo AIV

Figure 28 Composition lipidique et protéique des particules Lp AIV, Lp AIV-AI, Lp AIV:AI-E, Lp AIV:AI:E, et Lp AIV-AI-E exprimée en mg pour 100 mg de lipides et de protéines



* : Une seule détermination

Figure 29: Composition en apolipoprotéines des particules
Lp AIV-AI, Lp AIV-AI-E, Lp AIV:AI-E et Lp AIV:AI:E
exprimée en mg pour 100 mg d'apolipoprotéines

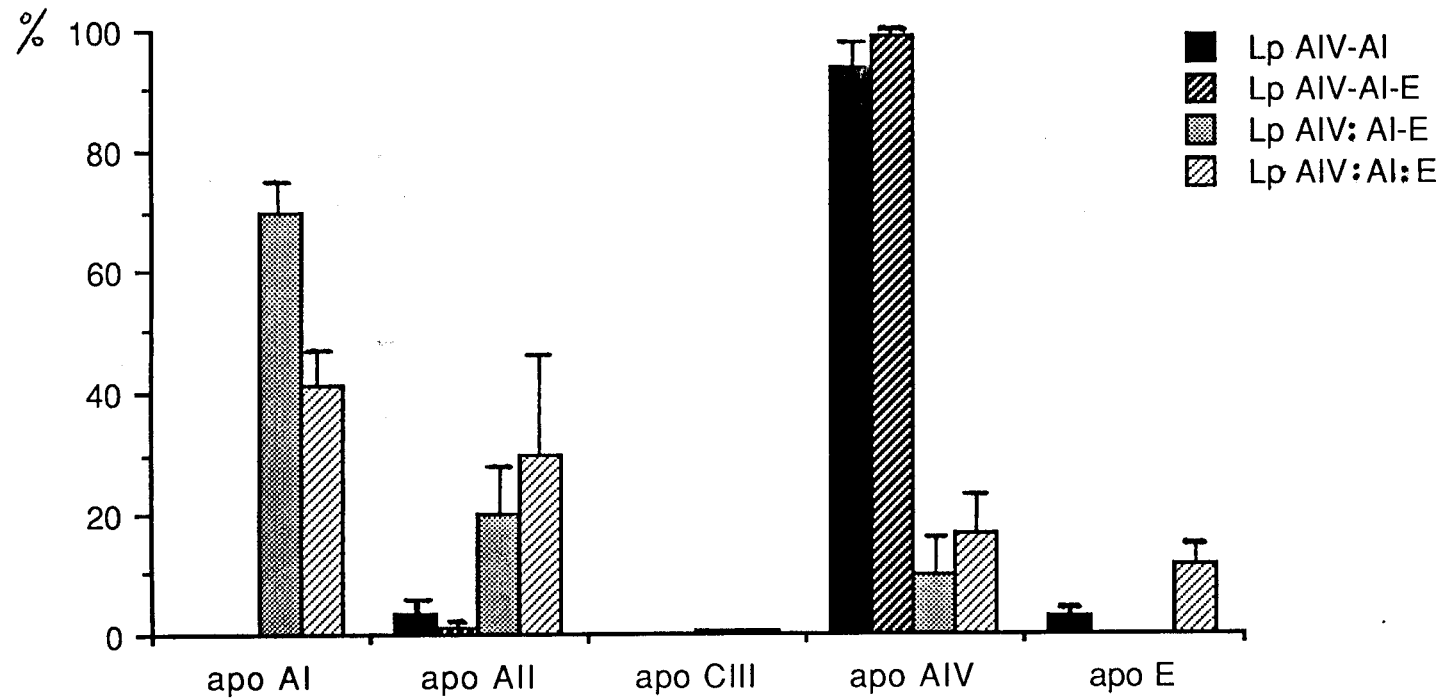


Figure 30 : Activité de la LCAT des particules lipoprotéiques

Figure 30 a

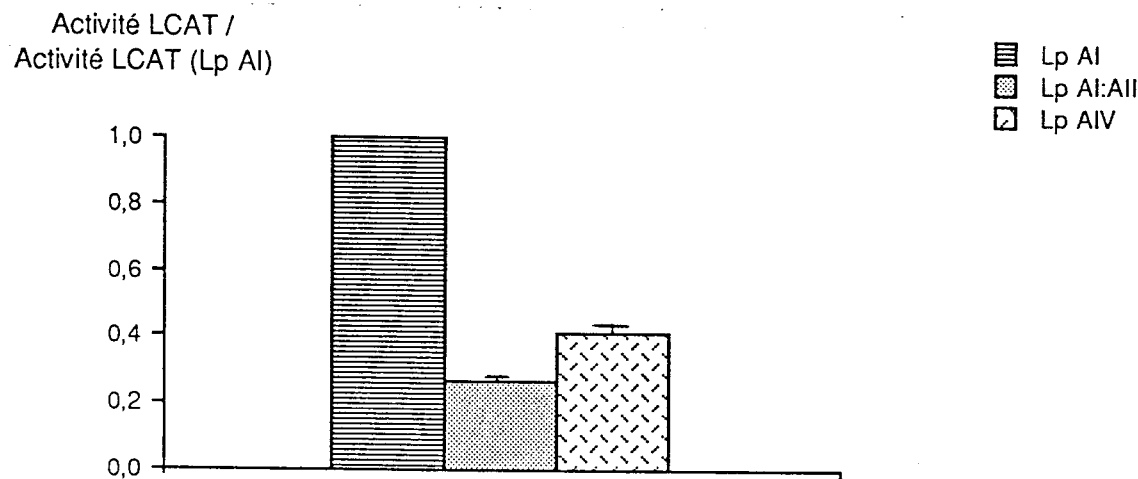
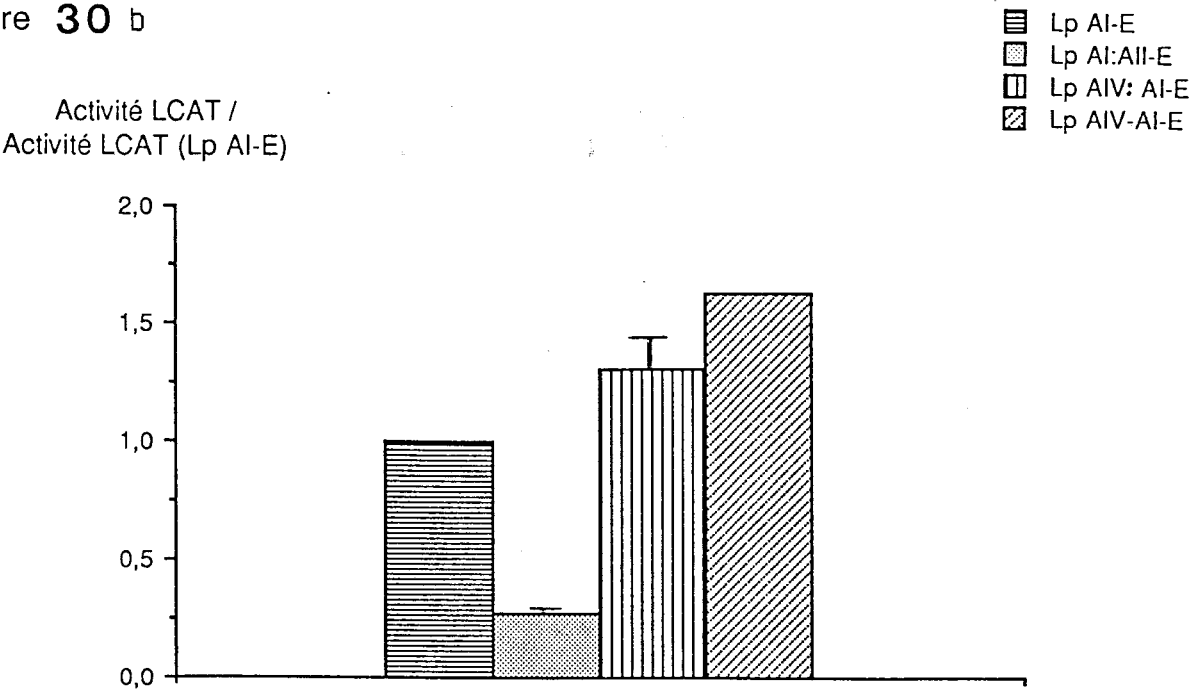


Figure 30 b



*:Une seule détermination

B - DISCUSSION

L'apolipoprotéine AIV est associée à de faibles quantités d'apolipoprotéines AI, AII, B, CIII et E. Elle est associée aussi aux lipides. L'apo AIV plasmatique est donc associée à des particules lipoprotéiques. Un grand pourcentage de la masse totale de ces particules est représenté par des protéines. De ce fait, ces particules sont des lipoprotéines de petite taille et de densité élevée. En plus nous avons préparé des particules à partir d'une fraction plasmatique de densité supérieure à 1,21. Leur masse totale est constituée de 87 % de protéines, 2 % de cholestérol, 7 % de triglycérides et 4 % de phospholipides, montrant ainsi l'association de l'apo AIV dans cette fraction aux lipides.

Sur le profil électrophorétique (électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS), on constate la présence d'une bande protéique diffuse qui se localise à un niveau juste au-dessus du témoin de masse moléculaire 200 k.Da. Cette protéine pourrait avoir comme masse moléculaire 260 k.Da.

La protéine de masse moléculaire 59 k.Da qui existe dans les particules AIV, a été trouvée par Fidge et Mc Cullagh en 1981 (202) à côté de l'apo AIV dans les chylomicrons lymphatiques du rat. Ces auteurs l'ont nommée apo AV. En 1984, Ohta et coll. (149) l'ont trouvé dans les particules AIV préparées à partir d'une fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine et à partir de la lymphe. Toutefois, cette protéine n'est pas encore caractérisée.

L'immunoélectrotansfert des particules AIV contre les anticorps anti-PRP, anti-LCAT, anti-CETP et anti-apo H montre l'existence de ces protéines. L'apo H a été trouvée aussi par Ohta et coll. (149) dans les particules AIV. Une masse moléculaire de 43 k.Da a été attribuée à l'apo H par Lee et coll. (205) en 1983. Il a été rapporté que 16 % de sa concentration plasmatique totale sont associés aux chylomicrons, 2 % aux LDL, 17 % aux HDL et 65 % sont retrouvés dans la fraction plasmatique de densité supérieure

à 1,21 (206). Le rôle métabolique de l'apo H n'est pas encore connu. Burstein et Legmann (207) ont suggéré que cette apolipoprotéine est impliquée dans le métabolisme des triglycérides. La même proposition a été faite par Polz et Kostner (208). En 1980, Nakaya et coll. (209) ont rapporté que cette apolipoprotéine active la LPL par l'hydrolyse des triglycérides en émulsion avec les phospholipides. Mais un déficit en apo H n'entraîne pas d'hyper-triglycéridémies (observation de Brewer).

Le profil électrophorétique des particules AIV du sujet atteint de la maladie de Tangier montre l'absence de la bande protéique correspondant à l'apo AI. Il a été rapporté que l'apo AIV des sujets atteints de la maladie de Tangier est retrouvée à une faible concentration par rapport à celle des sujets normaux (137). Les particules AIV des HDL des sujets atteints de la maladie de Tangier pourraient être absentes ou présentes et ne contenant pas l'apo AI.

L'analyse de la distribution de l'apo AI et de l'apo AIV dans le plasma montre que la majorité de l'apo AI migre en position alpha et qu'une faible quantité est partagée en deux populations ayant une migration pré-bêta, la Lp AI pré-bêta 1 et la Lp AI pré-bêta 2. Castro et Fielding (28) ont rapporté que chez des sujets normolipémiques, ces deux populations représentent respectivement 2,8 % et 2,3 % d'apo AI totale plasmatique et que la Lp AI pré-bêta 1 pourrait être l'accepteur primaire du cholestérol. L'apo AIV migre en position pré-bêta et elle est associée à deux populations de particules de 75 et 200 k.Da. Les particules de 200 k.Da pourraient contenir l'apo AIV associée aux HDL. Ces particules contiendraient aussi l'apo AI. Alors que la deuxième population de 75 k.Da pourrait contenir l'apo AIV trouvée dans la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine.

Les sous-populations de particules AIV séparées selon leur contenance ou non en apolipoprotéine AI et en apolipoprotéine E, ont des compositions chimiques différentes. La population Lp AIV-AI serait plus dense que les deux autres populations Lp AIV:AI-E et Lp AIV:AI:E. En effet, le rapport lipides

/protéines des particules Lp AIV-AI est égal à 0,33, alors que celui des deux autres populations Lp AIV:AI-E et Lp AIV:AI:E est respectivement égal à 0,67 et 0,96. Le contenu en triglycérides et le rapport lipides/protéines de la population Lp AIV:AI:E sont plus élevés que ceux de la population Lp AIV:AI-E. Sur la base de ces résultats, les Lp AIV-AI seraient plus petites que les Lp AIV:AI-E, qui elles-mêmes seraient plus petites que les Lp AIV:AI:E.

Les apolipoprotéines des particules Lp AIV-AI-E sont représentées essentiellement par l'apo AIV, alors que les Lp AIV:AI-E et les Lp AIV:AI:E contiennent plus d'apo AI que d'apo AIV.

L'activité de la LCAT de la Lp AIV est plus faible que celle de la Lp AI. Par contre, l'activité de la LCAT des particules AIV ne contenant pas l'apo E, est plus grande que celle de la Lp AI-E.

L'apo AIV plasmatique est associée à deux populations de particules lipoprotéiques possédant une mobilité électrophorétique pré-bêta et une masse moléculaire de 75 et 200 k.Da.

Les particules Lp AIV sont hétérogènes selon leur caractère physico-chimique (composition lipidique et apolipoprotéique, taille) et leur potentiel biologique (activité LCAT, stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire [chapitre IV]).

Conclusion

La Lp AI, la Lp AI:AII et la Lp AIV renferment chacune une population de particules lipoprotéiques hétérogènes par leur caractère physico-chimique (composition lipidique et apolipoprotéique, taille) et leur potentiel biologique (interactions avec une protéine cellulaire, activité LCAT).

Les sous-populations de particules contenant l'apo E possèdent plus de triglycérides et pourraient avoir une taille plus grande et une densité hydratée plus faible que celles ne contenant pas d'apo E. Ces sous-populations peuvent être interconvertibles. Les particules ne possédant pas l'apo E peuvent acquérir cette apolipoprotéine en périphérie ou en la recevant des tissus synthétisant l'apo E (via les macrophages) (33). Il est possible que les particules contenant l'apo E deviennent des particules sans apo E.

Le rapport phosphatidylcholine/sphingomyéline, la quantité des acides gras poly-insaturés des phospholipides et l'activité de la LCAT sont plus grands dans la Lp AI-E que dans la Lp AI:AII-E. Ces résultats confirment et affinent le caractère anti-athérogène des HDL accordé à la Lp AI et non à la Lp AI:AII.

La Lp AI du liquide interstitiel possède plus d'apo AIV que son homologue plasmatique. Ceci pourrait lui permettre d'avoir le rôle le plus important pour provoquer l'efflux du cholestérol des cellules périphériques, du fait d'une affinité importante de l'apo AIV pour le récepteur aux HDL.

L'apo AIV n'existe pas sous forme libre, mais elle est associée aux lipides, aux apolipoprotéines et à d'autres protéines plasmatiques. Les particules AIV ont une mobilité électrophorétique pré-bêta. Un grand pourcentage de la masse de ces particules est constitué de protéines. Ceci leur donne une petite taille et une densité hydratée élevée. La Lp AIV-AI-E pourrait représenter la particule simple ; en effet la masse totale de ses apolipoprotéines est constituée d'apo AIV.

CHAPITRE II

METHODE DE DOSAGE DE LA Lp AI

Introduction

Les méthodes pouvant permettre la quantification de la Lp AI sont : l'immunoprécipitation (73,74), l'électroimmunodiffusion à double phase (73) et plus récemment l'immunoenzymologie à double détermination d'antigène (74). Dans le cas de l'électroimmunodiffusion et de l'immunoprécipitation, la Lp AI est quantifiée directement. Par contre, l'immunoenzymologie à double détermination d'antigène n'offre pas un dosage direct de la Lp AI. Dans cette technique, la Lp AI:AII est dosée directement et la valeur de sa concentration est soustraite de celle de l'apo AI totale et la différence correspond à la concentration de la Lp AI. L'immunoprécipitation nécessite une grande quantité d'anticorps. L'électro-immunodiffusion est rendue difficile à cause de la préparation des deux phases.

La méthode d'électroimmunodiffusion différentielle que nous rapportons pour le dosage de la Lp AI, véritable fraction anti-athérogène des HDL, consiste à précipiter près du puits la Lp AI:AII à l'aide des anticorps anti-apo AII présents dans un rapport 10/1 par rapport aux anticorps anti-apo AI. La Lp AI migre plus loin et réagit avec les anticorps anti-apo AI.

Article n°1

**Differential electroimmunoassay
on ready-to use plates
for human Lp AI lipoprotein particles**

Parra H.J., Mezdour H., Ghalim N., Bard J.M. and Fruchart J.C.

Clin. Chem., accepté

DIFFERENTIAL ELECTROIMMUNOASSAY
ON READY-TO-USE PLATES
FOR HUMAN LpA-I LIPOPROTEIN PARTICLES

H-J. PARRA, H. MEZDOUR, N. GHALIM, J-M. BARD ,
and J-C. FRUCHART.

SERLIA et INSERM U. 279, *Institut Pasteur*, 1, rue du Pr Calmette
59019 - LILLE Cédex (France).

Nonstandard abbreviations : Apo A-I, Apolipoprotein A-I ; Apo A-II, Apolipoprotein A-II; HDL, High-density-lipoproteins ; D-EIA, Differential Electroimmunoassay ; TP-EIA, Two Phase Electroimmunoassay ; DA-ELISA, Differential-Antibody Enzyme-linked immunosorbent assay ; IA-ELISA, Immunoaffinity chromatography coupled to ELISA ; CHD, Coronary Heart Disease.

Additional keyphrases : LpA-I: A-II lipoprotein particles - Two Phase Electroimmunoassay- Enzyme linked differential antibody immunosorbent assay - Immunoaffinity chromatography - Polyclonal and monoclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II - Normolipidemic subjects - Atherosclerotic risk.

Abstract :

We describe a method for direct measurement of plasma LpA-I, lipoprotein particles containing Apolipoprotein A-I (Apo A-I) not associated with Apolipoprotein A-II (Apo A-II), by differential electroimmunoassay on ready-to-use plates. By using a very high excess of anti Apo A-II, as compared to anti Apo A-I, lipoprotein particles containing both Apo A-I and Apo A-II (LpA-I:A-II) are retained near by the wells when the LpA-I particles go on migrating and react with anti Apo A-I.

The method is specific, rapid and precise. Intra- and inter-assay CVs at three concentrations (high, medium and low) ranged between 1.5 and 2.7 % and 3.0 and 4.5 %, respectively. Analytical recovery of isolated LpA-I was from 95 to 115 %.

Results correlate well with those obtained by two-phase electroimmunoassay, enzyme-linked differential-antibody immunosorbent assay and immunoaffinity chromatography coupled to ELISA.

The average normolipidemic concentration of LpA-I was 0.60 g/L in 45 women and 0.49 g/L in 40 men.

INTRODUCTION

Several studies using a number of different systems of fractionation have demonstrated that plasma high-density-lipoproteins (HDL) are made of two types of particles ; one containing both Apolipoprotein A-I (Apo A-I) and Apolipoprotein A-II (Apo A-II), and the other Apo A-I but no Apo A-II (1-5). According to the terminology of the protein-family concept, these two groups of lipoprotein particles are called LpA-I:A-II and LpA-I, respectively (6). Recently we have shown, in agreement with earlier data from Fielding and Fielding (7), that LpA-I might be involved in "reverse" cholesterol transport (8), and might represent the "antiatherogenic" fraction of HDL (9).

Procedures for the quantification of these particles, including immunoprecipitation (10), two-phase electroimmunoassay (11), and more recently, enzyme-linked differential - antibody immunosorbent assay (12), have been elaborated. However, these methods suffer from lack of precision, they do not allow direct measurement of LpA-I particles and are time-consuming. Consequently, there is a need for a fast and precise quantification method which can only detect LpA-I particles.

The present study was set up to develop a technique for the measurement of plasma LpA-I particles by differential electroimmunoassay (D-EIA) on ready-to-use plates (Laboratoires Sébia, 92130 Issy-les-Moulineaux, France).

MATERIALS AND METHODS

Plasma samples

In this study, plasma samples were obtained from healthy normolipidemic subjects after a 10 - 12 hr overnight fast. Blood was drawn into vacutainer tubes containing disodium EDTA. On separation of plasma by centrifugation (1500 g), preservatives were promptly added (13). The samples were then immediately used for immunoaffinity chromatography or direct LpA-I quantification.

Isolation and purification of Apo A-I and Apo A-II

HDL were isolated by ultracentrifugation of human normolipidemic plasma as previously described (14). After centrifugation, the HDL were refloated at density 1.21 Kg/L and dialysed 24 h against three changes of 5 mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0). Isolated HDL was delipidated by extraction with ethanol-ether at -20°C . Apo A-I and Apo A-II were then separated by DEAE - Trisacryl chromatography. The purity of the fractions was confirmed by 7% polyacrylamide gel isoelectrofocusing and by immunodiffusion techniques.

Polyclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II

Polyclonal antisera to Apo A-I and to Apo A-II were prepared in rabbits by intraperitoneal administration of the corresponding antigens as described elsewhere (14, 15).

Monoclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II

The production and characterization of monoclonal antibodies to Apo A-I and

Apo A-II have been recently described in our laboratory (16).

Hybridomas were screened for the secretion of specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using microtiter plates coated with Apo A-I, Apo A-II or HDL3, and rabbit anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (Nordic). Positive wells were cloned twice by limiting dilution. Ascitic fluid was prepared by intraperitoneal injection of $2 - 4 \cdot 10^6$ hybridoma cells. Purification of antibodies was performed by ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography on Protein A - Sepharose (Pharmacia). Antibody specificity was determined by immunoblotting according to Towbin et al. (17).

Labeling monoclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II with horseradish peroxidase

The monoclonal antibody conjugates were prepared according to Avrameas (18) using glutaraldehyde as coupling reagent. The monoclonal antibodies chosen for labeling were a mixture of AO3, AO5, A17 and A51 as described (16), and GO3 alone (N. Vu Dac et al., in preparation) against Apo A-I and Apo A-II, respectively.

Plates for differential electroimmunoassay

Suitable concentrations of polyclonal antisera to Apo A-I and to Apo A-II were incorporated in a 0.9% buffered agarose solution at 55°C, poured onto plastic films and allowed to gel at room temperature. Wells, 16 per film, were punched in the gel and the plates were ready to use. The samples were diluted 1:30 in saline and 3 µl of the solution were placed into each well; electrophoresis was then carried out at 12.5 V/cm for 3 h in a buffer containing Tris, Glycine, Barbitol, Sodium Barbitol (7.05 / 5.65 / 0.285 / 1.62 g

per liter ; pH 8.6). By using a very high excess of anti Apo A-II, as compared to anti Apo A-I, LpA-I: A-II particles are retained near by the wells when the LpA-I particles go on migrating and react with anti Apo A-I. After washing for about 18 h, plates were dried and stained with Coomassie Brilliant Blue, and after destaining, "rockets" corresponding to LpA-I: A-II particles (low peaks) and to LpA-I particles (less coloured high peaks) were then visible (Fig. 1).

Isolation of LpA-I and LpA-I: A-II particles by immunoaffinity chromatography

LpA-I: A-II and LpA-I particles were isolated as previously described (12). Briefly, immunoadsorbents were prepared by coupling purified antibodies against Apo A-I or Apo A-II to CNBr-activated Sepharose 4B columns. After coupling, immunoadsorbents were equilibrated with PBS pH 7.4 containing 0.01% EDTA ; 10 ml of fresh plasma were then incubated with anti Apo A-II immunosorbent. LpA-I: A-II particles were recovered in the adsorbed fraction eluted from the column with 10 ml of 3M Sodium Thiocyanate solution ; it was extensively dialyzed against PBS pH 7.4 and tested for presence of Apo A-I and Apo A-II by ELISA (19, 20).

To isolate LpA-I particles, the unretained material was collected, checked for absence of Apo A-II and was applied to the anti Apo A-I immunoaffinity column. The bound fraction was eluted from the immunosorbent as described above and analyzed for Apo A-I.

Primary and secondary standards

LpA-I particles isolated by immunoaffinity chromatography were used as a primary standard. After they were concentrated under reduced pressure, the concentration of Apo

A-I was determined by electroimmunoassay (14). We used this primary standard to measure the concentration of LpA-I in a lyophilized normolipidemic plasma which then acted as a secondary standard.

Specificity and precision

The specificity of the assay was checked by : (i) measuring the concentration of LpA-I in the presence of two - or three - times higher anti Apo A-II concentration in the gel ; (ii) identifying LpA-I and LpA-I:A-II peaks in the gel using peroxidase - labelled monoclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II ; and (iii) running of LpA-I and LpA-I:A-II particles isolated by immunoaffinity chromatography.

Intra-assay precision was estimated by 10 replicate analyses of LpA-I concentrations in three plasma samples containing high, medium and low amounts of LpA-I. The inter-assay precision was assessed by measuring the concentration of LpA-I in the same samples for 6 consecutive working days.

Analytical recovery and comparison methods

To determine the recovery, LpA-I particles isolated by immunoaffinity chromatography, with known contents of Apo A-I, were added to plasma samples of known LpA-I concentrations. These were then electrophoresed.

Results obtained by the proposed method (D - EIA) were compared to those given by two-phase electroimmunoassay (TP-EIA), differential - antibody ELISA (DA - ELISA) and immunoaffinity chromatography coupled to ELISA (IA - ELISA).

Effect of freezing

The effect of freezing was investigated by comparison of LpA-I results utilizing fresh and frozen plasma samples.

Analytical methods

Plasma cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol (after phosphotungstic precipitation) were determined enzymatically (Boehringer, Mannheim, FRG). The assay of apolipoproteins A-I and B was carried out by electroimmunoassay (Sébia, Issy-les-Moulineaux, France) (14). Statistical analysis of the data was performed using the Student's t test or the Mann-Whitney U-test in cases of skewed distributions. Relationships between LpA-I and other lipoprotein parameters were assessed by linear regression analysis.

RESULTS

Optimal assay conditions

The optimal antibodies concentrations in the gel were determined so that the height of the LpA-I rocket was always higher than the LpA-I:A-II one.

Figure 2 depicts calibration curves developed with primary standard (isolated LpA-I particles), lyophilized secondary standard, and 2 different fresh plasma samples. As can be seen, sample dilution yielded curves closely parallel to the primary standard, which allowed the use of our lyophilized plasma as secondary standard.

Specificity and precision

No change in the height of the LpA-I peak was noted in the presence of two- or three-times higher anti Apo A-II concentration in the gel.

After electrophoresis, two similar plates were incubated with the peroxidase - labeled monoclonal antibodies to Apo A-I and Apo A-II, respectively. The first conjugate revealed the two peaks (LpA-I and LpA-I:A-II particles) (Fig. 3A), while the second revealed only one peak corresponding to LpA-I:A-II particles (Fig. 3B).

Figure 4 shows that LpA-I and LpA-I:A-II particles isolated by immunoaffinity chromatography give a unique rocket on electrophoresis.

The intra- and inter-assay coefficients of variation at three concentrations (high, medium and low) ranged between 1.5 and 2.7 % (n=10) and 3.0 and 4.5 % (n=10), respectively.

Analytical recovery and comparison methods

Addition of isolated LpA-I particles to plasma with known concentrations of LpA-I, as determined by the present method (n=3), resulted in a good recovery ranging from 95 to 115 %.

Comparison of LpA-I levels measured on 59 plasma samples by both the D-EIA and TP-EIA yielded a good correlation (Table 1); the mean values were not statistically different as determined by Student's paired-t test. Although the correlation between D-EIA and DA-ELISA was only at the level of 0.69, the relationship between the two systems was

statistically significant ($p < 0.001$). We also compared the proposed method with immunoaffinity chromatography coupled to ELISA, using 10 plasma samples ; as can be seen in Table 1, we found a good correlation between the two methods.

Effect of freezing

A comparison of values of LpA-I obtained from fresh samples as compared to aliquots stored at -20°C ($n=53$) gave very similar results (0.613 ± 0.136 g/l fresh and 0.647 ± 0.162 g/l frozen) with a correlation coefficient of 0.93 ($y = 1.11x - 0.031$; $p < 0.001$).

Plasma LpA-I concentrations in normolipidemic subjects

Plasma LpA-I values in 85 normolipidemic healthy men and women, aged 17 - 54 years, are shown in Table 2, together with their lipid and Apo A-I and B concentrations. As did others (21, 22), we found that concentrations of total cholesterol and Apo B were lower in women than in men while HDL cholesterol and Apo A-I values were higher. For LpA-I particles, statistically significant sex - related differences were seen ; values were increased by 22 % in women as compared to men ($p < 0.0001$).

Correlation coefficients obtained by linear regression analysis for comparisons of the LpA-I concentrations to the other parameters are given in Table 3. There was a significant positive correlation between LpA-I and both HDL cholesterol ($r = 0.673$; $p < 0.001$) and Apo A-I ($r = 0.378$; $p < 0.001$). LpA-I had also a positive correlation with age ($r = 0.215$; $p < 0.05$). On the other hand, triglycerides negatively correlate with LpA-I ($r = -0.301$; $p < 0.01$) and no association was found with either total cholesterol or Apo B.

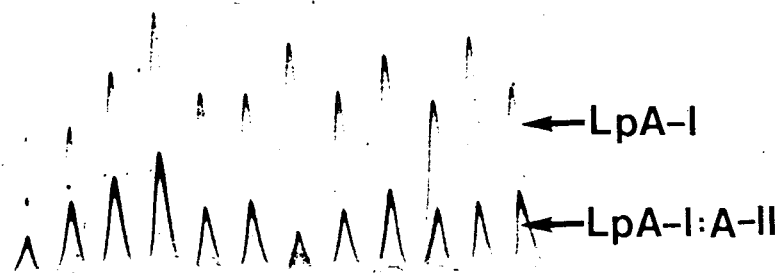


Fig. 1. Fractionation of apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles by differential electroimmunoassay (D-EIA).

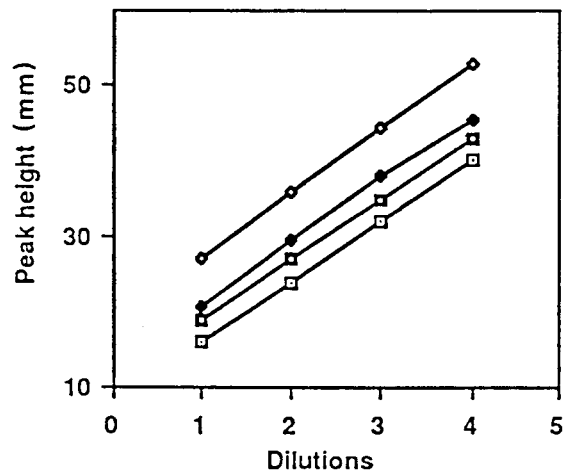


Fig. 2. Calibration curves developed with 2 fresh plasma samples (□ , ▢), lyophilized standard (◆), and isolated LpA-I lipoprotein particles (◇).

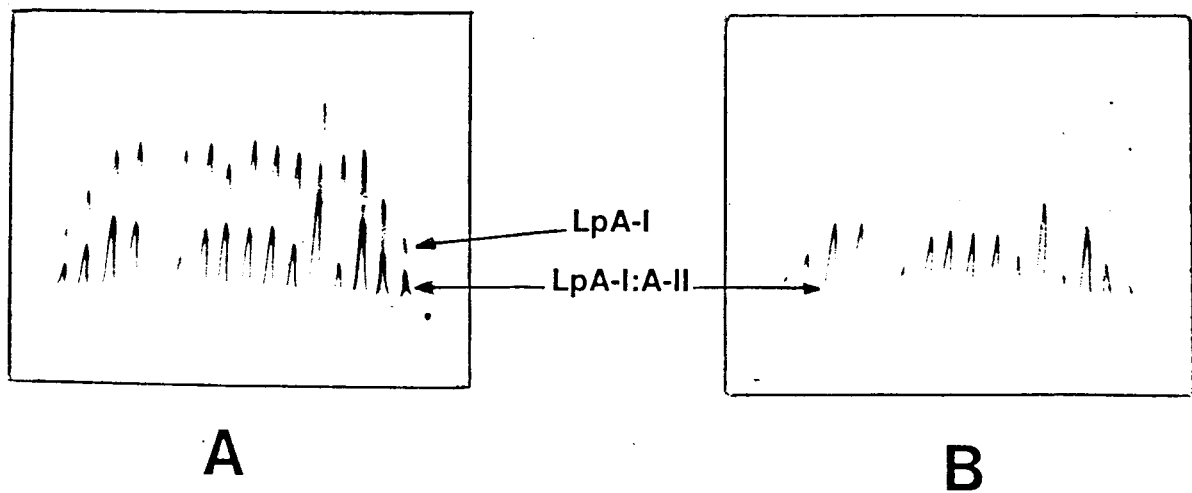


Fig. 3. Identification of LpA-I and LpA-I:A-II peaks in the gel using horseradish peroxidase labeled monoclonal antibodies to Apo A-I (A) and Apo A-II (B), respectively.

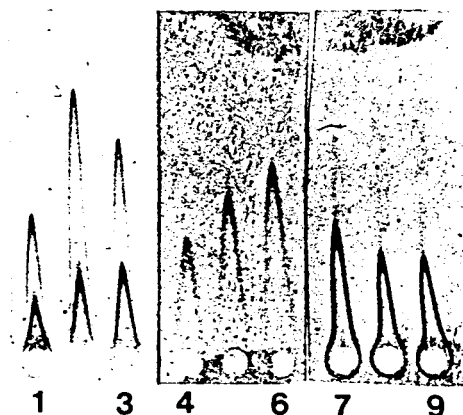


Fig. 4. Differential electroimmunoassay of plasma (1 - 3) and isolated LpA-I (4 - 6) and LpA-I:A-II particles (7 - 9).

Table 1. Comparison Methods : Correlation between Differential Electroimmunoassay (D-EIA), Two-Phase Electroimmunoassay (TP-EIA), Differential ELISA (DA-ELISA) and Immunoaffinity Chromatography Coupled to ELISA (IA-ELISA)

	LpA-I		
	TP-EIA	DA-ELISA	IA-ELISA
LpA-I (D-EIA)	$y=0.924x + 3.92$	$y=0.803x + 0.150$	$y=0.897x + 0.396$
	$n = 59$	$n = 50$	$n = 10$
	$r = 0.977$	$r = 0.69$	$r = 0.896$
	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Table 2. Concentrations of Lipids, ApoA-I and B and LpA-I Lipoprotein Particles in Normolipidemic Subjects.
(Mean $\pm$ Standard Deviation)

	Women (n = 45)	Men (n = 40)
Age, years	29.04 $\pm$ 8.16	29.75 $\pm$ 7.74
Total Cholesterol, mmol/L	5.39 $\pm$ 0.93	5.79 $\pm$ 0.88 ^a
Triglycerides, mmol/L	0.87 $\pm$ 0.28	0.98 $\pm$ 0.31
HDL-Cholesterol, mmol/L	1.68 $\pm$ 0.36	1.54 $\pm$ 0.40 ^a
ApoB, g/L	0.79 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.14 ^b
ApoA-I, g/L	1.33 $\pm$ 0.17	1.20 $\pm$ 0.20 ^b
LpA-I, g/L	0.60 $\pm$ 0.13	0.49 $\pm$ 0.09 ^c

a, b, c Values significantly different from women : ^a p<0.05 ; ^b p<0.01 ; ^c p<0.0001.

Table 3. Correlation of LpA-I Lipoprotein Particles with Age and other Plasma Lipoprotein Constituents (n=85)

	Age	TC	TG	HDL-C	ApoB	ApoA-I
LpA-I	0.215 ^a	0.124	-0.301 ^b	0.673 ^c	-0.198	0.378 ^c

a, b, c These correlations were significant at : ^a p<0.05 ; ^b p<0.01 and ^c p<0.001.

TC = Total Cholesterol ; TG = Triglycerides ; HDL-C = HDL-Cholesterol ; Apo = Apolipoprotein.

DISCUSSION

Many epidemiological studies have shown a strong negative correlation between plasma HDL cholesterol concentrations and the risk of coronary heart disease (CHD). In the last decade, much attention has been paid to the clinical significance of Apo A-I, the major protein of HDL, which appears to be a better predictor of CHD than HDL cholesterol (23, 24). Recently, the discovery of molecular properties of the apolipoproteins led to their use as specific markers for lipoprotein classification (6). So, several research groups have demonstrated that human HDL is comprised of at least two well - characterized types of Apo A-I - containing lipoproteins : lipoproteins containing Apo A-I and Apo A-II (LpA-I:A-II) and lipoproteins containing Apo A-I but no Apo A-II (LpA-I) (2, 3, 10-12, 25, 26). Recently we have shown that the protective effect of HDL is due to LpA-I particles while LpA-I:A-II may have little or no effect (8, 9). As suggested by these findings, determinations of plasma LpA-I levels will probably become an important diagnostic test in the assessment of premature atherosclerotic disease.

In the present report we describe the development of a precise, specific and reproducible technique utilizing differential - electroimmunoassay (D-EIA) for direct determination of plasma LpA-I lipoprotein particles. The assay is inexpensive, easy to initiate and reagents used are widely available (Laboratoires Sébia, 92130 Issy-les-Moulineaux, France) and can be stored for a long time within the laboratory ; it requires no special sample pretreatment. Moreover, frozen samples can be used without any statistically significant change in the results.

As shown in Figures 2 and 4, LpA-I particles in whole fresh or lyophilized plasma, and LpA-I particles isolated by immunoaffinity chromatography react similarly in our D-EIA system ; the parallelism obtained in dilution curves lends validity to the use of a lyophilized secondary standard.

In this study, LpA-I concentrations for normolipidemic subjects were nearly in the range we found using differential-antibody ELISA (DA-ELISA) (12) which, however, gives slightly higher values, probably due to differences stemming from the methods used to assign values to the secondary standard.

Results indicated in Tables 2 and 3 are in agreement with our previous studies in that 40 to 45 % of total plasma Apo A-I are in the form of LpA-I (12), and that LpA-I is strongly positively correlated with HDL cholesterol and Apo A-I, and negatively correlated with triglycerides (9).

Finally, the system described here can provide specific and reproducible determinations of plasma LpA-I lipoprotein particles ; it will be of great interest in the evaluation of atherosclerotic risk in population studies, and in the assessment of dyslipoproteinemic states. Such evaluations are currently in progress in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS : We thank Mr F. Bellon from Sébia Laboratories (Issy-les-Moulineaux, France) for providing excellent technical assistance.

LpA-I Lipoprotein quantification

REFERENCES

1. Norfeldt PIP, Olofsson SO, Fager G, and Bondjers G. Isolation and partial characterization of the lipoprotein families A and A-I from high-density lipoproteins of human serum. *Eur J Biochem* 1981 ; 118 : 1-8.
2. Nestruck AC, Niedmann PD, Wieland H, and Seidel D. Chromatofocusing of human high density lipoproteins and isolation of lipoproteins A and A-I. *Biochim Biophys Acta* 1983 ; 753 : 65-73.
3. Cheung MC, and Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography ; particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 12201-9.
4. Kunitake ST, La Sala KJ, and Kane JP. Apolipoprotein A-I - containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J Lipid Res* 1985 ; 26 : 549-55.
5. Cheung MC, Segrest JP, Albers JJ, Cone JT, Brouillette CG, Chung BH, Kashyap M, Glasscock MA, and Anantharamaiah GM. Characterization of high density lipoprotein subspecies : structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *J Lipid Res* 1987 ; 28 : 913-29.
6. Alaupovic P. Conceptual developments of the classification systems of plasma lipoproteins. *Fluids Proc Colloq* 1972 ; 19 : 9-19.

LpA-I Lipoprotein quantification

7. Fielding CJ, and Fielding PE . Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin : cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 3911-4.
8. Barbaras R, Puchois P, Fruchart J C, and Ailhaud G. Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpA-I particles but not by LpA-I:A-II particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 ; 142 : 63-9.
9. Puchois P, Kandoussi A, Fiévet P, Fourrier JL, Bertrand M, Koren E, and Fruchart JC. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987 ; 68 : 35-40.
10. Cheung MC, and Albers JJ. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition : particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res* 1982 ; 23 : 747-53.
11. Atmeh RF, Shepherd J , and Packard CJ. subpopulations of apolipoprotein A-I in human high density lipoproteins. Their metabolic properties and respons to drug therapy. *Biochim Biophys Acta* 1983 ; 751: 175-88.
12. Koren E, Puchois P, Alaupovic P, Fesmire J, Kandoussi A, and Fruchart JC. Quantification of two types of apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles in plasma by enzyme-linked differential-antibody immunosorbent assay. *Clin Chem* 1987 ; 33 : 38-43.

LpA-I Lipoprotein quantification

13. Edelstein C, and Scanu AM. Precautionary measures for collecting blood destined for lipoprotein isolation. In : Segrest JP, Albers JJ, eds. Methods in enzymology. Plasma lipoproteins. Part A : Academic Press INC, 1986 : 151-5.
14. Fruchart JC, Kora I, Cachera C, Clavey V, Duthilleul P, and Moschetto Y. Simultaneous measurement of plasma apolipoproteins A-I and B by electroimmunoassay. Clin Chem 1982 ; 28 : 59-62.
15. Kora I, Vanhoutte G, Parra H, Bermann MC, Cachera C, Clavey V, Puchois P, Fruchart JC. Dosage de l'apolipoprotéine A-II sérique par électroimmunodiffusion sur plaques prêtes à l'emploi. Applications cliniques. Ann Biol Clin 1984 ; 42 : 349-53.
16. Betard C, Vu-Dac N, Mezdoor H, Nestruck AC, Leroy A, and Fruchart JC. Standardization of an enzymometric assay for apolipoprotein A-I by using mixtures of monoclonal antibodies. J Clin Chem Clin Biochem 1987 ; 25 : 893-9.
17. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets : procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979 ; 76 : 4350-4.
18. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry 1969 ; 6 : 43-52.
19. Koren E, Puchois P, McConathy WJ, Fesmire JD, and Alaupovic P. Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-I by a non competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chim Acta 1985 ; 147 : 85-95.

LpA-I Lipoprotein quantification

20. Puchois P, Kandoussi A, Duriez P, Fruchart J C, McConathy WJ, Koren E. Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-II by a non competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* 1986 ; 7(4) : 285-307.

21. Rouffy J, Chanu B, Bakir R, Hermand M. Lipides, lipoprotéines, ménopause et traitement hormonal substitutif. *Hormones* 1984 ; 1 : 17-26.

22. Alaupovic P, McConathy WJ, Fesmire JD. Apolipoprotein profiles of dyslipoproteinemic states. In : Lippel K, ed. *Proceedings of the workshop of apolipoprotein quantification*. Bethesda, MD 20205 : NIH publ. n°. 83 - 1266, National Heart, Lung and Blood Institute, 1983 : 27-53.

23. Maciejko JJ, Holmes DR, Kottke BA, Zinsmeister AR, Dinh DM, and Mao SJT. Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. *N Engl J Med* 1983 ; 309 : 385-9.

24. Brunzell JD, Sniderman AD, Albers JJ, and Kwiterovich Jr PO. Apoproteins B and A-I and coronary artery disease in humans. *Arteriosclerosis* 1984 ; 4 : 79-83.

25. Ohta T, Hattori S, Nishiyama S, and Matsuda I. Studies on the lipid and apolipoprotein compositions of two species of Apo A-I - containing lipoproteins in normolipidemic males and females. *J Lipid Res* 1988 ; 29 : 721-8.

26. Barkia A, Puchois P, Ghalim N, Barbaras R, Torpier G, Ailhaud G, Fruchart JC. Differential role of apolipoprotein A-I containing particles in cholesterol efflux from adipose cells. *Arteriosclerosis* 1988 ; submitted

Conclusion

La méthode d'électroimmunodiffusion différentielle que nous rapportons pour le dosage de la Lp AI est précise, spécifique et reproductible. Elle est surtout facilitée par l'utilisation de plaques prêtes à l'emploi et par les réactifs, livrés dans un coffret par la Société SEBIA. De plus, elle ne demande aucun traitement des échantillons. Cette méthode est actuellement utilisée dans notre laboratoire et est déjà commercialisée par la firme SEBIA.

Les variations de la concentration en Lp AI ont été décrites par Atmeh et coll. (73) et Puchois et coll. (120). Les premiers auteurs ont observé une augmentation de la concentration en Lp AI chez les sujets traités à l'acide nicotinique et une diminution chez ceux traités au probucol. Les deuxièmes auteurs ont rapporté, chez des sujets à coronaires lésées, une diminution de la Lp AI, qui traduit celle en apo AI, mais avec un degré de signification plus élevé. Cependant, plusieurs études ont montré des rapports différents apo AI/apo AII dans le plasma (56, 57, 58, 61), suggérant ainsi des concentrations différentes de la Lp AI sous divers états pathologiques. L'électroimmunodiffusion différentielle, avec ses avantages et sa corrélation avec les autres méthodes de dosage, devrait répondre aux questions concernant la concentration et la distribution de la Lp AI dans les différents états physiologiques et pathologiques.

Nous avons trouvé 40 à 45 % de la concentration totale plasmatique en apo AI sous la forme Lp AI chez les sujets normolipémiques. Cette valeur est en accord avec celle rapportée par Puchois et coll. (120) et Atmeh et coll. (73). Les concentrations plasmatiques en Lp AI sont différentes entre les hommes et les femmes. La Lp AI est plus élevée chez les femmes. En effet la Lp AI se retrouve principalement dans les HDL₂. L'augmentation de la Lp AI chez les femmes ne peut être que le reflet des concentrations plus élevées des HDL₂ pour ce sexe.

Nous avons observé une corrélation positive entre la concentration de la Lp AI et celle du cholestérol des HDL et

apo AI et une corrélation négative entre la concentration de la Lp AI et celle des triglycérides plasmatiques. Cette dernière constatation laisse supposer que les particules Lp AI peuvent provenir des produits du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Cette proposition pourrait lier le risque d'athérosclérose à la clairance défectueuse des triglycérides plasmatiques.

CHAPITRE III

**ALCOOL ET PATHOLOGIE
CARDIOVASCULAIRE**

Introduction

L'augmentation de la concentration du cholestérol des HDL est l'une des premières manifestations des troubles du métabolisme lipidique observée lors de l'absorption d'alcool. Cette augmentation est assez mystérieuse, en raison du rôle protecteur des HDL vis à vis de l'athérosclérose.

Dans un premier article, nous exposerons et discuterons les principaux travaux étudiant l'effet de la consommation d'alcool sur les maladies cardiovasculaires. Nous analyserons d'une façon objective les arguments avancés par certains auteurs pour attribuer à l'alcool un effet anti-athérogène.

Dans un deuxième article, nous analyserons les variations de la Lp AI et de la Lp AI: AII sous l'effet de l'alcool pour pouvoir attribuer à sa consommation un effet athérogène ou anti-athérogène.

Article n°2

**L'alcool a-t-il un effet athérogène ou anti-athérogène ?
Analyse des données épidémiologiques et biochimiques**

Ghalim N., Hugot-Puchois A., Puchois P., Parra H.J. and Fruchart J.C.

Presse Médicale, soumis, Juin 1989

L'ALCOOL A-T-IL UN EFFET ATHEROGENE OU ANTIATHEROGENE ?

Analyse des données épidémiologiques et biochimiques

Nordine GHALIM , Annick HUGOT-PUCHOIS, Pascal PUCHOIS ,
Henri-Joseph PARRA , Jean-Charles FRUCHART

Correspondance : Professeur Jean-Charles FRUCHART
Service de Recherche sur les Lipoprotéines
et l'Athérosclérose (SERLIA) et INSERM U325

Institut Pasteur
1 rue du Professeur Calmette
59019 Lille Cédex

FRANCE

RESUME

Les résultats des différentes études épidémiologiques et cliniques parues depuis 1980 et étudiant l'effet de la consommation d'alcool sur les maladies cardiovasculaires sont assez contradictoires. Bien que la majorité des auteurs mettent en évidence un certain effet protecteur de la consommation d'alcool et plus particulièrement de vin contre l'athérosclérose, il n'est pas possible en raison des limites méthodologiques de ces études d'établir de façon définitive une relation de cause à effet.

Les études biochimiques ont permis de cerner de façon plus précise l'effet de l'alcool sur le mécanisme de l'athérosclérose. La plupart des auteurs mettent en évidence une augmentation des HDL sous l'effet d'une consommation régulière d'alcool. Cependant, une analyse plus fine de leurs sous fractions et notamment des HDL₂ dites lipoprotéines antiathérogènes conduit à des résultats contradictoires. L'identification exacte des particules lipoprotéiques antiathérogènes des HDL devrait à l'avenir permettre de préciser les conséquences physiopathologiques d'une consommation régulière d'alcool. Les données épidémiologiques et biochimiques sont actuellement encore insuffisantes pour attribuer à la consommation d'alcool un effet antiathérogène.

SUMMARY

The results of epidemiological and clinical studies which have appeared since 1980 analyzing the effect of alcohol intake on coronary artery disease are largely contradictory. Although, a certain protective role of alcohol consumption was described by several authors, particularly in wine consumption against atherosclerosis. It is not possible to establish firmly a cause-effect relationship because of the methodological limits of these studies.

Biochemical studies have enabled a more precise approach of alcohol effect on the atherosclerosis mechanism. An increase of HDL have been shown in the case of regular alcohol consumption. However, a detailed analysis of the HDL sub-fractions, concerning the HDL₂ designated as an antiatherogenic lipoproteins, gives rise to equally contradictory results. The exact identification of antiatherogenic lipoproteins particles in HDL should allow future specification of the consequences of regular alcohol intake. Biochemical and epidemiological information is still actually insufficient to give to alcohol consumption an antiatherogenic effect.

INTRODUCTION

Lorsque le processus de fermentation fut découvert, les liquides issus de ce procédé ont servi à des fins diverses. Historiquement, l'alcool a surtout été utilisé comme remède contre de nombreuses maladies. Dans la Grèce antique, le vin était un médicament. Hippocrate le prescrivait comme antipyrétique, purgatif et diurétique. Plus tard, le vin fut recommandé pour désinfecter l'eau impure, source de choléra. L'alcool est probablement le plus vieil analgésique, il a été utilisé il y a des siècles pour calmer la douleur lors des interventions chirurgicales. Heberden, en 1786 (1) rapporta que le vin et certaines liqueurs pouvaient être des remèdes contre l'angine.

Au travers de l'histoire, les effets bénéfiques d'une consommation modérée d'alcool, mais également les effets nuisibles d'une consommation excessive ont été rapportés. L'alcool a souvent été considéré comme "un jouet de Satan" plutôt qu'un "don de Dieu" (2). Il est en effet largement reconnu que la consommation excessive de boissons alcoolisées accroît le risque de cirrhose, d'hypertension artérielle, de cardiomyopathies, de foetopathies et de certains types de cancers (3).

Le concept qu'une consommation modérée d'alcool pourrait être bénéfique n'est pas nouveau. Il y a plus d'un demi-siècle, Pearl (4) a observé que l'espérance de vie était généralement plus élevée chez les buveurs modérés que chez les abstinents. Depuis, de nombreux auteurs ont essayé d'étudier l'effet de l'alcool sur la mortalité due aux maladies cardiovasculaires et de lui attribuer un rôle protecteur dans l'athérogénèse.

Les études épidémiologiques réalisées jusqu'en 1980 pour tenter d'élucider le rôle de l'alcool dans l'athérosclérose ont pour la plupart mis en évidence un effet protecteur de celui-ci contre les maladies cardiovasculaires, bien que leurs conclusions soient discutables.

Jusqu'en 1980, cet effet protecteur de l'alcool a été essentiellement attribué, sur le plan biochimique, à l'augmentation des HDL plasmatiques (High Density Lipoproteins) dites lipoprotéines antiathérogènes. A l'époque, cette observation avait d'ailleurs amené certains auteurs à suggérer de "boire du whisky pour faire du bon cholestérol".

Nous essaierons ici de faire le point sur les nouvelles données épidémiologiques et biochimiques apparues depuis 1980 et concernant cet effet protecteur de l'alcool contre les maladies cardiovasculaires.

Le but de cette revue n'est pas de répondre de façon catégorique à la question : l'alcool a-t-il un effet athérogène ou anti-athérogène ? mais d'analyser de façon objective les arguments avancés par certains auteurs pour attribuer à l'alcool un effet anti-athérogène.

cardiovasculaires dans 51 juridictions américaines entre 1969 et 1978. Mais la diminution de la mortalité par maladies cardiovasculaires attribuée à la consommation de vin peut être également liée à une diminution de la consommation de tabac et d'acides gras saturés dans cette période. Aussi comme l'indique Skog (32) il apparaît nécessaire de tenir compte de l'ensemble des covariables dans ce genre d'étude épidémiologique.

Yano (33) en étudiant une population de japonais vivant à Hawaï trouva uniquement une incidence bénéfique de la consommation de bière sur la mortalité par maladies cardiovasculaires. Alors qu'en Yougoslavie aucune différence entre le vin et la bière n'a été trouvée (34).

Un meilleur effet protecteur du vin comparativement à la bière a été trouvé par Brenn (35) en Norvège.

Nanji (36), trouva dans 27 pays, non seulement un effet bénéfique de la consommation de vin sur la mortalité par maladies cardiovasculaires ($r = - 0,75$ $p < 0,001$) mais également un effet plutôt néfaste de la consommation de bière ($r = + 0,60$ $p < 0,001$).

En 1986, Nanji (37) étudia les variations des taux de mortalité cardiovasculaire survenues entre 1970 et 1980 dans 22 pays en fonction des changements de la consommation globale de vin et de bière dans chaque pays. Les résultats confirment ce qu'il avait précédemment trouvé, à savoir une forte incidence de la bière sur le taux de décès par maladies cardiovasculaires ($r = 0,32$ $p < 0,05$) et un effet protecteur du vin ($r = - 0,50$ $p < 0,01$).

Cette relation avec la nature de l'alcool consommé n'a cependant pas pu être mise en évidence en 1986 par Friedman et coll. (21) dans le cadre de l'étude de Framingham.

COMMENTAIRES

Un skieur de fond âgé de 103 ans, Herman Smith Johanson à qui était demandé le secret de sa longévité répondit : "rester actif mentalement et physiquement, ne pas trop boire mais ne pas boire trop peu" (27). Cette réponse est peut être la conclusion que l'on peut tirer au premier abord des résultats des études épidémiologiques. En effet les résultats recueillis depuis 1980, bien que mitigés, suggèrent dans l'ensemble, l'existence d'une étroite relation entre la consommation d'alcool et les maladies cardiovasculaires. Cependant comme l'indiquent Baum-Baicher en 1985 (23) et Ferrence en 1986 (8) les preuves épidémiologiques sont pour l'instant insuffisantes pour pouvoir accorder de façon définitive à la consommation d'alcool un effet protecteur contre l'athérosclérose. Certes, la plupart des études épidémiologiques mettent en évidence cette étroite relation mais aucune ne peut formellement aboutir à une relation de cause à effet. Ceci est essentiellement lié aux problèmes rencontrés lors de toutes les études épidémiologiques nutritionnelles. Bien que les protocoles d'étude utilisés par les différents auteurs soient des mieux définis à l'origine, il existe trop de covariables non contrôlées

ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

La plupart des données épidémiologiques recueillies jusqu'à présent sont basées sur les taux de mortalité ou de morbidité des maladies cardiovasculaires.

En 1982, Ashley (5) a réalisé une revue des études cliniques et épidémiologiques portant sur les relations entre la consommation d'alcool et les cardiopathies ischémiques. Les résultats de la plupart de ces études, qu'elles soient prospectives ou rétrospectives mettent en évidence les effets protecteurs de l'alcool contre les maladies cardiovasculaires mais n'apportent pas de preuves formelles de cet effet. Ainsi, dans plusieurs études, les résultats obtenus après autopsie d'une population composée de sujets alcooliques n'ont pas mis en évidence de façon indiscutable une plus faible proportion de lésions anatomopathologiques d'athérosclérose par rapport à une population témoin. Concernant les études prospectives (9-23) les résultats sont encore contradictoires. Bien que la plupart de ces études aient mis en évidence une relation négative entre la consommation d'alcool et les maladies cardiovasculaires, il en existe certaines qui n'ont pas abouti aux mêmes résultats (6,7).

Les études cliniques n'ont pas démontré de façon probante l'existence de l'effet protecteur de l'alcool (24,25,26).

Ashley conclue que malgré l'existence d'une certaine relation négative, on ne peut conclure à une relation de cause à effet entre la consommation d'alcool et les maladies cardiovasculaires.

Depuis cette revue générale, des résultats d'autres études prospectives ont été rapportés (8).

BIERES, VINS ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Les études qui ont mis en évidence une relation négative entre les maladies cardiovasculaires et la consommation d'alcool trouvent pour la plupart des grandes variations en fonction de la nature de l'alcool consommé (27, 28).

St Léger et coll. (28) ont rapporté une relation négative uniquement avec le vin et aucune avec la bière. Ils ont suggéré que cet effet protecteur du vin était lié à la présence de certains composants aromatiques ou d'autres ingrédients. Laporte (27) retrouva le même phénomène.

Schmidt et Popham (29, 30) ont rapporté des résultats beaucoup plus mitigés et ils estiment que de telles études sont difficiles à réaliser en raison du grand nombre de covariables. En effet la consommation régulière de tel ou tel type d'alcool s'accompagne généralement de changements dans les habitudes de vie et d'alimentation qu'on ne peut pas négliger.

Werth en 1980 (31) a trouvé une forte corrélation négative entre la consommation de vin et la mortalité par maladies

lors de telles enquêtes. Il est en effet difficile de connaître dans de telles études épidémiologiques la part des facteurs psychologiques, sociaux et alimentaires qui peuvent être essentiels et prédisposants pour le développement de l'athérosclérose.

Ferrence (8) indique que l'un des premiers problèmes à résoudre dans les études épidémiologiques prospectives est d'assurer de façon continue dans le temps, un mode d'estimation de la consommation d'alcool, identique à plusieurs années d'intervalle. Cette donnée essentielle est un élément fondamental de la validité de ce genre d'études épidémiologiques. Il faut d'ailleurs noter que selon les auteurs, le mode d'estimation de la consommation d'alcool est différent. Certains réalisent un interrogatoire rétrospectif sur 1 mois, d'autres sur 3 jours et d'autres sur 1 journée.

L'estimation de la consommation d'alcool lors d'études rétrospectives est encore plus difficile. L'estimation de la consommation récente et préalable à l'hospitalisation peut être sous estimée en raison de l'état maladif du sujet. En effet, la consommation d'alcool, récente dans ce cas, ne correspond pas forcément à celle ingérée régulièrement dans les dernières années. Enfin, l'estimation de la consommation d'alcool par l'intermédiaire des proches du sujet est difficilement validable.

La plupart des études tiennent compte de l'âge, du sexe, de la consommation tabagique, de la tension artérielle, du poids et de l'exercice. Comme le suggère Ferrence (8) d'autres facteurs d'appariement devraient être à l'avenir pris en considération tels que la prise de médicaments ou de contraceptifs chez les femmes, mais surtout la composition de l'alimentation des sujets. La consommation d'alcool est en effet souvent associée à une diminution de celles de thé ou de café (75), de certaines protéines, de calcium, de vitamines A, B et C, d'acides gras saturés, de sucre, de fer, et de végétaux (76) qui peuvent être responsables directement (diminution de l'incidence de l'athérosclérose) ou indirectement (augmentation des autres causes de maladies) de la baisse de la mortalité cardiovasculaire observée chez les buveurs modérés.

Les facteurs psychologiques et socio-économiques sont également des composants essentiels à maîtriser. En effet, le stress, la position sociale et son environnement psychologique sont des variables importantes et connues pour être plus ou moins liées à l'apparition des maladies cardiovasculaires. La difficulté de réaliser une enquête épidémiologique idéale, prospective ou rétrospective, où toutes ces covariables seraient prises en compte, sera certainement un facteur limitant pour pouvoir à l'avenir mettre en évidence une relation de cause à effet.

Pour l'ensemble de ces raisons, il n'est actuellement pas possible d'après les données épidémiologiques, d'attribuer de façon catégorique à l'alcool un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires.

DONNEES BIOCHIMIQUES

Pour expliquer l'effet protecteur possible de l'alcool vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, 3 mécanismes biologiques sont évoqués :

- diminution de l'agrégation plaquettaire par inhibition de la libération du Thromboxane A2 qui normalement stimule l'agrégation plaquettaire (38) ;
- augmentation de l'activité fibrinolytique par stimulation de la sécrétion de l'activateur du plasminogène (39) ;
- augmentation des lipoprotéines HDL, qui interviennent dans le transport "reverse" du cholestérol.

Les travaux sur les 2 premiers mécanismes sont beaucoup moins nombreux que ceux réalisés sur les HDL. Une attention toute particulière a été donnée depuis 1980 à leurs sous-fractions et notamment aux HDL₂ qui d'après certains auteurs pourraient représenter la fraction spécifique antiathérogène des HDL.

Afin d'évaluer cet effet protecteur de l'alcool dû à l'augmentation des HDL, 3 protocoles d'étude peuvent être utilisés. En effet on peut envisager d'examiner :

- 1 - les modifications des concentrations plasmatiques des lipoprotéines observées après une consommation d'alcool régulière pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines (les sujets étant abstinents auparavant), on appellera ce genre d'études : "études dynamiques" ;
- 2 - les modifications des concentrations plasmatiques des lipoprotéines observées chez les sujets alcooliques après une période d'abstinence, on appellera ce genre d'études : "études par restriction" ;
- 3 - les concentrations plasmatiques des lipoprotéines chez des sujets ayant une consommation d'alcool élevée comparativement à des sujets ayant une consommation d'alcool plus faible, on appellera ce genre d'études : "études statiques".

Dans notre revue des études parues depuis 1980, nous avons écarté les travaux dans lesquels :

- les effets à court terme de l'alcool sur les concentrations plasmatiques des lipoprotéines étaient évalués (suivi de 0 à 12 heures après l'ingestion d'alcool) (phase aiguë) ;
- des sujets hyperlipémiques étaient inclus. En effet il est reconnu que la consommation massive d'alcool peut favoriser l'apparition de certaines hyperlipoprotéïnémies notamment des types IV et V qui sont potentiellement athérogènes. Or l'influence bénéfique de l'alcool via l'augmentation des concentrations plasmatiques des HDL n'est suggérée que pour les consommations modérées d'alcool ;
- des sujets présentant des signes cliniques et biologiques d'insuffisance hépatocellulaire. En effet l'atteinte hépatocellulaire secondaire à la consommation d'alcool (massive

et/ou à long terme) entraîne une diminution des concentrations plasmatiques des HDL (diminution de synthèse hépatique). Inclure de tels sujets pourrait donc biaiser les résultats obtenus.

MODIFICATIONS DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES APRES CONSOMMATION REGULIERE D'ALCOOL : "ETUDES DYNAMIQUES"

RESULTATS

Thornton et coll. (40) en 1983 ont évalué l'effet de la consommation d'alcool (39 g/jour pendant 6 semaines) sur le cholestérol HDL (méthode par précipitation au phosphotungstate), chez 12 sujets normolipémiques connus pour avoir une très faible consommation d'alcool. Les concentrations en cholestérol HDL augmentèrent de 25 % en fin d'étude ($p < 0,01$).

Fraser et coll. (41) ont également réalisé le même genre d'étude sur 6 sujets masculins (35 g/jour pendant 3 semaines). Une augmentation de 13,3 % des concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) a été observée. Il en est de même pour les concentrations en apo AI (+ 5,8 %) et AII (+ 16,5 %) (dosage par radioimmunologie).

8 sujets masculins, abstinents durant les 2 semaines précédant l'étude, ont absorbé pendant 5 semaines, 31 g d'alcool/jour. Couzigou et coll. (42) ont observé lors de cette étude une augmentation de l'apo AI (13 %) et une augmentation du cholestérol HDL variable selon la méthode utilisée (24,8 % pour la méthode à l'héparine manganèse, 23 % pour la méthode au phosphotungstate, 7,8 % pour la méthode électrophorétique Helena).

En 1984, Crouse et coll. (43) ont analysé le plasma de 12 sujets masculins abstinents pendant 6 semaines et ayant consommé par la suite 90 gr d'alcool par jour pendant 4 semaines. Les concentrations en cholestérol HDL augmentèrent de 14,2 % ($p < 0,002$) (méthode par précipitation à l'héparine manganèse).

4 hommes et 2 femmes ont été inclus dans l'étude de Schneider réalisée en 1985 (44). Après 4 semaines d'abstinence suivies de 4 semaines d'une consommation journalière de 75 g d'alcool, les concentrations en cholestérol HDL augmentèrent de près de 40 % ($p < 0,04$) (ultracentrifugation).

Malmendier et coll. (45) ont fait consommer de l'alcool de façon régulière à 7 sujets masculins pendant 2 semaines. Ils n'observèrent pas de modification du cholestérol HDL (méthode par précipitation de Lopes-Virella (89)). Par contre les concentrations en apo AI augmentèrent de 11,5 % (dosage par électroimmuno-diffusion).

En 1985, Camargo et coll. (46) ont étudié une population constituée de 12 sujets masculins abstinents pendant 6 semaines. Après 5 semaines de prise d'alcool (35 g en moyenne/jour) les concentrations plasmatiques des apo AI et AII (dosage par immunodiffusion radiale) augmentèrent respectivement de 14,1 % et

20,2 %. Les concentrations en cholestérol HDL n'ont pas été déterminées.

Masarei et coll. en 1986 (47) ont réalisé une analyse quantitative plus fine des constituants des HDL. Après 6 semaines d'une consommation faible d'alcool (4500 ml à 0,9 % par semaine), 24 sujets reprirent pendant 6 semaines une consommation hebdomadaire d'alcool accrue (4500 ml à 5 %). Les concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) HDL₂ et HDL₃ (méthode de précipitation de Gidez (88)) augmentèrent respectivement de 11,8 %, 27,5 % et 8,8 %. Une augmentation de l'apo AI de 14,7 % et de l'apo AII de 18,3 % a été également notée (dosage immunoturbidimétrique).

Hartung et coll. (48) ont étudié en 1986, 18 "joggers" féminins entraînées (32 kms par semaine). Avant l'étude, ces femmes se sont abstenues de boire de l'alcool pendant 3 semaines. Après cette période d'abstinence, elles ont consommé 35 g d'alcool/jour pendant 3 semaines. Le même protocole a été suivi par 18 femmes sédentaires. Dans les 2 groupes étudiés, aucune augmentation significative du cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) HDL₂, HDL₃ et de l'apo AI (dosage radioimmunologique) n'a été trouvée.

COMMENTAIRES

Le nombre de sujets étudiés par les différents auteurs est relativement faible, variant entre 6 et 24.

A l'exception de Malmendier et coll. (45) et Hartung et coll. (48) qui n'observent pas d'augmentation des concentrations du cholestérol HDL, l'élévation du cholestérol HDL (7,8 % à 40 %) est généralement retrouvée, indépendamment de la méthode de dosage utilisée. Les résultats obtenus par les premiers auteurs pourraient s'expliquer par la période assez courte de consommation d'alcool (2 semaines) par rapport aux autres travaux. Quant à Hartung et coll. (48), il est possible que leurs résultats puissent s'expliquer par l'inclusion exclusive de femmes dans leur étude.

Lorsque les dosages des apo AI et AII ont été réalisés, l'augmentation de l'apo AII a toujours été trouvée supérieure à celle de l'apo AI (16,5 % contre 5,8 % (41), 20,2 % contre 14,1 %, (46) et 18,3 % contre 14,7 % (47)).

Dans aucune des études, une diminution du cholestérol LDL ou de l'apo B (lorsque ceux-ci sont déterminés) (42, 43, 45, 47, 48) n'a été observée. Seuls Schneider et coll. (44) trouvèrent une légère augmentation du LDL cholestérol mais le nombre de cas étudiés était de 6.

Concernant l'analyse des sous fractions HDL₂ et HDL₃, un auteur a trouvé une augmentation, à la fois des HDL₂ et HDL₃ (47) alors qu'une autre étude n'a mis en évidence aucune modification (48). Sur les 9 études que nous avons rapportées ici, 5 auteurs suggèrent

d'après leurs résultats un effet protecteur de l'alcool via l'augmentation des HDL (40, 42, 44, 46, 47). Les autres auteurs ne se prononcent pas.

MODIFICATIONS DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES APRES ABSTINENCE : "ETUDES PAR RESTRICTION"

RESULTATS

Barboriak et coll. (49) en 1980 ont analysé les variations du cholestérol HDL chez 20 sujets "alcooliques" (15 hommes et 5 femmes). Les concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) ont diminué de 45 % chez les hommes et de 25 % chez les femmes après 3 semaines d'abstinence.

A nouveau, Barboriak et coll. en 1981 (50) dans le même genre d'étude analysèrent d'autres paramètres des HDL chez 8 hommes après 8 semaines d'abstinence. Les concentrations en cholestérol HDL diminuèrent de 24 %, celles de l'apo AI de 23,6 %, et celles de l'apo AII de 25 %.

En 1981, Devenyi et coll. (51) ont également déterminé les concentrations d'HDL chez 15 sujets masculins consommateurs réguliers d'alcool (90 g/jour). Après 2 semaines d'abstinence, les concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) diminuèrent significativement de 29 %. Ils notèrent également une augmentation significative de près de 39 % du cholestérol LDL (formule de Friedewald).

Rosseneu et coll. (52) en 1982 ont inclus dans leur étude 6 sujets masculins, indemnes de toute insuffisance hépatique. Après 3 semaines d'abstinence, aucune modification des concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation au phosphotungstate de Na) et en apo B n'a été observée. Par contre, bien que statistiquement non significative, une diminution des AI (11 %) et AII (12 %) a été notée (méthode immunonéphélométrique).

En 1982, 10 sujets "alcooliques" masculins ont fait l'objet de l'étude de Taskinen (53). La panoplie des paramètres évalués était plus complète que lors des études précédentes. Après 15 jours d'abstinence, les concentrations en cholestérol HDL, HDL₂ et HDL₃ (ultracentrifugation) diminuèrent significativement de 44 %, 53 % et 34 % respectivement. Cette diminution des HDL₂ et HDL₃ affectait également leur contenu en apo AI et AII : diminution des apo AI et AII de 40 % dans les HDL₂, diminution des apo AI et AII de 25 % dans les HDL₃ (dosage par immunodiffusion radiale).

En 1983, Perier et coll. (54) ont analysé le cholestérol HDL (méthode par précipitation à la concanavalline A) chez 118 sujets (115 hommes et 3 femmes) rentrés volontairement en cure de désintoxication alcoolique. La diminution du cholestérol HDL était de 29 % après 4 semaines de désintoxication.

L'effet de la prise d'alcool en fonction de l'activité physique

a été examiné par Hartung et coll. en 1983 (55) : 16 marathoniens, 15 "joggers" et 13 hommes sédentaires ont été incorporés dans leur étude. Après 3 semaines d'abstinence, une diminution significative de 16 % du cholestérol HDL n'a été observée que chez les sujets inactifs (méthode par précipitation à l'héparine manganèse). Les auteurs concluent que la consommation d'alcool et l'exercice physique ont les mêmes effets sur les HDL, puisque les concentrations en cholestérol HDL chez les "joggers" après abstinence étaient semblables à celles des sujets sédentaires avant abstinence. D'après ces auteurs, la consommation de 3 bières par jour pourrait être une alternative à l'exercice physique pour augmenter les HDL.

Haskell et coll. en 1984 (56) étudièrent 12 sujets masculins après 6 semaines d'abstinence. Ils ont pu mettre en évidence une légère diminution du cholestérol HDL de 13 % (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) : diminution qu'ils ont attribuée uniquement à celle des HDL₃ (-14 %) et non à celle des HDL₂ (ultracentrifugation).

En 1985, Camargo et coll. ont pu mettre en évidence chez 12 sujets masculins, après 6 semaines d'abstinence, une diminution de 11 % de l'apo AI et de 12 % de l'apo AII (dosage par immunodiffusion radiale).

30 sujets indemnes de toute insuffisance hépatique mais consommateurs réguliers d'alcool ont été étudiés avant et après 3 semaines d'abstinence. Leurs concentrations en cholestérol HDL ont diminué de 49 % (méthode par précipitation au phosphotungstate de Na) et leurs concentrations en apo AI et AII ont chuté de 24 % (dosage par immunophénélométrie) (57).

Masarei et coll. (47) ont pu montrer chez 45 sujets masculins une diminution du cholestérol HDL de 12 % (méthode par précipitation à l'héparine manganèse), une diminution de 12 % de l'apo AI et une diminution de 15 % de l'apo AII (dosage par immunoturbidimétrie).

En 1986, Hartung et coll. (48) ont évalué l'effet de l'abstinence sur 18 femmes "joggers" et sur 18 femmes sédentaires. Aucune différence n'a été observée pour le cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) ainsi que pour l'apo AI (dosage radioimmunologique).

Toujours en 1986, Välimäki et coll. (58) ont étudié 12 sujets masculins après une période d'abstinence de 8 jours. Le cholestérol HDL a diminué de 33 % (ultracentrifugation), le cholestérol HDL₂ de 46,3 % et le cholestérol HDL₃ de 15,8 %. La diminution majoritaire des HDL₂ a été attribuée par les auteurs à une baisse de l'activité de la lipoprotéine lipase.

Enfin Cushman et coll. (59) ont rapporté dernièrement que 2 semaines d'abstinence étaient suffisantes pour retrouver les concentrations normales en cholestérol HDL, en apo AI et AII, à l'inverse de l'apo CIII qui était encore anormalement élevée après

4 semaines d'abstinence.

COMMENTAIRES

A l'exception des études réalisées par Rosseneu et coll. (52) et Hartung et coll. (48) tous les auteurs ont observé une diminution des HDL après abstinence. Il faut cependant noter que les 6 sujets étudiés par Rosseneu présentaient tous des taux de gammaglutamyltransférase normaux à l'entrée de l'étude, mettant en doute par conséquent leur réelle intoxication alcoolique. Quant à Hartung et coll., ils n'étudièrent que des sujets féminins.

A l'image des études dynamiques, les concentrations en apo AII (quand celles-ci étaient déterminées) ont été trouvées plus sensibles à la restriction d'alcool que celles de l'apo AI.

Le nombre de sujets étudiés varie selon les études entre 6 et 45. Seuls Perier et coll. (54) étudièrent un nombre élevé de cas ($n = 118$). Cependant le dosage du cholestérol HDL a fait appel lors de cette étude à une méthode par précipitation à la concanavaline A qui ne correspond pas forcément à l'isolement de lipoprotéines comparables à celles non précipitées par les polyanions ou à celles isolées par ultracentrifugation.

Concernant les 2 sous fractions HDL₂ et HDL₃, les résultats sont assez discordants selon les études. Un auteur attribue la diminution des HDL uniquement aux HDL₂ (58), un autre l'attribue aux HDL₃ (56) et 2 autres à l'ensemble des 2 sous fractions HDL₂ et HDL₃ (47, 53). Hartung n'a cependant pas pu mettre en évidence de variation des 2 sous fractions (48).

Ces résultats discordants n'apparaissent pas être d'ordre méthodologique puisque Taskinen et coll. (53), Haskell et coll. (56) et Välimäki et coll. (58) utilisèrent comme méthode d'isolement des HDL₂ et HDL₃ l'ultracentrifugation séquentielle.

CONCENTRATIONS DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES CHEZ DES SUJETS CLASSES EN FONCTION DE LEUR CONSOMMATION D'ALCOOL : "ETUDES STATIQUES"

RESULTATS

Ernst est l'un des auteurs qui étudia sur un nombre très élevé de sujets ($n = 4855$ âgés de 20 à plus de 60 ans) les variations du cholestérol HDL en fonction de la consommation d'alcool. Cette étude a été réalisée dans le cadre de la LRC "Lipid Research Clinics" (60). Les concentrations étaient mesurées par la méthode LRC (précipitation par l'héparine manganèse après ultracentrifugation). Une bonne corrélation entre les concentrations de cholestérol HDL et la consommation d'alcool a été trouvée ($r = 0,2$; $p < 0,001$).

Toujours dans le cadre de cette étude de la LRC, seuls les sujets âgés de 12 à 19 ans ont été étudiés par Glueck et coll.

(61). Le même effet de la consommation d'alcool sur les concentrations d'HDL, décrit par Ernst, a été également observé dans cette tranche d'âge.

Gordon et coll. (62) en 1981, à nouveau dans le cadre de cette étude LRC et sur 4003 autres sujets, trouva une corrélation significative ($r = 0,21$ $p < 0,05$). Les concentrations en cholestérol HDL étaient plus élevées ($p < 0,05$) chez les buveurs que chez les non buveurs (+ 30 % chez les sujets âgés de 30 à 69 ans).

Barboriak en 1980 (49) étudia 92 sujets "alcooliques" (1587 g d'alcool absolu par jour) (68 hommes de 37 ± 15 ans et 24 femmes de 42 ± 5 ans). Les concentrations en cholestérol HDL trouvées chez ces sujets étaient statistiquement supérieures ($p < 0,01$) à celles d'une population témoin (+ 38 % chez les hommes, + 33 % chez les femmes).

Craig et coll. en 1981 (63) analysèrent le plasma de 40 sujets masculins classés en 3 groupes selon leur consommation d'alcool (12 buveurs légers, 14 modérés, 14 excessifs). Une augmentation du cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) de 30 % ($p < 0,01$) a été notée entre buveurs légers et modérés (12 "drinks" par semaine). Cependant aucune différence significative n'a été trouvée entre buveurs légers et buveurs excessifs (33 "drinks" par semaine). Aucune corrélation entre le cholestérol HDL et la consommation d'alcool d'une part ($r = -0,02$) et les taux de GGT d'autre part ($r = 0,15$) n'a été trouvée.

Schmitt (64) et Avogaro (65) ont réalisé en 1982 une analyse quantitative plus fine des HDL chez les sujets "alcooliques", en dosant notamment les apolipoprotéines, mais les sujets étudiés présentaient des signes d'atteinte hépatique.

Rosseneu en 1982 (52) n'a trouvé aucune différence pour le cholestérol HDL (méthode par précipitation au phosphotungstate), les apo AI et AII (dosage immunonéphélométrique) chez 6 sujets "alcooliques" par rapport à une population témoin.

Malmendier et coll. en 1983 (73) ont rapporté des concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation au phosphotungstate) et en apo AI et AII (électroimmunodiffusion) plus élevées chez 28 sujets "alcooliques" comparativement à une population témoin.

Taskinen et coll. (53) évaluèrent les HDL ainsi que leurs sous fractions HDL₂ et HDL₃ (ultracentrifugation) chez 10 sujets "alcooliques". Une augmentation de 54 % ($p < 0,05$) du cholestérol HDL a été attribuée essentiellement à l'augmentation des HDL₃ (+ 34 %, $p < 0,01$) mais aussi à celle des HDL₂ (+ 6,7 %, NS).

En 1983, Jacqueson et coll. (66) ont analysé les plasmas de 640 sujets masculins âgés de 22 à 56 ans. Les concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse) sont corrélées à la consommation d'alcool uniquement chez des

sujets âgés de plus de 30 ans ($r = 0,20$ $p < 0,05$). L'augmentation moyenne du cholestérol HDL est de 10 % entre sujets abstinents et "alcooliques".

En 1984, Haskell et coll. (56) publiaient une étude dans le "New England Journal of Medicine" dans laquelle 12 sujets consommateurs réguliers d'alcool étaient comparés à 12 sujets abstinents. Une augmentation des HDL (+ 15 % $p < 0,05$) essentiellement liée aux HDL₃ (+ 16 %) a été trouvée, alors qu'aucune modification des HDL₂ n'a été remarquée (ultracentrifugation).

Une analyse des différents constituants des HDL fut réalisée en 1984 par Duhamel et coll. (67). Ceux-ci comparèrent 10 sujets "alcooliques" à 9 sujets non "alcooliques". Les concentrations en apo AI (+ 38 %, $p < 0,02$), apo AII (+ 66 %, $p < 0,01$) (immunodiffusion radiale), et HDL₂ (+ 108 %, $p < 0,01$) ont été trouvées plus élevées dans le premier groupe alors que dans ce même groupe les HDL₃ étaient diminuées (- 10 %, NS) (ultracentrifugation). En évaluant les apo AI et AII des HDL₂ et HDL₃, ils observèrent chez les sujets "alcooliques" un enrichissement en apo AII par rapport à l'apo AI (HDL₂ : apo AI + 148 %, apo AII + 193 %, $p < 0,01$; HDL₃ : apo AI + 29 %, apo AII + 59 %, $p < 0,01$). Les apo AI et AII ont été dosées par immunodiffusion radiale.

Haffner et coll. (74) étudièrent également les mêmes paramètres que Duhamel et coll., chez 33 hommes et 17 femmes "alcooliques". Ils ne comparèrent pas ces 2 groupes à des sujets témoins mais réalisèrent uniquement une étude corrélative entre les différents paramètres dosés et la consommation alcoolique. Chez les hommes, la consommation d'alcool est corrélée au cholestérol HDL ($r = 0,455$, $p < 0,05$) et au cholestérol HDL₂ ($r = 0,322$, $p < 0,05$) (cholestérol HDL₃ ($r = 0,248$, NS)) alors que chez les femmes elle est corrélée au cholestérol HDL ($r = 0,537$, $p < 0,05$) et au cholestérol HDL₃ ($r = 0,586$, $p < 0,01$) (cholestérol HDL₂ ($r = 0,266$, NS)). Les apo AI et AII (immunodiffusion radiale) sont corrélées dans les 2 sexes à la consommation d'alcool ($r = 0,45$ $p < 0,05$). En tenant compte de la consommation tabagique, une corrélation n'a été obtenue que pour les HDL₃.

Breier et coll. (68) en 1984 comparèrent 7 sujets "alcooliques" à 10 témoins. Chez les "alcooliques", le cholestérol HDL (ultracentrifugation zonale) n'est pas augmenté. Aucune anomalie de répartition des HDL₂ et HDL₃ n'a été observée. Cependant une augmentation significative du contenu en apolipoprotéine AII des HDL₂ a été notée ($p < 0,05$).

Comparant 79 sujets alcooliques" à 100 témoins, nous avons (69) pu mettre en évidence chez les alcooliques une augmentation du cholestérol HDL (+ 21 %, $p < 0,01$) (méthode par précipitation au phosphotungstate), de l'apo AI (+ 6,5 %, $p < 0,01$), et surtout de l'apo AII (+ 45 %, $p < 0,001$) (électroimmunodiffusion).

dosage du cholestérol HDL fait appel à une méthode de précipitation par le PEG 6000. De plus 23 % des sujets "alcooliques" présentaient une insuffisance hépatique. Enfin Breier (68) n'étudia que 7 sujets.

En ce qui concerne les sous fractions d'HDL, HDL₂ et HDL₃, les résultats, comme pour les autres types d'étude, sont assez discordants selon les auteurs. Duhamel (67) attribue l'augmentation des HDL à celle des HDL₂ alors que Taskinen (53) et Haskell (56) l'attribuent uniquement à celle des HDL₃. Le nombre de sujets étudiés dans tous les cas est faible (10 à 12). Breier (68) n'observe aucune anomalie de répartition des 2 sous fractions (n = 7). Par contre, dans les 2 seules études où un nombre relativement élevé de sujets ont été inclus, l'augmentation n'est attribuée qu'aux HDL₃ : (n = 77 pour réf. (70) / n = 366 pour réf. (72)).

Dans l'étude de Haffner (74) la consommation d'alcool est également mieux corrélée avec les HDL₃ qu'avec les HDL₂, dans la population féminine.

L'analyse quantitative des protéines spécifiques des HDL montre que l'apo AII a une valeur discriminante plus intéressante que l'apo AI. En effet, dans tous les cas où les apolipoprotéines ont été déterminées (67, 69, 70, 71, 73) l'augmentation de l'apo AII est plus importante que celle de l'apo AI. De plus les concentrations en apo AII sont mieux corrélées avec la consommation d'alcool que celles en apo AI (70). Il faut également noter, dans les résultats présentés par Breier (68) et Duhamel (67), un net enrichissement des HDL₂ en apo AII.

En 1987, nous avons dosé les lipides, les lipoprotéines et les apolipoprotéines chez 90 sujets adultes de sexe masculin, consommateurs intempérants d'alcool (400 g d'éthanol/semaine) et 90 témoins (consommation d'alcool < 250 g/semaine) appariés en âge, sexe et index corporel. L'analyse univariée a montré que la GGT et les concentrations d'apolipoprotéine A-II et phospholipides des lipoprotéines ne contenant pas l'apo B étaient les variables les plus significativement différentes entre témoins et buveurs excessifs (90).

Williams et coll. (70) étudièrent en 1985 une population constituée de 77 sujets masculins âgés de 30 à 55 ans. Une corrélation a été trouvée entre la consommation d'alcool et le cholestérol HDL (méthode de LCR) ($r = 0,31$, $p < 0,001$), HDL₃ ($r = 0,47$, $p < 0,0001$) (ultracentrifugation), l'apo AI ($r = 0,25$, $p < 0,05$) et l'apo AII ($r = 0,37$, $p < 0,0001$) (immunodiffusion radiale). Aucune corrélation n'a été trouvée avec les HDL₂.

Dans leur étude publiée en 1986, Hurt et coll. (71) ont comparé les concentrations en cholestérol HDL (précipitation par le PEG 6000), et en apo AI et AII (radioimmunologie) obtenues chez 59 sujets "alcooliques" masculins à celles obtenues chez 140 sujets non "alcooliques". Aucune différence n'a été observée pour le cholestérol HDL ni pour l'apo AII. Curieusement, seule l'apo AI est retrouvée, plus faible chez les "alcooliques" (- 10 %, $p < 0,001$). Par contre, en comparant 13 femmes "alcooliques" à 145 femmes non "alcooliques", les auteurs ont noté uniquement une augmentation significative de l'apo AII (+ 21 %, $p < 0,001$).

Robinson et coll. (72) ont étudié les concentrations en cholestérol HDL (méthode par précipitation à l'héparine manganèse), cholestérol HDL₂ et HDL₃ (méthode de Gidez) dans 4 groupes différents, définis par leur consommation respective en alcool (inférieure à 1 verre par jour, $n = 148$ / 1 à 2 verres par jour, $n = 75$ / 3 à 5 verres par jour, $n = 101$ / plus de 6 verres par jour, $n = 32$). Les concentrations en cholestérol HDL sont augmentées de 7 % entre le groupe 1 et le groupe 4 mais cette augmentation n'est significative que pour les HDL₃ (+ 10 %, $p < 0,001$) ; quant aux HDL₂, elles ne sont pas modifiées. L'étude corrélative avec la consommation d'alcool ne fait que confirmer ces résultats (HDL₃ : $r = 0,261$, $p < 0,001$; HDL₂ : $r = 0,156$). Malheureusement aucun appariement pour le sexe et l'âge n'est mentionné entre les différents groupes par les auteurs, de même que le contenu en gramme d'alcool d'un "drink".

COMMENTAIRES

A l'exception de Rosseneu (52), Hurt (71) et Breier (68) tous les auteurs ont observé des concentrations en cholestérol HDL plus élevées chez les sujets consommateurs réguliers d'alcool que chez les sujets abstinents.

Il faut cependant remarquer que Rosseneu et coll. (52) n'ont étudié que 6 cas. Quant à Hurt et coll. (71), leur méthode de

Tableau I : Consommation d'alcool et Chol-HDL

Auteurs	Réf	Sujets	Etudes	Résultats
Barboriak et coll. 1980	49	15 hommes 5 femmes	3 semaines d'abstinence Précipitation à l'héparine manganèse	baisse Chol-HDL : hommes 45 % femmes 25 %
	50	8 hommes	8 semaines d'abstinence Précipitation à l'héparine manganèse	baisse Chol-HDL 24%
	49	68 hommes 24 femmes	1587 g d'alcool absolu par jour Précipitation à l'héparine manganèse	augmentation Chol-HDL : hommes 38% (p < 0,01) femmes 33% (p < 0,01)
Ernst et coll. 1980	60	4855 sujets âgés de plus de 20 ans	Dans le cadre de la LRC "Lipid Research Clinics" Précipitation par l'hépa- rine manganèse	sujets âgés de 50 à 69 ans: Alcool Chol-HDL ml / jour mg / dl 0 42 0,01-16,89 48 16,6-42,24 51 42,25-48,50 55 Corrélation R=0,2 ; p<0,001 Les non buveurs avaient un Chol-HDL plus faible que les abstiens pendant l'étude.
Gordon et coll. 1981	62	4003 sujets	LRC	Verres Chol-HDL d'alcool / jour mg / dl 0 41,9 0,01 - 1,5 47,6 1,6 - 3,8 50,7 3,9 - 7,5 55,3 Corrélation R=0,21 ; p<0,05 Le Chol-HDL augmente de 30% chez les buveurs par rapport aux non buveurs.
Angelico et coll. 1982	86	520 hommes âgés de 40 à 59 ans	Projet de Rome sur la prévention de l'athérosclérose	Verres Chol-HDL d'alcool / jour mg / dl 0 - 2 50 2,1 - 4,1 52 4,5 - 6,6 55 6,7 + 58

Tableau I suite : Consommation d'alcool et Cho-HDL

Auteurs	Réf	Sujets	Etudes	Résultats
Thornton et coll. 1983	40	12 hommes	39 g d'alcool / jour pendant 6 semaines Précipitation au phosphotungstate	Cho-HDL augmente de 7 mg / dl
			6 semaines d'abstinence	Cho-HDL baisse de 8 mg / dl
Hartung et coll. 1983	55	15 hommes "joggers" 16... "marathoniens" 13... sédentaires	1065 ml de bière / jour pendant 3 semaines précipitation par l'héparine manganèse	Cho-HDL augmente de 9 mg / dl uniquement chez les sédentaires
			3 semaines d'abstinence précipitation à l'héparine manganèse	Cho-HDL baisse de 8 mg/dl uniquement chez les sédentaires
Donahue et coll. 1985	87	hommes et femmes âgés en moyenne de 22 ans	verres d'alcool / jour	Cho-HDL mg/dl hommes femmes
			0	44 54
			1 - 2	47 54
			2 +	51 53

Tableau II : Consommation d'alcool et HDL2 - HDL3

Auteurs	Réf	Nombre de sujets	Consomm. d'alcool	Type d'étude et méthode	Durée de l'étude	Résultats
Taskinen et coll. 1982	53	10 hommes 28 à 40 ans	non précisée	restriction ultracentrifugation	2 semaines	baisse HDL2 (53 %, $p < 0,005$) baisse HDL3 (34 %, $p < 0,005$)
		10 hommes 28 à 40 ans	non précisée	statique ultracentrifugation	2 semaines	augmentation HDL2 (6,7 %, NS) augmentation HDL3 (34 %, $p < 0,01$)
Haskell et coll. 1984	56	12 hommes 30 à 60 ans	35 g / jour	restriction ultracentrifugation	6 semaines	baisse HDL2 (3 %, NS) baisse HDL3 (13 %, $p < 0,005$)
			35 g / jour	statique ultracentrifugation	6 semaines	augmentation HDL3 (16 %, $p < 0,05$)
Duhamel et coll. 1984	67	10 hommes 28 à 60 ans	supérieure à 100 g / jour pendant 5 ans	statique ultracentrifugation	5 semaines	augmentation HDL2 (108 %, $p < 0,001$) baisse HDL3 (10 %, NS)
Breier et coll. 1984	68	7 hommes 47 à 55 ans	135 g / jour	statique ultracentrifugation		pas de différence
Haffner et coll. 1984	74	33 hommes 17 femmes 28 à 64 ans	etude correlative	statique précipitation de Gidez et ultracentrifugation		HDL2 homme $R = 0,322$ $p < 0,05$ HDL2 femme $R = 0,266$; NS HDL3 homme $R = 0,248$; NS HDL3 femme $R = 0,586$, $p < 0,01$

Tableau II suite : Consommation d'alcool et HDL2-HDL3

Williams et coll. 1985	70	77 hommes 30 à 55 ans	20 g/jour	statique ultracentri- fugation		HDL2 R = 0,17 ; NS HDL3 R = 0,47 p < 0,0001
Yälimäki et coll. 1986	58	12 hommes 32 à 46 ans	pas précisée	restriction ultracentri- fugation	8 jours	baisse HDL2 (46,3 % , p < 0,05) baisse HDL3 (15,8 % , NS)
Masarei et coll. 1986	47	24 hommes 25 à 55 ans	32 g / jour	dynamique précipitation de Gidez	6 semaines	augmentation HDL2 (27,5 % , p < 0,01) augmentation HDL3 (8,8 % , p < 0,001)
Hartung 1986	48	18 femmes 30 à 45 ans	10 g / jour	restriction	3 semaines	pas de différence
Robinson et coll. 1987	72	366 hommes	etude correlative	statique précipitation de Gidez	3 semaines	HDL2 R = 0,156 p < 0,005 HDL3 R = 0,261 p < 0,001

Tableau III : Consommation d'alcool et apolipoprotéines AI et AII

Auteurs	Réf	Sujets	type de l'étude	Alcool	Résultats
Barboriak et coll. 1981	50	8 hommes	Restriction	Abstinence pendant 8 semaines après une consommation de 250 ± 100 ml d'alcool / j	baisse : apo AI 23,6 % apo AII 25 % apo AI / apoAII 30,7 % augmentation : apo B 12,5 %
Taskinen et coll. 1982	53	10 hommes	Restriction	Abstinence pendant 15 jours	baisse : apo AI et apo AII dans les HDL2 de 40 % apo AI et Apo AII dans les HDL3 de 25 %
Rosseneu et coll 1982	52	6 hommes	Restriction	Abstinence pendant 3 semaines	baisse : apo AI 11 % apo AII 12 %
Fraser et coll. 1983	41	6 hommes	Dynamique	35g d'alcool par jour pendant 3 semaines	augmentation : apo AI 5,8 % apo AII 16,5 %
Puchois et coll. 1984	69	53 hommes 26 femmes	Statique	450g d'alcool par semaine	augmentation : apo AI 6,5 % (p<0,01) apo AII 45 % (p<0,001)
Couzigou et coll. 1984	42	8 hommes	dynamique	31g de vin par jour pendant 5 semaines	augmentation : apo AI 13 % apo B non modifiée
Malmendier et coll. 1985	45	7 hommes	dynamique	60 - 70 g d'alcool/jour (Vodka ou Gin) pendant 2 semaines	augmentation : apo AI 11,5 %

Tableau III suite : Consommation d'alcool et apolipoprotéines AI et AII

Williams et coll 1985	70	77 hommes	statique	Etude correlative	La consommation d'alcool est corrélée à : apo AI $R=0,25; p<0,05$ apo AII $R=0,37$; $p<0,0001$
Camargo et coll 1985	57	12 hommes	Restriction	abstinence pendant 6 semaines	baisse : apo AI 11 % apo AII 12 %
			Dynamique	35g d'alcool par jour pendant 5 semaines	augmentation : apo AI 14,1 % apo AII 20,2 %
Haffner et coll 1985	74	33 hommes 17 femmes	Statique	Etude corrélative	La consommation d'alcool est corrélée aux : apo AI et apo AII $R=0,45; p<0,05$
Hurt et coll 1986	71	59 hommes	Statique		baisse : apo AI 10 %; $p<0,001$
		13 femmes	Statique		augmentation : apo AII 21 %; $p<0,001$
Masarei et coll 1986	47	24 hommes	Dynamique	33g d'alcool par semaine	augmentation : apo AI 14,7 % apo AII 18,3 %

DISCUSSION

La mise en évidence de l'effet protecteur de l'alcool par les études épidémiologiques a été renforcé quand une augmentation des concentrations des HDL circulantes apparut comme un mécanisme possible de protection contre l'athérosclérose. Une augmentation des HDL sous l'effet d'une consommation d'alcool a été retrouvée par l'ensemble des auteurs et ceci indépendamment des protocoles d'études utilisés ("dynamique", "restriction", "statique").

Quand le rôle des HDL dans le transport "reverse" du cholestérol et leur effet antiathérogène ont été suggérés par Miller et Miller (77), il était raisonnable d'émettre l'hypothèse selon laquelle la diminution des maladies cardiovasculaires chez les consommateurs réguliers d'alcool était liée à l'augmentation des HDL, induite par l'alcool.

Les HDL sont très hétérogènes (79) et il n'est pas évident de déterminer quelles sont les différentes entités métaboliques présentes au sein des HDL responsables de l'élévation du cholestérol HDL. Un certain nombre d'auteurs se sont notamment intéressés à la quantification de 2 sous fractions lipoprotéiques des HDL caractérisées par des propriétés physicochimiques différentes (densité, précipitabilité par les polyanions) : les HDL₂ et HDL₃. L'approche des différents auteurs consistait à définir la part de responsabilité des HDL₂ et HDL₃ dans l'élévation du cholestérol HDL, sachant que les HDL₂ pourraient représenter la fraction spécifiquement antiathérogène des HDL (78) alors que les HDL₃ n'auraient aucun rôle dans cet effet protecteur des HDL. Les résultats sont très contradictoires selon les études (tableau II) et ceci indépendamment des protocoles d'études et des méthodes de dosage utilisées. Certains auteurs ont attribué l'augmentation des HDL aux 2 sous fractions, d'autres à l'une des 2 sous fractions (HDL₂ ou HDL₃). Le problème qui peut être soulevé dans une telle démarche est de savoir si l'identification des sous fractions isolées par ultracentrifugation correspond réellement à de véritables entités qui peuvent avoir une signification métabolique in vivo. A ce sujet on se doit de mentionner que la classification des lipoprotéines en fonction de leur densité est très discutée depuis 1980 par certains auteurs. En effet, depuis les travaux d'Alaupovic (79), la classification des lipoprotéines plasmatiques en fonction de leur composition en apolipoprotéines (partie intelligente des lipoprotéines) apparaît plus adéquate pour étudier le métabolisme et la physiopathologie des lipoprotéines.

Dans une telle classification les lipoprotéines des HDL très hétérogènes ne sont plus subdivisées en fonction de leur densité hydratée mais en fonction de leur composition en apolipoprotéines. C'est ainsi qu'il a été montré que les HDL contiennent 2 principaux types de particules lipoprotéiques, celles qui contiennent à la fois les apo AI et AII (Lp AI: AII) et celles qui contiennent les apo AI mais non les apo AII (Lp AI). Utilisant ce concept de particules lipoprotéiques, nous avons pu montrer lors d'études cliniques et d'études in vitro que seule la Lp AI avait un effet

antiathérogène en intervenant dans le transport "reverse" du cholestérol (80, 81, 82). Nous avons utilisé à nouveau cette approche originale de l'étude du métabolisme des HDL pour analyser les variations de ces 2 particules Lp AI et Lp AI:AII sous l'effet de la consommation d'alcool. 350 sujets masculins ont été classés en fonction de leur consommation respective d'alcool dans 5 groupes (0 à 200 gr par semaine, 200 à 400, 400 à 600, 600 à 800, supérieur à 800 gr par semaine). Les résultats ont confirmé l'existence de l'augmentation du cholestérol HDL et des apo AI et AII sous l'effet de l'alcool. Concernant les variations des 2 particules lipoprotéiques Lp AI et Lp AI:AII, nous avons observé une augmentation de la Lp AI:AII et une diminution de la Lp AI (83) ; ceci suggère que l'augmentation des HDL généralement observée chez les buveurs traduit en fait celle de la Lp AI:AII et masque une diminution de la Lp AI, véritable fraction antiathérogène des HDL et par conséquent, en aucun cas, l'effet bénéfique de l'alcool (si il existe) accordé par les épidémiologistes ne peut s'expliquer sur le plan biochimique par les modifications affectant le métabolisme des HDL. Certes ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres auteurs qui utiliseront la même démarche d'analyse moléculaire des lipoprotéines : le concept des particules lipoprotéiques. On peut cependant déjà noter que la plupart des auteurs qui ont évalué l'apolipoprotéine AII, lors de leur étude ont observé une forte augmentation des concentrations en apolipoprotéine AII comparativement à celle en apolipoprotéine AI. Cette augmentation n'est peut-être pas étrangère à l'augmentation de la Lp AI:AII.

CONCLUSION

Au travers de l'histoire de l'humanité, les divers alcools ont été largement consommés pour leur goût et leurs effets hallucinogènes. La consommation d'alcool a souvent été, à juste titre, déconseillée en raison de ses effets nocifs sur la santé (cirrhose). Il pourrait être argumenté que ces effets nocifs ne s'observent que lors de consommations excessives alors qu'au contraire pour des consommations modérées, l'effet de l'alcool pourrait être bénéfique notamment vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Les études épidémiologiques ont pu mettre en évidence, dans certaines circonstances mais avec quelques lacunes méthodologiques, un effet protecteur de l'alcool et plus particulièrement du vin. Cependant comme le signale Lieber dans le "New England Journal of Medicine" dans un article intitulé "To drink or not to drink" (84), il est à l'heure actuelle prématuré et hasardeux d'attribuer à une consommation modérée d'alcool un effet prophylactique vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Les données épidémiologiques et biochimiques sont en effet insuffisantes. De plus il ne faut pas oublier que même modérée la consommation d'alcool a des effets nocifs : foetopathies, troubles psychologiques, hypertension, cocarcinogène avec le tabac (85).

REFERENCES

- 1 - Heberden. W., Coll. Physicians (London), 1786, 2, 59.
- 2 - Rosenman S., Am Imago, 1955, 12, 241.
- 3 - Berkelman R.L., Ralston M., Herndon J., Gwinn M., Bertolucci D. and Dufour M., Patterns of Alcohol Consumption and Alcohol-related morbidity and mortality. Morbidity and Mortality weekly report, 1985, 35, 1-5.
- 4 - Pearl R., Alcohol and Longevity. Sci. Monthly, 1938, 242, 117.
- 5 - Ashley H.J., Alcohol consumption, Ischemic Heart Disease and cerebrovascular disease. An epidemiological perspective. J. Stud. Alcohol, 1982, 43, 869-887.
- 6 - Friedman G.D., Dales L.G. and Ury H.K., Mortality in middle aged smokers and non smokers. New Engl. J. Med., 1979, 300, 213-217.
- 7 - Morris J.N., Kagan A., Patilison D.C., Garner M.J. and Raffle P., Incidence and prediction of ischemic heart disease in London busmen. Lancet, 1966, 2, 553-559.
- 8 - Ferrence R.G., Truscott S. and Whitehead P.C., Drinking and the prevention of coronary heart disease : Findings, Issues and Public health policy. J. Stud. Alcohol, 1986, 47, n°5, 394-408.
- 9 - Marmot M.G., Rose G., Shipley M.J. and Thomas B.J., Alcohol and mortality : A u-shaped curve. Lancet, 1981, 1, 580-583.
- 10 - Wigfiekd W.J. and Hill W.J., Alcohol and mortality. Lancet, 1981, 1, 1052.
- 11 - Tofler O.B. and Woodings T.L., A 13 year follow-up of social drinkers. Med. J. Aust., 1981, 2, 479-481.
- 12 - Cullen K., Stenhouse N.S. and Wearne K.L., Alcohol and mortality in the Busselton study. Int. J. Epidemiol., 1982, 11, 67-70.
- 13 - Salonen J.T., Puska P. and Nissinen A., Intake of spirits and beer and risk of myocardial infarction and death a longitudinal study in Eastern Finland. J. Chron. Dis., 1983, 36, 533-543.
- 14 - Gordon T. and Kannel W.B., Drinking habits and cardiovascular disease : The Framingham Study. Amer. Heart. J., 1983, 105, 667-667.
- 15 - Kagan A., Yano K., Rhoads G. and Mc Gee D.L., Alcohol and cardiovascular disease : The Hawaiian experience. Circulation,

- 1981, 64 (Suppl 3), 27-31.
- 16 - Yano K., Reed D.M. and Mc Gee D.L., Ten year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program : Relationship to biologic and lifestyle characteristics. Amer. J. Epidemiol., 1984, 119, 653-666.
 - 17 - Kittner S.J., Garcia-Palmieri M.R., Costas R.Jr, Cruzvidal M., Abbott R.D. and Haulik R.J., Alcohol and coronary heart disease in Puerto Rico. Amer. J. Epidemiol., 1983, 117, 538-550.
 - 18 - Mc Gee D.L., Reed D.M., Yano K., Kagan A. and Tillotson J., Ten year of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program : Relationship to nutrient intake. Amer. J. Epidemiol., 1984, 119, 667-676.
 - 19 - Gordon T. and Doyle J.T., Drinking and coronary heart disease : The Albany Study. Amer. Heart. J., 1985, 110, 331-334.
 - 20 - Siscovick D.S., Weiss N.S. and Fox N., Moderat alcohol consumption and primary cardiac arrest. Amer. J. Epidemiol., 1986, 123, 3, 499-503.
 - 21 - Friedman L.A. and Kimball A.W., Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. Amer. J. Epidemiol., 1986, 124, 3, 481-489.
 - 22 - Moore R.D. and Pearson T.A., Moderate alcohol consumption and coronary artery disease. A review Medicine, 1986, 65, 4, 242-267.
 - 23 - Baum Baicker C. The health benefits of moderate alcohol consumption. A review of litterature. Drug and alcohol dependance, 1985, 15, 207-227.
 - 24 - Gruchow H.W., Hoffman R.G., Anderson A.J. and Barboriak J.J., Effects of drinking patterns on the relationship between alcohol and coronary occlusion. Atherosclerosis, 1982, 43, 393-401.
 - 25 - Barboriak J.J., Anderson A.J. and Hoffman R.G., Smoking, alcohol and coronary artery occlusion. Atherosclerosis, 1982, 43, 277-282.
 - 26 - Kaufman D.W., Rosenberg L., Helmrich S.P. and Shapiro S., Alcoholic beverages and myocardial infarction in young men. Amer. J. Epidemiol., 1985, 121, 548-554.
 - 27 - Laporte R.E., Cresanta J.L. and Kuller L.H., The relationship of alcohol consumption to atherosclerotic heart disease. Prev. Med., 1980, 9, 22-40.
 - 28 - St leger A.S., Cochrane A.L. and Moore F., Factors associated with cardiac mortality in developped countries with particular

- reference to the consumption of wine. Lancet, 1979, 1, 1017-1020.
- 29 - Schmidt W. and Popham R.E., Alcohol consumption and ischemic heart disease : Some evidence from population studies. Brit. J. Addict., 1981, 76, 407-413.
 - 30 - Schmidt W. and Popham R.E., Alcohol consumption and ischemic heart disease : An addendum. Brit. J. Addict., 1982, 77, 91-92.
 - 31 - Werth J., A little wine for the heart's sake. Lancet, 1980, 2, 1141.
 - 32 - Skog O.J., Methodological problems in the analysis of temporal covariation between alcohol consumption and ischemic heart disease. Brit. J. Addict., 1983, 78, 157-172.
 - 33 - Yano K., Rhoads C.G. and Kagan A., Coffee, alcohol and risk of coronary heart disease among Japanese men living in Hawai. N. Engl. J. Med., 1977, 297, 405-409.
 - 34 - Kozarevic D., Mc Gee D. and Vojvodic N., Frequency of alcohol consumption and morbidity and mortality. The yougoslavia cardiovascular diseases Study. Lancet, 1980, 1, 613-616.
 - 35 - Brenn T., The tromso heart study : alcoholic beverages and coronary risk factors. J. Epidemiol. Comm. Health, 1986, 40, 249-256.
 - 36 - Nanji A.A., Alcohol and ischemic heart disease : wine, beer or both. International Journal of Cardiology, 1985, 8, 487-489.
 - 37 - Nanji A.A. and French S.W., Alcoholic beverages and Coronary heart disease. Atherosclerosis, 1986, 60, 197-198.
 - 38 - Mikhailidis D.P., Jenkins W.J., Jeremy J.Y., Barradas M.A. and Dandona P., Ethanol and arterial disease. New Engl. J. Med., 1984, 311, 537-538.
 - 39 - Barboriak J.J., Alcohol, lipids and Heart Disease. Alcohol, 1984, 1, 341-345.
 - 40 - Thornton J., Symes C., Heaton K. and Moderate alcohol intake reduces bile cholesterol saturation and raises HDL cholesterol. Lancet, 1983, 819-821.
 - 41 - Fraser G.E., Anderson J.T., Foster N., Goldberg R., Jacobs D. and Blackburn H., The effect of alcohol on serum high density lipoprotein (HDL). Atherosclerosis, 1983, 46, 275-286.
 - 42 - Couzigou P., Fleury B., Crokett R., Rautou J.J., Blanchard P., Lemoine F., Richard-Molard B., Amouretti M. and Beraud C., High density lipoprotein cholesterol and apoprotein AI in healthy volunteers during long-term moderate intake. Ann.

- Nutr. Metab., 1984, 28, 377-384.
- 43 - Crouse J.R. and Grundy S.M., Effects of alcohol on plasma lipoproteins and cholesterol and triglyceride metabolism in man. J. Lipid Res., 1984, 25, 486-496.
 - 44 - Schneider J., Leisenfeld A., Mordasini R., Schubotz R., Zöfel P., Kubel F., Vandré-Plozzitzka C. and Kaffarnik H., Lipoprotein fractions, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in healthy subjects. Atherosclerosis, 1985, 57, 281-291.
 - 45 - Malmendier C.L. and Delcroix C., Effect of alcohol intake on high and low density lipoprotein metabolism in healthy volunteers. Clin. Chim. Acta, 1985, 152, 281-288.
 - 46 - Jr Camargo C.A., Williams P.T., Vranizan K.M., Albers J.J. and Wood P.D., The effect of moderate alcohol intake on serum apolipoproteins AI and AII. Jama, 1985, 253, 19, 2854-2857.
 - 47 - Masarei J.R.L., Puddey I.B., Rouse I.L., Lynch W.J., Vandongen R. and Beilin L.J., Effects of alcohol consumption on serum lipoprotein lipid and apolipoprotein concentrations. Atherosclerosis, 1986, 60, 79-87.
 - 48 - Hartung G.H., Reeves R.S., Foreyt J.P., Patsch W. and Gotto A.M., Effect of alcohol intake and exercise on plasma high density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein AI in Women. The american journal of cardiology, 1986, 58, 148-151.
 - 49 - Barboriak J.J., Jacobson G.R., Cushman P., Herrington R.E., Lipo R.F., Daley M.E. and Anderson A.J., Chronic alcohol abuse and high density lipoprotein cholesterol. Alcoholism Clinical and Experimental research, 1980, 4, 4, 346-348.
 - 50 - Barboriak J.J., Alaupovic P. and Cushman P., Abstinence-induced changes in plasma apolipoprotein levels of alcoholics. Drug and Alcohol Dependence, 1981, 8, 337-343.
 - 51 - Devenyi P., Robinson G.M., Kapur B.M. and Roncari D.A.K., High-density lipoprotein cholesterol in male alcoholics with and without severe liver disease. The Amer. J. of Med., 1981, 71, 589-593.
 - 52 - Rosseneu M., Stellemans G., Vercaemst R. and Belpaire F., Plasma apoproteins levels in chronic alcohol abuse. Artery, 1982, 10, 3, 193-201.
 - 53 - Taskinen M.R., Välimäki M., Nikkilä E.A., Kuusi T., Ehnholm C. and Ylikahri R., High density lipoprotein subfractions and postheparin plasma lipases in alcoholic men before and after ethanol withdrawal. Metabolism, 1982, 31, 11, 1168-1174.
 - 54 - Perier C., Janin J., Pierre-Louis S. and Frey J., Reversal of



- changes in lipoprotein A and lipoprotein B cholesterol during and for a year after a detoxication treatment program in chronic alcoholism. Clin. Chem., 1983, 29, 5, 874-875.
- 55 - Hartung G.H., Foreyt J.P., Mitchell R.E., Mitchell J.G., Reeves R.S. and Gotto A.M., Effect of alcohol intake on high-density lipoprotein cholesterol levels in runners and inactive men. Jama, 1983, 11, 6, 747-750.
- 56 - Haskell W.L., Camargo C.B.A., Williams P.T., Vranisan K.M., Krauss R.M., Lindgren F.T. and Wood P., The effect of cessation and resumption of moderate alcohol intake on serum high density lipoprotein subfractions. New Engl. J. Med., 1984, 310, 13, 805-809.
- 57 - Tateossian S., Peynet J.G., Legrand A.G., Collet B., Rossignol J.A., Delattre J.J. and Rousselet F.J., Variations in HDL and VLDL levels chronic alcoholics. Influence of the degree of liver damage and of withdrawal of alcohol. CCA, 1985, 148, 3, 211-219.
- 58 - Välimäki M., Nikkilä E.A., Taskinen M.R. and Ylikahri R., Rapid decrease in high density lipoprotein subfractions and postheparin plasma lipase activities after cessation of chronic alcohol intake. Atherosclerosis, 1986, 59, 147-153.
- 59 - Cushman P., Barboriak J. and Kalbfleisch J., Alcohol : high density lipoproteins, apolipoproteins. Alcoholism (NY), Mar-Apr, 1986, 10, 2, 154-157.
- 60 - Ernst N., Fisher M., Smith W., Gordon T., Rifkind B.M., Little A.J., Mishkel M.A. and Williams O.D., The association of plasma high-density lipoprotein cholesterol with dietary intake and alcohol consumption. Circulation, 1980, 62 (suppl. IV), 41-52.
- 61 - Glueck C.J., Heiss G., Morrison J.A., Khoury P. and Moore M., Alcohol intake, cigarette smoking and plasma lipids and lipoproteins in 12-19 year old children. Circulation, 1981, 64 (suppl. III), 48-56.
- 62 - Gordon T., Ernst N., Fisher M. and Rifkind B.M., Alcohol and high density lipoprotein cholesterol. Circulation, 1981, 64 (suppl. III), 63-67.
- 63 - Sanchez-Craig M. and Annis H.M., Gamma glutamyl transpeptidase and high density lipoproteins cholesterol in male problem drinkers : advantages of a composite index for Predicting Alcohol consumption. Alcoholism Clinical and Experimental Research, 1981, 5, 4, 540-544.
- 64 - Schmitt, Thebault and Le Brazidec, Apolipoprotéines et états alcooliques. Revue française des laboratoires, 1981, 100, 57-59.

- 65 - Avogaro P., Cazzolato G., Belussi F. and Bittolo G., Altered apoprotein composition of HDL₂ and HDL₃ in chronic alcoholics. *Artery*, 1982, 10, 5, 317-328.
- 66 - Jacqueson A., Richard J.L., Ducimetière P., Warnet J.M. and Claude J.R., High density lipoprotein cholesterol and alcohol consumption in a french male population. *Atherosclerosis*, 1983, 48, 131-138.
- 67 - Duhamel G., Nalpas B., Goldstein S., Laplaud P.M., Berthelot P. and Chapman J.M., Plasma lipoprotein and apolipoprotein profile in alcoholic patients with and without liver disease : on the relative roles of alcohol and liver injury. *Hepatology*, 1984, 4, 4, 577-585.
- 68 - Breier C., Lisch H.J., Drexel H. and Braunsteiner H., Post-heparin lipolytic activities and alterations of the chemical composition of high density lipoproteins in alcohol induced type V hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 1984, 52, 317-328.
- 69 - Puchois P., Fontan M., Gentilini J.L., Gelez P. and Fruchart J.C., Serum apolipoprotein AII, a biochemical indicator of alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta*, 1984, 185, 185-189.
- 70 - Williams P.J., Krauss R.M., Wood P.D., Albers J.J., Dreon D. and Ellsworth N., Association of diet and alcohol intake with high density lipoprotein subclasses. *Metabolism*, 1985, 34, 6, 524-530.
- 71 - Hurt R.D., Briones E.R., Offord K.P., Patton J.G., Mao S.J.T., Morse R.M. and Kottke B.A., Plasma lipids and apolipoprotein AI and AII levels in alcoholic patients. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1986, 43, 521-529.
- 72 - Robinson D., Ferns G.A.A., Bevan E.A., Stocks J., Williams P.T. and Galton D.J., High density lipoprotein subfractions and coronary risk factors in normal men. *Arteriosclerosis*, 1987, 7, 341-346.
- 73 - Malmendier C.L., Mailier E.L., Amerijckx J.P. and Fischer M.L., Plasma levels of apolipoproteins AI, AII and B in alcoholism. Relation to the degree of histological liver damage, and to liver function tests. *Hepato-gastroenterol.*, 1983, 30, 236-239.
- 74 - Haffner S.M., Applebaum-Bowden D., Wahl P.W., Hoover J.J., Warnick G.R., Albers J.J. and Hazzard W.R., Epidemiological correlates of high density lipoprotein subfractions, apolipoprotein AI, AII and D, and lecithin cholesterol acyltransferase. *Arteriosclerosis*, 1985, 5, 2, 169-177.
- 75 - Hughes J., Stewart M. and Barra-Clough B., Why teetotallers abstain. *Brit. J. Psychiat.*, 1985, 146, 204-208.

- 76 - Hillers V.N. and Massey L.K., Interrelationships of moderate and high alcohol consumption with diet and health status. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1985, 41, 356-362.
- 77 - Miller G.J. and Miller N.E., Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease. *Lancet*, 1975, 1, 16-19.
- 78 - Miller N.E., Hammett F. and Saltissi S., Relation of angiographically defined coronary artery disease to plasma lipoprotein subfractions and apolipoproteins. *Brit. Med. J.*, 1981, 282, 1741-1744.
- 79 - Puchois P., Fruchart J.C. and Alaupovic P., Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1985, 43, 831-840.
- 80 - Koren E., Puchois P., Alaupovic P., Fesmire J., Kandoussi A. and Fruchart J.C., Quantitative determination of two different types of apo AI containing lipoprotein particles in human plasma by an enzyme linked differential antibody immunosorbent assay. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 38-43.
- 81 - Puchois P., Kandoussi A., Fourrier J.L., Bertrand M., Koren E. and Fruchart J.C., Apolipoprotein AI containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1987, 68, 35-40.
- 82 - Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C. and Ailhaud G., Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpAI but not by LpAI AII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 63-69.
- 83 - Puchois P., Ghalim N., Zylberberg R. and Fruchart J.C., Effect of alcohol consumption on lipoprotein particles which contain apo AI and apo AII (Lp AI AII) and apo AI but not apo AII (Lp AI). *Circulation*, 1986, 74 (suppl. II), 383.
- 84 - Lieber C.S., "To Drink or not to Drink ?". *New Engl. J. Med.*, 1984, 310, 846-848.
- 85 - Doll R. and Peto R., The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the U.S. today, New York. Oxford Univ. Press., 1981.
- 86 - Angelico F., Bucci A., Capocaccia R. et al., Further considerations on alcohol intake and coronary risk factors in a Rome working population group : HDL-cholesterol. *Ann. Nutr. Metab.*, 1982, 26, 73-76.
- 87 - Donahue R.P., Orchard T.J., Kuller L.H. and Drash A.L., Lipids and lipoproteins in a young adult population. *Amer. J. Epidemiol.*, 1985, 122, 458-467.
- 88 - Gidez L.I., Miller G., Burstein M., Slagle S. and Eder H.A., Separation and quantitation of subclasses of human plasma high

density lipoproteins by a simple precipitation procedure.
J. Lipid Res., 1982, 23, 1206-1223.

- 89 - Lopes-Virella M.F., Stone P., Ellis S. and Colwell S.A.,
Cholesterol determination in high density lipoproteins
separated by three different methods. Clin. Chem., 1977, 23,
882.
- 90 - Parra H.J., Puchois P., Demarquilly C., Fruchart J.C. Analyse
multivariée d'indicateurs biologiques de consommation
excessive d'alcool. Path. Biol., 1987, 35, n°9, 1230-1234.

Article n°3

**Effect of alcohol intake on human apolipoproteins AI
containing lipoproteins subfractions**

Ghalim N., Puchois P., Zylberberg G., Fiévet P.,
Demarquilly C. and Fruchart J.C.

Arch. Int. Med., accepté, en cours de révision

EFFECT OF ALCOHOL INTAKE ON HUMAN APOLIPOPROTEINS A-I CONTAINING
LIPOPROTEINS SUBFRACTIONS

Nordine GHALIM + ¹, Pascal PUCHOIS PhD¹, Gécél ZYLBERBERG MD²,
Pierre FIEVET MD¹, Catherine DEMARQUILLY PhD¹, Jean-Charles
FRUCHART PhD¹

1 - SERLIA, Institut Pasteur, Lille

2 - Centre d'Examen de Santé, Institut Pasteur, Lille

+ - Pre-doctorate fellow

SUMMARY

HDL comprises two main types of lipoprotein particles : those which contain both apolipoprotein (apo) A-I and A-II, designated LpA-I:A-II and those which contain apo A-I but not apo A-II designated LpA-I. Both have been extensively studied and are believed to represent distinct metabolic entities which may confer differing protection against coronary artery disease risk. We have previously suggested that LpA-I might represent the antiatherogenic fraction of HDL. Since alcohol consumption also has an antiatherogenic effect, which has been ascribed mainly to its effect on HDL cholesterol, we set out to investigate, in 334 men, the relation between LpA-I:A-II and LpA-I levels and alcohol consumption. As ethanol intake rose LpA-I:A-II increased while LpA-I fell. On the assumption that LpA-I is the antiatherogenic fraction of HDL, the putative protective action of alcohol consumption against coronary artery disease should be reconsidered.

INTRODUCTION

High density lipoproteins (HDL) have been the focus of many clinical and epidemiological investigations because their elevated concentration in plasma is associated with reduced incidence of coronary artery disease (CAD) (1). Among dietary factors studied for a possible influence on plasma HDL levels, alcohol intake is one of the most intriguing since it is reported to be positively associated with HDL concentrations (2, 3). This has led some investigators to suggest that moderate alcohol consumption may be protective against CAD. Epidemiological and clinical data have provided some support to this notion, but there are many inconsistencies among studies seeking to demonstrate the beneficial effect of alcohol consumption in this context (3-5).

Although there is no doubt about the increase of plasma HDL concentrations upon alcohol intake, the subfraction of HDL responsible for this biological observation has not yet been formally identified. Indeed, studies in which HDL has been fractionated on the basis of hydrated density are inconclusive and contradictory data have been published about the reputedly "antiatherogenic" HDL₂, the less dense HDL subfraction (6-16).

Clearly, this approach is not necessarily adequate for studying the chemical and metabolic complexity of the plasma lipoprotein system (17-18) and alternative techniques designed to identify the subclasses within HDL on the basis of their apoproteins composition may prove to be more effective (19-22). In this

context, HDL comprise two main lipoprotein subclasses : those which contain, as the main protein components, apolipoprotein A-I (apo A-I) and apolipoprotein A-II (apo A-II), designated LpA-I:A-II, and those which contain apo A-I but not apo A-II, designated LpA-I. Both fractions have been characterized in regard to their protein and lipid contents (19, 23, 24) and have been shown to be affected differently by drug treatment (21). In a previous clinical study, the lower HDL concentrations in CAD were linked with lower LpA-I levels, while LpA-I:A-II was unaffected (22). This observation led us to hypothesize that LpA-I may represent the antiatherogenic lipoprotein particle, a premise that fits with in vitro studies which showed that cholesterol efflux from cells is mediated by LpA-I and not by LpA-I:A-II (20, 25).

In the light of the heterogeneity within HDL and of the potential clinical and metabolic importance of newly defined apo A-I containing lipoprotein particles, we decided to investigate whether plasma concentrations of LpA-I and LpA-I:A-II were influenced by alcohol consumption.

METHODS

Subjects and study design

Our study was carried out in 334 men (25 years to 63 years old) undergoing a routine health examination in the Health Center of the Pasteur Institute, Lille (France). They completed a form which allowed the assessment within a 6 months period, of eating habits, cigarette and alcohol consumption. Alcohol intake was recorded by an interview with a specially trained physician.

From the alcohol consumption data (gr alcohol/week) the men were divided into five groups with 63 to 69 subjects in each. Alcohol consumption was : (a, for group A : 0-200 gr/week, (b) for group B : 201-400 gr/week, (c) for group C : 401-600 gr/week, (d) for group D : 601-800 gr/week, (e) for group E : > 800 gr/week. The main clinical and biochemical characteristics of the subjects in each group are summarized in table 1. To avoid analytical or seasonal bias, the selection process was such that the recruitment of one subject with a weekly alcohol consumption of > 800 gr implied the selection on the same day of one subject matched for age from each of the other groups. None of the subjects had a medical history of heart or liver disease, or of diabetes mellitus.

Laboratory measurements

Blood samples were drawn after an overnight fast into Vacutainer tubes containing 1.5 mg of disodium EDTA per ml. Plasma was promptly prepared from the blood samples and analysed within 12 hrs. Cholesterol and triglyceride concentrations were determined enzymatically. HDL cholesterol was also determined enzymatically after isolation of HDL using the phosphotungstate-magnesium chloride method (26). LDL cholesterol was determined using a precipitation procedure (Biomerieux Kit ref 61532, Produits et réactifs de laboratoire - Marcy l'Etoile - 69260 Charbonnières les Bains - France). Total apoprotein A-I, A-II and B were assayed by enzyme linked immunosorbent assays (27, 28, 29). The quantitative determination of LpA-I:A-II (amount of apo A-I associated with apo A-II) was performed using an enzyme linked differential antibody immunosorbent technique. The procedure has been recently described in detail elsewhere (30). All enzyme immunoassays were automated on microtiter plates using antibodies from rabbit prepared in our laboratory as described earlier (29). In order to confirm results obtained for LpA-I, this particle type was also quantified using a two-phase electroimmunoassay as described by Atmeh et al. (21). Other biochemical parameters (glucose, transaminases, urea, gamma glutamyl-transpeptidase (GGT), creatinine, uric acid) were determined on an American Monitor analyzer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by mean of Spearman's correlation analysis, Fisher's exact test for non parametric samples and by analysis of variances for measured variables.

RESULTS

The mean ($\pm$ SD) age of the subjects in each group was 48 ± 10 years (Table 1). All groups were matched for height, weight, systolic and diastolic blood pressure, plasma glucose and plasma uric acid, only in terms of erythrocyte corpuscular volume and gammaglutamyltranspeptidase activity (Table 1).

Mean physical activity and cigarette consumption were the same in the groups on the basis of a questionnaire administered by the physician in charge of the subject.

Plasma lipid, lipoprotein and apolipoprotein profiles

No significant difference between groups A, B, C, D and E was observed for total plasma cholesterol, LDL cholesterol, or apolipoprotein B (Table 2). Only HDL cholesterol and apo A-II appeared significantly different when group A (alcohol consumption below 200 gr/week) was compared with either group D (alcohol consumption ranged between 601 and 800 gr/week) or E (alcohol consumption > 800 gr/week) (Table 2). The mean increases of HDL cholesterol and apo A-II from group A to E were 37.6% and 21.8% respectively, while apo A-I levels were unaltered. A correlation study confirmed this strong relationship between alcohol consumption and HDL cholesterol and apo A-II levels (Table 3). However no correlation was found with apo A-I or with any of the other parameters measured in this study.

LpA-I and LpA-I:A-II levels in study population

LpA-I:A-II levels were increased from group A to group E while LpA-I levels decreased significantly by 28.3% (Table 4). The correlation study indicated a significant positive correlation between alcohol consumption and LpA-I:A-II concentrations ($r = 0.404$; $p < 0.001$) and a negative association with LpA-I concentrations ($r = - 0.208$; $p < 0.01$) (Table 3).

To determine the relative contributions of these two apo A-I containing lipoprotein particle subpopulations to the alcohol mediated increase in total plasma HDL cholesterol concentration, another correlation study was performed (Table 5). HDL cholesterol correlated highly with apo A-II and LpA-I:A-II concentrations ($r = 0.238$; $p < 0.001$) and to a lesser degree with apo A-I concentrations ($r = 0.200$; $p < 0.01$) however, there was no relationship with LpA-I concentrations ($r = 0.051$), indicating that the increase of HDL cholesterol upon alcohol consumption was probably due exclusively to accumulation of LpA-I:A-II.

Although the distribution of the GGT values was highly skewed (Table 1), a significant correlation was observed between GGT and LpA-I:A-II concentrations (Table 5).

Table 1 : Characteristics of Study Groups (means + standard deviation)

	A	B	C	D	E
	(n = 68)	(n = 65)	(n = 69)	(n = 69)	(n = 63)
mean age (years)	47.6+10.1	47.6+10.2	47.7+9.7	47.9+9.7	47.9+9.8
alcohol consumption (gr/week)	130+40	289+59**	492+60**	676+53**	993+189**
erythrocyte corpuscular volume (ft)	92.9+3.5	93.2+3.9	94.7+4.9*	96.7+4.9**	96.3+11.7*
gammaglutamyl transferase (IU/l)	24.1+20.2	29.2+22.9	48.5+55.7**	67.8+77.6**	79.5+114**

Significance of differences between group A and B, C, D, E :

* p < 0.01

Table 2 : Lipoprotein and Apoprotein Concentrations in Study Group.

	A	B	C	D	E
Plasma cholesterol (mmol/l)	6.15 + 0.90	6.10 + 1.11	6.07 + 1.06	6.44 + 1.06	6.54 + 1.06
LDL cholesterol (mmol/l)	4.42 + 1.13	4.42 + 1.42	4.27 + 1.55	4.44 + 1.37	4.40 + 1.42
Apolipoprotein B (mg/dl)	108.6 + 35.9	101.5 + 35.2	104.2 + 42.6	117.2 + 44.1	100.0 + 36.4
HDL cholesterol (mmol/l)	1.41 + 0.33	1.46 + 0.39	1.54 + 0.42	1.61 + 0.52	1.94 + 0.82**
Apolipoprotein A-I (mg/dl)	136.8 + 32.4	128.8 + 27.8	130.8 + 29.8	132.0 + 26.1	140.7 + 29.4
Apolipoprotein A-II (mg/dl)	39.9 + 10.2	40.2 + 10.9	42.2 + 10.1	44.3 + 11.1*	48.5 + 14.1**

Significance of differences between groups B, C, D, E and group A

* p < 0.02
 ** p < 0.001

Table 3 : Spearman's Correlational Analysis of Gammaglutamyl-transpeptidase Activity, Lipoproteins and Apoproteins with Alcohol intake

	Alcohol intake	
GGT	+ 0.2963	**
LDL cholesterol	+ 0.0872	NS
HDL cholesterol	+ 0.3628	**
Apolipoprotein A-I	+ 0.1065	NS
Apolipoprotein A-II	+ 0.2548	**
Apolipoprotein B	- 0.0353	NS
LpA-I:A-II	+ 0.4043	**
LpA-I	- 0.2077	*

NS not significant

* $p < 0.01$

** $p < 0.001$

Table 4 : LpA-I:A-II and LpA-I Concentrations in Study Group.

	A	B	C	D	E	% difference between A and E
LpA-I:A-II (g/l)	0.809+0.158	0.850+0.159	0.868+0.163	0.962+0.195**	1.034+0.220**	+ 27.8%
LpA-I (g/l)	0.519+0.266	0.437+0.231	0.439+0.253	0.358+0.183**	0.372+0.192**	- 28.3 %

Significance of differences between groups B, C, D, E and group A

* p < 0.02

** p < 0.001

Table 5 : Correlations of Apolipoprotein A-I, A-II, Lipoprotein A-I:A-II and Lipoprotein A-I with HDL Cholesterol Concentrations and GGT Activity.

	Apolipoprotein A-I	Apolipoprotein A-II	LpA-I:A-II	LpA-I
HDL cholesterol	0.200**	0.238***	0.238***	NS
GGT	NS	0.304***	0.317***	-0.141*

NS not significant

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

COMMENTSApolipoprotein profiles

To assess the effects of moderate alcohol consumption on lipoproteins, lipoprotein profiles have been determined several days or weeks, after alcohol intake in abstinent subjects (13, 31, 32) or after cessation of alcohol intake in moderate drinkers (6, 13, 32-34). From these studies, alcohol has been reported to increase HDL components, including cholesterol apo A-I and apo A-II. In an alternative study design lipoprotein profiles have been compared in subjects with different alcohol consumption. Again, from these cross-sectional studies, apo A-I and A-II concentrations seem to be highly affected by alcohol intake (8-11, 35, 36). We also found HDL to be increased by alcohol but this was highly significant only for HDL cholesterol and apo A-II (Table 2). These changes were significantly related to the amount of alcohol ingested (Table 3). Such results are not inconsistent with other studies, when examined in more detail. Several authors have already reported a more pronounced effect of alcohol consumption on apo A-II than on apo A-I concentrations (8, 11, 35, 37). Duhamel et al (8), comparing 9 non alcoholic subjects to 10 alcoholic subjects with normal liver function, observed a much more significant increase of apo A-II (+ 66%) than of apo A-I (+ 38%). Hurt et al (37) reported a significant increase only for apo A-II (+ 21%) in 13 alcoholic women. Recently, Williams et al (11) found a better correlation between alcohol intake and apo

A-II concentration than with apo A-I concentration. Our data also reveal this better correlation for apo A-II (Table 3) and suggest that the increase of HDL upon alcohol consumption reflects raised levels of apo A-II containing lipoproteins. This suggestion fits with data obtained by Duhamel (8) and Breier (9) who recently described an enrichment of HDL₂ and/or HDL₃ in apo A-II compared to apo A-I.

HDL subfraction profiles

When the "antiatherogenic" role of HDL in reverse cholesterol transport was proposed by Miller (1), it led some authors to suggest a beneficial effect of alcohol consumption on cardiovascular diseases, due to the resulting increase of HDL. To verify this proposal the alcohol-induced changes in HDL₃ and of the reputedly "antiatherogenic" HDL₂ subfraction (38) were analysed. However, results obtained in different studies were variable, the increase of HDL being ascribed either to HDL₂ alone, to HDL₃ alone, or to both subfractions (6-16).

The question which arises from these conflicting data is whether the HDL subfractions isolated by ultracentrifugation correspond to the functional metabolic entities present in vivo. A more rational alternative is to examine the HDL spectrum on the basis of its apolipoprotein composition rather than on physical criteria such as hydrated density. The results of this approach clearly demonstrate that subjects with high alcohol consumption have increased LpA-I:A-II but decreased plasma LpA-I concentra-

tions compared to those with lower alcohol intake (Table 4). Moreover, correlation analyses (Table 3) support the likelihood that these changes are related to alcohol consumption. More interesting, as revealed by the positive correlation between LpA-I:A-II and HDL cholesterol (Table 5) is the fact that the increase of HDL following alcohol consumption reflects a rise in LpA-I:A-II which is simultaneously hiding a decrease of LpA-I. These results are very relevant to the eventual protective effect of alcohol consumption against cardiovascular diseases. Indeed, there is some evidence that LpA-I, in contrast to LpA-I:A-II, represents the antiatherogenic HDL subfraction. This is suggested by clinical studies in which apo A-I but not apo A-II concentrations have been found to be decreased in coronary artery disease (39-40). We have recently confirmed this notion by showing that LpA-I concentrations, in contrast to LpA-I:A-II were decreased in atherosclerotic patients (22). The ability of LpA-I to remove cholesterol from cells in vitro, also characterize it as the antiatherogenic HDL subfraction (20, 25). It therefore seems from our present study that alcohol consumption would be unlikely to have any antiatherogenic effect, at least on the basis of its action on HDL.

REFERENCES

1. Miller GJ, Miller NE: Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease. *Lancet* 1975;1:16-19.
2. Ashley HJ: Alcohol consumption, ischemic heart disease and cerebrovascular disease. An epidemiological perspective. *J Stud Alcohol* 1982;43:869-887.
3. Ferrence RG, Truscott S, Whitehead PC: Drinking and the prevention of coronary heart disease : findings, issues and public health policy. *J Stud Alcohol* 1986;47/5:394-408.
4. Moore RD, Pearson TA: Moderate alcohol consumption and coronary artery disease. *A Review Medicine* 1986;65/4:242-267.
5. Baum Baicker C: The health benefits of moderate alcohol consumption. A review of litterature. *Drug and Alcohol Dependence* 1985;15:207-227.
6. Taskinen MR, Välimäki M, Nikkilä EA, Kuusi T, Ehnholm C, Ylikahri R: High density lipoprotein subfractions and postheparin plasma lipases in alcoholic men before and after ethanol withdrawal. *Metabolism* 1982;31/11:1168-1174.

7. Haskell WL, Camargo CBA, Williams PT, Vranisan KM, Krauss RM, Lindgren FT, Wood P: The effect of cessation and resumption of moderate alcohol intake on serum high density lipoprotein subfractions. *New Eng J Med* 1984;13:805-809.

8. Duhamel G, Nalpas B, Goldstein S, Laplaud PM, Berthelot P, Chapman JM: Plasma lipoprotein and apolipoprotein profile in alcoholic patients with and without liver disease : on the relative roles of alcohol and liver injury. *Hepatology* 1984;4/4:477-585.

9. Breier C, Lisch HJ, Drexel H, Braunsteiner H: Post-heparin lipolytic activities and alterations of the chemical composition of high density lipoproteins in alcohol induced type V hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1984;52:317-328.

10. Haffner SM, Applebaum-Bowden D, Wahl PW, Hoover JJ, Warnick GR, Albers JJ, Hazzard WR: Epidemiological correlates of high density lipoprotein subfractions, apolipoprotein A-I, A-II and D, and lecithin cholesterol acyltransferase. *Arteriosclerosis* 1985;5/2:169-177.

11. Williams PJ, Krauss RM, Wood PD, Albers JJ, Dreon D, Ellsworth N: Association of diet and alcohol intake with high density lipoprotein subclasses. *Metabolism* 1985;35/5:524-530.

12. Välimäki M, Nikkilä EA, Taskinen MR, Ylikahri R: Rapid decrease in high density lipoprotein subfractions and postheparin plasma lipase activities after cessation of chronic alcohol intake. *Atherosclerosis* 1986;59:147-153.

13. Masarei JRL, Puddey IB, Rouse IL, Lynch WJ, Bandongen R, Beilin LJ: Effects of alcohol consumption on serum lipoprotein lipid and apolipoprotein concentrations. *Atherosclerosis* 1986;60:79-87.

14. Hartung CH, Reeves RS, Foreyt JP, Patsch W, Gotto AM: Effect of alcohol intake and exercise on plasma high-density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein A-I in women. *Am J Card* 1986;58:148-151.

15. Robinson D, Ferns GAA, Bevan EA, Stocks J, Williams PT, Galton DJ: High density lipoprotein subfractions and coronary risk factors in normal men. *Arteriosclerosis* 1987;7:341-346.

16. Diehl AK, Fuller JH, Mattock MB, Salter AM, El-Gohari R, Keen H: The relationship of high density lipoprotein subfractions to alcohol consumption, other lifestyle factors, and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1988;69:145-153.

17. Alaupovic P, The physicochemical and immunological heterogeneity of human plasma high density lipoproteins, in Miller NE, Miller GJ (eds): Clinical and Metabolic Aspects of High Density Lipoproteins. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 1985, pp1.
18. Puchois P, Fruchart JC, Alaupovic P: Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques. Ann Biol Clin 1985;43:831-840.
19. Cheung MC, Albers JJ: Distribution of high density lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but not A-II. J Biol Chem 1984;259:12201-12209.
20. Fielding CJ, Fielding PE: Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin : cholesterol acyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 1981;6:3911.
21. Atmeh RF, Shepherd J, Packard CJ: Subpopulations of apolipoprotein A-I in human high-density lipoproteins their metabolic properties and response to drug therapy. Biochim Biophys Acta 1983;751:175-188.

22. Puchois P, Kandoussi A, Fourrier JL, Bertand M, Koren E, Fruchart JC: Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987;68:35-40.
23. Cheung MC, Wolf AC, Lum KD, Tollefson JH, Albers JJ: Distribution and localization of lecithin : cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I containing lipoproteins. *J Lipid Res* 1986;27:1135-1144.
24. Cheung MC, Segrest JP, Albers JJ, Cone JT, Brouillette CG, Hong Chung B, Kashyap M, Glasscock MA, Anantharamaiah: Characterization of high density lipoprotein subspecies : structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *J Lipid Res* 1987;28:913-929.
25. Barbaras R, Puchois P, Fruchart JC, Ailhaud G: Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpA-I particles but not by LpA-I:A-II particles. *Biochem Biophys Res Com* 1987;142/1:63-69.
26. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, Hägele EO: Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic Acid/Mgcl₂. *Clin Chem* 1983;29/12:2026-22030.

27. Koren E, Puchois P, McConathy WJ, Fesmire FM, Alaupovic P: Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-I by a non competitive enzyme linked immunosorbent assay. Clin Chim Acta 1985;147:85-95.
28. Puchois P, Kandoussi A, McConathy WJ, Alaupovic P, Fruchart JC, Koren E: Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-II by a non competitive enzyme linked immunosorbent assay. J Immunoassay 1986;7/4:285-307.
29. Fruchart JC, Fievet C, Puchois P: Apo-lipoproteins, in Bergmeyer HU (ed): Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim, Verlagsgesellschaft mbH, 1985, pp 126-139.
30. Koren E, Puchois P, Alaupovic P, Fesmire J, Kandoussi A, Fruchart JC: Quantitative determination of two different types of apo A-I containing lipoprotein particles in human plasma by an enzyme linked differential antibody immunosorbent assay. Clin Chem 1987;33/1:38-43.
31. Fraser GE, Anderson JT, Foster N, Goldberg R, Jacobs D, Blackburn H: The effect of alcohol on serum high density lipoprotein (HDL). Atherosclerosis 1983;46:275-286.
32. Jr Camargo CA, Williams PT, Vranizan KM, Albers JJ, Wood PD: The effect of moderate alcohol intake on serum apolipoproteins A-I and A-II. JAMA 1985;252:2854-2857.

33. Barboriak JJ, Alaupovic P, Cushman P: Abstinence-induced changes in plasma apolipoprotein levels of alcoholics. *Drugs and Alcohol Dependence* 1981;8:337-343.
34. Cushman P, Barboriak J, Kalbfleisch J: Alcohol : high density lipoproteins, apolipoproteins. *Alcoholism* 1986;10/2:154-157.
35. Puchois P, Fontan M, Gentilini JL, Gelez P, Fruchart JC: Serum apolipoprotein A-II, a biochemical indicator of alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 1984;185:185-189.
36. Malmendier CL, Mailier EL, Amerijckx JP, Fischer ML: Plasma levels of apolipoproteins A-I, A-II and B in alcoholism. Relation to the degree of histological liver damage, and to liver function tests. *Hepato-Gastroenterol* 1983;30:236-239.
37. Hurt RD, Briones ER, Offord KP, Patton JG, Mao SJT, Morse RM, Kottke BA: Plasma lipids and apolipoprotein A-I and A-II levels in alcoholic patients. *Amer J Clin Nutr* 1986;43:521-529.
38. Miller NE, Hammett F, Saltissi S: Relation of angiographically defined coronary artery disease to plasma lipoprotein subfractions and apolipoproteins. *Br Med J* 1981;282:1741-1744.

39. Hamsten A, Walldius G, Dahlen G, Johansson B and De Faire U:
Serum lipoprotein and apolipoproteins in young male survivors of
myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1986;59:223-235.

40. Franzen J, Fex F: Low serum apolipoprotein A-I in acute
myocardial infarction survivors with normal HDL cholesterol.
Atherosclerosis 1986;59:37-42.

Conclusion

Certains auteurs se sont intéressés à l'évaluation des HDL₂ et des HDL₃ sous l'effet de l'alcool, sachant que les HDL₂ pourraient représenter la fraction spécifiquement anti-athérogène des HDL, alors que les HDL₃ n'auraient aucun rôle dans cet effet protecteur des HDL. Les résultats sont très contradictoires et les opinions diffèrent sur la sous-fraction de densité des HDL, HDL₂ ou HDL₃, qui est préférentiellement influencée par l'alcool. La plupart des études qui se sont intéressées au dosage des apolipoprotéines des HDL mettent en évidence une forte augmentation de la concentration de l'apolipoprotéine AII (qui n'est pas un paramètre de choix dans le dépistage de l'athérosclérose coronarienne), comparativement à celle de l'apolipoprotéine AI.

L'étude que nous avons faite sur l'effet de la consommation d'alcool sur les particules lipoprotéiques Lp AI et Lp AI:AII a montré que l'augmentation de l'apolipoprotéine AII est traduite par celle de la Lp AI:AII en masquant une diminution de la Lp AI, véritable fraction anti-athérogène des HDL.

CHAPITRE IV

Lp AI, Lp AI:AI ET Lp AIV DANS L'ETAPE INITIALE DU TRANSPORT "REVERSE" DU CHOLESTEROL (EFFLUX)

Introduction

Sur le plan physiologique, le rôle anti-athérogène des HDL est suggéré par leur capacité à épurer le cholestérol cellulaire et à le ramener vers le foie pour son catabolisme et son excrétion. Cependant, il a été montré que les HDL₃ provoquent l'efflux du cholestérol cellulaire, alors que les HDL₂ sont incapables de le produire (41).

Dans ce chapitre, nous testerons, en collaboration avec l'équipe du Professeur G. Ailhaud (Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, Nice) et le Docteur A. Steinmetz (Laboratoire d'Endocrinologie et du métabolisme, Université Philipps, Marburg, RFA), l'activité des particules Lp AI et Lp AI:AI_{II} des HDL₂, des HDL₃ et du plasma natif et des Lp AIV plasmatiques sur le cholestérol cellulaire.

Les cellules utilisées appartiennent à la lignée préadipocytaire ob 17. Ce clone a été établi par l'équipe du Professeur G. Ailhaud à partir des adipocytes matures du tissu périépididymaire de souris (C57 BL/6J) génétiquement obèse (161).

Bien que les adipocytes ne soient pas impliquées dans la formation de plaques d'athéromes, elles paraissent être un modèle biologique de choix pour l'étude de l'efflux du cholestérol cellulaire du fait de leur grande capacité à accumuler le cholestérol et à l'échanger avec le milieu extracellulaire.

Article n° 4

**Effect of different apo AI containing lipoprotein particles
on reverse cholesterol transport in fat cells**

Barkia A., Barbaras R., Ghalim N., Puchois P.,
Ailhaud G. and Fruchart J.C.

**Horm. Met. Res.,
Supplément séries, 1988, 19, 10-12**

Effect of Different APO A-I Containing Lipoprotein Particles on Reverse Cholesterol Transport in Fat Cells

A. Barkia¹, R. Barbaras², N. Ghalim¹, P. Puchois¹, G. Ailhaud² and J.C. Fruchart¹

¹SERLIA, Institut Pasteur, Lille, France

²Centre de Biochimie du CNRS, Faculté des Sciences, Nice, France

Summary

Cholesterol efflux was studied in cultured mouse adipose cells after preloading with LDL cholesterol. Long term exposure to LpA-I particles isolated from HDL₂ and HDL₃ promoted cholesterol efflux while LpA-I:A-II particles isolated from both fractions did not. However, LpA-I and LpA-I:A-II particles isolated from both HDL subfractions were effective in competing for the binding of ¹²⁵I-HDL₃ to apo A-I/A-II cell surface receptor sites. These results underline the role of LpA-I particles in the promotion of cholesterol efflux and suggest that the concentrations and/or the relative proportions of LpA-I and LpA-I:A-II particles might be critical for the regulation of cholesterol efflux from adipose cells.

Key-Words: *Apoprotein A-I Containing Lipoprotein Particles – Apoprotein A-II – Cholesterol Efflux*

Introduction

Among peripheral tissues, adipose tissue is recognized to contain one of the largest pool of exchangeable cholesterol in the body. This cholesterol pool is present under unesterified form. This pool is increasing with age, dietary cholesterol and obese state. Moreover, it can be mobilized quite rapidly to a large extent during starvation (Krause and Hartmann 1984, Angel and Fong 1983). This ability for adipose tissue to accumulate, store and, when needed, mobilize a large pool of unesterified cholesterol provides to these cells good characteristics for studying reverse cholesterol transport. Barbaras, Grimaldi, Negrel and Ailhaud (1985) have shown that mouse OB1771 adipose cells possess distinct apolipoprotein E-free HDL and apolipoprotein B:E binding sites. One of the most striking finding of these data is the inability of these cells to down regulate levels of apo B:E receptors and to upregulate those of apo E-free HDL binding sites in response to cholesterol loading via LDL (Barbaras et al. 1985; Barbaras, Grimaldi, Negrel and Ailhaud 1986). Both apo A-I and apo A-II bind to these HDL receptors but only apo A-I containing liposomes promote cholesterol efflux. In contrast apo A-II containing liposomes are ineffective, indicating that apo A-II behaves as a typical antagonist (Barbaras et al. 1986).

With respect to human metabolism this phenomenon

has been for us of great interest since it could be related to the conceptual view of the existence, in vivo, of lipoprotein particles with different apolipoprotein composition (Alaupovic 1985; Cheung, Segrest, Albers, Cone, Brouillette, Hong Chung, Kashyap, Glasscock and Anantharamaiah 1987; Cheung, Wolf, Lum, Tollefson and Albers 1986; Nichols, Gong, Blanche, Forte and Shore 1987). We have previously reported that lipoprotein particles containing apo A-I but no apo A-II (LpA-I HDL) isolated from HDL were able to promote cholesterol efflux in contrast to lipoprotein containing both apo A-I and apo A-II (LpA-I:A-II HDL) (Barbaras, Puchois, Fruchart and Ailhaud 1987a). These data agree with those published recently where we could show that patients, suffering from atherosclerosis, have plasma levels of LpA-I significantly lowered as compared to healthy patients, in contrast to the concentration of LpA-I:A-II which remain unchanged (Puchois, Kandoussi, Fievet, Fourrier, Bertrand, Koren and Fruchart 1987). Then together, these data led us to suggest that LpA-I might represent the antiatherogenic fraction of HDL.

Other clinical studies have ascribed the antiatherogenic effect of HDL to the subfraction, characterized by its hydrated density: HDL₂ (Miller, Hammett and Saltissi 1981). In the present report we describe the effect of different LpA-I and LpA-I:A-II preparations isolated from HDL₂ and HDL₃ for promoting cholesterol efflux from mouse OB1771 adipose cells.

Materials and Methods

Clonal line and cell culture: The characterization of OB1771 preadipocyte clonal line has been previously reported (Amri, Dani, Doglio, Etienne, Grimaldi and Ailhaud 1986). Cells were plated at 2×10^3 in 35 mm dishes and grown until confluence in DME medium supplemented with 10% FBS, 200 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 33 µM biotin and 17 µM pantothenate (defined as standard medium). After confluence (4 to 5 days after seeding), this medium was replaced by the differentiation medium, i.e. standard medium supplemented with 17 µM insulin, 2 nM T₃, 10 µM methylglyoxal bis (guanyldiazide) and 100 µM putrescine. Under these conditions, most OB1771 cells differentiated into adipose cells within 10 days. The

medium was changed every other day. The experiments reported below were performed on 10-day post-confluent cells.

Isolation of lipoproteins: human LDL, HDL₂ and HDL₃ were separated by sequential ultracentrifugation of normolipemic human plasma.

Plasma isolation of LpA-I and LpA-I:A-II particles from native plasma, HDL₂ and HDL₃ were performed by immunoaffinity chromatography: Anti-apo A-I and anti-apo A-II immunoadsorbents were prepared by coupling the specific antibodies (100 mg) to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B column (5 mg/g of gel). After antibody coupling, immunoadsorbents were equilibrated with PBS pH 7.4 containing 0.01 % EDTA.

For isolation of LpA-I:A-II particles from the HDL subfractions 10 mg of protein were run over the immunoaffinity column specific for apo A-II. Samples were applied at a slow rate to an amount of gel sufficient to bind quantitatively all apo A-II-containing particles. The gel was then washed extensively with the same buffer as above, and non-specifically bound material was eluted with 0.5 M sodium chloride. The unretained fraction was collected as LpA-I particles: They were used for isolation by immunoaffinity chromatography on anti-apo A-I column (see below). In order to dissociate and collect the retained fraction, 20 ml of 3 M NaSCN were applied to the anti-apo A-II column. To minimize contact between apo A-II-containing particles and the dissociating agent, immunosorbents were constructed with a layer of Sephadex G25 below the immunosorbent portion. This bottom layer of Sephadex G25 allowed immediate separation of the particles from the dissociating agent.

For isolation of LpA-I particles, the unretained fraction on anti-apo A-II immunosorbent was checked for absence of apo A-II by enzyme immunoassay, and subsequently incubated with anti-apo A-I immunosorbent. The retained fraction was collected as described above for the isolation of LpA-I:A-II particles. Apo E was removed previously from these fraction by immunoaffinity chromatography (Barbaras et al. 1987a).

After collection, the fraction containing LpA-I or LpA-I:A-II particles was extensively dialyzed against PBS, pH 7.4 and concentrated under reduced pressure. Apo A-I, A-II, B, C-III and E were measured in both fractions using specific enzyme immunoassays (Fruchart, Fievet and Puchois 1985).

Cholesterol influx and efflux: cholesterol loading of the cells was performed at 37 °C via LDL cholesterol. The promotion of cholesterol efflux was initiated at 37 °C on differentiated, cholesterol-preloaded OB1771 cells. The concentration of the remaining cellular cholesterol was determined by HPLC as previously described (Barbaras et al. 1986).

Results

Preliminary observations indicated that LpA-I and LpA-I:A-II were as effective competitors as human apo A-I containing liposomes for the binding of ¹²⁵I-HDL₃ to differentiated OB1771 cells (Table 1). These receptor sites were shown to be able to recognize apo A-I and apo A-II as well as HDL subfractions containing these apolipoproteins (Barbaras et al. 1986). The presence of such receptor sites has been shown to be required for the promotion of cholesterol efflux (Barbaras, Puchois, Grimaldi, Barkia, Fruchart and Ailhaud 1987b). Therefore, differentiated OB1771 cells were exposed to maximally effective concentrations of LpA-I (HDL₂), LpA-I:A-II (HDL₂), LpA-I (HDL₃) and LpA-I:A-II (HDL₃) in order to study their respective effect on cholesterol efflux. As previously shown for LpA-I and LpA-II isolated from total HDL, LpA-I isolated from HDL₂ and HDL₃ subfractions, promoted cholesterol efflux while LpA-I:A-II did not (Figure 1). Clearly, the lack of effect of LpA-I:A-II particles is neither due to their lack of recognition by receptor sites (Table 1) nor due to their concentration not suffi-

Table 1

Biological	Lipoprotein particles	Concentration required to inhibit 50 of ¹²⁵ I-HDL ₃ binding (µg protein/ml)
Native human plasma	LpA-I	2
	LpA-I	5
	LpA-I:A-II	10
	LpA-I:A-II (ApoE free)	15
HDL ₃	LpA-I	5
	LpA-I:A-II	10
Artificial particles	A-I proteoliposomes	3

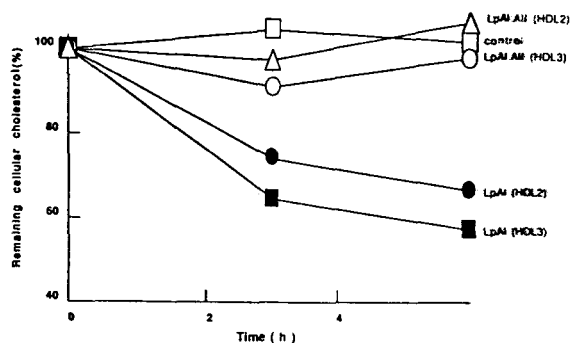


Fig. 1 Cholesterol efflux in differentiated OB1771 cells (% of control). Cholesterol-loaded cells were exposed to different apoprotein A-I containing lipoproteins (100 µg/ml of protein).

cient enough to promote cholesterol efflux, if any. Once again, the results would suggest that the presence of apo A-II makes native particles playing some kind of antagonists role when compared to the agonist role of LpA-I particles.

Discussion

The present study extends our previous work on the effect of LpA-I and LpA-I:A-II isolated from HDL on the cholesterol efflux (Barbaras et al. 1987a). They confirm that LpA-I isolated from whatever density class, HDL₂ and HDL₃, promote cholesterol efflux while the presence of apo A-II into apo A-I-containing lipoproteins can be considered as an antagonist for the promotion of cholesterol efflux. These results underlines that LpA-I and LpA-I:A-II particles behave as distinct metabolic entities as it has been suggested from other studies (Cheung et al. 1987; Puchois, Kandoussi, Fievet, Fourier, Bertrand, Koren and Fruchart 1987; Fielding and Fielding 1981; Atmeh, Shepherd and Packard 1983). In that respect it is of interest to note that LpA-I particles contain the bulk of LCAT and CETP proteins (Cheung et al. 1986). In addition it is possible that a subfraction among the population of LpA-I particles might play a critical role as being the first acceptor of cholesterol following egress from peripheral cells.

References

- Alaupovic, P.: The physicochemical and immunological heterogeneity of human plasma high density lipoproteins. In: *Clinical and Metabolic Aspects of High Density Lipoproteins*, Ed. Miller, N.E. and G.J., Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1985), pp. 1
- Amri, E., C. Dani, A. Doglio, J. Etienne, P. Grimaldi, G. Ailhaud: Adipose cell differentiation: evidence for a two-step process in the polyamine dependant Ob1754 clonal line. *The Biochemical Journal* 238: 115–122 (1986)
- Angel, A., B. Fong: Cellular and Molecular Mechanisms. In: *The Adipocyte and Obesity*, Ed. Angel, Hollenberg, C.H., Roncari, DAK, Raven Press New York (1983), pp. 179–190
- Atmeh, R.F., J. Shepherd, C.J. Packard: Subpopulations of apolipoprotein A-I in human high-density lipoproteins their metabolic properties and response to drug therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 751: 175–188 (1983)
- Barbaras, R., P. Grimaldi, R. Negrel, G. Ailhaud: Binding of lipoproteins and regulation of cholesterol synthesis in cultured mouse adipose cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 845: 492–501 (1985)
- Barbaras, R., P. Grimaldi, R. Negrel, G. Ailhaud: Characterization of high-density lipoprotein binding and cholesterol efflux in cultured mouse adipose cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 888: 143–156 (1986)
- Barbaras, R., P. Puchois, J.C. Fruchart, G. Ailhaud: Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpA-I particles but not by LpA-I:A-II particles. *Biochemical and Biophysical research communications* 142: 63–69 (1987a)
- Barbaras, R., P. Puchois, P. Grimaldi, A. Barkia, J.-C. Fruchart, G. Ailhaud: Relationship in adipose cells between the presence of receptor sites for high density lipoproteins and the promotion of reverse cholesterol transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press (1987b)
- Cheung, M.C., J.P. Segrest, J.J. Albers, J.T. Cone, C.G. Brouillette, B. Hong Chung, M. Kashyap, M.A. Glasscock, G.M. Anantharamaiah: Characterization of high density lipoprotein subspecies: structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *Journal of Lipid Research* 28: 913–929 (1987)
- Cheung, M.C., A.C. Wolf, K.D. Lum, J.H. Tollefson, J.J. Albers: Distribution and localization of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I-containing lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 27: 1135–1144 (1986)
- Fielding, C.J., P.E. Fielding: Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin: cholesterol acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6: 3911 (1981)
- Fruchart, J.C., C. Fievet, P. Puchois: Apolipoproteins. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. Bergmeyer (1985) vol. III, pp. 126–128
- Krause, B.R., A.D. Hartman: Adipose tissue and cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research* 25: 97–110 (1984)
- Miller, N.E., F. Hammett, S. Saltissi: Relation of angiographically defined coronary artery disease to plasma lipoprotein subfractions and apolipoproteins. *Br. Med. J.* 282: 1741–1744 (1981)
- Nichols, A.V., E.L. Gong, P.J. Blanche, T.M. Forte, V.G. Shore: Pathway in the formation of human plasma high density lipoprotein subpopulations containing apolipoprotein A-I without apolipoprotein A-II. *Journal of Lipid Research* 28: 719–732 (1987)
- Puchois, P., A. Kandoussi, P. Fievet, J.L. Fourier, M. Bertrand, E. Koren, J.C. Fruchart: Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 68: 35–40 (1987)

Article n°5

**Differential role of apolipoprotein AI containing particles
in cholesterol efflux from adipose cells**

Barkia A., Puchois P., Ghalim N., Barbaras R., Torpier G.,
Ailhaud G. and Fruchart J.C.

Arteriosclerosis, accepté

DIFFERENTIAL ROLE OF APOLIPOPROTEIN A_I-CONTAINING PARTICLES IN CHOLESTEROL EFFLUX FROM ADIPOSE CELLS

Ahmed BARKIA⁺, Pascal PUCHOIS⁺, Nordine GHALIM⁺, Ronald BARBARAS^{o*},
Gérard TORPIER⁺, Gérard AILHAUD^{o*} and Jean-Charles FRUCHART⁺

⁺ Institut Pasteur-SERLIA, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cédex

^o Centre de Biochimie(CNRS),Fac.Sciences,Parc Valrose,06034 Nice Cédex

^{*} Laboratoires Fournier, 50 rue de Dijon, Daix, 21121 Fontaine-les-Dijon
FRANCE.

Highest degree for each author : Ahmed BARKIA, Ph.D. ; Pascal PUCHOIS, Ph.D. ; Nordine GHALIM, pre-doctorate fellow ; Ronald BARBARAS, Ph.D. ; Gérard TORPIER, Ph.D. ; Gérard AILHAUD, Ph.D. and Jean-Charles FRUCHART, Ph.D.

Acknowledgements for grant supports : The authors wish to thank the "Institut Pasteur" (Lille, France) and the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS LP7300, Nice, France) for financial support. Thanks are also due to the "Fondation pour la Recherche Médicale Française" (Paris, France).

Short title : Role of LpA-I and LpAI:AI in cholesterol efflux

Key-words = LpA_I / LpA_I:A_{II} / Cholesterol efflux

[†] To whom correspondence and proofs should be sent

Telex number UNINICE 970 281 F - Fax 93 52 99 17

ABBREVIATIONS

HDL, high-density lipoprotein ; LDL, low-density lipoprotein ; LpA_I(P), LpA_I from native plasma ; LpA_I:A_{II}(P), LpA_I:A_{II} from native plasma.

ABSTRACT

Cholesterol efflux was studied in cultured Ob1771 adipose cells after pre-loading with LDL cholesterol. Long-term exposure to particles containing only apo A_I (LpA_I) and particles containing apo A_I and apo A_{II} (LpA_I:A_{II}) isolated from native human plasma, and from HDL₂ and HDL₃, showed that only LpA_I were able to promote cholesterol efflux, despite the fact that both kinds of particles were able to bind to the same receptor sites. During this long-term exposure, LpA_I:A_{II} particules demonstrated a concentration-dependent inhibition of LpA_I-mediated cholesterol efflux from the adipose cells. We conclude that the antagonizing and modulating role of LpA_I:A_{II} in preventing cholesterol efflux mediated by LpA_I is not related to the respective density of the particles but, rather, is dependent upon the presence of apo A_I in LpA_I particles and of apo A_{II} in LpA_I:A_{II} particles. The actual concentrations of these particles in the interstitial fluid bathing peripheral cells might be critical for the in vivo occurrence of net reverse cholesterol transport from peripheral cells to the liver.

INTRODUCTION

Several studies have reported that high-density lipoproteins (HDL) can promote both a bidirectional flux of cholesterol and a net unidirectional cholesterol efflux in a variety of cells^{1,2}. In adipose tissue, 90% of tissue cholesterol was found in adipocytes and to a very large extent (75-90%) as unesterified cholesterol³. This tissue is able to store and, when needed, to mobilize a large pool of unesterified cholesterol. Cultured mouse adipose cells, which possess both distinct apo B,E⁴ and apo A_I,A_{II} receptor sites^{4,5} are unable to synthesize cholesterol, do not exhibit efficient cholesterol homeostasis and can, as observed *in vivo* for adipocytes, accumulate or mobilize unesterified cholesterol⁵.

As previously shown, long-term exposure of Ob1771 adipose cells to increasing concentrations of low density lipoproteins (LDL) leads to an increased accumulation of cellular unesterified cholesterol but cholesterol esters remain undetectable⁵. The capacity of adipose cells to regulate their cholesterol content is therefore limited. As a consequence, cholesterol loading via LDL cholesterol mimics the physiological situation and cultured adipose cells seem to be a suitable model of peripheral cells to study the first step in reverse cholesterol transport, i.e. cholesterol efflux. The process of cholesterol accumulation is reversible and saturable : cholesterol efflux takes place as a function of time and concentration by exposure of cholesterol-preloaded cells to HDL₃ or apo A_I-containing liposomes whereas apo A_{II}-containing liposomes do not promote this efflux⁵.

The use of a heterologous system, i.e. human (apo)lipoproteins and mouse adipose cells, is valid in light of several observations made in Ob1771 cells

- i) mouse LDL compete with human LDL for binding to apo B,E receptor sites⁴ ;
- ii) mouse HDL (containing mainly apo A_I and apo A_{II}) compete with human HDL₃ for the binding to apo A_I,A_{II} receptor sites^{4,5} ;
- iii) mouse apo A_I and apo A_{II}

resemble their human counterparts in aminoacid composition^{6,7} and, moreover, aminoacid sequence analysis demonstrates strong homology for apo A_I⁶ or apo A_{II}⁷ between human and mouse. The "agonist" role of apo A_I and the "antagonist" role of apo A_{II} in cholesterol efflux, have been demonstrated in the to two populations of apo A_I-containing lipoprotein particles present in plasma : those that also contain apo A_{II} (LpA_I:A_{II}) and those that do not (LpA_I), and which together represent the bulk of the particles present in the HDL fraction ; LpA_I but not LpA_I:A_{II} promotes cholesterol efflux from cholesterol-preloaded Ob1771 cells⁸. The present study was undertaken to compare the binding of LpA_I and LpA_I:A_{II} to the apo A_I,A_{II} receptor sites of Ob1771 cells, and to determine whether apo E-free LpA_I and apo E-free LpA_I:A_{II} particles isolated from native plasma, and from HDL₂ and HDL₃ fractions (which represent lipoprotein particles of different densities) behave similarly. The possible modulation by LpA_I:A_{II} of the LpA_I-mediated cholesterol efflux was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Culture media and bovine serum were from Flow Laboratories (Bethesda, U.S.A.). Na¹²⁵I was obtained from Amersham International (Buckinghamshire, U.K.). All other products were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.)

Cells

Ob1771 cells (a subclone of Ob17 cells) were plated at 2.5×10^3 cells per cm² in multi-well plates (Limbro) or 60-mm diameter dishes (Falcon). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 7% (v/v) bovine serum and maintained after confluence in the same medium supplemented with insulin, triiodothyronine, putrescine and methylglyoxal bis(guanyldrazone), as previously described⁴. Media were changed every 2 days. Differentiated cells

showed both the morphological and biochemical properties of rodent adipose cells⁴. Under the culture conditions used, the cells accumulated small lipid droplets, but the triacylglycerol content of differentiated cells remained low, i.e. at least two orders of magnitude lower than that of mature fat cells⁹. The experiments reported below were performed between day 10 and day 12 after confluence. Cells were exposed at 37°C to a medium containing lipoprotein-deficient bovine serum (referred to as lipoprotein-deficient medium) for 24 h before performing assays of binding at 4°C (vide infra) and assays of cholesterol influx or efflux at 37°C⁴.

Plasma

Blood of normolipemic blood donors (after an overnight fast) was collected into EDTA-containing tubes (1.5 mg/ml) and promptly centrifuged at 4°C for 15 min at 1500 x g to separate cells from plasma. Plasma samples were kept at 4°C for no more than 24 h and analyzed for lipoproteins, apolipoproteins and lipids.

Isolation of lipoproteins and quantitation of apolipoproteins and lipids

Human LDL, HDL₂ and HDL₃ were separated by sequential ultracentrifugation of human plasma. Removal of apo E and apo B from native plasma was performed by heparin-Sepharose column chromatography¹⁰. Removal of apo E from HDL₂ and HDL₃ was performed by immunoaffinity chromatography, as previously described¹¹. Native plasma, HDL₂ and HDL₃ depleted of apo E and apo B were then used for isolation of LpA_I and LpA_I:A_{II} particles by immunoaffinity chromatography⁸. LpA_{II} particles were isolated from plasma of a patient with Tangier's disease and also from pooled plasma of blood donors (vide supra). Each plasma was chromatographed on a column of Sepharose 4B coupled to anti-apo A_{II} antibodies. The retained fraction, after elution with 3 M guanidinium thiocyanate and dialysis against phosphate-buffered saline (pH 7.4), was put onto a column of Sepharose 4B coupled to anti-apo A_I

antibodies. The unretained fraction was concentrated using an Amicon membrane filter (MW 30,000 cut). This fraction which, based on protein content, represented 2-3% of all apo A_{II}-containing particles in blood donor plasma and showed only apo A_{II} when analyzed by SDS-PAGE. Human apo A_I, apo A_{II}, apo B, apo C_{II} and apo C_{III} were measured in each fraction using specific enzyme immunoassays¹². Protein was measured by the method of Lowry *et al.*¹³. Cholesterol (total and unesterified), phospholipids and triglycerides were determined enzymatically¹⁴⁻¹⁶.

Labeling of high-density lipoproteins

The procedure of Bilheimer *et al.*¹⁷ was used for the radioiodination of human HDL₃. The specific activities varied between 130 and 200 cpm per ng of protein.

Binding assays

To prevent any interference of apo B,E receptor sites by the binding of apo A_I-containing lipoprotein particles also containing apo E and/or apo B, intact Ob1771 cells present in multi-well plates were first exposed for 2 h at 4°C to 1 ml per well of a lipoprotein-deficient medium containing 100 µg of LDL. Cells were then washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4). Competition experiments were subsequently performed at 4°C and at a fixed concentration of [¹²⁵I]-HDL₃ (30 µg/ml) added simultaneously to increasing concentrations of the various unlabeled lipoprotein particles (see Fig.2). After 2 h, the radioactivity bound to the cells was determined as previously described⁴. All assays were performed on duplicate dishes. Variability between duplicate values was not more than 10%.

Cholesterol influx and efflux

As previously reported, exposure to LDL cholesterol proved to be critical in order to achieve cholesterol loading of Ob1771 cells⁵. Only with this "physiological" procedure was it possible to obtain reproducible and meaningful

results for the subsequent determination of cholesterol efflux. To promote cholesterol influx, differentiated Ob1771 cells in 60-mm diameter dishes were first maintained at 37°C for 24 h in 5 ml of lipoprotein-deficient medium and then exposed for 48 h to unlabeled LDL at a fixed concentration of 100 µg/ml in the same medium. Subsequently, the cells were rinsed three times with phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 37°C and then maintained in 1 ml of lipoprotein-deficient medium with or without various unlabeled lipoprotein particles. The cholesterol efflux was then determined either as a function of time (see Fig.3) or as a function of increasing concentrations of these lipoprotein particles after 6 h incubation (see Fig. 4).

The concentration of cholesterol in Ob1771 cells was determined by HPLC as described previously⁵ after rinsing the cells with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) and solubilization with 2 ml of 0.1 M NaOH per dish. Under these conditions 1-50 µg of injected cholesterol could be routinely determined. Since separation of cholesterol and cholesterol esters from lipid extracts of these cells by HPLC (using a different solvent system) had previously shown the absence of detectable cholesterol esters⁵, cholesterol was directly determined without prior hydrolysis.

Electron-microscopy

LpA_I and LpA_I:A_{II} particles were dialyzed against a large excess of buffer (0.125 M ammonium acetate, 2.6 mM ammonium hydrogenocarbonate and 0.26 mM tetrasodium EDTA, pH 7.4) and negatively stained with 1% uranyl formate. Electron micrographs were taken with a Philips EM 420 transmission electron microscope. The primary magnification was usually 52000 diameters.

RESULTS

Analysis of apolipoproteins lipids and size distribution in LpA_I and LpA_I:A_{II}

As shown in Table I, both LpA_I and LpA_I:A_{II} isolated by immunoaffinity chromatography from HDL₂ or HDL₃ were largely devoid of apo B, apo C_{II} and apo C_{III}. As expected, no apo A_{II} could be detected in LpA_I from HDL₂ [LpA_I(HDL₂)] or HDL₃ [LpA_I(HDL₃)]. The molar ratio of apo A_I to apo A_{II} was close to unity in LpA_I:A_{II} isolated from both HDL₂ [LpA_I:A_{II}(HDL₂)] and HDL₃ [LpA_I:A_{II}(HDL₃)]. However this ratio differs between various LpA_I:A_{II} particles (*vide infra*). The data indicate that LpA_I and LpA_I:A_{II}, isolated from HDL₂ or HDL₃ and thus exhibiting different densities, did not contain any major additional apolipoprotein. The determination of the apo A_{IV} content was not made, but if we assume that most apo A_{IV} associated with the HDL fraction should have been lost during ultracentrifugation¹⁸, it is reasonable to postulate that LpA_I can be considered as particles containing only apo A_I and LpA_I:A_{II} as particles containing only apo A_I and apo A_{II}. The analysis of the lipid composition of LpA_I and LpA_I:A_{II} from HDL₂ and HDL₃ showed that LpA_I from HDL₃ was enriched in esterified plus unesterified cholesterol and in triglycerides as compared to other particles. In addition, the ratio of esterified to unesterified cholesterol was somewhat higher in either LpA_I:A_{II} species than in either LpA_I species (1.2-1.5 compared to 1.1).

Electron micrographs of LpA_I and LpA_I:A_{II} from the same samples of either lipoprotein subspecies were prepared and morphometric analyses were carried out (Table I). The average particle size (mean $\pm$ SD) was 108.4 ± 19.5 Å for LpA_I(HDL₂), 107.3 ± 23.6 Å for LpA_I(HDL₃), 100.6 ± 18.3 Å for LpA_I:A_{II}(HDL₂) and 96.6 ± 17.8 Å for LpA_I:A_{II}(HDL₃). Figure 1 shows the profiles of the size distribution of the various lipoprotein particles. These profiles indicate that there exists for either lipoprotein subspecies some particles whose average diameter is larger than those reported above.

The morphographic analysis of particle diameters is consistent with a bimodal size distribution for LpA_I(HDL₃), LpA_I:A_{II} from HDL₂ and HDL₃ but not for LpA_I(HDL₂).

Competitive binding of LpA_I or LpA_I:A_{II} with HDL₃ to intact Ob1771 cells

The relative binding activities of LpA_I and LpA_I:A_{II} from native plasma, HDL₂ or HDL₃ were examined in competitive assays with ¹²⁵I-HDL₃. As shown in Figure 2, LpA_I (Fig.2A) and LpA_I:A_{II} particles (Fig.2B) prevented the ¹²⁵I-HDL₃ binding to adipose cells at 4°C. The concentrations required to prevent 50% of the binding were between 5 µg/ml and 10 µg/ml of protein. Therefore it is likely that LpA_I and LpA_I:A_{II} bind with similar affinities to the same receptor sites which have been already described as recognizing both apo A_I and apo A_{II}⁵.

Cholesterol efflux from cholesterol-preloaded Ob1771 cells exposed to various apo A_I-containing particles

Differentiated Ob1771 cells were first exposed to LDL cholesterol under conditions leading to the accumulation of unesterified cholesterol (see "Materials and Methods"). Subsequent exposure to LpA_I(HDL₂), LpA_I(HDL₃) or LpA_I isolated from native plasma [LpA_I(P)] promoted cholesterol efflux. A rapid decrease in the cellular cholesterol content occurred within 3 h and reached a lower value within 6 h (see Fig.3). This value was similar to that determined in control cells before exposure to LDL cholesterol. No decrease was observed in the absence of LpA_I or in the presence of LpA_I:A_{II} from all three sources. The lack of effect of LpA_I:A_{II} cannot be due to the lack of binding of LpA_I:A_{II} to the receptor sites (see Fig.2). Moreover the concentration of LpA_I:A_{II} (100 µg/ml) being used was sufficient to saturate these sites (see Fig.2).

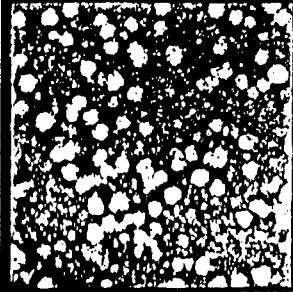
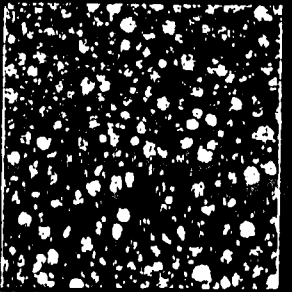
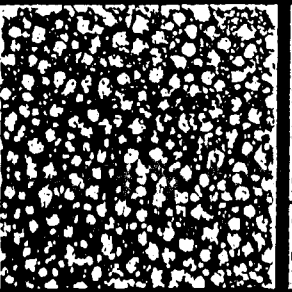
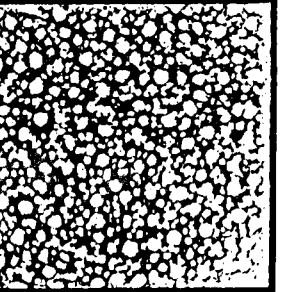
Modulation by LpA_I:A_{II} of LpA_I-mediated cholesterol efflux in Ob1771 cells

To exclude apolipoproteins other than apo A_I or apo A_{II} which might interfere with the process of cholesterol efflux, only LpA_I and LpA_I:A_{II} isolated from HDL₂ or HDL₃ were used. The respective concentrations of LpA_I

and LpA_I:A_{II} were chosen to mimic the actual plasma concentrations of these particles in HDL₂ and HDL₃^{19,20}.

As shown in Figure 4, both LpA_I:A_{II}(HDL₂) and LpA_I:A_{II}(HDL₃) were able to inhibit cholesterol efflux mediated by LpA_I(HDL₂) or LpA_I(HDL₃). LpA_I:A_{II}(HDL₂) was more inhibitory than LpA_I:A_{II}(HDL₃) in the presence of either LpA_I species. The concentration required to prevent 50% of LpA_I-mediated cholesterol efflux ranged for LpA_I:A_{II}(HDL₂) from 5 µg/ml (Fig.4B) to 10 µg/ml (Fig.4A) and for LpA_I:A_{II}(HDL₃) from 5 µg/ml (Fig.4B) to 15 µg/ml (Fig.4A). These values are in fairly good agreement with concentrations required to prevent 50% of [¹²⁵I]HDL₃ binding to intact Ob1771 cells (see Fig.2B). During the course of these experiments, it was noted, as previously reported for cholesterol efflux in human fibroblasts¹, that HDL₂, in contrast to HDL₃, did not promote cholesterol efflux from cholesterol-preloaded cells. The stronger inhibition of efflux caused by LpA_I:A_{II}(HDL₂) than by LpA_I:A_{II}(HDL₃) was striking. It was reasoned that HDL₂ but not HDL₃ might contain lipoprotein particles composed of only apo A_{II}(LpA_{II}) in addition to LpA_I:A_{II} present in both sub-fractions. LpA_{II} were indeed isolated from HDL₂ but not from HDL₃ (not shown). As illustrated in Table II, LpA_{II} isolated from plasma of a patient with Tangier's disease and LpA_{II} isolated from native plasma of normolipemic blood donors were able to inhibit the LpA_I-mediated cholesterol efflux.

Table I: APOLIPOPROTEIN AND LIPID COMPOSITION OF LPA_I AND LPA_I:A_{II}

MOLE/MOLE APO A-I	Lp A-I (HDL2)	Lp A-I (HDL3)	Lp A-I:A-II (HDL2)	Lp A-I:A-II (HDL3)
ESTERIFIED CHOLESTEROL	67.0 ± 13.0	1 75 ± 7.5	20.0 ± 3.0	27.0 ± 2.0
UNESTERIFIED CHOLESTEROL	62.5 ±13.5	16.0 ± 1.0	13.0 ± 0	22.5 ± 2.5
PHOSPHOLIPIDS	78.5 ± 11.5	81.0 ± 4.0	36.0 ± 4.0	40.0 ± 2.0
TRIGLYCERIDES	21.0 ± 7.0	8.0 ± 2.0	4.0 ± 0	7.50 ± 0.05
APO A-II	und	und	0.97 ± 0.02	1.10 ± 0
APO C-II (x 10 ⁻³)	5.7 ± 0.7	2.4 ± 0.4	6.4 ± 0.2	5.8 ± 0.7
APO C-III (x 10 ⁻³)	0.17 ± 0.02	0.07 ±0.01	0.013 ± 0.004	0.03 ± 0.02
APO B (x 10 ⁻³)	1.6	0.6	0.38	0.12
DIAMETERS (Å)	108.4 ± 19.5	107.3 ± 23.6	106 ± 18.3	96.6 ±17.8
				

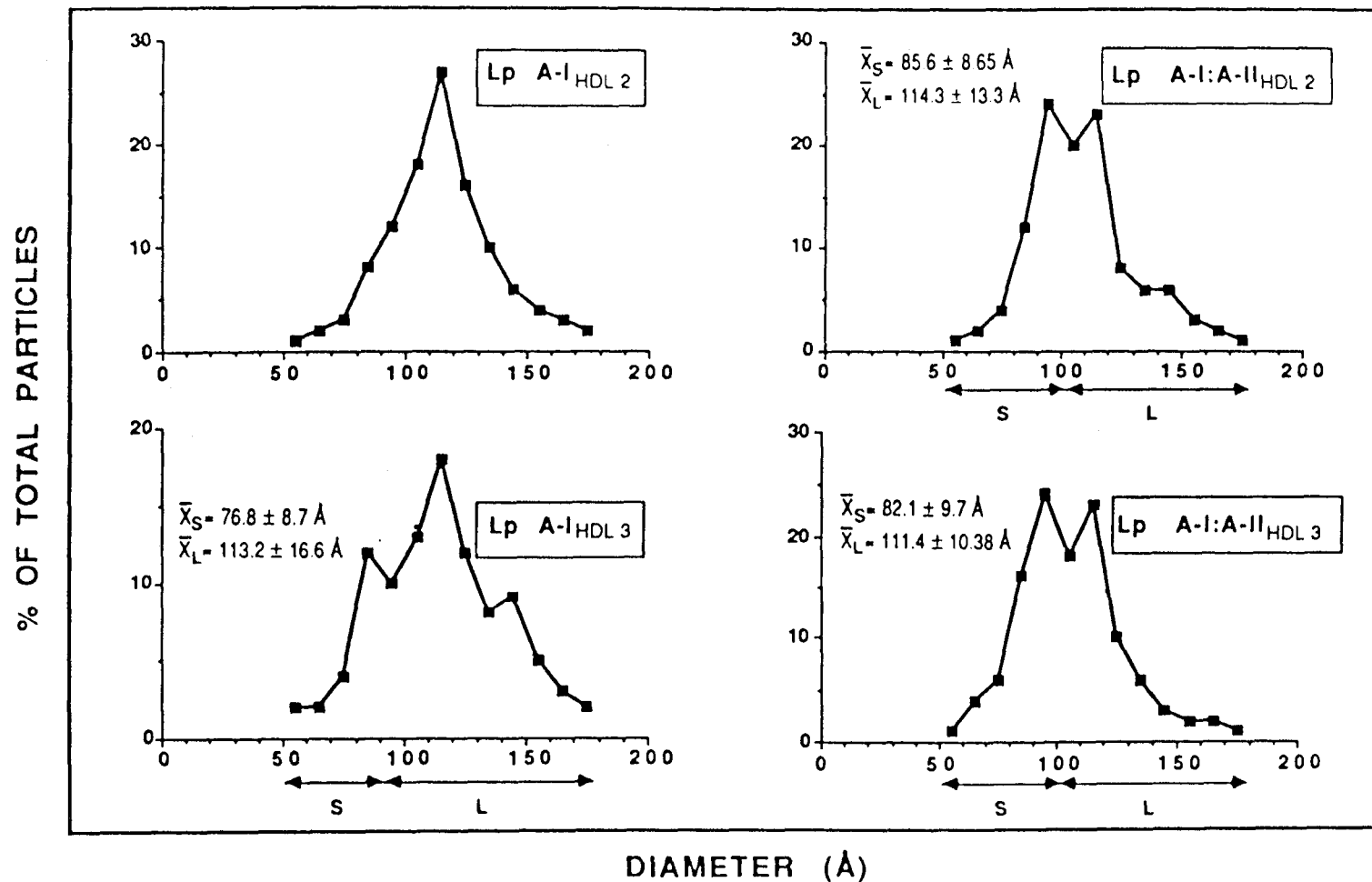


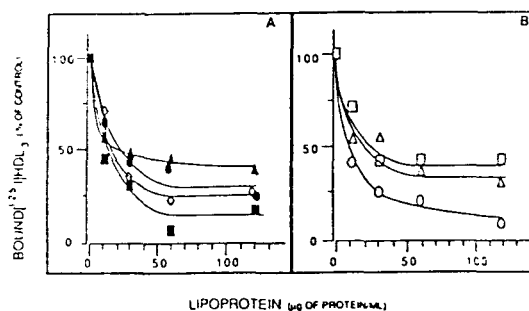
Fig.1 : Morphographic analysis of particle diameters

LpA_I and LpA_I:A_{II} isolated from HDL₂ and HDL₃ (see Table I for apolipoprotein and lipid composition) were analyzed for size by negative staining. For each particle, n=500. Particle diameter mean ($\bar{x}$) and standard deviation ($\pm$) are displayed on each graph : $\bar{x}_S$, smaller mode ; $\bar{x}_L$, larger mode.

Table II : INHIBITION OF LPA_I-MEDIATED CHOLESTEROL EFFLUX BY LPA_{II}

	μG CHOLESTEROL / MG PROTEIN	% INHIBITION OF CHOLESTEROL EFFLUX
<u>Experiment 1</u>		
No addition	73.0 ± 2.7	-
LpA _I	42.5 ± 1.3	-
LpA _I +LpA _I :A _{II} (40 μg/ml)	51.0 ± 1.8	27.9 ± 5.9
LpA _I +LpA _{II} Tangier (40 μg/ml)	55.7 ^a	43.3
LpA _I +LpA _I :A _{II} +LpA _{II} Tangier (40 μg/ml)	60.9 ^a	60.3
<u>Experiment 2</u>		
No addition	43.2 ± 0.8	-
LpA _I	37.9 ± 1.1	-
LpA _I +LpA _{II} (25 μg/ml)	41.5 ^a	67.9
LpA _I +LpA _{II} (100 μg/ml)	46.7 ^a	>100

LpA_I were isolated in Experiment 1 from HDL₃ and in Experiment 2 from native plasma of two normolipemic blood donors ; 40 μg/ml were used in Experiment 1 and 50 μg/ml in Experiment 2. LpA_{II} were isolated from native plasma of Tangier patient in Experiment 1 and from a normolipemic blood donor in Experiment 2. Two different series of cholesterol-preloaded Ob1771 cells were used in Experiments 1 and 2. The reported values were obtained for each condition in duplicate dishes and are expressed as median ± range. The difference in cholesterol content between cells not exposed and cells exposed to LpA_I for 6 h was taken as zero percent inhibition. 100% inhibition correspond to a situation in which this difference would be equal to zero. a, experiment performed on a single dish.

Fig.2: Competitive inhibition of (125I)-HDL₃ binding to intact Ob1771 cells

Ob1771 cells were preincubated with 100 μg/ml of LDL as described in "Materials and Methods" and then incubated at 4°C for 2 h with 30 μg/ml of (125I)-HDL₃ and increasing concentrations of (A) LpA_I(P) (●), LpA_I(HDL₂) (◇), LpA_I(HDL₃) (▲), HDL₃ (■) and (B) LpA_I:A_{II}(P) (△), and LpA_I:A_{II}(HDL₂) (□) and LpA_I:A_{II}(HDL₃) (○). 100% binding corresponds to the value obtained in the absence of competitor. The mean values from duplicate dishes, which did not differ by more than 10%, are reported. Similar values have been obtained in another independent experiment performed in the presence of LpA_I(HDL₃) and LpA_I:A_{II}(HDL₃). A separate batch of native plasma was used to directly prepare LpA_I(P) and LpA_I:A_{II}(P).

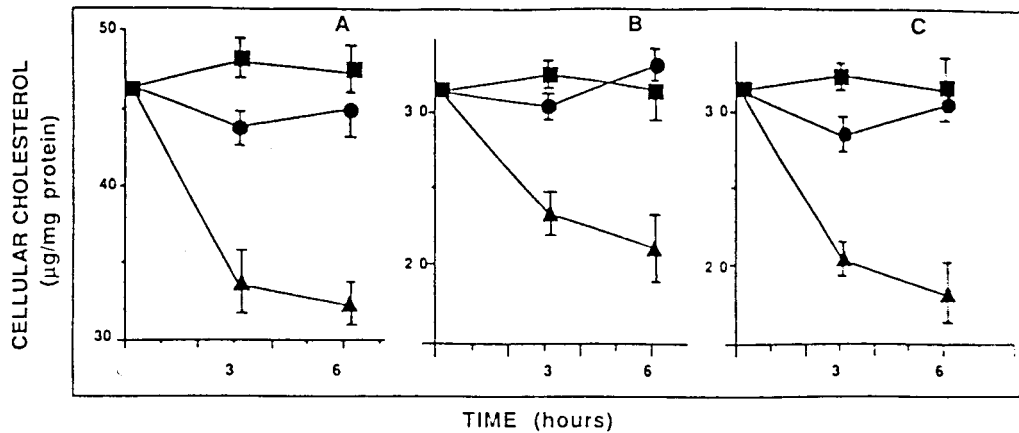


Fig.3: Cholesterol efflux in Ob1771 cells exposed to LpA_I and LpA_I:A_{II} particles

Cholesterol preloading of Ob1771 cells was performed as described in "Materials and Methods". Cells were then maintained in the absence (■) or in the presence of LpA_I (▲) from native plasma (A), HDL₂ (B) and HDL₃ (C) or LpA_I:A_{II} (●) from native plasma (A), HDL₂ (B) and HDL₃ (C). Duplicate dishes were treated and assayed for cellular cholesterol content. Median $\pm$ range values from duplicate dishes are reported; they are representative of two independent experiments performed on two different series of cells. The cholesterol content of cells maintained continuously in lipoprotein-deficient bovine serum was 22 (A) and 17 µg/mg of cell protein (B,C).

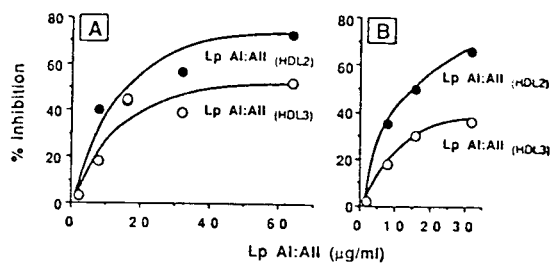


Fig-4: Inhibition by LpA_I:A_{II} of LpA_I-mediated cholesterol efflux in Ob1771 cells

Cholesterol-preloaded Ob1771 cells exposed to LpA_I (40 µg/ml) isolated from HDL₃ (A) or HDL₂ (B) and in the presence of increasing concentrations of LpA_I:A_{II} isolated from HDL₂ (●) or HDL₃ (○). After 6 h at 37°C, cellular cholesterol content was determined as described in "Materials and Methods". Control cells were continuously exposed to LDL cholesterol and contained 62 µg cholesterol per mg of cell protein whereas cholesterol-preloaded cells subsequently exposed for 6 h to LpA_I(HDL₂) or LpA_I(HDL₃) had a remaining content of cellular cholesterol content of 32 µg cholesterol per mg of cell protein; 100% decrease corresponds to the difference between both values i.e. 30 µg of cholesterol per mg of cell protein. The curves are representative of two independent experiments performed with two different series of cells.

DISCUSSION

The lipoprotein particles used in this study were isolated either from native plasma or from HDL₂ and HDL₃ recovered from plasma after ultracentrifugation. Recent reports have indicated that, among the apo A_I-containing lipoprotein particles, LpA_I are less stable than LpA_I:A_{II} upon ultracentrifugation²¹. Because of the small extent of perturbation induced by this technique on the apolipoprotein composition of either LpA_I:A_{II} species shown in Table I, it is likely that the LpA_I:A_{II}(HDL₂) and LpA_I:A_{II}(HDL₃) are similar to LpA_I:A_{II} isolated from native plasma²¹. The situation may be different for LpA_I particles which have been reported to be more labile upon ultracentrifugation²¹. In any event, it is clear that intact LpA_I(P) or "remodeled" LpA_I isolated from HDL₂ or HDL₃ behave similarly and quite efficiently in promoting cholesterol efflux from cholesterol-preloaded adipose cells. This "remodeling" does not seem to affect significantly, if at all, the functional properties of LpA_I particles. Nevertheless, since the cellular cholesterol content was determined when efflux reached a plateau, it cannot be excluded that various LpA_I particles behaved distinctly different from a kinetic point of view. The characterization of a subpopulation of apo A_I-containing particles of apparent M_r=70 kDa in native plasma, which appears to behave as the first acceptor of cholesterol from human skin fibroblasts preloaded with cholesterol²², may well be relevant on this point.

In contrast to LpA_I particles, LpA_I:A_{II} particles isolated from native plasma, HDL₂ or HDL₃ are inactive with respect to cholesterol efflux. Since LpA_I (or LpA_I:A_{II}) isolated from HDL₂ or HDL₃ have a different density and thus a different lipid content, the distinct metabolic behavior of LpA_I and LpA_I:A_{II} seems only related to their apolipoprotein composition. Given the apolipoprotein composition of LpA_I and LpA_I:A_{II} shown in Table I, it is reasonable to assume that only apo A_I is involved in the agonist role played by LpA_I particles and that only apo A_{II} is involved in the antagonist role played by LpA_I:A_{II}. The presence of apo A_{II} in a particle is critical for inhibition of cholesterol efflux. This conclusion is supported by the inhibition of LpA_I-mediated cholesterol efflux in the presence of LpA_{II} particles isolated from a patient suffering from Tangier's disease and from normolipemic blood donors.

The fact that LpA_I and LpA_I:A_{II} compete for the same binding sites recognizing apo A_I and apo A_{II} (see Fig.2 and ref.5) led us to study the modulation by LpA_I:A_{II} of LpA_I-mediated cholesterol efflux (see Fig.4). This modulation takes place in vitro at concentrations similar to those required for binding. This result is consistent with the direct role played by the apo A_I,A_{II} receptor sites in this process²³. The significance in vivo of our observations remains to be established, but it is tempting to postulate that the magnitude of cholesterol efflux from peripheral cells might be adjusted according to the actual concentrations of both kinds of particles in the interstitial fluid bathing the cells. In favor of this hypothesis is the fact that LpA_I and LpA_I:A_{II} have been recently characterized in human interstitial fluid (P. Puchois et al., unpublished data), and that their relative concentrations are compatible with a possible role in cholesterol efflux from peripheral cells. Further investigations on this point of major interest are warranted, since patients suffering from atherosclerosis have plasma LpA_I concentrations significantly lower than those of healthy subjects, in contrast to similar concentrations of LpA_I:A_{II}²⁴.

ACKNOWLEDGEMENTS

The help of Dr. A. Doglio and Miss M. Cazalès for growing Ob1771 cells and the secretarial assistance of Mrs. G. Oillaux are gratefully acknowledged.

The authors are grateful to Prof. D. Goldberg (Toronto, Canada) and Dr. A. Steinmetz (Marburg, FRG) for careful reading of the manuscript and helpful suggestions.

REFERENCES

1. Oram JF, Albers JJ, Cheung MC, Bierman EL. The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. Regulation of low density lipoprotein receptor activity. *J Biol Chem* 1981; 256:8348-8351
2. Bachorick PS, Virgil DG, Kwiterovich PO Jr. Effect of apolipoprotein E-free high density lipoprotein on cholesterol metabolism in cultured pig hepatocytes. *J Biol Chem* 1987; 262:13636-13645
3. Krause BR, Hartman AD. Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 1984;25:97-110
4. Barbaras R, Grimaldi P, Négrel R, Ailhaud G. Binding of lipoproteins and regulation of cholesterol synthesis in culture adipose cells. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:492-501
5. Barbaras R, Grimaldi P, Négrel R, Ailhaud G. Characterization of high-density lipoprotein binding and cholesterol efflux in culture mouse adipose cells. *Biochem Biophys Acta* 1986;888:143-156
6. Steinmetz A *et al.*, *J Biol Chem*, submitted for publication
7. Forgez P, Chapman MJ, Rall SC Jr, Camus M-C. The lipid transport system in the mouse, *Mus musculus*: isolation and characterization of apolipoproteins B, AI, AII, CIII. *J Lipid Res* 1984;25:954-966
8. Miller CG, Lee TD, Leboeuf RC, Shively JE. Primary structure of apolipoprotein AII from inbred mouse strain BALB/c. *J Lipid Res* 1987;28:311-319
9. Barbaras R, Puchois P, Fruchart JC, Ailhaud G. Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpAI particles but not by LpAI:AII particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142:63-69

10. Négrel R, Grimaldi P, Ailhaud G. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:6054-6058
11. Havel RJ, Eder HA, Brangdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-1353
12. Weisgraber KH, Mahley RW. Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin Sepharose affinity chromatography. *J Lipid Res* 1980;21:316-325
13. Ginson JC, Rubinstein A, Ngain N, *et al.* Immunoaffinity isolation of apolipoprotein E containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1985;835:113-123
14. Fruchart JC, Fievet C, Puchois P. Apoproteins. In Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III, Academic Press, New York. 1985;126-138
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
16. Fruchart JC, Duthilleul P, Daunizeau A, Comyn P. Dosage du cholestérol total à l'aide d'une méthode enzymatique utilisant un monoréactif. *Pharm Biol* 1980;24:227-229
17. Ziegenhorn J, Baril K, Deeg R. Improved kinetic method for automated determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1980;26:973
18. Takayam M, Itoh S, Nagasaki T. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 1977;79:93-98
19. Bilheimer D, Eisenberg S, Levy R. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary *in vitro* and *in vivo* observations. *Biochim Biophys Acta* 1972;260:212-221

20. Craig IF, Via DP, Sherill BC *et al.*. Incorporation of defined cholesteryl esters into lipoproteins using cholesteryl ester-rich microemulsions. *J Biol Chem.* 1982;257:330-335
21. Bisgaier CL, Sachdev OP, Megna L, Glickman RM. Distribution of apolipoprotein A_{IV} in human plasma. *J Lipid Res* 1985;26:11-25
22. Cheung MC. Characterization of apolipoprotein A-containing lipoproteins. In *Methods in Enzymology* 1986;129:130-145
23. Atmeh RF, Shepherd J, Packard CJ. Subpopulations of apolipoprotein A_I in human high-density lipoproteins. Their metabolic properties and response to drug therapy. *Biochim Biophys Acta* 1983;751:175-188
24. Koren E, Puchois P, Alaupovic P *et al.*. Quantitative determination of two different types of apolipoprotein A_I by a noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chim Acta* 1987;33:38-43
25. Puchois P, Kandoussi A, Fourrier JL *et al.*. Apolipoprotein A_I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987;68:35-40
26. Cheung MC, Wolf AC. *In vitro* transformation of apo A_I-containing lipoprotein subpopulations : role of lecithin:cholesterol acyltransferase and apo B-containing lipoprotein. *J Lipid Res* 1989;30:499-500
27. Cheung MC, Wolf AC. Differential effect of ultracentrifugation on apolipoprotein A_I containing lipoprotein subpopulations. *J Lipid Res* 1988;29:15-25
28. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β migrating high-density lipoproteins. *Biochemistry* 1988;27:25-29
29. Barbaras R, Puchois P, Grimaldi P *et al.*. In Malmendier CL, ed. *Eicosanoids, Apolipoproteins, Lipoprotein Particles and Atherosclerosis*. Plenum Press, New York. 1989, in press

30. Barbaras R, Puchois P, Grimaldi P *et al.* Relationship in adipose cells between the presence of receptor sites for high-density lipoproteins and the promotion of reverse cholesterol transport. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149/2:545-554

Article n°6

**Human apolipoprotein AIV
binds to apolipoprotein AI/AII receptor sites
and promotes cholesterol efflux from adipose cells**

Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J.C. and Ailhaud G

J.Biol. Chem., accepté

HUMAN APOLIPOPROTEIN A-IV BINDS TO APOLIPOPROTEIN A-I/A-II RECEPTOR
SITES AND PROMOTES CHOLESTEROL EFFLUX FROM ADIPOSE CELLS

Armin STEINMETZ^{+o}, Ronald BARBARAS^{*}, Nordine GHALIM⁺

Véronique CLAVEY⁺, Jean-Charles FRUCHART⁺, and Gérard AILHAUD^{*}

+ SERLIA, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cédex,
France

* Centre de Biochimie du CNRS, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06034 Nice
cédex, France

o present address and address for correspondence:

Zentrum Innere Medizin, Endokrinologie und Stoffwechsel, Universität Marburg,
Baldingerstrasse, D-3550 Marburg, FRG

Tel. 011-49-6421-28 36 91

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to
A. Steinmetz.

Running head : Binding of apolipoprotein A-IV and cholesterol efflux

FOOTNOTES

* The **abbreviations** used are : **apo A-I**, apolipoprotein A-I ; **apo A-II**, apolipoprotein A-II ; **apo A-IV**, apolipoprotein A-IV ; **apo B,E**, apolipoprotein B,E ; **apo C-III**, apolipoprotein C-III ; **apo E**, apolipoprotein E ; **LCAT**, lecithin:cholesterol acyltransferase ; **LDL**, low density lipoprotein ; **DME medium**, Dulbecco's modified Eagle's medium ; **HDL**, high density lipoprotein ; **DMPC**, L- α -dimyristoylphosphatidylcholine.

/ R. Barbaras et al., unpublished observation.

Summary

Cholesterol efflux was studied in cultured mouse adipose cells after preloading with LDL cholesterol. Exposure to human apolipoprotein A-IV-containing liposomes as well as to human lipoprotein particles containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I (LpA_{IV}-A_I) and particles containing apolipoproteins A-IV and A-I (LpA_{IV}:A_I) showed that both artificial and native apolipoprotein A-IV-containing particles were able at 37°C to promote cholesterol efflux as a function of time and concentration. The half-maximal concentration was found to be 0.3×10^{-6} M for apolipoprotein A-IV-containing liposomes. Binding experiments performed in intact cells at 4°C with labeled apolipoprotein A-IV-containing liposomes showed the existence of specific binding sites, with a K_D value of 0.32×10^{-6} M and a maximal binding capacity of 224,000 sites/cell. By cross-competition experiments with labeled and unlabeled liposomes containing apolipoproteins A-IV, A-I or A-II, it appeared that all three apolipoproteins were binding to the same cell-surface recognition sites. It is suggested that apolipoprotein A-IV, which is present in the interstitial fluid surrounding adipose cells in vivo at concentrations similar to those required in vitro for the promotion of cholesterol efflux, plays a critical role in the cholesterol removal from peripheral cells.

INTRODUCTION

When compared to other apolipoproteins apolipoprotein A-IV (**apo A-IV**)*, first described in the rat (1), is of particular interest as it appears mainly in a lipoprotein-free form after centrifugation or gel filtration of plasma. In human, the 46 kDa-protein was shown to be a component of chylomicrons, very low density lipoproteins and high density lipoproteins but occurring to a major extent in the lipoprotein-free fraction (2-7). Despite the fact that apo A-IV is mainly synthesized in the gut (8) as a component of newly secreted chylomicrons (9), no specific function has been so far assigned to apo A-IV in human. However, it has been shown that human apo A-IV behaves as a potent cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT, E.C. 2.3.1.43) (10,11). Moreover rat apo A-IV has been shown to promote cholesterol efflux from human skin fibroblasts suggesting a recognition process (12). In agreement with this assumption, a specific binding of rat apo A-IV to rat liver membranes was inferred from results that showed rat apo A-IV as being one of the ligands responsible for the binding of rat HDL to rat hepatocytes in culture (13,14). A specific binding of human apo A-IV to cultured endothelial cells from bovine aorta has been recently shown (15) and a common binding site for apo A-IV and apo A-I has been proposed (16).

Cultured Ob1771 adipose cells have previously been shown to accumulate cholesterol upon exposure to low density lipoproteins (LDL). The addition of apo A-I liposomes but not that of apo A-II liposomes promoted cholesterol efflux (17), despite the fact that both proteoliposomes were able to bind to the same cell surface sites of intact cells (18). Since LpA-I particles but not LpA-I:A-II particles (isolated by immunoaffinity chromatography from HDL) were able to promote cholesterol efflux, it was proposed that apo A-I plays the role of an agonist and apo A-II that of an antagonist (17,18). In the present study, we show that apo A-IV liposomes promote cholesterol efflux from Ob1771 cells preloaded with cholesterol by means of LDL. Apo A-IV-containing particles, isolated by immunoaffinity chromatography from

native plasma (LpA_{IV}) and separated into particles containing apo A-I (LpA_{IV}:A_I) or not containing apo A-I (LpA_{IV}-A_I), are all effective in promoting cholesterol efflux. Apo A-IV appears to bind to the same sites present in intact cells which recognize apo A-I and apo A-II.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Culture media and bovine serum were products of Flow Laboratories (Bethesda, USA). Na[¹²⁵I] was purchased from Amersham (Les Ulis, France). Recombinant human growth hormone (Genotropin, batch 60663) was a gift from KabiVitrum AB (Stockholm, Sweden). L- α -dimyristoylphosphatidylcholine and all other chemicals were obtained from Sigma Chimie (La Verpilliere, France).

Cells

The characterization of Ob1771 preadipocyte clonal line, a sub-clone of mouse Ob17 cells, has been previously reported (19). Cells were plated at 2×10^3 cells/cm² in 35-mm dishes (for assays of cholesterol efflux) or in 24-multiwell plates (for assays of binding) and grown in Dulbecco's modified Eagle's (DME) medium supplemented with 6% bovine serum, 200 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 33 μ M biotin and 17 μ M pantothenate. This medium is termed standard medium. At confluence, approximately 5 days after seeding, the standard medium was supplemented with 17 nM insulin, 2 nM triiodothyronine and 1.4 nM growth hormone (defined as differentiation medium). Media were changed every other day. Under these conditions, more than 50% of Ob1771 cells differentiated into adipose cells within 8 days (19). The experiments were performed on 8-day post-confluent cells. Before performing cholesterol loading, Ob1771 cells were exposed for the last 24 h to the differentiation medium containing 6% lipoprotein-deficient bovine serum.

Cholesterol accumulation and mobilization

To promote cholesterol accumulation, differentiated Ob1771 cells were maintained for 24 h at 37°C in lipoprotein-deficient differentiation medium and then exposed for 48 h to the same medium containing 100 µg/ml of LDL. This led to the accumulation of unesterified cholesterol only (17). After careful washing with lipoprotein-deficient standard medium, the cells were exposed at 37°C to the same medium supplemented with various artificial or native lipoprotein particles, as indicated. The cellular cholesterol content of the cells was measured by HPLC on duplicate dishes as described before (17) at various times as indicated. The results are expressed as µg of cellular cholesterol/mg of cell protein.

Lipoproteins, apolipoproteins, proteoliposomes

High density lipoproteins (HDL₃) and LDL were isolated from plasma of normolipemic human blood donors by sequential flotation ultracentrifugation: LDL between densities of 1.019-1.063 g/ml and HDL₃ between 1.125-1.21 g/ml by adding solid KBr. Lipoprotein-deficient bovine serum was obtained as previously described (17).

Apo A-I and A-II were isolated from HDL₃ as outlined before (20). Apo A-IV was isolated from human lipoprotein-deficient serum as described (21).

Complexes containing apolipoproteins and L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) were prepared by the cholate dialysis procedure as described for apo A-I liposomes by Chen and Albers (22) at a molar ratio of phosphatidyl choline : protein of 150:1. The Stoke radius of the complexes was estimated to be 100 ± 10 Å. Labeling of apolipoproteins with ¹²⁵Iodine was performed by the method of Hunter and Greenwood (23): specific radioactivities ranged from 200 to 400 cpm/ng of protein.

The isolation of lipoprotein particles containing apo A-IV (LpA_{IV}) was performed at 4°C by immunoaffinity chromatography. First, a fraction of IgG (40% ammonium

sulfate precipitate) from rabbit immunoserum directed against human apo A-IV was passed over a cyanogen bromide-activated Sepharose 4B to which human apo A-IV had been previously coupled. Second, after elution of anti-apo A-IV antibodies with a solution of 0.2 M glycine buffered with HCl at pH 3 followed by concentration using a PM-10 Amicon membrane, immunosorbers were prepared by coupling the specific antibodies (30 mg) to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (5 mg/g of gel, ref.24). After antibody coupling, immunosorbers were equilibrated with phosphate-buffered saline pH 7.4 containing 0.01% EDTA (buffer A). For isolation of LpA_{IV} particles, 5 ml of human native plasma were run over the immunoaffinity column specific for apo A-IV; the sample was applied at a slow rate. After binding of all apo A-IV-containing particles, the gel was washed extensively with buffer A, and non-specifically bound material was eluted with 0.5 M NaCl. The retained fractions were collected as LpA_{IV} particles and an aliquot was saved for the subsequent isolation by immunoaffinity chromatography on anti-apo A-I column (see below). To dissociate and collect the retained fraction, 20 ml of 3 M NaSCN were applied to the anti-apo A-IV column. To minimize contact between apo A-IV-containing particles and the dissociating agent, immunosorbers were constructed with a layer of Sephadex G-25 below the immunosorber portion. This bottom layer allowed immediate separation of the particles from the dissociating agent. For isolation of lipoprotein particles containing apo A-I (LpA_{IV}:A_I) or not containing apo A-I (LpA_{IV}-A_I), LpA_{IV} particles were run over an immunoaffinity column specific for human apo A-I as described above. The unretained fraction (LpA_{IV}-A_I) was collected whereas the retained fraction (LpA_{IV}:A_I) was eluted as described above. After collection, both fractions were extensively dialyzed against buffer A and concentrated under reduced pressure. The various apolipoproteins were then measured in both fractions using specific enzyme immunoassays (25); the full characterization of these various lipoprotein particles will be published elsewhere.

Binding assays

The binding of labeled apolipoprotein-DMPC complexes to intact Ob1771 cells was performed for 2 h at 4°C as described previously (17). Non-specific binding was determined by measuring the amount of radioactivity when incubations were carried out in the presence of a 100-fold excess of the corresponding unlabeled ligand; the values of non-specific binding varied from 30 to 40% for apo A-I, from 20 to 30% for apo A-II and from 15 to 20% for apo A-IV (see Fig.3). The ratio of bound to free ^{125}I -apolipoprotein-DMPC complexes were plotted against bound complexes according to the method of Scatchard (26).

RESULTS

Following cholesterol-preloading of adipose cells by means of LDL, DMPC complexes containing apo A-IV were then assayed for their ability to promote cholesterol efflux as a function of time at 37°C. Complexes containing apo A-I or A-II were used in parallel. As shown in Figure 1, both apo A-IV- and apo A-I-DMPC complexes were able to promote cholesterol efflux from adipose cells whereas, as already reported (17), no efflux was observed in the presence of apo A-II-DMPC complexes.

A rapid decrease in the cellular cholesterol content occurred (approximately 0.5 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ of cell protein) and reached a minimal value within 2 h. This minimal value was similar to that observed in control cells before exposure to LDL cholesterol. This suggests the existence in adipose cells of a non-mobilizable pool of cholesterol whereas apo A-I or apo A-IV-DMPC complexes were able to modulate the efflux of a mobilizable pool of cholesterol.

To assess that during the incubation time for cholesterol efflux no significant degradation was taking place, efflux was studied with apo A-I and apo A-IV-DMPC complexes and was subjected to TCA precipitation after incubation. More than 96% of the radioactivity remained precipitable in 10% trichloroacetic acid.

In a second set of experiments, increasing the concentration of apo A-IV-DMPC complexes over a fixed time period of 5 h, led to cholesterol efflux in a dose-dependent manner ; the concentrations of apo A-IV-DMPC complexes required to bring a half-maximal and a maximal effect were 14 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Fig.2).

The isolation from native plasma of lipoprotein particles containing apo A-IV (LpA_{IV}) was made possible by means of immunoaffinity chromatography. Sequential use of specific antibodies directed against apo A-IV and apo A-I allowed to separate lipoprotein particles containing also apo A-I (LpA_{IV}:A_I) or deprived of apo A-I (LpA_{IV}-A_I). The results of Figure 2 indicate that LpA_{IV}, LpA_{IV}:A_I and LpA_{IV}-A_I were all active in promoting cholesterol efflux, with concentrations required to bring a half-maximal effect of 20 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$ and 7 $\mu\text{g/ml}$, respectively ; the concentration required to bring a maximal effect was 50 $\mu\text{g/ml}$ for the various lipoprotein particles.

The results of Figures 1 and 2 were in favour of an interaction between apo A-IV and intact Ob1771 cells. Therefore binding experiments were performed with labeled apo A-IV-DMPC complexes. As shown in Figure 3, a saturation curve was obtained after incubating the cells for 2 h at 4°C. The percentage of non-specific binding averaged $20 \pm 5\%$ (mean $\pm$ range of 2 experiments) ; a Scatchard plot (Fig.3, inset) allowed to determine a K_d value of 0.32×10^{-6} M and a B_{max} value of 171 ng of apo A-IV bound per mg of cell protein (224,000 sites per cell, see Table I).

To explore the possibility that apo A-IV binds to the same sites which recognize apo A-I and apo A-II (17), competition experiments were performed in which the binding of either of the three labeled apolipoproteins was performed at 4°C in the presence of the two other unlabeled apolipoproteins. The results of Figure 4 show clearly that apo A-I (or apo A-II)-DMPC complexes competed with the binding of ¹²⁵I-labeled apo A-IV-DMPC complexes to intact cells (Fig.4A). In a similar way apo A-I (or apo A-IV)-DMPC complexes competed with the binding of ¹²⁵I-labeled apo A-II-DMPC complexes (Fig.4B) whereas apo A-IV-DMPC complexes but not apo E-

DMPC complexes competed for the binding of ^{125}I -labeled apo A-I-DMPC complexes (Fig.4C). The concentrations of unlabeled apolipoproteins which were required to prevent 50% of the binding of the other labeled apolipoproteins were found to be 0.2×10^{-6} M for apo A-IV, 0.3 to 0.6×10^{-6} M for apo A-II and 0.6×10^{-6} M apo A-I. These values were within the range of those calculated from the binding isotherms of labeled apolipoproteins which were found to be 0.32×10^{-6} M for apo A-IV (Fig.3), 0.2×10^{-6} M for apo A-II and 10^{-6} M for apo A-I (17). The data of Table I summarize the binding parameters of the three apolipoprotein-DMPC complexes to intact adipose cells at 4°C and their ability to promote cholesterol efflux at 37°C . The maximal number of binding sites per cell were 223,000 for apo A-IV, 100,000 for apo A-II and 193,000 for apo A-I.

TABLE I
PARAMETERS OF BINDING AND CHOLESTEROL EFFLUX
OF VARIOUS APOLIPOPROTEIN COMPLEXES

LIGAND	BINDING		CHOLESTEROL EFFLUX	
	K_d (μ M)	B_{max} (sites/cell)	EC_{50} (μ M)	$[C]_{max}$ (μ M)
apo A-IV	0.32	224,000	0.3	1.1
apo A-II*	0.2	100,000	no efflux	
apo A-I*	1	193,000	1.5	3.2

* from ref.27

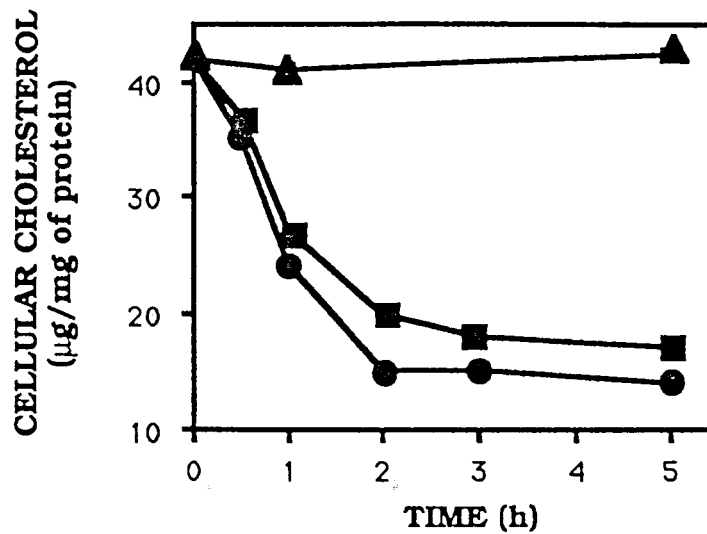


Fig.1 : Kinetics of cholesterol efflux from cholesterol-preloaded Ob1771 cells in the presence of various apolipoprotein-DMPC complexes

Cholesterol preloading of Ob1771 cells was performed at 37°C as described in "Experimental Procedures". After careful washing, cells were exposed to 100 μ g/ml of apo A-I (■), apo A-II (▲) and apo A-IV (●)-DMPC complexes. The determination of cholesterol content was performed on duplicate dishes by HPLC (17) at the indicated times. The mean values from duplicate dishes are reported ($< \pm 10\%$ from the mean) and are representative of two independent experiments performed on two independent series of cells. The cholesterol content (mean $\pm$ range) of Ob1771 cells continuously exposed to lipoprotein-deficient serum was 12 ± 2 μ g/mg.

The present study demonstrates the ability of human apo A-IV to promote cellular efflux from cholesterol-preloaded Ob1771 cells. This cellular model appears rather unique as adipose cells, in vitro as well as in vivo, accumulate cholesterol mainly under an unesterified form. Providing that cholesterol accumulation takes place in the presence of LDL, no cholesterol efflux occurs unless specific lipoprotein particles are added. For instance it was previously shown that HDL₃, apo A-I-DMPC complexes and LpA-I particles (isolated from plasma by immunoaffinity chromatography) promote cholesterol efflux (17,18). The possibility to use a heterologous system, i.e. human (apo)lipoproteins and mouse adipose cells, is not surprising in view of i) the marked homology in the sequence of apo A-I (28) and apo A-II (29) between mouse and man and ii) the fact that mouse HDL (containing mainly apo A-I and apo A-II) compete with human HDL₃ for the binding of human ¹²⁵I-HDL₃ to receptor sites of intact Ob1771 cells (18). Human apo A-IV, the sequence of which has marked homology with mouse apo A-IV (30), is able like apo A-I to form stable complexes with DMPC, as characterized before (10). These complexes were active in promoting cholesterol efflux as a function of time and concentration.

Recently the Steins and colleagues (12) have shown that apo A-IV isolated from rat HDL, when complexed with dioleoyl-phosphatidylcholine or its nonhydrolysable ether analog dioleoyl-phosphatidylcholine, was more efficient than apo A-I of promoting cholesterol efflux from cholesterol preloaded human skin fibroblasts (12); apo E complexes were also active. This is in contrast to mouse adipose cells, as apo E complexes do not promote cholesterol efflux (Fig.1) and are not recognized by the receptor sites which recognize apo A-IV, apo A-I and apo A-II (Fig.4).

The facilitation of cholesterol efflux from cells by apo A-IV is of interest in the view of the high amounts of this apolipoprotein in the peripheral lymph of dogs that are even increased after cholesterol feeding (for review see ref.31). Furthermore, we were able recently to find high levels of apo A-IV-containing particles in human interstitial fluid surrounding peripheral cells (32). The concentration of apo A-IV required for cholesterol efflux in the present study resembles that found in the interstitial fluid, suggesting that cholesterol efflux can take place in vivo from peripheral cells. If it were so, LpA_{IV} particles, which are also present in plasma, may exchange between plasma and interstitial fluid as already proposed for apo A-I (31,33), thus facilitating reverse cholesterol transport.

According to our previous results (17) and to those of Figure 4 and Table I, it is likely that apo A-IV, apo A-I and apo A-II bind to common receptor sites. This hypothesis is supported by the finding that a highly purified protein from Ob1771 cells is still able to bind the three apolipoproteins⁴. The observation that approximately one mole of apo A-II is bound per two moles of apo A-I or apo A-IV (Table I) could be explained if one assumes that the receptor site is a dimeric structure which recognizes each monomer of the dimeric apo A-II in the same way that it recognizes two molecules of the monomeric apo A-IV or apo A-I. In any event, this stoichiometry of apo A-I (or apo A-IV)⁴ versus apo A-II binding has been consistently observed in intact cells and in homogenates after detergent solubilization as well as after extensive purification of a binding protein of 75-80 kDa (34). A common binding site for human apo A-I and apo A-IV has been recently postulated by Savion and colleagues, as both apo A-I and apo A-IV present in human lipoprotein-deficient serum were able to displace human HDL₃ from binding to bovine aortic endothelial cells in culture (15). Further experiments by the same authors showed a specific saturable binding of HDL₃, apo A-I and apo A-II to these cells (16). Moreover rat apo A-IV was shown to bind specifically in a saturable manner to rat liver membranes (13) whereas apo A-IV was shown to be one of the ligands involved in the binding of rat HDL to hepatocytes; these binding sites differed from apo E-dependent liver receptors (apo B,E and apo E receptors) (14). Thus there exists mounting evidence that apo A-IV owns a ligand specificity for cell surface receptors in various cell types.

The involvement in cholesterol efflux of cell-surface binding sites for HDL remains unsettled as evidence in favor (35-38) or against this possibility (39-41) has been presented. The data of Table I indicate that the parameters of binding of apo A-I and apo A-IV-containing liposomes to Ob1771 cells are in agreement with the parameters of cholesterol efflux promoted from cholesterol-preloaded cells by the same particles. This result, coupled with that showing a tight relationship between the presence of apo A-I/A-II receptor sites and the promotion of cholesterol efflux (36), is consistent with a requirement of HDL receptor sites in this process.

REFERENCES

1. Swaney, J.B., Reese, H., and Eder, H.A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 513-519
2. Weisgraber, K.H., Bersot, T.P., and Mahley, R.W. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 287-292
3. Beisiegel, U., and Utermann, G. (1979) *Eur. J. Biochem.* **93**, 601-608
4. Utermann, G., and Beisiegel, U. (1979) *Eur. J. Biochem.* **99**, 333-343
5. Green, P.H.R., Glickman, Z.M., Saudek, C.D., Blum, C., and Tall, A.R. (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 233-243.
6. Roheim, P.S., Edelstein, D., and Pinter, G.G. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1757-1760
7. Bisgaier, C.L., Sachdev, O.P., Megna, L., and Glickman, R.M. (1985) *J. Lipid Res.* **26**, 11-25
8. Elshourbagy, N.A., Walker, D.W., Boguski, M.S., Gordon, J.I., and Taylor, J.M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1998-2002
9. Green, P.H.R., and Glickman, R.M. (1981) *J. Lipid Res.* **22**, 1153-1173
10. Steinmetz, A., and Utermann, G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2258-2264
11. Chen, C.H., and Albers, J.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **836**, 279-285
12. Stein, O., Stein, Y., Lefevre, M., and Roheim, P.S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **878**, 7-13
13. Ghiselli, G., Grump, W.L., and Gotto, A.M. Jr. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 122-128
14. Dvorin, E., Gorder, N.L., Benson, D.M., and Gotto, A.M. Jr. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15714-15718
15. Savion, N., Gamliel, A., Tauber, J.P., and Gospodarowicz, D. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 435-443
16. Savion, N., and Gamliel, A. (1988) *Arteriosclerosis* **81**, 178-186

17. Barbaras, R., Grimaldi, P., Négrel, R., and Ailhaud, G. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **888**, 143-156
18. Barbaras, R., Puchois, P., Fruchart, J.-C., and Ailhaud, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 63-69
19. Amri, E., Dani, C., Doglio, A., Etienne, J., Grimaldi, P., and Ailhaud, G. (1986) *Biochem. J.* **238**, 115-122
20. Mezdoor, H., Clavey, V., Kora, I., Koffigan, M., Barkia, A., and Fruchart, J.-C. (1987) *J. Chromatogr.* **414**, 35-45
21. Steinmetz, A., Clavey, V., Vu-Dac, N., Kaffarnick, H., and Fruchart, J.-C. (1989) *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.)* **487**, 154-160
22. Chen, C.H., and Albers, J.J. (1982) *J. Lipid Res.* **23**, 680-691
23. Hunter, W.M., and Greenwood, F.C. (1962) *Nature* **194**, 495-496
24. McConathy, W.J., Koren, E., Wiedland, M., Campos, E.M., Lee, D.M., Kloer, H.V., and Alaupovic, P. (1985) *J. Chromatogr.* **342**, 47-66
25. Fruchart, J.-C., Fievet, C., and Puchois, P. (1985) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol. III, pp. 126-128
26. Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672
27. Barbaras, R., Puchois, P., Grimaldi, P., Barkia, A., Fruchart, J.-C., and Ailhaud, G. (1989) in *Eicosanoids, Apolipoproteins, Lipoprotein Particles, and Atherosclerosis* (Malmendier, C.L., ed.), in press.
28. Forgez, P., Chapman, M.J., Rall, S.C. Jr., and Camus, M.C. (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 954-965
29. Miller, C.G., Lee, T.D., LeBoeuf, R.C., and Shively, J.E. (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 311-319
30. Williams, S.C., Bruckheimer, S.M., Lusi, A.J., LeBoeuf, R.C., and Kinniburgh, A.J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3807-3814
31. Sloop, C.H., Dory, L., Roheim, P.S. (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 225-237

32. Puchois, P., Steinmetz, A., Ghalim, N., Barbaras, R., Barkia, A., Ailhaud, G., and Fruchart, J.-C. (1988) *Circulation* **78**, supp.II, 168
33. Reichl, D., Postiglione, A., Myant, N.B., Pflug, J.J., and Press, M. (1975) *Clin. Sci. Mol. Med.* **49**, 419-426
34. Barbaras, R., Puchois, P., Barkia, A., Fruchart, J.-C., and Ailhaud, G. (1987) *Circulation* **76**, supp.IV, 478
35. Slotte, J.P., Oram, J.F., and Bierman, E.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12904-12907
36. Barbaras, R., Puchois, P., Grimaldi, P., Barkia, A., Fruchart, J.-C., and Ailhaud, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 545-554
37. Oppenheimer, M.J., Oram, J.F., and Bierman, E.L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19318-19323
38. Randolph, R.K., and Hoff, H.F. (1986) *J. Lipid Res.* **27**, 307-315
39. Tabas, I., and Tall, A.R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13897-13905
40. DeLamatre, J., Wolfbauer, G., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **875**, 419-428
41. Mendel, C.M., and Kunitake, S.T. (1988) *J. Lipid Res.* **29**, 1171-1178

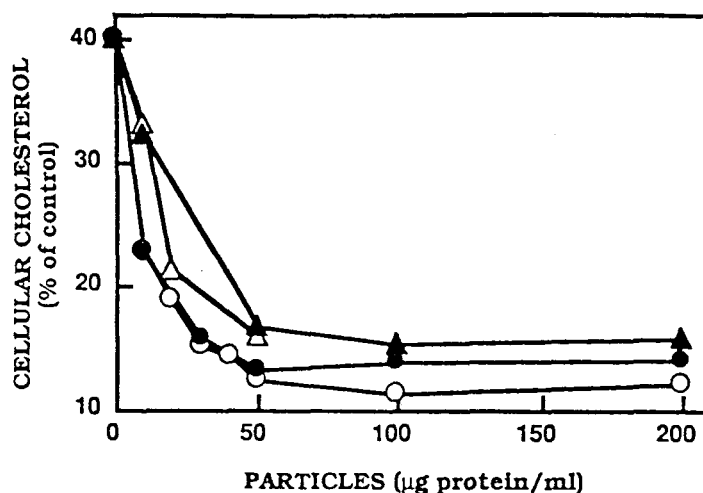


Fig.2 : Dose-response curves of cholesterol efflux from cholesterol-preloaded Ob1771 cells in the presence of artificial and native apo A-IV-containing particles

Cholesterol preloading of Ob1771 cells was performed as in Figure 1, using a different series of cells. After 5 h exposure to increasing concentrations of apo A-IV-DMPC complexes (Δ), LpAIV ($\blacktriangle$), LpAIV-AII ($\circ$) and LpAIV-AII ($\bullet$), duplicate dishes were carefully washed and assayed separately for cholesterol content. The mean values from duplicate dishes are reported ($< \pm 15\%$ from the mean). Note that the same batch of plasma was used to prepare the various native apo A-IV-containing particles. The cholesterol content (mean $\pm$ range) of Ob1771 cells continuously exposed to lipoprotein-deficient serum was $11 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$ of cell protein.

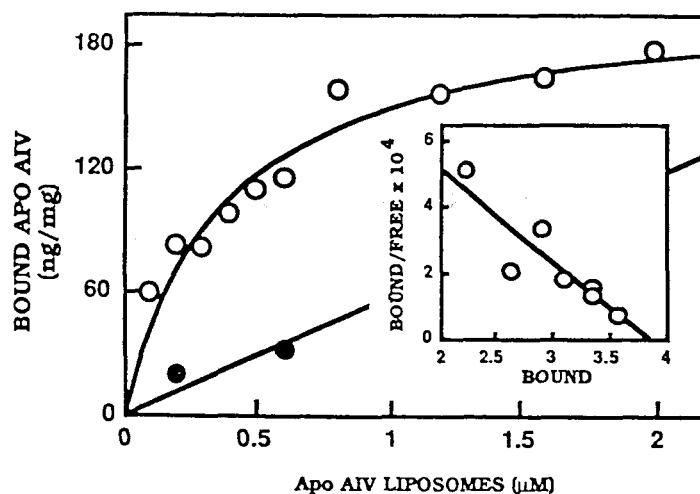


Fig.3 : Binding isotherm of ^{125}I -labeled apo A-IV-DMPC complexes to Ob1771 cells

Specific binding of ^{125}I -apo A-IV-DMPC complexes ($\circ$) was measured on duplicate dishes after 2 h incubation at 4°C . The non-specific binding ($\bullet$) was measured as described in "Experimental Procedures". A Scatchard plot of ^{125}I -apo A-IV-DMPC complexes is shown in the inset. The mean values from duplicate dishes are reported ($< \pm 10\%$ from the mean) and are representative of two independent experiments performed on two different series of cells.

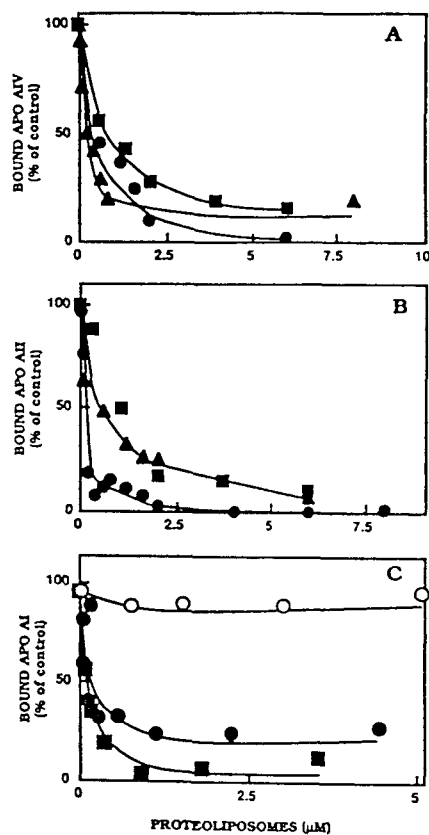


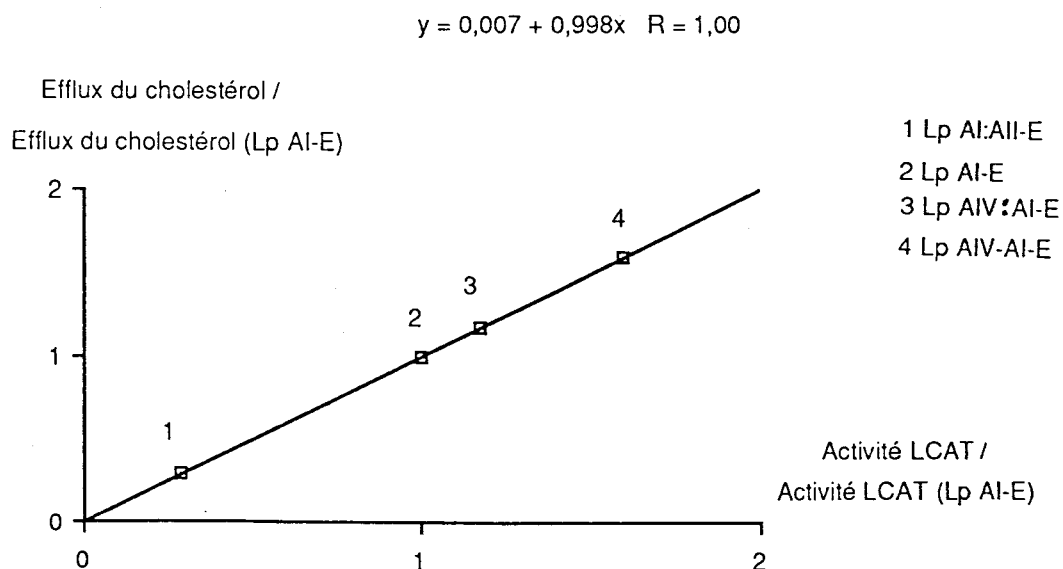
Fig.4 : Competitive inhibition of binding of ^{125}I -labeled apolipoprotein-DMPC complexes to Ob1771 cells

Ob1771 cells were incubated for 2 h at 4°C in the presence of (A) $0.6\text{ }\mu\text{M}$ labeled apo A-IV-DMPC complexes and increasing concentrations of unlabeled apo A-IV- (●), apo A-II- (▲) or apo A-I-DMPC complexes (■) as indicated; (B) $0.1\text{ }\mu\text{M}$ labeled apo A-II-DMPC complexes and increasing concentrations of apo A-IV (●), apo A-II (▲) or apo A-I-DMPC complexes (■); (C) $1\text{ }\mu\text{M}$ labeled apo A-I-DMPC complexes and varying concentrations of apo A-IV- (●), apo A-I- (■) or apo E-DMPC complexes (○). 100% binding corresponds to 105, 20, and 80 ng/mg of cell protein for labeled apo A-IV, apo A-II and apo A-I, respectively. The results are representative of two independent experiments performed on two different series of cells. The mean values of duplicate dishes are reported ($< \pm 10\%$ from the mean).

**Relation entre l'activité de la LCAT
et l'efflux du cholestérol**

La relation entre "l'efflux" du cholestérol des cellules adipeuses ob 1771 et l'activité de la LCAT est représentée par la figure ci-dessous. Les particules lipoprotéiques utilisées pour "l'efflux" du cholestérol correspondent aux particules caractérisées dans le chapitre I. La détermination de l'efflux a été faite sur les particules du 3^{ème} sujet.

Plus l'activité de la LCAT est grande, plus "l'efflux" du cholestérol est grand. Le cholestérol libre pourrait être capté par les particules lipoprotéiques et estérifié par la LCAT. Le cholestérol ainsi estérifié, s'accumule dans le noyau de la particule. Ceci pourrait créer les conditions d'un appel de cholestérol libre des membranes cellulaires vers les particules.



Conclusion

Ces résultats indiquent que la Lp AI, quelque soit son origine (HDL₂, HDL₃, plasma) et la Lp AIV plasmatique provoquent l'efflux du cholestérol des cellules préadipocytaires de souris ob 1771, alors que la Lp AI:AIH en est incapable.

L'inefficacité de la Lp AI:AIH dans la stimulation de l'efflux du cholestérol n'est pas dû à un défaut de fixation au récepteur aux HDL, puisqu'elle est capable de rentrer en compétition avec les HDL₃ pour se fixer à ce récepteur. Cette particule se comporte comme un antagoniste dans la régulation de l'efflux du cholestérol, puisque sa présence en même temps que celle de la Lp AI se traduit par une diminution de la sortie du cholestérol cellulaire.

Malgré la présence de l'apo AI dans la particule Lp AI:AIH, cette dernière est incapable de produire l'efflux du cholestérol. De ce fait, nous pouvons supposer que la séquence antigénique de l'apo AI responsable de l'efflux du cholestérol pourrait être masquée dans la Lp AI:AIH et apparente dans la Lp AI. En effet, une apolipoprotéine donnée possède des déterminants antigéniques (épitopes) qui sont enfouis, d'autres partiellement cachés et certains parfaitement accessibles à la surface de la particule. L'expression des déterminants antigéniques de l'apolipoprotéine change en fonction de la composition lipidique et protéique d'une particule. Curtiss et Edgington (6) ont constaté que des fractions des HDL sont différentes en fonction de leur réactivité antigénique du fait que leur apolipoprotéine AI n'exprime pas le même épitope. Cheung et Wolf ont rapporté que la position de l'apo AI est plus superficielle dans la Lp AI que dans la Lp AI:AIH (75).

Du fait que l'apo AIV active la LCAT et que sa fixation sur des cellules est spécifique et saturable, il était suggéré qu'elle joue un rôle dans le transport "réverse" du cholestérol. En effet, nos résultats montrent que l'apo AIV provoque l'efflux du cholestérol des cellules adipeuses ob 1771 et se fixe au récepteur aux apolipoprotéines AI/AIH.

CHAPITRE V
APPLICATIONS CLINIQUES

Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux perturbations du métabolisme lipidique sous certains états pathologiques et plus particulièrement à l'évaluation des concentrations plasmatiques des Lp AI et Lp AI: AII chez les traumatisés crâniens et les sujets atteints de myélome multiple.

Dans une étude en collaboration avec le Docteur J. Bonneterre (Centre Oscar Lambret de Lille), nous avons suivi les variations du métabolisme lipidique chez des malades recevant l'aminoglutéthimide. Cette drogue est utilisée comme hormonothérapie dans le cancer évolué du sein. Il a été rapporté que l'aminoglutéthimide augmente la cholestérolémie. Cette thérapeutique est utilisée dans certaines équipes comme traitement adjuvant. Afin d'évaluer le risque d'athérosclérose, nous avons suivi l'évolution des différents paramètres lipidiques au cours des traitements chez 15 malades ayant au départ une concentration en cholestérol et triglycérides normale et 13 malades ayant au départ une concentration en cholestérol et triglycérides élevée.

Dans un autre type de cancer, le myélome multiple, et en collaboration avec l'équipe du Professeur G. Soula (Laboratoire de Biochimie appliquée, Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse) nous avons étudié les variations des concentrations plasmatiques des Lp AI et des Lp AI: AII chez 43 patients. Le myélome multiple, ou maladie de Kahler se caractérise du point de vue biochimique par une production excessive d'immunoglobulines. Le type de l'immunoglobuline, Ig A, Ig G, Ig D ou Ig E, définit le type du myélome. L'hyperlipidémie est exceptionnelle dans le myélome. En général, la maladie myélomateuse s'accompagne d'une hypolipidémie. L'activité des immunoglobulines a été rendue responsable des hyperlipidémies. L'équipe du Professeur G. Soula a observé chez des sujets myélomateux une diminution de l'apolipoprotéine AI.

Nous avons réalisé une étude chez les traumatisés crâniens en collaboration avec l'équipe du regretté P. Métais (Laboratoire du Centre de Traumatologie et d'Orthopédie de Strasbourg dirigé actuellement par le Professeur G. Férard). Nous avons étudié les

variations post-traumatiques des concentrations plasmatiques des particules lipoprotéiques Lp AI et Lp AI:AII et nous les avons comparées à celles des apolipoprotéines AI et AII des HDL₂ et HDL₃.

Article n°7

(communications)

**Variations in lipoproteins
during aminoglutethimide therapy**

Bonneterre J., Ghalim N., Nguyen M., Puchois P.,
Demaille A., Demarquilly C. and Fruchart J.C.

**Breast Cancer Research and Treatment
1987, 10, 197-200**

*Brief communication***Variations in lipoproteins during aminoglutethimide therapy**J. Bonnetterre¹, N. Ghalim², M. Nguyen³, P. Puchois⁴, A. Demaille⁵, C. Demarquilly⁶ and J.C. Fruchart⁷^{1,3,5} *Centre Oscar Lambret, Rue F. Combemale, BP 307, 59020 Lille Cédex, France;* ^{2,4,6,7} *SERLIA, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur Calmette, Lille, and Département Lipides Lipoprotéines et U. INSERM 279, Faculté de Pharmacie, 3 Rue du Professeur Laguesse, Lille, France***Key words:** aminoglutethimide, apoproteins, cholesterol, lipoproteins**Summary**

Plasma lipids, apolipoproteins, and gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) were measured in 28 patients receiving aminoglutethimide (500 mg) and hydrocortisone (30 or 40 mg) for advanced breast cancer. A rise in cholesterol (CHOL), LDL-CHOL, apoprotein B, apoprotein CIII, and GGT was observed after 45 days. When the patients were divided in two groups according to lipid basal plasma levels, those with high CHOL and triglyceride did not experience any modification of lipid parameters (only GGT were elevated). Conversely normolipidaemic patients experienced an increase in CHOL, triglycerides, LDL-CHOL, apoproteins B and CIII, and GGT.

Aminoglutethimide (AG) is a hormone treatment currently used in advanced breast cancer [1]. It has also been proposed as an adjuvant treatment after surgery for locoregional cancer [2]. However, it has been shown that AG is able to induce hypercholesterolemia in breast cancer patients [3, 4]. We have shown that the variations in the plasma lipid parameters were different in patients with normal basal cholesterol levels and in those with high levels [5]. This study has been designed to further assess the variations in lipo- and apoproteins induced by AG, and to evaluate the risk of atherosclerosis if this drug appeared to be indicated in an adjuvant setting.

Twenty-eight advanced breast cancer patients received 500 mg AG/d plus 30 mg hydrocortisone/d from the first day on; the dose of 500 mg was chosen since it had been shown that it was as efficient as 1 g [6, 7]. Blood was drawn from fasting patients before treatment, and at day 15, 45 and 90. Two groups of patients were defined as a function of cholesterol and triglycerides plasma levels: group A patients (n = 15) had less than 2.5 g/l cho-

lesterol (CHOL) and less than 1.6 g/l triglycerides; group B patients (n = 13) had more than 2.5 g/l CHOL or more than 1.6 g/l triglycerides.

Cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic methods (Boehringer Mannheim, FRG). HDL and LDL cholesterol were isolated by precipitation procedures using commercial kits (Biomérieux, France). Quantitative determination of apoproteins A-I, A-II, B, and C-III was performed using specific enzyme immunoassays [8–10].

Firstly the variations in plasma levels during treatment were studied by the non-parametric Wilcoxon's test (for coupled series) for all the patients, and then for the two groups (A; B).

A rise in CHOL, LDL CHOL, apoprotein B, and apoprotein C-III, as well as gamma GT, was already observed after 45 days of treatment and was statistically significant. p values were respectively 0.001, 0.05, 0.02, 0.05 and 0.001.

Group A and B patients' baseline values were significantly different as far as CHOL (p<0.001), triglycerides (p<0.001), LDL CHOL (p<0.001)

and apoprotein A-II ($p = 0.05$) were concerned. In group A patients ($n = 15$), a significant rise was found for CHOL, triglycerides, LDL CHOL, and gamma-GT plasma levels after 3 months of treatment; p values were respectively 0.03, 0.05, 0.04 and 0.001 (Table 1). A rise in apoproteins B and C-III was found at day 45 (respectively $p < 0.05$, $p < 0.05$) but was no longer significant after 3 months. Conversely in group B patients ($n = 13$), the only variation was an increase in gamma-GT levels (+ 110% after 3 months, $p < 0.01$) but not as important as for group A (+ 311%) (Table 2).

Our results confirm that variations in CHOL plasma levels arise in patients with normal CHOL and triglycerides baseline plasma levels; furthermore, they show that these variations are due to low and/or very low density lipoproteins, as suggested by the observed simultaneous variations of apoprotein C-III and triglycerides (apoprotein C-III is a protein component of VLDL and HDL).

Luoma *et al.* [11] studied a population of 30 patients who were treated with phenytoine, phenobarbital, or carbamazepine. AG is biochemically close to these drugs and had been previously proposed as an anti-epileptic. These authors found higher HDL CHOL levels in patients than in a

control group. The differences observed between these results and ours could be explained by the different chemical structures of the drugs used. Also, in Luoma's study, two groups were compared (epileptics and control), whereas we have studied the variations during treatment in one group of patients.

To our knowledge there is no data regarding lipid plasma levels in patients undergoing surgical adrenalectomy. It is unlikely that the observed variations could be due to an increase in the weight of our patients, which was sometimes observed but occurred several months later than the variations of plasma lipid parameters. To our knowledge hydrocortisone alone cannot be responsible for these changes in man (hydrocortisone was given as a suppletive treatment); this is in keeping with our experimental results [12]. The observed increase in cholesterol levels could be due to a decreased utilization of beta lipoprotein CHOL (LDL-CHOL and, although not significantly, HDL-CHOL) by the adrenal as a consequence of AG treatment.

It is possible too, as has been shown for phenobarbital and phenytoine, that AG stimulates CHOL synthesis through the induction of TPNH dependent enzymes [13], or beta-hydroxy-beta-

Table 1. Variations in lipoproteins, apoproteins and GGT in 15 normolipidaemic subjects (Gp A).

	Day 0	Day 15	Day 45	Day 90
Cholesterol mg/dl	208.8 $\pm$ 25.4	222.7 $\pm$ 40.3	240.6 $\pm$ 6.9 $p < 0.001$	238.2 $\pm$ 51.5 $p < 0.03$
Triglycerides mg/dl	101.0 $\pm$ 29.0	105.3 $\pm$ 27.7	129.0 $\pm$ 35.0 $p < 0.05$	121.8 $\pm$ 39.04 $p < 0.05$
HDL CHOL mg/dl	74.7 $\pm$ 13.0	74.5 $\pm$ 18.1	77.2 $\pm$ 23.5	82.0 $\pm$ 24.4
LDL CHOL mg/dl	68.0 $\pm$ 32.2	73.8 $\pm$ 25.3	94.7 $\pm$ 34.1 $p < 0.05$	96.8 $\pm$ 30.1 $p < 0.04$
Apo A-I mg/dl	135.9 $\pm$ 26.3	138.0 $\pm$ 31.5	132.7 $\pm$ 30.2	134.3 $\pm$ 26.7
Apo A-II mg/dl	34.7 $\pm$ 8.9	35.4 $\pm$ 11.4	34.4 $\pm$ 11.7	32.4 $\pm$ 12.6
Apo B mg/dl	65.0 $\pm$ 24.9	68.0 $\pm$ 20.3	74.7 $\pm$ 17.7 $p < 0.05$	72.4 $\pm$ 16.8
Apo C-III mg/dl	13.7 $\pm$ 6.0	16.5 $\pm$ 7.6	17.4 $\pm$ 7.6 $p < 0.05$	18.3 $\pm$ 9.6
GGT UI/l	51.7 $\pm$ 51.9	100.9 $\pm$ 120.3	126.2 $\pm$ 22.8 $p < 0.04$	212.6 $\pm$ 218.7 $p < 0.001$

Table 2. Variations in lipoproteins apoproteins and GGT in 13 hyperlipidaemic subjects (Gp B).

	Day 0	Day 15	Day 45	Day 90
Cholesterol mg/dl	263.0 ± 19.4	266.9 ± 35.5	271.0 ± 23.1	277.5 ± 42.8
Triglycerides mg/dl	195.0 ± 83.2	188.1 ± 68.8	188.8 ± 67.2	185.8 ± 57.9
HDL CHOL mg/dl	69.7 ± 9.4	74.1 ± 12.5	80.4 ± 17.6	77.6 ± 18.3
LDL CHOL mg/dl	127.2 ± 49.2	122.2 ± 50.5	135.6 ± 49.8	136.3 ± 45.9
Apo A-I mg/dl	134.3 ± 36.8	138.6 ± 56.2	145.0 ± 37.8	121.0 ± 37.5
Apo A-II mg/dl	29.7 ± 13.8	31.7 ± 15.8	31.1 ± 14.0	16.2 ± 11.0
Apo B mg/dl	78.6 ± 21.9	76.0 ± 32.8	95.8 ± 33.2	83.0 ± 27.0
Apo C-III mg/dl	17.4 ± 8.9	21.4 ± 10.4	18.8 ± 9.3	19.5 ± 6.0
GGT UI/l	34.6 ± 20.1	49.9 ± 33.0	70.4 ± 36.6 p<0.01	72.8 ± 37.6 p<0.01

methyl-glutaryl-CoA-reductase [14]; simultaneously, CHOL degradation could be inhibited by aminoglutethimide, since it depends on P450 cytochrome dependent hydroxylases. It seems likely that variations in the other parameters could be explained by enzyme induction too.

From a clinical point of view, the most important conclusion is that the variations were observed in those lipoproteins which carry a higher risk of atherosclerosis; this is obviously not a problem when AG is given in advanced disease, but is a stronger argument for not utilizing it as an adjuvant treatment.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ciba Geigy Laboratory for financial assistance.

References

1. Santen RJ, Brodie AMH: Suppression of oestrogen production as treatment of breast carcinoma: pharmacological and clinical studies with aromatase inhibitors. *Clin Oncol* 1: 77-130, 1982
2. Coombes RC, Chilvers C, Mc Lelland R, Powles T: Adjuvant aminoglutethimide (A G) therapy for postmenopausal patients with primary breast cancer. *J Steroid Biochemistry* 19: 22s, Abstr 64, 1982
3. Bonnetterre J, Nguyen M, Hecquet B, Cappelaere P: Aminoglutethimide induced hypercholesterolemia. *Lancet* 1: 912-913, 1984
4. Ceci G, Passalacqua R, Bisagni G, Bella M, Cocconi G: Aminoglutethimide and serum cholesterol. *Lancet* 2: 358, 1984
5. Bonnetterre J, Nguyen M, Hecquet B, Fournier C, Cappelaere P: Dyslipémie induite par l'aminoglutethimide. Etude clinique. *Bull Cancer* 72: 99-103, 1985
6. Bonnetterre J, Coppens H, Mauriac Jr L, Fargeot P, Armand JP, Cappelaere P: Aminoglutethimide in advanced breast cancer. Clinical results of a French multicentre randomized trial comparing 500 mg and 1 g/day. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 1153-1158, 1985
7. Illiger HJ, Caffier H, Carterier H: Aminoglutethimide in advanced breast cancer - low dose vs standard dose. *J Cancer Res Clin Oncol* 111s: 569, 1986
8. Koren E, Puchois P, Mc Conathy WJ, Fesmire JD, Alaupovic P: Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-I by a non competitive enzyme linked immunosorbent assay. *Clin Chim Acta* 147: 85-95, 1985
9. Fruchart JC, Fiévet C, Puchois P: Apo-lipoproteins. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 1985, pp 126-138
10. Puchois P, Kandoussi A, Duriez P, Fruchart JC, Mc Conathy WJ, Koren E: Quantitative determination of human plasma apolipoprotein A-II by a non competitive enzyme

- linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* 7: 285–307, 1986
11. Luoma PV, Sotaniemi EA, Arranto AJ: Serum LDL cholesterol, the LDL/HDL cholesterol ratio, and liver microsomal enzyme induction evaluated by antipyrine kinetics. *Scand J Clin Lab Invest* 43: 671–675, 1983
 12. Nguyen M, Bonnetterre J, Vanlerenberghe J, Demaille A: Dyslipémie induite par l'aminogluthéimide (AG). Etude expérimentale. *Bull Cancer* 72: 282–289, 1985
 13. Jones AL, Armstrong DT: Increased cholesterol biosynthesis following phenobarbital induced hypertrophy of agranular endoplasmic reticulum in liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 119: 1136–1139, 1965
 14. Coyne MJ, Bonorris GC, Goldstein LI, Schoenfield LJ: Effect of chenodeoxycholic acid and phenobarbital on the rate limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in patients with gallstones. *J Lab Clin Med* 87: 281–291, 1976

Address for offprints: J. Bonnetterre, Centre Oscar Lambret, BP 307, 59020 Lille Cédex, France

Article n°8

**Quantitative abnormalities of lipoprotein particles
in multiple myeloma**

Hachem H., Favre G., Ghalim N., Puchois P., Fruchart J.C. and Soula G.

**J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
1987, Vol. 25, No 10, 675-679**

Quantitative Abnormalities of Lipoprotein Particles in Multiple Myeloma

By *H. Hachem*

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

G. Favre

Laboratoire de Biochimie, Groupe de Recherches en Cancérologie, Centre Claudius Regaud, Toulouse

N. Ghalim, P. Puchois, J.-C. Fruchart

S. E. R. L. I. A., Institut Pasteur, Lille and

G. Soula

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

Laboratoire de Biochimie – Groupe de Recherches en Cancérologie, Centre Claudius Regaud, Toulouse, France

(Received February 2/July 27, 1987)

Summary: Serum concentrations of total cholesterol and lipoprotein cholesterol, of apolipoproteins A I and A II and of apolipoprotein A I in lipoprotein particles (Lp A I and Lp A) were determined in 43 patients with multiple myeloma.

There were striking alterations in the plasma levels of these analytes relative to normal subjects.

We observed a decrease of cholesterol levels in LDL, HDL and HDL₃ fractions, and of apolipoproteins A I and A II compared with normal subjects. The HDL₂ cholesterol was increased.

The decrease of apolipoprotein A II was more prominent than apolipoprotein A I.

The decrease of apolipoprotein A I concerns only the A I (Lp A), while the A I (Lp A I) was increased.

Most of these modifications were correlated with the monoclonal Ig levels.

Introduction

Most patients suffering from multiple myelomatosis show disturbances in serum cholesterol and lipoproteins (1–3). *Fiessinger et al.* (3) described a decrease in α -lipoproteins and less frequently β -lipoproteins with hypocholesterolaemia in myeloma patients and suggested that these decreases were associated with progressive disease. We have observed that the same disease state is accompanied by decreases of HDL cholesterol and apolipoprotein A I concentrations

which were inversely correlated with the monoclonal immunoglobulin level (4). These two parameters appear to play central roles in corporeal cholesterol metabolism. The presence of several HDL classes has been confirmed in many studies. In the studies of *Gofman et al.* (5) HDL was separated by ultracentrifugation based on density flotation into three subpopulations: HDL₁, HDL₂ and HDL₃. Without doubt, HDL₂ and HDL₃ are the major HDL populations present in the plasma. As previously described, these

subfractions could play distinct metabolic roles in pathological events (6, 7) or cellular cholesterol metabolism in vitro (8, 9). Apolipoprotein A I exists in at least two different types of lipoprotein particles in human plasma (10, 11). More than 50% of total apolipoprotein A I is associated with apolipoprotein A II (Lp A particles) while the rest exists in lipoproteins that contain no apolipoprotein A II (Lp A I particles). These two populations of particles apparently may represent two metabolically distinct pools of apolipoprotein A I-containing lipoproteins (11). The basis of the lower HDL cholesterol concentrations present in subjects with myelomatosis has not been previously elucidated. In view of the possibility of a distinct metabolic role for HDL-containing particles, it is of interest to determine which particle is involved in HDL perturbations in myeloma disease.

This study was undertaken to determine the level of cholesterol associated with LDL, HDL, HDL₂ and HDL₃, the circulating mass of apolipoprotein A I and A II, and the A I concentrations of lipoprotein particles containing A I associated or unassociated with A II (A I (Lp A) and A I (Lp A I)) in patients suffering from myeloma. These studies increase our understanding of the pathological events which occur in cholesterol metabolism in myeloma.

Materials and Methods

Clinical populations

Studies were performed on 43 patients with multiple myeloma (28 females and 15 males). The diagnosis was based both on bone marrow histology and on the presence of monoclonal Ig or light chain gammopathy. The monoclonal gammopathies were IgG Kappa in 23 patients, IgG Lambda in 10 patients, IgA Lambda in 3 patients, IgA Kappa in 6 patients and Kappa light chains in one patient. The ages of the patients ranged between 40 and 60, except for 3 patients aged 75, 78, and 80 (10 patients between 40 and 50 years; 30 patients between 50 and 60 years).

On the basis of clinical examination and standard biological parameters of hepatic function (serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and bilirubin), they were considered as having normal liver function at the time of the blood sampling.

Since initial analysis indicated no differences between male and female patients, the data for the two groups were combined for the statistical analysis.

Sixty eight healthy normolipidaemic subjects were used as controls for triacylglycerols and cholesterol, and thirty as controls for plasma apolipoprotein A I of lipoprotein particles (A I (Lp A I) and A I (Lp A)) and for plasma apolipoproteins A I and A II. The age distribution of these two populations was in the same range as the myeloma patients.

Blood samples were obtained by venipuncture from subjects who had fasted overnight. The blood was collected in 10 ml vacutainer tubes containing 0.5 ml of 5 mmol/l EDTA, and centrifuged for 15 min at 2500 min⁻¹ at 4 °C to separate cells

from plasma. Plasma samples were kept frozen for more than one month, at -20 °C until analysis. In these conditions, no significant lipid or apolipoprotein modifications were observed.

Reagents

Manganese chloride and heparin sodium salt were purchased from Sigma Chemical Company; and dextran sulphate ($M_r = 15000$) was obtained from Sochibo -3-5, rue Carnot, 92100 Boulogne-sur-Seine, France). All other reagents were of analytical grade.

Analytical methods

Plasma cholesterol and triacylglycerol (12, 13) concentrations were determined by enzymatic methods. LDL cholesterol was determined by a precipitation method (BioMerieux, Marcy-l'Etoile 69260 Charbonnières les Bains, France) as was the cholesterol associated with HDL, HDL₂ and HDL₃ (12).

Determination of apolipoproteins A I and A II and of A I in lipoprotein particles (Lp A and Lp A I)

Apolipoprotein A I and A II were determined by non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay (14, 15).

The quantitative determination of A I (Lp A) and A I (Lp A I) was performed using an automated enzyme-linked differential antibody immunosorbent technique, on microtitre plates. The procedure is described in detail elsewhere (16).

Briefly, the method consisted of two assays:

a) Measurement of total apolipoprotein A I by non-competitive enzyme-linked immunoassay (14). Here, antibodies to apolipoprotein A I were coated on microtitre plates. After incubation with undelipidated plasma at various dilutions, the total amount of apolipoprotein A I retained by these first antibodies was evaluated using peroxidase-labeled antibodies to apolipoprotein A I (A I (Lp A) + A I (Lp A I)).

b) For the measurement of A I (Lp A), the plate wells were coated with antibodies to apolipoprotein A II. After incubation with samples, only A I (Lp A) lipoproteins were retained while A I (Lp A I) lipoproteins were removed in the washing process. The amount of apolipoproteins A I associated with A II was then evaluated by using again peroxidase labeled antibodies to apolipoprotein A I.

Apolipoprotein A I unassociated with A II was evaluated by subtracting the concentration of A I (Lp A) from total A I.

The assay of apolipoprotein A I associated with A II was linear over the range of 0.005 to 0.05 g/l. Within- and between-assay CVs were 5.6 and 9.8% respectively (16). LpA isolated from plasma from a normolipidaemic fasting subject was used as standard.

Statistical studies

A preliminary statistical study based on an F test indicates a discrepancy between the variances of controls and myeloma populations. Comparison of means was carried out by the *Mann-Whitney* U-test. *Spearman's* test was used to identify significant ($p < 0.05$) relationships between parameters.

Results

Table 1 shows the results obtained for total cholesterol, HDL and HDL subfractions and LDL cholesterol. Whereas total cholesterol was not modified,

Tab. 1. Comparative studies of total cholesterol, lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations (mean $\pm$ SD) between myeloma patients and the control group.

NS : not significant

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

*** : $p < 0.001$

**** : $p < 0.0001$

	Total cholesterol mmol/l	HDL cholesterol mmol/l	HDL ₂ cholesterol mmol/l	HDL ₃ cholesterol mmol/l	LDL cholesterol mmol/l	Triacylglycerols mmol/l
Control group N = 68	5.65 $\pm$ 1.00	1.44 $\pm$ 0.36	0.21 $\pm$ 0.19	1.22 $\pm$ 0.27	3.75 $\pm$ 0.89	1.05 $\pm$ 0.4
Myeloma patients N = 43	5.38 $\pm$ 1.17 NS	1.07 $\pm$ 0.50 ***	0.35 $\pm$ 0.26 *	0.72 $\pm$ 0.39 ****	2.63 $\pm$ 1.11 ****	1.45 $\pm$ 0.6 **

Tab. 2. Comparative studies of apolipoproteins A I and A II, A I (Lp A I) and A I (Lp A) concentrations (mean $\pm$ SD) between myeloma patients and the control group.

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.001$

*** : $p < 0.0001$

	Apolipoprotein A I g/l	Apolipoprotein A II g/l	A I (Lp A I) g/l	A I (Lp A) g/l
Control group N = 30	1.31 $\pm$ 0.25	0.44 $\pm$ 0.08	0.43 $\pm$ 0.28	0.83 $\pm$ 0.20
Myeloma patients N = 43	1.05 $\pm$ 0.37 **	0.21 $\pm$ 0.07 ***	0.55 $\pm$ 0.20 *	0.50 $\pm$ 0.21 ***

the HDL cholesterol levels were significantly decreased ($p < 0.001$; tab. 1) in myeloma patients. The mean and SD of HDL cholesterol levels were 1.07 ± 0.50 mmol/l compared with 1.44 ± 0.36 mmol/l in healthy subjects. This decrease affected particularly the HDL₃ subfraction ($p < 0.001$); the HDL₂ cholesterol was increased in myeloma ($p < 0.001$). This finding and the lower LDL cholesterol levels ($p < 0.0001$; 70% of cases) suggest that VLDL cholesterol must be elevated in this disease. Indeed approximate VLDL cholesterol concentrations (obtained by total cholesterol minus HDL cholesterol plus LDL cholesterol) were higher in myeloma patients (1.64 ± 0.78 mmol/l compared with 1.23 ± 0.49 mmol/l in control group, $p < 0.01$).

Consistent with this proposal is the observation that the myeloma patients have significantly higher plasma triacylglycerol levels (1.45 ± 0.6 mmol/l; $p < 0.01$) than controls (1.05 ± 0.4 mmol/l).

The plasma concentrations of both apolipoproteins A I and A II, and A I associated with A II (A I (Lp A)) were significantly decreased in myeloma ($p < 0.01$; tab. 2). The apolipoprotein A II levels (86% of cases, $p < 0.0001$) were more diminished than apolipoprotein A I (44% of cases, $p < 0.001$;

tab. 2). This was consistent with the observation that, unlike A I (Lp A), the A I (Lp A I) levels were actually higher in myelomatosis ($p < 0.05$; tab. 2).

Plasma A I (Lp A I) and A I (Lp A) concentrations correlated positively with the cholesterol content of HDL, HDL₂ and HDL₃ (tab. 3). The proportion of these two types of particles varied with the ratio of HDL₂ and HDL₃ in the plasma (11). In the same manner, the plasma A I (Lp A I) concentrations were

Tab. 3. Degree of significant linear association (r) among LDL cholesterol, HDL cholesterol, A I (Lp A I), and A I (Lp A) with the cholesterol of lipoprotein fractions in myeloma patients.

* : $p < 0.001$

** : $p < 0.0001$

Parameters	r	p
HDL-Chol vs HDL ₂ -Chol	0.678	**
HDL-Chol vs HDL ₃ -Chol	0.839	**
A I (Lp A I) vs HDL-Chol	0.718	**
A I (Lp A I) vs HDL ₂ -Chol	0.548	*
A I (Lp A I) vs HDL ₃ -Chol	0.559	*
A I (Lp A) vs HDL-Chol	0.877	**
A I (Lp A) vs HDL ₂ -Chol	0.502	*
A I (Lp A) vs HDL ₃ -Chol	0.851	**

positively correlated with A I (Lp A) concentrations ($r = 0.681$; $p < 0.001$), while the HDL₂ cholesterol was not correlated with the HDL₃ cholesterol. No relationship is noticed between LDL cholesterol and the other parameters.

Table 4 shows an inverse relationship between the monoclonal Ig levels and the plasma apolipoproteins A I and A II, and the A I (Lp A I), A I (Lp A), HDL and HDL₃ cholesterol concentrations. The increase in cholesterol HDL₂ concentration was monoclonal Ig-independent. However, the small number of alpha chain myeloma cases ($n = 9$) made it impossible to determine whether there was a correlation between Ig isotype and the disturbed parameters.

Tab. 4. Degree of linear association (r) among monoclonal Ig with apolipoproteins A I and A II, A I (Lp A I), A I (Lp A) and with the cholesterol of lipoprotein fractions in myeloma patients.

* : $p < 0.05$
 ** : $p < 0.01$
 *** : $p < 0.001$

Ig vs	r	p
Apolipoprotein A I	- 0.512	***
Apolipoprotein A II	- 0.496	**
A I (Lp A I)	- 0.342	*
A I (Lp A)	- 0.528	***
LDL-cholesterol	- 0.320	*
HDL-cholesterol	- 0.559	***
HDL ₂ -cholesterol	- 0.233	NS
HDL ₃ -cholesterol	- 0.583	***

Discussion

Our data showed significant decreases of LDL, HDL and HDL₃ cholesterol, of apolipoproteins A I and A II and of A I (Lp A) in the plasma of patients with myelomatosis. In contrast with previous reports (1, 3), total plasma cholesterol was not significantly affected by the disease.

Increased elimination rates of β -lipoprotein and α -lipoprotein by the reticuloendothelial system following complex formation with the pathological globulin in the plasma might be the basis of the reduced plasma LDL- and HDL-cholesterol concentrations in our patients, as suggested by *Fiessinger et al.* (3). This hypothesis has never been confirmed in vivo and indeed identical lipid perturbations occur in the other haematological diseases such as leukaemia (17), a disease that does not show abnormal immunoglobulin synthesis. *Bases & Krakoff* demonstrated increased phagocytic activity of the reticuloendothelial system in patients with chronic myeloproliferative disorders and hypocholesterolaemia (18) without complex formation of lipoprotein with pathological globulin in the plasma. In the same disease, *Ginsberg et al.* (19)

observed reduced LDL cholesterol concentrations and suggested that these were associated with increased non receptor-mediated catabolism of LDL apolipoprotein B. If the reduced LDL-cholesterol in myeloma was due to increased activity of the reticuloendothelial system, why is an identical process not involved in HDL metabolism? Indeed, we have observed an increase of cholesterol in HDL₂ without association with the tumoral mass expressed by the pathological immunoglobulin levels. These observations suggest that a more specific mechanism is likely for the reduced LDL concentrations of patients with myeloma disease, based on increased LDL receptor-mediated uptake and degradation of LDL. Cells that have undergone malignant transformation are known to have altered cholesterol metabolism (20, 21), and low LDL cholesterol levels in patients with acute leukaemia are the result of increased receptor-mediated LDL uptake and degradation by leukaemic cells as suggested by *Vitols et al.* (17). An increased load of myeloma plasmocyte cells could conceivably alter plasma cholesterol levels, and the marked decreases of cholesterol concentrations in HDL, particularly into HDL₃, were consistent with an LDL receptor-dependent process. *Oram* (9) demonstrated in cultured human fibroblasts and human arterial smooth muscle cells, that exposure of cells to HDL₃ and VHDL removes cholesterol from cells and also results in elevated LDL receptor activity and an enhanced rate of LDL degradation by the cells.

We can suppose that in myeloma patients, the decreased cholesterol HDL₃ levels were due to HDL₃-cellular interaction. This interaction of HDL₃ with tumour plasmocyte cells results in a rapid increase in LDL receptor activity in parallel to an increase in the rate of cholesterol synthesis and a decrease in the rate of cholesterol esterification, as suggested by several authors (22, 8) for cultured human fibroblasts. The correlations observed in our patients between cholesterol levels or LDL and HDL₃ with the disease state supports this hypothesis. It has been postulated that the efflux of cholesterol from the cell is mediated by the binding of HDL to high-affinity sites (22, 23). Recent work by *Fielding et al.* (24) has indicated that sterol efflux from fibroblasts is dependent upon a minor lipoprotein fraction containing apolipoprotein A I unassociated with other major lipoproteins. The increased mass of circulating A I (Lp A I) observed in our patients in relation to the disease state support this hypothesis. The increased HDL₂-cholesterol in our patients would be explained by the availability of lipid transport proteins that may "drive" the cholesterol transport process (28). The decrease of total plasma apolipoprotein A I (activator of lecithin-cho-

lesterol acyltransferase) might induce a decrease of lecithin cholesterol acyltransferase and an increase of apolipoprotein E-rich HDL (25). Fielding et al. (26) have demonstrated that unassociated apolipoprotein E promotes sterol efflux. At that time, however, data on apolipoprotein E levels in myeloma were not available.

Elsewhere we cannot rule out the hypothesis that myeloma HDL have altered structure with an accompanying increase in their catabolism. These structural modifications could result from substitution of apolipoproteins A I and A II by another protein resulting from the disease. This phenomenon of one apolipoprotein displacing another has been shown by several authors (27, 28, 29).

Preliminary results in our laboratory have shown the presence of serum amyloid A protein (SAA) in myeloma HDL. Parks et al. (30) have described, in a non-human primate, a displacement of A I, A II or C-apolipoproteins from HDL after induction with serum amyloid A protein.

We think that the presence of serum amyloid A protein could modulate the HDL surface and conse-

quently facilitate the binding of HDL to specific sites to tumour cells. The decrease of apolipoproteins A I and A II, particularly of A I (Lp A) with relation to disease state could conceivably support this hypothesis. At least, these two apolipoproteins (A I and A II) are localized at the periphery of the lipoprotein particle (31).

Studies are in progress in our laboratory to delineate the mechanism involved in the production of these perturbations in patients suffering from myeloma.

Our results suggest that determination of apolipoprotein A I, associated or unassociated with A II, provide information that may be of value in assessing myeloma disease activity.

Acknowledgement

We are indebted to Dr P. Cambon (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France) for the gift of major myeloma samples. The secretarial aid of Jeanine Leon is also appreciated.

This work was supported by a grant of the "Comités Départementaux (Région Midi-Pyrénées) de la Ligue Nationale de Lutte Contre le Cancer".

References

- Seitanidis, B. A., Shulman, G. & Hobbs, J. R. (1970) *Clin. Chim. Acta* 29, 93–95.
- Shulman, S. R., Lynch, S. R., Bezwoda, W. R. & Gilich, G. C. (1976) *J. Clin. Pathol.* 29, 458–461.
- Fieissinger, J. N., Olier, M. P., Filitti-Wurmser, S. & Hartmann, L. (1971) *Ann. Biol. Clin.* 29, 25–37.
- Hachem, H., Favre, G., Raynal, G. & Soula, G. (1983) *Ann. Biol. Clin.* 41, 181–185.
- Gofman, J. W., De Lalla, O., Glazier, F., Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Nichols, A. V., Strisower, E. H. & Tamplin, A. R. (1954) *Plasma* 2, 413–484.
- Enzi, G., Favaretto, L., Martini, S., Sellin, R., Baritussio, A., Baggio, G. & Crepaldi, G. (1983) *J. Lipid. Res.* 24, 566–574.
- Mendonza, S., Lumer, R. F., Glueck, C. F., Chen, C. Y., Steiner, P. M., Sallat, R. W. & Kashyab, M. L. (1976) *Atherosclerosis* 25, 131–136.
- Oram, J. F., Albers, J. J., Cheung, M. C. & Bierman, E. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8348–8356.
- Oram, J. F. (1983) *Arteriosclerosis* 3, 420–432.
- Norfeldt, P. P., Olofsson, S. O., Fager, G. & Bondjers, G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 118, 1–8.
- Atmeth, R. F., Shepherd, J. & Packard, C. J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 751, 175–188.
- Gidez, L. I., Miller, G. J., Burstein, M., Slagle, S. & Eder, A. H. (1982) *J. Lipid. Res.* 23, 1206–1222.
- Bucolo, G. & David, H. (1973) *Clin. Chem.* 19, 476–482.
- Koren, E., Puchois, P., Mc Conathy, W. J., Fesmire, J. D. & Alaupovic, P. (1985) *Clin. Chim. Acta* 147, 85–95.
- Puchois, P., Kandoussi, A., Duriez, P. & Fruchart, J. C. (1986) *J. Immunoassay* 7, 285–307.
- Koren, E., Puchois, P., Alaupovic, P., Fesmire, J., Kandoussi, A. & Fruchart, J. C. (1987) *Clin. Chem.* 33, 38–43.
- Vitols, S., Gahrton, G., Bjorkholm, M. & Peterson, C. (1985) *Lancet* I or II, 1150–1153.
- Bases, R. E. & Krafoff, I. H. (1965) *J. Reticuloendothel. Soc.* 2, 1–7.
- Ginsberg, H., Goldberd, I. J., Wang-Iverson, P., Gilter, E., Le, N. A., Gilbert, H. S. & Brown, W. V. (1983) *Arteriosclerosis* 3, 233–241.
- Chen, H. W. & Hemiger, H. (1974) *Cancer Res.* 34, 1304–1307.
- Betteridge, D., Krone, J. W., Ford, J. M. & Galton, D. J. (1979) *Eur. J. Clin. Invest.* 9, 439–441.
- Briesbroeck, R., Oram, J. V., Albers, J. J. & Bierman, E. L. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 525–539.
- Wu, J. D., Butler, J. & Bailey, J. M. (1979) *J. Lipid. Res.* 20, 472–480.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3911–3914.
- Harry, D. S., Day, R. C. & Bwen, J. S. (1978) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 38, suppl. 150, 223–227.
- Fielding, C. J., Frohlich, J., Moser, K. & Fielding, P. E. (1982) *Metabolism* 31, 1023–1028.
- Lagocki, P. A. & Scanu, A. M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3701–3706.
- Coetzee, G. A., Strachan, A. F., Van Der Westhuylen, D. R., Hoppe, E. C., Jeenah, M. S. & De Beer, F. C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9644–9651.
- Pownall, H. J., Pao, Q., Rohde, M. & Gotto, A. M. (1978) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 85, 408–414.
- Parks, J. S. & Rudel, L. L. (1985) *J. Lipid Res.* 26, 82–91.
- Shen, B. W., Scanu, A. M. & Kezdy, F. J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 837–841.

Georges Soula
Centre Claudius Regaud
20–24 rue du Pont Saint-Pierre
F-31052 Toulouse Cedex

Article n°9

**Analyse quantitative
des apolipoprotéines et des particules lipoprotéiniques
chez les traumatisés crâniens**

Kabbaj O., Saile R., Ghalim N., Puchois P., Parra H.J.,
Puchois P., Fruchart J.C., Métais P. and Férard G.

**Ann. Bio. Clin.
1989, 47, 35-40**

Analyse quantitative des apolipoprotéines et des particules lipoprotéiniques chez les traumatisés crâniens

O. KABBAJ¹, R. SAILE², N. GHALIM², H.J. PARRA², P. PUCHOIS², J.C. FRUCHART², P. MÉTAIS^{1†}, G. FÉRARD¹

RÉSUMÉ

L'étude effectuée chez les traumatisés crâniens montre que les diminutions des concentrations de l'apo A-I et de l'apo A-II des HDL₃ sont plus importantes que celles des HDL₂. Cela induit des modifications des concentrations plasmatiques des principales particules lipoprotéiniques des HDL ; on note ainsi une diminution significative ($p < 0,05$) des particules Lp A-I : A-II dont la variation est semblable à celle de l'apo A-I totale ($r = 0,78$) alors que la variation des particules Lp A-I est faible. D'autre part, l'apo C-III subit également une baisse importante alors que l'élévation de la concentration plasmatique de l'apo E est considérable ($p < 0,05$) ; elle atteint trois fois la valeur normale au 10^e jour après un traumatisme crânien sévère.

MOTS CLÉS : HDL - Apolipoprotéines - Traumatisme crânien.

SUMMARY

Quantitative analysis of some apolipoproteins and lipoproteins particles by head-injured patients. — By head-injured patients, apo A-I and apo A-II concentrations were more decreased in HDL₃ than in HDL₂. Then, the plasmatic concentrations of the main lipoprotein particles present in HDL fraction were modified. For example, a significant decrease of Lp A-I : A-II particles was observed and this variation was similar to that of total apo A-I ($r = 0,78$). On the other hand, the concentration of Lp A-I particles was slightly modified, apo C-III concentration was markedly decreased whereas apo E concentration was significantly increased ($p < 0,05$) ; in plasma samples obtained 10 days after a severe head injury, apo E reached three times the normal value.

INDEX TERMS : Lipoproteins - HDL - Cranium trauma.

Les lipoprotéines plasmatiques sont hétérogènes non seulement en fonction de leur densité hydratée (HDL, LDL, VLDL) mais également en fonction de leur composition en apolipoprotéines (apo). En effet, de nombreuses particules lipoprotéiniques distinctes ont été mises en évidence et un certain nombre d'apolipoprotéines plasmatiques ont été individualisées [1]. Certaines apolipoprotéines existent sous différentes formes polymorphiques ; d'autres protéines mineures ont été également trouvées associées aux lipoprotéines plasmatiques telle que la protéine sérique amyloïde A (SAA) qui s'associe aux HDL lors de son apparition [2]. Il est maintenant admis que les HDL comprennent deux principaux types de particules : celles qui contiennent à la fois les apo A-I et A-II (Lp A-I : A-II) et celles qui contiennent l'apo A-I mais pas l'apo A-II (Lp A-I). Il a été proposé que ces particules lipoprotéiniques possèdent des fonctions spécifiques [3]. Ainsi, il a été démontré récemment sur un modèle cellulaire, l'adipocyte, que l'efflux de cholestérol n'était observé qu'en présence de Lp A-I et non Lp A-I : A-II [4]. Ce nouveau concept moléculaire de classification des lipoprotéines devrait permettre une meilleure compréhension de leur métabolisme. Nous avons constaté, dans une étude préliminaire chez les traumatisés crâniens, une diminution consi-

dérable des concentrations plasmatiques de cholestérol et phospholipides des HDL, ainsi que celles des apo A-I et A-II. Dans le but d'élucider le mécanisme des variations des lipoprotéines après traumatisme crânien sévère, nous avons étudié d'une part l'évolution en fonction du temps des concentrations des apo A-I et apo A-II des HDL₂ et HDL₃ et des particules Lp A-I : A-II, Lp A-I et, d'autre part, des apo C-III et apo E du plasma et des fractions de densité (HDL, LDL et VLDL).

Matériel et méthodes

Patients

34 patients (24 hommes, 10 femmes) âgés de 17 à 84 ans ont été admis au Service de Réanimation du Centre de Traumatologie et d'Orthopédie de Strasbourg. Tous avaient un traumatisme crânien avec perte de connaissance durable (coma). Dès leur admission, tous ces malades ont bénéficié :

- d'une ventilation contrôlée après intubation nasotrachéale ou trachéotomie ;
- d'une sédation au phénobarbital (Gardénal) pour réaliser une « protection cérébrale » selon Gobiet [5] ;
- d'une réhydratation avec restriction sodée pendant 48 heures au maximum ;
- durant le coma (15 jours en moyenne) d'une infusion entérale continue d'aliments diététiques équilibrés : Nutrison (Nutricia Holland). Le régime ainsi

¹Laboratoire de Biochimie Appliquée, Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques, Université Louis-Pasteur, 74, route du Rhin, 67048 STRASBOURG Cedex.

²SERLIA, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, 59019 LILLE Cedex.

Tirés à part : G. Férard, adresse ci-dessus.

Reçu le 21 juin 1988. Accepté le 14 novembre 1988.

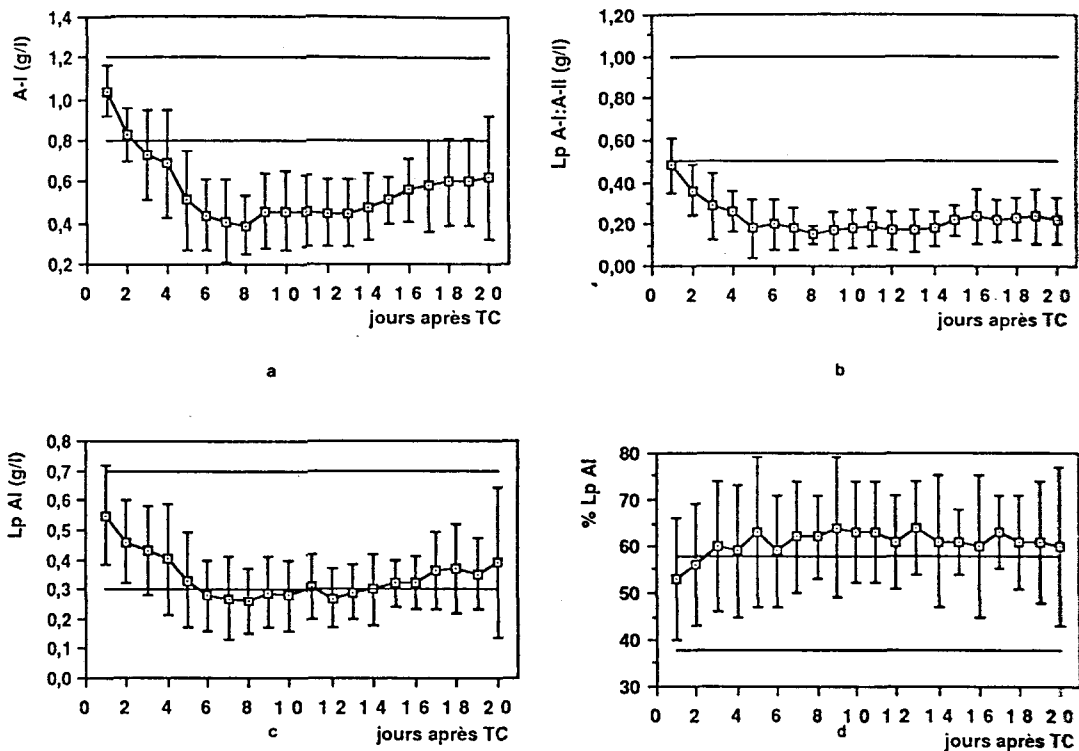


Fig. 1. — Variations moyennes de l'apo A-I (a), des particules Lp A-I : A-II (b), Lp A-I (c) et du pourcentage en Lp A-I par rapport à l'apo A-I totale (d) chez 34 traumatisés crâniens par rapport aux valeurs normales ($M \pm 2$ ET) pendant les 20 jours suivant un traumatisme.

réalisé apporte entre 2 000 et 3 000 kCal par jour. Le régime entéral est arrêté dès que le patient est conscient après l'arrêt de la sédation et une alimentation normale est alors administrée. Sur les 34 patients, huit sont décédés après le quatrième jour suivant le traumatisme. Sont exclus de cette étude les patients qui présentent une affection hépatique, rénale, cardiovasculaire, un diabète, une hyperlipidémie ou ceux qui ont développé un processus infectieux. Des prélèvements sanguins ont été pratiqués quotidiennement à partir de l'admission et pendant au moins 20 jours sauf chez les huit patients décédés.

Méthodes

Préparation des sous-fractions lipoprotéiques

Les HDL ont été séparées des LDL et VLDL par précipitation à l'héparine-manganèse [6]. HDL₂ et HDL₃ ont été préparées selon la méthode de Gidez et coll. [7].

Dosage des apolipoprotéines

L'apo A-I et l'apo A-II des HDL et l'apo B ont été déterminées par électroimmunodiffusion [8]. Tous les autres dosages d'apolipoprotéines et de particules lipoprotéiques ont été réalisés par une méthode immunoenzymatique ELISA adaptée sur microplaque [9, 10].

Principales applications

Les principales applications de cette étude se résument ainsi :

— apo A-I, Lp A-I : A-II, Apo C-III et E ont été déterminées chez 34 patients quotidiennement pendant 20

jours en parallèle à 30 témoins à l'exception des huit malades décédés précocement pour lesquels les analyses ont été réalisées sur une période plus limitée.

— Apo A-I et A-II des HDL₂ et HDL₃ ont été suivies chez 10 sujets (6 hommes, 4 femmes) en parallèle à 10 témoins.

— Enfin, apo A-I, C-III et E des HDL et des lipoprotéines de basse densité (mélange LDL et VLDL) chez trois traumatisés crâniens :

patient 1 : un homme de 40 ans, évolution fatale jusqu'au 10^e jour ;

patient 2 : une femme de 23 ans, évolution lentement favorable ;

patient 3 : un homme de 34 ans, évolution rapidement favorable.

Résultats

Variations de l'apo A-I et des particules Lp A-I : A-II et Lp A-I

Les variations des concentrations plasmatiques de ces paramètres chez 34 traumatisés crâniens sont comparées aux limites de référence des sujets sains. Ainsi, la figure 1 montre que la variation moyenne de la Lp A-I : A-II est semblable à celle de l'apo A-I totale (fig. 1a, 1b), avec un coefficient de corrélation de 0,78 ($p < 0,05$). Leur diminution est significative ($p < 0,05$) à partir du 2^e jour, et est maximale le 8^e jour après le traumatisme. La diminution des particules Lp A-I est faible (fig. 1c), les valeurs restant en général dans les limites de l'intervalle de référence.

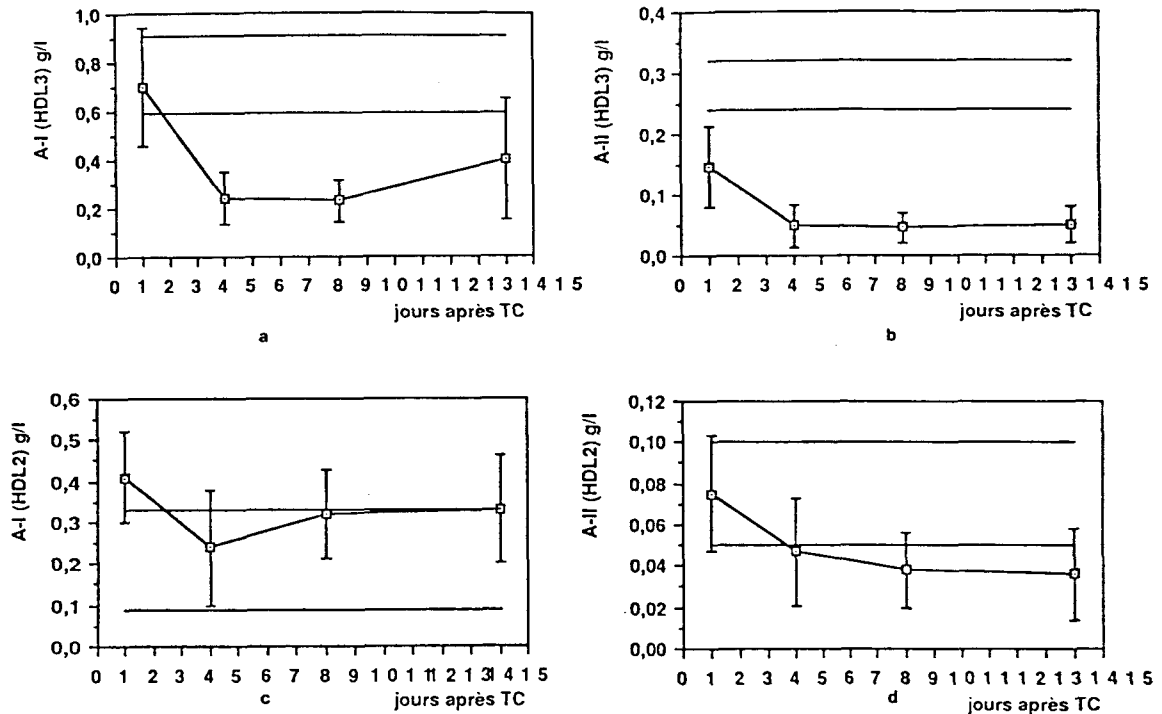


Fig. 2. — Variations moyennes de l'apo A-I des HDL₃ (a), apo A-II des HDL₃ (b), apo A-I des HDL₂ (c) et l'apo A-II des HDL₂ (d) chez dix traumatisés crâniens par rapport aux valeurs normales (M ± ET) pendant les 14 jours suivant un traumatisme crânien grave (TC).

TABLEAU I
Compositions en apo A-I, apo A-II des HDL chez 10 témoins
(M = moyenne, ET = écart-type)

	HDL	HDL ₃	HDL ₂
Apo A-I (M ± 2 ET) g/l	0,95 ± 0,11	0,75 ± 0,16	0,21 ± 0,12
Apo A-II (M ± ET) g/l	0,355 ± 0,029	0,28 ± 0,04	0,075 ± 0,025

De ce fait, le pourcentage en Lp A-I augmente en moyenne chez tous les sujets traumatisés et atteint 60 p. cent de l'apo A-I totale le 7^e jour (fig. 1d).

Variations de l'apo A-I et de l'apo A-II des HDL₂ et HDL₃

Le tableau I représente les concentrations plasmatiques des apo A-I, A-II des HDL, HDL₂ et HDL₃ chez 10 sujets sains. La figure 2 montre les variations des apo A-I et A-II des HDL₂ et HDL₃ en comparaison avec les limites de référence. Ces deux apolipoprotéines diminuent considérablement ($p < 0,05$) dans les HDL₃ chez les 10 traumatisés crâniens (fig. 2a, 2b). Cette diminution atteint en moyenne 69 p. cent pour l'apo A-I et 85 p. cent pour l'apo A-II. Par contre, les variations sur les HDL₂ sont faibles (fig. 2c, 2d).

Variations de l'apo C-III

Les concentrations plasmatiques en apo C-III subissent une diminution importante (fig. 3) et significative ($p < 0,05$) ; elles atteignent 0,033 g/l le 6^e jour

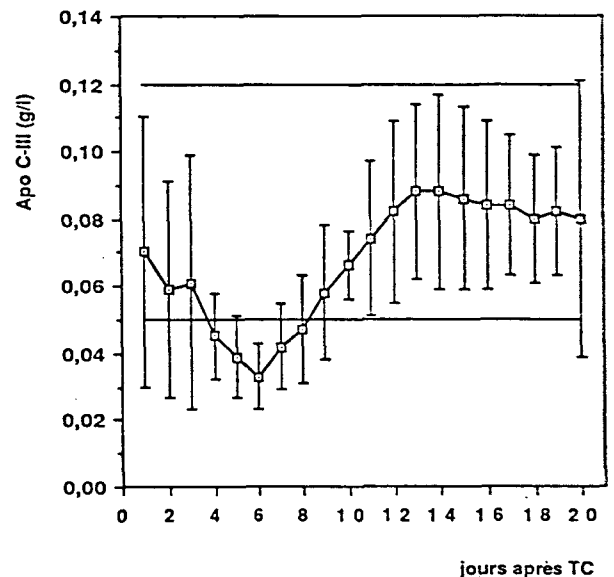


Fig. 3. — Variations moyennes de l'apo C-III chez 34 traumatisés crâniens par rapport aux valeurs normales (M ± 2 ET) pendant les 20 jours suivant un traumatisme crânien grave.

après le traumatisme ; elles augmentent par la suite pour rejoindre les valeurs usuelles. L'apo C-III diminue transitoirement aussi bien dans les HDL que dans les lipoprotéines de basse densité (LDL et VLDL). Pour savoir si cette variation porte sur certaines fractions plutôt que d'autres, nous avons calculé les rapports C-III (HDL)/A-I et C-III (LDL + VLDL)/B reflétant respectivement la répartition des apo C-III dans les HDL et dans l'ensemble LDL + VLDL (tableau II). On constate ainsi que le rapport C-III (HDL)/A-I s'élève jusqu'à 8 fois la valeur habituelle

TABLEAU II

Distribution des apo C-III et E dans les lipoprotéines de haute et de basse densité chez trois traumatisés crâniens (P 1, P 2, P 3)

		HDL					LDL + VLDL				
		A-I (g/l)	C-III (g/l)	E (g/l)	C-III/A-I	E/A-I	B (g/l)	C-III (g/l)	E (g/l)	C-III/B	E/B
Témoins (n = 30)		0,96±0,11	0,041±0,015	0,029±0,011	0,043±0,004	0,03±0,011	0,85±0,15	0,044±0,014	0,056±0,009	0,052±0,015	0,0066±0,01
Jours après TC											
P1	1	0,79	—	0,026	—	,33	0,62	—	0,159	—	0,26
	5	0,17	0,017	0,115	0,1	0,68	0,5	0,006	0,142	0,012	0,28
	10	0,04	0,014	0,013	0,35	0,33	0,5	0,022	0,107	,044	0,21
P2	1	1,06	0,067	0,012	0,063	0,011	0,74	0,003	0,088	0,004	0,12
	5	0	0,002	0,008	—	—	0,55	0,013	0,107	0,024	0,19
	10	0,38	0,046	0,021	0,121	0,055	0,37	0,024	0,204	0,064	0,55
	15	0,81	0,039	0,013	0,048	0,016	0,31	0,051	0,102	,16	0,33
P3	1	0,91	0,017	0,028	0,018	0,031	0,7	0,033	0,097	0,047	0,14
	5	0,84	0,02	0,019	0,024	0,023	0,5	0,045	0,139	0,09	0,28
	10	0,53	0,01	0,014	0,019	0,026	0,5	0,027	0,142	0,058	0,28
	15	0,57	0,01	0,014	0,018	0,025	0,56	0,027	0,119	0,048	0,21

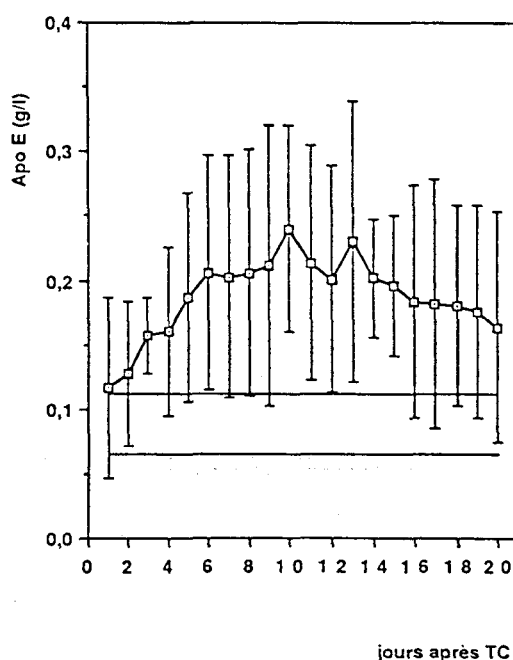


Fig. 4. — Variations moyennes de l'apo E chez 34 traumatisés crâniens par rapport aux valeurs normales ($M \pm 2 ET$) pendant 20 jours suivant un traumatisme crânien grave (TC).

surtout chez les deux traumatisés crâniens très gravement atteints ; cela traduit l'enrichissement passager de leurs HDL en apo C-III aux dépens de l'apo A-I. Par contre, le rapport C-III (LDL + VLDL)/B diminue par rapport à la valeur obtenue chez les témoins ce qui indique leur appauvrissement en apo C-III.

Variations de l'apo E

Les concentrations plasmatiques d'apo E augmentent considérablement ($p < 0,05$) à partir du 1er jour ; cette élévation atteint trois fois la valeur normale le 10^e jour après le traumatisme (fig. 4). L'étude des variations relatives de l'apo E des HDL et de l'ensemble LDL + VLDL est plus importante que celle

des HDL sauf pour le premier patient où elle augmente dans les deux fractions (tableau II).

Discussion

L'étude des apolipoprotéines plasmatiques chez les traumatisés crâniens gravement atteints montre des altérations considérables des concentrations de ces protéines. On remarque surtout une diminution significative des concentrations des apo A-I, A-II et C-III. Il est donc intéressant de voir si ces diminutions portent sur certaines fractions des HDL réparties en sous-classes de densité (HDL₂ et HDL₃), ou sur les LpA-I : A-II et LpA-I définies par leur composition en apolipoprotéines.

En ce qui concerne les modifications des sous-classes HDL₂ et HDL₃, on constate, chez les traumatisés crâniens, une diminution de la concentration plasmatique des HDL₃ semblable à celle obtenue lors d'une atteinte hépatique [11]. La réduction des HDL est également associée à l'effondrement des concentrations en apo A-I et apo A-II et à celui des particules Lp A-I : A-II qui sont les plus influencées par la réaction post-traumatique. Cette diminution de la LpA-I : A-II devrait être le reflet de celle des HDL₃ ; en effet les HDL₃ contiennent plus de Lp A-I : A-II que les HDL₂ [3]. Dans cette étude, malgré une diminution importante des HDL, la Lp A-I reste dans les limites habituelles et même augmente relativement par rapport à la LpA-I : A-II.

Quant aux autres apolipoprotéines étudiées, la diminution de l'apo C-III serait due à la baisse des concentrations des HDL. En effet l'apo C-III, synthétisée par le foie et l'intestin [12], joue un rôle dans la lipolyse des VLDL [13] et diminue la captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides et des particules résiduelles issues de leur catabolisme [14, 15]. Cette apolipoprotéine est activement échangée entre les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides ; les chylomicrons et les VLDL n'en contiennent pas de novo mais en acquièrent par échange avec

les HDL. Un processus inverse se produit au cours du catabolisme des VLDL [16]. Chez les traumatisés crâniens, les concentrations des HDL sont nettement réduites par rapport à celles des LDL et VLDL ; le déficit en apo C-III des lipoprotéines de basse densité pourrait être lié à la réduction des HDL.

Nous avons également remarqué une augmentation considérable de l'apo E. Cette apolipoprotéine est synthétisée surtout par le foie. Elle est sécrétée avec les HDL et transférée ensuite sur les VLDL, mais elle est aussi synthétisée par le rein, les monocytes, les macrophages et le tissu nerveux [17-21]. Les travaux de Castro et Fielding ont montré chez les sujets sains que la totalité de l'apo E plasmatique est présente dans les particules contenant principalement l'apo A-I ou l'apo B [22]. Mais dans certains cas pathologiques on peut trouver la particule Lp E et celle-ci peut contenir jusqu'à 62 p. cent de la totalité de l'apo E plasmatique [23]. Cette fraction pourrait être présente chez les traumatisés crâniens puisqu'aucune autre apolipoprotéine ne subit de telles élévations et qu'on observe même des diminutions importantes des HDL. On sait aussi que la concentration plasmatique de l'apo E s'élève durant le développement du tissu nerveux [24, 25], au cours des maladies nerveuses [25, 26] ou lors de la régénération du tissu nerveux [27]. Mais le rôle exact de l'apo E dans le système nerveux n'est pas encore connu. Ainsi, l'augmentation de la concentration plasmatique de l'apo E, après un traumatisme crânien sévère, pourrait donc être due soit à une augmentation de la synthèse des particules Lp E, indépendamment de la synthèse des HDL, soit à une synthèse supplémentaire de l'apo E par les macrophages ou les monocytes, liée aux phénomènes inflammatoires importants chez ces sujets, ou encore à une synthèse accrue de l'apo E dans les tissus nerveux, libérée en cas de traumatisme crânien.

Ainsi, après un traumatisme crânien grave, on assiste à des perturbations considérables du métabolisme des apolipoprotéines. On peut alors se demander si ces anomalies sont liées au traumatisme lui-même ou aux phénomènes inflammatoires qui en résultent. Cependant, des études préliminaires chez ces malades ont montré une élévation considérable de la protéine sérique amyloïde A (SAA) de l'ordre du g/l. Il est connu que cette protéine est pratiquement inexistante à l'état normal [28], que sa concentration plasmatique est augmentée même en cas de réactions inflammatoires minimales, et que lors de son apparition elle se lie aux HDL aux dépens de l'apo A-I et A-II [29].

Conclusion

L'analyse quantitative des apolipoprotéines chez les traumatisés crâniens gravement atteints montre des modifications importantes de ces protéines et des particules lipoprotéiniques particulièrement la diminution de la concentration plasmatique de la Lp A-I : A-II, alors que la variation de la Lp A-I est faible. Cette étude montre aussi que les variations de l'apo A-I et de l'apo A-II des HDL₃ sont plus importantes que celles des HDL₂. D'autre part le métabolisme de l'apo C-III est aussi modifié alors que l'élévation de l'apo E est considérable. Il serait donc intéressant de voir si les modifications observées ici, notamment celles des Lp E sont retrouvées dans d'autres types de traumatismes non crâniens ou si elles sont liées au pronostic chez les traumatisés crâniens. De plus, nous proposons d'étudier les modifications éventuelles des particules lipoprotéiniques particulièrement les Lp B : C-III et les Lp B : E lors d'un traumatisme crânien sévère.

RÉFÉRENCES

1. Puchois P., Alaupovic P., Fruchart J.C. — Mise au point sur les classifications des lipoprotéines. *Ann. Biol. clin.*, 1985, 43, 831.
2. Eriksen N., Benditt E.P. — Isolation and characterization of the amyloid-related apolipoprotein (SAA) from human high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 6860.
3. Atmeh R.F., Shepherd J., Packart C.J. — Subpopulations of apolipoprotein A-I in human high density lipoproteins. Their metabolic properties and response to drug therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 751, 175.
4. Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C., Ailhaud G. — Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by LpA-I particles but not by LpA-I : A-II particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 63.
5. Gobiet W. — *Intensivetherapie von Schädelhirntrauma*. (Springer, 1977).
6. Burstein M., Legmann P. — In : Clarkson T.B., Kritchevsky D., Pollak O.J. *Lipoprotein precipitation* (Monogr. Atheroscler., 1982), 11.
7. Gidez L.I., Miller G.J., Burstein M., Slagle S., Eder H.A. — Separation and quantification of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure. *J. Lipid. Res.*, 1982, 23, 1206.
8. Fruchart J.C., Kora I., Cachera C., Clavey V., Duthilleul P., Moschetto Y. — Simultaneous measurement of plasma apolipoproteins A-I and B by electroimmunoassay. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 59.
9. Koren E., Puchois P., Alaupovic P., Fesmire J., Kandoussi A., Fruchart J.C. — Quantification of two different types of apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles in plasma by enzyme-linked differential antibody immunosorbent assay. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 38.
10. Parsy D., Clavey V., Fievet C., Kora I., Duriez P., Fruchart J.C. — Quantification of apolipoprotein C-III in serum by a non competitive immunoassay. *Clin. Chem.*, 1985, 31, 1632.
11. Kajiyama G., Takata K., Horiuchi I., Oyama K., Miyochi A. — HDL and its subfractions in patients with chronic liver diseases. *J. Med. Sci.*, 1981, 30, 273.
12. Blaufuss M.C., Gordon J.I., Shonfeld G., Strauss A.W., Alpers D.H. — Biosynthesis of apo C-III in rat liver and small intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 2452.
13. Brown W.V., Baginsky M.L. — Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 375.
14. Shelburne F., Hanks J., Meyers W., Quarfordt S. — Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J. Clin. Invest.*, 1980, 65, 652.
15. Windler E., Chao Y., Havel R.J. — Determination of hepatic uptake of triglyceride rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 5475.
16. Peckless J.P.D., Stocks J., Holdworth G. — The roles of C apolipoproteins in the metabolism of triglyceride rich lipoproteins. *Clin. Sci.*, 1982, 62, 129.
17. Blue M.L., Williams D.L., Zucker S., Khan S.A., Blum C.B. — Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 283.
18. Basu S.K., Brown M.S., Ho Y.K., Havel R.J., Goldstein J.C. — Mouse macrophage synthesizes and secretes a protein resembling apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 7545.
19. Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Foss D., Mahley R.W. — Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 917, 148.
20. Roheim P.S., Carey M., Forte T., Vega G.L. — Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4646.

21. Basu S.K., Ho Y.K., Brown M.S., Bilheimer D.W., Anderson R.G., Goldstein J.L. — Biochemical and genetic studies of apolipoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 9788.
22. Castro G.R., Fielding C.J. — Evidence for the distribution of apolipoprotein E between lipoprotein classes in human normocholesterolemic plasma and for the origin of an associated apolipoprotein E (LpE). *J. Lipid. Res.*, 1984, 25, 58.
23. Fielding C.J., Frohlich J., Moser K., Fielding P.E. — Promotion of sterol efflux and net transport by apolipoprotein E in lecithin : cholesterol acyltransferase deficiency. *Metabolism*, 1982, 31, 1023.
24. Müller H.W., Gebicke H.P.J., Hangen D.H., Shooter E.M. — A specific 37 000 dalton protein that accumulates in regenerating but not in non regenerating mammalian nerves. *Science*, 1985, 228, 499.
25. Snipes G.J., MacCuire C.B., Norden J.J., Freeman J.A. — Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 1130.
26. Skene J.H.P., Shooter E.M. — Denervated sheath cells secrete a new protein after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 4169.
27. Ignatius M.J., Gebicke H.P.J., Skene J.H.P., Schilling J.W., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Shooter E.M. — Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 1125.
28. Rosenthal C.J., Franklin E.C. — Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component. *J. Clin. Invest.*, 1975, 55, 746.
29. Parks J.S., Rudel L.R. — Alteration of high density lipoprotein subfraction distribution with induction of serum amyloid protein (SAA) in the non human primate. *J. Lipid. Res.*, 1985, 26, 82.

Conclusion

L'étude réalisée chez les malades sous aminoglutéthimide a montré que :

- les malades ayant une concentration en cholestérol élevée au départ ne montrent aucune variation dans la concentration du cholestérol LDL et de l'apolipoprotéine B. La seule variation constatée était l'augmentation de la gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) ;

- les malades dont la cholestérolémie et la triglycéridémie était normale au départ montrent une augmentation de la concentration en cholestérol, triglycérides, cholestérol des HDL et GGT après 3 mois de traitement. L'élévation des apolipoprotéines B et CIII a été constatée au bout de 45 jours de traitement, mais n'était pas plus significative après 3 mois.

Compte tenu des perturbations du métabolisme du cholestérol chez les malades recevant l'aminoglutéthimide et ayant au départ une concentration normale en cholestérol, le traitement avec l'aminoglutéthimide à titre adjuvant doit être évité. En revanche, il n'y a aucun problème quand l'aminoglutéthimide est utilisé dans un stade avancé de la maladie.

L'étude des perturbations lipidiques dans le myélome se limitait en général au dosage du cholestérol, aux bêta-lipoprotéines et très rarement aux alpha-lipoprotéines. Cependant, en analysant les apolipoprotéines, l'équipe du Professeur G. Soula a constaté une baisse de l'apo AI chez des sujets myélomateux. En accord avec cette étude, nous avons constaté une baisse significative de l'apo AI et du cholestérol des HDL. L'apo AI joue un rôle métabolique important dans l'activation de la LCAT, donc vis-à-vis du métabolisme du cholestérol circulant. La diminution de l'apo AI observée chez les myélomateux, pourrait induire la diminution de l'activité de la LCAT et par conséquent l'augmentation des HDL riches en apo E (HDL_C). De ce fait, on ne peut éliminer l'hypothèse de l'augmentation de l'apo E dans le myélome. Ces HDL riches en apo E pourraient augmenter l'efflux du cholestérol cellulaire chez des

sujets déficients en LCAT. Nous avons observé une diminution importante de la concentration en apo AII, du cholestérol des LDL, du cholestérol des HDL₃ et des particules Lp AI:AII. En revanche, les concentrations des Lp AI étaient augmentées et se montraient en parfaite concordance avec celles des HDL₂. Etant donné que la Lp AI présente la fraction anti-athérogène des HDL, son augmentation pourrait induire l'efflux du cholestérol cellulaire.

L'étude réalisée chez les traumatisés crâniens, montre une diminution significative des constituants lipidiques et protéiques des HDL non liée au traumatisme crânien proprement dit, mais plutôt aux phénomènes inflammatoires post-traumatiques. Nous avons observé une diminution très importante des concentrations plasmatiques des apolipoprotéines AI, AII et CIII associée à une diminution des lipides liés aux HDL. La surprise venait surtout de l'augmentation de la concentration plasmatique de l'apolipoprotéine E. Cette augmentation, après traumatisme crânien, pourrait donc être due soit à une augmentation de la synthèse des particules lipoprotéiques contenant l'apo E (Lp E) indépendamment de la synthèse des HDL, soit une synthèse supplémentaire de l'apo E par les macrophages ou les monocytes ou encore une synthèse accrue de l'apo-E dans les tissus nerveux, libérée en cas de traumatisme crânien. Nous avons noté une baisse importante de la concentration plasmatique des apolipoprotéines AI et AII des HDL₃ par rapport à celle des HDL₂. La réduction des HDL a été traduite plus précisément par celle des particules Lp AI:AII. Les Lp AI restent dans les limites habituelles. Ces observations semblent être en parfaite concordance, puisque les particules Lp AI:AII se retrouvent principalement dans les HDL₃.

The first part of the study was a literature review of the available literature on the topic of the study. The second part was a survey of the available literature on the topic of the study. The third part was a survey of the available literature on the topic of the study. The fourth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The fifth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The sixth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The seventh part was a survey of the available literature on the topic of the study. The eighth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The ninth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The tenth part was a survey of the available literature on the topic of the study.

CONCLUSION GENERALE

The first part of the study was a literature review of the available literature on the topic of the study. The second part was a survey of the available literature on the topic of the study. The third part was a survey of the available literature on the topic of the study. The fourth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The fifth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The sixth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The seventh part was a survey of the available literature on the topic of the study. The eighth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The ninth part was a survey of the available literature on the topic of the study. The tenth part was a survey of the available literature on the topic of the study.

Nos résultats confirment et affinent l'effet anti-athérogène des lipoprotéines contenant l'apo AI accordé à la Lp AI et non à la Lp AI:AI. De plus, ils montrent, comme la Lp AI, que la Lp AIV provoque l'efflux du cholestérol des cellules adipeuses, suggérant ainsi son rôle à côté de la Lp AI dans l'activation du transport "réverse" du cholestérol.

La Lp AI, la Lp AI:AI et la Lp AIV sont hétérogènes. Il est possible, selon leur composition en apolipoprotéine, d'isoler les Lp AI et les Lp AI:AI avec ou sans apo E et les Lp AIV avec ou sans apo AI, ainsi que les sous-populations de ces dernières selon leur contenance ou non en apo E. Toutes les populations sont différentes entre elles, selon leur caractère physico-chimique (composition lipidique et apolipoprotéique, taille), leur rôle biologique (activité LCAT, transport "réverse" du cholestérol). La complexité de ces particules n'est probablement que le reflet de celle du métabolisme des lipoprotéiques définies par leur contenu en apolipoprotéines. Ainsi, l'utilisation du concept des particules lipoprotéiques devrait à l'avenir permettre de déterminer de façon encore plus affine les particules protectrices vis-à-vis de l'athérosclérose, afin de rechercher les médicaments les plus actifs.

La composition en lipides et en apolipoprotéines et l'activité de la LCAT des particules lipoprotéiques Lp AI-E, Lp AIV:AI-E et Lp AIV-AI-E sont très favorables à la captation du cholestérol cellulaire par ces particules. Il serait donc plus bénéfique de porter l'intérêt sur elles. L'augmentation de la concentration plasmatique de celles-ci pourrait lutter contre l'athérosclérose par la réduction du dépôt du cholestérol des tissus périphériques en favorisant son retour vers le foie. Néanmoins, il n'est pas encore possible d'affirmer que l'augmentation provoquée de leurs concentrations plasmatiques est sans risque; seuls des travaux futurs peuvent y répondre.

Il est intéressant de noter que la Lp-AI du liquide interstitiel, milieu dans lequel les cellules baignent, contient

plus d'apo-AIV que la Lp-AI plasmatique ; toutefois, l'apo-AI et l'apo-AIV provoquent toutes les deux l'efflux du cholestérol. Cette composition pourrait probablement attribuer à la Lp-AI interstitielle le rôle le plus important pour assurer l'efflux du cholestérol des cellules périphériques. Le liquide interstitiel de la peau est-il le reflet de celui de la proi artérielle ? Des études du liquide interstitiel du derme entre des sujets à coronaires lésées et des sujets normaux apporteront des arguments.

Bien que la Lp AI puisse être dosée directement par l'immunoprécipitation et l'électroimmunodiffusion à double phase et indirectement par l'immunoenzymologie à double détermination d'antigène, la méthode d'électroimmunodiffusion différentielle que nous rapportons offre des avantages tels que simplicité, rapidité et elle est facilitée par l'utilisation de plaques prêtes à l'emploi.

L'intérêt de l'évaluation de la Lp AI et de la Lp AI:AIH était très important lors de l'étude de l'effet de la consommation de l'alcool sur les HDL. Nous avons observé, en évaluant la concentration plasmatique de ces particules chez des sujets consommant diverses quantités d'alcool, que l'élévation du cholestérol des HDL était liée à celle de la Lp AI:AIH, masquant une diminution de la Lp AI, véritable fraction anti-athérogène des HDL.

FICHES TECHNIQUES

FICHE TECHNIQUE N° 1

TRAITEMENT DU PLASMA
(Pour la chromatographie d'immunoaffinité)

REFERENCES :

Edelstein C. and Scanu D., Methods in enzymology, 1986, 128, 151-155.

Cardin D. et coll., J. Biol. Chem., 1984, 259, 8522-8528.

SANG

	<u>Solution mère</u>	<u>Volume/20 ml</u>	<u>Conc. finale</u>
PPACK	10 mM	2 µl	1 µM
EDTA	0,2 M pH 7,4	320 µl	1,2 g/l
N ₃ Na	2 %	100 µl	0,1 g/l
Gentamycine	10 mg/ml	160 µl	80 mg/l
Aprotinine	20 000 U/ml	10 µl	10 000 U/l
NaCl	0,03 M pH 7,4	592 µl	0,15 M

PLASMA

	<u>Solution mère</u>	<u>Volume/ml</u>	<u>Conc. finale</u>
PMSF	0,2 M (dans du méthanol)	5 µl	1 mM
Benzamidine	1 M	1 µl	1 mM

PPACK : D-phénylalaninyl-L-propyl-L-arginine chlorométhyl-kétone.

La solution mère est gardée à 4°C, sauf le PMSF qui est gardé à -20°C dans le méthanol.

FICHE TECHNIQUE N° 2

DOSAGE DES PROTEINESREFERENCES :

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.

PRINCIPE :

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

REACTIFS :

- Solution A
Solution de Na_2CO_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.
- Solution B
Solution de $\text{CuSO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$ à 0,5 % (p/v) dans de l'eau distillée.
- Solution C
Solution de travail préparée par un mélange de 50 volumes de solution A et 1 volume de solution B.
Elle se conserve une journée.
- Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck)
A diluer au 1/2 avec de l'eau bidistillée.
- Etalons de sérumalbumine
Une gamme d'étalonnage de 5 à 200 μg de sérumalbumine/ml est réalisée par dilution dans de l'eau bidistillée d'une solution mère de sérumalbumine bovine titrant 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

MODE OPERATOIRE :

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

Agiter et laisser 10 minutes au moins à température ambiante.

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

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

L'absorbance de la solution est mesurée :

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

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.

FICHE TECHNIQUE N° 3

**PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES TOTALES D'UN SERUM
PAR PRECIPITATION**

Décomplémenter le sérum en l'incubant à 56°C pendant 30 mn.

SOLUTIONS A PREPARER :

Na_2SO_4 à 27 % (p/v) = 270 g/l

Na_2SO_4 à 18 % (p/v) = 180 g/l

NaCl à 0,15 M = 8,766 g/l

REMARQUE :

Faire toutes les opérations suivantes à une température supérieure à 16°C, sinon on observe une cristallisation.

MODE OPERATOIRE :

A 1 volume de sérum décomplémenté, ajouter 2 volumes de Na_2SO_4 à 27 % ($27 \times 2/3 = 18$). Mettre sous agitation douce pendant 1 heure.

Centrifuger 15 mn à 8000 trs/mn.

Eliminer le surnageant.

Reprendre le précipité par Na_2SO_4 à 18 % avec le même volume de sérum de départ.

Centrifuger 15 mn à 8000 trs/mn. Eliminer le surnageant.

Reprendre le précipité par le même volume de sérum de départ avec NaCl à 0,15 M.

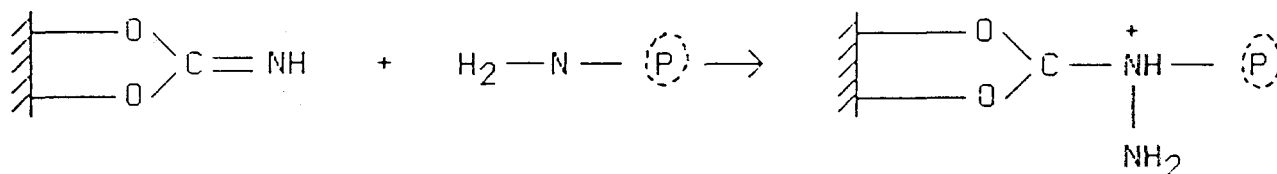
Dialyser contre NaCl à 0,15 M. Mesurer le volume. Doser les protéines.

FICHE TECHNIQUE N° 4

PREPARATION D'UN IMMUNOADSORBANT

PRINCIPE :

Le sépharose 4B activé au bromure de cyanogène permet d'immobiliser rapidement des ligands contenant des groupes aminés primaires par une réaction spontanée.



(Protéines)

Sépharose 4B
activé au bromure
de cyanogène

MATERIELS :

- HCl 10^{-3} M
- Tampon de couplage : NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 8,3
- Solution de blocage : éthanolamine 1 M pH = 8
- Solution de désorption : Acétate de sodium 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 4
- PBS pH = 7

METHODE :

Protocole pour 1 g de gel sépharose 4B :

a - Gonflement du gel

1 g de gel à gonfler pendant 15 mn dans 30 à 40 ml d'HCl 10^{-3} M
(1 g de gel gonflé $\rightarrow$ 3,5 ml de gel)
Laver sur verre fritté avec 200 ml d'HCl 10^{-3} plusieurs fois.

Le gel est ensuite lavé par le tampon de couplage ; 10 ml/1 g de gel sec.

b - Couplage du ligand

Les protéines à coupler doivent être dialysées contre le tampon de couplage ; 5 à 10 mg de protéines/1 g de gel sec.

Transvaser immédiatement la solution du ligand.

NB : - Les groupements réactifs du gel s'hydrolysent à pH du couplage.

- Ne pas utiliser un tampon Tris ou un tampon contenant des groupements aminés.

Laisser le couplage 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C.

NB : - Ne pas utiliser d'agitateur magnétique.

Ne pas oublier de faire un dosage de protéine sur l'éluat pour calculer le rendement du comptage.

c - Blocage de l'excès de groupes actifs

Bloquer les sites réactifs restants avec l'éthanolamine 1 M pH = 8 ou avec la glycine 1 M pH = 8 (20 ml/1 g de gel sec) (sans agitation pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C).

d - Lavage du produit

Laver le produit pour éliminer l'excès du ligand ; lavage alternatif, répété 4 à 5 fois avec 100 ml de :

- tampon NaHCO_3 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 8,3
- tampon acétate de sodium 0,1 M ; NaCl 0,5 M pH = 4

e - Conservation de la colonne

Le gel est transvasé dans une colonne, puis lavé avec du PBS contenant un agent antibactérien (mérthiolate 0,02 % ou azide de sodium 0,01 %) et l'EDTA à 0,01 %, ensuite gardé à 4°C.

FICHE TECHNIQUE N° 5

PREPARATION DES HDL TOTALES ($d = 1,063 - 1,21$)

- Ajuster le plasma à 1,063 par addition de KBr solide (8,53 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Prélever le sous nageant. Le diluer de moitié avec la solution à $d = 1,063$.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Amener le sous nageant ($d = 1,063$) à $d = 1,21$ par addition de KBr solide (23,62 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant (HDL totales) et le diluer de moitié avec la solution $d = 1,21$.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant. Dialyser contre du PBS + EDTA pH 7,4. Mesurer le volume. Doser les protéines.

Passage d'un plasma d'une densité d_1 à une densité d_2 ($d_2 < d_1$)

$$V \text{ solution diluante} = \frac{V \text{ solution } (d \text{ voulue} - d \text{ solution})}{d \text{ sol. diluante} - d \text{ voulue}}$$

FICHE TECHNIQUE N° 6

PREPARATION DES HDL₂ (d = 1,063 - 1,125)

- Ajuster le plasma à 1,063 par addition de KBr solide (8,53 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Prélever le sous nageant. Le diluer de moitié avec la solution à d = 1,063.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Amener le sous nageant (d = 1,063) à d = 1,125 par addition de KBr solide (8,76 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant (HDL₂) et le diluer de moitié avec la solution d = 1,125.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant. Dialyser contre du PBS + EDTA 0,1 g/l pH 7,4.
Mesurer le volume. Doser les protéines.

FICHE TECHNIQUE N° 7

PREPARATION DES HDL₃ (d = 1,125 - 1,21)

- Ajuster le plasma à 1,125 par addition de KBr solide (17,52 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Prélever le sous nageant. Le diluer de moitié avec la solution à d = 1,125.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Eliminer le surnageant. Amener le sous neageant (d = 1,125) à d = 1,21 par addition de KBr solide (14,46 g/100 ml).
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant (HDL₃) et le diluer de moitié avec la solution d = 1,21.
Centrifuger 24 heures à 40 000 trs/mn à 4°C.
- Prélever le surnageant. Dialyser contre du PBS + EDTA 0,1 g/l pH 7,4.
Mesurer le volume. Doser les protéines.

FICHE TECHNIQUE N° 8

PREPARATION DU CONJUGUE ANTICORPS MARQUE A LA PEROXYDASE

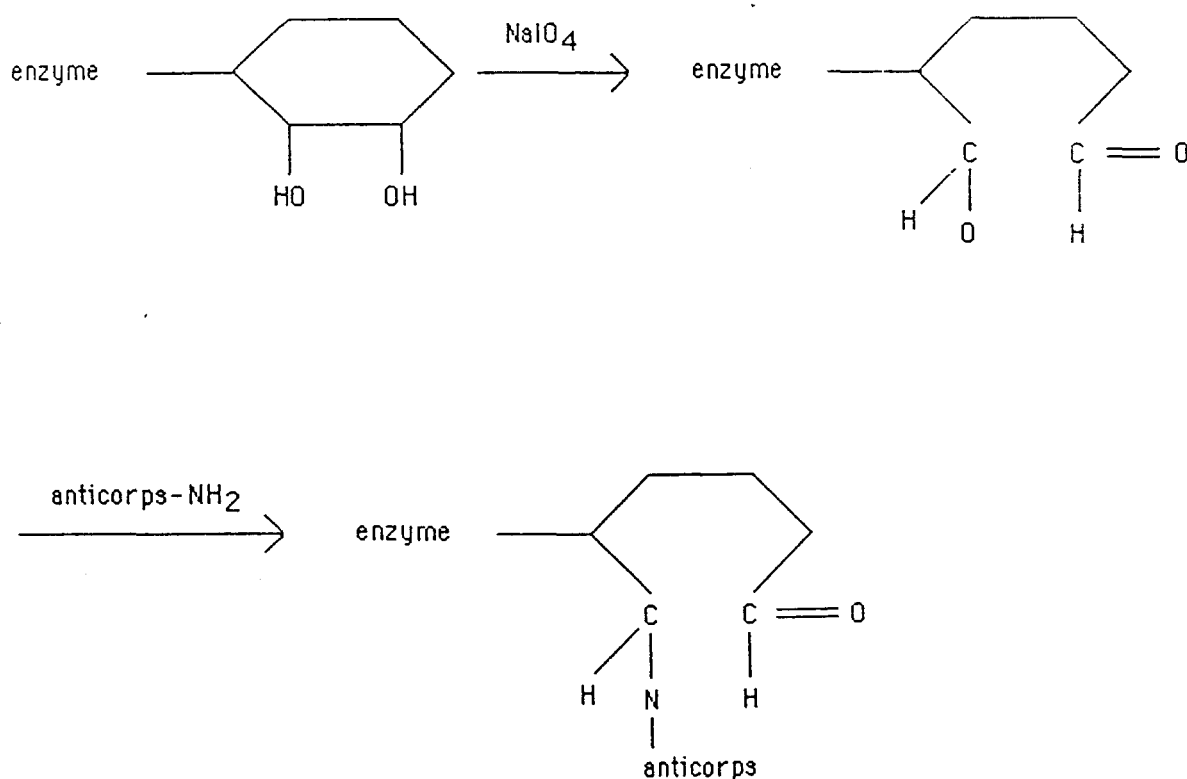
REFERENCE :

Nakane P. and Kawaoi A., J. Histochem. Cytochem., 1974, 22, 1084-1091.

PRINCIPE :

La méthode de Nakane fait appel à l'oxydation par le périodate de sodium des groupements alpha - diol de la peroxydase. Les fonctions aldéhydiques formées peuvent se conjuguer avec les groupements aminés des anticorps purs.

Le schéma réactionnel est le suivant :



REACTIFS :

- Péroxydase de raifort (EC . 1 . 11 . 17) Boehringer
- Tampons :
 - PO_4NaH_2 0,1 M pH 6,8
 - Bicarbonate de sodium 0,3 M pH 8,1
 - Solution 2-4 dinitrofluorobenzène à 0,1 g/l dans l'éthanol
 - Périodate de sodium 0,08 M
 - Glycérol bidistillé
 - Carbonate-bicarbonate 0,01 M pH 9,5
 - PBS 0,1 M pH 7,4

TECHNIQUE :

Dissoudre 5 mg de peroxydase dans du tampon phosphate 0,1 M pH 6,8.

Ajouter 1 ml de bicarbonate de sodium 0,3 M et 0,1 ml de dinitrofluorobenzène. Agiter pendant 2 heures à température ambiante.

Ajouter 1 ml de NaIO_4 .

Incuber 1 h 30.

Arrêter la réaction par 0,2 ml de glycérol bidistillé.

Dialyser à 4°C contre le tampon carbonate-bicarbonate pH 9,5.

Ajouter 10 mg d'anticorps purs préalablement dialysés contre le tampon carbonate-bicarbonate et laisser 3 h à température ambiante.

Dialyser à 4°C pendant une nuit contre du PBS.

En fin de dialyse, le conjugué est dilué au demi avec du glycérol bidistillé et stocké à - 20°C.

La peroxydase étant sensible à la lumière et à certains détergents, toute la manipulation doit être effectuée avec de la vaisselle traitée au sulfochrome et entourée de papier aluminium.

FICHE TECHNIQUE N° 9

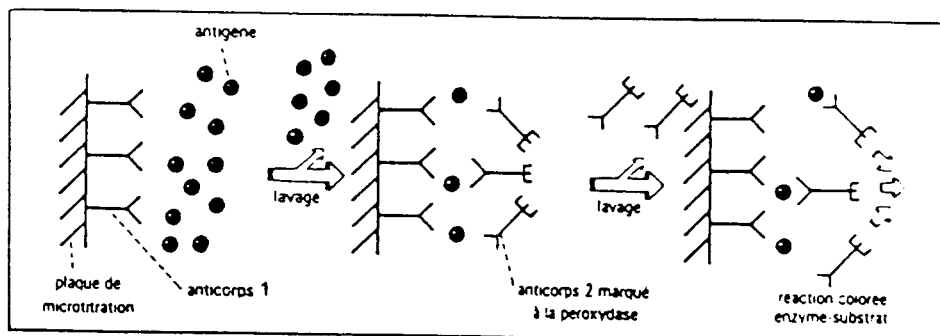
DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DES APOLIPOPROTEINES (méthode sandwich)

REFERENCES :

Fiévet C., Demarquilly C. and Luyeye I., Utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux pour le dépistage de l'athérosclérose. Intérêt de nouveaux marqueurs. Ann. Biol. Clin., 1985, 43, 463-499.

PRINCIPE :

Les apolipoprotéines AI, AII, AIV, CIII et E sont dosées par une méthode immunoenzymatique non compétitive, de type "Sandwich", applicable avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Le principe et les différentes étapes de ce dosage sont représentés par la figure ci-dessous :

MATERIELS :

- Appareil Bhering ELISA processor : capacité de laver, distribuer, lire et possibilité de connexion sur ordinateur pour effectuer les calculs et faciliter l'obtention automatique de la courbe d'étalonnage
- Phase solide : plaques Costar Serocluster contenant 96 alvéoles

- Tampon PBS 0,1 M pH 7,4 :
 - Phosphate disodique ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O) 27 g
 - Phosphate monosodique (PO_4NaH_2 , 2 H_2O) 4 g
 - NaCl 8 g
 - Eau distillée qsp 1 l
- Tampon PBS albumineux :
 - Albumine à 1 % dans le PBS
 - (tampon de dilution de l'antigène et du conjugué)
- Substrat enzymatique :
 - Tampon phosphate-citrate pH 5,5 :
 - Phosphate disodique 0,1 M 500 ml
 - Citrate 200 ml
 - Ortho-phényl diamine (OPD) :
 - 0,0375 g dans 12,5 ml de tampon phosphate-citrate
 - Eau oxygénée (H_2O_2) :
 - 8 μl dans 12,5 ml de tampon phosphate-citrate

METHODE :

100 μl de la solution d'anticorps à 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration puis incubés 1 nuit à température ambiante.

Lavage (4 fois) PBS —
 Dépôt de l'antigène 100 μl de la solution d'antigène dans du
 PBS-SAB
 Lavage (4 fois) PBS
 Conjugué 100 μl de la solution d'anticorps marqués
 à la peroxydase
 Lavage (4 fois) PBS
 Substrat 100 μl
 Arrêt de la réaction 100 μl de HCl 1 N

La mesure de la DO est effectuée à 492 nm.

FICHE TECHNIQUE N° 10

ELECTROPHORESE EN GRADIENT DE POLYACRYLAMIDE ET EN PRESENCE DE SDS

PRINCIPE :

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate 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.

TECHNIQUE:

A = 36,3 g Tris-HCl qsp 100 ml H₂O pH 8,9

B = 48 g acrylamide + 1,28 g bisacrylamide qsp 100 ml H₂O

C = 10 g SDS + 90 ml H₂O

D = 0,5 g de persulfate d'ammonium + 4,5 ml H₂O (A préparer extemporanément)

E = 39,4 g Tris + 2 g SDS qsp 1 litre H₂O pH 6,8

Tampon de migration pH 8,3 :

Tris 15,15 g

Glycine 72 g

SDS 5 g

H₂O qsp 5 litres

	Gel 5 %	Gel 19 %	Gel 3,3 %
A	10	10	0
B	4	16	3
H ₂ O	26	4	15
Glycérol	0	10	0
C	0,4	0,4	0
E	0	0	20
Dégazer			
TEMED	0,012	0,012	0,06
D	0,12	0,12	0,3

Un gel (18 x 16 x 0,15 cm) est coulé de la manière suivante :

- gel inférieur, gradient linéaire 5 —> 19 %
- gel supérieur à 3,3 %

Conditions électriques :

- 30 mA/plaque; 10°C; 5 heures
- ou
- 10 mA/plaque; 10°C ; 1 nuit

Colorant :

250 ml méthanol
250 ml H₂O
50 ml acide acétique
0,85 g de bleu de Coomssie G250
Filtrer

Décolorant :

250 ml méthanol
100 ml acide acétique
450 ml H₂O

Colorer 1/2 heure, décolorer au moins 24 heures

FICHE TECHNIQUE N° 11

IMMUNOELECTROTRANSFERT

a) TRANSFERT :

- Tampon de transfert : (Tris 0,025 M, Glycine 0,192 M)
 - Tris : 15,15 g
 - Glycine : 72 g
 - qsp 5 litres
- Méthanol : 1 litre

Transférer le gel avec des gants, sans faire de bulles, de la façon suivante :

+

- 1 - grille
- 2 - éponge
- 3 - papier Whatman n° 3 imbibé de Tp de transfert
- 4 - nitrocellulose 0,45 μ m
- 5 - gel
- 6 - papier Whatman n° 3 imbibé de Tp de transfert
- 7 - éponge
- 8 - grille

-

Migration 30 mn à 50 V puis 90 mn à 100 V à 4°C.

b) BLOT :

- Tampon de lavage = Tp B
 - Tris : 12,144 g
 - NaCl = 10,52 g
 - qsp H₂O 2 litre pH 8,0
- Tampon de saturation = Tp B + 10 % de lait écrémé = Tp A

(Lait écrémé en poudre pour la microbiologie, Merck)

Laisser la feuille de nitrocellulose 1 heure dans le Tp A.

Ajouter le 1er anticorps = 10 µg/ml.

Incuber - 1 nuit à 4°C (avec les anticorps monoclonaux)

- 1 heure à T° ambiante (avec les anticorps polyclonaux)

Laver 3 fois 15 mn avec le Tp B.

Ajouter le 2ème anticorps = IgG marqué à la peroxydase au 1/500e dans le Tp A.

Incuber 1 heure à température ambiante.

Laver 3 fois avec le Tp B.

c) REVELATION :

- Tampon de révélation :

- 1 ml de 4-chloro 1-naphtol 0,45 g/25 ml méthanol

- 100 ml Tp B pH 6,5

- 50 µl H₂O₂ à 30 % en volume

Arrêt de la réaction avec de l'eau distillée.

FICHE TECHNIQUE N° 12

DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDESREFERENCE :

Lowry R.R. and Tinsley I.J., A simple sensitive method for lipid phosphorous. Lipids, 1974, 9, 491-492.

PRINCIPE :

Dosage de phosphore après minéralisation des phospholipides.

REACTIFS :

- Acide perchlorique à 70 %
- Acide nitrique concentré
- Acétate de butyle
- Solution chromogène :
 - Molybdate d'ammonium 29,2 g
 - Acide chlorhydrique concentré 100 ml

Après dissolution complète, ajouter 400 ml d'eau pour préparations injectables.

La solution est stockée à + 4°C.

Il faut la préparer la veille de son utilisation.

Elle est valable 3 mois.

- Etalon :
 - Phosphate monopotassique 17,5 mg
 - Eau pour préparation injectable 10 ml

(Etalon contenant 4 de phosphore minéral dans 10 µl)

TECHNIQUE :

Après fractionnement par chromatographie sur couche mince, les portions de gel correspondant aux phospholipides sont grattées et récupérées dans des tubes à minéraliser. Après addition d'1 ml

d'acide perchlorique à 70 % et de 2 gouttes d'acide nitrique concentré, les tubes munis de réfrigérants sont portés au thermobloc à 2000°C pendant 45 minutes. Il faut ensuite laisser refroidir les tubes pendant 15 minutes avant d'ajouter dans chacun d'eux 3,6 ml d'eau pour préparation injectable. Les tubes sont alors centrifugés 10 minutes à 3000 tours/min. pour éliminer le gel de silice.

On reprend 3 ml du surnageant auquel on ajoute 7 ml d'eau pour préparation injectable et 1 ml de solution chromogène. On agite 20 secondes au Vortex avant d'ajouter 5 ml d'acétate de butyle. On agite de nouveau 30 secondes.

Une centrifugation à froid et à 3000 tours/min. pendant 5 minutes permet de récupérer la phase supérieure dont la densité optique est lue à 310 nm.

N.B. Il faut prendre la précaution d'utiliser de la vaisselle lavée au mélange sulfochromique et soigneusement rincée.

Le tube "blanc" et le tube "étalon" doivent contenir la même quantité de gel de silice que les fractions de phospholipides.

FICHE TECHNIQUE N° 13

EXTRACTION DES LIPIDESREFERENCES :

Folch J. et coll., J. Biol. Chem., 1957, 226, 497-509

PRINCIPE :

Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau, agitation et déphase, la phase hydro-alcoolique supérieure renferme les substances hydrosolubles tandis que la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux.

REACTIFS :

- Solvant d'extraction chloroforme/méthanol (2/1 - v/v)
- Solution de NaCl à 7,5 g/l
- Liquide de lavage :
 - Chloroforme 8 volumes
 - Méthanol 4 volumes
 - Eau 3 volumes

Après agitation, transvaser le mélange dans une ampoule à décanter. Laisser reposer 1 heure et récupérer la phase supérieure. Mesurer le volume de la phase supérieure et ajouter du NaCl à raison de 2,9 g pour 1000 ml. Agiter jusqu'à dissolution complète.

TECHNIQUE :

Environ 500 µl de particules (500 µg/ml) sont homogénéisées dans 4 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2/1 (V/V).

Ajouter 1 ml de solution de NaCl à 7,5 g/l et agiter vigoureusement pendant 1 minute.

Abandonner quelques heures à température ambiante pour permettre le déphasage. Siphonner la phase hydro-alcoolique et laver trois fois la phase chloroformique avec le liquide de lavage.

Après évaporation sous azote, les extraits lipidiques sont conservés à -20°C dans le chloroforme et sous azote.

FICHE TECHNIQUE N° 14

**ANALYSE DES ACIDES GRAS DES DIFFERENTES CLASSES
DE LIPIDES DES PARTICULES LIPOPROTEIQUES****PRINCIPE :**

Après extraction des lipides totaux, les phospholipides, les esters de cholestérol et les triglycérides sont séparés par chromatographie sur couche mince et soumis ensuite à une transméthylation.

TECHNIQUE :

Les lipides des lipoprotéines sont extraits par la méthode de Folch. Après extraction, la phase chloroformique est séchée sous azote, puis reprise par 50 µl de chloroforme/méthanol (2/1 - v/v) et déposée sur couche mince de gel de silice. Après chromatographie dans le solvant éther de pétrole/éther éthylique/acide acétique (90/20/5), les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides sont révélés par pulvérisation à la Rhodamine 6 G et extraits du gel de silice. Chaque classe de lipide est soumise à une transméthylation en vue de l'analyse en phase gazeuse de leurs acides gras.

Transméthylation :

Les lipides (esters de cholestérol, triglycérides, phospholipides) sont repris par 3 ml de méthanol additionnés de 10 gouttes d'acide sulfurique concentré.

La transméthylation se déroule à 70°C pendant 2 heures. Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transvasés dans une ampoule à décanter en présence de 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure est filtrée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée.

FICHE TECHNIQUE N° 15

PREPARATION DES PROTEOLIPOSOMESREFERENCE :

Chen C.H. and Albers J.J., Characterisation of proteoliposomes containing apo-AI : a new substrate for the measurement of LCAT. J. Lipid Res., 1982, 23, 680-691.

REACTIFS :

- Lipobuffer :
Tris 10 mM - NaCl 140 mM - EDTA 1 mM
1,2114 g + 8,1816 g + 0,3722 g qsp H₂O 1000 ml pH 7,4
- Cholestérol :
10,8 µCi C¹⁴
- Cholestérol :
1 mg/ml dans du chloroforme ou de l'éthanol.
- Phosphatidyl-choline 20 mg/ml dans du chloroforme ou de l'éthanol.
- Cholate de sodium :
Acide cholique 725 mM = 312 mg/ml de lipobuffer.
- Apo-AI :
880 µg = x µl

TECHNIQUE :

Pour 4 ml de protéoliposome. 40 pts.

Dans un petit flacon en verre à fond plat :

Cholestérol ¹⁴10,8 µCi 108µl Evaporer sous N₂. Faire un film homogène

Cholestérol 1 mg/ml 116 µl

Lécithine 20 mg/ml 385 µl

Evaporer le tout sous N₂.

Ajouter :

Lipobuffer	2,5 ml
Apo-AI	880 µg
Cholate de Na	300 µl

Le volume final doit être de 3 ml avant la dialyse.

Vortexer très vigoureusement pendant 1 min.

Mettre au bain-marie à 24°C sous agitation forte.

Dialyser dans le lipobuffer au moins 24 heures (élimination du cholate de Na).

Ajuster à 4 ml avec du lipobuffer après la dialyse.

FICHE TECHNIQUE N° 16

MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LCAT

Lécithine Cholestérol Acyl Transférase

PRINCIPE :

L'activité de la LCAT est déterminée en mesurant la conversion de ^{14}C -cholestérol en ^{14}C -ester de cholestérol après incubation de l'échantillon étudié avec un substrat constitué de phospholipides, de ^{14}C -cholestérol et d'apolipoprotéine AI. Après incubation les esters de cholestérol sont séparés par chromatographie en couche mince.

REACTIFS :

- Lipobuffer :
Tris 10 mM - NaCl 140 mM - EDTA 1 mM
1,2114 g + 8,1816 g + 0,3722 g qsp 1000 ml pH 7,4
- Solution stock de HSA :
Prendre de préférence de la HSA pauvre en AG ou de la BSA pauvre en AG.
2 g BSA pauvre en AG dans 100 ml de lipobuffer. (congeler en fraction de 4,5 ml).
- Mercapto éthanol 100 mM :
40 μl Mercapto éthanol dans 9,96 ml H_2O .
- Cholestérol :
10 mg de cholestérol par ml de chloroforme. (conserver au congélateur).
- Cholestérol estérifié :
10 mg de cholestérol estérifié (oléate) par ml de chloroforme. (congélateur).
- Carrier :
Chloroforme/Méthanol 1/2
+ 3 μvol de cholestérol 10 mg/ml
+ 3 μvol de cholestérol estérifié 10 mg/ml.

TECHNIQUE :

Dans un tube à hémolyse en verre, mettre :

200 µl lipobuffer

200 µl BSA 2 %

100 µl protéoliposome VORTEX BM 37°C pendant 20 min.

+ 20 µl mercapto éthanol

+ 15 µl plasma VORTEX BM 37°C pendant 30 min.

arrêt de la réaction par addition de 1,5 ml de solution Carrier.

- 1ère extraction :

Vortex, BM 37°C 30 min. Centrifuger 10 min. 3000 rpm.

Prélever le surnageant et le transférer dans un grand tube en verre à vis.

- 2ème extraction :

Dans le tube à hémolyse en verre, reprendre le culot par 1,5 ml de la solution carrier.

Vortex, BM 37°C 30 min. Centrifuger 10 min. 3000 rpm.

Prélever le surnageant et le transférer dans le grand tube en verre à vis.

Aux surnageants, ajouter 3 ml de chloroforme.

1,1 ml d'H₂O

Vortex doux, centrifuger 5 min. à 500 rpm.

Enlever la phase aqueuse à la trompe à vide.

Evaporer la phase organique.

Reprendre par 500 µl de chloroforme. Vortex (pour rincer les parois).

Réévaporer.

- Dépôt et migration :

Reprendre le culot par 40 µl de chloroforme et les déposer en une bande de 2 cm.

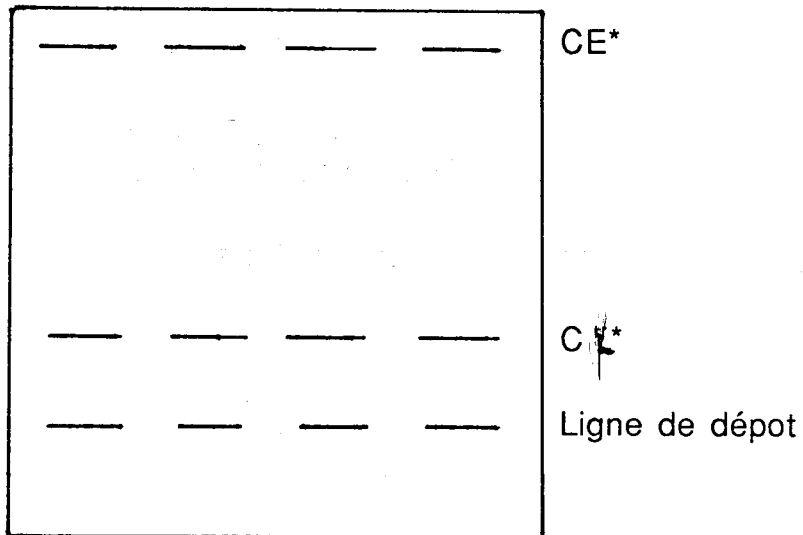
Faire migrer dans le mélange : éther de pétrole 230 ml

diéthyl éther 60 ml

acide acétique 3 ml

Laisser sécher et révéler à l'iode, repérer les tâches au crayon.
 Découper la plaque et mettre les morceaux dans 5 ml de lipofluor.
 Comptage du ^{14}C .

$[\text{CE}/(\text{C L} + \text{CE}) \times 100] = \% \text{ estérification.}$



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Gofman J.W., De Lalla O., Glazier F., Freeman N.K., Lindgren F.T., Nichols A.V., Strisower B. and Tamplin A.R., Atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma*, 1954, 2, 413-484.
- 2 - Anderson D.W., Nichols A.V., Forte T.M., and Lindgren F.T., Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 493, 55-68.
- 3 - Assman G. and Schriewer H. Role of low-density and high-density lipoproteins in atherogenesis. *Nutr. Metab.*, 1980, 24, suppl. 1,1.
- 4 - Laggner P., Stablinger H. and Kostner G.M., Separation of subclasses of human serum high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation. *Prep. Biochem.*, 1977, 7, 33-43.
- 5 - Patsch W., Schonfeld G., Gotto A.M. and Patsch, Characterization of human high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3178-3185.
- 6 - Curtiss L.K. and Edgington T.S., Immunochemical heterogeneity of human plasma high density lipoproteins. Identification with apolipoprotein AI and AII specific monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 2982-2993.
- 7 - Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B. and Dawber T.R., High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study. *Am. J. Med.*, 1977, 62, 707-714.
- 8 - Barboriak J.J., Anderson A.J., Rimm A.A. and King J.F., High density lipoprotein cholesterol and coronary occlusion. *Metabolism*, 1979, 28, 735-741.
- 9 - Eisenberg S., High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1017-1058.
- 10 - Vergani C. and Bettale G., Familial hypo-alpha-lipoproteinaemia. *Clin. Chem. Acta.*, 1981, 114, 45-52.
- 11 - Gofman J.W., Young W. and Tandy R., Ischemic heart disease, atherosclerosis and longevity. *Circulation*, 1966, 34, 679-697.
- 12 - Avogaro P., Bittolo Bon G., Cazzolato G., Quinci G.B. and Belussi F., Plasma levels of apolipoprotein AI and apolipoprotein B in human atherosclerosis. *Artery*, 1978, 4, 385-394.
- 13 - Miller N.E., Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Amer. Heart J.*, 1987, 113, 589-597.

- 14 - Robinson G., Ferns G.A.A., Bevan E.A., Stocks J., Williams P.T. and Galton D.J., High density lipoprotein subfractions and coronary risk factors in normal men. *Atherosclerosis*, 1987, 7, 341-346.
- 15 - Maciejko J.J., Holmes D.R., Kottke B.A., Zinmeister A.R., Dinh D.M. and Mao S.J.T., Apolipoprotein AI as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 1983, 309, 385-389.
- 16 - Franzen J. and Fex F., Low serum apolipoprotein AI in acute myocardial infarction survivors with normal HDL cholesterol. *Atherosclerosis*, 1986, 59, 37-42.
- 17 - Riesen W.F., Mordasini R., Salzmann C., Theler A. and Gurtner H.P., Apoproteins and lipids as discriminators of severity of coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 1980, 37, 157-162.
- 18 - Wielund O., Fager G., Olofsson S.O., Wilhelmsson C. and Bondjers G. Serum apolipoprotein levels in relation to acute myocardial infarction and its risk factors. *Atherosclerosis*, 1980, 37, 631-636.
- 19 - Kladetzky R.G., Assman G., Walgenbach S., Tauchert P. and Helb H.D., Lipoprotein and apoprotein values in coronary angiography patients. *Artery*, 1980, 7, 191-205.
- 20 - Kora I., Vanhoutte G., Parra H., Bermann M.C., Cachera C., Clavey V., Puchois P. and Fruchart J.C., Dosage de l'apolipoprotéine AII sérique par électroimmunodiffusion sur plaques prêtes à l'emploi, *Ann. Biol. Clin.*, 1984, 42, 349-353.
- 21 - Puchois P., Fontan M., Gentilini J.L., Gelez P. and Fruchart J.C., Serum apolipoprotein AII, a biochemical indicator of alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, 1984, 185, 185-189.
- 22 - Danielsson B., Ekman R., Fex G., Johansson B.G., Kristensson H., Nilssonehle P. and Wadstein J., Changes in plasma high density lipoproteins in chronic male alcoholics during and after abuse. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1978, 38, 113-119.
- 23 - Hamilton R.L., Williams M.C., Fielding C.J. and Ravel R.J., Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 1976, 58, 667-680.
- 24 - Green P.H.R., Tall A.R. and Glickman R.M., Rat intestine secretes discoid high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 1978, 61, 528-534.
- 25 - Marsh J.B., Apoproteins of the lipoproteins in a nonrecirculating perfusate of rat liver. *J. Lipid Res.*, 1976, 17, 85-90.

- 26 - Driscoll D.M. and Getz G.S., Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1368-1379.
- 27 - Green P.H.R. and Glickman R.M., Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 1153-1173.
- 28 - Castro G.R. and Fielding C.J., Early incorporation of cell derived cholesterol into pre- β migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*, 1988, 27, 25-29.
- 29 - Tall A.R. and Small D.M., Body cholesterol removal : role of plasma high density lipoproteins. *Adv. Lipid. Res.*, 1980, 17, 1-51.
- 30 - Norum K., Glomset J.A. and Nichols A.V., Plasma lipoprotein in familial lecithin : cholesterol acyltransferase deficiency : effects of incubation with lecithin:cholesterol acyltransferase in vitro. *Scand. J. Lab. Clin. Invest.*, 1975, (Suppl. 142), 35, 31-55.
- 31 - Tall A.R., Blum C.B., Forester G.P. and Nelson C.A., Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 198-207.
- 32 - Blue M.L., Williams D.L., Zucker S., Khan S.A. and Blum C.B., Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 283-287.
- 33 - Basu S.K., Brown M.S., Ho Y.K., Havel R.J. and Goldstein J.L., Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 7545-7549.
- 34 - Atkinson D., Tall A.R., Small D.M. and Mahley R.W., The structural organization of the lipoprotein HDLc from atherosclerotic swine : structural features relating the particle surface and core. *Biochemistry*, 1978, 78, 3930-3933.
- 35 - Mahley R.W. and Weisgraber K.H., Subfractionation of high density lipoproteins into two metabolically distinct subclasses by heparin affinity chromatography and Geon-Pevikon electrophoresis. In : Report of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop. Edited by K.L. Lippel, NIH Publication, National Heart, Lung and Blood Institute, Lipid Metabolism Branch, Washington DC., 1979, 1161, No. 79, 356-366.
- 36 - Tall A.R., Atkinson D., Small D.M. and Mahley R.W., Characterization of the lipoprotein of atherosclerotic swine. *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 7288-7293.
- 37 - Pittman R.C. and Steinberg D., Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1577-1585.

- 38 - Brown M.S. and Goldstein J.L., A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, 232, 34-47.
- 39 - Fruchart J.C. and Broutain-Hanaire H., Les interactions lipoprotéines/cellules : les récepteurs des lipoprotéines. Les entretiens du CARLA, 1986, tome VI, 139-157.
- 40 - Barton Duell F., Oram J.F. and Bierman E, Apolipoprotein AI stimulates high density lipoprotein (HDL) receptor-mediated sterol translocation. *Circulation*, 1988, 78 (4), 159.
- 41 - Oram J.F., Albers J.J., Cheung M.C. and Biernan E.L., The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 8348-8358.
- 42 - Glomset J.A. and Norum K.R., The metabolic role of lecithin cholesterol acyltransferase : perspectives from pathology. *Adv. Lipid Res.*, 1983, 11, 1-65.
- 43 - Morton R.E. and Zilversmit D.B., Purification and characterization of lipid transfer protein from human lipoprotein deficient plasma. *J. Lipid Res.*, 1982, 23, 1058-1063.
- 44 - Perret B., Collet X., Parinaud J., Chap H. and Douste-Blazy L., Disposal of HDL-cholesterol to cultured granulosa cells, endothelial cells and hepatocytes : effects of HDL-phospholipolysis, 3rd Coll. of the Fondation pour la Recherche sur l'Athérosclérose, Brussels, March 12-14, 1986.
- 45 - Rothblat G.H., Abogast L.Y. and Ray E.K., Stimulation of esterified cholesterol accumulation in tissue culture cells exposed to high density lipoproteins enriched in free cholesterol. *J. Lipid Res.*, 1978, 19, 350-358.
- 46 - Arbogast L.Y., Rothblat G.H., Leslie M.H. and Cooper R.A., Cellular cholesterol ester accumulation induced by free cholesterol rich lipid dispersion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 3680-3684.
- 47 - Puchois P., Alaupovic P. and Fruchart J.C., Mise au point sur les classifications des lipoprotéines. *Ann. Biol. Clin.*, 1985, 43, 831.
- 48 - Alaupovic P., The concepts, classification systems and nomenclatures of human plasma lipoproteins. In : Lewis L.A., Oppllt J.J., *CRC Handbook of Electrophoresis, Lipoproteins : basic principles and concepts*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1980, 27-46.
- 49 - Osborne J.C. and Brewer H.B., The plasma lipoproteins. *Adv. Prot. Chem.*, 1977, 31, 253-337.
- 50 - Alaupovic P., The role of apolipoproteins in lipid transport processes. *La Ricerca Clin. Lab.*, 1982, 12, 3-21.

- 51 - Gidez L.I., Miller G., Burstein M., Slagle S. and Eder H.A., Separation and quantification of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure. *J. Lipid Res.*, 1982, 23, 1206-1223.
- 52 - Johnson P., Muirhead R.A. and Deegan T., Loss of A apoprotein immunoreactivity during high density lipoprotein separation. *Ann. Clin. Biochem.*, 1981, 18, 308-313.
- 53 - Kunitake S.T. and Kane J.B., Factors affecting the integrity of high density lipoproteins in the ultracentrifuge. *J. Lipid Res.*, 1982, 23, 936-940.
- 54 - Castro G.R. and Fielding C.J., Evidence for the distribution of apolipoprotein E between lipoprotein classes in human normocholesterolemic plasma and for the origin of unassociated apolipoprotein E (Lp E). *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 58-67.
- 55 - Mc Vicar J.P., Kunitake S.T., Hamilton R.L. and Kane J.P., Characteristics of human lipoproteins isolated by selected-affinity immunosorption of apolipoprotein AI. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1356-1360.
- 56 - Cheung M.C. and Albers J.J., The measurement of apolipoprotein AI and AII levels in men and women by immunoassay. *J. Clin. Invest.*, 1977, 60, 43-50.
- 57 - Kostner G.M., Patsch J.R., Sailer S., Braunsteiner H. and Holasek A., Polypeptide distribution of the main lipoprotein density classes separated from human plasma by rate zonal ultracentrifugation. *Eur. J. Biochem.*, 1974, 45, 611-621.
- 58 - Cheung M.C. and Albers J.J., Distribution of cholesterol and apolipoprotein AI and AII in human high density lipoprotein subfractions separated by CsCl equilibrium gradient centrifugation : evidence for HDL subpopulations with differing AI/AII molar ratios. *J. Lipid Res.*, 1979, 20, 200-207.
- 59 - Borut T.C. and Aladjem F., Immunochemical heterogeneity of human high density serum lipoproteins. *Immunochemistry*, 1971, 8, 851-63.
- 60 - Albers J.J. and Aladjem F., Precipitation of ¹²⁵I-labeled lipoproteins with specific polypeptide antisera. Evidence for two populations with differing polypeptide compositions in human high density lipoproteins. *Biochemistry*, 1971, 10, 3436-42.
- 61 - Patsch W., Schonfeld G., Gotto A.M. Jr. and Patsch J.R., Characterization of human high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3178-3185.
- 62 - Børresen A.L. and Berg K., Presence of "free" apo AI in

- serum : implications for immunological quantification of HDL and its apoproteins. *Artery*, 1980, 7, 139-160.
- 63 - Schonfeld G., Balley A. and Steelman R., Plasma apolipoprotein AI and AII levels in hyperlipidemia. *Lipids*, 13, 951-959.
 - 64 - Norfeldt P.I.P., Olofsson S., Fager G. and Bondjers G., Isolation and partial characterization of the lipoprotein families A and AI from high density lipoproteins of human serum. *Eur. J. Biochem.*, 1981, 118, 1-8.
 - 65 - Nestruck C.A., Niedmann P.O. Wieland H. and Seidel D., Chromatofocusing of human high density lipoproteins and isolation of lipoproteins A and AI. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 753, 65-73.
 - 66 - Cheung M.C. and Albers J.J., Characterization of lipoprotein particules isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing AI and AII particles containing AI but no AII. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 19, 12201-12209.
 - 67 - Engvall E., and Perlmann P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunchmistry*, 1971, 8, 871-874.
 - 68 - Engvall E., Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzymol.*, 1980, 36, 67-74.
 - 69 - Fruchart J.C., Desreumaux C., Dewailly P. et coll., Enzyme immunoassay for human apolipoprotein B, the major protein moiety in low density and very low density lipoprotein. *Clin. Chem.*, 1978, 24, 455-460.
 - 70 - Kunitake S.T., La Sala K.J. and Kane J.P., Apolipoprotein AI containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J. Lipid Res.*, 1985, 26, 549-555.
 - 71 - Chen C., Applegate K., King W.C., Glomset A., Norum K.R. and Gjone E., A study of the small spherical high density lipoproteins of patients affected with familial lecithin : cholesterol acyltransferase deficiency. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 269-282.
 - 72 - Fielding C.J. and Fielding P.E., Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin : cholesterol acyl transferase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 3911-3914.
 - 73 - Atmeh R.F., Shepherd J. and Packard C.J., Subpopulations of apolipoprotein AI in human high density lipoproteins. Their metabolic properties and responses to drug therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 751, 175-188.
 - 74 - Koren E., Puchois P., Alaupovic P., Fesmire J., Kandoussi

- A. and Fruchart J.C., Quantification of Two Different Types of Apolipoprotein AI Containing Lipoprotein Particles in Plasma by Enzyme-Linked Differential-Antibody Immunosorbent Assay. Clin. Chem., 1987, 33, 38-43.
- 75 - Cheung M.C. and Wolf A.C., Differential effect of ultracentrifugation on apolipoprotein AI containing lipoprotein subpopulations. J. Lipid Res., 1988, 29, 15-25.
- 76 - Cheung M.C., Nichols A.V., Blanche P.J., Gong E.L., Franceschini G. and Sirtori C.R., Characterization of A-I-containing lipoproteins in subjects with A-I Milano variant. Biochim. Biophys. Acta, 1988, 960, 73-82.
- 77 - Alaupovic P., Knight-Gibson C., Wang C.S., Downs D., Koren E., Brewer H.B. Jr. and Gregg R., Characterization of an apo-AII containing lipoprotein (Lp-AII:B Complex) isolated from very low and low density lipoproteins of human plasma. 8th International Symposium on Atherosclerosis, Rome, October 9-13, 1988.
- 78 - März W. and Groß W., Immunochemical evidence for the presence in human plasma of lipoproteins with apolipoprotein AII as the major protein constituent. Biochim. Biophys. Acta, 1988, 962, 155-158.
- 79 - Steinmetz A. and Utermann G., Activation of lecithin : cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein AIV. J. Biol. Chem., 1985, 260, 2258-2264.
- 80 - Chen C.H. and Albers J.J., Activation of lecithin : cholesterol acyl transferase by apolipoproteins E-2, E-3 and AIV isolated from human plasma. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 836, 279-285.
- 81 - James R.W., Hochstrasser D., Tissot J.D., Funk M., Appel R., Barja F., Pellegrini C. and Muller A.F., Protein heterogeneity of lipoprotein particles containing apolipoprotein AI without apolipoprotein AII and apolipoprotein AI with apolipoprotein AII isolated from human plasma. J. Lipid Res., 1988, 29, 1557-1571.
- 82 - Soutar A.K., Garner C.W. and Baker H.N., Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidyl-choline acyl donor on the activity of lecithin cholesterol acyl transferase. Biochemistry, 1975, 14, 3057-3064.
- 83 - Larosa J.C., Levy R.I., Herbert R.L. SE and Fredrickson D.S., A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 41, 57.
- 84 - Kostner G.M., Apolipoproteins and lipoproteins of human plasma : significance in health and in disease. Adv. Lipid. Res., 1983, 20, 1-43.
- 85 - Shelburne F., Hanks J., Myers W. and Quarfordt S., Effects of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions

in the rat. J. Clin. Invest., 1980, 65, 652-658.

- 86 - Kostner G. and Alaupovic P., Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Separation and quantification of the lipoprotein families occurring in the high density lipoproteins of human plasma. Biochemistry, 1972, 11, 3419-3428.
- 87 - Gibson J.C., Rubinstein A., Bukberg P.R. and Brown W.V., Discrete apo-E rich lipoproteins can be isolated by immunoaffinity chromatography. Arteriosclerosis, 1982, 2, 432a.
- 88 - Huff M.W., Fidge N.H., Nestel P.J., Billington T. and Watson B., Metabolism of C-apolipoproteins : kinetics of CII, CIII-1 and CIII-2 and VLDL-apolipoprotein B in normal and hyperlipoproteinemic subjects. J. Lipid Res., 1981, 22, 1236-1246.
- 89 - Ohta T., Hattori S., Murakami M., Nishiyama S. and Matsuda I., Age- and sex-related differences in lipoproteins containing apoprotein AI. Arteriosclerosis, 1989, 2, 90-95.
- 90 - Kostner G.M., Studies of the composition and structure of human serum lipoproteins. Isolation and partial characterization of apolipoprotein-AIII. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 336, 383-395.
- 91 - Fielding P.E. and Fielding C.J., A cholesterol ester transfer complex in human plasma. Proc. Natl Acad. Sci., 1980, 77, 3327-3330.
- 92 - Morton R.E. and Zilversnit D.B., The separation of apo-D from cholesteryl ester transfer protein. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 530, 350-355.
- 93 - Blue M.L., Williams D.L., Zucker S., Khan S.A. and Blum C.B., Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1983, 80, 283.
- 94 - Basu S.K., Ho Y.K., Brown M.S., Bilheimer D.W., Anderson R.G. and Goldstein J.L., Biochemical and genetic studies of apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. J. Biol. Chem. 1982, 257, 9788.
- 95 - Rall S.C. Jr., Weisgraber K.H. and Mahley R.W., Human apolipoprotein E. The complete aminoacid sequence. J. Biol. Chem., 1982, 257, 4171-4178.
- 96 - Müller H.W., Gebicke H.P.J., Hangen D.H. and Shooler E.M., A specific 37 000 dalton protein that accumulates in regenerating but not in non regenerating mammalian nerves. Science, 1985, 228, 499.
- 97 - Snipes G.J., Mac Cuire C.B., Norden J.J. and Freeman J.A., Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by non neuronal cells. Proc. Natl Acad. sci. USA, 1986, 83,

1130.

- 98 - Skene J.H.P. and Shooter E.M., Denervated sheath cells secrete a new protein after nerve injury. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1983, 80, 4169.
- 99 - Ignatius M.J., Gebicke H.P.J., Skene J.H.P., Schilling J.W., Weisgraber K.H., Mahley R.W. and Shooter E.M., Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1125.
- 100 - Schaefer E.J., Disorders of lipoprotein metabolism associated with apolipoprotein deficiencies. In : Lippel K., Proceedings of the Workshop on apolipoprotein quantification, NIH Publications, 1983, No 83, 1266, 54-70.
- 101 - Davignon J., Richard E., Gregg and Sing C.F., Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis, 1988, 8, 1-21.
- 102 - Sing C.F. and Davignon I., Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am. J. Hum. Genet., 1985, 37, 268-285.
- 103 - Utermann G., Genetic polymorphism in apolipoprotein E. Impact on plasma lipoprotein metabolism. In : Crepaldi G., Tiengo A., Baggio G., eds. Diabetes, obesity and hyperlipidemias III. Amsterdam : Excerpta Medica, 1985, 1-28.
- 104 - Fielding C.J., Prohlich J., Moser K. and Fielding P.E., Promotion of sterol efflux and net transport by apolipoprotein E in lecithin cholesterol acyltransferase deficiency. Metabolism, 1982, 31, 1023-1028.
- 105 - Fielding C.J., Castro G.R., Donner C., Fielding P.E. and Reaven G.M., Distribution of apolipoprotein E in the plasma of insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetics and its relation to cholesterol net transport. J. Lipid Res., 1986, 27, 1052-1061.
- 106 - Weisgraber K.H. and Mahley R.W., Apoprotein (E-AII) complex of human plasma lipoproteins I. Characterization of this mixed disulfide and its identification in a high density lipoprotein subfraction. J. Biol. Chem., 1978, 253, 6281-6288.
- 107 - Koren E., Mc Conathy W.J. and Alaupovic P., Isolation and Characterization of Simple and Complex Lipoproteins Containing Apolipoprotein F from Human Plasma. Biochemistry, 1982, 21, 5347-5351.
- 108 - Van Tol A., Characterization and cellular binding of human HDL subclasses Lp-AI/Lp-AI:AI. European Lipoprotein Conference. 11th meeting, Monday 12 September to Thursday

15 September 1988.

- 109 - Fielding C.J., Shore V.G. and Fielding P.E., A protein cofactor of lecithin : cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 1493-1498.
- 110 - Rosseneu M., Tornout P.V., Caster H. and Lievens M.J., Displacement of apo-AI by AII in lipid apoprotein complex and human HDL. *Acat. cardiologica*, 1981, supp. XXVII, 11-29.
- 111 - Glomset J.A., The plasma lecithin : cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.*, 1968, 9, 155-167.
- 112 - Mac Lean J., Fielding C., Drayna D., Dieplinger H., Baer B., Kohr W. Henzel W. and Lawn R., Cloning and expression of human lecithin : cholesterol acyltransferase cDNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 2335-2339.
- 113 - Cheung M.C., Wolf A.C., Lum K.D., Tollefson J.H. and Albers J.J., Distribution and localization of lecithin : cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in AI containing lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 1986, 27, 1135-1144.
- 114 - Cheung M.C., Segrest J.P., Albers J.J., Cone J.T., Brouillette C.G., Chung B.H., Kashyap M., Glasscock M.A. and Anantharamaiah G.M., Characterization of high density lipoprotein subspecies : structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 913-928.
- 115 - Jarnagin A.S., Kohr W. and Fielding C., Isolation and specificity of a M_r 74,000 cholesteryl ester transfer protein from human plasma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1854-1857.
- 116 - Marcel Y.L., Vézina C., Emond D., Verdery R.B. and Milne R.W., High density lipoprotein subfractions isolated by heparin-Sepharose affinity chromatography and their role in cholesteryl ester transfer to very low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 1198-1205.
- 117 - Levy R.I. and Fredrickson D.S., Heterogeneity of plasma high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 1965, 4, 426-441.
- 118 - Ishida B.Y., Frolich J. and Fielding C.J., Prebeta-migrating high density lipoprotein : quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 778-786.
- 119 - Zech L., Schaefer E.J., Bronzert T.J., Aamodt R.L. and Brewer H.B., Metabolism of human apolipoprotein AI and AII : compartmental models. *J. Lipid Res.*, 1983, 24, 60-71.

- 120 - Puchois P., Kandoussi A., Fiévet P., Fourrier J.L., Bertrand M., Koren E. and Fruchart J.C., Apolipoprotein AI containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1987, 68, 35-40.
- 121 - Ritter M.C. and Scanu A.M., Structural changes in human serum high density lipoprotein-3 attending incubation with blood leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3763-3769.
- 122 - Kwok B.C.P., Dawson G. and Ritter M.C., Stimulation of glycolipid synthesis and exchange by human serum high density lipoprotein-3 in human fibroblasts and leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 92-98.
- 123 - Lagocki P.A. and Scanu A.M., In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3701-3706.
- 124 - Nichols A.V., Gong E.L., Blanche P.J., Forte T.M. and Shore V.G., Pathways in the formation of human plasma high density lipoprotein subpopulations containing apolipoprotein AI without apolipoprotein AII. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 719-732.
- 125 - Cheung M.C. and Wolf A.C., In vitro transformation of apo AI containing lipoprotein subpopulations : role of lecithin:cholesterol acyltransferase and apo B containing lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 1989, 30, 499-509.
- 126 - Van Tol A., Van't Hooft F.M., Van Gent T. and Dallinga-Thie G.M., HDL subfractions, HDL receptors and HDL turnover. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1987, 210, 15-21.
- 127 - Ohta T., Hattori S., Nishiyama S. and Matsuda I., Studies on the lipid and apolipoprotein compositions of two species of apo AI-containing lipoproteins in normolipidemic males and females. *J. Lipid Res.*, 1988, 29, 721-728.
- 128 - Luc G., Bard J.M., Parra H.J., Fruchart J.C. and Davignon J. High density lipoprotein particles in octogenarians (Soumis).
- 129 - Fruchart J.C., Lipoprotéines de haute densité (HDL) et transfert réverse du cholestérol. *Sang Thromboses Vaisseaux*, 1989, 1, 24-29..
- 130 - Swaney J.B., Reese H. and Eder H.A., Polypeptide composition of rat high density lipoprotein : characterisation by SDS-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 59, 513-519.
- 131 - Green P.H.R. and Glickman R.M., Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 1153-1173.
- 132 - Lefevre M. and Roheim P.S., Metabolism of apolipoprotein AIV. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1603-1610.

- 133 - Gordon J.I., Smith D.P., Alpers D.H. and Strauss A.W., Proteolytic processing of the primary translation product of rat intestinal apolipoprotein AIV mRNA. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 8418-8423.
- 134 - Gordon J.I., Smith D.P., Alpers D.H. and Strauss A.W., Cloning of a complementary desoxyribonucleic acid encoding a portion of rat intestinal preapolipoprotein AIV messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, 1982, 21, 5424-5431.
- 135 - Elshourbagy N.A., Walker D.W., Boguski M.S., Gordon J.I. and Taylor J.M., The nucleotide and derived amino acid sequence of human apolipoprotein AIV mRNA and the close linkage of its gene to the genes of apolipoproteins AI and CIII. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 1998-2002.
- 136 - Boguski M.S., Elshourbagy B., Taylor J.M. and Gordon J.I., Rat apolipoprotein AIV contains 13 tandem repetitions of a 22 aminoacid segment with amphipatic helical potential. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 5021-5025.
- 137 - Bisgaier C.L., Sachdev O.P., Megna L. and Glickman R.M., Distribution of apolipoprotein AIV in human plasma. *J. Lipid Res.*, 1985, 26, 11-25.
- 138 - Wu A.L. and Windmueller H.G., Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 7316-7322.
- 139 - Windmueller H.G. and Wu A.L., Biosynthesis of plasma apolipoproteins by rat small intestine without dietary or biliary fat. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 3012-3016.
- 140 - Ghiselli G., Brewer H.B. Jr. and Windmueller H.G., Apolipoprotein AI isoprotein synthesis by the perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 107, 144-149.
- 141 - Ghiselli G., Krishnan S., Beigel Y. and Gotto A.M. Jr., Plasma metabolism of apolipoprotein AIV in humans. *J. Lipid Res.*, 1986, 27, 813-827.
- 142 - Rosseneu M., Michiels G., De Keersgieter W., Bury J., De Slypere J.P., Dieplinger H. and Utermann G., Quantification of human apolipoprotein AIV by "Sandwich"-Type enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Chem.*, 1988, 34, No 4, 739-743.
- 143 - Utermann G. and Beisiegel U., Apolipoprotein AIV : a protein occuring in human mesenteric lymph chylomicrons and free in plasma : isolation and quantitation. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 99, 333-343.
- 144 - Kondo K., Allan C. and Fidge N. Quantitation of apolipoprotein AIV in human plasma using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Lipid Res.*, 1989, 30, 939.
- 145 - Ghiselli G., Schaefer E.J., Gascon P. and Brewer H.B. Jr,

Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science*, 1981, 214, 1239-1241.

- 146 - Nestel P.J., Fidge N.H. and Tan M.H. Increased lipoprotein-remnant formation in chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.*, 1982, 307, 329-333.
- 147 - Green P.M.R., Glickman R.M., Riley J.W. and Quinet E., Human apolipoprotein AIV : intestinal origin and distribution in plasma. *J. Clin. Invest.*, 1980, 65, 911-919.
- 148 - De Lamatre J.G., Hoffmeier C.A., Lacko A.G. and Roheim P.S., Distribution of apolipoprotein AIV between the lipoprotein and the lipoprotein-free fractions of rat plasma : possible role of lecithin cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.*, 1983, 24, 1578-1585.
- 149 - Ohta T., Fidge N.H. and Nestel P.J., Characterization of apolipoprotein AIV complex and apo-AIV isoforms in human lymph and plasma lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 14888-14893.
- 150 - De Lamatre J.G. and Roheim P.S., The response of apolipoprotein AIV to cholesterol feeding in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 751, 210-217.
- 151 - Fidge N.H., The redistribution and metabolism of iodinated apolipoprotein AIV in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 619, 129-141.
- 152 - Weinberg R.B. and Spector M.S., Lipoprotein affinity of human apolipoprotein AIV during cholesterol esterification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 135, 756-763.
- 153 - Bisgaier C.L., Sachdev O.P., Lee E.S., Williams K.J., Blum C.B. and Glickman R.M., Effect of lecithin : cholesterol acyltransferase on distribution of apolipoprotein AIV among lipoproteins of human plasma. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 693-705.
- 154 - Stein O., Stein Y., Lefevre M. and Roheim P.S., The role of apolipoprotein AIV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 878, 7-13.
- 155 - Boguski M.S., Elshourbagy N.A., Taylor J.M. and Gordon J.I., Comparative analysis of repeated sequences in rat apolipoproteins AI, AIV and E. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 992-996.
- 156 - Brewer H.B., Fairwell T., La Rue A., Ronan R., Houser A. and Bronzert T.J., The amino acid sequence of human apo-AI and apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 80, 623-630.

- 157 - Ghiselli G. Crump W.L. and Gotto A.M., Binding of apo-AIV - phospholipid complexes to plasma membranes of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 139, 122-128.
- 158 - Dvorin E., Gorder N.L., Benson D.M. and Gotto A.M., Apolipoprotein AIV. A determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 15714-15718.
- 159 - Savion N., Gamliel A., Tauber J.P. and Gospodarowicz D., Free apolipoproteins AI and AIV present in human plasma displace high-density lipoprotein on cultured bovine aortic endothelial cells. *Eur. J. Biochem.*, 1987, 164, 435-443.
- 160 - Brinton E.A., Oram J.F., Chen C.H., Albers J.J. and Bierman E.L., Binding of high density lipoproteins to cultured fibroblasts after chemical alteration of apoprotein aminoacid residues. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 495-503.
- 161 - Negrel R., Grimaldi P. and Ailhaud G., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 6054-6058.
- 162 - Tabas I. and Tall A., Mechanism of the association of HDL₃ with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 13897-13905.
- 163 - Barbaras R., Grimaldi P., Negrel R. and Ailhaud G. Binding of lipoproteins and regulation of cholesterol synthesis in cultured mouse adipose cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 845, 492-501.
- 164 - Barbaras R., Grimaldi P., Negrel R. and Ailhaud G., Characterization of high density lipoprotein binding and cholesterol efflux in cultured mouse adipose cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 888, 143-156.
- 165 - Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C. and Ailhaud G., Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by Lp AI particles but not by Lp AI:AII particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 63-69.
- 166 - Barbaras R., Puchois P., Grimaldi P., Barkia A., Fruchart J.C. and Ailhaud G., Relationship in adipose cells between the presence of receptor sites for high density lipoproteins and the promotion of reverse cholesterol transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 149/2, 545-554.
- 167 - Barbaras R., Puchois P., Barkia A., Fruchart J.C. and Ailhaud G., Purification of the apo-AI:AII receptor from adipose cells. *Circulation*, 1987, 76 (4), 479.
- 168 - Betard C., Vu-Dac N., Mezdoor H., Nestruck A.C., Leroy A. and Fruchart J.C., Standardization of an enzymometric assay for apolipoprotein AI by using mixtures of monoclonal antibodies. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1987, 25, 893-9.

- 169 - Zawadzki Z., Terce F., Seman L.J., Theolis R.T., Breckenrdige W.C., Milne R.W. and Marcel Y.L., The linkage with apolipoprotein (a) in lipoprotein (a) modifies the immunochemical and functional properties of apolipoprotein B. *Biochemistry*, 1988, 27, 8474-8481.
- 170 - Leroy A., Vu-dac N., Koffigan M., Clavey V. and Fruchart J.C., Characterization of monoclonal antibody that binds to apolipoprotein E and to lipoprotein of plasma containing apo E. Application to ELISA quantification of plasma apo-E. *J. Immunoassay*, 1988, 2, 309-334.
- 171 - Koren E., Mc Conathy W.J. and Alaupovic P., Isolation and characterization of apolipoprotein F containing lipoproteins from human plasma. *Biochemistry*, 1982, 21, 5347-5351.
- 172 - Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E. and Ross G.T., A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocr.*, 1971, 33, 988.
- 173 - Cuatrecasas P., Agarose derivatives for purification of protein by affinity chromatography. *Nature*, 1970, 228, 1327-1328.
- 174 - Urpo Kustala M.D., Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. *J. Invest. Dermatol.*, 1965, Vol. 50, No 2, 120-137.
- 175 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- 176 - Douste-Blazy L., Beucler I., Bleton V., Canal J., Fruchart J.C., Gambert P., Kattermann R., Peynet J. and Polonovski J., Méthode sélectionnée pour le dosage enzymatique du cholestérol total. *I.S.B.*, 1979, 4, 23-31.
- 177 - Eggsteim M. and Krevtz F.H., Eine neue bestimmung der neutralfette in blutserum und gewebe. *Klin. Wochenschr.*, 1966, 44, 262-267.
- 178 - Takayama M., Itoh S. and Nagaski T., A new enzymatic method for determination of serum choline containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta*, 1977, 73, 93-98.
- 179 - Nouvelot A., Sezille G., Dewailly P. and Fruchart J.C., Chromatographie monodimensionnelle des lipides polaires sur couche mince de gel de silice en gradient discontinu d'humidité. *Revue française des corps gras. CM des lipides polaires*, 1977, 24ème année, No 7, 365-366.
- 180 - Ouchterlony O., Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor Science Publishers, Inc., Ann. Arbor, MI, 1968.
- 181 - Axelsen N.H., Bock E., and Kroll J., Twelve comparison of

- antisera. In : Axelsen N.H., Kroll J., Weeke B. eds. A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Oslo-Bergen-Tromsø : Universitetsforlaget 1983, 101-103.
- 182- Philips G.B., The phospholipid composition of human serum lipoprotein fractions separated by ultracentrifugation. *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 489-493.
 - 183 - Nelson G.J. and Freeman N.K., The phospholipid and phospholipid fatty acid composition of human serum lipoprotein fractions. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 578-583.
 - 184- Sata T., Havel R.J. and Kane J.P., New protein in human blood plasma, rich in proline, with lipid-binding properties. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 1976, 73, 1063-1067.
 - 185 - Funakoshi M., Sasaki J. and Arakawa K., Proline-rich protein is a glycoprotein and an acute phase reactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 963, 98-108.
 - 186 - Gibson J.C., Rubinstein A., Ngai N., Ginsberg H.N., Le N.A., Gordon R.E., Goldberg I.J. and Brown W., Immunoaffinity isolation of apolipoprotein E containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 835, 113-123.
 - 187 - Lillian F., Clejan S. and Bittman R., Movement of cholesterol between vesicles prepared with different phospholipids or sizes. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 4098-4102.
 - 188 - Leduc R., Patton G.M., Atkinson D. and Robins S., Influence of different molecular species of phosphatidylcholine on cholesterol transport from lipoprotein recombinants in rat. *J. Biol. Chem.*, 1986, 262, 7680-7685.
 - 189 - Reichl D., Rudra D.N., Myant N.B. and Pflug J.J., Further evidence for the role of high density lipoprotein in the removal of tissue cholesterol in vivo. *Atherosclerosis*, 1982, 44, 73-84.
 - 190 - Reichl D., Simons L.A., Myant N.B., Pflug J.J. and Mills G.L., The lipids and lipoproteins of human peripheral lymph, with observations on the transport of cholesterol from plasma and tissues into lymph. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1973, 45, 313-329.
 - 191 - Reichl D., Postiglione A., Myant N.B., Pflug J.J. and Press N., Observations on the passage of apoproteins from plasma lipoproteins into peripheral lymph in two men. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1975, 49, 419-426.
 - 192 - Reichl D. and Myant N.B., Lipoproteins of human peripheral lymph. In *Protides of the Biological Fluids*, H. Peeters, editor, Pergamon Press, New-York, 1977, 123-132.
 - 193 - Reichl D., Myant N.B., Brown M.S. and Goldstein J.L., Biologically active low density lipoprotein in human peripheral lymph. *J. Clin. Invest.*, 1978, 61, 64-71.

- 194 - Yoffey J.M. and Courtice F.C., The formation of lymph. In *Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid system*, J.M. Yoffey and F.C. Courtice, editors, Academic Press, London, 1970, 123-132.
- 195 - Malmendier C.L., Amerijckx J.P. and Van Den Bergen C.J., Metabolism of lipoproteins in human chylous ascites. Kinetic and static studies of lipids and apoproteins. *Clin. Chim. Acta*, 1977, 77, 227-244.
- 196 - Staats B.A., Ellefson R.D., Budahn L.L., Dines D.E., Prokash U.B. and Offord K., The lipoprotein profile of chylous and nonchylous pleural effusions. *Mayo. Clin. Proc.*, 1980, 55, 700-704.
- 197 - Olcewski W.L., Engeset A. and Sokolowski J., Lymph flow and protein in the normal male leg during lying, getting up and walking. *Lymphology*, 1977, 10, 178-183.
- 198 - Vermeer B.J., Reman F.C. and Van Gent C.M., The determination of lipids and proteins in suction blister fluid. *J. Invest. Dermatol.*, 1979, 73, 303-305.
- 199 - Vessby B., Gustafson S., Chapman M.J., Hellsing K. and Lithell H., Lipoprotein composition of human suction-blister interstitial fluid. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 629-641.
- 200 - Reichl D., Forte T.M., Hong J.L., Rudra D.N. and Pflug J., Human lymphedema fluid lipoproteins : particle size, cholesterol and apolipoprotein distributions and electron microscopic structure. *J. Lipid Res.*, 1985, 26, 1399-1411.
- 201 - Rudra D.N., Myant N.B., Pflug J.J. and Reichl D., The distribution of cholesterol and apoprotein AI between the lipoproteins in plasma and peripheral lymph from normal human subjects. *Atherosclerosis*, 1984, 53, 297-308.
- 202 - Fidge N.H., Mc Cullagh P.J., Studies on the apoproteins of rat lymph chylomicrons : characterization and metabolism of a new chylomicron-associated apoprotein. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 138-146.
- 203 - Stokke K.T., Kluge N.B., Kluge T.H. and Skrede S., Lipid composition and cholesterol esterification in lymph. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1974, 33, 199-206.
- 204 - Dory L., Sloop C.H. and Roheim P.S., Interstitial fluid (peripheral lymph) lipoproteins. *Methods Enzymol.*, 1986, 129, 660-678.
- 205 - Lee N.S., Brewer H.B. Jr and Osborne J.C. Jr., β_2 -Glycoprotein I. Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H. *J. Biol. Chem.*, 1983, Vol. 258, No 8, 4765-4770.
- 206 - Polz E. and Kostner G.M., Binding of β_2 -Glycoprotein-I to

intralipid : determination of the dissociation constant.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979a, 90, 1305-1312.

- 207 - Burstein M. and Legmann P., in Protides of the biological fluids, (Peeters H., ed.), pp 407-410, Pergamon Press Ltd., Elmsford, New-York.
- 208 - Polz E. and Kostner G.M., The binding of β_2 -Glycoprotein-I to human serum lipoproteins. FEBS Lett., 1979b, 102, 183-186.
- 209 - Nakaya Y., Schaefer E.J. and Brewer H.B. Jr., Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -Glycoprotein-I). Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, 95, 1168-1172.



Mots-clés :

Athérosclérose, lipoprotéines de haute densité, HDL, HDL₂, HDL₃, apolipoprotéines, apo AI, apo AII, apo AIV, particules lipoprotéiques, Lp AI, Lp AI:AII, Lp AIV, consommation d'alcool, transport "réverse" du cholestérol

RESUME

Les classes de lipoprotéines que l'on peut définir sont un mélange de particules lipoprotéiques constituées de lipides associés à une, deux ou plusieurs apolipoprotéines.

L'apo AI est distribuée principalement entre deux types de particules lipoprotéiques contenant ou non l'apo AII (Lp AI, Lp AI:AII). L'apo AIV est retrouvée essentiellement dans la fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine.

Nous avons purifié par chromatographie d'immunoaffinité et montré l'hétérogénéité moléculaire des particules lipoprotéiques Lp AI, Lp AI:AII (du plasma natif, des HDL₂, des HDL₃ et du liquide interstitiel) et Lp AIV du plasma.

Nous avons rapporté la description d'une méthode d'électroimmunodiffusion différentielle utilisant des plaques prêtes à l'emploi pour la quantification rapide de la Lp AI, véritable fraction anti-athérogène des HDL.

En collaboration avec l'équipe du Professeur Ailhaud (Faculté des Sciences de Nice), nous avons montré, lors d'études *in vitro*, que la Lp AI (quelque soit son origine) et la Lp AIV, produisent l'efflux du cholestérol d'une lignée adipocytaire de souris (ob 17). En revanche, la Lp AI:AII, se comporte comme antagoniste de cet efflux.

Après avoir exposé et discuté les principaux travaux étudiant l'effet de la consommation d'alcool sur les maladies cardiovasculaires, nous avons analysé les variations de la concentration plasmatique en Lp AI et en Lp AI:AII. L'augmentation des HDL, généralement observée chez les buveurs, a été traduite par celle de la Lp AI:AII en masquant une diminution de la Lp AI.

Nous avons observé chez les traumatisés crâniens une diminution de la concentration plasmatique en Lp AI:AII qui n'est autre que le reflet de celle des HDL₃, alors que la Lp AI reste dans les limites habituelles. Une étude réalisée chez les sujets atteints de myélome multiple a montré que les baisses des concentrations plasmatiques des HDL et de l'apo AI sont traduites par celle de la Lp AI:AII alors que la Lp AI augmente comme les HDL₂.

Ces résultats montrent que la classification des lipoprotéines en fonction de leur composition en apolipoprotéines paraît être la plus adéquate pour étudier leur métabolisme et leur physiopathologie.