



**HAL**  
open science

# Lipoproteines et apolipoproteines du serum de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*)

Yvan Rahbé

► **To cite this version:**

Yvan Rahbé. Lipoproteines et apolipoproteines du serum de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*). 1982. hal-00665072

**HAL Id: hal-00665072**

**<https://hal.science/hal-00665072>**

Submitted on 1 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

# RAPPORT

de

## STAGE de D.A.A.

présenté

par

Yvan RAHBÉ

### LIPOPROTEÏNES ET APOLIPOPROTEÏNES DU SERUM DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL ( *Salmo Gardnieri* )

effectué au

CENTRE DE RECHERCHES SUR LA NUTRITION  
C.N.R.S. BELLEVUE

JUIN 1982

Je tiens ici à remercier Mme A. GIRARD de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir suivi de très près ce travail et mon encadrement au sein de l'équipe. (E.HENTZ, F.N'DIAYE, D.VACHER, A.MOUGIN.)

Je remercie également L.FREMONT (INRA-Physiologie des Poissons-JOUY-en-JOSAS) pour les truites mises à notre disposition et pour les renseignements fournis.

Je remercie aussi P. et D.ROBIN pour les analyses d'acides aminés ainsi que l'équipe de Melle O.CHAMPIGNY pour mon initiation aux dosages de lipoprotéines lipase.

Je remercie enfin tout spécialement Mme FINEL pour la mise en forme de ce rapport, ainsi que toutes les personnes du Centre de Recherches sur la Nutrition (C.N.R.S., MEUDON) qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

P L A N

	<u>Pages</u>
<u>Introduction</u> :	
- Les lipoprotéïnes des mammifères; structure et fonction.	--- 1-5
- L'utilisation des lipides chez les poissons.	--- 5-6
<u>Travail Expérimental</u> :	
<u>Matériel et Méthodes</u>	--- 7-10
<u>Résultats et discussion</u>	
- profil lipoprotéïque	--- 11
- composition des lipoprotéïnes	--- 11-13
- Apolipoprotéïnes :. description générale	--- 14-15
. séparation et caractéri- sation des principales apoprotéïnes.	--- 16-17
. essais fonctionnels sur une fraction d'apoprotéïne; activation de lipoprotéïne	--- 18-19
- Conclusions - - - - -	lipase. --- 20-21
- Bibliographie .	
<u>Annexes</u> :	
- A1 à A6 : méthodes et protocoles détaillés	
- A7 : résultats bruts de composition.	

(Salmo Gardnieri)

Le rôle des lipides dans les structures cellulaires ou dans le métabolisme énergétique et hormonal des animaux en fait un important sujet d'étude. A côté des recherches sur le métabolisme cellulaire des lipides ou des mécanismes de l'action hormonale de certaines classes d'entre eux, les moyens par lesquels les lipides endogènes ou exogènes sont transférés d'un organe ou tissu à d'autres sont analysés en détail. Dans le sang des mammifères et des autres vertébrés, à côté des acides gras libres transportés par l'albumine plasmatique, la plus grande partie des lipides sont véhiculés par des complexes supramoléculaires, liés à des protéines spécifiques. L'étude de ces lipoprotéines chez les mammifères et chez l'homme permet de mieux comprendre le métabolisme général des principaux lipides-essentiellement triglycérides, phospholipides et cholestérol- depuis la synthèse intestinale jusqu'à leur dégradation ou leurs conversions dans les divers organes. D'un point de vue clinique, la compréhension du fonctionnement des lipoprotéines permet d'en contrôler l'influence dans certaines pathologies. La plus importante est sans doute l'athérosclérose, dont les lésions artérielles et les complications qui en découlent semblent en relation étroite avec le métabolisme des lipoprotéines et ses perturbations d'origine génétique<sup>ou</sup> nutritionnelle.

Le choix de la truite comme matériel animal permet de compléter le travail de physiologie comparée effectué en ce domaine, (CHAPMAN et al. (1)), et d'approfondir les mécanismes d'absorption, de transport et stockage des lipides chez les poissons. Les différences ou les similitudes de comportement nutritionnel constatés par rapport aux espèces domestiques plus traditionnelles permettront d'améliorer les techniques d'alimentation de ces animaux dont on commence à envisager une exploitation plus "intensive". A ce titre, le régime alimentaire de type carnivore de la truite pose un problème du fait d'une mauvaise adaptation à l'assimilation des sucres-amidon brut mais aussi glucose et

saccharose. Améliorer les performances de croissance passe donc probablement par une augmentation de l'ingéré lipidique. Il est donc nécessaire de mieux connaître le métabolisme et le stockage des graisses chez les poissons. Cela paraît d'autant plus important que ce sont des poecilothermes et dans la plupart des cas des ovipares, ayant de ce fait de forts besoins lipidiques saisonniers. On peut aussi noter la présence chez les Salmonidés d'affections athéromateuses par ailleurs saisonnières et réversibles, qui permettraient peut-être d'en savoir plus sur l'induction des lésions et des facteurs qui y contribuent.

L'étude présente portera sur la caractérisation biochimique des différentes classes de lipoprotéines chez la truite Arc-en-ciel, (*Salmo Gardnieri*) tant du point de vue lipidique que protéique-apoprotéines-. Avant de présenter les travaux effectués, une courte mise au point sera faite, d'une part sur la structure et le métabolisme des lipoprotéines, d'autre part sur l'absorption et le transport des lipides chez les poissons.

(2)

Depuis leur mise en évidence par MACHEBOEUF, en 1929, l'analyse des lipoprotéines s'est intensifiée d'une part avec la mise au point de techniques adaptées, comme dans les années 50 avec l'ultracentrifugation et les techniques d'électrophorèse et d'autre part avec la mise en évidence de leur intérêt clinique impliquant les lipoprotéines dans nombre d'anomalies pathologiques, héréditaires ou non, de la composition plasmatique. Depuis, de très nombreuses revues ont été publiées sur la pathologie (3) (4) et sur la structure et le métabolisme normal des lipoprotéines (5 - 10)

La composition du plasma en lipoprotéines permet de définir différentes classes déterminées par un certain nombre de leur propriétés physiques comme leur densité hydratée, déterminant leur coefficient de flottation en ultracentrifugation, ou leurs positions de migration électrophorétique ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  dans l'ordre des mobilités décroissantes). Ces classes sont essentiellement les mêmes chez tous les vertébrés. Les protéines spécifiques les constituant tirent leur nomenclature - ALAUPOVIC, 1971 (11) - de cette propriété, les protéines majeures des particules de mobilité  $\alpha$  (resp.  $\beta$ ,  $\gamma$ ) étant les apoprotéines A (resp. B, C).

Fig a. Profil lipoproteique du plasma humain . Separation par ultracentrifugation sur gradient de densité (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

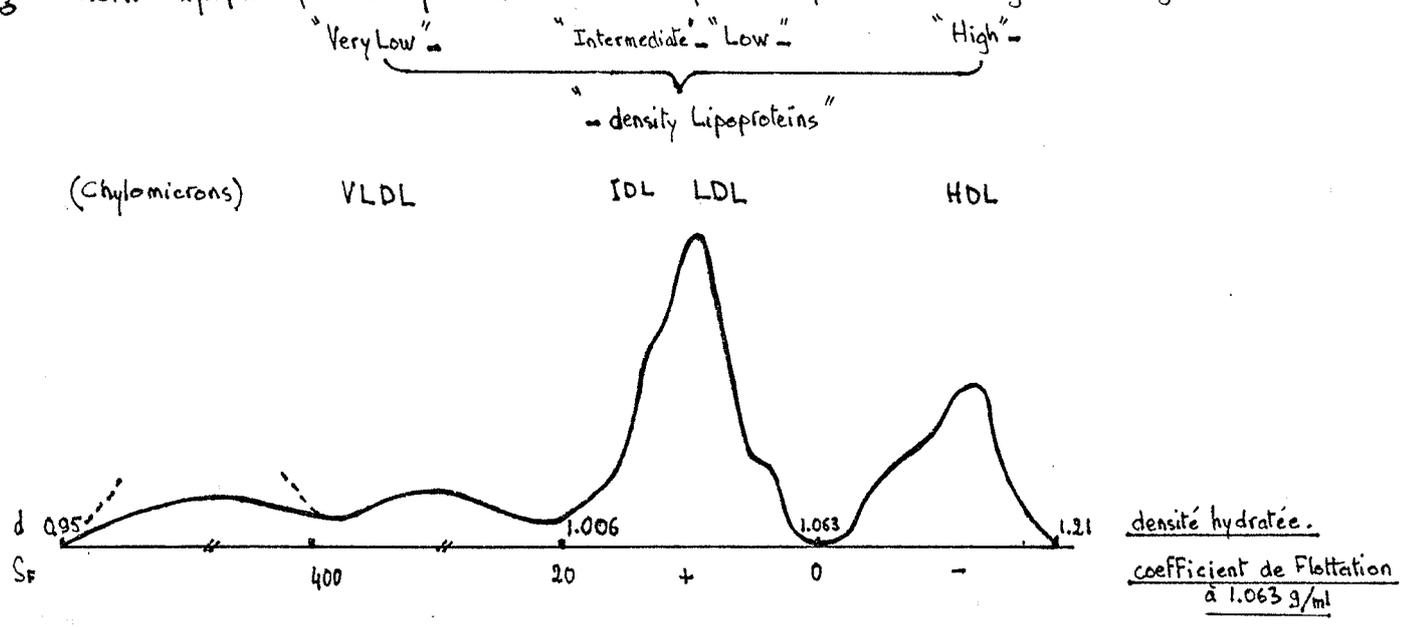


TABLEAU A : Propriétés et composition des lipoprotéines du plasma humain .  
 - d'après OSBORNE et BREWER (1977) [ref. 7] -

Propriétés	Chylomicrons	VLDL	IDL "remnants"	LDL	HDL (2)	HDL (3)
migration électrophoret.	Origine: $\gamma$	$\beta$	"broad" $\beta$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha$
d. milieu (g.ml <sup>-1</sup> )	< 1,006	< 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,125	1,125 - 1,210
d. hydratée moyenne (n)	0,93	0,96	1,013	1,034	1,094	1,145
poids moléculaire	> 400 . 10 <sup>6</sup>	5-10 . 10 <sup>6</sup>	3,9-4,8 . 10 <sup>6</sup>	2,7 . 10 <sup>6</sup>	0,39 . 10 <sup>6</sup>	0,18 . 10 <sup>6</sup>
diamètre (nm)	> 75	75-25	24-22	22,5-20	14-6	10-4
Protéines:	0,5 - 2,5	10,0-13,0		20,0-25,0	45,0	55,0
Lipides: triglycérides	88,0	56,0		9,0	6,0	7,0
cholestérol	3,0	25,0		59,0	43,0	38,0
phospholipides	9,0	19,0		30,0	42,0	41,0

TABLEAU B : Répartition des Lipoprotéines dans les classes de Lipoprotéines chez l'homme  
 (% des protéines totales des L.P.) - d'après SCHAEFER et al. (1978) [ref. 6] -

Apoprotéine	Chylomicrons (LYMPHE)	VLDL (plasma)	LDL	HDL
AI	7,4	traces		67
AII	4,2	traces		22
B	22,2	36,9	98	traces
CI	15	3,3	traces	1,3
CII	15	6,7	traces	1-3
CIII	36	39,9	traces	3-5
D (AIII ; "thin line protein")				+
E ("Arginin-rich protein")		13	trace	+

Ultérieurement, d'autres composants furent nommés D et E sans lien avec cette caractéristique.

Chez l'homme les principales classes ainsi définies sont les chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL et les HDL. (Voir Figure a.) Certaines classes n'apparaissent que dans des conditions physiologiques précises, comme les chylomicrons et leur dérivés dans la classe IDL, appelés " Remnants", qui ne sont observés qu'après une prise alimentaire. D'autre part, des analyses plus fines de composition et de filiations métaboliques permettent de distinguer des sous-classes (LDL<sub>1</sub>, LDL<sub>2</sub>; HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub>; VHDL). La Tableau A propose un résumé des compositions et propriétés des lipoprotéines plasmatiques humaines, et le Tableau B la composition protéique des différentes classes. On peut schématiquement réduire les lipoprotéines, du point de vue fonctionnel, en deux fractions assez distinctes. D'une part les particules transportant les lipides, avec les chylomicrons et les VLDL pour la majorité des triglycérides et les LDL pour le cholestérol, essentiellement sous forme estérifié. D'autre part les particules transportant surtout des protéines - et des phospholipides - que sont les HDL. Cette vue très simplifiée sera enrichie un peu plus loin par l'étude du métabolisme et des relations, notamment de type précurseur - produit, entre ces différentes particules.

D'un point de vue structural, les lipoprotéines associent en leur sein des constituants totalement hydrophobes - triglycérides, esters de cholestérol - à des constituants mixtes possédant des poles hydrophiles - phospholipides, cholestérol libre ou protéines. Un des rôles primordiaux des lipoprotéines est justement de permettre le transport, en phase plasmatique aqueuse, de ces constituants essentiellement hydrophobes. Des méthodes diverses ont permis d'analyser de telles structures : Diffraction des rayons X ou de neutrons, R.M.N. du proton ou du <sup>31</sup>P, microcalorimétrie et calorimétrie différentielle, hydrolyses enzymatiques et extractions avec des solvants. La plupart des résultats confirment des modèles de micelles simples stabilisés, avec des coeurs de particules occupés par les constituants hydrophobes, la périphérie étant formée d'une monocouche lamellaire des constituants amphiphiles - pole(s) hydrophile(s) vers l'extérieur (9). Des modèles différents sont proposés pour les diverses



classes et sont présentés en Figure b.

Bien que constituant des entités définies, les différentes lipoprotéines ne sont pas indépendantes les unes des autres. Des conversions et des échanges très nombreux ont lieu à partir des particules synthétisées par les deux sources principales que sont l'intestin, surtout dans sa partie duodéno-jéjunale, et le foie. Les grands traits de ce métabolisme sont résumés par la Figure c. On y voit l'origine des particules riches en triglycérides: elles peuvent être d'origine hépatique ou intestinale et transportent alors des triglycérides endogènes (VLDL) ou d'origine uniquement intestinale (chylomicrons sécrétés par les cellules absorbatives intestinales dans la lymphe et acheminés vers le sang par le canal thoracique, après quelques modifications de leur composition, notamment en apoprotéines). Ces lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) vont subir dans le plasma des transformations qui les mèneront finalement à la classe LDL - les stades intermédiaires étant ceux de "Remnants" ou d'IDL. Le mécanisme principal de ce processus est la perte par hydrolyse des triglycérides du coeur de la particule. En effet, une enzyme de la paroi de l'endothélium vasculaire, la lipoprotéine lipase (LPL) va libérer progressivement les acides gras sous l'effet d'un cofacteur protéique transféré des HDL vers les LRT: l'apo CII. La Figure d illustre cette étape. Par la suite, les LRT échangent avec les HDL d'autres constituants: perte de cholestérol libre, de phospholipides et de protéines (essentiellement Apo C); gain de cholestérol estérifié. Ce dernier est produit, au niveau des HDL, par une réaction enzymatique utilisant la Lecithine-Cholestérol-acyltransférase plasmatique (LCAT) et une autre apoprotéine-cofacteur: Apo AI (Figure e)\*. Cela illustre bien le rôle de réserve de protéines fonctionnelles joué par les HDL dans le métabolisme des lipoprotéines. Leur autre rôle est d'assurer le flux de cholestérol (sous forme libre) des tissus vers le foie où il est catabolisé. Le transport inverse du cholestérol (Foie ou intestin vers les tissus) est, lui assuré par les LDL, sous forme de cholestérol estérifié. Il constitue donc l'apport de cholestérol aux cellules périphériques, où les LDL sont captées par des systèmes différents, endocytose ou récepteurs spécifiques (Figure f)\*. Cette captation de

Fig d : Activation et role de la Lipoprotéine lipase tissulaire (en phase plasmatique)

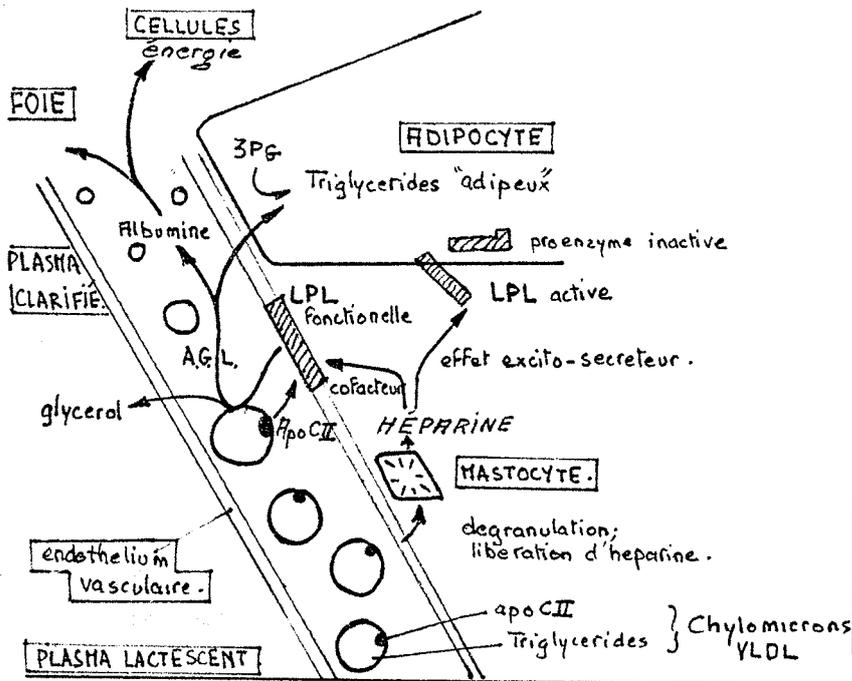


Fig e : Transesterification plasmatique du cholestérol par la Lecithine cholestérol acyl transférase (LCAT)

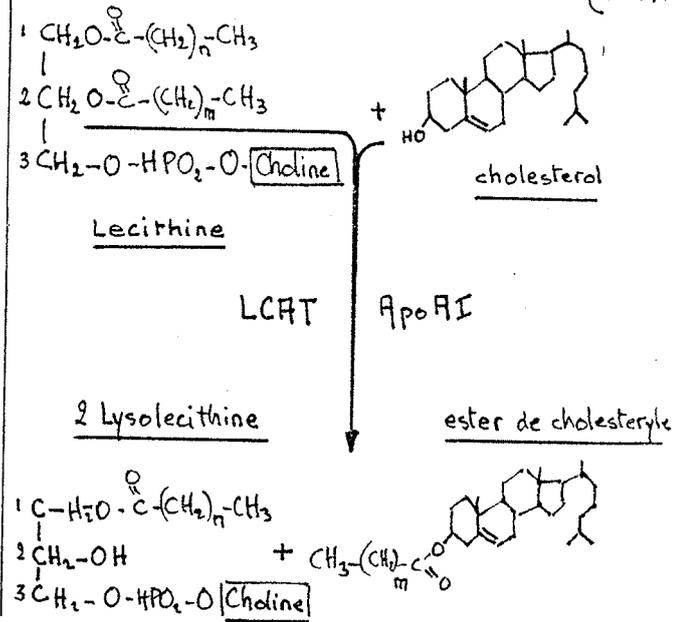


Fig F : Etapes de la voie de dégradation des LDL ("LDL pathway") et leurs actions sur le métabolisme cellulaire du cholestérol. — d'après BROWN H.S. et GOLDSTEIN S. (1980) (12) —

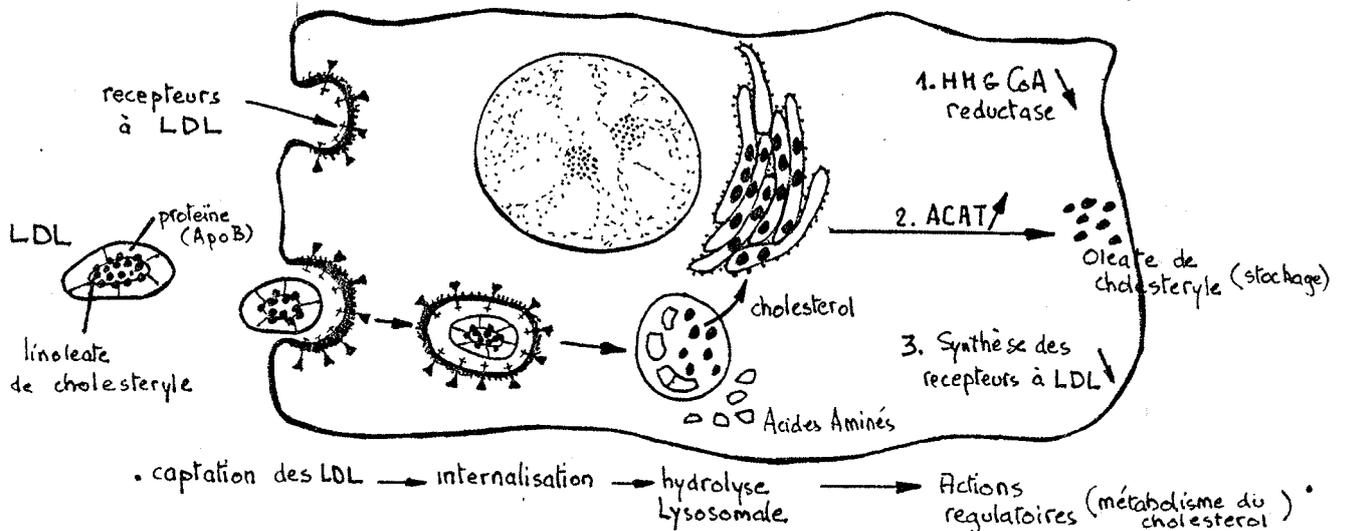


TABLEAU C : Caractéristiques, Fonctions et paramètres métaboliques des apoprotéines du plasma humain. (1978) (6) — d'après SCHAEFER, EISENBERG & LEVY

Apoprotéine	Poids Moléculaire	nombre d'A.A.	Glycides	Fonctions	Site de Synthèse	Taux plasmatique mg %	masse synthétisée mg/jour	Demi-vie plasmatique jours	Site possibles de catabolisme
AI	28300	243	+	Activateur LCAT	intestin / Foie	120	450-600	5,0	Foie, reins (lysosomes)
AII	17000	2 x 77		? Structure des HDL	intestin / Foie	40	150-200	5,0	Foie, reins (lysosomes)
B <sub>100</sub> B <sub>48</sub>	459.000 264.000	?	5%	Transport des Triglyc. Ligand de récepteur?	- Foie - intestin	90	850	3,0	Tissus periph. Foie
CI	6331	57	0	Activateur de la LCAT? Activateur de la LPLipase?	Foie	} 25	} 400	} 0,6	} Foie? Tissus periph.
CII	8837	78	0	Activateur de la LPLipase	Foie				
CIII	8764	79	+	Inhibiteur de la LPLipase	Foie				
D	22100	?	?	Activateur de la LCAT?	?	?	?	?	?
E	33000	?	?	Ligand de récepteur?	Foie / Intestin	?	?	?	Foie

LDL, donc de cholestérol exogène, abaisse le niveau de sa synthèse endogène par la cellule et augmente son stockage, GOLDSTEIN et al. (12).

Cet aperçu sommaire montre qu'à côté du rôle purement structural (Apo B, Apo AI, Apo AII), certaines apoprotéines assurent des fonctions essentielles dans le métabolisme lipidique (Apo CII dans la lipolyse plasmatique; Apo AI dans la transestérification du cholestérol). Le Tableau C rassemble des données concernant les constituants polypeptidiques des lipoprotéines.

Outre la connaissance des mammifères, notre sujet nécessite aussi de dégager les grands traits de la nutrition et du métabolisme lipidique chez les poissons. Nous parlerons donc rapidement des principaux acquis concernant la digestion, l'absorption, le transport et le stockage des lipides chez les poissons. (16-18).

Les triglycérides représentant 70% des lipides, l'attention des chercheurs s'est naturellement portée sur la triglycéridase principale du tractus digestif: la lipase pancréatique. Elle est étudiée chez le poisson par LEGER et al., (19,20): son Km est plus faible que chez le porc et pourrait compenser les effets des basses températures; l'ion  $Ca^{++}$  joue un rôle important dans le déroulement de la lipolyse et on pense avoir mis en évidence une activité colipase analogue à celle des mammifères (21). Les spécificités d'attaque (principalement en position 1 et 3 du Glycérol) ou de nature de chaîne sont étudiées, ainsi que les changements de structure et de propriétés de l'enzyme lors d'adaptations thermiques différentes (énergies d'activation différentes).

Une fois les triglycérides hydrolysés, les acides gras et les 2-monoglycérides sont absorbés par des entérocytes assez analogues à ceux des mammifères. Une des différences morphologiques (22) est la présence, à côté de particules assimilables à des lipoprotéines naissantes (lipides en gouttelettes), d'accumulations lipidiques plus importantes (lipides étalés). Leur rôle reste à définir, mais semble lié à des mécanismes d'absorption légèrement différents de ceux des mammifères. ROBINSON et MEAD (23) avaient même cru conclure de leurs expériences que la forme

principale d'absorption et de transfert au sang des triglycérides alimentaires était celle des acides gras libres (voir portales). Des travaux plus récents (24-26) semblent contredire ces conclusions et proposent les triglycérides comme voie majeure d'exportation sous forme de VLDL ou même de Chylomicron. Ils sont déversés par l'entérocyte dans les canaux lymphatiques où ils rejoignent le sang. Une différence fondamentale avec les mammifères est la cinétique de l'absorption et des synthèses intestinales, beaucoup plus lente; l'état "post prandial" est beaucoup moins marqué et le taux de lipoprotéines riches en triglycérides varie peu avec la prise alimentaire (il est d'ailleurs beaucoup plus variable individuellement que chez les mammifères et dépend, comme les autres lipoprotéines, du cycle de reproduction).

Le transport des lipides sous formes de triglycérides, d'origine hépatique et intestinale, a été abordé par quelques chercheurs (27-29) avec la méthodologie employée pour les lipoprotéines humaines. La confirmation de l'existence de classes analogues, mais peuplées différemment, ou de constituants lipidiques et protéiques à première vue équivalents, a incité certains à approfondir ce domaine. La première étape consiste à bien déterminer les constituants des états "normaux" et les facteurs de variation (FREMONT et al. (30) et données non publiées) avant d'aborder les spécificités des relations métaboliques entre lipoprotéines chez le poisson.

Le stockage des lipides et les mécanismes de leur mobilisation sont aussi encore mal connus. Les principaux organes que sont le foie, le tissu adipeux mais aussi les muscles blancs et rouges - l'intestin? - ont été analysés en relation avec certains états nutritionnels (31). Le rôle essentiel de certains acides gras (série  $\omega 3$ , de l'acide linoléique) est lié à la présence ou non de certaines désaturases gouvernant la formation des polyinsaturés nécessaires à l'intégrité des membranes cellulaires, notamment aux températures assez basses où sont élevées les truites.

Une étude approfondie de ces différents volets du métabolisme lipidique des poissons permettra sans doute de mieux comprendre ses particularités et de fournir des outils mieux adaptés à l'élevage rationnel de ces espèces aquatiques.

## Abréviations utilisées

- L.R.T. = Lipoprotéïnes riches en triglycérides
- VLDL = Very Low Density Lipoproteïns
- IDL = Intermediate " "
- LDL = Low " "
- HDL = Hight " "
- VHDL = Very Hight " "

- S.D.S.-PAGE = Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS
- I.E.F. = Isoélectrofocalisation
- D.O. = densité optique
- d = densité.

- LPL = Lipoprotéïne lipase (facteur clarifiant E.C.3.1.1.3.)
- LCAT = Lécithine Cholesterol-acyl transferase.
- B.S.A= Serum alubine bovine
- A.G.L.= acides gras libres
- C ou Chol. = Cholesterol
- CT, CE, CL = Cholesterol Total, Estérifié, Libre
- Pr = protéïnes
- PL = Phospholipides
- TG = Triglycérides

- SDS = Dodecyl sulfate de Sodium
- TRIS = hydroxyméthylaminométhane
- DOC = deoxycholate de Sodium
- T.C.A = Acide trichloracétique
- T.M.U = Tera méthyl urée
- TEMED = N N N'N' tetramethylethylènediamine
- B.M.E =  $\beta$  mercaptoéthanol

MATERIEL ET METHODES -

ANIMAUX: Les analyses de sérum ont été effectuées séparément à partir de quatre animaux d'un même lot, nourris avec une alimentation commerciale à environ 10% de lipides. Les truites utilisées (*Salmo-Gardnieri*) étaient des femelles de 2 à 3 ans, pesant environ 1,5kg. Le prélèvement a été effectué début janvier, soit en fin de période de reproduction et avant le repos sexuel, par ponction au niveau de la veine dorso-caudale sur les animaux anesthésiés.

D'autres prélèvements ont été effectués sur des animaux plus âgés ( $\sigma$ ; 3ans; 3kg) mais à peu près à la même période du cycle de reproduction. Le sérum a été utilisé pour préparer les apoprotéines. Du tissu adipeux et du cœur ont été prélevés pour les études de Lipoprotéine Lipase.

PRODUITS: Les produits de haute pureté proviennent de :

- EASTRAN KODAK pour l'Acrylamide, le NN'méthylène-bisacrylamide et le TEMED.
- SIGMA pour le T.M.U., le 2-mercaptoéthanol, le sérum albumine bovine, et la neuraminidase.
- BOEHRINGER pour les enzymes des dosages de lipides.
- PHARMACIA pour les ampholines (pharmalyte pH 4-6,5) et les gels de filtration.

PREPARATION DES LIPOPROTEINES; ULTRACENTRIFUGATION: Après obtention du sérum par centrifugation du sang coagulé à température ambiante, on ajoute un antibactérien (Azide de sodium 0,1‰) et de l'EDTA (0,1‰). L'isolement des lipoprotéines se fait par modification - GIRARD et col., non publié - de la technique de REDGRAVE (32).

Isolement des lipoprotéines totales: Le sérum de densité initiale  $d=1,015$  est ajusté, avec du KBr, à la densité de 1,21. On part de 4ml de sérum au dessus desquels on dépose 2ml de solution de KBr à  $d=1,21$  et qu'on centrifuge 48h. à 45 000 Tours (Rotor BECKMAN à angle fixe 50 Ti et ultracentrifugeuse BECKMAN L 8.55)

Séparation des classes de lipoprotéines: Les lipoprotéines "totales" ainsi obtenues 2ml de surnageant  $d < 1,21$  - sont déposés sous un gradient discontinu de KBr composé successivement de : 1ml de  $d=1,210$ ; 2,5ml de  $d=1,063$ ;

2,5ml de  $d=1,040$ ; 2,5ml de  $d=1,019$ ; 1ml de  $d=1,006$  et 0,5ml d'eau. Après une centrifugation de 24h. à 45 000 Tours (BECKMAN SW 41/L8-55), les lipoprotéines sont recueillies à partir du haut du tube par un collecteur de gradients (ISCO). Le volume des fractions collectées est de 0,7ml et la D.O. à 280nm est mesurée en continu par une cellule reliée à un enregistreur (ISCO UA 5 "Absorbance Monitor"). Les dix sept fractions ainsi obtenues sont stockées à 4°C pour analyses, leur densité ayant été mesurée par mesures de resistivité rapportées à une gamme étalon de solutions de KBr.

Préparation des apoprotéines: à des fins préparatives, des volumes plus importants de sérum ont été fractionnés de façon analogue en ultracentrifugation séquentielle: Lipoprotéines totales,  $d < 1,21$ ; LDL + VLDL,  $1,006 < d < 1,080$ ; HDL,  $1,080 < d < 1,21$ .

DOSAGES: Ils sont effectués sur les 17 fractions; les résultats sont exprimés en mg de substance par 100ml de sérum:

a-protéines: elles sont dosées par la méthode de G.L.PETERSON (33). C'est une modification de la méthode de LOWRY et al. (1951), (34), faisant intervenir une précipitation quantitative des protéines par un mélange D.O.C-T.C.A. et une solubilisation-dénaturation de ces protéines en présence de SDS. Elle permet un élargissement des conditions d'utilisation adaptée au dosage des protéines membranaires.

Une autre méthode plus rapide est utilisée pour les déterminations courantes. Elle utilise la fixation quantitative d'un colorant sur les protéines - BRADFORD M. (35). Pour plus de précisions sur les principes et les protocoles, se rapporter à l'annexe A1. Dans tous les cas l'étalon utilisé est la BSA.

b-lipides plasmatiques: Cholestérol total, Cholestérol libre, Triglycérides sont dosés enzymatiquement à l'aide de trousse BOEHRINGER. Pour les phospholipides on utilise le procédé Wako, monoréactif enzymatique. Les références, principes et protocoles sont rassemblés en annexe A2.

DELIPIDATIONS: Plusieurs techniques sont utilisées selon le cas:

- Les petits échantillons ( 200µg de protéines, en solution aqueuse) sont délipidés à deux reprises par 5 fois leur volume d'éther.
- A l'échelle préparative (à partir de 5mg de protéines), la délipidation se fait par précipitation à l'alcool 1-1 à 0°C (BROWN et al., (36)).

- Dans le cas des lipoprotéines légères, on peut effectuer une délipidation par le TMU (KANE, (37)) qui précipite aussi sélectivement l'apo B.

Pour plus de détails sur ces deux dernières techniques, se reporter à l'annexe A3.

FILTRATIONS SUR GEL: Elles sont effectuées sur colonnes de 950x25mm remplies de Sephacryl S200 (PHARMACIA). Le tampon d'élution est un tampon UREE-TRIS (6M-0,01M, + EDTA 1M, filtré sur Büchner et charbon actif). Le débit est environ de 10ml/heure.

ELECTROPHORESES: La migration des protéines en SDS-PAGE est faite selon le cas dans deux systèmes électrophorétiques mais toujours sur gels cylindriques de 95x5,0mm:

Pour les apoprotéines totales, l'analyse se fait sur gels à 12% d'Acrylamide en tampon SDS phosphate à température ambiante- WEBER et OSBORNE, (38). La migration dure 14h. Une estimation semi-quantitative des bandes protéiques après coloration est effectuée par planimétrie sur les profils d'absorption des gels à 550nm (Bleu de Coomassie).

Pour les apoprotéines de haut P.M. la séparation se fait soit dans le système précédent avec des gels à 3%, soit en tampon SDS-TRIS avec des gels mixtes à 3-4%, -LAEMMLI et FAVRE, (39)-

L'estimation des poids moléculaires grâce à une gamme étalon (Sigma-DALTON-MARK VI), ainsi que les détails des méthodes sont décrites en annexe A4. Des renseignements complets sont fournis par la référence (40).

ELECTROFOCALISATIONS: -Les I.E.F. analytiques sont effectuées selon la méthode décrite par O'FARRELL, (41), sur gels cylindriques (130x2,5mm) de polyacrylamide, avec une gamme de pH de 4 à 6,5. La linéarité du gradient est vérifiée au pH-mètre après découpage du gel.

-L'I.E.F. préparative est réalisée sur lits d'Ultradex-LKB par une méthode adaptée d'après RADOLA, (42). Les protéines ainsi isolées ne sont pas purifiées des ampholines avant leur essais fonctionnels.

L'annexe A5 traite de ces méthode d'isoelectrofocalisation ainsi que des traitements préalables (ex: IEF après traitement à la neuraminidase)

ANALYSES D'ACIDES AMINES: Les compositions totales ont été analysées par P. et D. ROBIN (C.R.N.-C.N.R.S. MEUDON) sur Auto Analyseur T.S.M. Technicon (DOMONT, FRANCE) et les Acides Aminés N et C terminaux par D. TRITSCH

(I.B.M.C., STRASBOURG).

ESSAIS DE LIPOPROTEINES- LIPASE ET D'ACTIVITE Apo CII: Ils ont été menés par adaptation de la méthode de P. de GASQUET, (43) pour le dosage de lipoprotéines-Lipase; des prise aliquotes de L.P.L. extraites de tissu adipeux de rats mâles nourris sont utilisées pour déceler une activité cofacteur de type Apo CII dans diverses fractions d'apoprotéines de truite. La même méthode est utilisée pour mettre en évidence une activité LPL dans les poudres acétoniques - voir annexe A6 - extraites de tissu adipeux ou de coeur de truites adultes.

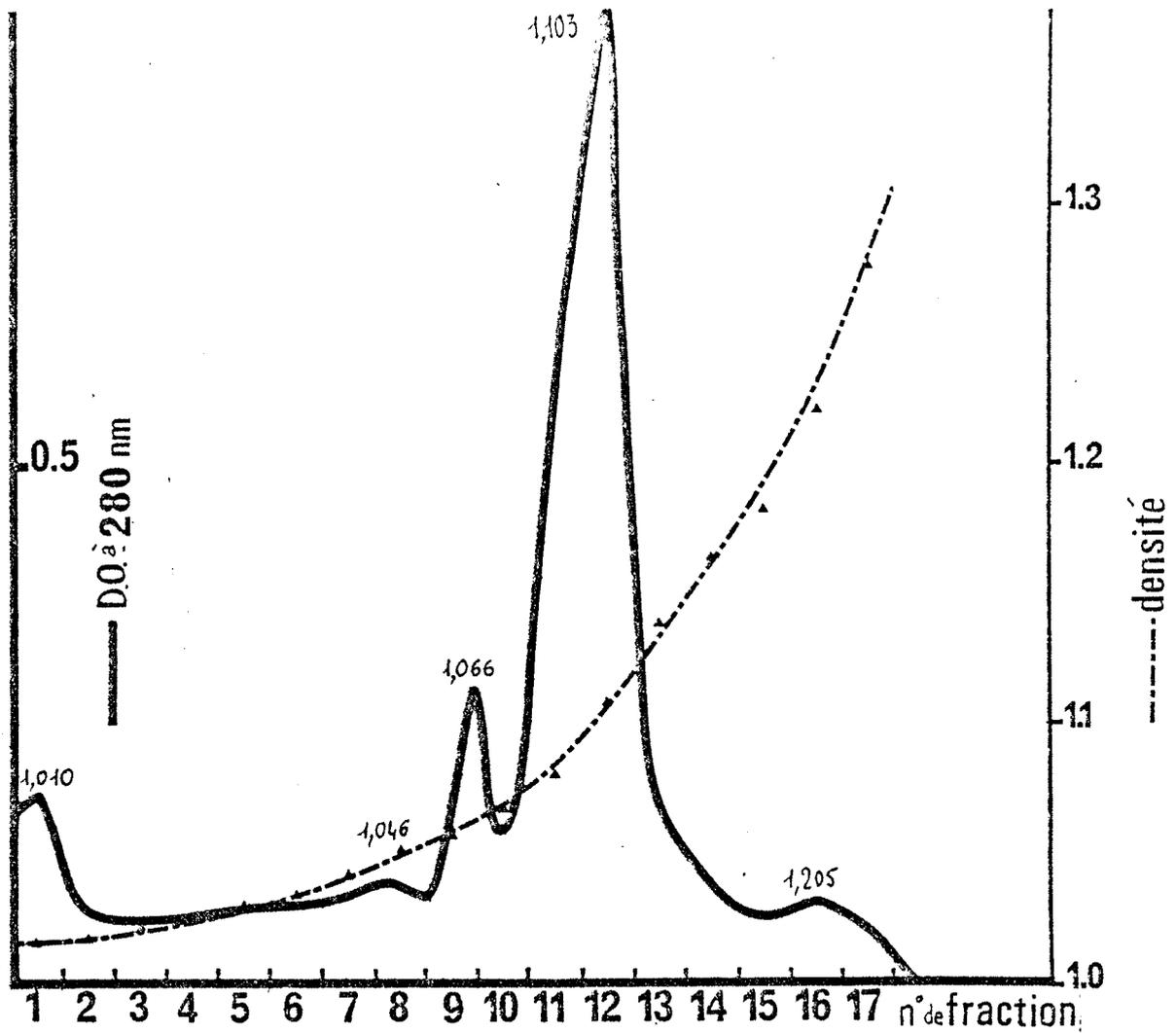


FIG. 1: Fractionnement de lipoprotéines totales. Ultracentrifugation sur gradient de KBr.

**TABLEAU I: Teneur des différentes classes en lipoprotéines et compositions relatives**  
(Valeurs moyennes sur 2 Truites)

Fraction	Classe	mg./100 ml de Serum		% des lipoprotéines Totales				
		Lipoprot. Totales	±	Prot.	C.Tot.	CLib.	T.G.	P.L.
1	VLDL Chylo.	252	41	8,6	5,4	5,2	69,5	16,4
2-6	IDL	169	14	13,1	7,9	6,1	62,5	16,6
7,8	LDL	145	18	30,4	13,2	9,0	33,3	23,1
9,10	LDL'	356	40	35,1	10,4	6,5	19,3	35,2
11-13	HDL	1825	150	43,4	6,8	3,5	10,4	39,4
14-17	HDL'	181	15	62,5	4,3	2,2	15,8	17,4

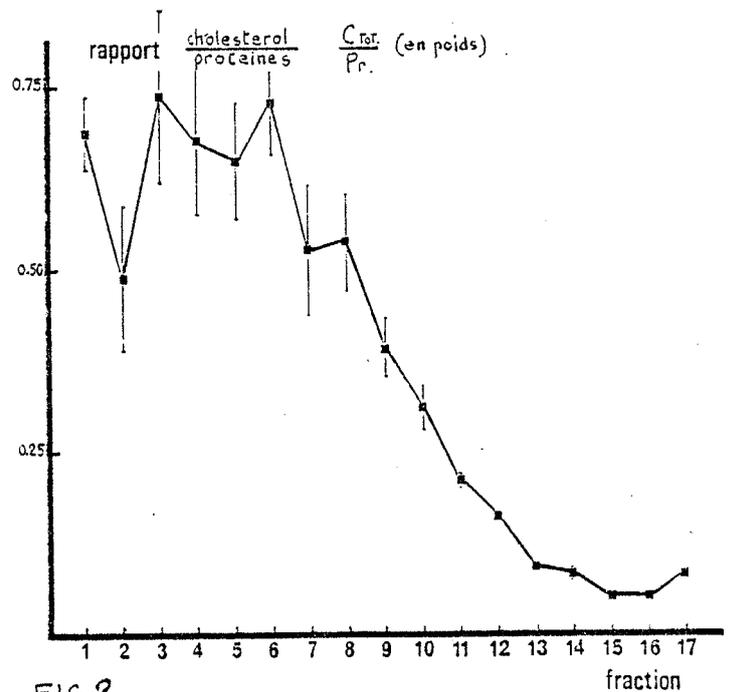


FIG. 2.

RESULTATS ET DISCUSSION:

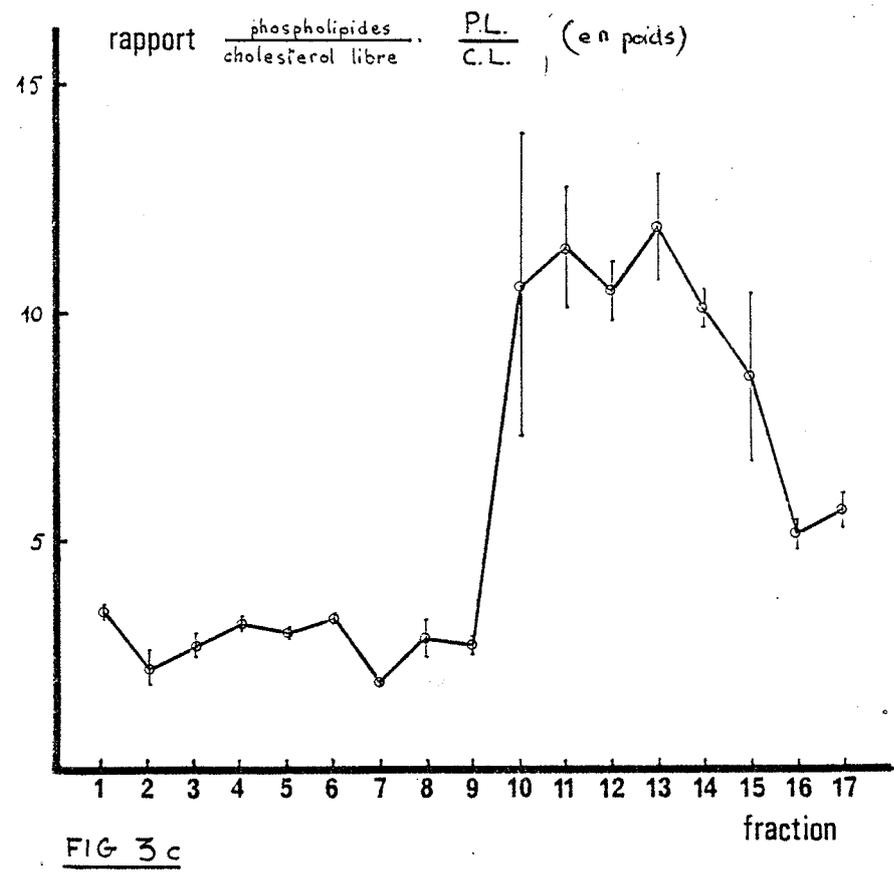
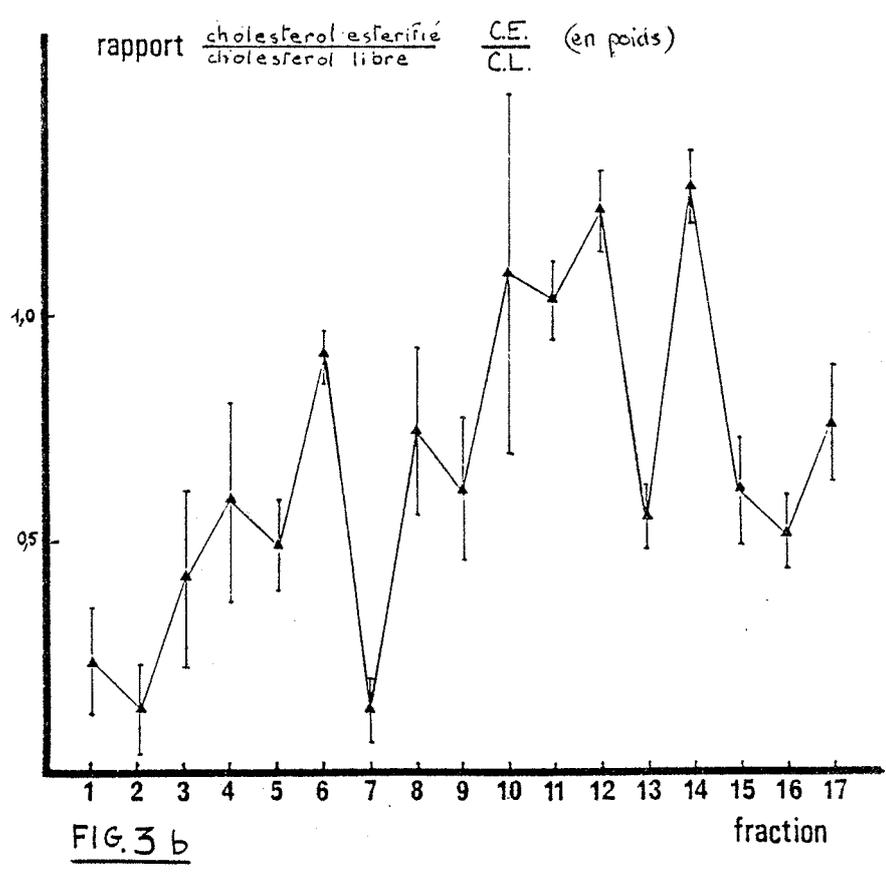
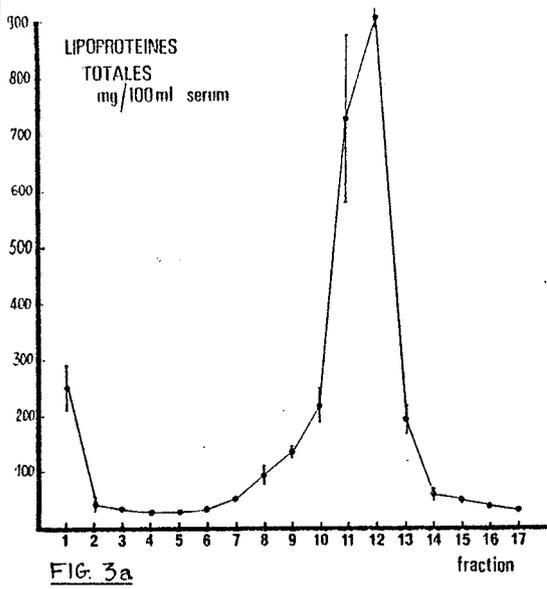
Profil lipoprotéique: Les techniques courantes utilisées pour l'analyse des lipoprotéines dans le sérum des mammifères (ultracentrifugation séquentielle à des densités bien déterminées) ne sont pas à priori adaptées à d'autres espèces. C'est pourquoi le sérum de truite, dont la densité initiale est déjà différente de celle des mammifères ( $d=1,015$  au lieu de  $1,006$ ) a été analysé sur gradient de densité. Le résultats est représenté par la fig.1. Du point de vue du profil protéique (D.O. à  $280\text{nm}$ ) plusieurs classes apparaissent:

- Une classe à très faible densité ( $d = 1,015$ )
- Une classe apparemment hétérogène dans la gamme de densité dite moyenne; cette hétérogénéité a été confirmée par l'analyse sur gradient étalé de densité; remarquons que le maximum du deuxième pic se trouve à une densité ( $d=1,066$ ) plus élevée que la limite supérieure de la classe LDL chez les mammifères ( $d=1,063$ ).
- Une classe, très largement majoritaire dans notre cas, vers la densité ( $d=1,103$ ) correspondant à celle des HDL humaines. Mais si ces dernières sont hétérogènes et présentent des sous-classes vers  $d=1,095$ ,  $d=1,115$  et  $d=1,160$ , la même hétérogénéité n'est pas apparente pour le pic principal chez la truite, tout au moins au niveau des densités.
- Une dernière classe, peu importante quantitativement, est visible à  $d=1,205$ . Elle est néanmoins significative car peu contaminée par les protéines plasmatiques (voir plus loin) et peut correspondre à une sous-classe lourde de HDL (VHDL).

Malgré les différences de densités et de répartition quantitative (voir le profil humain en introduction), on retrouve bien les mêmes classes que chez les mammifères et la nomenclature classique peut être conservée.

Composition des différentes classes: Le tableau I donne la teneur des différentes classes en lipoprotéines totales (rapportées à  $100\text{ml}$  de sérum), ainsi que leurs compositions relatives (en % du total). Les valeurs brutes sont rassemblées en annexe A7 pour toutes les fractions et classes (A7a à A7e), ainsi que les compositions relatives de toutes les fractions (A7f). On remarquera la nette prédominance des HDL. Ceci est en accord avec la plupart de données de la littérature (27-29). Pourtant FREMONT et al. (30) notent une prédominance des LDL pour un lot de 15 animaux, ainsi que des variations individuelles et saisonnières importantes. Il serait donc nécessaire, une fois les classes bien déterminées, de mieux connaître les facteurs de variation (sexe, âge, stade sexuel, alimentation).

Le rapport cholestérol total /protéines (fig.2) est souvent utilisé

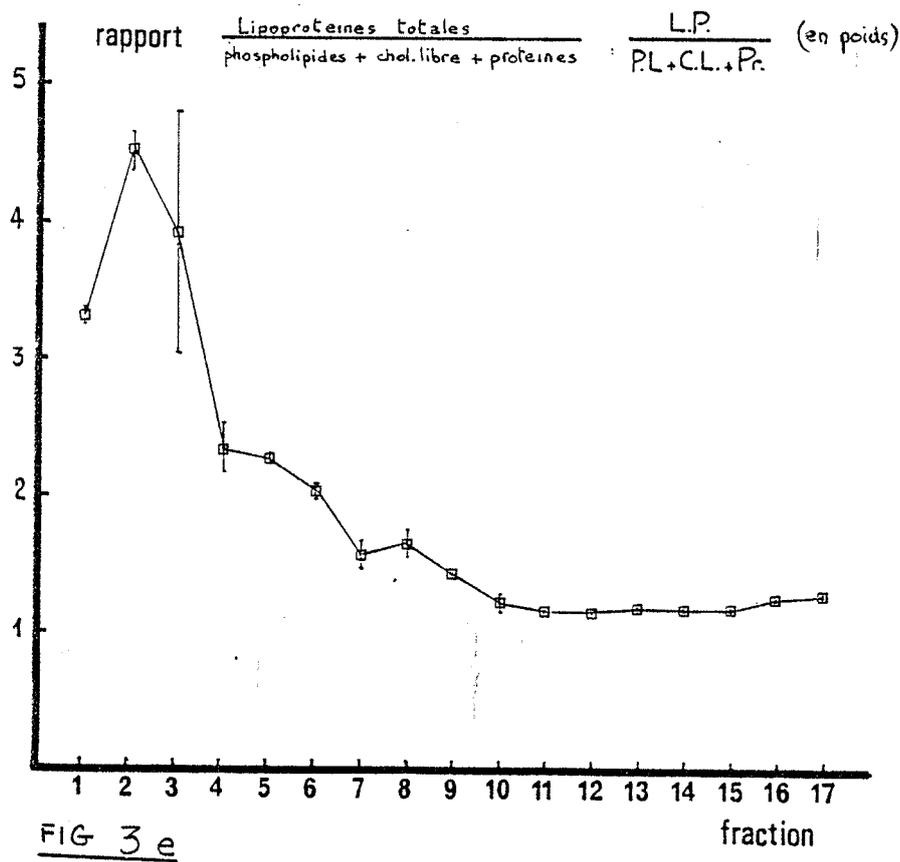
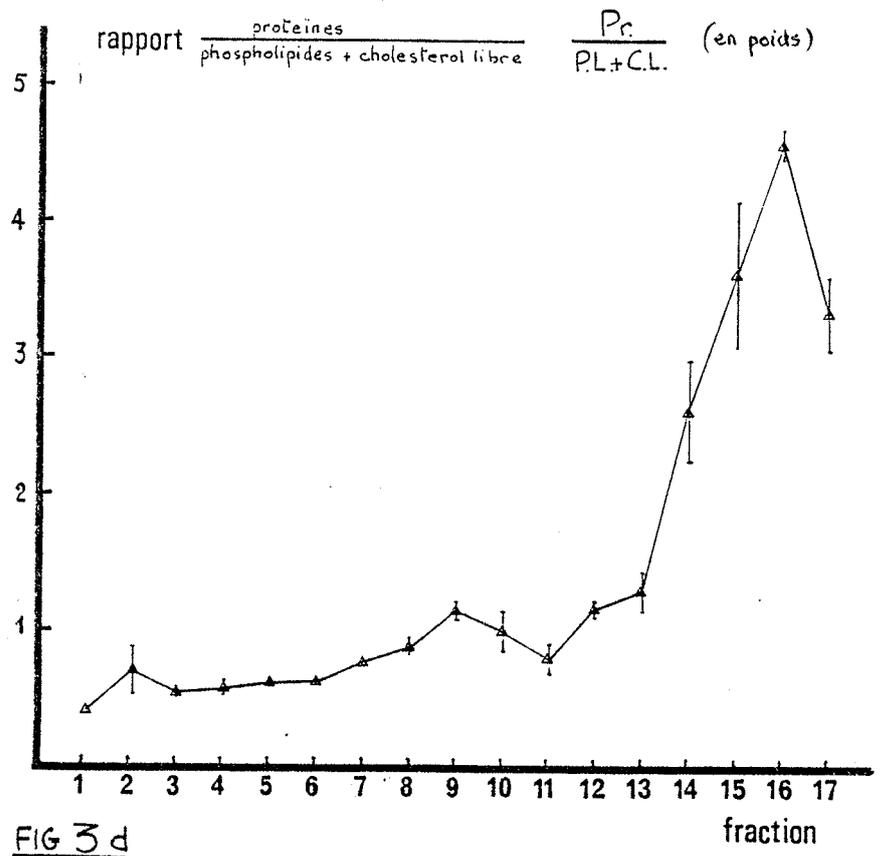
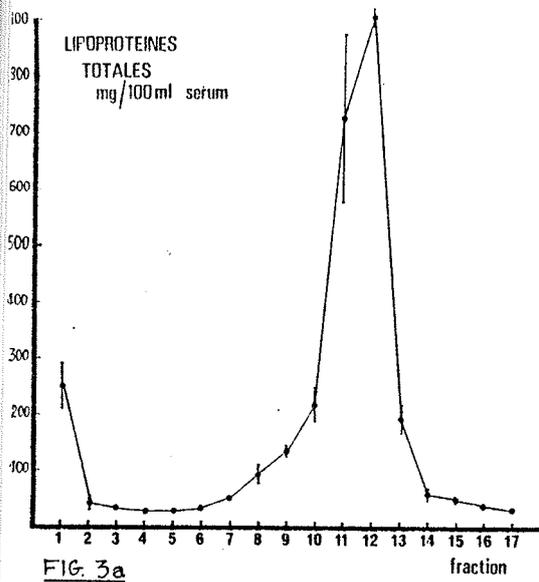


pour différencier les classes. Ce caractère de composition représente une image de la structure et de la "position" métabolique; il permet dans notre cas de distinguer les fractions 1 à 6 - la fraction 2 présentant un taux anormalement bas et probablement non significatif - des fractions suivantes; les LDL présentent un léger plateau (7,8,9) et le rapport baisse régulièrement dans les HDL de densités croissantes (11 à 13) pour se stabiliser aux très basses valeurs des HDL lourdes (14 à 17). Cette variation correspond à ce qu'on observe chez les mammifères.

L'état du cholestérol dans les lipoprotéines est représenté par le rapport cholestérol estérifié/cholestérol libre (fig.3b); la fig.3a représente l'importance de chaque classe de lipoprotéines chez la truite. On note d'abord une plus grande richesse en cholestérol libre que chez les mammifères notamment pour les LDL et HDL (environ 1 contre des rapports supérieurs à 5 pour l'homme); cela met l'accent sur la nécessité d'élucider les mécanismes de l'estérification plasmatique du cholestérol (LCAT) et de ses échanges. D'autre part, si les fractions 1 à 6 montrent une élévation régulière du rapport conforme au schéma métabolique des IDL (perte et estérification du cholestérol libre accompagnant l'hydrolyse des triglycérides), la fraction 7 présente un rapport très bas et à faible écart-type qui pose problème. Une relation de type précurseur-produit paraît peu probable entre les fractions 6 et 7. Les lipoprotéines de la fraction 7, par ailleurs assez peu abondantes (fig.3a), semblent donc avoir une origine particulière; il pourrait s'agir d'une sécrétion hépatique. Les LDL plus lourdes (fr.8,9 et 10) retrouvent un rapport CE/CL plus haut mais la présence de deux types de précurseurs (fr.1 à 6 et fr.17) pourrait en partie rendre compte de leur hétérogénéité précédemment soulignée. La même caractéristique s'observe pour les HDL avec la fr.13 assez riche en cholestérol libre, et qui pourrait comprendre des HDL natives (secrétées par le foie, ou l'intestin) ou bien ayant accepté des composants de surface des lipoprotéines légères, dont le cholestérol non estérifié.

Une autre caractéristique des lipoprotéines de la truite est le transport prédominant du cholestérol par les HDL, à la différence des lipoprotéines humaines ( $\frac{\text{Chol.LDL} + \text{VLDL}}{\text{Chol.HDL}} = 0,67$  chez la truite, 3 chez l'homme sain.).

La teneur des membranes en cholestérol libre influe directement sur leurs propriétés physiques (fluidité, stabilité) et elle est très différente entre les lipoprotéines légères et lourdes. Ainsi le rapport entre les lipides de surface (Phospholipides/Cholestérol libre Fig.3c) est très faible pour les fractions 1 à 9, influant donc sur les propriétés d'échange et



de stabilité des particules correspondantes. La relative constante de PL/CL (entre 3 et 4) pour ces fractions, contraste avec l'augmentation de CE/CL et souligne la perte de phospholipides en même temps que celle du cholestérol libre au cours de la lipolyse. (Concept de transfert aux HDL d'entités de matériel de surface -EISENBERG et al., in(10)).

Deux autres rapports sont analysés pour mieux caractériser les particules:

Le rapport Protéines/Phospholipides + Cholestérol (fig.3d) donne une image de la composition de surface. Les fractions très lourdes (14 à 17) se détachent très nettement par leur richesse en protéines et on peut se demander si elles ne résultent pas d'un artéfact de préparation (agrégation d'apoprotéines détachées des lipoprotéines) on ne peut cependant pas rejeter une signification métabolique (voie de dégradation des protéines des HDL par exemple). D'autre part, on observe à l'intérieur des classes un enrichissement de la surface en protéines quand la densité augmente (11 à 13; 7 à 9).

Le dernier rapport étudié est celui des lipoprotéines totales à la somme de matériel de surface (Pr + CL + PL dans les modèles présentés en introduction). A la densité des différents composants près, ce rapport devrait fournir une estimation du diamètre de la particule (Volume/Surface). Les résultats, fig.3e, montrent qu'il en est grossièrement ainsi. Dans la fraction 1, le rapport "anormalement" faible serait dû à une plus forte teneur en phospholipides; une différence de structure est peut-être la cause de cette anomalie.

Une représentation graphique des lipoprotéines de truite est présentée sur la fig.4 (pages suivantes). Elle permet de mieux visualiser leur composition ainsi que les liens métaboliques existant entre elles.

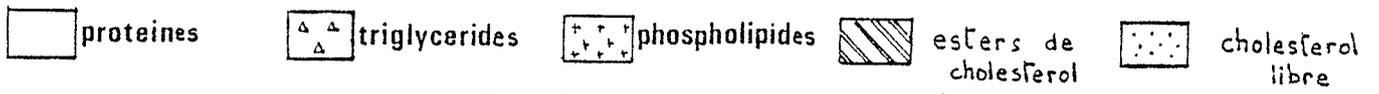
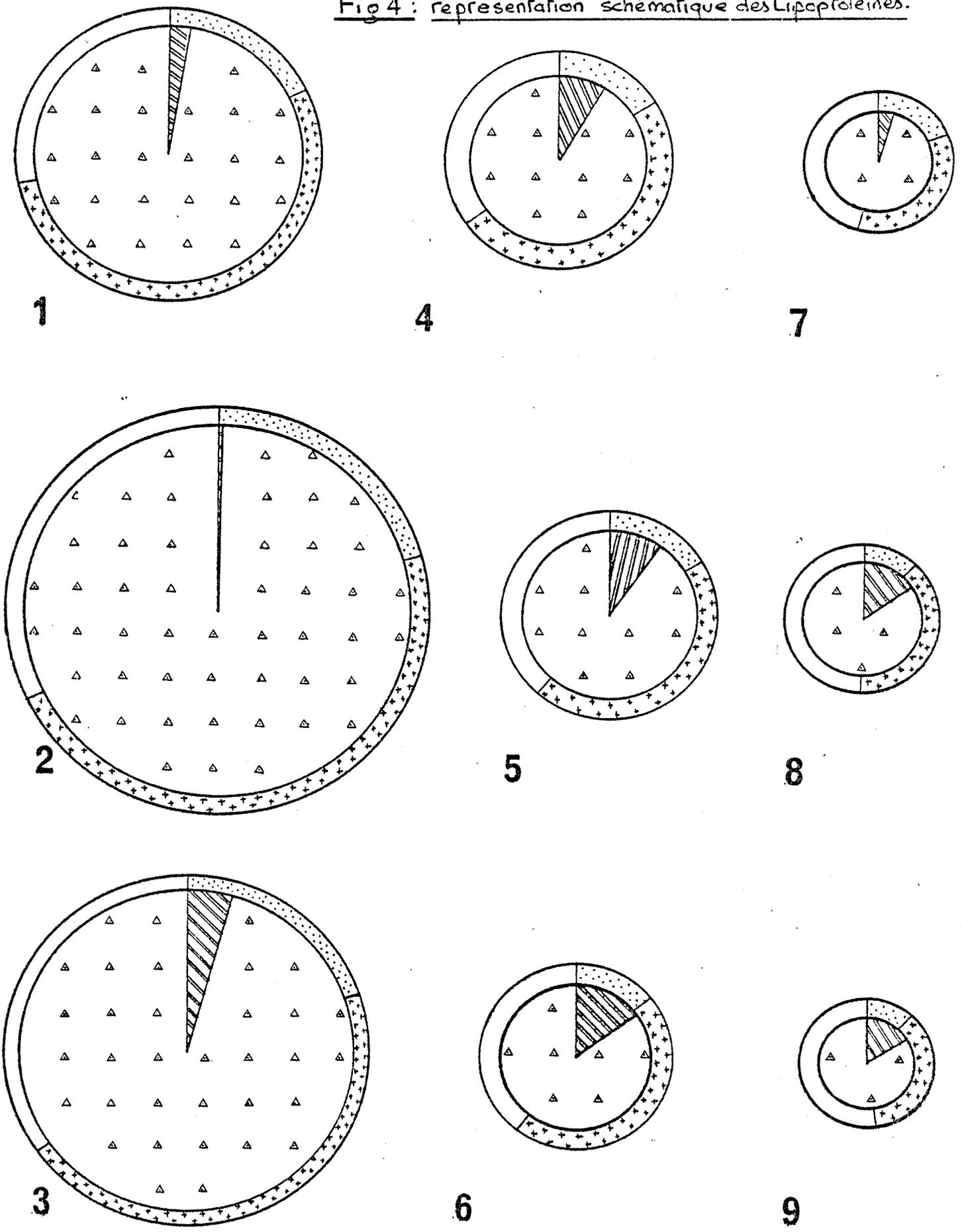
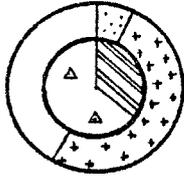
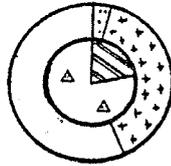


Fig 4 : representation schématique des Lipoproteines.

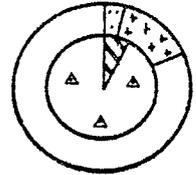




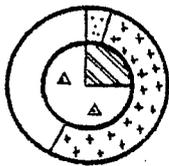
10



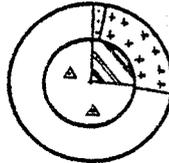
13



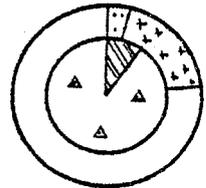
16



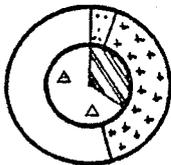
11



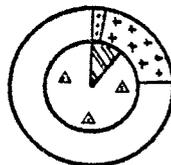
14



17



12



15

1) Rayon externe  $\propto \frac{L.P. \text{ tot.}}{CL + Pr + P.L.}$  ( soit la  
 masse des constituants totaux , soit aussi  
 masse des constituants de surface , soit aussi  
 grossièrement  $\frac{\text{volume de la particule}}{\text{surface de la particule}} .$  )

2) (Rayon interne)<sup>3</sup>  $\propto$  masse des constituants  
 internes .

3) Arcs externes  $\propto$  % du constituant considéré  
 par rapport aux constituants de surface .

4) Arcs internes  $\propto$  % du constituant considéré  
 par rapport aux constituants internes .

( $\propto$  = proportionnel à ...)

Principes de la représentation  
 des particules.

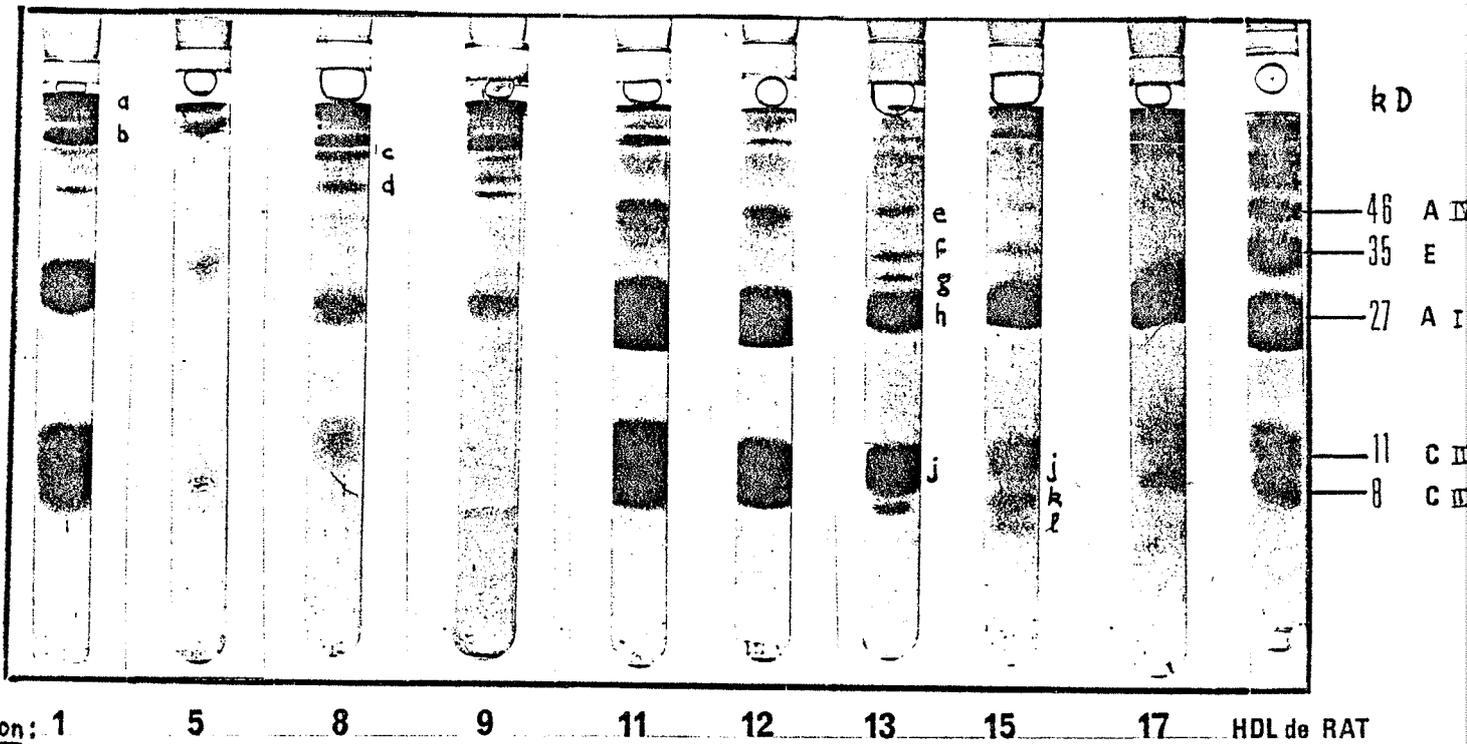


FIG 5 : ANALYSE DES POLYPEPTIDES DES DIFFERENTES FRACTIONS, sur gel de polyacrylamide (12% d'Acrylamide) en tampon SDS. PHOSPHATE.

CLASSE	HPOPOTEINE (P.M.)		>100.000	65 000 à 80 000	28.000 à 60.000	~25000	8000 à 14000	n *
	FRACTION							
VLDL "Chylomicrons"?	4-2		26 ± 3	8 ± 3	7 ± 2	29,5 ± 6	29,5 ± 8	3
IDL	3-6		36	21	14	14,5	14,5	1
LDL	7-8		38 ± 2	33 ± 4	11,5 ± 1	13,5 ± 2	4 ± 2	2
LDL'	9-10		40,5 ± 3	30 ± 1	14,5 ± 1	15 ± 2	-	2
HDL	11-12-13		1 ± 0,5	3 ± 0,5	8 ± 0,5	46 ± 4	42 ± 2	5
HDL'	14-17		1 ± 0,5	8 ± 2	9 ± 2	52 ± 4	20 ± 2	3

\* n = nombre de gels ayant servi à calculer les valeurs.

TABLEAU II : Composition en apoprotéines des lipoprotéines des différentes classes.

(en % du contenu protéique - en masse - ; Valeurs calculées par planimétrie sur les profils de gels colorés pour révéler les protéines [Bleu de Coomassie])

COMPOSITION EN APOPROTEINES :

Elle a d'abord été étudiée sur gels de polyacrylamide à 12% (Fig.5) La plupart des fractions ont été analysées chez plusieurs animaux et on distingue un nombre restreint de bandes protéiques, notées (a à I) (1). La comparaison avec les fonds de centrifugation et les protéines sériques (Fig.7, page suivante) montrent que se sont des protéines spécifiques. Quatre bandes peuvent être considérées comme majeures (a, b, h, j,).

Les bandes (a) et (b) ne sont présentes que dans les lipoprotéines riches en triglycérides; la bande (a) représente des protéines en tout point analogues aux Apo B humaines; elles seront analysées plus loin. La bande (b), de P.M. à 67-70kD ne semble pas avoir d'analogue chez les mammifères. Elle est peut-être liée au complexe lipoprotéique dense de vitellogenèse chez les truites femelles matures (analogue à la vitellogenine des oiseaux?); sa présence dans ce complexe (fig.7b) serait à confirmer. Une étude immunologique des lipoprotéines de l'oeuf, faite par SKINNER et ROGIE, (44) ne permet pas de ce faire une opinion à ce sujet.

La bande (h), souvent large, de P.M. estimé à environ 25 kD, correspondrait à l'Apo AI des mammifères. Comme Apo AI, on la retrouve principalement dans les fractions lourdes. Sa présence en quantité non négligeable dans la fraction 1 tendrait à confirmer la présence de chylomicrons qui chez les mammifères, sont riches en AI alors que les VLDL en sont dépourvues.

La quatrième bande majeure (j), de forte mobilité (P.M 12-14kD) se trouve dans les lipoprotéines très légères ainsi que dans les HDL les moins lourdes. L'analogie avec les mammifères porte ici sur les apoprotéines de la famille C (ou sur AII pour ceux qui en possèdent). L'hétérogénéité de cette bande est pressentie car certaines fractions montrent plusieurs bandes fines à ce niveau (Fr.15). Quelques bandes mineures apparaissent dans les HDL (e, f, g). La bande (e) de mobilité analogue à celle de AIV a cependant une distribution (prédominance dans les HDL les moins lourdes) analogue à Apo E. Les seules mobilités électrophorétiques ne permettent pas d'aller plus loin.

Le tableau II rapporte la répartition des différents groupes de P.M. dans les différentes lipoprotéines; on constate de nombreuses analogies avec les mammifères:

-Augmentation de la proportion des Apo B des VLDL vers les LDL' et absence dans les classes lourdes. Notons le même comportement pour la bande (b) qui pourrait donc être associée aux Apo B (métaboliquement ou physiquement).

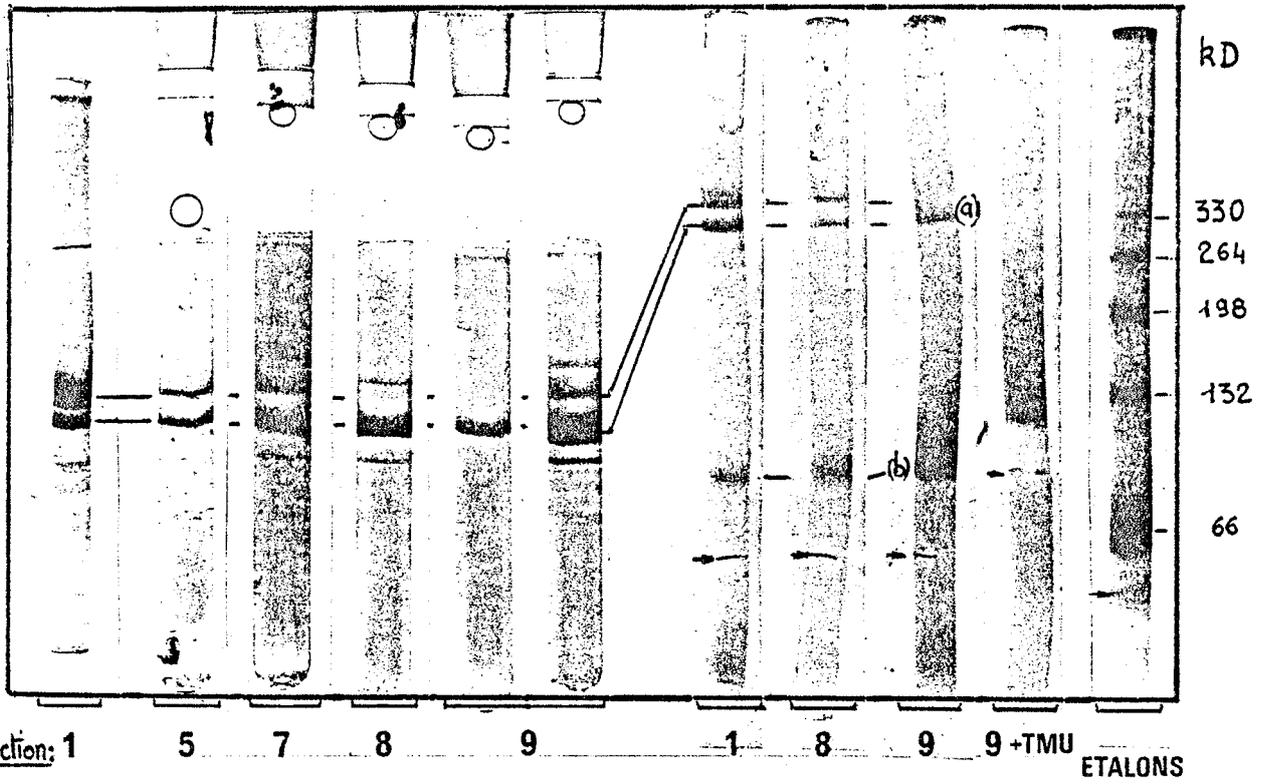


Fig 6: ANALYSE des APOPROTEINES de HAUT P.M. des FRACTIONS LÉGÈRES (VLDL et LDL). Gels à 3-4% en tampon TRIS (à gauche) Gels à 3% en tampon PHOSPHATE (à droite), les Flèches (→) indiquent la position du front de migration.

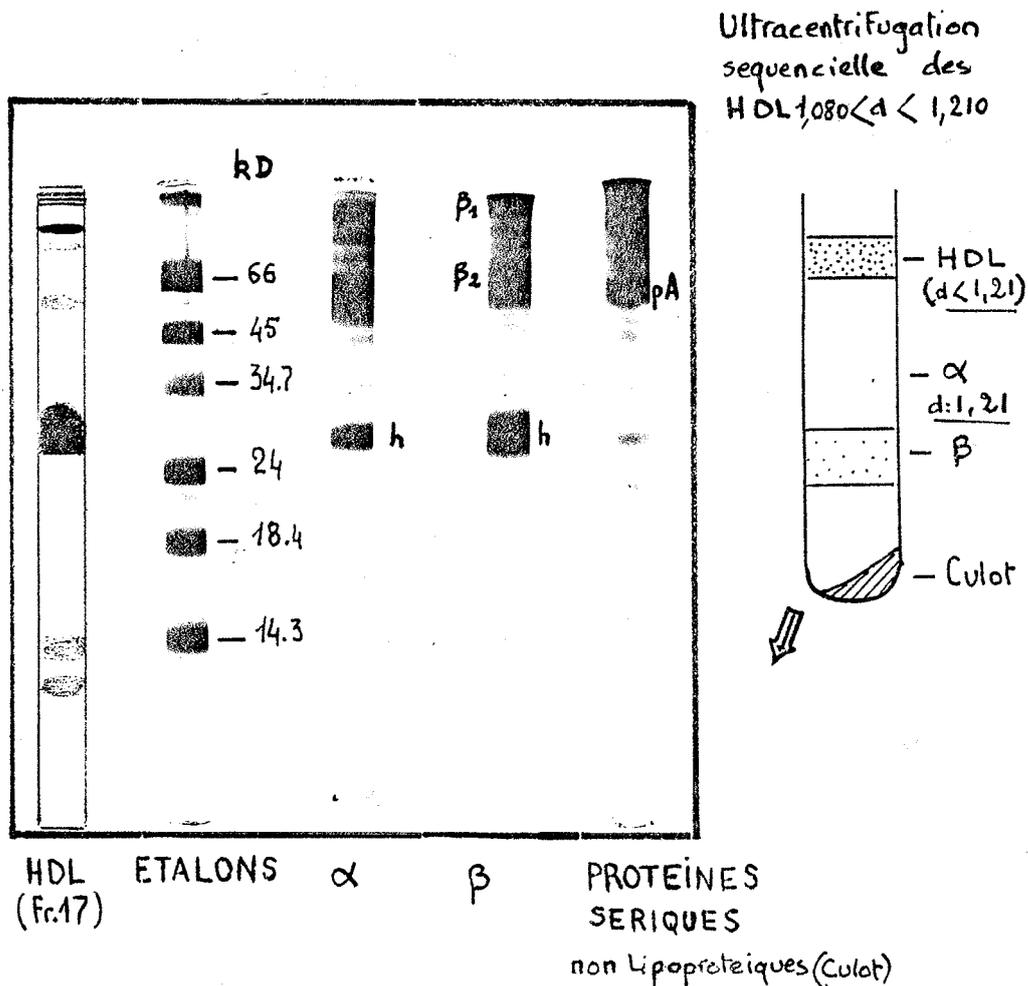


FIG 7: PROFILS POLYPEPTIDIQUES des "FONDS" de GRADIENT; LIPOPROTEINES ULTRA LOURDES ET POLYPEPTIDES NON LIPOPROTEIQUES. (Voir texte)

-Perte des apoprotéines légères des VLDL vers les LDL'. Ceci est un comportement d'Apo C, lié à la lipolyse; il sera donc utile de chercher une fonction Apo C (Apo CII, CIII...) parmi ces apoprotéines. Leur abondance dans les HDL est cependant supérieure à celle des mammifères.

-Perte aussi d'Apo AI des VLDL aux LDL' et augmentation notable dans les HDL ultralourdes.

Les apoprotéines de type "B" ont aussi été analysées sur gels à faibles teneurs en acrylamide permettant de les séparer (fig.6). Elles ont le même comportement que les Apo B<sup>humaines</sup>: mauvaise solubilité dans l'eau après délipidation; précipitation par le T.M.U., au contraire de la bande (b) qui n'en serait pas un fragment. Elles sont d'autre part hétérogènes et présentent deux bandes majeures vers 270kD et 300kD; en quantités analogues dans la fr.1, la bande "légère" prédomine dans les LDL. Cette différence métabolique<sup>ne</sup> permet cependant pas d'en conclure une analogie avec la différence entre Apo B intestinale et hépatique chez les mammifères (45,46).

La fig.7 analysant les fonds de centrifugation, permet de dégager les points suivants:

-les protéines sériques (notamment la para Albumine pA) ne semblent pas contaminer les lipoprotéines.

-la bande (h) soit "Apo AI" existe libre tout comme chez les animaux déjà étudiés (artefact de centrifugation ou sécrétion sans lipides?)

-La fraction  $\beta$ , formant une bande visible dans le tube, contient du matériel de haut P.M. =  $\beta_4$  (Vitellogenine?), ainsi qu'une bande  $\beta_2$  qu'il serait intéressant de comparer à (b).

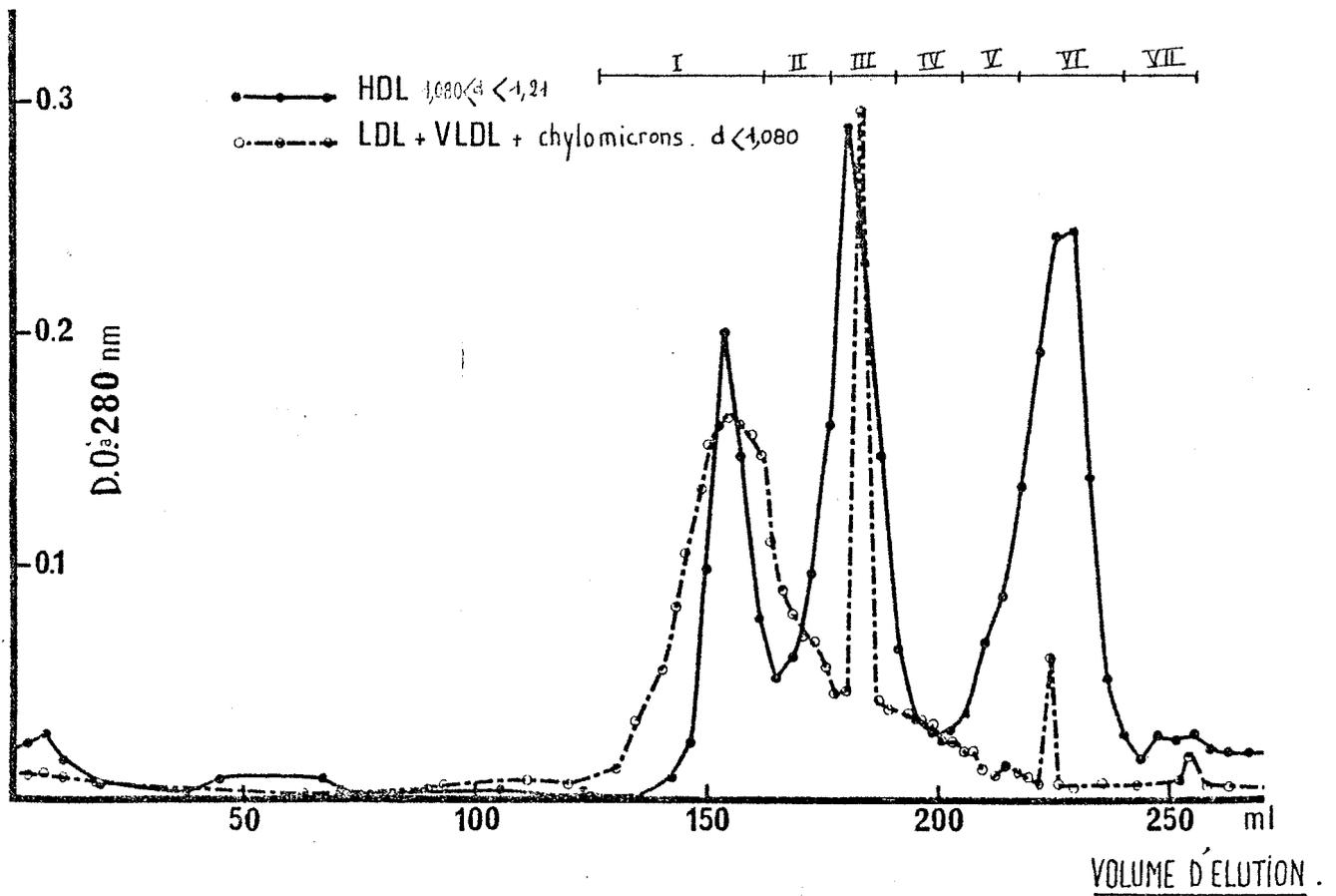


FIG. 8: SEPARATION des APOPROTEINES sur SEPHACRYL S200: COURBE D'ELUTION

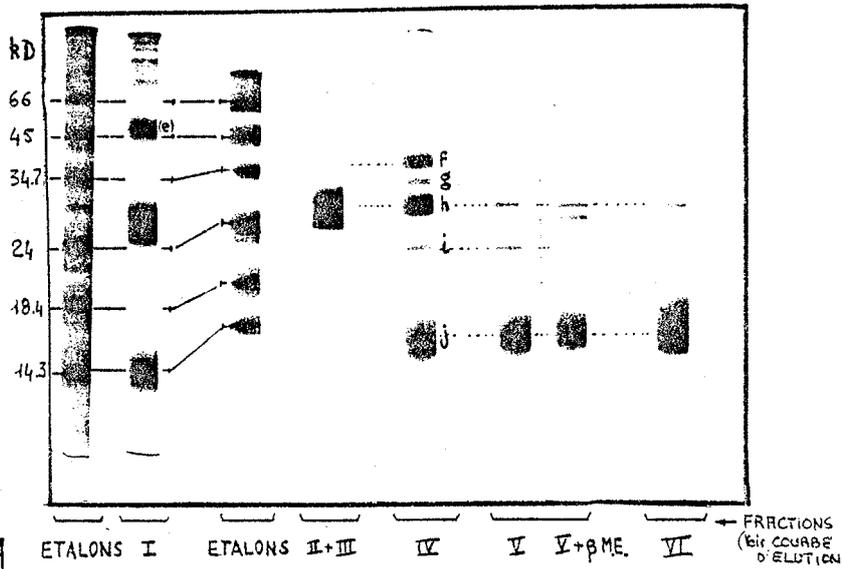


FIG. 9: PROFILS POLYPEPTIDIQUES des FRACTIONS de (HDL) SEPARÉES SUR SEPHACRYL S.200.

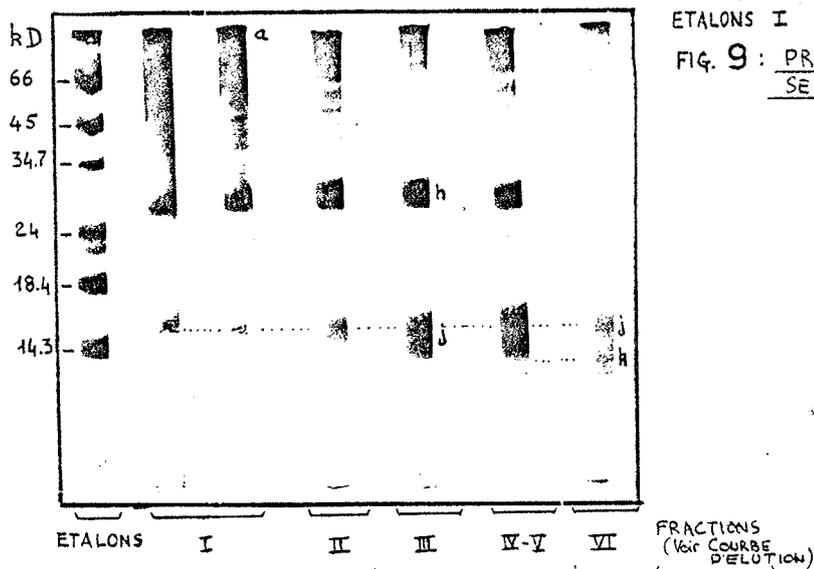


FIG. 10: PROFILS POLYPEPTIDIQUES des FRACTIONS de (VLDL+LDL) SEPARÉES SUR SEPHACRYL S.200.

PURIFICATION ET ANALYSE DE QUELQUES APOPROTEINES MAJEURES

Pour préciser plus avant leurs analogies avec celle des mammifères, certaines apoprotéines ont été purifiées à partir de HDL et des (LDL+LRT). Après délipidation, les apoprotéines ont été séparées par gel-filtration (100mg de protéines de HDL et 25mg pour les LRT+LDL). Le profil d'éluion est présenté en fig.8, et l'analyse en apoprotéines des pics est donnée par les fig.9 (HDL) et fig.10 (LDL+LRT):

-Les deux derniers pics (III et VI) contiennent respectivement les bandes des protéines majeures (a)(AI) et (h). Dans les HDL, ces fractions contiennent du matériel assez pur, alors que le matériel de haut P.M. semble contaminer la colonne des lipoprotéines légères.

-le premier pic, hétérogène, est apparemment un mélange de complexes non stoechiométriques ou de haut P.M. (Position du volume mort). Son importance est accrue dans les préparations les plus vieilles; cela montre l'importance des phénomènes d'agrégations de ces apoprotéines amphiphiles.

-La fraction HDL IV, intermédiaire entre les deux pics principaux, présente, outre les bandes de ces deux pics, des bandes de P.M. plus élevé (f et g). Ces bandes existent dans les HDL lourdes. Leur comportement anormal en filtration sur gel s'explique peut-être par une structure tertiaire particulière.

-la fraction V, intermédiaire elle aussi, contient une bande très faible (i; P.M. 21000) réductible au  $\beta$ -mercapto-ethanol. En raison de sa faible proportion, il n'a pu être déterminé s'il s'agit d'un dimère analogue à l'AIH humain ou d'une chaîne unique à pont disulfure interne.

Les protéines majeures (pics HDL III et HDL VI) ont été analysées pour leurs acides aminés totaux (Tableau III) et leurs acides aminés N et C terminaux:

HDL III a été comparée avec des fractions homologues extraites de Truites et de Saumon (27,44), mais aussi avec l'Apo AI humaine. Les analogies avec cette dernière sont assez significatives; les principaux écarts concernent les acides aminés LEU, ILE, ASP et ALA. Ce dernier écart est en accord avec les résultats sur les acides aminés terminaux:

-NH<sub>2</sub> terminal: un bon accord entre les méthodes existe pour ALA (avec LEU, SER ou LYS en deuxième position).

-COOH terminal: c'est aussi ALA qui domine. (SER, LYS en 2ème)

Cela plaide donc l'existence d'un seul polypeptide, de type AI, même si l'acide aminé terminal n'est pas Gln (toujours en C terminal de AI chez les mammifères).

### TABLEAU III

Resultats en moles / 100 moles d'Acides aminés.

Acide Aminé	(1)				(2)			
	-a-	-b-	-c-	-d-	-a-	-b-	-c-	-d-
	TRUITE "HDL III"	TRUITE SEPHADEX (Frac. II)	SAUMON DEAE - Cell. (Frac. 3)	AI humain	TRUITE "HDL VI"	SAUMON DEAE - Cell. (Frac. 2)	CI humain	AI humain
THR	5,55	4,3	5,3	4,2	3,5	2,30	10,9	8,1
VAL	6,43	6,7	6,5	5,4	8,1	9,19	5,2	7,6
MET	2,47	2,4	3,3	1,3	2,2	3,42	2,5	1,5
ILE	4,43	4,5	3,7	0	3,6	3,05	1,1	1,5
LEU	10,91	10,3	11,0	16,2	9,4	9,52	10,7	10,2
PHE	1,76	2,3	1,6	2,5	1,7	1,68	2,7	5,1
LYS	9,25	9,9	9,8	8,7	8,6	8,65	5,3	11,6
HIS	1,15	1,2	1,6	2,1	2,0	2,38	0	0
ARG	5,30	6,5	4,7	6,6	2,4	2,34	0,8	0
ASP	5,64	5,4	5,8	8,7	6,5	8,16	6,7	4,1
SER	4,34	4,1	4,9	5,8	3,7	3,12	12,2	8,1
GLU	20,20	18,1	19,9	19,5	15,8	13,36	18,8	19,8
PRO	4,16	4,8	3,8	4,1	5,7	5,82	5,0	5,2
GLY	2,31	2,6	2,1	4,1	9,4	9,42	3,0	4,3
ALA	12,41	13,2	12,0	7,9	11,6	11,02	9,3	6,7
TYR	3,63	3,7	4,0	2,9	5,9	6,70	6,0	4,6
CYS	-	-	-	-	-	-	0	1,5

Composition en acides aminés de deux Fractions de HDL (apo HDL)  
de truite — voir courbe d'élution de la colonne de Fractionnement —.

(1) moyenne de deux séparations différentes, chacune analysée en double.

(2) moyenne de deux analyses d'une même séparation.

(a) fraction analogue séparée sur Sephadex G 200 par SKINNER et ROGIE (44).

(b) Séparation de protéines de HDL de Saumon sur DEAE - Cellulose par NELSON & SHORE (27)

(c) d'après la structure primaire.

(d) d'après BROWN et al. (47) [HPO-Glu.]

Pour la fraction HDL VI, la composition en acides aminés ne correspond ni au CII ni à l'AIH humains et les acides aminés terminaux sont au moins au nombre de 4 ou 5 : cette fraction est donc bien hétérogène.

Cette hétérogénéité est encore confirmée par l'isoelectrofocalisation où 5 bandes importantes sont détectées dans des zones diverses de pH (fig.11). On voit en outre:

-que "AI" présente un profil analogue à l'AI humain, avec pour la truite deux isoformes prédominantes, de  $pH_i$  5,20 et 5,30 environ.

-que la fraction intermédiaire IV présente une bande nette ( $pH_i=4,6$ ) absente des fractions III et VI, elle pourrait correspondre à la bande protéique(f) des gels d'électrophorèse et cette propriété pourrait servir à sa purification.

Par traitement à la neuraminidase, aucun changement de mobilité n'est détecté: il n'y a donc pas de résidus d'acide sialique (cas des Apo CIII humaines).

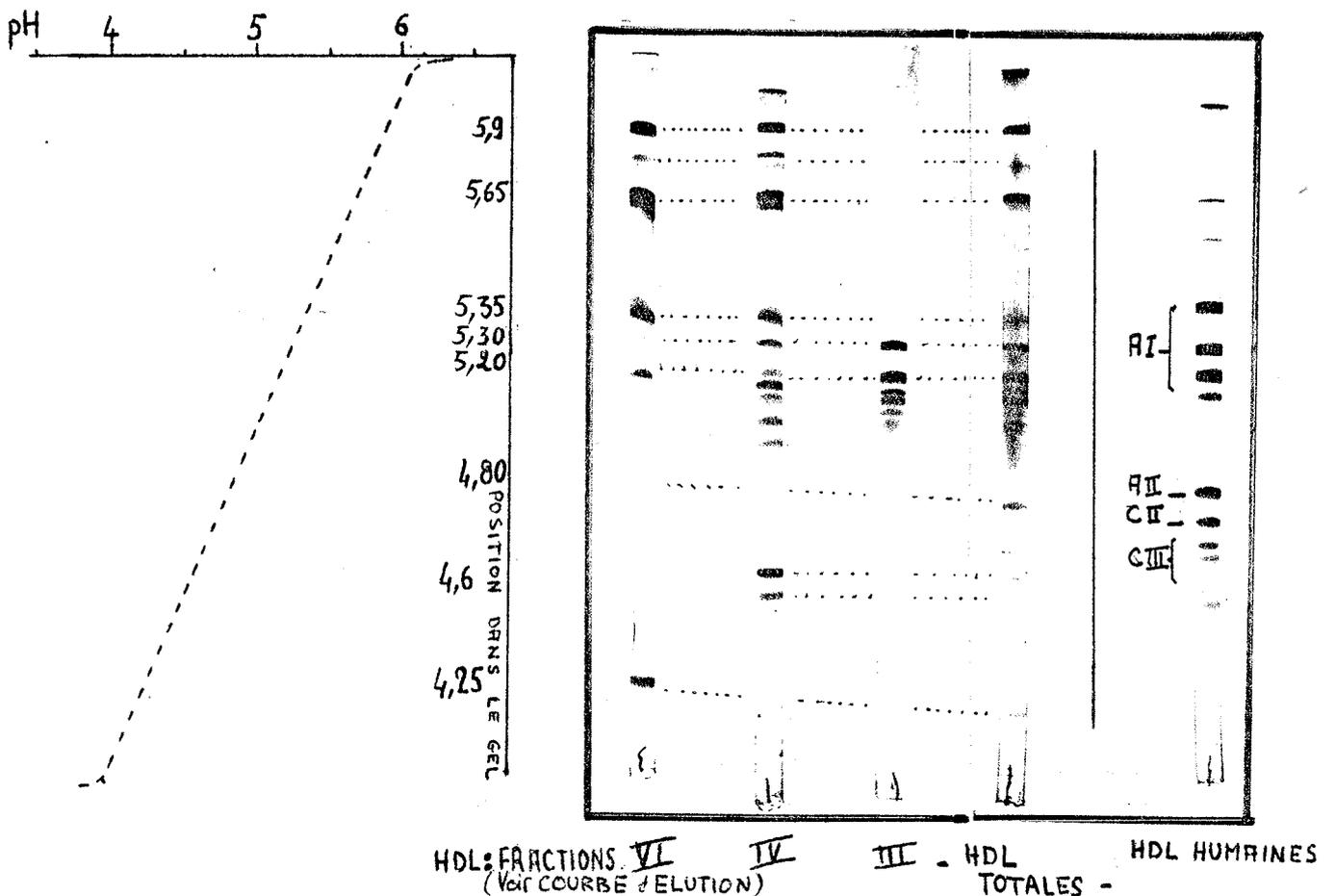


Fig. 11. ElectroFocalisation en gel d'Acrylamide de plusieurs fractions d'HDL.

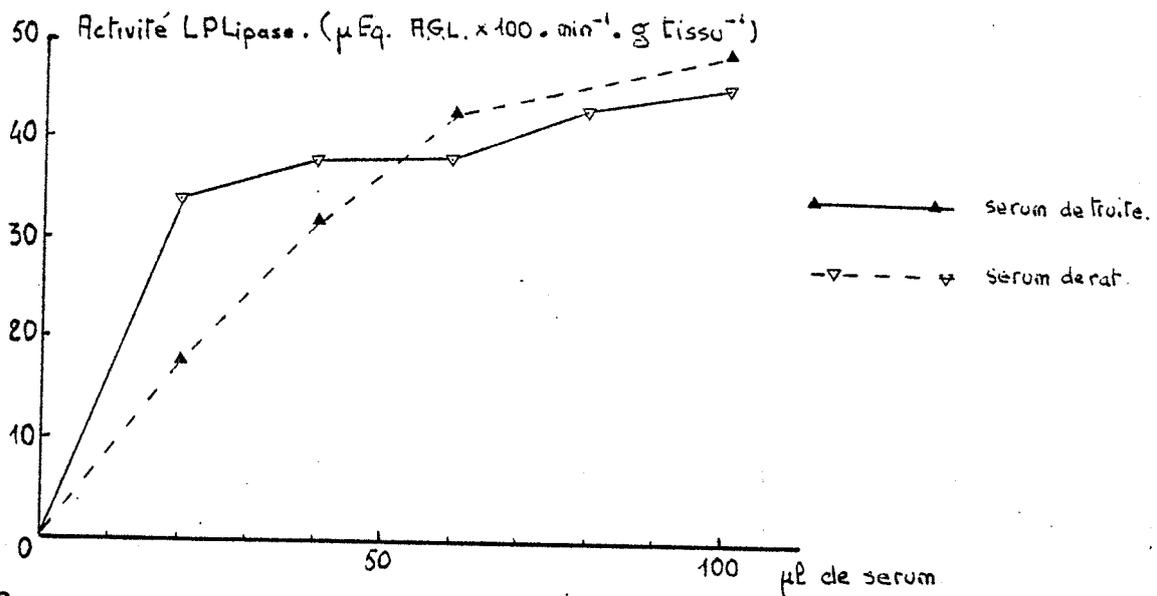


Fig 12: Courbes d'activation de LPLipase de rat (Tissu adipeux) par des serums de rat et de truite

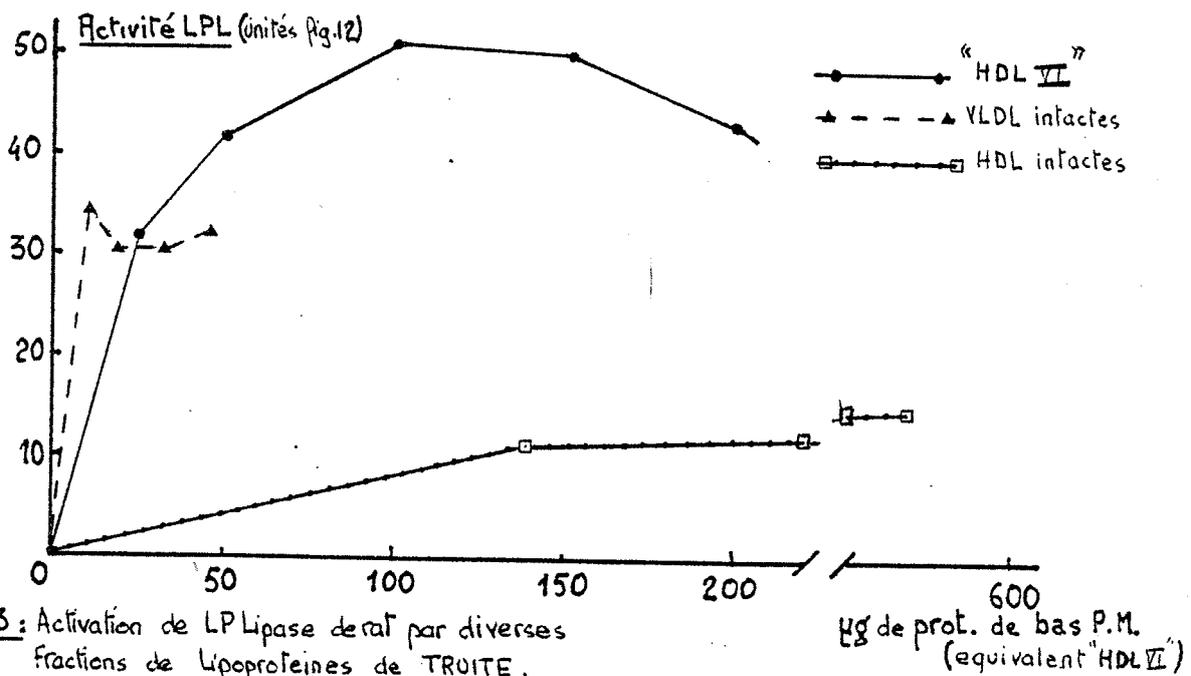


Fig 13: Activation de LPLipase de rat par diverses fractions de Lipoprotéines de TRUITE.

ACTIVATION DE LA LIPOPROTEINE LIPASE:

L'étude de la lipolyse des lipoprotéines légères a été abordée par la recherche d'une activité LPL dans certains tissus de truite et la caractérisation des cofacteurs de cette enzyme (Apo C).

.La LPL de tissu adipeux de rat est activée par du sérum de truite-fig.12- indiquant la présence d'un activateur de type Apo CII.

.La recherche d'une activité LPL dans certains tissus de truite a montré son existence, mais à des niveaux très faibles. Le Tableau IV résume ces résultats:

-TABLEAU IV-

	Température d'incubation			
	16°C	24°C	37°C	
Tissu adipeux	0,08	0,07	0,93	Avec sérum
	0,00	0,02	0,00	Sans sérum
Muscle cardiaque	0,07	0,04	0,06	Avec sérum
	0,00	0,02	0,00	Sans sérum

Activités LPL de deux tissus de truite pour 3 températures d'incubation. Résultats en  $\mu\text{Eq}$  d'acides gras libérés/min/g de tissu. L'activation se fait par du sérum de truite (Voir annexe A6).

Ces données très fragmentaires ne permettent pas de conclure sur les effets de la température. Trop de facteurs restent incontrôlés, notamment la nature du substrat lipidique et sa fluidité à ces températures. De même, l'éventualité d'un contrôle hormonal du niveau d'activité de la LPL dans les tissus (variations saisonnières) incite à la prudence pour commenter les faibles niveaux observés.

Les expériences suivantes portant sur l'activité cofacteur, elles ont été effectuées avec la LPL de tissu adipeux de rat (bonne activité, et disponibilité).

La fig.13 montre l'activation de cette LPL par des quantités croissantes d'apoprotéines de la fraction "HDL VI" et compare cette activation à celle obtenue par des HDL et des VLDL non délipidées. L'apo CII est donc bien contenue dans la fraction VI, et il semblerait que la présence de lipides dans les HDL ne favorise pas l'expression du caractère activateur, tout au moins en présence de substrat synthétique (Intralipide). La délipidation des HDL en élève l'activité à un niveau analogue à celui des VLDL ou des apoprotéines extraites.

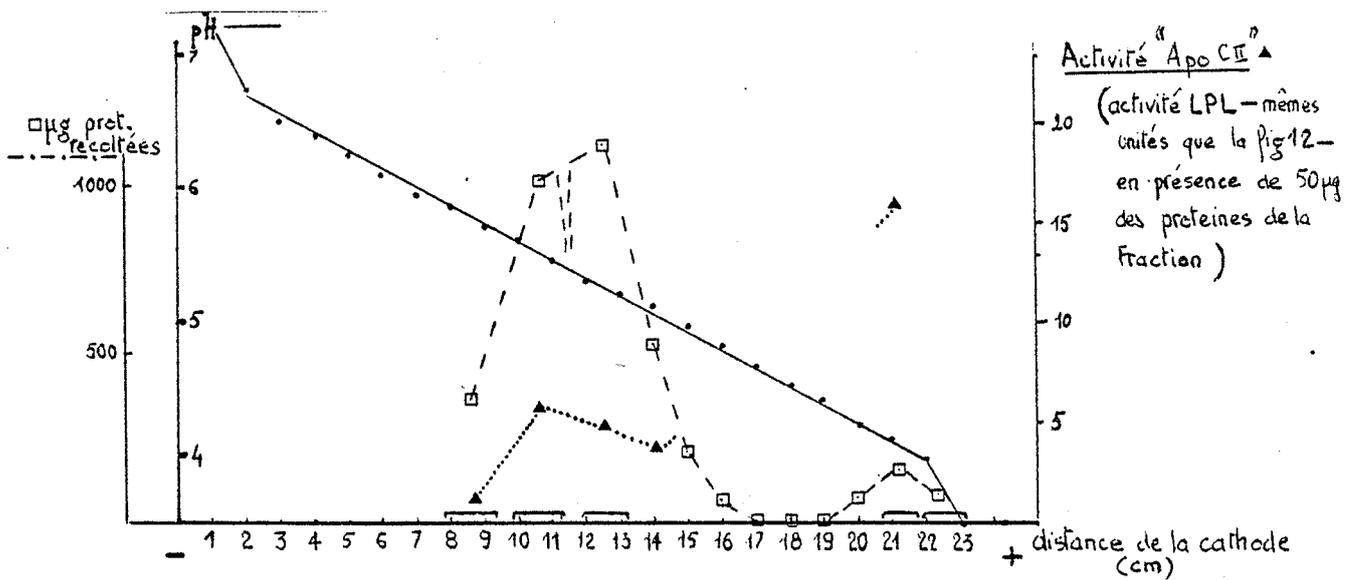


Fig 14: Isoelectrofocalisation préparative sur lit d'ultrodex (LKB) et activation de LP Lipase de rat par les fractions.

La fig.14 présente les résultats d'une isoelectrofocalisation préparative des apoprotéines de la fraction "HDL VI" et du dosage du pouvoir activateur de chacun des pics de protéines. On met en évidence une forte activité Apo CII dans une bande focalisant ici à pH 4,1 en absence d'urée. Cette protéine extraite et refocalisée dans les conditions des gels analytiques, c'est-à-dire en présence d'urée, se place à un pH de 5,35 correspondant bien à une apoprotéine majeure de la fraction VI. (fig.15. Fraction 22-23).

La présence de plusieurs protéines par fraction (fig.15) montre que des agrégats peuvent focaliser en absence d'urée et complique l'analyse des résultats de l'activation. On peut essayer de les interpréter en donnant un rôle inhibiteur (Apo CIII) à la bande de pH 5,65 qui est en abondance croissante de la fraction 10 vers la fraction 15 alors que l'activité décroît. Mais une meilleure purification est nécessaire pour conclure.

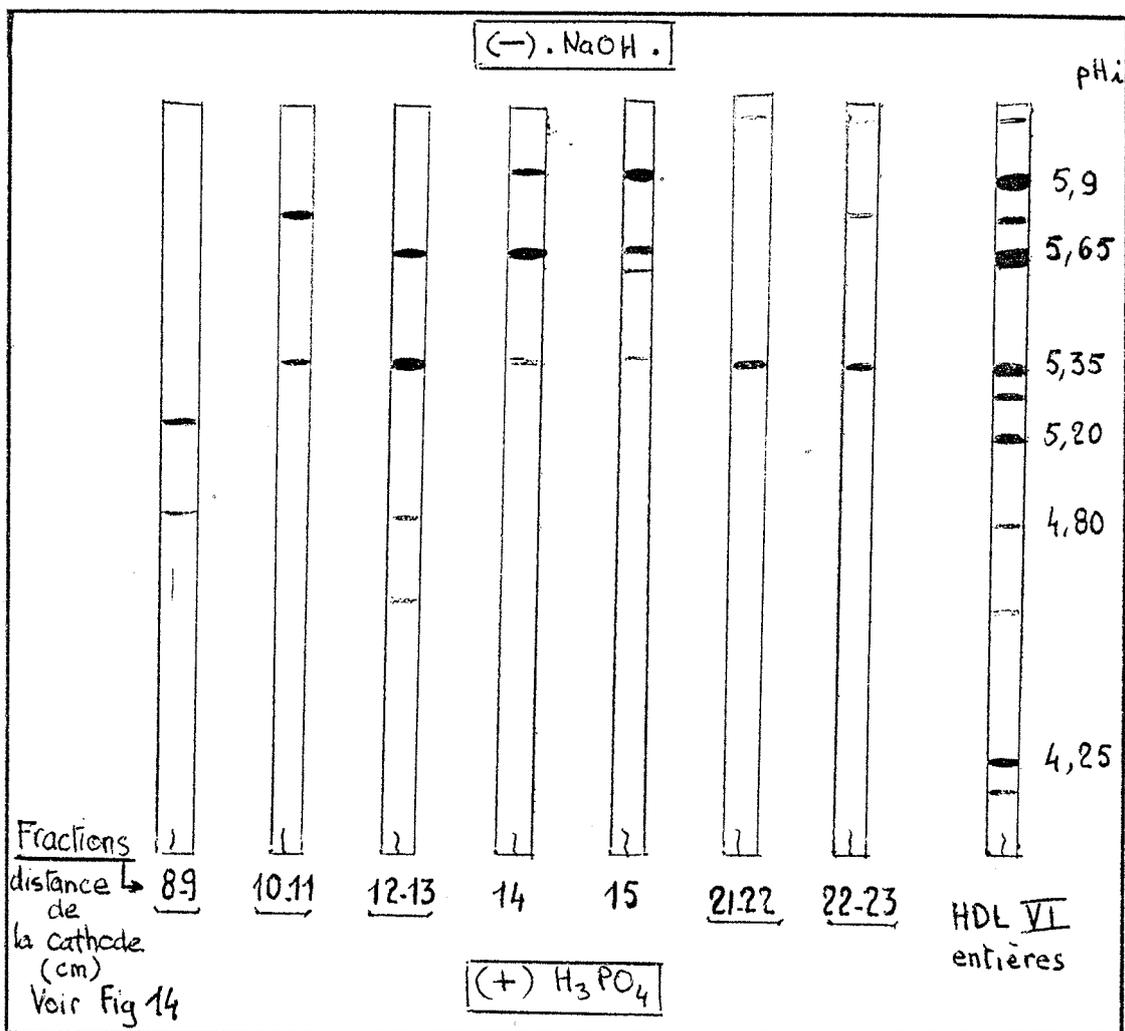


Fig 15 : Analyse en IEF/URÉE des Fractions obtenues en IEF préparative sur Lit d'Ultradex.

## CONCLUSIONS

L'ensemble des données disponibles sur les lipoprotéines de la truite montre qu'elles correspondent bien au même système d'organisation que celui observé chez les mammifères. Si la structure protéines-lipides est une "solution" simple adoptée tôt dans l'évolution pour le transport des lipides, il est remarquable que certains éléments de fonctions plus complexes l'aient aussi été (Système LPL/ApoCII— et LCAT/ApoAI?).

Les Salmonidés présentent toutefois quelques particularités intéressantes; À une faible protéïnémie globale du sang, ils associent:

- Un fort taux de lipoprotéines, dominées par les HDL.
- Une forte cholestérolémie et une importance du cholestérol libre.
- La présence d'apoprotéines spécifiques (Apo 70K)

Il faut d'autre part souligner que les résultats obtenus sont ceux d'un état particulier (début de repos sexuel et alimentation commerciale). Les études de composition devront par la suite être associées à une véritable approche nutritionnelle et métabolique. Une approche immunologique est aussi nécessaire pour l'étude des polypeptides mis en évidence; des travaux préliminaires ont été réalisés à ce sujet par PERRIER et al. (48) et SKINNER et ROGIE (29).

L'état actuel des connaissances sur les lipoprotéines des poissons, plus particulièrement des salmonidés, soulève un certain nombre de problèmes à approfondir:

- L'origine métabolique des diverses particules est à déterminer. Les techniques employées chez les mammifères peuvent être adaptées (Marquages in vivo, cultures organotypiques ou perfusions d'organes, ultrastructure des tissus producteurs).

- A un niveau d'organisation inférieur, le métabolisme cellulaire de certains organes mériterait qu'on s'y intéresse. L'entérocyte commence à être étudié (49) pour son rôle dans le système et le stockage des triglycérides. Le muscle (blanc ou rouge) pourrait aussi tenir une place importante dans le dépôt des lipides (50).

- L'étude approfondie des deux grands systèmes enzymatiques LPL et LCAT (avec la caractérisation fonctionnelle de AI?) est nécessaire pour en dégager les spécificités.

- Le rôle de la température sur le métabolisme et les propriétés physicochimiques des lipides circulants et membranaires est à étudier en relation avec la nature des acides gras du régime (30).

- L'influence précise du cycle sexuel sur les niveaux des différentes

classes est à déterminer (MARION et FREMONT données non publiées), de même que la participation des lipoprotéines à la constitution des réserves vitellines.

Bien d'autres points, soulignés ici et là dans ce compte rendu, justifient l'intérêt porté sur les lipoprotéines des poissons au cours des dernières années. Rappelons quand même que les Salmonidés ne représentent sûrement pas un modèle applicable à tous les poissons: les chondrychiens, notamment, présentent des particularités pouvant servir à un travail intéressant de physiologie comparée.

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1-CHAPMAN, J. (1980) -  
"Animal Lipoprotéins : chemistry, structure and comparative aspects". J.Lipid, Res., 21, 789-853.
- 2-MACHEBOEUF, M. (1929)-  
Recherches sur les phospho-amino-lipides et les stérides du sérum et du plasma sanguin; entraînement des phospholipides, des stérols et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protéines du sérum.  
Bull.Soc.Chim.Biol., 11, 268-293.
- 3-MAHLEY, R.W. (1981) -  
Cellular and Molecular Biology of Lipoprotein metabolism in atherosclerosis. Diabetes., 30, Sup.n°2, 60-65.
- 4-BEAUMONT, R.L., FREDRICKSON, D.S. & al. (1970) -  
Classification of hyperlipidemias and hypercholesterolemias. World Health Organ., 43, 891-908.
- 5-JACKSON, R.L., MORRISETT, J.D., GOTTO, M.G. (1976) -  
Lipoprotein structure and metabolism. Physiol Reviews., 56, n°2, 259-316.
- 6-SCHAEFER, E.F., EISENBERG, S., LEVY, R.T. (1978) -  
Lipoprotein apoprotein metabolism. J.Lipid.Res., 19, n°6, 667-687.
- 7-OSBORNE, J.C., BREWER, H.B. (1977) -  
The plasma lipoproteins. Adv.in Prot.Chemistry., 31, 253-337.
- 8-GREEN, P.H., GLICKMAN, R.M. (1981) -  
Intestinal Lipoprotein Metabolism. J.Lipid.Res., 22, 1153-1173.
- 9-MORRISETT, J.D., JACKSON, R.L., GOTTO, M.G. (1977) -  
Lipid protein interactions in the plasma lipoproteins  
Biochim.Biophys.Acta., 472, 93-133.
- 10-SCANU, A.M., LANDSBERGER, F.R. (1980) -  
Lipoprotein structure. Annals of the N.Y. Acad.of Sciences, 348, 436 p.
- 11-ALAUPOVIC, P. (1971) -  
Apolipoproteins and Lipoproteins. Atherosclerosis., 13, 141-146.
- 12-GOLDSTEIN, J.L., KAVANEN, P.T., BROWN, M.S. (1980) -  
Evolution of the LDL receptor concept -From cultured cells to intact animals. Annals of the N.Y.Acad.of Sciences., 348, 48-68.

- 13-VERDERY, R.B., NICHOLS, A.V. (1975) -  
Chem.Phys.Lipids., 14, 123-134.
- 14-HAVEL, R. (1980) -  
 Lipoprotein biosynthesis and metabolism.  
Annals of the N.Y.Acad.of Sciences., 348, 16-29.
- 15-NILSSON-EHLE, P., GARFINKEL, A.S., SCHOTZ, M.C. (1980) -  
 Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism.  
Ann.Rev.Biochem., 49, 667-693.
- 
- 16-COWEY, C.B., SARGENT, J.R. (1977) -  
 Lipid nutrition in fish. Comp.Biochem.Physiol., 57B, 269-273.
- 17-LEGER, C., FREMONT, L., BERGOT, P., FLANZY, J. (1979) -  
 Quelques recherches sur la digestion, l'absorption, le  
 transport et le stockage des lipides chez le poisson  
 Intérêt d'une biochimie comparée des lipides.  
Med.et Nutr., XV, n°1, 61-71.
- 18-FONTAINE, M. (1979) - Collectif, Direction.  
 Nutrition des poissons. Actes du Colloque CNERNA, PARIS,  
 Mai 1979., Ed. du C.N.R.S.
- 19-LEGER, C., BERGOT, P., FLANZYS, J., FRANCOIS, A.C. (1970) -  
 Mise en évidence d'une activité lipasique dans le pancréas  
 diffus de la truite. Etude des modalités d'action de l'enzyme  
 responsable. C.R.Acad.Sc., PARIS, Série D, 270, 2813-2816.
- 20-LEGER, C., BAUCHART, D., FLANZY, J. (1977) -  
 Some properties of pancreatic lipase in *Salmo Gardnieri* Rich:  
 Km, effects of bile salts and Ca<sup>++</sup>, gel filtrations.  
Comp.Biochem.Physiol., 57B, 359-363.
- 21-LEGER, DUCRUET, V., FLANZY, J. (1979) -  
 Lipase et colipase de la truite arc-en-ciel. Quelques  
 résultats récents. Ann.Biol.anim.Bioch.Bioph., 19, 285-832.
- 22-BERGOT, P., FLECHON, J.E. (1970) -  
 Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras  
 à chaîne longue chez la truite arc-en-ciel.  
Ann.Biol.anim.Bioch.Bioph., 10, 459-480.
- 23-ROBINSON, J.S., MEAD, J.F. (1973) -  
 Lipid absorption and deposition in Rainbow Trout.  
Can.J.Biochem., 51, 1050-1058.
- 24-SIRE, M.F., VERNIER, J.M. (1979) -  
 Formation de VLDL intestinales endogènes. Etude ultratru-  
 cturelle sur un nouveau modèle, l'embryon et l'adulte, à jeun,  
 de Truite. Biol.Cell., 35, 271-280.

- 25-SIRE, M.F., LUTTON, C., VERNIER, J.M. (1981) -  
New views on intestinal absorption of lipids in teleostean  
Fishes: an ultrastructural and biochemical study in the  
Rainbow Trout., J.Lipid.Res., 22, 81-94.
- 26-VERNIER, J.M. (1975) -  
Etude ultrastructurale des lipoprotéines hépatiques de très  
basse densité au cours du développement de la truite  
arc-en-ciel. J.Microsc.Biol.Cell., 23, 39-50.
- 27-NELSON, G.J., SHORE, V.G. (1973) -  
Characterization of the sérum high density lipoproteins  
and apolipoproteins of Pink Salmon.  
J.Biol.Chem., 249, 536-542.
- 28-CHAPMAN, J., GOLDSTEIN, S., MILLS, G., LEGER, C. (1978) -  
Distribution and characterization of the sérum lipoproteins  
and their apoproteins in the Rainbow Trout.  
Biochemistry., 17, n°21, 4455.
- 29-SKINNER, E.R., ROGIE, A. (1978) -  
The isolation and partial characterization of the serum  
lipoproteins and apolipoproteins of the Rainbow Trout.  
Biochem.J., 173, 507-520.
- 30-FREMONT, L., LEGER, C., BOUDON, M. (1980) -  
Fatty acid composition of lipids in the Trout.  
II Fractionation and analysis of plasma lipoproteins.  
Comp.Biochem.Physiol., 69B, 107-113.
- 31-LEGER, C., FREMONT, L., BOUDON, M. (1980) -  
Fatty acid composition of lipids in the Trout.  
I Influence of dietary fatty acids on the triglyceride  
fatty acid desaturation in serum, adipose tissue, liver,  
white and red muscle.  
Comp.Biochem.Physiol., 69B, 99-105.
- 32-REDGRAVE, T.G., ROBERTS, D.C., WEST, C.E. (1975) -  
Separation of plasma lipoproteins by density-gradient  
ultracentrifugation. Anal.Biochem., 65, 42-49.
- 33-PETERSON, G.L. (1977) -  
A simplification of the protein assay method of LOWRY et al.  
which is more generally applicable.  
Anal.Biochem., 83, 346-356.
- 34-LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) -  
protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J.Biol.Chem., 193, 265-275.

- 35-BRADFORD, M. (1976) -  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- 36-BROWN, W. V., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. (1969) -  
Studies of the proteins in human plasma very low density lipoproteins. J. Biol. Chem., 244, 5687.
- 37-KANE, J. P. (1973) -  
A rapid electrophoretic technique for identification of Subunit species of apoproteins in serum lipoproteins. Anal. Biochem., 53, 350-364.
- 38-WEBER, K., OSBORN, M. (1969) -  
The reliability of molecular weight determinations by S. D. S. P. A. G. E. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 39-LAEMMLI, ., FAVRE, . (1973) -  
J. Mol. Biol., 80, 575.
- 40-HAMES, B. D., RICKWOOD, D. (1981) -  
Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press., 290p.
- 41-O'FARRELL, P. H. (1975) -  
High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.
- 42-RADOLA, B. J. (1974) -  
Isoelectric focusing in layers of granulated gels. II préparative I. E. F. Biochim. Biophys. Acta., 386, 181-195.
- 43-de GASQUET, P., PEQUIGNOT, E. (1972) -  
Lipoprotein lipase activities in adipose tissues, heart and diaphragm of the genetically obese mouse (ob/ob). Biochem. J., 127, 445-447.
- 
- 44-SKINNER, E. R. et ROGIE, A. (1977) -  
"Trout Egg Lipoprotein and its relationship to normal serum lipoproteins". in "Protides of the biological fluids" Proc. 25th Colloquium, Brugge. Pergamon Press, p. 491-494.
- 45-KANE, J. P., HARDMAN, D. A., PAULUS, H. E. - (1980) -  
Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 2465-2469.
- 46-SPARKS, C. E., MARSH, J. B. (1981) -  
Metabolic heterogeneity of apolipoprotein B in the rat. J. Lipid. Res., 22, 519-527.
- 47-BROWN, W. V., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. (1970) -  
Further characterization of apolipoproteins from the human plasma very low density lipoproteins. J. Biol. Chem., 245, 6588-6594.

- 48-PERRIER, H., PERRIER, C., PERES, G., GRAS, J. (1979) -  
The lipoproteins of the plasma of the Rainbow Trout.  
Immuno-electrophoresis, selective precipitation and lipid  
composition.  
Comp. Biochem. Physiol., 62B, 245-248.
- 49-BAUERMEISTER, A. SARGENT, J. (1979) -  
Biosynthesis of triacylglycerols in the intestine of  
Rainbow Trout (*Salmo Gardnieri*) fed marine zooplankton  
rich in wax esters.  
Biochim. Biophys. Acta., 575, 358-364.
- 50-BILINSKI, E. (1969) -  
Lipid catabolism in fish muscle in Fish in Research.  
Ed. NEUHAUS HALVER, Acad. Press., N.Y., p.135.

## ANNEXE A1

### Dosages de Protéines

Méthode de G.L. PETERSON (Anal. Biochem. 83, 346-356. 1977)

Principe : - précipitation quantitative des protéines pour éliminer les substances interférentes si elles existent.

- solubilisation du précipité et dosage des protéines par réaction de FOLIN.

Produits : - STOCK : 1) CTC (Copper Tartrate Carbonate) : une solution à 20% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  est ajoutée lentement à une solution de Sulfate-Tartrate de Cuivre. Concentrations finales :

- 0,1%  $\text{Cu SO}_4 (5\text{H}_2\text{O})$
- 0,2% tartrate de Na,K
- 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

2) SDS 10%

3) Na OH 0,8 N

4) FOLIN (Ciocalten Phenol - MERCK)

- Travail : 1) 0,15% DOC (Deoxycholate de Sodium)

2) 72% TCA (acide trichloracétique)

3) BSA 1 mg/ml (pour la gamme)

4) réactif A : CTC, NaOH, SDS et eau en parts égales.

5) réactif B : FOLIN, eau - 1/5

Dosage : - précipitation : échantillon = 5 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines dans 1 ml.

- ajouter 0,1 ml DOC - Agiter - Laisser reposer 10 min.

- ajouter 0,1 ml TCA - Mélanger - Centrifuger 15 min. à 3000 g.

- retirer le surnageant.

- dissolution :

- amener à 1 ml avec de l'eau distillée

- ajouter 1 ml de A. Agiter. Laisser reposer 10 min. (dissolution)

- ajouter 0,5 ml de B. Agiter aussitôt.

- lecture : Après 30 min., lire à 750 nm dans les 2 heures qui suivent (Etalonnage non parfaitement linéaire)

Remarque : Pour un micro essai, tous les volumes sont divisés par 5.

## A1 (suite)

Méthode de BRADFORD (Anal. Biochem. 72, 248-254. 1976)

Principe : coloration des protéines par liaison quantitative avec du Bleu de Coomassie.

Produits : Une solution - réactif :  
Coomassie G 250 = 100 mg  
Ethanol à 95% = 50 ml  
 $H_3 PO_4$  (85% w/v) = 100 ml  
Eau distillée qsp 1000 ml

Dosage : échantillon : 10 à 100  $\mu g$  de protéines dans 100  $\mu l$  de tampon.

On ajoute 5 ml de solution-réactif. On agite. On laisse reposer 5 min. On lit dans les 20 min. à 595 nm.

\* \* \*

Pour les deux méthodes, l'étalon utilisé est la Serum Albumine Bovine (Gamme de 5 à 100  $\mu g$  de protéine).

## Dosages lipidiques

## Test-Combination Cholestérol libre

Méthode CHOD-PAP  
Test colorimétrique enzymatique  
Réf. 310 328 pour env. 45-90 dosages

**Méthode**  
Stähler, F., et coll., *Med. Lab.* 30 (1977) 29  
Trinder, P., *Ann. clin. Biochem.* 6 (1969) 24

**Principe**  

$$\text{Cholestérol} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{cholestérol-}}$$

$$\Delta^4\text{-cholesténone} + \text{H}_2\text{O}_2$$

$$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{amino-4 phénazone} - \text{onéol} \xrightarrow[\text{(monoimino-p-benzoquinone)-4 phénazone} + 4 \text{H}_2\text{O}]{\text{peroxydase}}$$

**Valeurs usuelles** pour le cholestérol libre  
22-30% du cholestérol total

**Bibliographie:** Wybenga, D. R., et Inkpen, J. A., *Lipids in*, Henry, R. J., et coll., *Clinical Chemistry: Principles and Technics*, 2<sup>e</sup> édition, Harper & Row, éd., Inc., New York, San Francisco, Londres, 1974, p. 1448

**Echantillon**  
Sérum, plasma recueilli sur heparine ou EDTA

Réactifs			
Contenu		Concentrations des solutions prêtes à l'emploi	
1 Tampon (phosphate de potassium) Phénol Méthanol		0,4 mol/l, pH 7,7 20 mmol/l 1,85 mol/l	
	2 Tampon (phosphate de potassium) Amino-4 phénazone Méthanol Hydroxypolyéthoxydodécane		0,4 mol/l, pH 7,7 2 mmol/l 1,85 mol/l 0,4 p. 100
		3 Cholestérol-oxydase/ Peroxydase	IV
IV			3 U/ml

**Contrôle de qualité**  
Pour le contrôle d'exactitude: Précitip® E.L.

## CHOLESTÉROL LIBRE

**Réactif :** Solutions 1-2-3 dans des proportions 10-10-0,1.

**Dosage :** échantillon 0 à 40 µg de Cholestérol dans 100 µl.

On ajoute 1 ml de réactif. On incube 20 min. à 20-25°C et on lit dans les deux heures à 505nm



## Cholestérol C-system

Méthode CHOD-PAP  
Test colorimétrique enzymatique

Réf. 290 319 pour env. 4 x 15 dosages (4 x 32 ml)  
Réf. 237 574 pour env. 4 x 50 dosages (4 x 100 ml)  
Réf. 236 691 pour env. 4 x 250 dosages (4 x 500 ml)

**Méthode**  
Klose, S., et Schumberger, H. (Boehringer Mannheim GmbH)  
Röschlau, P., Berni, E., et Gruber, W.,  
*9th Int. Congr. on Clin. Chemistry* Toronto 1975, Abstr. No. 1  
Trinder, P., *Ann. clin. Biochem.* 6 (1969) 24

**Principe**  

$$\text{Esters du cholestérol} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{estérase}]{\text{cholestérol-}}$$

$$\text{cholestérol} + \text{acides gras}$$

$$\text{Cholestérol} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{cholestérol-}}$$

$$\Delta^4\text{-cholesténone} + \text{H}_2\text{O}_2$$

$$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{amino-4 phénazone} - \text{onéol} \xrightarrow[\text{(monoimino-p-benzoquinone)-4 phénazone} + 4 \text{H}_2\text{O}]{\text{peroxydase}}$$

**Interprétation clinique**  
Le facteur de risque « hypercholestérolémie » peut être estimé en considérant les limites suivantes:  
douteux à partir de: 2,2 g/l ou 220 mg/100 ml ou 5,7 mmol/l  
élevé à partir de: 2,6 g/l ou 260 mg/100 ml ou 6,7 mmol/l

**Bibliographie:** Schettler, G., et Nüssel, E.,  
*Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed.* 10 (1975) 25

**Echantillon**  
Sérum, plasma recueilli sur heparine ou EDTA.

Réactifs		
Contenu		Concentrations dans le mélange réactionnel
Tampon phosphate		200 mmol/l, pH 7,9
Amino-4 phénazone		1 mmol/l
Phénol		5 mmol/l
Dichloro-3,4 phénol		5 mmol/l
Monoether d'alcool		
gras de polyéthylène glycol		0,48 %
Cholestérol-estérase		≥ 0,1 U/ml
Cholestérol-oxydase		≥ 0,14 U/ml
Peroxydase		≥ 0,12 U/ml

**Contrôle de qualité**  
Exactitude: Précinorm® U, Precipath® U, Précitip®, Precitip® E.L.  
Précision: Précinorm® UPX

## CHOLESTÉROL TOTAL

même protocole que pour le Cholestérol libre (mélange réactionnel unique décrit ci-contre).



# Test-Combination Triglycérides (Graisses neutres)

Méthode entièrement enzymatique

Test UV

Ref. 138 355 pour 3 x 8 dosages  
Ref. 126 012 pour 3 x 34 dosages  
Ref. 126 039 pour 4 x 90 dosages

## Méthode

Dosage enzymatique des triglycérides après hydrolyse enzymatique.

**Bibliographie:** mod. selon Wahlefeld, A.W., dans H.U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3<sup>e</sup> édition, tome II, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, p. 1878.

## Principe

Triglycerides  $\xrightarrow{\text{lipase/estérase}}$  glycérol + acides gras

Glycérol + ATP  $\xrightarrow{\text{GK}}$  glycérol-3-phosphate + ADP

ADP + PEP  $\xrightarrow{\text{PK}}$  pyruvate + ATP

Pyruvate + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{LDH}}$  L-lactate + NAD<sup>+</sup>

## Interprétation clinique

Le facteur de risque « hypertriglycéridémie » peut être estimé en considérant les limites suivantes:

douteux à partir de: 1.5 g/l ou 150 mg/100 ml ou 1.71 mmol/l

élevé à partir de: 2.0 g/l ou 200 mg/100 ml ou 2.29 mmol/l

**Bibliographie:** Schettler, G. et E. Nüssel, *Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed.* 10 (1975) 25.

Les valeurs usuelles suivantes ont été obtenues sur un groupe sélectionné:  
0.74-1.72 g/l ou 74-172 mg/100 ml ou 0.85-1.97 mmol/l

**Bibliographie:** Eggstein, M., *Klin. Wschr.* 44 (1966) 287

## Echantillon

Sérum, plasma recueilli sur héparine ou EDTA.

## Réactifs

Contenu	Concentrations des solutions prêtes à l'emploi
<b>1 Tampon</b>	
Tampon phosphate	20 mmol/l, pH 7
MgSO <sub>4</sub>	4 mmol/l
Dodécylsulfate de sodium	0.35 mmol/l
<b>2 NADH/ATP/PEP</b>	10 mmol/l; 22 mmol/l; 18 mmol/l
<b>3 LDH/PK/ lipase/estérase</b>	≥ 300 U/ml; ≥ 50 U/ml ≥ 4000 U/ml; ≥ 30 U/ml
<b>4 GK</b>	≥ 150 U/ml

## Contrôle de qualité

Domaine de la normale: Précinorm<sup>®</sup>U et Précilip<sup>®</sup>

Domaine pathologique: Précilip<sup>®</sup>E.L.

Pour le contrôle de la précision: Précinorm<sup>®</sup>UPX

## TRIGLYCERIDES

Réactifs (I) Solutions 1.2.3.  
dans les proportions 50.1.1.

(II) Solution 4 (GK)

Dosage : échantillon avec 0 à  
100 µg de Triglycerides dans  
100 µl.

- Ajouter 1 ml de réactif (I), agiter et incubé 10 min. à 20-25°C.
- Lire l'extinction E<sub>1</sub> à 340 nm.
- Ajouter 5 µl de réactif (II), mélanger et incubé 10 min. à 20-25°C
- Lire l'extinction E<sub>2</sub> à 340 nm.

$\Delta E = E_2 - E_1$  est une mesure de la quantité de triglycérides.

ANNEXE A3

Délipidations des lipoprotéïnes

1) Par précipitation à l'alcool-éther :

Pour 10 mg de protéïnes :

- Lyophiliser. Les prochaines opérations se déroulent à 0°C:
- Reprendre par l'alcool (15 ml). Agiter et laisser reposer 2 h.
- Rajouter 5 ml d'éther, agiter et laisser en contact une dizaine d'heures.
- Ajouter encore 10 ml d'éther, agiter et attendre une heure dans ce mélange alcool éther 1-1.
- Centrifuger 15 min., à 0°C, à 3000 g.
- Le surnageant est retiré.
- Deux extractions / centrifugations sont encore réalisées avec l'alcool éther 1-1, puis un lavage à l'éther.
- Les protéïnes sèches sont stockées à -30°C.

2) Par le T.M.U. (tetraméthyl Urée).

50 à 200 µl de lipoprotéïnes (contenant 50 à 200 µg de protéïnes) sont ajoutées à un volume égal de T.M.U. et à 1/10<sup>e</sup> de volume d'une solution réductrice (0,3 ml 2-mercaptoéthanol  
0,2 g d'EDTA  
qsp 10 ml H<sub>2</sub>O).

On agite, puis on procède :

- soit à une électrophorèse en SDS-PAGE. Les Apo B précipitées ne pénètrent pas dans le gel.
- soit à une centrifugation, lorsque les volumes sont assez importants;

Trois phases apparaissent : - une phase lipidique.  
- une phase de protéïnes solubles dans le T.M.U. (Elles peuvent être prélevées et analysées).  
- un culot de protéïnes insolubles (Apo B).

## ANNEXE A4

### Electrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

#### En Tampon Phosphate :

- Réactifs :
1. Solution d'Acrylamide à 30%, avec 0,8% de bis-Acrylamide.
  2. SDS 10% dans l'eau.
  3. TEMED
  4. Colorant : Bleu de Coomassie R 250 (0,1%), méthanol (50%), acide acétique (10%)
  5. Décolorant : a- méthanol 50%, acide acétique 10%  
b- acide acétique 10%
  6. Tampon : solution de phosphate mono sodique 0,5 M ajustée à pH 7,6.
  7. Peroxydisulfate d'Ammonium à 10%.

extemporanément

Préparation des gels : Dans les tubes (95 x 0,5mm) sont coulés 2 ml de la solution suivante (pour 12 gels)

- Acrylamide 30:0,8	10 ml
- Tampon PO <sub>4</sub> 0,5M	5 ml
- SDS 10%	0,25 ml
- TEMED	20 µl
- H <sub>2</sub> O	10 ml
+ - persulfate 10%	200 µl (catalyseur de polymérisation à rajouter juste avant le remplissage).

Tampon d'électrophorèse : Pour 1 litre : 200 ml de (6)  
+ 10 ml de (2)

#### Préparation et chargement de l'échantillon :

- 50 à 100 µg de protéines, dans 20 à 100 µl de tampon, sont additionnées d'1/5ème de volume de SDS 10%, maintenues à 100°C pendant 1 min., et on y ajoute une goutte de bleu de bromophénol glycérolé.

- le chargement des protéines sur les gels a lieu une fois la cuve montée et tous les tampons en place.

Déroulement de l'électrophorèse : 14 à 16 heures à température ambiante et sous une tension de environ ( mA par tube).

Les gels sont colorés pendant environ 3 heures (solution (4)), décolorés (solution (5)a) pendant une dizaine d'heures, puis conservés dans la solution (5)b.

#### Etalons de Poids moléculaire : Sigma (Dalton Mark VI)

. Lysozyme .	14300 (10 µg)
. β lactoglobuline .	18400 ( " )
. Trypsinogène .	24000 (20 µg)
. Pepsine .	34700 (50 µg)
. Ovalbumine .	45000 (15 µg)
. Serum Albumine Bovine .	66000 (15 µg)

#### Détermination des P.M. :

Droite de regression de :

$$\text{Log (P.M.)} = f(R_F)$$

$$R_F = \frac{\text{migration milieu de bande}}{\text{migration du Bleu (Front)}}$$

ANNEXE A4 (suite)

En Tampon TRIS : (LAEMMLI et FAURE -(39)-). Pour hauts P.M.  
(Apo B)

Réactifs : en plus des précédents

STOCK : 8. Tampon pour gel Supérieur (0,5M) :  
6,06 g. de Tris, 4 ml de SDS 10%, pH  
ajusté à 6,8 avec HCl. q.s.p. 100 ml

9. Tampon pour gel inférieur (2M) :  
24,22 g de Tris, 4 ml de SDS 10%, pH  
ajusté à 8,8 avec HCl. q.s.p. 100 ml

10. Solution réductrice : 0,6 g SDS, 3 ml  
β mercaptoéthanol, 3 ml de glycerol,  
0,23 g de Tris, 4 ml d'eau.

Conserver  
au froid  
(4°C)

Préparation des gels : Par tube : gel inférieur : 1,6 ml  
(4% d'Acrylamide)  
gel supérieur : 0,4 ml  
(3% d'Acrylamide)

<u>Pour 12 tubes</u> : Gel inférieur (20 ml)		Gel supérieur (10 ml)
Acrylamide 30/0,8	2,66 ml	1 ml
Tampon Tris (9) (2M)	3,75 ml	-
Tampon Tris (8) (0,5M)	-	1,2 ml
SDS 10%	0,20 ml	0,10 ml
TEMED	10 µl	6 µl
H <sub>2</sub> O	qsp. 20 ml	qsp. 10 ml
Persulfate	50 µl	80 µl

Tampon d'électrophorèse : 3 g de Tris, 14,4 g de glycine,  
10 ml de SDS 10%, H<sub>2</sub>O qsp 1 l.

Préparation et chargement : même opération qu'en Tampon P, mais  
m'échantillon est bouilli (2.3 min) en présence d'1/5 vol.SDS10%  
+ 1/5ème de volume de solution réductrice.

Déroulement de l'électrophorèse : 20.30 V, 1 mA par tube pendant  
12 heures.

La coloration a lieu (3 heures) en solution 4' (même composition  
que 4 mais avec du COOMASIE G 250) et la décoloration directement  
dans 5 b.

# ANNEXE A 5.

## ISOELECTROFOCALISATIONS.

a) Analytique: d'après O'FARRELL (J.B.C 250 4007-4021)

preparation du gel à 4%: pour 10 ml

Urée	5,50 g
Acrylamide	1,33 ml
28:1,6	
Ampholines	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 10 ml

- dégazer 30'

Ajouter

TEMED	7 µl
Persulfate 10%	10 µl

- couler les gels immédiatement. (1 ml par tube 130 x 2,5 mm)

préparation des échantillons:

- soit inclus dans le gel →
- soit chargés dans une solution d'Urée 8 M. (50 à 100 µg)

Tampons d'électrophorèse: Anode (+): H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
Cathode (-): NaOH

Déroulement de l'électrophorèse:

a. pré-focalisation des Ampholines: 15 mn à 200V  
30 mn à 300V  
30 mn à 400V

Charger les échantillons →

b. 10 à 15 h à 400-500V  
1 h à 600V (Total entre 6 et 10 mille V.h.)

Traitement des gels:

- Fixation 5 à 7 h dans le T.C.A. 10%
- Coloration dans une solution DIEZEL

Traitement à la neuraminidase: (SWANEY, GIDEZ ; JLR 18 (1977) p 63)

- 1 à 2 ml de solution de protéines (2 à 4 mg) sont ajoutées à un volume égal de solution d'acétate de Sodium à pH 5, et 1 ml d'une solution  $\frac{1}{50} \times 3 \text{ mg/ml}$  de neuraminidase Sigma 2776.
- l'incubation a lieu pendant 2h à 37°C et on dialyse ensuite contre de l'eau distillée, 16-18h à 4°C.
- la concentration se fait par lyophilisation.

## A 5 (suite)

b) Preparative: d'après Radola (BBA 386 (1974) p181-195) et la technique L.K.B.

Préparation du gel: - 5 ml d'Ampholines pH 4-6,5 (PHARMACIA).  
- 95 ml d'eau bidistillée.

Saupoudrer de 4 g d'Ultradex (LKB), en agitant et évitant la formation de grumeaux.

(On peut ajouter les protéines dans les 95 ml d'eau distillée.  
Éviter la présence de sels)

Verser le gel sur le plateau d'électrofacalisation (24,5 x 11 cm) muni de ses mèches imbibées d'Ampholines 5% (disposées le long du petit côté).

Évaporer jusqu'à la limite E.L. mentionnée pour chaque échantillon d'Ultradex. (Le poids initial exact du gel sur le plateau doit être connu)

Poser les mèches d'électrodes légèrement imbibées dans:  
-  $H_3PO_4$  1M (anode)  
-  $NaOH$  1M (cathode)

Installer le plateau sur la cuve d'électrophorèse munie des électrodes adéquates.

Déroulement de l'électrophorèse: - débuter à 500V (16 mA)  
- Finir à 1050V (7,5 mA)  
et maintenir le plus possible une puissance constante (8 W).

Détection des bandes: Par empreintes papier (Whatman n° 3) colorées au Bleu de Coomassie - voir technique LKB.

Prélèvement des bandes: Le gel est éloigné par une grille et les fractions sont prélevées à la spatule.

- les protéines sont extraites par élution dans une seringue avec de l'eau ou un éluant approprié (tampon UREA-TRIS)
- le pH est contrôlé sur des prélèvements de gels le long du plateau.

ANNEXE A6

Dosage - Activation de Lipoprotéine Lipase  
(d'après de GASQUET et al. Biochem. J. (1972) p.445)

- Réactifs :
- (1) Eau physiologique NaCl 9%.
  - (2) Tampon Tris pH 8,1 1,6M
  - (3) Tampon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM
  - (3') Tampon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hépariné : à (3) ajouter extemporanément 2 U. d'Héparine/ml de tampon.
  - (4) Solution d'héparine 5000 U/ml en solution physiologique.
  - (5) NaOH 5nM
  - (6) Tampon d'homogenat; pour 10 ml : 10 ml de (1), 400 mg de B.S.A. Fraction V (Sigma), 80  $\mu\text{l}$  de (4). Ajuster à pH 7,4.
  - (7) Acide palmitique étalon 2,25 nmol./l dans l'exane
  - (8) B.S.A. (Fr.V délipidée) à 18%. en solution physiologique à pH 8
  - (9) Mélange Dole :
    - 2-propanol 800 ml
    - Heptane 200 ml
    - $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N 20 ml
  - (10) Bleu de Nil : - Solution mère à 20 mg/100 ml dans l'eau
  - (10') Solution prête à l'emploi : (1) diluée au 1/10 dans l'alcool absolu.

Préparation du Tissu : (Adipeux, musculaire, cardiaque...)

- Prélèvement. Rinçage avec (1) à 0°C. Pesée précise 200 à 500 mg.
- Homogénéiser dans 3 à 4 ml de (6). Laisser en contact 5 min. (0°C)
- Récupérer quantitativement dans 150 ml d'acétone. Agiter et laisser en contact 15 min. (0°C).
- Filtrer sous vide sur Whatman n°1. Rincer par 2 x 50 ml d'acétone et 50 ml d'éther.
- Conservation sous vide (0°C) de la poudre pendant 24 à 48 h.

Incubation :

Préparation : 4 tubes par échantillon (2 x 65'; 2 x 5')

- a) Un blanc de LPL par série (65'; 5') : remplacer l'enzyme par un volume égal de 3'

- Par tube :
- 25  $\mu\text{l}$  d'Intralipide
  - 100  $\mu\text{l}$  d'activateur (sérum ou apoprotéïnes à tester)
  - 210  $\mu\text{l}$  de (8)
  - 70  $\mu\text{l}$  de (2)

pre-incuber 1/2 heure à 37°C

- b) enzyme : homogénéiser la poudre dans 12 ml de 3' (0°C)

incubation : durée 65' et 5' pour chaque essai

départ : adjonction de 400  $\mu\text{l}$  d'enzyme.

arrêt : adjonction de 5 ml de Dole et mise à 0°C.

ANNEXE A6 (suite)

Extraction à l'hexane :

- Après agitation 1 min. au Vortex (tubes bouchés), ajouter 1,4 ml d'eau et 3 ml d'heptane et agiter encore 30 sec.
- On peut conserver quelques jours à 0°C.

Dosage des acides gras libérés et extraits :

- Dosage Titrimétrique par la soude (5) en présence de bleu du Nil (10') : ajouter la soude à la microburette à 0,5 ml de 10' et 1,5 ml de phase hexane supérieure provenant des échantillons. Le mélange se fait par un filet d'Azote et le virage à la coloration rose.
- La gamme se fait en extrayant de l'acide palmitique à un mélange analogue : eau/hexane/Dole (2,2 ml/3 ml/5 ml).

## ANNEXE A7

Dosage des composants lipoprotéïques  
dans les fractions d'ultracentrifugation.

- A7a. Dosage des PROTEINES :
- valeurs brutes par fraction pour chacune des 4 truites.
  - moyenne et écart-type par fraction, sur 4 truites.
  - moyenne et écart-type par fractions poolées (classes), sur 4 truites.
  - dosage des protéïnes des lipoprotéïnes totales ( $d < 1,21$ ), des fonds de centrifugation ( $d > 1,21$ ) et du sérum, pour chaque truite.
- A7b. Idem pour le Cholestérol Total
- A7c. Idem pour le Cholestérol Libre
- A7d. Idem pour les Triglycérides, mais sur 2 animaux
- A7e. Idem pour les Phospholipides.
- A7f. Moyennes et écarts-types moyens sur 2 truites.
- des teneurs en lipoprotéïnes totales par fraction.
  - des compositions relatives de chaque fraction en ses différents composants.



Cholesterol

mg. 100 ml<sup>-1</sup>

A7 b

M = moyenne  
s = ecart. type

Fraction	Traité I	Traité I	Traité III	Traité IV	M	n=4 s	Classe	M	s
1	16,4	11,1	25,4	20,5	18,4	6,1	①	18,4	6,1
2	2,1	1,5	0,7	3,4	1,9	1,1			
3	2,2	1,7	5,1	3,7	3,2	1,5	②	19,0	6,7
4	2,5	2,2	5,5	4,4	3,7	1,6			
5	3,3	2,6	5,8	5,5	4,3	1,6			
6	4,2	4,2	8,7	6,8	6,0	2,2			
7	6,3	5,9	10,8	7,8	7,7	2,2			
8	16,9	8,9	12,7	12,8	12,8	3,3	③	20,5	4,0
9	20,3	12,8	18,6	21,1	18,2	3,7			
10	21,9	18,7	34,5	26,4	25,4	6,9	④	43,6	9,2
11	44,1	78,4	25,9	35,7	46,0	22,8			
12	68,3	64,8	63,0	98,0	73,5	16,5	⑤	141,9	21,1
13	9,8	7,4	38,5	33,9	22,4	16,1			
14	3,1	2,8	7,7	4,3	4,5	2,2			
15	1,4	1,5	2,7	2,4	2,0	0,6	⑥	9,7	2,9
16	1,3	1,4	1,7	1,7	1,5	0,2			
17	1,7	.	1,5	1,9	1,7 <sup>n=3</sup>	0,2			
LPP Σ	226	226	269	290	253	32			
LPP Totales	193	223	266	263	236	35			
Fond	6,4	25,7	5,3	27,1	16,1	11,9			
Sérum	217	275	320	365	294	63,3			

VLDL

IDL

LDL

LDL'

HDL

HDL'

Cholesterol libre.

mg. 100 ml<sup>-1</sup>

A7c

M̄ = moyenne  
S = écart type

Fraction	Traite I	Traite II	Traite III	Traite IV	M̄	n=4 S	Classe	M̄	S
1	15,4	11,3	15,8	15,4	14,5	2,1	①	14,5	2,1
2	2,9	1,3	1,4	2,4	2,0	0,8			
3	2,0	1,6	2,8	2,1	2,1	0,5	②	12,1	2,2
4	1,7	.	2,8	2,2	2,2 <sup>n=3</sup>	0,5			
5	2,3	1,9	3,2	3,2	2,7	0,7			
6	2,3	2,3	4,1	3,5	3,1	0,9			
7	7,2	5,5	8,1	6,6	6,9	1,1			
8	.	6,0	8,6	.	7,3 <sup>n=2</sup>	1,8	③	14,2	2,1
9	.	11,2	.	.	11,2 <sup>n=1</sup>	-			
10	11,6	12,3	3,5	.	9,1 <sup>n=3</sup>	4,9	④	20,3	4,0
11	21,1	35,9	14,6	16,9	22,1	9,6			
12	27,8	31,7	29,5	41,6	32,7	6,2	⑤	69,1	10,1
13	5,8	5,3	26,2	19,8	14,3	10,4			
14	1,3	1,3	3,1	2,0	1,9	0,9			
15	0,9	0,9	1,4	1,8	1,3	0,4	⑥	5,2	1,3
16	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	0,1			
17	0,8	.	1,0	1,1	1,0 <sup>n=3</sup>	0,1			
LPP Σ	121	123	137	143	131	10,7			
LPP Totales									
Fond									
Sérum									

VLDL

IDL

LDL

LDL'

HDL

HDL'

Triglycerides

mg. 100 ml<sup>-1</sup>

A7d

$\bar{M}$  = moyenne  
s = écart-type

Fraction	Truite I	Truite I	Truite III	Truite IV	$\bar{M}$	n=2 (s)	Classe	$\bar{M}$	s
1	205	145,6	.	.	175,3	42,0	①	175,3	42,0
2	40,8	25,6	.	.	33,2	10,7			
3	21	30,1	.	.	25,6	6,4	②	105,6	3,5
4	15,6		..	..	15,6 <sup>ns1</sup>	-			
5	16,3	15,1	..	..	15,7	0,8			
6	14,3	16,7	..	..	15,5	1,7			
7	17,9	19,0	..	..	18,4	0,8			
8	.	29,8	..	..	29,8 <sup>ns1</sup>	-	③	48,3	0,7
9	.	36,6	..	..	36,6 <sup>ns1</sup>	-			
10	32,5	31,5	..	..	32,0	0,7	④	68,6	1,0
11	59,3	84,2	..	..	71,8	17,6			
12	92,8	78,4	..	..	85,6	10,2	⑤	186,2	1,1
13	34,8	22,8	..	..	28,8	8,5			
14	5,9	8,2	..	..	7,1	1,6			
15	7,1	6,8	..	..	7,0	0,2	⑥	28,4	0,7
16	7,8	6,8	..	..	7,3	0,7			
17	7,1	.	..	..	7,1 <sup>ns1</sup>	-			
LPP $\Sigma$	578	557	..	..	568	15			
LPP Totales									
Fond									
Sérum	1275	890			1083	272			

VLDL

LDL

LDL

LDL'

HDL

HDL'

Phospholipides

mg. 100 ml<sup>-1</sup> A7 e

$\bar{M}$  = moyenne  
s = écart-type

Fraction	Truite I	Truite II	Truite III	Truite IV	$\bar{M}$	s	Classe	$\bar{M}$	s
1	48,0	34,8	61,0	55,7	49,9	11,4	①	49,9	11,4
2	4,8	3,6	1,9	7,1	4,4	2,2			
3	4,8	3,6	7,4	7,3	5,8	1,9	②	34,8	8,3
4	5,0	.	8,1	7,9	7,0 <sup>n=3</sup>	1,7			
5	6,4	5,4	8,9	10,8	7,9	2,4			
6	7,9	7,6	12,0	11,8	9,8	2,4			
7	12,1	11,2	14,6	13,5	12,9	1,5			
8	29,6	15,2	17,0	20,3	20,5	6,4	③	33,4	6,4
9	34,9	32,0	23,5	30,4	30,2	4,8			
10	71,8	112	71,8	57,8	78,4	23,4	④	108,6	24,8
11	308,0	332,5	129,5	217	246,6	92,5			
12	343	311,5	308	385	337	36	⑤	756,0	59,5
13	84,0	47,3	327	231	172,3	130,1			
14	11,8	12,5	34,1	21,1	19,9	10,4			
15	6,2	12,6	10,7	10,2	9,9	2,7	⑥	40,5	11,9
16	4,5	4,2	5,6	6,3	5,2	1,0			
17	5,2	.	4,7	6,6	5,5 <sup>n=3</sup>	1,0			
LPP $\Sigma$	945	956	1046	1093	1010	71,5			
LPP Totales	928	1056	992	1312	1072	168			
Fond	14,7	130	20,3	77,3	60,6	54,2			
Sérum	1480	1460	1340	2120	1605	347			

VLDL

IDL

LDL

LDL'

HDL

HDL'

mg/100 ml  
de SERUM

en % des Lipoprotéines totales.

R7F

FRACTIONS	LIPOPROTEINES TOTALES		PROTEINES CHOLESTEROL →				TRIGLYCERIDES PHOSPHOLIPIDES				CLASSES		
	±	±	±	±	TOTAL ±	LIBRE ±	±	±	±	±			
1	252,0	41,2	8,6	0,5	5,4	0,2	5,2	0,2	69,5	0,4	16,4	0,1	① VLDL
2	42,2	8,8	7,2	0,9	4,3	0,2	4,1	0,1	78,4	1,8	10,1	0,7	
3	34,9	3,2	9,4	2,3	5,7	1,2	5,3	1,1	72,6	6,4	12,3	2,8	
4	28,3	0,9	15,2	0,2	8,3	0,8	6,9	0,7	55,3	1,8	21,1	2,8	② IDL
5	29,7	1,7	17,2	0,3	9,9	0,6	7,1	0,3	53,0	0,9	19,9	0,6	
6	34,1	1,4	19,5	0,2	12,3	0,5	6,8	0,3	45,4	1,7	22,8	1,4	③ LDL
7	51,5	3,0	29,4	4,0	11,9	0,3	11,7	0,9	36,1	3,2	22,8	0,5	
8	93,7	18,2	30,2	1,6	13,4	1,7	7,2	0,7	33,1	6,4	23,3	3,2	
9	135,9	10,7	36,2	1,2	12,0	1,8	8,3	0,7	27,1	2,1	24,7	0,9	④ LDL'
10	219,8	34,1	34,1	2,0	9,6	2,2	5,5	0,7	15,0	2,5	41,4	2,7	
11	733,3	152	36,6	7,5	8,2	0,6	3,8	0,2	9,9	0,4	45,3	7,8	⑤ HDL
12	899,5	16,0	46,7	1,8	7,4	0,1	3,3	0,3	9,5	0,6	36,4	1,1	
13	192,0	27,6	47,1	5,7	4,5	0,0	2,9	0,3	14,9	1,0	33,5	4,7	
14	59,4	12,4	61,5	5,7	5,2	1,3	2,3	0,5	12,0	0,5	21,3	3,8	⑥ HDL'
15	49,3	3,1	64,1	4,0	2,9	0,1	1,8	0,1	14,2	1,2	18,7	5,3	
16	37,0	2,9	64,7	1,2	3,7	0,4	2,6	0,1	19,8	0,2	11,8	0,5	
17	34,8	1,0	59,3	0,7	4,9	0,1	2,6	0,2	20,4	0,6	15,4	0,0	
TOTAL	2927,4												

Distribution et composition des Lipoprotéines dans les différentes fractions.

Réalisé avec le concours du Service Imprimerie de la 5ème Circonscription  
1, Place Aristide-Briand – 92190 Meudon – Tél. 534 75 50 – Télex 204135