

Literaturverzeichnis

1. Cohn, E. J.; Strong, L. E.; Hughes, W. L., Jr.; Mulford, D. J.; Ashworth, J. N.; Melin, M. und Taylor, H. L.: J. amer. chem. Soc. 68: 459 (1946).
2. Schade, A. L.; Reinhart, R. W. und Levy, H.: Arch. Biochem. 20: 170 (1949). – Schade, A. L. und Caroline, L.: Science 104: 340 (1946).
3. Surgenor, D. M.; Strong, L. E.; Taylor, H. L.; Gordon, R. S., Jr. und Gibson, D. M.: J. amer. chem. Soc. 71: 1223 (1949).
4. Surgenor, D. M.; Koechlin, B. A. und Strong, L. E.: J. clin. Invest. 28: 73 (1949).
5. Rath, C. E. und Finch, C. A.: J. clin. Invest. 28: 79 (1949).
6. Cartwright, G. E. und Winrobe, M. M.: J. clin. Invest. 28: 86 (1949).
7. Koechlin, B. A.: J. amer. chem. Soc. 74: 2649 (1952).
8. Inman, J. K.: 10th Conf. on Plasma Proteins and Cellular Elements of the Blood. Protein Foundation, Cambridge, Mass. 1956.
9. Keller, W. und Pennell, R. B.: 6th Congr. int. Soc. Blood Transf., Boston 1956 (Karger, Basel/New York 1958).
10. Krawczynski, J.: Ann. Univ. M. Curie-Sklodowska, D.D. IX/20: 341 (1954).
11. Horejsi, J. und Smetana, R.: Acta med. scand. 155: 65 (1956).
12. Böttcher, E. W.; Kistler, P. und Nitschmann, Hs.: Nature, Lond. 181: 490 (1958).
13. Nitschmann, Hs.; Kistler, P. und Lergier, W.: Helv. chim. Acta 37: 866 (1954).
14. Nitschmann, Hs.; Kistler, P. und Joss, A.: Vox Sang. 2: 100 (1957).

227

Sur la précipitation sélective des β -lipoprotéines du sérum par l'héparine et les héparinoïdes de synthèse en présence du chlorure de calcium

M. BURSTEIN

Paris, France

On sait que les lipides du plasma sont liés aux protéines. On distingue les α -lipoprotéines qui migrent avec les α -globulines, et qui sont de densité élevée, et les β -lipoprotéines qui font partie des β -globulines, et qui sont de faible densité.

Dans un sérum lipémique on trouve en plus les chylomicrons, particules de très faible densité, constituées essentiellement par les triglycérides, et qui renferment également une certaine quantité de protéines. Diverses techniques sont utilisées pour séparer les lipoprotéines: fractionnement par l'éthanol à froid suivant la méthode de Cohn, ultracentrifugation dans un milieu à densité appropriée d'après Gofman, électrophorèse de zone. Seule l'ultracentrifugation permet d'obtenir des lipoprotéines à l'état pur.

Nous avons mis au point une technique beaucoup plus simple et très rapide qui permet d'isoler l'ensemble des lipoprotéines de faible densité, c'est-à-dire les β -lipoprotéines et les chylomicrons. Cette technique est basée sur la précipitation sélective des lipoprotéines légères par l'héparine et par des héparinoïdes de synthèse en présence de certains cations bivalents^{1, 2}.

Précipitation sélective des β -lipoprotéines par certains héparinoïdes de synthèse et du chlorure de calcium

Lorsqu'on ajoute à un sérum clair certains héparinoïdes de synthèse et du Cl_2Ca , les β -lipoprotéines précipitent sélectivement et en totalité.

Nous utilisons généralement le sulfate de dextrane (Equilibre Biologique) qui est un anticoagulant employé en clinique et dont le poids moléculaire n'est pas très élevé.

Les détails techniques sont les suivants:

A un volume de sérum on ajoute, à la température du laboratoire, 0,04 volume d'une solution de sulfate de dextrane à 10 %, et 0,1 volume d'une solution molaire de Cl_2Ca . Immédiatement un précipité se forme. Celui-ci est séparé par centrifugation; il renferme l'ensemble des β -lipoprotéines du sérum à l'exclusion de tout autre constituant protidique. Le surnageant clair représente le sérum moins les β -lipoprotéines; à sa surface on trouve une pellicule très mince composée de chylomicrons*.

L'électrophorèse sur papier du surnageant avec coloration des lipides par le soudan noir montre la disparition complète de la tache des β -lipoprotéines; la tache qui correspond aux α -lipoprotéines subsiste.

La précipitation des β -lipoprotéines est spécifique; un sérum débarrassé des β -lipoprotéines par ultracentrifugation dans un milieu à densité élevée ne donne aucun précipité.

Le sulfate de dextrane peut être remplacé par le *Tréburon* (Roche), le *Manuronate* (Wyeth), le *Sulfarsénol* (Biochimie Médicale); toutefois en présence de Cl_2Ca , les deux derniers précipitent aussi d'autres protéines.

La précipitation des β -lipoprotéines est empêchée par alcalinisation du sérum au delà de pH 9,00, par augmentation de la force ionique (adjonction de ClNa), par le Cl_2Ba et le Cl_2Sr qui forment un complexe avec le sulfate de dextrane.

Ce précipité se redissout après élimination de Cl_2Ca (dialyse, oxalate, citrate) ou du sulfate de dextrane (protamine, Cl_2Ba). Pour obtenir les β -lipoprotéines à l'état pur, nous procédons à plusieurs reprécipitations; le précipité est redissous dans du ClNa à 5 % (un dixième du volume initial du sérum) et reprécipité par adjonction d'eau distillée tamponnée à pH 7,50 et du Cl_2Ca (NaCl 6 $^{\circ}/_{00}$, CaCl_2 0,025 M.). Ceci est répété quatre fois. Le précipité est ensuite redissous dans une solution molaire de Cl_2Ba (un cinquantième de volume initial de sérum). Le Cl_2Ba précipite la plus grande partie du sulfate de dextrane. Après centrifugation on dialyse contre du NaCl à 9 $^{\circ}/_{00}$ tamponné à pH 7.50 pour éliminer le chlorure de baryum.

L'électrophorèse optique et l'ultracentrifugation analytique n'ont permis de déceler qu'un seul constituant dans le précipité redissout; de même l'analyse immunologique par la méthode de gels, d'après Oudin, a montré qu'il s'agit d'un seul antigène³.

* Avec certains lots de sulfate de dextrane et avec certains sérums, la centrifugation s'effectue mal; il suffit dans ce cas de diluer le sérum de moitié avec de l'eau distillée.

Les β -lipoprotéines étant très solubles, on obtient des solutions qui renferment jusqu'à 125 g de lipides par litre. Ces solutions sont très stables et peuvent être conservées des mois à l'état congelé. Par contre, elles ne supportent pas la dessiccation à froid.

Les β -lipoprotéines ainsi isolées sont très riches en lipides. Le taux de lipides varie suivant les préparations entre 79 % et 85 % et le taux des protides entre 15 % et 21 %.

Les stérols et stérides représentent, suivant les préparations, 40 à 60 % des lipides totaux; les phospholipides représentent 15 à 25 % et les triglycérides 25 à 37 %.

En cas de sérum lipémique, les β -lipoprotéines et les chylomicrons flocculent simultanément. Lorsqu'il s'agit d'un sérum très riche en chylomicrons, tout remonte à la surface après centrifugation; par contre avec un sérum faiblement lipémique, la centrifugation s'effectue mal; pour obtenir une bonne séparation, il suffit de remplacer la solution de CaCl_2 M par une solution de MgCl_2 M. Après centrifugation les chylomicrons et les β -lipoprotéines remontent à la surface. Enfin les α_2 -lipoprotéines sur papier (néphrose lipidique), qui sont les lipoprotéines de faible densité, précipitent également.

En résumé, la présence de Cl_2Ca , le sulfate de dextrane précipite sélectivement l'ensemble des lipoprotéines de faible densité. Seules les α -lipoprotéines de densité élevée restent en solution. Cette précipitation sélective a permis pour la première fois d'isoler les β -lipoprotéines, et de préparer un sérum débarrassé des β -lipoprotéines, par un procédé purement chimique, sans avoir recours à l'ultracentrifugation. Le résultat est le même qu'après ultracentrifugation dans un milieu à densité 1,063 g/cm³ qui fait flotter l'ensemble des lipoprotéines légères.

Ultérieurement à nos publications *Onclay*⁴ a montré que le sulfate de dextrane à poids moléculaire très élevé précipite les β -lipoprotéines même en l'absence de CaCl_2 . Il en est de même pour le sulfate d'amylopectine à poids moléculaire élevé⁵.

Précipitation sélective des β -lipoprotéines et des chylomicrons par l'héparine en présence du chlorure de calcium

Contrairement aux héparinoïdes, l'héparine ne précipite pas les β -lipoprotéines en présence de CaCl_2 , à moins de réduire au préalable la force ionique du sérum, soit par dialyse contre l'eau distillée, soit par dilution au dixième avec de l'eau distillée.

L'adjonction d'héparine et du Cl_2Ca à un sérum clair non dialysé ne donne pratiquement aucun trouble; par contre après dilution au dixième avec une solution 0.025 M de Cl_2Ca , l'héparine, à la concentration de 10^{-4} précipite sélectivement l'ensemble des β -lipoprotéines. Ceci nous a permis de mettre au point une technique opacimétrique simple de dosage des β -lipoprotéines⁶.

En cas de sérum lipémique l'héparine en présence de Cl_2Ca floccule les chylomicrons, même lorsque la force ionique n'est pas réduite. Les chylomicrons remontent spontanément à la surface sous forme d'une couche grasseuse⁷.

Conclusion

En présence de chlorure de calcium et d'une force ionique appropriée l'héparine et les héparinoïdes de synthèse précipitent sélectivement les β -lipoprotéines et les chylomicrons.

Ceci permet d'isoler les β -lipoprotéines et de préparer un sérum débarrassé des β -lipoprotéines, par un procédé purement chimique, sans avoir recours à l'ultracentrifugation.

Summary

The addition to human serum of dextran sulfate or treburon and of calcium chloride causes a selective precipitation of beta-lipoproteins. The clear supernatant, which is separated after centrifugation, represents the serum that is selectively cleared of beta-lipoproteins by means of a purely chemical procedure.

The precipitated beta-lipoproteins are very soluble after elimination of calcium chloride (dialysis, addition of oxalate). They are a homogeneous fraction from an electrophoretic and immunochemical point of view and contain about four times more lipids than proteins.

The precipitation is carried out also in the presence of heparin, provided that the ionic strength of the serum is reduced by dialysis or dilution by means of distilled water. By partially reducing the ionic strength of the serum, only one portion of the beta-lipoproteins is precipitated. This makes it possible to obtain several fractions which are different in the lipid-protein ratio.

In the case of lipemic serum, heparin, in the presence of calcium chloride, causes a flocculation of the chylomicrons without previous reduction of the ionic strength.

This selective precipitation allows an opacimetric simple dosage of the beta-lipoproteins as well as of alpha- and beta-cholesterol.

Bibliographie

1. *Burstein, M.*: C. R. Acad. Sci. 243: 527 (1956).
2. *Burstein, M. et Samaille, J.*: J. Physiol. 49: 83 (1957); Clin. chim. Acta 3: 320 (1958).
3. *Burstein, M. et Oudin, J.*: C. R. Acad. Sci. 246: 2187 (1958).
4. *Onclay, J. L.; Walton, K. W. et Cornwell, G. D.*: J. amer. chem. Soc. 79: 4666 (1957).
5. *Bernfield, P.; Donahue, N. M. et Berkowitz, M. E.*: J. biol. Chem. 226: 51 (1957).
6. *Burstein, M. et Samaille, J.*: C. R. Acad. Sci. 243: 2185 (1956); Presse méd. 66: 974 (1958); Path. Biol. 6: 541 (1958).
7. *Burstein, M. et Samaille, J.*: C. R. Acad. Sci. 241: 664 (1955).