

# **La séparation des fractions lipoprotéiques du sérum (plasma)**

## **La détermination du cholestérol total et du cholestérol dans diverses fractions lipoprotéiques sériques**

### **I. La séparation des fractions lipoprotéiques du sérum (plasma)**

#### **Introduction**

Les lipoprotéines plasmatiques sont des formes de transport pour les lipides. Ils portent des lipides insolubles dans le milieu aqueux entre les différents organes par le sang. Ils ont une structure lipido-protéique, constituée d'un composant lipidique (triacylglycérols, cholestérol, cholestérol estérifié, phospholipides) et un composant protéique (apoprotéine). Les groupes polaires de protéines et de phospholipides sont disposés sur la surface de complexes, les rendant un caractère hydrophile.

Après les méthodes de séparation, les lipoprotéines plasmatiques sont divisés en:

#### **A. Méthodes physico-chimiques**

**1. Ultracentrifugation** - est basé sur les différences de densité entre les lipoprotéines qui dépende de leur teneur en lipides et protéines. Dans champs gravitationnels forts (env. 100000g), par rapport à la densité de l'environnement, les lipoprotéines vont sédimenter (si elles ont des densités plus élevées que l'environnement) ou ils vont flotter (si leurs densités sont plus réduites). Par cette méthode, en utilisant un tampon avec une densité de 1,063 g/cm<sup>3</sup> (correspondant à une lipoprotéine avec un teneur égale en lipide et en protéines) ont été séparés quatre fractions:

- Chylomicrons  $d \leq 0,96 \text{ g/cm}^3$
- VLDL (**V**ery **L**ow **D**ensity **L**ipoproteins – lipoprotéines d'une densité très basse)  $d = 0,96 - 1,006 \text{ g/cm}^3$
- LDL (**L**ow **D**ensity **L**ipoproteins - lipoprotéines d'une densité basse)  $d = 1,006 - 1,063 \text{ g/cm}^3$
- HDL (**H**igh **D**ensity **L**ipoproteins - lipoprotéines d'une densité haute)  $d = 1,063 - 1,21 \text{ g/cm}^3$

**2. Electrophorèse** - les lipoprotéines plasmatiques dans un champ électrique migrent parce que les protéines et phospholipides portent des charges électriques. La séparation est réalisée à un pH de 8,6 et les fractions sont visualisées avec des colorants spécifiques. Les fractions séparées par électrophorèse constituent l'électrophorégramme de lipoprotéines sériques.

- Chylomicrons - pratiquement ne migre pas à cause de leur faible teneur en protéines et phospholipides
- $\beta$ -lipoprotéines – correspondent à LDL
- pré-beta-lipoprotéines - correspondent à VLDL
- $\alpha$ -lipoprotéines - correspondent à HDL - ils migrent le plus rapidement parce qu'ils ont la plus haute teneur en protéines et phospholipides.

Dans le sérum normal, récoltées après 8 à 10 heures de jeûne, il n'y a pas de chylomicrons et VLDL (pré- $\beta$ ) ; ils se retrouvent uniquement dans les traces.

La séparation des lipoprotéines comme entités morpho-fonctionnelles a permis de comprendre la dynamique des lipides dans le sang, leur genèse et de leur mode d'utilisation.

La poursuite stricte d'un composant lipidique du sang ne donne pas d'informations satisfaisantes sur la signification de tout changement fonctionnelle; par la séparation des

lipoprotéines et la détermination du composant lipidique dans la fraction séparée on peut obtenir des informations à plus forte valeur.

Il y a la possibilité de séparer les fractions par gel-filtration et par la précipitation d'apoprotéines des complexes avec leurs anticorps spécifiques.

### **B. Methodes chimiques**

La séparation des fractions lipoprotéiques du sérum (ou plasma) est fait avec des cations bivalents ou polyanions, et avec des substances tensioactives. La fraction de LDL est précipitée avec héparine au pH isoélectrique de 5,12.

## **II. La détermination du cholestérol total et du cholestérol dans diverses fractions lipoprotéiques sériques**

### **Les principes de méthodes de la mesure du cholestérol sérique**

Le cholestérol est présent dans tous les tissus animaux. Dans bon nombre de ceux-ci, y compris le sang, il apparaît que comme une fraction libre mais aussi estérifié avec des acides gras divers.

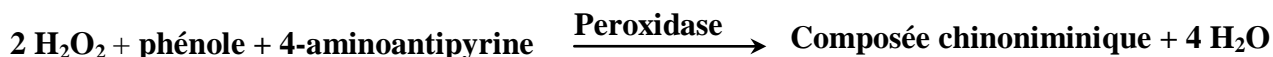
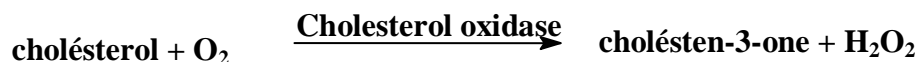
La détermination quantitative du cholestérol a été et est une grande étude, étant donné son importance dans le diagnostic clinique et des mesures préventives de maladies métaboliques, la cholestérolémie étant considérée comme un indicateur important du risque de l'athérosclérose et des maladies coronariennes.

Dans la pratique, pour déterminer le cholestérol, il y a une variété de méthodes basées sur des principes différents. Il est prévu que dans le court terme dans les laboratoires soit utilisés seules les méthodes basées sur les techniques enzymatiques.

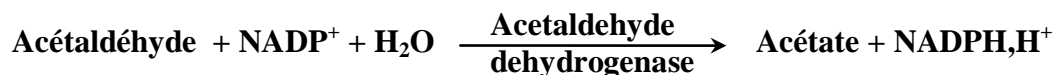
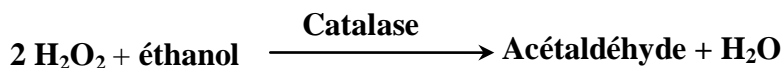
Un grand nombre de variantes de méthodes de détermination utilisent la méthode de Liebermann - Burchard, qui est à traiter l'échantillon avec un mélange d'acide sulfurique et d'anhydride acétique quand, par oxydation successives et sulfonation résulte un acide cholestohexansulphonique coloré. Une variante de cette méthode développée par Abell et ses collaborateurs est aujourd'hui considérée comme la méthode de référence. Bien que laborieux, il est considéré que cette technique, qui fait d'abord une saponification des esters de cholestérol, suivie de l'extraction du cholestérol avec de l'éther de pétrole, l'évaporation de l'éther et la réaction de Liebermann - Burchard, est inégalée dans l'exactitude.

De nombreuses méthodes, utilisées pour déterminer le niveau du cholestérol dans le sérum, le plasma et le sang, sont basées sur des procédés enzymatiques.

Fondamentalement, une technique enzymatique comprend les étapes:



Ou :



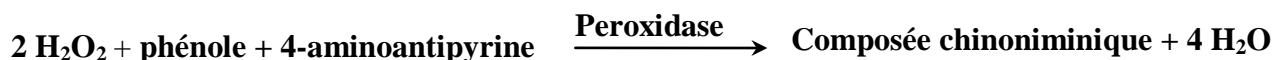
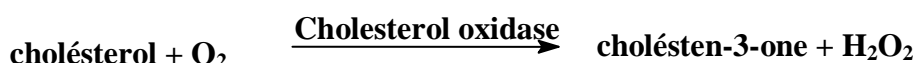
On peut analyser des échantillons de sérum, de plasma ou de sang total. Pour le plasma est préférable que l'EDTA ou l'héparine serve le anticoagulant (1 mg/ml). Les anticoagulants comme le fluorure, l'oxalate ou le citrate causent d'erreurs dues à une dilution résultant de l'efflux d'eau à partir d'érythrocytes dans le plasma.

## Application pratiques

### 1. Détermination du cholestérol total par méthodes enzymatiques

#### Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés de lipoprotéines par traitement avec des agents tensioactifs. La cholestérol estérase hydrolyse les esters et la cholestérol oxydase catalyse l'oxydation du cholestérol en formant de l'eau oxygénée. Ce-ci oxyde le phénol et 4-aminoantipyrine, en présence de la peroxidase, en formant un composé chinoniminique coloré.



#### Réactifs

On utilise le kit Fluitest<sup>®</sup>CHOL

1. Réactif 1: contient tampon PIPES 90 mmole/l, pH 6,90; phénol 26mmole/l; cholestérol oxydase 200 U/l; cholestérol estérase 300 U/l; peroxidase 1250 U/l; 4-amino-antipyrine 0,4 mmole/l.

2. Réactif 4 – Etalon de cholestérol 200 mg/100 ml (5,17 mmol/l)

On travaille avec sérum ou plasma récolté sur héparine.

#### Mode opératoire

Pipetez dans trois tubes, notés P (probe), E (étalon) T (témoin) comme suit:

Réactifs, µl	Probe	Etalon	Témoin
Réactif 1	1000	1000	1000
Sérum ou plasma (dilué 1/10)	100	-	-
Etalon de cholestérol (dilué 1/10)	-	100	-
Eau distillée	-	-	100

Mélangez, incubez 5 minutes à 37°C. Mesurez l'absorption de la lumière  $A_P$  et  $A_T$  à la longueur d'onde de 546 nm, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin, à l'intervalle de 60 minutes.

#### Calcul

$$\text{mg cholestérol /100 ml} = A_{\text{probe}}/A_{\text{étalon}} \times 200$$

La linéarité absorption–concentration est respectée jusqu'à un contenu de 800 mg cholestérol total/100 ml (21 mmol/l).

#### Valeurs normales

140 - 220 mg cholestérol /100 ml sérum (3,62 – 5,68 mmol/l)

### Variations pathologiques:

#### 1. Hypcholestérolémie: Valeurs < 180 mg/100ml

- insuffisances hépatiques : hépatites virales et toxiques, cirrhose, ictères graves.
- certain maladies infectieuses graves et prolongées: tuberculose, pneumonie, fièvre typhoïde, endocardite maligne.
- Hyperthyroïdies, maladies d'Addisson, Anémies, retard mental, Maladie de TANGIER
- jeûne prolongée ou état de famine.
- prise de médicaments

#### 2. Hypercholestérolémie: Valeurs >250 mg/100ml

- a. Les hypercholestérolémies primitives: origine familiale, taux élevé des triglycérides
- b. Les hypercholestérolémies secondaires:
  - ictères par rétention, syndromes néphrétiques (5 g/l), pancréatites aiguës et chroniques, diabète insulino-dépendant, hyperthyroïdies, goutte, obésité, alcoolisme chronique, athérosclérose
  - alcoolisme
- c. prise de médicaments

### 2. Détermination du cholestérol dans la fraction HDL

#### Principe

Dans la première étape, les fractions LDL, VLDL et les chylomicrons sont éliminées et transformées en composants non-réactifs par une réaction spécifique. Dans la deuxième étape, les réactions sont celles de la détermination enzymatique du cholestérol.

#### Reactifs

On utilise le kit Fluitest<sup>®</sup>HDL-D

1. Réactif R1: contiens tampon Good 100 mM, pH 7,00; cholestérol oxidase > 0,8 KU/l; cholestérol esterase > 1,0 KU/l; catalase > 500 KU/l; HDCBS 0,5 mmole/l
2. Réactif R2: contiens peroxidase 30 KU/l; 4-aminoantipyrine 4 mmole/l
3. Etalon de HDL cholestérol 40 mg/100ml (1,04 mmole/l)

On travaille avec sérum ou plasma récolte sur héparine.

#### Mode opératoire

Pipetez dans trois tubes, notés P (probe), E (étalon) T (témoin) comme suit:

Réactifs, µl	Probe	Etalon	Témoin
Réactif 1	300	300	300
Sérum ou plasma (dilué 1/100)	300	-	-
Etalon de cholestérol (dilué 1/100)	-	300	-
Eau distillée	-	-	300
<b>Mélangez, incubez 5 minutes à 37°C. Ajoutez après :</b>			
Réactif R2	100	100	100

Mélangez, incubez à 37°C. Mesurez l'absorption de la lumière A<sub>1P</sub> et A<sub>1T</sub> après exactement 30 secondes, et après ça exactement a 5 minutes (A<sub>2P</sub> et A<sub>2T</sub>), à la longueur d'onde de 600 nm, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin.

Calculez :  $\Delta E = E_2 - E_1$ .

#### Calcul

$$\text{mg cholestérol/100 ml} = \Delta E_{\text{probe}} / \Delta E_{\text{étalon}} \times 40$$

### Valeurs normales

hommes: 35 – 55 mg HDL cholestérol/100 ml sérum (0,91 – 1,43 mmol/l)

femmes: 45 - 65 mg HDL cholestérol/100 ml sérum (1,17 – 1,69 mmol/l)

Risque atérogen	hommes	femmes
faible	> 55 mg/100 ml	> 65 mg/100 ml
elevé	< 35 mg/100 ml	< 45 mg/100 ml

On peut apprécier aussi le risque atérogen en calculant le rapport  $C_T/C_{HDL}$ .

rapport  $C_T / C_{HDL} = 3,5 - 5$  - normal

$C_T / C_{HDL} < 3,5$  - risque atérogen faible

$C_T / C_{HDL} > 5$  - risque atérogen élevé

### 3. Détermination du cholestérol dans la fraction LDL

#### Principe

La fraction LDL est précipitée a son point isoélectrique (pH = 5,12) avec une solution d'héparine. Après la centrifugation, les fractions HDL et VLDL restent dans le surnageant et peuvent être déterminées enzymatiquement. La concentration du cholestérol de LDL est déterminée après par différence.

#### Réactifs

1. Réactif de précipitation: contiens héparine 0,68 g/l (correspondant a 100000 U/l); citrate de sodium 0,064 moles/l; stabilisateurs 2%
2. Réactifs pour la détermination enzymatique du cholestérol (voyez la détermination du cholestérol total)

On travaille avec sérum ou plasma récolte sur héparine ou EDTA.

#### Mode opératoire

Précipitation : Pipetez dans un tube de centrifuge 1 ml réactif de précipitation et 0,10 ml sérum. Mélangez, lésez en repos pendant 10 minute la 15 - 25°C. Centrifugez 15 minutes à 4000 rpm. Séparez le surnageant et déterminez dans celui-ci la concentration du cholestérol de HDL + VLDL, par le méthode enzymatique présentée à la détermination du cholestérol total.

#### Calcul

**cholestérol LDL mg/100 ml sérum = cholestérol total – (cholestérol HDL+ VLDL)**

#### Valeurs normales

Valeurs utilisées pour établir le traitement:

**< 130 mg cholestérol LDL /100 ml (< 3,38 mmole/l):**

**ne nécessite pas traitement**

**- 130 – 190 mg cholestérol LDL /100 ml (3,38 – 4,92 mmole/l):**

**risque atérogen medium**

**> 190 mg cholestérol LDL /100 ml (> 4,92 mmole/l):**

**risque atérogen élevé : nécessite traitement**