

LIPIDES SÉRIQUES DES SUJETS BOLIVIENS

ANALYSE DES PRE- β -LIPOPROTEINES

BELLIDO D., DOUSSET N., DOUSTE-BLAZY L., DROUET L.* et CAEN J.*

INSERM Unité 101 Biochimie des Lipides - Hôpital Purpan - 31052 TOULOUSE.

*INSERM Unité 150 ERA 335 CNRS - Hôpital St Louis - 2, Place du Dr Alfred Fournier,
75475 PARIS CEDEX 10.

INTRODUCTION

Les populations vivant en haute altitude présentent une incidence particulièrement faible d'accidents cardio-vasculaires (1). Etant donné les relations entre lipides plasmatiques et athérosclérose et dans le but d'explorer les lipides sériques de ces sujets vivant en hypoxie, nous avons effectué, chez des Boliviens des évaluations de lipoprotéines plasmatiques et de fractionnement des phospholipides.

MATERIEL ET METHODES

Des sérums d'individus originaires des Hauts Plateaux de Bolivie nous sont parvenus dans des containers à 4°C.

1°) Dosages

Les dosages des lipides totaux, des triglycérides, du cholestérol total et des phospholipides ont été effectués sur le sérum et sur les pré- β -lipoprotéines préparées par ultracentrifugation. Le dosage du phosphore lipidique est fait par la méthode de CHEN et al. (2), le cholestérol total par la méthode de LEBERMAN (3), les triglycérides sont dosés par la technique de LARTILLOT et VOGEL (4), les lipides totaux sont évalués selon le protocole décrit par ZOLLNER et KIRSCH (5) et le dosage des protéines est effectué par la méthode de LOWRY (6).

2°) Electrophorèse des lipoprotéines sériques

Elle est réalisée sur acétate de cellulose, après un stockage des sérums 17-25 et 30 jours, en vue d'observer des variations éventuelles soit qualitatives, soit quantitatives en fonction du temps.

Les pourcentages des lipoprotéines sériques que nous rapportons concernent les sérums boliviens et les sérums français après un laps de temps de conservation de 10 à 15 jours.

3°) Préparation des pré- β -lipoprotéines sériques.

Une ultracentrifugation préalable à 9 000 g pendant 30 minutes est faite dans une ultracentrifugeuse Martin Christ (Haereus) en vue d'éliminer les chylomicrons. (7).

Une ultracentrifugation préparative à 105 000 g pendant 18 heures à 10°C dans un appareil S.A. 20 Beckman (rotor angulaire 50 TI) est effectuée afin d'obtenir la fraction pré- β -lipoprotéinique. Puis une seconde ultracentrifugation (105 000 g durant 24 heures à 10°C) de cette dernière fraction en solution saline de densité 1,006 nous permet d'obtenir la fraction pure de pré- β -lipoprotéines.

4°) Etude chimique des pré- β -lipoprotéines

Les lipides totaux sériques sont extraits en ajoutant à un volume de matériel biologique à étudier 20 volumes d'un mélange de chloroforme/méthanol, 2/1 (v/v) et en agitant pendant une heure. Après filtration et évaporation, les dosages des différents lipides sont effectués par les méthodes signalées ci-dessus.

Les fractions phospholipidiques sont séparées par chromatographie ascendante en couche mince en utilisant des plaques de Silicagel G de 0,25 mm d'épaisseur (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le solvant employé pour la migration est un mélange de chloroforme/méthanol/acide acétique/eau, 75/45/12/6, (v/v/v/v). Les taches des fractions phospholipidiques séparées sont grattées et leur pourcentage phospholipidique est évalué après dosage du phosphore.

L'interprétation statistique des résultats est faite selon le test t de student pour les petites populations.

RESULTATS

Le tableau suivant présente les moyennes en milligramme/100 ml de 50 sujets boliviens :

Lipides totaux : 772 mg \pm 160

Cholestérol total : 182 mg \pm 32

Triglycérides : 135 mg \pm 9

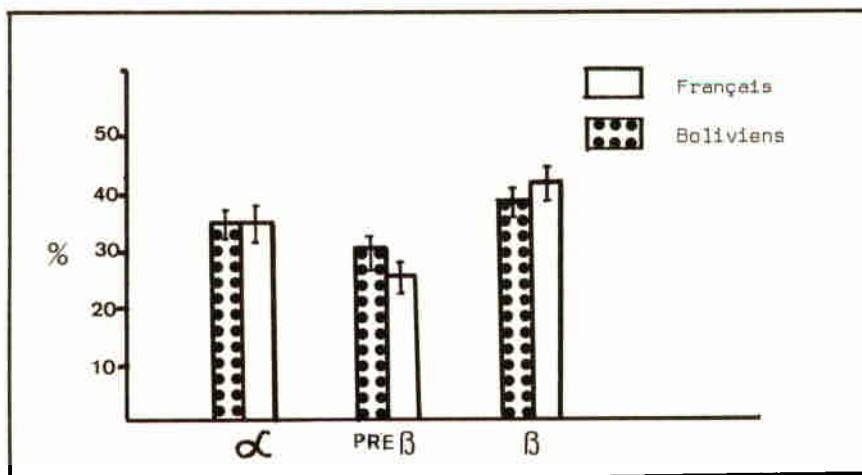


Figure 1 : Pourcentage des lipoprotéines sériques.

Le diagramme ci-dessus représente les moyennes en pourcentage des différentes fractions lipoprotéiniques de 30 sujets boliviens à jeûn (depuis 12 à 18 heures) et de 10 sujets français à jeûn (depuis 10-12 heures).

Les fractions α -lipoprotéiniques montrent des pourcentages semblables dans les deux groupes étudiés : $34,2 \pm 3,4$ (sujets français) et $34,4 \pm 2,9$ (sujets boliviens).

Par contre, les fractions pré- β -lipoprotéiniques des sujets boliviens ($28,9 \pm 2,6$) sont supérieures à celles des sujets français ($24,3 \pm 2,9$) avec une probabilité statistique de $0,02 < p < 0,05$ tandis que les fractions β -lipoprotéiniques des sujets boliviens ($36,7 \pm 3,1$) sont inférieures à celles des sujets français ($41,4 \pm 3,2$) avec une probabilité de $0,02 < p < 0,05$.

Les dosages préliminaires des lipoprotéines, faits après différents délais de stockage ne montrent pas de changements, qualitatifs ou quantitatifs, importants.

Des études sur la composition chimique des pré- β -lipoprotéines sont faites chez les deux groupes de sujets (21 sujets boliviens, 10 sujets français) et donnent les résultats suivants.

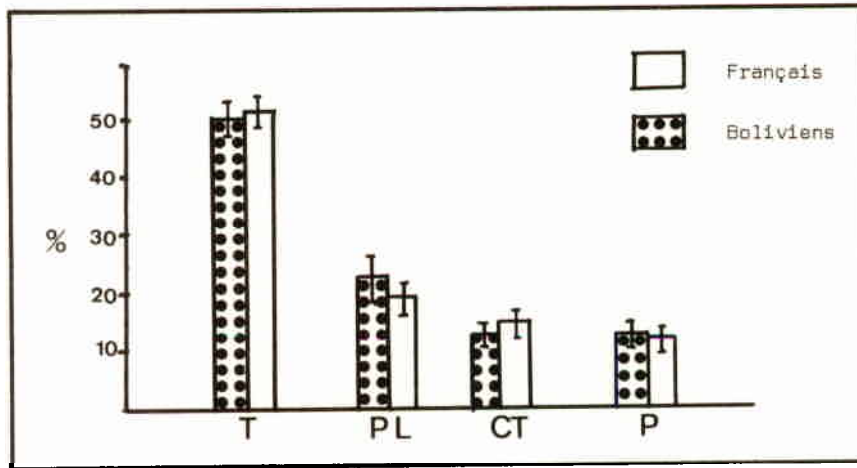


Figure 2 : Composition centésimale des pré- β -lipoprotéines sériques.

Nous constatons que les taux de triglycérides (T) ($50 \pm 3,5$), de cholestérol (CT) ($13,4 \pm 1,9$), de protéines (P) ($13,5 \pm 2,3$), des pré- β -lipoprotéines sont semblables à ceux des sujets français : triglycérides ($53 \pm 3,1$), cholestérol ($15 \pm 2,5$) et protéines ($13 \pm 3,7$).

Cependant, les taux des phospholipides (PL) ($23,2 \pm 4$) chez les sujets boliviens sont légèrement augmentés par rapport à ceux des sujets français ($18 \pm 2,3$). Ces dernières valeurs sont semblables à celles rapportées par SCANU et al. (8) et par FREDRICKSON (9).

Les analyses des phospholipides sériques ont été faites sur 18 sujets boliviens à jeûn depuis 12-18 heures et sur 18 sujets français à jeûn depuis 12 heures. Nous y remarquons que le taux de ces lipides ($61,2 \pm 15 \mu\text{g}$ de phosphore lipidique/ml de sérum), chez les sujets boliviens est inférieur de 24 % à celui des sujets français ($80,8 \pm 12,2 \mu\text{g}$ de phosphore lipidique/ml de sérum) avec une probabilité statistique de $p < 0,001$.

L'analyse des fractions phospholipidiques représentées sur la figure 3 nous permettent de faire les constatations suivantes :

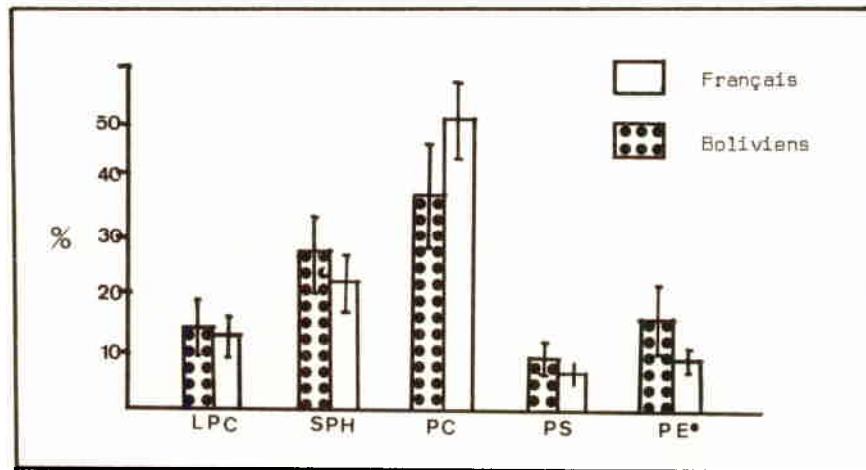


Figure 3 : Composition centésimale des phospholipides sériques

Les pourcentages des sphingomyélines (SPH) $26,8 \pm 7,3$ (sujets boliviens) $21,9 \pm 4,9$ (sujets français), celui des phosphatidylsérines (PS) $8,8 \pm 2,9$ (sujets boliviens), $6,4 \pm 2$ (sujets français) et de l'ensemble des phosphatidyléthanolamines, acides phosphatidiques, phosphatidylglycérols, cardiolipides (PE) $15,5 \pm 9,7$ (sujets boliviens), $7,8 \pm 2,6$ (sujets français) sont légèrement augmentés.

Les probabilités statistiques sont les suivantes :

$0,02 < p < 0,05$ pour les sphingomyélines,

$0,01 < p < 0,02$ pour les phosphatidylsérines

$0,001 < p < 0,01$ pour l'ensemble phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycérols, acides phosphatidiques et cardiolipides.

Les lysophosphatidylcholines (LPC) ne montrent aucune modification de leurs pourcentages : $13,9 \pm 5,6$ (sujets boliviens) et $13,3 \pm 3,7$ (français). Par contre, les taux de phosphatidylcholines (PC) sont fortement diminués : $36,7 \pm 10$ (sujets boliviens) et $50 \pm 7,2$ (sujets français), avec une probabilité statistique de $p < 0,001$.

Si nous exprimons ces chiffres en valeurs absolues (Fig. 4), nous remarquons que les sphingomyélines et les phosphatidylsérines des sujets boliviens ne diffèrent pas de ceux des sujets français, tandis que les phosphatidylcholines sont diminuées de 45 % et l'ensemble des phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidylglycérols, acides phosphatidiques et cardiolipides est augmenté de 49 % par rapport à ceux des sujets français.

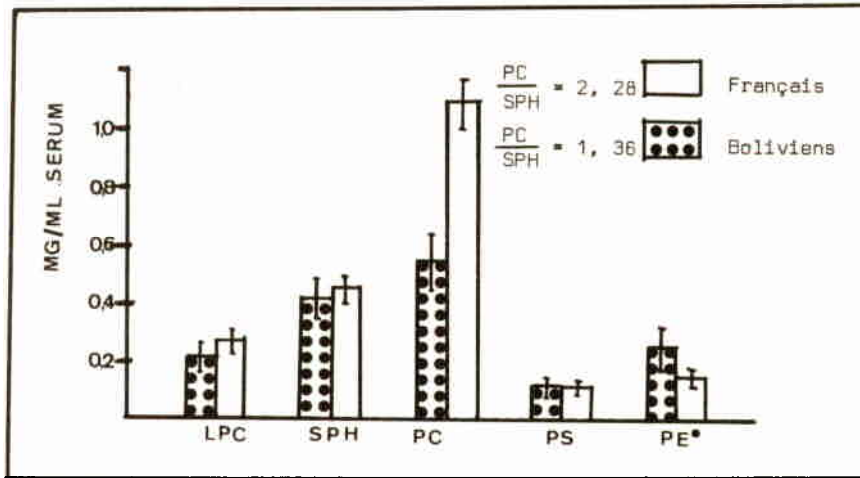


Figure 4 : Taux des fractions phospholipidiques.

DISCUSSION

La diminution du taux des β -lipoprotéines est compensée par l'augmentation du taux des pré- β -lipoprotéines chez les sujets boliviens.

Il faut noter que nous n'avons observé aucune variation importante des fractions lipoprotéiniques au cours du stockage des sérums.

Selon les travaux de SCANU et al. (10) et ceux de MORRISETT et al. (11), une grande partie de phospholipides est transportée par les β -lipoprotéines. De plus, les travaux de SKIPSKY (12) établissent que les plus grandes quantités des phosphatidylcholines sériques sont entraînées par la fraction β -lipoprotéinique. Le fait que les β -lipoprotéines soient diminuées chez les sujets boliviens pourrait expliquer la diminution des phospholipides totaux et surtout des phosphatidylcholines chez ces sujets.

Nous avons étudié seulement la composition chimique des pré- β -lipoprotéines et nous avons montré une légère augmentation du phosphore lipidique. Des variations des constituants chimiques des autres fractions lipoprotéiniques sont possibles. Il faudrait les analyser afin d'étudier si cette élévation

phospholipidique dans les pré- β -lipoprotéines n' est pas compensée par une baisse du phosphore lipidique plus ou moins importante dans les autres fractions lipoprotéiniques. Ainsi on pourrait connaître à juste titre la cause de cette élévation des phospholipides dans les pré- β -lipoprotéines.

Nous avons montré que l'ensemble des phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycérols, acides phosphatidiques et cardiolipides est augmenté chez les sujets boliviens. En effet, il faut noter que le solvant que nous avons utilisé ne nous permet pas de séparer ces phospholipides. L'utilisation d'autres solvants chromatographiques sera nécessaire pour déterminer s'il s'agit d'une augmentation globale de ces phospholipides ou bien d'une augmentation sélective.

La diminution du rapport phosphatidylcholines/sphingomyélines chez les sujets boliviens est due à la baisse du taux de phosphatidylcholines et non à l'augmentation des sphingomyélines, comme il l'a été signalé chez les sujets athéromateux (13).

ABSTRACT

This work aims at studying lipid metabolism of individuals living in hypoxia.

Bolivians' serum lipids are studied comparatively to those of French individuals.

- Serum total lipids, total cholesterol and triglycerids have ratios within normal standards found in literature.

- The pre- β -lipoprotein fraction is increased; it is balanced by a decrease of the β -lipoprotein fraction.

- The reduction of total serum phospholipids is associated to the decrease of phosphatidylcholines, but the group of phosphatidylethanolamines, phosphatidic acids, phosphatidylglycerols, cardiolipids is increased.

R E F E R E N C E S

- 1 - CAEN J.P., DROUET L., BELLANGER R., MICHEL H. et HENON P.
Thrombosis, platelet behaviour, fibrinolytic activity and diet on the Andes Plateau.
Haemostasis, 1973-1974, 2, 13-20.
- 2 - CHEN P.S., TORIBARA T.Y. et WARNER H.
Microdetermination of phosphorus.
Anal. Chem., 1956, 28, 1756-1758.

- 3 - LIEBERMAN C.
Ueber das oxychinoterpen
Berichte, 1885, 18, 1803-1809.
- 4 - LARTILLOT S. et VOGEL Ch.
Dosage des triglycérides sériques.
Feuillets de Biologie, 1970, 53, 39-42.
- 5 - ZOLLNER N. et KIRSCH K.
Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels
der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden)
gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion.
Zeits. Ges. Exp. Med., 1962, 135, 545-561.
- 6 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH H.J., LEWIS-FAR A. et RANDALL R.J.
Protein measurement with the folin reagent.
Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.
- 7 - LALLA O.F. and GOFMANN J.W.
Ultracentrifugal Analysis of Serum lipoproteins.
Methods of Biochemical Analysis, 1954, Vol. 1, pp 459-478.
- 8 - SCANU A.M., EDELSTEIN C. et KEIN P.
Serum lipoproteins.
The plasma proteins, Putnam F.W.Ed., 1975, Vol. 1, pp 317-391, Academic Press,
New York.
- 9 - FREDRICKSON D.S.
Plasma lipoproteins and apolipoproteins in Current topics in biochemistry,
Anfinsen C.B. et Schechten A.N. Eds., 1974, pp 219-263, Academic Press,
New York.
- 10 - SCANU A.M. et WISDEM C.
Serum lipoproteins-Structure and function in Annual review of biochemistry,
Snell E.E., Boyer P.D., Meister A. et Sinsheimer R.L. Eds., 1972, Vol. 41,
pp 703-730, Annual Reviews Inc., California.
- 11 - Morrisett J.D., JACKSON R.L. et GOTTO A.M.
Lipoproteins : structure and function in Annual review of Biochemistry,
Snell E.E., Boyer P.D., Meister A. et Richardson C.C. Eds., 1975, Vol. 44,
pp 183-207, Annual Reviews Inc., California.
- 12 - SKIPSKY V.P., BARCLAY M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J. et
ARCHIBALD M.F.
Lipid composition of human serum lipoproteins.
J. Biochem., 1951, 104, 340-352.
- 13 - NOEL C., MARCEL Y.L. et DAVIGNON J.
Plasma phospholipids in the different types of primary hyperlipoproteinemia.
J. Lab. Clin. Med., 1972, 79, 611-621.