

Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

Université Mouloud Mammeri
Faculté de Médecine
TIZI-OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو



Département de pharmacie
N° d'ordre : DP/ 002/ 2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté et soutenu publiquement
le : 22 Juin 2017

En vue de l'obtention du diplôme de :

DOCTEUR EN PHARMACIE

Sous le thème :

Adaptation d'une technique électrophorétique des lipoprotéines plasmatiques
&
Evaluation de son intérêt dans l'exploration des dyslipidémies.

Réalisé par :

M. DOUFENE Kocéïla

M. CHERIFI Abdelkrim

Encadrés par :

D^r MEHNI M^{ed} El Hadi

Co-encadrés par :

M. CHIBAH Ammar

Membres du jury :

P ^r MAKRELOUF. M ^{ed}	MD-PhD en biochimie, Faculté de Médecine - Alger chef de service du LCB, CHU Bab El Oued - Alger	Président
D ^r BELKAID. N	MAHU, Faculté de Médecine, UMM-TO	Examinatrice
D ^r SI AHMED-ZENIA. S	Maître de conférences B, Faculté des sciences biologiques et agronomiques, UMM-TO	Examinatrice
D ^r DAHMANI. D	MAHU, Faculté de Médecine, UMM-TO chef de service Biochimie, CHU-TO	Invitée d'honneur
D ^r KHELIL. S	Ancien chef de service Biochimie, CHU-TO ex-chef du département Pharmacie, UMM-TO	Invité d'honneur
D ^r SIFER. A	Ancien chef de service Biochimie, CHU-TO	Invité d'honneur

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Monsieur MEHNI M.E.H, Maître-assistant hospitalo-universitaire en Biochimie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir encadré ce modeste travail. Nous remercions Monsieur CHIBAH A., Maître-assistant en Biochimie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son aide et sa disponibilité ayant aidé à amorcer nos travaux, et Madame DAHMANI D., chef du service de Biochimie au CHU de Tizi-Ouzou et responsable de la spécialité à la Faculté de Médecine, pour la confiance mise en nous et l'autonomie offerte afin de concrétiser cette étude, et nous nous estimons honorés par sa présence parmi le jury. Nous n'oublierons pas de remercier également Madame BAHLOUL M. pour son chaleureux accueil au sein du laboratoire.

Notre profonde reconnaissance va à l'encontre de Monsieur KHELIL S. ancien chef du service de Biochimie au CHU de Tizi-Ouzou et fondateur du département de Pharmacie, qui nous a toujours été d'une aide sans concessions et qui nous fait honneur par sa présence parmi le jury, ainsi qu'à l'encontre de toute l'équipe de son laboratoire et en particulier Monsieur DOUFENE M.S et Mademoiselle CHABANE F. pour l'aide précieuse dont ils nous ont fait grâce afin de fructifier nos travaux.

Nous tenons à témoigner notre gratitude envers Monsieur MAMOU M., chef du département de Pharmacie à la faculté de médecine de Tizi-Ouzou, pour son appui tout au long de nos travaux et son soutien indéfectible envers ses étudiants.

Nous ne pouvons qu'exprimer tout l'honneur que nous vaut la présence de Monsieur MAKRELOUF M., professeur en Biochimie à l'université d'Alger, en tant que président du jury de notre soutenance ; nous lui souhaitons la bienvenue à Tizi-Ouzou. Cela est un honneur pour nous de nous voir également évalués par Madame Si Ahmed, Maître de conférences à la faculté des sciences biologiques et agronomiques de l'UMM-TO, et Mademoiselle BELKAID N., maître assistante hospitalo-universitaire de l'UMM-TO. Un honneur est de compter parmi nous Monsieur SIFER A., ancien chef du service de Biochimie au CHU-TO.

Nous ne manquerons pas de remercier D^r MALKI, endocrinologue, et son aimable secrétaire « Zahia », ainsi que D^r FERNANE, cardiologue, pour l'ensemble des données cliniques fournies. Sans pour autant oublier mademoiselle MAHDI S. pour nous avoir précieusement épaulé à un moment où il nous fallait trois paires d'yeux.

Et en dernier lieu, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce modeste travail.

Dédicaces



Je tiens à dédier cet humble ouvrage à :

- ❧ *Mes parents sans qui je n'aurais jamais pu atteindre ce à quoi j'aspire,*
- ❧ *Mon frère et ma sœur,*
- ❧ *Mes amis, en particulier Lyes et Milou.*

Puisse Dieu nous guider vers de meilleures œuvres et nous ouvrir les portes du succès en toutes circonstances ... Amen.

Koceïla

Dédicaces



Ce travail est particulièrement dédié à :

❧ *Mes parents*

❧ *Mes frères et sœurs*

❧ *Ainsi que mes amis*

Pour leur grand amour, leur patience et leur soutien.

Que celui-ci soit le témoignage de mon affection la plus profonde et de ma gratitude.

Abdelkrim

SOMMAIRE



➤ INTRODUCTION GENERALE01

Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Chapitre I^{er} : Lipides et les lipoprotéines sériques

1. LES LIPIDES	
1.1. Définition	02
1.2. Classification et rôles biologiques	02
1.2.1. Les acides gras	03
1.2.1.1. Les acides gras saturés	03
1.2.1.2. Les acides gras insaturés	04
1.2.2. Les lipides simples.....	05
1.2.2.1. Les glycérides.....	05
1.2.2.2. Les stérides	05
1.2.2.3. Les cérides	06
1.2.3. Les lipides complexes.....	07
1.2.3.1. Les glycérophospholipides.....	07
1.2.3.2. Les Sphingolipides	08
2. LES LIPOPROTEINES SERIQUES	
2.1. Définition	09
2.2. Classification.....	10
2.3. Métabolisme.....	12
2.3.1. Métabolisme des chylomicrons et des VLDL.....	12
2.3.2. Métabolisme des LDL	13
2.3.3. Métabolisme des HDL	13
2.3.4. Régulation et variations physiologiques	14
3. LES DYSLIPIDEMIES	
3.1. Définition	15
3.2. Classification.....	15
3.2.1. Les hyperlipoprotéinémies primaires.....	16
3.2.2. Les hypolipoprotéinémies primaires.....	18
3.2.3. Les hyperlipoprotéinémies secondaires	19
3.2.4. Les hypolipoprotéinémies secondaires	19
3.3. Risques liés aux hyperlipidémies	20

II. Chapitre II^{ème} : Méthodes d'exploration des dyslipidémies

1. LE BILAN LIPIDIQUE	
1.1. Définition	21
1.2. Prélèvement, milieu biologique et conditions de conservation	21
1.3. Bilan lipidique systématique	22
1.4. Bilan lipidique orienté	22
1.5. Paramètres lipidiques	23
1.5.1. Aspect du sérum	23
1.5.2. Dosage des triglycérides	24
1.5.3. Dosage du cholestérol total	24
1.5.4. Dosage du cholestérol-HDL	25
1.5.4.1. Méthode par précipitation sélective	25
1.5.4.2. Dosage direct en phase homogène	25
1.5.5. Dosage du cholestérol-LDL	26
1.5.5.1. Ultracentrifugation séquentielle et β -quantification	26
1.5.5.2. Détermination indirecte par formules de calcul	27
1.5.5.3. Dosage direct en phase homogène	27
2. LE LIPOPROTEINOGRAMME	
2.1. Définition	27
2.2. L'électrophorèse	27
2.2.1. Définition	27
2.2.2. Principes physicochimique de la séparation électrophorétique	28
2.2.2.1. La mobilité électrophorétique μ	28
2.2.2.2. Le champs électrique E	29
2.2.2.3. Les courants liquidiens	29
2.2.2.3.1. Le courant d'endosmose	29
2.2.2.3.2. Les courants d'évaporation	29
2.2.2.4. La diffusion	30
2.2.2.5. La durée de migration	30
2.2.2.6. La nature du tampon	30
2.2.2.7. La taille des particules	30
2.2.2.8. La nature du support	30
2.3. Les méthodes électrophorétiques	30
2.3.1. L'électrophorèse libre en veine liquide	31
2.3.2. L'électrophorèse sur support	31
2.3.2.1. Electrophorèse sur papier	31
2.3.2.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose	31

2.3.2.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	31
2.3.2.4.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	31
2.3.2.4.1.	Polymérisation de l'acrylamide	32
2.3.2.4.2.	Réticulation du polyacrylamide	33
2.3.2.4.3.	Les catalyseurs de polymérisation	34
2.3.2.4.4.	Effets des conditions physico-chimiques sur la polymérisation	35
2.3.2.4.5.	Suivi de la cinétique de polymérisation.....	35
2.3.2.4.6.	Gels homogènes d'acrylamide.....	36
2.3.2.4.7.	Gels en gradient d'acrylamide	36
2.3.2.4.7.1.	Gradient continu d'acrylamide.....	36
2.3.2.4.7.2.	Gradient discontinu d'acrylamide.....	36
2.3.2.4.7.3.	Tampons ioniques dans un système a gradient discontinu.....	37
3.	DOSAGE DE LA LIPOPROTEINE (a)	38
4.	DOSAGE DES APO A-1 ET APO B.....	38

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

III. Chapitre III^{ème} : Matériels et méthodes

1.	MATERIELS	
1.1.	Appareils analytiques.....	39
1.2.	Matériel de laboratoire.....	39
1.3.	Réactifs	39
1.3.1.	Réactifs pour dosage des lipides sériques.....	39
1.3.2.	Réactifs pour la réalisation des gels de polyacrylamide et la migration électrophorétique	39
1.4.	Outils informatiques.....	40
2.	METHODES	
2.1.	Dosage des paramètres lipidiques sanguins	41
2.1.1.	Dosage des triglycérides	41
2.1.2.	Dosage du cholestérol total.....	42
2.1.3.	Dosage du cholestérol-HDL	42
2.1.4.	Evaluation du cholestérol-LDL.....	43
2.2.	Lipoprotéinogramme.....	43
2.2.1.	Optimisation du protocole	44
2.2.1.1.	Préparation des catalyseurs	45
2.2.1.2.	Préparation des solutions mères	46
2.2.1.3.	Préparation des tampons.....	47
2.2.1.3.1.	Tampon Tris – Borate – EDTA (TBE)	47

2.2.1.3.2.	Tampon Tris – Glycine / Tris - HCl	50
2.2.1.4.	Optimisation de la température de polymérisation.....	52
2.2.1.5.	Monitoring spectrophotométrique UV	53
2.2.1.5.1.	Monitoring à 260 nm	53
2.2.1.5.2.	Monitoring à 275 nm	55
2.2.1.6.	Préparation du colorant	59
2.2.1.7.	Préparation de l'épaississant de dépôt.....	61
2.2.2.	Protocole finalisé	62
2.2.2.1.	Premier jour.....	62
2.2.2.1.1.	Préparation du gel de séparation à 3.15 %	63
2.2.2.1.2.	Préparation du gel de concentration à 2.5 %	63
2.2.2.1.3.	Préparation des échantillons (précoloration et épaississement)	64
2.2.2.2.	Deuxième jour	65
2.2.2.2.1.	Injection des sérums	65
2.2.2.2.2.	Lancement de la migration	65
2.2.2.2.3.	Scan des plaques et analyse densitométrique	66

IV. Chapitre IV^{ème} : Résultats et discussion

1.	RESULTATS DES BILANS LIPIDIQUES DE BASE	67
1.1.	Sex-Ratio de la population de l'étude	67
1.2.	Répartition des hyperlipidémies dans la population de l'étude	68
1.2.1.	Les hypertriglycémies.....	68
1.2.2.	Les hypercholestérolémies.....	69
2.	RESULTATS DES LIPOPROTEINOGRAMMES	70
2.1.	Etude de profils normaux.....	70
2.2.	Etude des hypertriglycémies.....	73
2.3.	Etude des hypercholestérolémies	77
2.4.	Etude de profils perturbés	79
2.4.1.	Profils normolipémiques de personnes diabétiques	79
2.4.2.	Profils présentant des fractions supplémentaires	80
2.5.	Limites de la technique	81
➤	CONCLUSION	82
➤	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
➤	ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>Liste des abréviations</i>	
α-CD	Alpha-cyclodextrine
AAP	Amino antipyrine
ACAT	Acyl cholestérol acyl transférase
ACTH	« <i>Adreno cortico trophic hormone</i> » (hormone corticotrope)
Acyl-CoA	Acyl-coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADO	Antidiabétiques oraux
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AG	Acide gras
AGNE	Acide gras non estérifié
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
Apo	Apolipoprotéine
ARCOL	Comité Français de Coordination des Recherches sur l'Athérosclérose et le Cholestérol
ASBB	« <i>Acetylated sudan black B</i> »
ATP	Adenosine tri phosphate
BAC	N,N'-bisacrylylcystamine
C (indice)	Pourcentage du « <i>Cross linker</i> »
CETP	« <i>Cholesterol ester transfer protein</i> »
C-HDL	Cholestérol compris dans les HDL
C_i	Concentration intermédiaire
C_n	N ^{ième} carbone de la chaîne
C-LDL	Cholestérol compris dans les LDL
CT	Cholestérol total
C-VLDL	Cholestérol compris dans les VLDL
DAG	Diacyl glycérol
DATD	N,N'-diallyl tartardiamide
DHA-P	Dihydroxyacétone-phosphate
DHEBA	N,N-(1,2-dihydroxyethylene) bisacrylamide
EAL	Exploration d'une anomalie lipidique
EDA	Ethylène di-acrylate
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
GPO	Glycérol phosphate oxydase
HAS	Haute Autorité de Santé
HDL	« <i>High density lipoprotein</i> »
HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
IDL	« <i>Intermediary density lipoprotein</i> »
IP₃	Inositol triphosphate
IUPAC	« <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> »

LISTE DES ABREVIATIONS

LCAT	Lécithine-cholestérol-acyl-transférase
LDL	« <i>Low density lipoprotein</i> »
Lp (a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine lipase
Lp X	Lipoprotéine X
LRP	« <i>LDL-related receptor protein</i> »
M/V	Masse/volume
NCEP	« <i>National Cholesterol Education Program</i> »
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA-D	Polyanion-détergent
PAGE	« <i>Poly-acrylamide gel electrophoresis</i> »
PEG	Polyéthylène glycol
pHi	pH isoélectrique
PSA	Persulfate d'ammonium
P/V	Poids/volume
SBB	« <i>Sudan black B</i> »
SDS	« <i>Sodium dodecyl sulfate</i> »
SFBC	Société Française de Biologie Clinique
T (indice)	Pourcentage total d'acrylamide et de bisacrylamide
T₃	Triiodothyronine
T₄	Thyroxine
TBE	Tampon Tris-borate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylène diamine
THE	Tampon Tris-HCl-EDTA
TG	Triglycéride
TGLH	Triglycérides lipase hépatique
TRIS	Tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UV	Ultraviolet
VLDL	« <i>Very low density lipoprotein</i> »
V/V	Volume/volume

Figures :

Figure 1. Classification simplifiée des lipides _____	03
Figure 2. Représentation tridimensionnelle de structures chimiques [8] _____	04
Figure 3. Projection plane de la structure chimique du cholestérol [8] _____	06
Figure 4. Représentation schématique du site d'hydrolyse des différentes phospholipases _____	08
Figure 5. Schéma représentatif d'un édifice lipoprotéique _____	09
Figure 6. Régulation hormonale de la lipogénèse et de la lipolyse [13] _____	15
Figure 7. Aspects électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques sur gel de polyacrylamide coulé en tubes _____	18
Figure 8. Aspect de sérums hyperlipoprotéïnémiques _____	23
Figure 9. Représentation schématique des forces qui s'exercent sur une particule en migration _____	28
Figure 10. Impact du courant d'électroendosmose [40] _____	29
Figure 11. Polymérisation du polyacrylamide [48] _____	34
Figure 12. Suivi spectrophotométrique à 260nm de la polymérisation de 02 échantillons d'acrylamide en conditions identiques [48] _____	35
Figure 13. PAGE-Native a gradient discontinu [47] _____	38
Figure 14. Schéma représentatif de la méthode de détermination de la triglycéridémie _____	42
Figure 15. Schéma représentatif de la méthode de détermination de la cholestérolémie dite "de Trinder" _____	42
Figure 16. Dispositif de migration électrophorétique verticale _____	43
Figure 17. Caractéristiques des gels de polyacrylamide pour migration électrophorétique _____	44
Figure 18. Solutions préparées de TEMED et de PSA en flacons ambrés _____	45
Figure 19. Migration électrophorétique des lipoprotéines plasmatiques dans un tampon TBE sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu _____	49
Figure 20. Phénomène de tassement de l'échantillon sérique visible au fur et à mesure de l'avancée dans le stacking gel _____	50
Figure 21. Migration électrophorétique des lipoprotéines sériques précolorées au ASBB dans un système tampon triphasique Tris-Glycine/Tris-HCl en gradient discontinu de polyacrylamide _____	52
Figure 22. Suivi de la cinétique de polymérisation du gel a 3,15 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 260 nm _____	54
Figure 23 : Suivi de la cinétique de polymérisation du gel a 2,5 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 260 nm _____	55
Figure 24. Suivi de la cinétique de polymérisation des gels à 2,5 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 275 nm _____	57
Figure 25. Suivi de la cinétique de polymérisation des gels à 3,15 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 275 nm _____	58
Figure 26. Structure chimique du Noir Soudan B II (SBB-II) _____	59
Figure 27. Tracés électrophorétiques des lipoprotéines sériques précolorées au Noir soudan B natif _____	60
Figure 28. Photographie comparative des résidus de colorant dans deux puits de migration _____	61
Figure 29. Épaisseur des gels à couler _____	62
Figure 30. Photographie montrant le processus de polymérisation dans une cloche à vide _____	64
Figure 31. Photographie de l'opération d'injection de sérums précolorés dans les puits de dépôt _____	65
Figure 32. Photographie du processus de mise sous tension de la migration électrophorétique _____	65
Figure 33. Exemple d'une lecture densitométrique à l'aide de Mesurim Pro _____	66
Figure 34. Sex-ratio de la population de l'étude _____	67
Figure 35. Histogramme représentant la distribution de la population d'étude selon les taux de triglycéridémie _____	68

Figure 36. Histogramme représentant la distribution de la population d'étude selon les taux de cholestérolémie _____	69
Figure 37. Lipoprotéinogramme du pool-témoin 01 _____	71
Figure 38. Lipoprotéinogramme du pool-témoin 02 _____	71
Figure 39. Lipoprotéinogramme avec usage de témoins HDL _____	72
Figure 40. Profils électrophorétiques des hypertriglycéridémies franches pures _____	73
Figure 41. profils électrophorétiques des hypertriglycéridémies franches mixtes _____	73
Figure 42. Profils électrophorétiques des échantillons « 29 », « 90 » et « 98 » _____	75
Figure 43. Profils électrophorétiques des échantillons « 57 » et « 59 » _____	75
Figure 44. Profils électrophorétiques des échantillons « 52 » et « 76 » _____	76
Figure 45. Profils électrophorétiques des échantillons « 26 », « 78 » et « 96 » _____	78
Figure 46. Profils électrophorétiques des échantillons « 18 » et « 91 » _____	78
Figure 47. Profils électrophorétiques de patients normolipémiques sous antidiabétiques oraux _____	79
Figure 48. Profils électrophorétiques de patients normolipémiques sous antidiabétiques oraux et insuline _____	79
Figure 49. Profils électrophorétiques présentant des bandes supplémentaires _____	80

Tableaux :

Tableau 1. Fonction des principales apolipoprotéines [13,16] _____	10
Tableau 2. Caractéristiques des LDL et HDL et de leurs sous-classes [16] _____	11
Tableau 3. Facteurs de variation des lipoprotéines plasmatiques [14] _____	14
Tableau 4. Principales étiologies d'hyperlipoprotéïnémies secondaires [6] _____	19
Tableau 5. Tableau récapitulatif des indices T et C des différents gels répertoriés _____	46
Tableau 6. Rendement des réactions de polymérisation des gels a 2.5% _____	56
Tableau 7. Rendement des réactions de polymérisation des gels a 3.15% _____	56

Annexes :

ANNEXE I. Principaux acides gras rencontrés dans la nature [8].
ANNEXE II. Schéma récapitulatif du métabolisme des lipoprotéines [13].
ANNEXE III. Tableau récapitulatif des caractéristiques biologiques des différentes hyperlipoprotéïnémies classées selon Fredrickson et coll. [19].
ANNEXE IV. Tableaux récapitulatifs de la calibration des pipettes.
ANNEXE V. Tableau récapitulatif du bilan lipidique général de la population de l'étude.

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Les pathologies cardiovasculaires constituent un problème majeur de santé publique à l'aube du 21^{ème} siècle. Ceci est en partie dû à l'avènement d'un Service Médical Rendu (SMR) de qualité sans cesse améliorée, aboutissant à un prolongement de l'espérance de vie de la population et à l'apparition concomitante de maladies dites « de vieillissement ». En 2012, les chiffres de l'OMS attestent que 7,4 millions des décès étaient imputables à des atteintes coronariennes, tandis que 6,7 millions des décès étaient causés par des accidents vasculaires cérébraux, deux pathologies directement associées aux accidents athérombotiques et qui, rappelons-le, ont pour facteur déclenchant principal les hypercholestérolémies, particulièrement celles liées à l'élévation des lipoprotéines de basse densité. Cependant cette fraction de lipoprotéines reste fortement hétérogène et l'impact cardiovasculaire qui en découle varie selon ses différentes sous-classes, à un moment où les dosages du cholestérol total, cholestérol-HDL ou cholestérol-LDL ne permettent d'avoir qu'une idée globale de la distribution du cholestérol sur les fractions principales. D'un autre côté, il est établi aujourd'hui que les hypertriglycéridémies, en dehors du risque certain de pancréatites aiguës qu'elles véhiculent, concourent également à des atteintes cardiovasculaires par des mécanismes directs et indirects : ainsi donc, les « remnants » de lipoprotéines riches en triglycérides peuvent non seulement pénétrer dans l'intima des vaisseaux et participer aux phénomènes athérosclérotiques, mais ils contribuent également à la baisse du taux plasmatique des lipoprotéines de hautes densités (HDL), facteur vasculo-protecteur en soi.

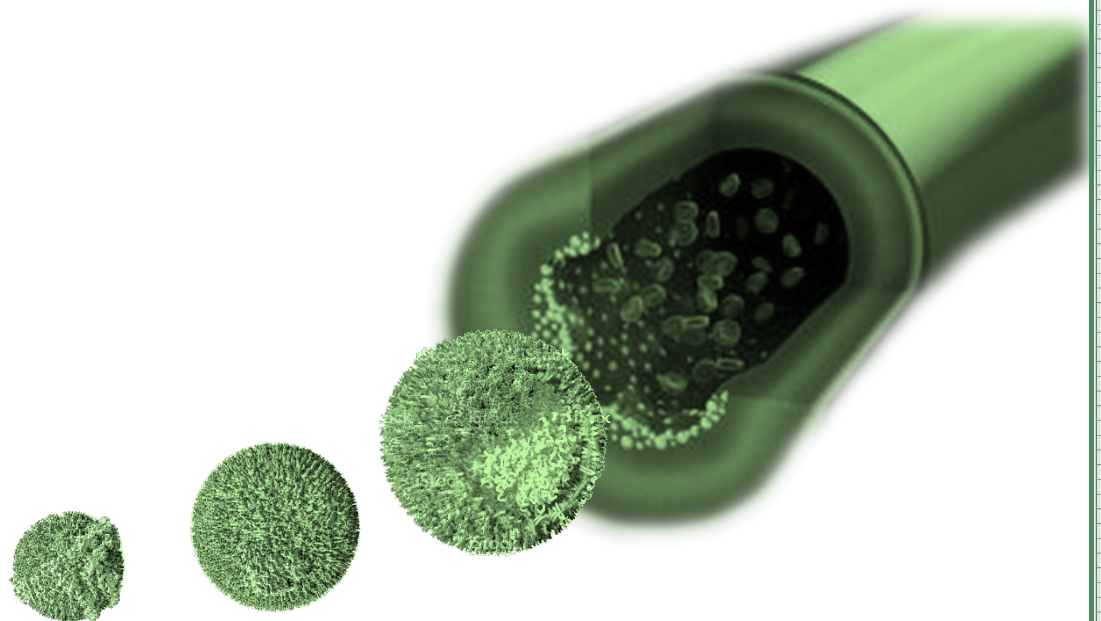
Le présent travail a pour objectif la mise en place d'une technique séparative des lipoprotéines sériques basée sur un principe électrophorétique, qui soit à la fois peu onéreuse, accessible au laboratoire et assez résolutive pour aboutir à des lipoprotéinogrammes aptes à mettre en évidence les différentes classes de lipoprotéines ainsi que leurs variations qualitatives et semi-quantitatives dans le cadre des hyperlipidémies, le but final restant de redonner une place au lipoprotéinogramme dans l'adaptation des thérapies normolipémiantes en fonction des classes atteintes et l'anticipation des risques postérieurs sur la santé de patients normolipémiques présentant malgré cela des lipoprotéinogrammes perturbés.

PREMIÈRE PARTIE :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I^{er} :

Lipides et lipoprotéines sériques



1. LES LIPIDES

1.1. Définition

Sont regroupés sous le nom de lipides toutes les substances d'origine organique, insolubles dans l'eau (hydrophobes ou plus rarement amphiphiles), solubles dans la plupart des solvants organiques tels que le Chloroforme, l'Ether, l'Acétone ou le Méthanol, et comportant au moins une chaîne grasse ou un acide gras (« Lipide » dérivant du Latin Lipos = Gras). D'autres composés, tels que le cholestérol et les dérivés stéroïdes sont rattachés aux lipides quand bien même ils ne comportent pas de chaînes ou d'acides gras, et cela compte tenu de leur hydrophobie commune [1,2].

1.2. Classification et rôles biologiques

On dénombre dans la littérature différents essais de classification des lipides, les regroupant pour la plupart sur la base de caractéristiques chimiques et/ou structurales communes.

A titre d'exemple, Polonovski [3] les a classés suivant les constituants atomiques du lipide, en :

- ↳ *Lipides simples ternaires* composés de Carbone, Hydrogène et Oxygène,
- ↳ *Lipides phosphorés* ; qui incluent les Sphingophospholipides et les Glycérophospholipides dont les Lécithines et les Céphalines,
- ↳ *Lipides azotés non phosphorés* ; qui incluent les céramides et les sphingosidolipides dont les cérébrosides et les gangliosides,
- ↳ *Lipides soufrés* dits Sulfatides.

L'IUPAC [4] à son tour les classe en :

- ↳ Acides gras et leurs esters,
- ↳ Glycérides,
- ↳ Phospholipides (essentiellement les phosphoglycérides et les sphingolipides),
- ↳ Glycolipides.

Nous constatons ainsi que les stérols (dont le cholestérol) et les stéroïdes n'y figurent pas, et sont considérés comme Terpénoïdes, aux côtés des terpènes et des caroténoïdes.

Une classification plus récente et plus complète [5], qui dérive de celle adoptée par l'IUPAC, dénombre quant à elle 05 catégories, incluant ainsi l'ensemble des lipides et lipoïdes :

- Les polykétides
- Les acylglycérols
- Les sphingolipides
- Les prénoles
- Les saccharolipides

En somme, une classification plus simplifiée, adoptée par Louisot [6] et retenue par nos soins, est illustrée dans le schéma ci-dessous :



Figure 1. Classification simplifiée des lipides

1.2.1. Les acides gras

Substances organiques formées d'un enchainement linéaire d'au moins 04 carbones, dont le premier est oxydé en fonction carboxylique. Les liaisons carbone-carbone peuvent être toutes saturées (AG saturés) ou comporter des doubles liaisons (AG mono- ou polyinsaturés) [1]. Cependant, des ramifications de la chaîne carbonée peuvent être observées sur les acides gras des microorganismes [7].

Les propriétés physiques des acides gras sont intimement dépendantes de la longueur et du degré d'insaturation de la chaîne aliphatique : ainsi, le raccourcissement de la chaîne ou l'augmentation du nombre de doubles liaisons diminue considérablement le point de fusion, ayant pour conséquence d'augmenter la fluidité des acides gras concernés ou des lipides qu'ils constituent [8]. De ce fait, le nombre de carbones, la présence ou l'absence ainsi que le nombre d'insaturations sur la chaîne aliphatique constituent la base même de la classification des acides gras (*Voir. Annexe I*).

1.2.1.1. Les acides gras saturés

Leur formule chimique semi-développée est $[\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}]$ et sont numérotés à partir du carbone carboxylique suivant la chaîne aliphatique. Les plus répandus sont les acides butyrique, palmitique, stéarique (*Figure 2-A*) et lignocérique, respectivement à 04, 16, 18 et 24 carbones [1]. Ils peuvent être naturels, retrouvés essentiellement dans le lait et ses dérivés, le beurre et les viandes, ou issus de l'hydrogénation industrielle des acides gras insaturés naturels [9,10].

1.2.1.2. Les acides gras insaturés

Acides gras comportant une ou plusieurs doubles liaisons de configuration spatiale *Cis* (cas des AG naturels) ou *Trans*. Les atomes de carbone sont numérotés à partir du carboxyle et la position d'une double liaison est indiquée par le symbole Δ dit *Delta* suivi d'un nombre en exposant qui donne le numéro du ou des premiers carbones impliqués. Toutefois, ces acides gras peuvent être regroupés en familles en fonction de la position de la dernière insaturation par rapport au dernier carbone qui est noté ω dit *oméga* [1,11]. Dans la plupart des acides gras monoinsaturés, la double liaison se situe en Δ^9 et dans les acides gras polyinsaturés les autres doubles liaisons sont habituellement en Δ^{12} et Δ^{15} , et ne sont donc presque jamais conjuguées [8].

On retrouve ainsi 03 grandes familles contenant chacune un acide gras indispensable non synthétisable par les mammifères, base de la synthèse endogène des autres acides gras de la même famille [1,8] :

- Les *oméga 03*, dont l'acide α -linoléique, acide gras essentiel et indispensable pour les mammifères,
- Les *oméga 06*, dont l'acide linoléique, autre acide gras essentiel et indispensable, et l'acide arachidonique, précurseur des médiateurs eïcosanoïdes endogènes,
- Les *oméga 09*, dont l'acide oléique (*Figure 2-A*).

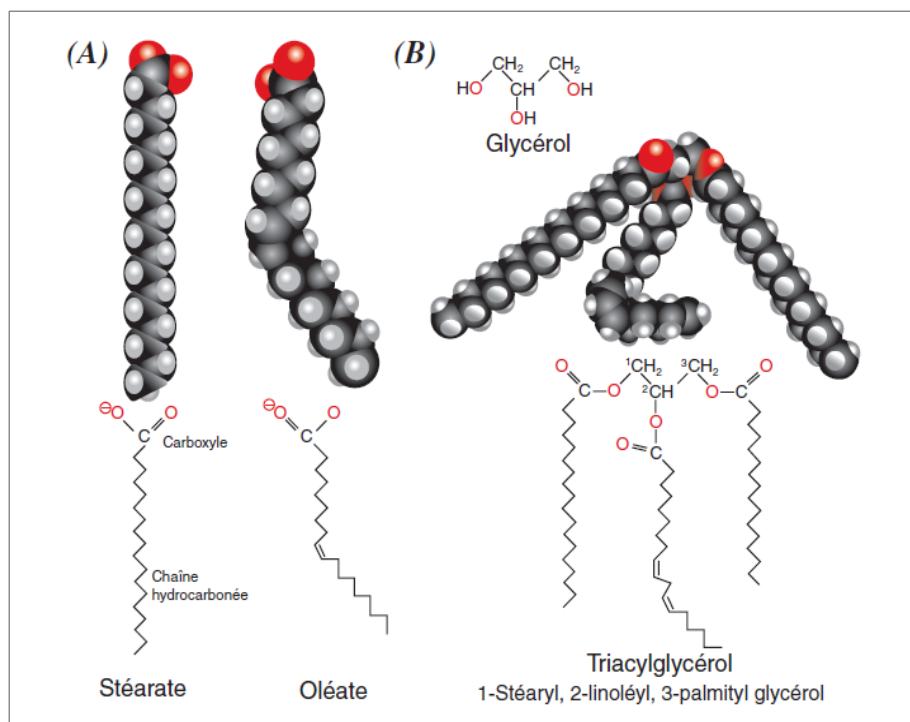


Figure 2. Représentation tridimensionnelle de structures chimiques [8] :
(A) Acides gras (B) triglycéride.

Les acides gras constituent la base fondamentale de la synthèse de plusieurs lipides. Eux même issus de la condensation d'unités d'acétyl CoA (ce qui explique le caractère souvent binaire du nombre de carbones sur la chaîne [6]), ils estérifient les fonctions « hydroxyles » et « amines » des poly alcools organiques pour former les composés lipidiques supérieurs.

1.2.2. Les lipides simples

Ce sont des composés ternaires (contenant du Carbone, de l'Oxygène et l'Hydrogène seulement) issus de la condensation d'acides gras avec différents alcools organiques. En fonction de l'alcool organique, on les classe en glycérides, stérides et cérides [1].

1.2.2.1. Les glycérides

Sont regroupés sous le terme de glycérides tous les composés issus de l'estérification d'acides gras sur un triol organique : le glycérol. Les fonctions hydroxyles de ce dernier, notées respectivement « 1 », « 2 » et « 3 » ou « α », « β » et « α' », peuvent être toutes estérifiées conduisant à un triglycéride, par opposition aux monoglycérides (une estérification) et aux diglycérides (deux estérifications). D'autre part l'estérification peut se faire par un même acide gras aboutissant à des glycérides homogènes, par opposition aux glycérides hétérogènes dont les acides gras estérifiants sont différents [1,6].

Les glycérides, nommés également acylglycérols ou graisses neutres, représentent quantitativement la majorité des lipides naturels. Ils constituent environ 90% des lipides du tissu adipeux chez l'humain, et ont pour rôle biologique majeur la libération des acides gras qui entrent dans le cycle de la β -oxydation afin de produire de l'ATP, ce qui en fait des réserves énergétiques de choix pour l'organisme [1,6,8].

La structure de grande taille et fortement hydrophobe des triacylglycérols fait que son absorption chez les mammifères ne peut se faire qu'après digestion, et cela à l'aide d'une Lipase pancréatique qui hydrolyse les liaisons esters en « α » et en « α' » ne libérant ainsi que 02 acides gras, laissant place à un monoglycéride. Cependant, une libération des 03 acides gras à partir des triglycérides est observée au niveau adipocytaire compte tenu de la présence concomitante d'une Lipase adipocytaire hormonosensible et d'une monoglycéride lipase [1].

1.2.2.2. Les stérides

Ce sont des esters d'acides gras et d'alcools polycycliques : les stérols. Ces stérols sont des dérivés isopréniques dont le noyau de base est une structure *cyclo-pentano-perhydro-phenantrénique* [6].

Le cholestérol (*Figure 3*) est le principal stérol des tissus animaux où il joue différents rôles biologiques [8] :

- Constituant des membranes, dont il stabilise les structures.

- Précurseur de molécules douées d'une activité biologique importante, dont :
 - ↳ Les sels biliaires qui interviennent dans la digestion des graisses,
 - ↳ La famille des hormones stéroïdes, subdivisée en Glucocorticoïdes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire et l'équilibre glycémique, les minéralocorticoïdes impliqués dans l'équilibre hydro-électrolytique, et les stéroïdes sexuels qui sont directement impliqués dans le développement des organes sexuels et le contrôle de la reproduction,
 - ↳ La vitamine D qui intervient dans l'équilibre phosphocalcique en augmentant notamment l'absorption intestinale du Calcium et sa fixation osseuse.

Le cholestérol est apporté par l'alimentation mais il est aussi synthétisé de novo, essentiellement dans le foie, mais aussi dans l'intestin. Il est transporté dans les fluides corporels sous forme d'esters d'acides gras au sein de particules lipoprotéiques et sous forme libre à leur surface (cf. 2.1 Définition des lipoprotéines). Le transport est assuré d'un côté par les chylomicrons et ses remnants pour le cholestérol d'origine alimentaire, et de l'autre côté par les LDL et les HDL pour le cholestérol endogène [8].

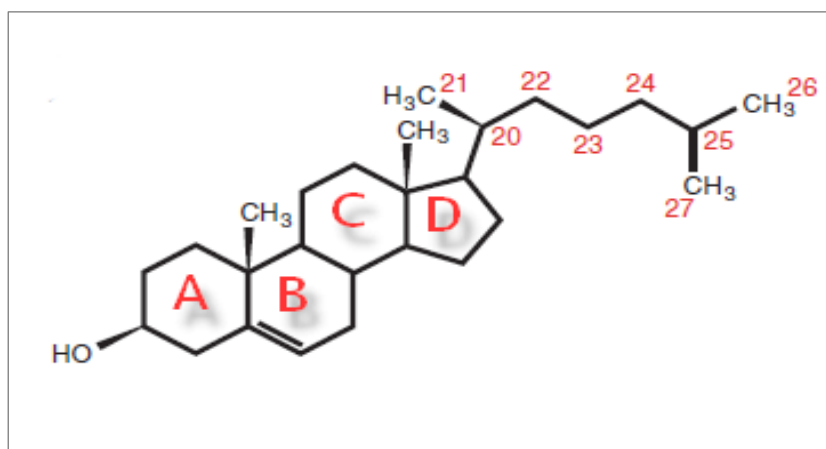


Figure 3. Projection plane de la structure chimique du cholestérol [8].

1.2.2.3. Les cérides

Sont des esters d'acides gras et d'alcools à poids moléculaire élevé, ce qui leur confère une consistance semi-solide à température ambiante (point de fusion avoisinant les 80°C) [6].

Ce sont les lipides constitutifs des cires animales (blanc de baleine), végétales (cuticule des feuilles) et bactériennes (bacille de Koch), ayant le plus souvent un rôle majeur de revêtement protecteur [6].

1.2.3. Les lipides complexes

Ce sont des hétérolipides contenant, en plus du Carbone de l'Oxygène et de l'Hydrogène, des groupes Phosphate, Sulfate ou glucidique. Ils sont ainsi classés par rapport à la molécule qui fixe les acides gras [12] :

- soit le *glycérol*, donnant les glycérophospholipides.
- soit une *base sphingoïde* (dialcool aminé) qui définit les sphingolipides.

1.2.3.1. Les glycérophospholipides

Plus couramment appelés « phospholipides », ce sont des lipides issus de l'estérification d'acides phosphatidiques à l'aide de leur résidu phosphate sur différents alcools organiques, ce qui en fait des lipides amphiphiles et polaires (par opposition au triglycérides), composants de base des bicouches lipidiques membranaires. Les acides phosphatidiques sont issus, quant à eux, de l'estérification du glycérol en « α » par un phosphate aboutissant à un acide L- α -glycérophosphorique, suivie d'estérifications par différents acides gras à chaîne longue (>14 carbones) en « α' » et en « β », dont l'un des deux est souvent insaturé [1,6,8].

Les glycérophospholipides sont substrats à 04 différentes phospholipases : A₁, A₂, C et D en fonction du site dont elles catalysent l'hydrolyse (*Figure 4*) libérant différentes fractions lipidiques ayant chacune un rôle biologique déterminé [1].

On distingue différents phospholipides en fonction de l'alcool qui se greffe sur le résidu phosphate, dont les intérêts biologiques sont remarquables [6]:

- *Les lecithines* ou phosphatidyl-choline ; dont l'alcool estérifié par le phosphate est la Choline. Elles sont largement répandues dans la nature et retrouvées essentiellement dans le foie et le cerveau des mammifères, ainsi que dans le jaune d'œufs.
- *Les céphalines* ou phosphatidyl-ethanolamines ; dont l'alcool estérifié par le phosphate est l'Ethanolamine.
- *Les phosphatidyl-serines* ; dont l'alcool qui se greffe sur le phosphate est un acide aminé: la Serine. Elles représentent 50 % des glycérophospholipides cérébraux.
- *Les phosphatidyl-inositides* ; dont l'alcool qui se greffe sur le phosphate est un Inositol, grande famille d'hexa-alcools cycliques dont le plus abondant est le Myoinositol. Les phosphatidyl-inositols jouent un rôle important dans la conduction des messages cellulaires en donnant de l'Inositol Triphosphate (IP₃) et du DiAcylGlycérol (DAG) sous l'action d'une phospholipase C.

2. LES LIPOPROTEINES SERIQUES

2.1. Définition

Les lipoprotéines sériques sont des structures supramoléculaires dont la taille est comprise entre 10nm et 01µm. Elles sont formées de protéines appelées « Apolipoprotéines » et de lipides (*Figure 5*), et servent à transporter ces derniers dans le sang. Ce transport est effectué en surface concernant les lipides polaires que sont le cholestérol libre et les phospholipides, tandis que les lipides apolaires tels que le cholestérol esterifié ou les triglycérides sont transportés au cœur de la lipoprotéine [6,13], mis a part les acides gras non esterifiés qui sont transportés, quant a eux, par l'albumine [14].

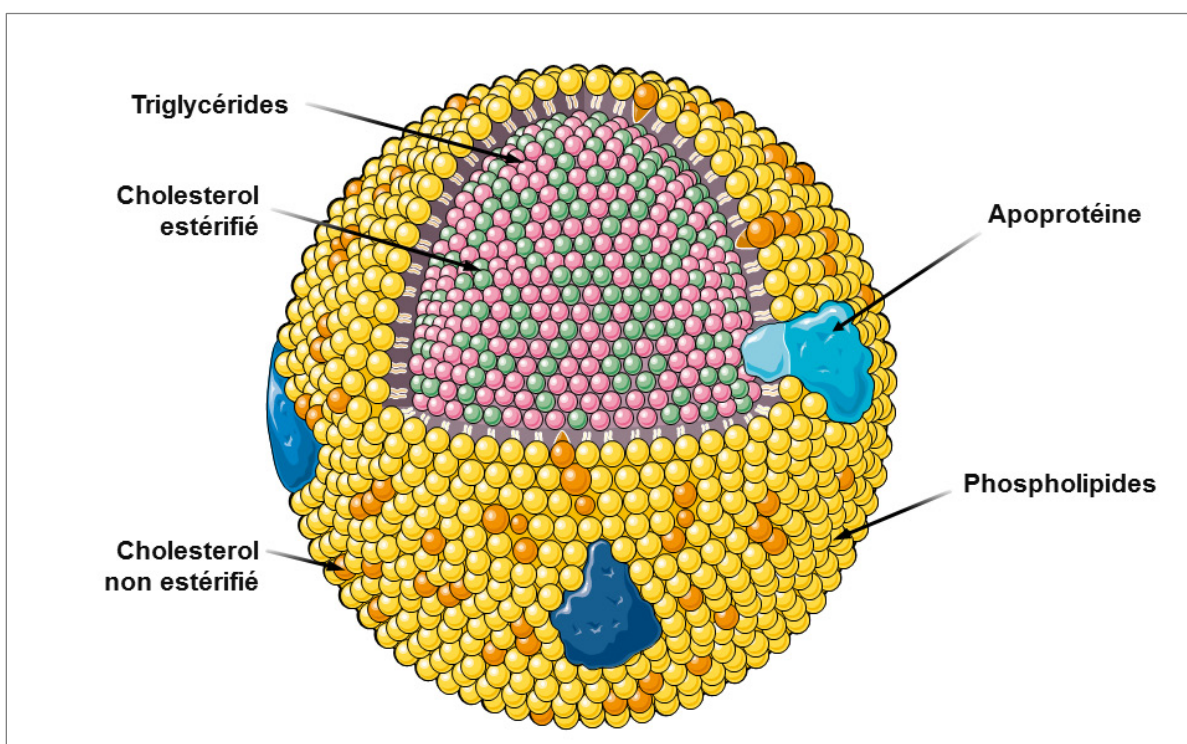


Figure 5. Schéma représentatif d'un édifice lipoprotéique.

Schéma mis à disposition par Servier Medical Art [15] selon les termes de la licence Creative Commons Attribution 3.0 France.

Les Apolipoprotéines (ou Apoprotéines) jouent un double rôle au sein de l'édifice (*Tableau I*), car non seulement elles participent à la stabilité de la structure et son hydrophilie interfaciale dans la circulation sanguine, mais elles jouent également un rôle fonctionnel important : certaines activent différentes enzymes du métabolisme lipoprotéique, tandis que d'autres jouent un rôle dans la reconnaissance des sites-récepteurs, participant grandement à la fonctionnalité de l'édifice lipoprotéique [13].

Tableau 1. Fonction des principales apolipoprotéines [13,16].

Apolipoprotéine	Fonction
A-I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Co-facteur de la Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase (LCAT) ▪ Active le transport Reverse du cholestérol
A-II	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protéine de structure des HDL
B₁₀₀	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Synthèse et transport des VLDL et des LDL ▪ Reconnaissance des récepteurs aux LDL
B₄₈	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Synthèse et transport des chylomicrons et des VLDL
C-I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Active la Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase (LCAT)
C-II	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Active la Lipoprotéine Lipase (LPL) responsable de l'épuration des triglycérides
C-III	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibe la Lipoprotéine Lipase (LPL)
D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rôle dans le métabolisme des esters du Cholestérol
E	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reconnaissance des remnants de chylomicrons et de VLDL par les récepteurs hépatiques (épuration des particules résiduelles) ▪ Reconnaissance des récepteurs aux LDL

2.2. Classification

La classification des lipoprotéines s'est faite sur la base de trois critères [6,16] :

- Leur densité en ultracentrifugation de flottation, classification établie par Gofman et coll. en 1954 ;
- Leur mobilité électrophorétique, par analogie aux protéines plasmatiques ;
- Les types d'Apolipoprotéines qui les composent, nouvelle classification proposée par Alaupovic et coll. définissant la notion de « lipoparticules » simples et complexes.

Ainsi, on retrouve en ordre croissant de densité [14,16] :

- *Les chylomicrons*, particules volumineuses (75 nm – 1000 nm) de densité très faible, elles ne migrent pas ou très peu à l'électrophorèse. Elles sont très riches en triglycérides issus de l'alimentation, et l'Apo C-II représente la majeure partie de la fraction protéique, suivie de l'Apo B₄₈, de l'Apo E et A. Elles ne sont présentes physiologiquement dans le sang qu'en période postprandiale.
- *Les Very Low Density Lipoproteins (VLDL)*, qui sont isolées de la fraction ayant une densité comprise entre 0,95 et 1,006. Elles sont plus petites que les chylomicrons (30nm - 50nm) et migrent en avant des β-lipoprotéines sur gel d'agarose, ce qui leur a valu le nom de pré β-lipoprotéines. Leur fraction protéique est principalement représentée par l'Apo B₁₀₀, en présence de quelques Apo C-II, C-III et E.

- *Les Low Density Lipoproteins (LDL)*, Lipoprotéines riches en Cholestérol, de densités comprises entre 1,006 et 1,0063. Elles migrent en position β sur gel d'agarose, d'où leur appellation de β -lipoprotéines. Et du fait qu'elles dérivent des VLDL, elles partagent avec ces dernières les mêmes Apoprotéines, à savoir l'Apo B₁₀₀ majoritairement ainsi que les Apo C-II, C-III et E. Il est important de signaler que la fraction LDL est hétérogène, et qu'elle comporte, au moins, 02 sous-classes : les LDL₁ dites IDL (*Intermediary density Lipoprotein*), forme métabolique transitoire quasiment absente physiologiquement du sérum humain, et les LDL₂ (*Tableau 2*).
- *Les High Density Lipoproteins (HDL)*, sont des lipoprotéines de densité comprise entre 1,063 et 1,25. Elles sont composées de phospholipides, de Cholestérol et d'une forte fraction protéique (environ 50 %) représentée majoritairement par l'Apo A-I et A-II, en présence d'une moindre proportion d'Apo C et E. Leur faible taille leur permet de migrer au front, en position α , d'où leur nom d' α -lipoprotéines. Les HDL représentent également une fraction hétérogène composée de 03 sous-classes (*Tableau 2*) : les HDL₁, HDL₂ et les HDL₃. Cependant, les HDL₂ et HDL₃ sont les plus importantes et correspondent aux principales étapes métaboliques des HDL (cf. 2.3.3 *métabolisme des HDL*).

Tableau 2. Caractéristiques des LDL et HDL et de leurs sous-classes [16].

Principales classes lipoprotéiques	Diamètre moléculaire (nm)	Sous-classes	Densité relative (Kg/l)
Lipoprotéines de basses densités (LDL)	20 - 22	LDL ₁ (IDL) LDL ₂	1,006 – 1,019 1,019 – 1,063
Lipoprotéines de hautes densités (HDL)	7,5 – 10	HDL ₁ HDL ₂ HDL ₃	1,063 – 1,085 1,085 – 1,125 1,125 – 1,210

Il est à noter également que des lipoprotéines particulières peuvent être rencontrées dans le sérum humain, exemple de :

- *La Lp (a)*, lipoprotéine dont les taux plasmatiques sont très variables d'un individu à l'autre et qui est assimilée aux LDL, sa densité est cependant plus élevée et sa taille plus grande que ces dernières. Elle comporte également une molécule d'Apo (a) pour chaque Apo B₁₀₀. Cette Apo (a) est une glycoprotéine de surface, reliée à l'Apo B₁₀₀ par un pont disulfure et qui présente une grande homologie avec le plasminogène [13,14]. Longtemps mise en cause dans les phénomènes thromboemboliques, des études récentes [17] réfutent cette théorie bien que la Lp (a) soit un facteur certain d'athérogénicité, et un marqueur prometteur dans le suivi des patients à risques cardiovasculaires [18].
- *La Lp X*, lipoprotéine riche en phospholipides et en cholestérol et couramment rencontrée lors de syndromes cholestatiques [16].

2.3. Métabolisme (pour le résumé voir. Annexe II)

2.3.1. Métabolisme des chylomicrons et des VLDL

Dans les entérocytes, les acides gras à longues chaînes et les monoglycérides issus de la digestion des triglycérides (cf. 1.2.2.1 *Les glycérides*) et absorbés sont réestérifiés en triacyglycérols, de même pour le cholestérol libre absorbé qui est également réestérifié, pendant que les acides gras à courtes chaînes passent directement dans le sang. L'intestin est l'organe de synthèse exclusif des chylomicrons, par synthèse entérocytaire de l'Apo B₄₈ et A-I et incorporation concomitante des triglycérides exogènes et des esters de cholestérol néoformés. Le transport initial des chylomicrons se fait par voie lymphatique via le canal thoracique avant de rejoindre la circulation sanguine [13,14,19].

Les VLDL sont principalement synthétisées par le foie avec inclusion du cholestérol et des triglycérides d'origine endogène en compagnie de l'Apo B₁₀₀ notamment [14]. Une partie des VLDL (20%) est cependant synthétisée au niveau entérocytaire [13].

Chylomicrons et VLDL subissent ensuite l'action de la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme, libérée dans le plasma grâce à l'Héparine, se fixe à l'endothélium des capillaires sanguins où elle est activée par l'Apo C-II présente dans les chylomicrons et les VLDL, préalablement cédée par les HDL. La LPL a pour rôle de libérer les acides gras des triglycérides, qui auront soit à subir la β -oxydation après pénétration dans les myocytes (source importante d'énergie), ou bien une resynthèse de triglycérides de réserve après pénétration dans les adipocytes. Après hydrolyse des triglycérides par la LPL, les chylomicrons se transforment en particules résiduelles dénommées « Remnants », et les VLDL en IDL [13].

Les remnants, ayant acquis du cholestérol estérifié transféré des HDL par l'intermédiaire de la *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP), libèrent leurs phospholipides, l'Apo C-II et l'Apo A-I avant d'être captés et épurés par les cellules hépatiques grâce à des récepteurs de l'Apo E spécifiques aux remnants dénommés LRP (*LDL-related receptor protein*). De même, les IDL ainsi formés, appauvris en triglycérides et en apoprotéines et enrichis en cholestérol estérifié transféré des HDL par la CETP, sont en partie captés par des récepteurs hépatiques de l'Apo B / Apo E distincts de ceux des remnants, et internalisés pour être catabolisés. Cependant, seules les isoformes E₃ et E₄ sont reconnus par le récepteur, à l'exclusion du E₂ qui entraîne bien souvent l'accumulation d'IDL dans le sang des patients porteurs (cf. 3.2.1.1 *Classification de Fredrickson et coll. - type III*). La fraction restante, quant à elle, subit l'action d'une triglycéride lipase hépatique tout en perdant l'Apo E, et aboutit à des lipoprotéines plus denses, les LDL [13,14].

2.3.2. Métabolisme des LDL

Les LDL sont les lipoprotéines vectrices du cholestérol vers les tissus périphériques, essentiellement dans sa forme estérifiée. Grâce à des récepteurs à Apo B₁₀₀ présents non seulement dans les tissus périphériques mais également au niveau hépatique, les LDL sont captés puis internalisés dans des lysosomes pour être dégradés libérant ainsi du cholestérol libre dans les cellules [13,14]. Ce cholestérol pourra [13] :

- Être utilisé par la cellule comme constituant de membrane, ou précurseur de synthèse biologique (cf. 1.2.2.2 *Les stérides*) ;
- Être stocké sous forme de cholestérol estérifié grâce à une enzyme, *l'Acyl Cholestérol Acyl Transférase* (ACAT) qui permet d'estérifier le cholestérol intracellulaire avec des acyl-coenzymes A ;
- Inhiber la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase, enzyme régulatrice de la synthèse du cholestérol,
- Inhiber la synthèse des récepteurs à Apo B₁₀₀.

Cependant, certaines particules de LDL subissent des modifications structurales (oxydation et acétylation entre autres) rendant leur reconnaissance par les récepteurs à Apo B₁₀₀ impossible. Ces particules transformées sont prises en charge par des macrophages à l'aide de récepteurs-éboueurs nommés « Scavengers » mais qui ne subissent pas une régulation par la quantité de cholestérol internalisée. S'en suit alors une phagocytose massive et la transformation en cellules spumeuses qui adhèrent à la paroi vasculaire et déclenchent le processus d'athérosclérose [13] (cf. 3.3 *Risques liés aux hyperlipidémies*).

2.3.3. Métabolisme des HDL

L'origine des HDL est mixte, car non seulement le foie sécrète des HDL discoïdales essentiellement composées d'Apo E, mais on observe également dans la circulation sanguine des replis formés à partir des éléments de surface des chylomicrons et des VLDL, lors de l'hydrolyse des triglycérides, et qui représentent une source importante d'HDL discoïdales contenant principalement des Apo A-I et Apo C [13,20].

Les HDL naissantes ne contiennent pas de cholestérol estérifié mais au fur et à mesure de leur circulation dans le sang elles acquièrent des phospholipides et du cholestérol libre, et une fois ce dernier estérifié par la *Lecithine Cholestérol Acyl Transférase* (LCAT) activée par l'Apo A-I, il migre au cœur de la lipoprotéine formant des HDL de forme sphérique, de petite taille et de densité élevée : les HDL₃. Ces dernières continuent de capter le cholestérol périphérique, de l'estérifier et de l'internaliser pour finalement se transformer en HDL₂, HDL

de plus grande taille et de densité moins élevée qui peuvent être reconnues par les cellules hépatiques via l'Apo A-I et internalisés afin d'être catabolisées [13,20], ou bien formeront un des maillons d'un équilibre dynamique avec notamment l'action concomitante de la CETP et de la TGLH sur ces HDL₂ : la CETP transfère le cholestérol estérifié des HDL₂ aux VLDL et aux chylomicrons en échange de triglycérides, et ces derniers sont à nouveau hydrolysés par la TGLH, régénérant ainsi les HDL₃ [14].

En somme, les HDL assurent le transport « reverse » du cholestérol suivant 04 étapes [13] :

- Récupérer l'excès de cholestérol libre des tissus périphériques.
- Permettre l'estérification du cholestérol libre par la LCAT pour libérer les sites périphériques de la lipoprotéine.
- Échanger ces stérides ainsi formé contre les triglycérides des VLDL et des chylomicrons grâce à la CETP.
- Ramener au foie le cholestérol non échangé des tissus.

2.3.4. Régulation et variations physiologiques

La régulation hormonale porte essentiellement sur le métabolisme des triglycérides dont l'importance énergétique est fondamentale. La lipogenèse et la lipolyse sont en équilibre constant et régulés physiologiquement par différentes hormones [13] (*Figure 6*).

Ceci dit, des facteurs physiologiques ou externes influencent également les lipoprotéines sériques tant en leurs concentrations qu'en leurs compositions (cholestérol et triglycérides) [14] (*Tableau 3*).

Tableau 3. Facteurs de variation des lipoprotéines plasmatiques [14].

Facteur de variation	HDL-Cholestérol	LDL-Cholestérol	Triglycérides
Sexe	Femme > Homme	Homme = Femme	Homme > Femme
Age	↑ modérée (F)	↑	↑
Rapport P/S* élevé	Normal ou ↓	↓	Normal ou ↓
Exercice	↑	↓	↓
Tabagisme	↓	Normal	Normal
Estrogènes exogènes	↑	↓	↑

* : Rapport P/S = Rapport $\frac{\text{acides gras polyinsaturés}}{\text{acides gras saturés}}$ dans l'alimentation

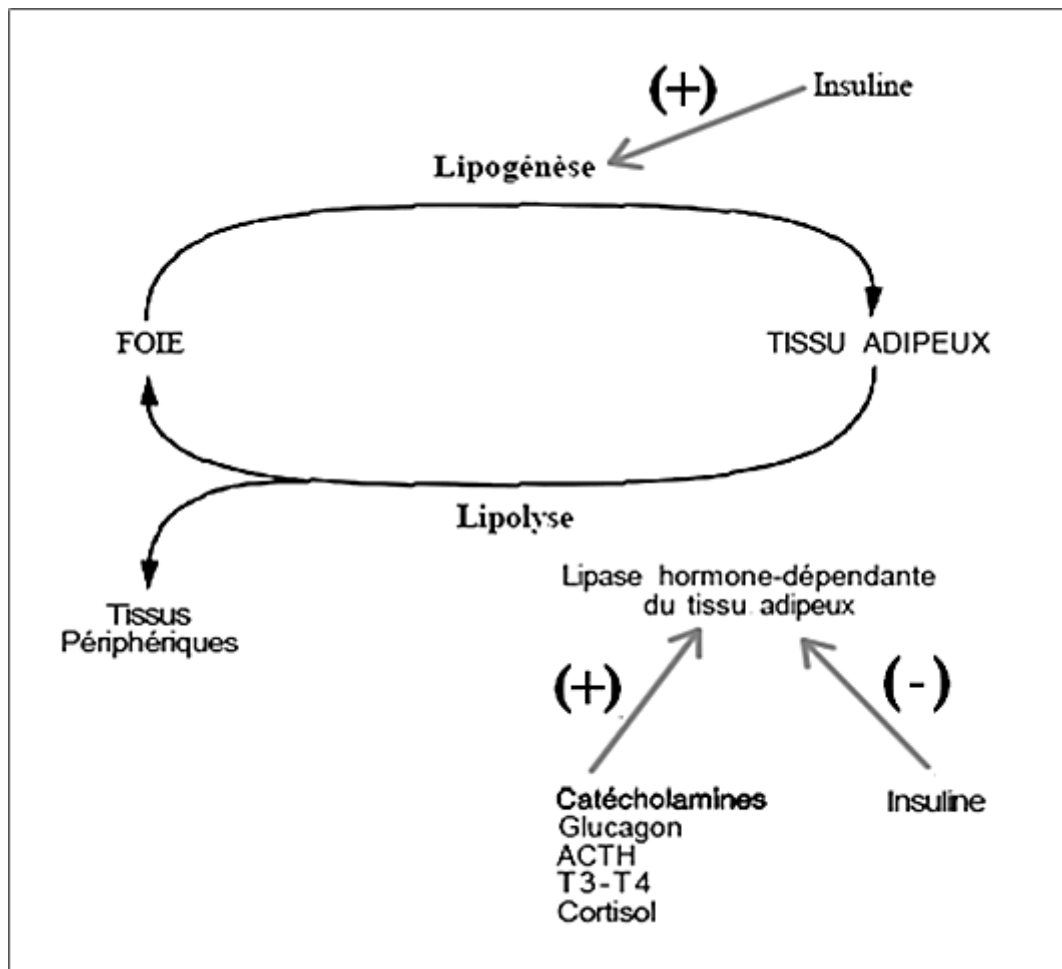


Figure 6. Régulation hormonale de la lipogénèse et de la lipolyse [13].

(+) : stimulation ; (-) : inhibition.

3. LES DYSLIPIDEMIES

3.1. Définition

Les dyslipidémies sont des atteintes du métabolisme des lipides et lipoprotéines circulants qui font partie de la grande famille des lipidoses, en compagnie notamment des sphingolipidoses (Maladies de Fabry, Gaucher ...etc). Elles se caractérisent par la variation hors des valeurs normales d'un ou plusieurs paramètres du bilan lipidique, par excès définissant les hyperlipidémies qui sont les plus fréquentes, ou par défaut caractérisant les hypolipidémies [6,14,21].

3.2. Classification

Les dyslipidémies peuvent être sommairement classées en dyslipidémies primaires, comprenant des pathologies à déterminisme génétique établi, et en dyslipidémies secondaires, reflets d'autres affections sous-jacentes [14].

La relation étroite entre lipides et lipoprotéines circulants (cf. 2.1 définition des lipoprotéines) fait que la variation d'un des deux paramètres est indéniablement liée à celle de

l'autre, dans un sens ou dans l'autre. Il est dès lors impossible de faire une distinction entre dyslipidémies et dyslipoprotéinémies.

Néanmoins, des classifications peuvent se baser sur l'un ou l'autre des paramètres afin d'établir des classes phénotypiques a même de distinguer les différentes entités pathogéniques, c'est ainsi que, concernant les hyperlipidémies ou hyperlipoprotéinémies primaires, Fredrickson et coll. [22] ont établi une classification (*Voir. Annexe III*) basée sur l'aspect électrophorétique des différentes formes (*Figure 7*), classification qui fût affinée par les directives de l'OMS (1970), alors que De Gennes [23] s'est axé sur les variations de triglycérides et de cholestérol pour distinguer les différentes entités. Ces classifications, bien que ne se basant pas à l'époque sur des preuves génétiques fiables, restent tout de même d'actualité vu la confirmation récente des atteintes métaboliques propres à chaque type [19] .

3.2.1. Les hyperlipoprotéinémies primaires

Elle met en évidence 06 différents types d'hyperlipoprotéinémies primaires [6,19,21] :

- **Hyperlipoprotéinémie de type I** ; dite hypertriglycérémie d'origine exogène ou maladie de Burger et Grutz, affection héréditaire se transmettant sur le mode autosomique récessif, d'incidence très faible. Elle se caractérise par une forte élévation des TG (jusqu'à 50g/l) et la présence de chylomicrons circulants même en période de jeûne, donnant un aspect lactescent au sérum et rendant le test de crémage positif (*Figure 8*). L'origine pathogénique est un déficit en LPL ou en son cofacteur : l'Apo C-II, ce qui explique les taux très élevés de TG alors que le taux de cholestérol reste normal, et que la pathologie soit maitrisable avec un régime alimentaire hypolipidique adéquat. Les manifestations cliniques sont précoces sous forme de xanthomes éruptifs, d'hépatosplénomégalie et de douleurs abdominales faisant suspecter bien souvent une atteinte pancréatique.
- **Hyperlipoprotéinémie de type II a** ; ou hypercholestérolémie essentielle, maladie familiale de transmission autosomique dominante, de plus grande incidence et à fort pouvoir athérogène. Deux mécanismes pathogéniques sont mis en cause : la non reconnaissance des LDL par leurs récepteurs tissulaires et l'insensibilité de l'HMG-CoA réductase au rétrocontrôle du cholestérol. Cela se traduit biologiquement par une élévation des β -lipoprotéines (fraction LDL) et des taux de cholestérol atteignant les 12g/l avec un sérum clair, et cliniquement par des dépôts cholestéroliques tendineux, sous cutanés et cornéens entre autres, le risque majeur restant l'atteinte cardiovasculaire précoce.
- **Hyperlipoprotéinémie de type II b** ; ou hyperlipidémie mixte, encore appelée type II+IV car se traduisant par une élévation concomitante des β -lipoprotéines (LDL) et des pré β -lipoprotéines (VLDL), sa fréquence élevée exclue cependant la probabilité de deux pathologies distinctes (II et IV). Les taux de cholestérol et de TG sont élevés mais à un degré moindre que les types précédemment cités. Le risque cardiovasculaire reste néanmoins tout aussi élevé et serait dû à des taux plus bas d'HDL [24].

- **Hyperlipoprotéinémie de type III** ; caractérisée par l'accumulation dans le sérum d'IDL qui se traduit à l'électrophorèse par une « Broad- β -band », large bande reliant les pré β -lipoprotéines aux β -lipoprotéines, alors que ces dernières sont anormalement diminuées. Le sérum est d'aspect opalescent et les taux de cholestérol ainsi que de TG sont élevés.

Le mécanisme de ce blocage est dû à une diminution voire une absence d'Apo E₃, et la présence anormalement élevée d'Apo E₂, Apoprotéine non reconnue par les récepteurs hépatiques qui captent les IDL pour être catabolisés. Cliniquement, cela se traduit par des dépôts lipidiques vasculaires à l'origine du risque cardiovasculaire élevé [25], et quelquefois des dépôts extravasculaires lors de formes majeures, à type de xanthomes des plis palmaires, signe pathognomonique de l'affection.
- **Hyperlipoprotéinémie de type IV** ; appelée également hypertriglycéridémie d'origine endogène, maladie fréquente et caractérisée par une surcharge plasmatique en VLDL, avec des taux franchement élevés de TG et modérément élevés de cholestérol, donnant un sérum d'aspect trouble à opalescent. Elle se traduit cliniquement par une asthénie, une somnolence, des troubles digestifs et quelques fois une surcharge adipeuse facio-cervico-tronculaire.

Trois différentes formes sont à distinguer en fonction de la dépendance diététique :

 - ↳ *L'hyperglycéridémie majeure endogène dépendante des hydrates de carbone*, la plus commune des trois formes. Elle est due à un accroissement de la synthèse des VLDL dont l'origine remonte à une insulinoresistance tissulaire qui enclenche une cascade métabolique comportant notamment une lipolyse exagérée et une déviation hépatique du glucose, forme la plus typique du syndrome métabolique ;
 - ↳ *L'hyperglycéridémie majeure endogène dépendante de l'alcool*, où le catabolisme intrahépatique de l'éthanol élève le potentiel d'oxydo-réduction dans l'hépatocyte, phénomène qui freine le cycle de Krebs et dévie les Acyl- CoA vers une synthèse *de novo* des TG, accentué quelques fois par une inhibition de la LPL et un potentiel d'épuration des VLDL intrinsèquement faible ;
 - ↳ *L'hyperglycéridémie majeure endogène dépendante d'une surcharge pléthorique*, dans laquelle les adipocytes constituent la source de l'excès en TG circulants.
- **Hyperlipoprotéinémie de type V** ; dite hypertriglycéridémie d'origines endogène et exogène, avec élévation concomitante des taux de chylomicrons et de VLDL dans le sang des malades. Elle est caractérisée par une double dépendance alimentaire : Lipidique qui génère l'excès de chylomicrons, et glucidique qui cause l'élévation des VLDL. Cette caractéristique permet ainsi d'éliminer les hypertriglycéridémies d'origine endogène avec chylomicrons (certains type IV, à éthanol notamment), et les hypertriglycéridémies d'origine exogène sous régime hyperglucidique (type I transformé).

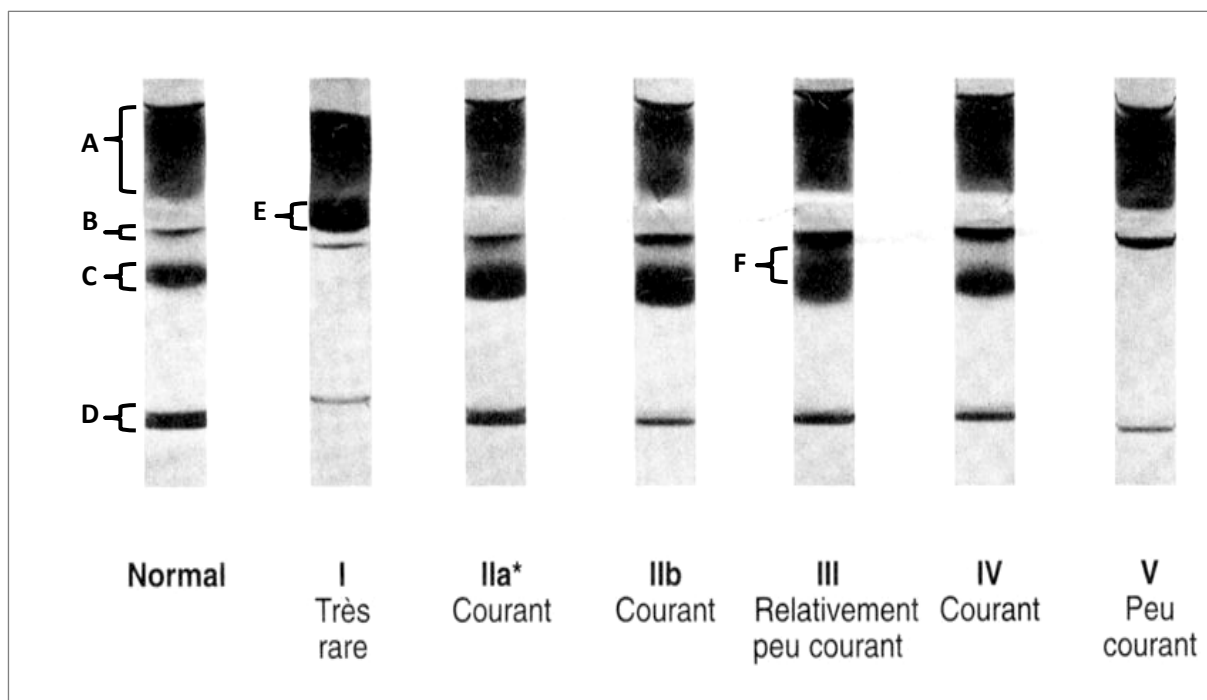


Figure 7. Aspects électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques sur gel de polyacrylamide coulé en tubes.

A = Excès de colorant dans le gel de dépôt ; B = VLDL ; C = LDL ; D = HDL ; E = chylomicrons ;
 F = « broad band » des IDL ; de « I » à « V » = types d'hyperlipoprotéinémies selon Fredrickson et coll.

3.2.2. Les hypolipoprotéinémies primaires

Affections à déterminisme génétique, d'incidences très rares, elles résultent soit d'un déficit en une ou plusieurs Apoprotéines, ou d'un déficit en enzymes du métabolisme lipoprotéique. On distingue notamment [6,14] :

- *La maladie de Tangier* ; maladie très rare, à transmission autosomique récessive, caractérisée biologiquement par des taux bas de HDL dus à un catabolisme accéléré des Apoprotéines A, et cliniquement par une hypertrophie des amygdales suite aux dépôts de cholestérol.
- *Le déficit congénital en Lecithine Cholestérol Acyltransférase (LCAT).*
- *L'Abétalipoprotéinémie et l'Hypobétalipoprotéinémie.*

3.2.3. Les hyperlipoprotéinémies secondaires

Elles sont fréquentes et consécutives à des maladies sous-jacentes qui perturbent le métabolisme des lipides et lipoprotéines sériques. Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4. Principales étiologies d'hyperlipoprotéinémies secondaires [6].

AGNE: Acides gras non estérifiés (libres) ; TG: Triglycérides.

Situation physiopathologique	Lipoprotéines augmentées	Lipides augmentés	Biologiquement analogues aux types :
DIABETE			
▪ Insulino-dépendant	➤ VLDL	➤ TG + AGNE	I, III, IV, V
▪ Non insulino-dépendant	➤ LDL	➤ Cholestérol	
HYPOTHYROIDIE	LDL, IDL	Cholestérol	IIa, IIb, III
ATTEINTES RENALES			
▪ Syndrome néphrotique	➤ VLDL, LDL	➤ TG + Cholestérol	➤ IIa, IIb
▪ Transplantation rénale	➤ VLDL, LDL	➤ TG + Cholestérol	➤ IIb
▪ Insuffisance rénale	➤ VLDL	➤ TG	➤ IV
▪ Dialysés	➤ VLDL	➤ TG	➤ IV, V
ALCOOLISME			
▪ Chronique	➤ VLDL, HDL	➤ TG	➤ IV, V
▪ Syndrome de Zieve	➤ VLDL, HDL	➤ TG	➤ IV
HEPATITES	***	Cholestérol	***
GLYCOGENOSE I	VLDL	TG	IV, V
LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ	Chylomicrons	TG	I

3.2.4. Les hypolipoprotéinémies secondaires

Signes d'accompagnement de maladies souvent graves, elles sont dès lors reléguées au second degrés dans leur prise en charge. Les pathologies causales sont principalement [6] :

- *La dénutrition ;*
- *Les défauts de biosynthèse, lors d'insuffisances hépatiques entre autres ;*
- *Les accélérations du catabolisme, s'agissant des syndromes myeloprolifératifs, cancers, anémies ...etc ;*
- *La combinaison dans des complexes immuns, lors de Gammopathies notamment.*

3.3. Risques liés aux hyperlipidémies

Les pancréatites sont les répercussions les plus connues des hypertriglycéridémies, Cependant, la répercussion majeure sur la santé des hyperlipidémies et qui représente la première cause de mortalité dans le monde (OMS - 2012) reste l'atteinte cardiovasculaire faisant souvent suite à des phénomènes athéro-thrombotiques ou à des accidents athéro-emboliques, et qui est liée non seulement aux hypercholestérolémies chroniques mais également aux hypertriglycéridémies selon de récentes études [26,27].

L'athérosclérose est définie par l'OMS comme une « association de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaire, avec remaniements de la média ». Elle évolue selon plusieurs stades [28] :

- 1) *La strie lipidique* : structure réversible constituée de l'accumulation de cellules spumeuses (macrophages ou cellules musculaires lisses chargés de LDL oxydés) dans l'intima. Elle est fréquemment retrouvée au niveau des bifurcations artérielles ;
- 2) *La plaque athéromateuse simple* : évolution de la strie lipidique, elle est composée d'un centre ou « core » lipidique, et d'une chape externe riche en fibres de collagène. L'augmentation du volume de la plaque entraîne un rétrécissement de la lumière de l'artère, qui s'adapte par remodelage et augmentation de calibre. A ce stade, des symptômes peuvent apparaître tel l'angor d'effort ou la claudication intermittente des membres inférieurs.
- 3) *La plaque compliquée* : définie par 03 différents types de complications :
 - ↳ L'ulcération de la plaque par érosion du tissu endothélial, à l'origine de phénomènes thrombotiques *in situ*.
 - ↳ La rupture de la plaque, résultat de contraintes mécaniques dues à l'augmentation de taille de la plaque, et de phénomènes chimiques tels que la production d'enzyme protéolytique. Cette rupture est bien souvent à l'origine d'embolies en aval.
 - ↳ L'hémorragie intra-plaque, qui se produit au niveau de la vascularisation propre à la plaque athéromateuse et qui est souvent suivie de l'occlusion de l'artère ou plus rarement de sa dissection.

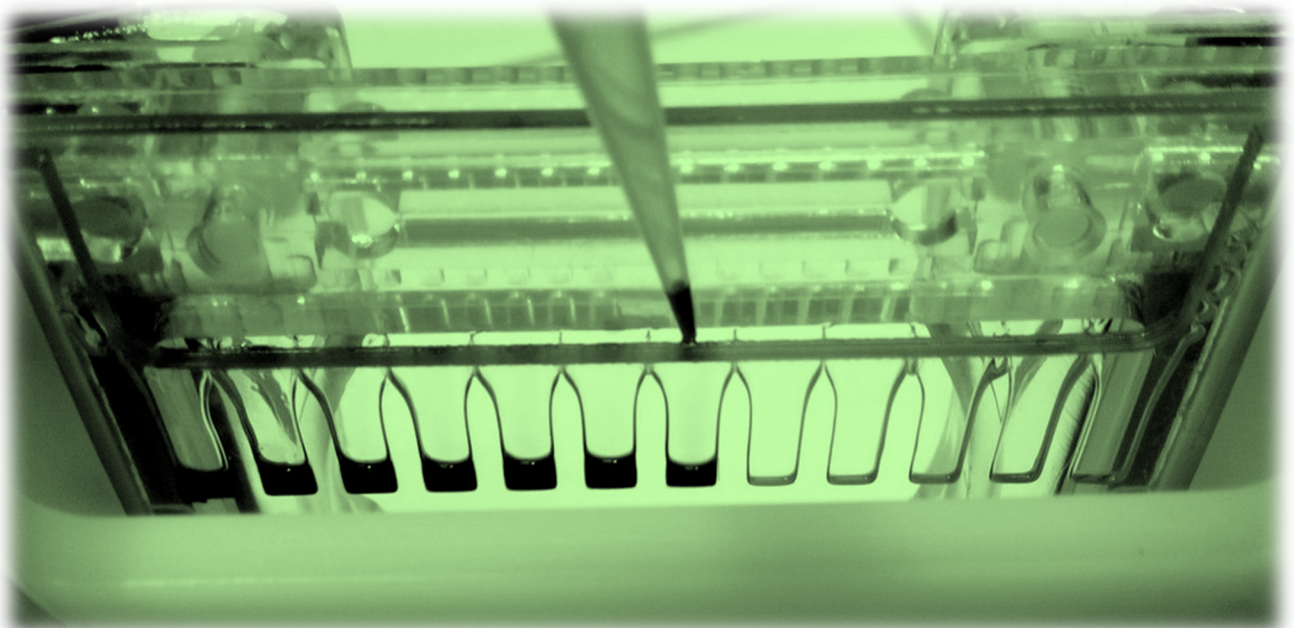
L'ensemble de ces conséquences cliniques font des hyperlipidémies des atteintes métaboliques sérieuses à prendre en charge diététiquement (par des régimes pauvres en graisses et une activité physique) et thérapeutiquement (par les statines, inhibitrices de l'HMG CoA réductase, enzyme clé de la synthèse endogène du cholestérol ; par les fibrates, qui activent des gènes de transcription de la LPL et des Apo A ...etc) [14].

PREMIÈRE PARTIE :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II^{ème} :

Méthodes d'exploration des dyslipidémies



1. LE BILAN LIPIDIQUE

1.1. Définition

Le bilan lipidique consiste en un ensemble d'analyses permettant de mettre en évidence des anomalies du métabolisme des lipoprotéines, et d'en optimiser la prise en charge diététique et si besoin thérapeutique. Il peut constituer un préalable à des explorations plus spécialisées qui nécessitent un dialogue clinico-biologique [29].

Selon la nomenclature des actes de biologie médicale [30], l'exploration d'une anomalie lipidique (EAL) permet de mettre en évidence des dyslipoprotéïnémies, qui se traduisent par des variations qualitatives ou quantitatives des lipoprotéines circulantes. L'EAL représente une première étape, éventuellement suivie d'une étude plus approfondie conduisant au typage de la dyslipoprotéïnémie afin de préciser la cause de l'anomalie métabolique et d'assurer une démarche diététique et/ou thérapeutique appropriée. Il faut noter que ce typage ultérieur ne se limite pas à identifier une hyperlipoprotéïnémie selon les critères de la classification de Fredrickson et coll, mais caractérise aussi une hypolipoprotéïnémie ou la présence de lipoprotéines anormales.

1.2. Prélèvement, milieu biologique et conditions de conservation

L'EAL doit être réalisée chez un sujet à jeun depuis 12 heures et dans du sérum [29], à distance (2 à 3 mois) de toute affection aiguë pouvant modifier les résultats (épisode infectieux, geste chirurgical...). En cas d'accident cardiovasculaire, elle doit être réalisée dans les 24 heures qui suivent [31]. Concernant le dosage du C-LDL, le prélèvement doit être effectué le matin, après un jeûne minimal de 14 heures, selon Saunier et Portugal [32].

Pour une analyse différée, la conservation du sérum à + 4 °C est possible plusieurs jours, sauf pour le dosage du C-LDL où la conservation est de 48 heures tout au plus. Le sujet doit être au repos au moment du prélèvement, en position assise. L'orthostatisme est à l'origine d'une hémococoncentration, ainsi qu'un garrot serré trop longtemps [32–34].

Il faut souligner que les analyses effectuées sur du plasma (tube hépariné ou de l'EDTA), parfois préconisées par les fournisseurs de réactifs, sous-estiment certains paramètres du bilan lipidique. En particulier, les anticoagulants abaissent la cholestérolémie de 2 à 4,5 % et jusqu'à 23 % en cas d'hyperlipidémie; la concentration sérique de cholestérol-HDL est en revanche peu modifiée, mais la sous-estimation précitée est critique pour le calcul et l'interprétation de la concentration de cholestérol-LDL [29].

1.3. Bilan lipidique systématique

Il faut un bilan de première intention dès l'enfance en cas de surpoids ou d'antécédents familiaux et vers 18-25 ans chez les autres sujets [13], ou chez la femme avant toute prescription d'une contraception orale [31]. S'il n'existe pas d'âge limite pour la prise en charge des dyslipidémies, il ne semble toutefois pas utile de « dépister » après l'âge de 80 ans en prévention primaire (à l'inverse, en prévention secondaire, les dernières études montrent un bénéfice chez les patients de 70 à 80 ans) [31].

En 2014, la nomenclature des actes de biologie médicale [30] a défini l'EAL (code 0996 - chapitre 13) comme un ensemble indissociable des analyses suivantes : aspect du sérum, concentration sanguine du cholestérol total, des triglycérides, du cholestérol-HDL et calcul de la concentration du cholestérol-LDL par la formule de Friedewald comme suit :

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - (\text{C-HDL} + \text{C-VLDL})$$

- **CT** : Concentration du cholestérol total
- **C-HDL** : Concentration du cholestérol HDL
- **C-VLDL** : Concentration du cholestérol VLDL

Le cholestérol lié aux VLDL étant estimé par « $TG/2,2$ » quand les éléments de la formule sont exprimés en « $mmol/L$ », ou par « $TG/5$ » s'ils sont exprimés en « g/L » où TG représente la concentration sanguine en triglycérides [29,33] :

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - \text{C-HDL} - \frac{\text{TG (mmol/L)}}{2,2}$$

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - \text{C-HDL} - \frac{\text{TG (g/L)}}{5}$$

Selon les recommandations 2005 de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et Foubert [31], cette formule reste valable lorsque le taux de TG est inférieur à 4 g/l (4.6 mmol/l). Si le taux est supérieur à 4 g/l, il faut disposer d'un dosage direct du C-LDL.

1.4. Bilan lipidique orienté

Il est utilisé pour une confirmation diagnostique après une anomalie dans le bilan systématique, pour une surveillance de traitement ou bien après la découverte d'une maladie susceptible d'entraîner une hyperlipidémie secondaire. Ce bilan comprend, en dehors de l'EAL usuelle, les dosages des Apo A-I, B et de la Lp(a) ainsi que le lipoprotéinogramme. Il est susceptible d'apporter un complément d'informations, notamment en présence

d'hypertriglycémie importantes qui rendent certains dosages ou interprétations difficiles voire impossibles [13,29].

1.5. Paramètres lipidiques

1.5.1. Aspect du sérum

L'aspect du sérum doit être systématiquement caractérisé après centrifugation de l'échantillon, et devra être interprété de façon cohérente avec l'ensemble des autres paramètres de l'EAL. Les HDL et les LDL, toutes deux majoritairement vectrices de cholestérol, ne modifient pas la limpidité du sérum lorsque leur concentration est augmentée du fait de leur petite taille ; au contraire, les lipoprotéines vectrices de triglycides, c'est à-dire les chylomicrons et les VLDL, du fait de leur grande taille, impactent l'aspect du sérum quand leur concentration est augmentée. Un sérum opalescent objective une augmentation des VLDL, tandis qu'un sérum lactescent résulte de la présence anormale de chylomicrons. En outre, les chylomicrons, en raison de leur très faible densité, ont la propriété de flotter spontanément à la surface du sérum après repos du tube de recueil à 4°C [29] et d'après Valdiguié [13] , la remontée des chylomicrons peut être accélérée avec une simple centrifugation du sérum à 4°C. C'est la raison pour laquelle la nomenclature des actes de biologie médicale [29] précise qu'en cas d'opalescence ou de lactescence d'un sérum, il faut vérifier son aspect après conservation à 4°C pendant 12 heures; si le sous-nageant est limpide, cela traduit la seule présence anormale de chylomicrons; en revanche, si la couche crémeuse est associée à un sous-nageant opalescent, elle témoigne d'une augmentation concomitante des VLDL circulantes. Ces traits sont pris en considération dans la classification des dyslipoprotéinémies familiales établies par Fredrickson et coll. [22] (*Figure 8*). Néanmoins, en cas de discordance entre l'aspect du sérum et sa concentration en TG, il conviendra d'envisager une élévation de la concentration sérique de glycérol libre, à l'origine d'une fausse hypertriglycémie [29].

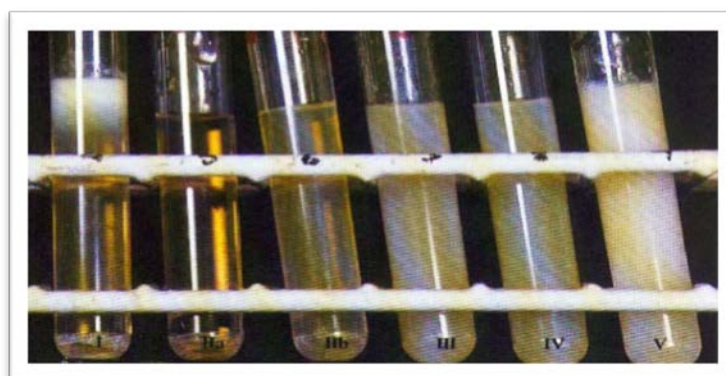


Figure 8. Aspect de sérums hyperlipoprotéinémiques

De gauche à droite : type I, IIa, IIb, III, IV et V des hyperlipoprotéinémies de Fredrickson.

1.5.2. Dosage des triglycérides

Des techniques enzymatiques sont utilisées par la plupart des laboratoires pour le dosage de la triglycéridémie. Elles sont fondées sur la mesure du glycérol libéré après action d'une lipase. La quantification du glycérol consiste, après phosphorylation par une glycérol kinase et oxydation par la glycérol-3-phosphate oxydase, à mesurer le peroxyde d'hydrogène formé par la réaction de Trinder modifiée (*Figure 14*). La lecture colorimétrique est habituellement effectuée à 540 nm [13]. Cette technique est la plus utilisée actuellement. Cependant, les méthodes récentes utilisent une lipase associée à une protéase comme agent hydrolytique.

Le glycérol libre préexistant est en quantité très faible dans le sérum, mais une élévation de sa concentration peut s'observer dans plusieurs circonstances, ceci fait que son dosage devra être pratiqué (grâce à un réactif dépourvu de lipase qui ne libère pas de glycérol à partir des triglycérides) afin d'obtenir, par déduction du glycérol libre, la concentration de TG « vrais » [29]. Il revient alors au biologiste de détecter une fausse hypertriglycéridémie, notamment par l'aspect limpide du sérum (puis qu'un excès de glycérol ne modifie pas celui-ci), mais également par l'absence d'augmentation des VLDL ou des chylomicrons (lipoprotéinogramme) [13,29,35].

1.5.3. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total (CT) correspond non seulement au cholestérol non estérifié dit « Libre » mais aussi au cholestérol estérifié. Le CT peut être dosé par de très nombreuses méthodes. Les plus anciennes sont colorimétriques, les plus pratiquées sont enzymatiques. La méthode considérée comme de référence par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) est chromatographique. Il s'agit de la chromatographie gaz-liquide couplé à la spectrométrie de masse [13,29,34].

Le dosage enzymatique du cholestérol repose sur l'utilisation consécutive d'une *cholestérol-estérase* (qui libère le cholestérol de ses esters) et d'une *cholestérol-oxydase* (qui oxyde le cholestérol). Les différentes méthodes varient selon la procédure utilisée pour la mesure ou la quantification du peroxyde d'hydrogène produit. La réaction de Trinder (*Figure 15*) est la plus couramment utilisée, faisant appel à une peroxydase comme réaction indicatrice ; en présence du 4-aminopyrine, de phénol et de peroxydase, on arrive à obtenir une quinone qui présente un maximum d'absorption à 500 nm.

Les méthodes enzymatiques représentent les méthodes de choix pour le laboratoire de routine car elles sont généralement très reproductibles et facilement automatisables. Les résultats sont également très bien corrélés avec la méthode de référence. La spécificité est aussi

très bonne (en raison de la trop faible concentration des autres stérols susceptibles d'interagir). En revanche elles sont sujette à des interférences en cas d'hémolyse, d'hyperbilirubinémie ou en présence de certaines substances réductrices comme l'acide ascorbique [29,34,35].

1.5.4. Dosage du cholestérol-HDL

Le dosage du cholestérol des HDL, préalablement séparé par ultracentrifugation ou chromatographie liquide, constitue la méthode de référence. Cependant, deux grands groupes de techniques sont disponibles pour ce dosage en pratique clinique [33] :

- ↳ Méthode de précipitation sélective
- ↳ Technique en phase homogène (dosage « direct »)

1.5.4.1. Méthode par précipitation sélective

Après précipitation par un réactif de toutes les lipoprotéines à l'exception des HDL suivie d'une centrifugation, le cholestérol est dosé dans le surnageant en utilisant les mêmes techniques que celles décrites pour la détermination du cholestérol total. Bien que simples à mettre en œuvre et peu coûteuses, elles nécessitent des précautions d'utilisation pour assurer leur fiabilité et ne sont pas totalement automatisables (pipetage manuel).

Leur principe est de précipiter sélectivement les VLDL et les LDL sériques grâce à un mélange de polyanions et de cations divalents ; il rend insoluble et agrège les lipoprotéines à Apo B (VLDL et LDL), qui sont sédimentées lors d'une étape de centrifugation, puis le C-HDL est dosé dans le surnageant.

Parmi les différents agents précipitants décrits, les techniques faisant appel à l'acide phosphotungstique en présence de chlorure de magnésium $MgCl_2$ ont été recommandées par la SFBC et le Comité français de coordination des recherches sur l'athérosclérose et le cholestérol (ARCOL) [29,33].

1.5.4.2. Dosage direct en phase homogène

Actuellement, les méthodes recommandées sont les méthodes directes de dosage du C-HDL, dites techniques « homogènes », qui sont entièrement automatisées, ce qui les rend précises, plus reproductibles et moins sensibles aux interférences que les techniques de précipitation.

Ces techniques utilisent un réactif sélectif « R1 » qui, tel que mentionné par Egloff et coll., pouvait contenir des sulfates d'alpha-cyclodextrine et de dextran (α -CD), des polyanions-détergents (PA-D), ou des anticorps anti-apo B ou apo B/CIII qui « complexe » les lipoprotéines autres que les HDL masquant leur accessibilité au réactif de dosage du cholestérol « R2 » et permet ainsi à celui-ci de réagir uniquement avec le C-HDL [29,33].

Actuellement, des laboratoires utilisent également des enzymes modifiées avec du polyéthylène glycol (PEG). Ce type de méthode associe l' α -CD et des ions Mg^{2+} qui bloquent

sélectivement les chylomicrons, les VLDL et les LDL, sans toutefois les précipiter. La spécificité d'action de la *cholestérol-estérase* et de la *cholestérol-oxydase* sur le C-HDL est ensuite assurée grâce à la liaison covalente du PEG avec ces enzymes, les empêchant d'accéder au cholestérol présent dans les lipoprotéines à Apo B [29].

1.5.5. Dosage du cholestérol-LDL

Le C-LDL est un élément clé du bilan lipidique, puisque les recommandations de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) prennent en compte sa valeur pour déterminer la prise en charge du risque cardiovasculaire d'un patient (note de cadrage de la Haute Autorité de Santé HAS de juin 2015) [29].

Les LDL sont classiquement définies comme une classe de lipoprotéine de faible densité. Cette classe hétérogène comprend, outre les LDL proprement dites, les chylomicrons, les VLDL, les IDL et la Lp (a). De cette hétérogénéité découle la difficulté d'individualiser les LDL au sens strict, expliquant les limites des performances techniques des différentes méthodes proposées [32].

1.5.5.1. Ultracentrifugation séquentielle et β -quantification

La technique de référence est l'ultracentrifugation séquentielle qui permet la séparation successive des différentes lipoprotéines en fonction de leur densité. Chaque séparation demande plusieurs heures, ce qui est incompatible avec la réalisation d'un grand nombre de dosages. De plus, un isolement fiable des LDL est difficile à obtenir en cas de dyslipidémie, et pour cette raison, le *National Cholesterol Education Program* (NCEP) [36] préfère la β -quantification comme référence. Non réalisée en routine ; elle se déroule en trois étapes [29] :

- ↪ Ultracentrifugation du sérum à la densité de 1,006 (élimination des chylomicrons et VLDL de la phase supérieure) et dosage du cholestérol dans la phase sous-nageante (contenant les IDL, LDL, HDL et lipoprotéine Lp(a)).
- ↪ Précipitation des lipoprotéines contenant l'apo B dans ce sous-nageant (soit, IDL, LDL et Lp(a)), par addition d'un mélange héparine/Mn²⁺.
- ↪ Quantification du cholestérol dans la fraction supérieure (HDL). La concentration du C-LDL est alors calculée en soustrayant la concentration de cholestérol avant et après l'étape de précipitation. La fraction de C-LDL isolée par bêta-quantification contient donc également du cholestérol porté par les IDL et la Lp(a).

1.5.5.2. Détermination indirecte par formules de calcul

Elles reposent sur l'estimation de la concentration du cholestérol LDL en utilisant une formule de calcul incluant des paramètres lipidiques courants et standardisés. La formule la plus ancienne recommandée actuellement par la SFBC et l'AFSSAPS est celle de Friedewald (cf. 1.3 Bilan lipidique systématique), cependant son application comporte des limites en cas d'hypertriglycéridémie franche. D'autres formules ont été proposées : formule de Dahlen, formule de Planella et coll. [32].

1.5.5.3. Dosage direct en phase homogène

Conscient des limites de la formule de Friedewald, le NCEP encourage l'emploi de méthodes directes. Plusieurs ont vu le jour (précipitation pour la première génération, anticorps et précipitation magnétique pour la seconde), mais ne présentent pas la fiabilité suffisante. La troisième génération semblait plus satisfaisante (microméthodes entièrement automatisées). Deux grands principes sont proposés : « sélection » ou « clairance » afin d'éliminer le cholestérol non-LDL et permettre le dosage du cholestérol LDL par la réaction classique (*cholestérol-estérase*, *cholestérol oxydase* puis peroxydase) [32].

2. LE LIPOPROTEINOGRAMME

2.1. Définition

Le lipoprotéinogramme est une méthode de séparation électrophorétique des principales classes de lipoprotéines sériques. Il permet d'apprécier de manière aisée les proportions relatives des fractions lipoprotéiques comparativement à un sérum normolipémique. Il s'agit d'une analyse qualitative ou semi-quantitative des lipoprotéines par mesure densitométrique du colorant fixé par les lipides inclus dans les lipoprotéines [29].

2.2. L'électrophorèse

2.2.1. Définition

L'électrophorèse est une méthode analytique de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique continu. Elle permet, dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques), de séparer des molécules non ioniques, comme des hormones stéroïdes.

Le terme d'électrophorèse dérive du grec « *phoresis* » qui, accolé au préfixe *electro-*, signifie littéralement « transporté avec l'électricité ». Il est réservé aux macromolécules : protéines, lipoprotéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides, tandis que le terme d'ionophorèse est utilisé dans le cas d'ions de petite taille. L'électrophorèse peut être effectuée, selon les dispositifs, dans un sens horizontal ou vertical [37–41].

2.2.2. Principes physicochimiques de la séparation électrophorétique

La migration électrophorétique de chaque type de particules dépend de plusieurs facteurs et paramètres [37,38,42] énumérés ci-dessous.

2.2.2.1. La mobilité électrophorétique μ

Elle est fonction de la charge et de la géométrie de la particule. Une particule de charge électrique Q , placée dans un champ électrique E , est soumise à une force F qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé :

$$F = Q \cdot E$$

Des forces de frottement f , dues à la viscosité du milieu η , s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant plus que la particule est grosse (r = rayon) et que la vitesse de migration (v) est grande :

$$f = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

(N.B. Le coefficient de viscosité η dépend de la température).

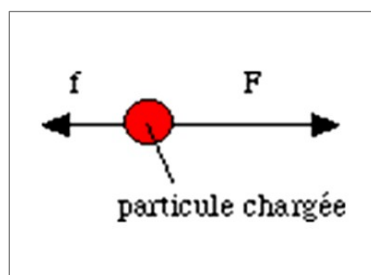


Figure 9. Représentation schématique des forces qui s'exercent sur une particule en migration.

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante; on peut alors écrire :

$$Q \cdot E = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{soit} \quad v = \frac{Q \cdot E}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

On définit dès lors pour chaque particule sa mobilité électrophorétique μ comme étant sa vitesse de migration dans un champ électrique unitaire (01 Volt/cm). Elle est vérifiée par la relation :

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \text{soit} \quad \mu = \frac{Q}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

La mobilité est une caractéristique de chaque particule; il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

La charge Q est fonction du pH isoélectrique de la particule (pH_i) et du pH du solvant. Pour les molécules de petite taille, on peut prévoir la valeur du pH_i en calculant le pH isoionique, pH pour lequel la charge nette est nulle, à partir des pK_a des différents groupements ionisables de la molécule; mais cela est plus difficile pour les macromolécules, car leur environnement ionique modifie notablement leur charge réelle. La différence $pH - pH_i$ détermine le signe et l'intensité de la charge Q d'une particule, plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante :

- si $pH > pH_i \Rightarrow$ charge nette négative (Anion) \Rightarrow migration vers l'anode ;
- si $pH < pH_i \Rightarrow$ charge nette positive (Cation) \Rightarrow migration vers la cathode ;
- si $pH = pH_i \Rightarrow$ charge nette nulle \Rightarrow pas de migration.

2.2.2.2. Le champ électrique E

$$E = V / \mu$$

2.2.2.3. Les courants liquidiens

2.2.2.3.1. Le courant d'endosmose

Dans les conditions expérimentales, le support d'électrophorèse se charge négativement; une couche mobile de charges positives se forme dans le solvant, au contact du support, et entraîne globalement la phase liquide vers la cathode.

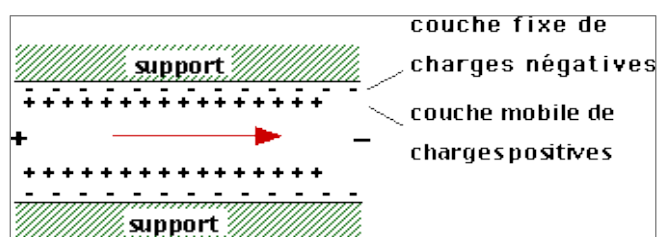


Figure 10. Impact du courant d'électroendosmose [40].

Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode. Il peut être quelques fois plus puissant que les forces électriques, ce qui fait que des protéines chargées négativement peuvent globalement migrer vers la cathode. C'est particulièrement observé avec les gels d'agarose.

2.2.2.3.2. Les courants d'évaporation

Le passage du courant électrique s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau de la phase liquide. Cet effet est maximal au milieu

de la bande; il s'établit ainsi un courant liquidien depuis chaque extrémité vers le centre de la bande, ayant pour conséquence de déformer les profils. Pour limiter ce phénomène, on se sert généralement de cuves réfrigérées.

2.2.2.4. La diffusion

Les particules incluses dans le gel ont tendance à diffuser des régions les plus concentrées vers les moins concentrées, ce qui peut gêner la bonne séparation des zones.

2.2.2.5. La durée de migration

Elle influe sur la distance de migration :

$$d = v \cdot t$$

(**d** = distance, **v** = vitesse, **t** = temps de passage du courant)

Cependant, cette formule n'est pas applicable dans le cas de l'électrophorèse sur support, car les molécules effectuent un trajet non linéaire dans les microcanaux du support poreux.

2.2.2.6. La nature du tampon

La composition du tampon est importante du fait des interactions possibles entre certaines molécules le constituant et la particule.

2.2.2.7. La taille des particules

Car à charge égale, une molécule plus petite migrera plus vite. Cet effet de tamisage moléculaire est surtout important pour les gels de polyacrylamide.

2.2.2.8. La nature du support

Le support ayant été longtemps utilisé est le papier, remplacé ensuite par la membrane d'acétate de cellulose puis par le gel d'agarose, et vint après le gel de polyacrylamide ayant un très fort pouvoir résolutif, notamment sur les gels à gradient continu. Ce pouvoir est exploité dans la séparation des lipoprotéines sériques et en biologie moléculaire.

2.3. Les méthodes électrophorétiques

Selon le type de support (liquide ou poreux), on distingue deux grandes familles de méthodes électrophorétiques [43]:

- ↳ *L'électrophorèse dite « libre »* en veine liquide
- ↳ *L'électrophorèse sur support* ou électrophorèse de zones, dont les variantes sont :
 - L'électrophorèse sur papier
 - L'électrophorèse sur acétate de cellulose
 - L'électrophorèse sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide)

Il existe cependant d'autres types d'électrophorèses (focalisation isoélectrique, électrophorèse bidimensionnelle, immunoélectrophorèse ...etc).

2.3.1. L'électrophorèse libre en veine liquide

Mise au point par Tisélius en 1937, elle est réalisée dans un tube en U de section carrée. La séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). La migration s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu. Cette méthode permet la détermination des mobilités électrophorétiques des différents constituants d'un mélange, cependant elle est très coûteuse [37,42].

2.3.2. L'électrophorèse sur support

Elle permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable qui doit être homogène, poreux et inerte. Cependant, la condition d'inertie n'est jamais respectée et la composition du support joue un rôle plus ou moins important dans la séparation. Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support [37,42].

2.3.2.1. Électrophorèse sur papier

La séparation des lipoprotéines selon la charge électrique a été effectuée pour la première fois par cette technique. Assez peu résolutive, elle est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille [35,42].

2.3.2.2. Électrophorèse sur acétate de cellulose

Elle est certainement la technique la plus utilisée pour la séparation des lipoprotéines, mais ne permet pas d'individualiser la Lp (a). La présence de chylomicrons gêne parfois l'interprétation. Peu résolutive et peu coûteuse, elle permet une analyse rapide et grossière des lipoprotéines sériques [16,35,42].

2.3.2.3. Électrophorèse sur gel d' agarose

Sa capacité résolutive est bonne mais son appréciation peut aussi être gênée en présence de grandes quantités de chylomicrons. La Lp(a) ne peut pas être individualisée [16].

Très utilisée pour mettre en évidence la Lp X (cf. *CHAPITRE I – 2.2 classification des lipoprotéines sériques*) qui, du fait du flux d'électroendosmose important, se déplace vers la cathode et se sépare ainsi des autres types de lipoprotéines [35].

2.3.2.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (*poly-acrylamide gel electrophoresis*) est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines, lipoprotéines ou pour le séquençage de l'ADN [42,44].

L'utilisation d'un gel de polyacrylamide permet un tamisage moléculaire et l'électrophorèse sur ce type de support permet donc de faire intervenir la taille moléculaire en plus de la charge.

Par cette méthode, la migration de lipoprotéines précolorées par le noir Soudan « B » natif, acétylé ou succinylé, permet de séparer, allant de la cathode (-) vers l'anode (+) : les VLDL, les LDL et les HDL. Les chylomicrons restent quant à eux au point de dépôt [35]. Par ailleurs, la Lp(a) migre sous forme d'une bande bien individualisée juste au-dessus de celle des LDL. Des bandes supplémentaires, ou des trainées peuvent se localiser juste au-dessous de la bande de VLDL, et ce dans certains sérums riches en triglycérides ; il s'agit le plus souvent d'IDL. Il est possible d'effectuer une intégration densitométrique des différentes bandes, cependant il n'existe aucune relation linéaire entre la concentration en lipoprotéines et l'intensité de la coloration, il doit donc être bien gardé à l'esprit que cette méthode de séparation des lipoprotéines ne permet qu'une analyse qualitative et ne doit être interprétée qu'en connaissance des résultats du bilan lipidique [35].

Cette technique est utilisée en conditions non dissociantes non dénaturantes (PAGE-Native) s'agissant de l'électrophorèse des lipoprotéines, tandis qu'une variante dite en conditions dissociantes-dénaturantes (PAGE-SDS) est employée lors d'électrophorèses de protéines. Elle est réalisée de préférence à l'aide d'un montage vertical (horizontal à défaut), les gels sont formés entre deux plaques de verre et les échantillons sont déposés dans des puits localisés au sommet du gel [42].

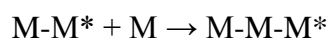
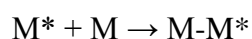
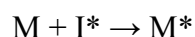
2.3.2.4.1. Polymérisation de l'acrylamide

Les gels de polyacrylamide se forment suite à un phénomène de polymérisation, initié puis accéléré à l'aide de catalyseurs appropriés, de monomères d'acrylamide en présence d'une certaine quantité d'agents réticulants assurant la structure tridimensionnelle du maillage.

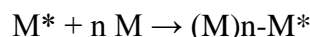
Quand l'un des carbones impliqués dans la double liaison de l'acrylamide monomérique ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) prend, sous l'influence d'un initiateur, une forme radicalaire (radical libre), il peut attaquer la double liaison $\text{C}=\text{C}$ d'une autre molécule. La réaction peut se résumer de la façon suivante où « M » est un monomère, « I » l'initiateur, le symbole « * » indique un radical et « - » indique une liaison covalente. La chaîne réactionnelle commence par la formation spontanée ou induite d'un radical au niveau de l'initiateur :



La propagation de ce radical libre enclenche alors la polymérisation :



Et par répétition (n) fois de la réaction en chaîne :



Ainsi les monomères d'acrylamide entrent dans une réaction en chaîne ou de longs polymères linéaires sont formés par la propagation de ces radicaux libres. En plus de l'acrylamide monomérique et de l'initiateur, la réaction de polymérisation doit se faire en présence d'un agent réticulant et d'un accélérateur (décrits ci-dessous) [45].

2.3.2.4.2. Réticulation du polyacrylamide

Un gel de polyacrylamide ne contenant que de l'acrylamide reste liquide, quoique très visqueux, ce qui le rends inutilisable en tant que support d'électrophorèse en zone.

En effet, l'acrylamide ne possède qu'un seul site de formation de radical par molécule et ne peut donc donner que des chaînes linéaires plus ou moins longues non reliées entre elles. Il en découle l'intérêt d'utiliser un agent réticulant dit « *cross-linker* », assurant un pontage entre les chaînes linéaires. Une grande panoplie d'agents réticulants sont décrits dans la littérature : le N,N'-bisacrylylcystamine (BAC), le N,N'-diallyltartardiamide (DATD), le N,N'-(1,2-dihydroxyethylene) bisacrylamide (DHEBA) et l'éthylène diacrylate (EDA). Cependant, le plus utilisé reste le N,N'-methylenebisacrylamide, dénommé également « bisacrylamide » [44-46].

Le bisacrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$) est une molécule qui comporte deux doubles liaisons C=C à chaque extrémité de la molécule. Chacune d'elles peut s'intégrer dans le processus de polymérisation de deux chaînes voisines de polyacrylamide, les liant entre elles et formant un maillage tridimensionnel plus ou moins serré selon les quantités d'acrylamide et d'agent réticulant. Ainsi donc, la proportion acrylamide / agent réticulant et la nature de ce dernier détermineront les capacités de séparation du gel en modifiant sa porosité, et cette propriété aura une importance capitale dans la séparation des molécules en migration. En effet, plus les mailles du gel sont serrées plus un effet de « tamisage moléculaire » sera observé ralentissant et sélectionnant les molécules qui auront à passer au travers [44,45].

Les gels obtenus sont caractérisés par un degré de réticulation reflété par deux indices « T » (pour *Total*) et « C » (pour *Cross linking*) dépendants du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide dans la solution de départ [38,47] :

$$T(\%) = \frac{A + B}{V} \times 100$$

$$C(\%) = \frac{B}{A + B} \times 100$$

A : masse d'acrylamide en solution (en gramme) ;

B : masse de bisacrylamide en solution (en gramme) ;

V : volume total de la solution (en millilitres).

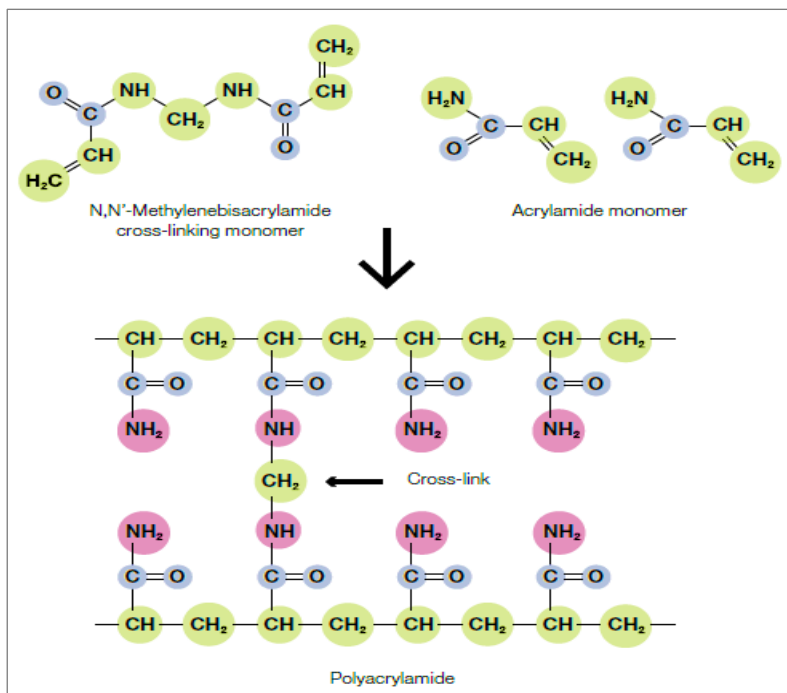


Figure 11. Polymérisation du polyacrylamide [48].

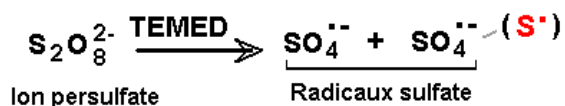
2.3.2.4.3. Les catalyseurs de polymérisation

Les catalyseurs de polymérisation permettent:

- ↳ Soit d'initier la formation de radicaux libres qui pourront alors démarrer la réaction en chaîne de la polymérisation, ce sont des « initiateurs » de polymérisation ;
- ↳ Ou de stimuler la réaction de propagation des radicaux libres pour l'accélérer et l'empêcher de « s'étouffer », ce sont des « accélérateurs » de polymérisation.

La formation de radicaux libres par ces composés peut être, soit, immédiate après leur mise en solution, soit, déclenchée par un phénomène physico-chimique. Généralement les deux types de catalyseurs doivent être combinés pour que la polymérisation se fasse de façon rapide et fiable.

Le PSA (persulfate d'ammonium) est presque exclusivement utilisé comme initiateur. L'ion persulfate forme spontanément des radicaux libres (radical sulfate) lorsqu'il est mis en solution, et cette réaction est catalysée par la présence d'un accélérateur (tel le TEMED) :



Le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine) est souvent utilisé comme accélérateur. On peut utiliser aussi la riboflavine qui ne forme des radicaux libres que lorsque la solution est exposée à des ondes lumineuses ultra-violettes provoquant la photoactivation de cet accélérateur. Cette propriété est intéressante dans le cas où l'on veut contrôler précisément le

début de la réaction de polymérisation, en particulier pour former des gels en gradients [38,45,49].

2.3.2.4.4. Effets des conditions physico-chimiques sur la polymérisation

Quelques produits peuvent inhiber la réaction de polymérisation de l'acrylamide en particulier ceux qui réagissent avec les radicaux libres sans s'intégrer dans la chaîne. En effet de tels produits vont « étouffer » la réaction en bloquant la propagation de celle-ci d'une molécule d'acrylamide à l'autre.

L'oxygène moléculaire (O₂) inhibe la polymérisation de l'acrylamide de cette façon. Il faut veiller donc à minimiser le brassage excessif du mélange lors de la préparation. Un dégazage de la solution d'acrylamide avant de la couler est également conseillé. D'autres produits peuvent interférer au niveau des réactifs tel que le TEMED qui doit être sous sa forme basique pour accélérer la réaction de polymérisation. De ce fait, un produit abaissant le pH (acide plus ou moins fort) ralentirait ou bloquerait la formation du gel.

Les conditions physiques peuvent également affecter la polymérisation de l'acrylamide. La température en est le bon exemple : elle accélère, à l'instar de la majorité des réactions chimiques, la polymérisation de l'acrylamide. Elle constitue donc un élément fondamental pour la maîtrise de la cinétique de polymérisation. [45,50].

2.3.2.4.5. Suivi de la cinétique de polymérisation

À mesure que l'acrylamide et le bisacrylamide polymérisent, la quantité de monomères diminue dans le gel. Les groupements « Vinyl » ($-C=C$) des monomères absorbant dans l'UV sont peu à peu éliminés. La progression de la réaction peut donc être suivie par décroissance de l'absorbance à 260 nm [48] ou à 275nm [51].

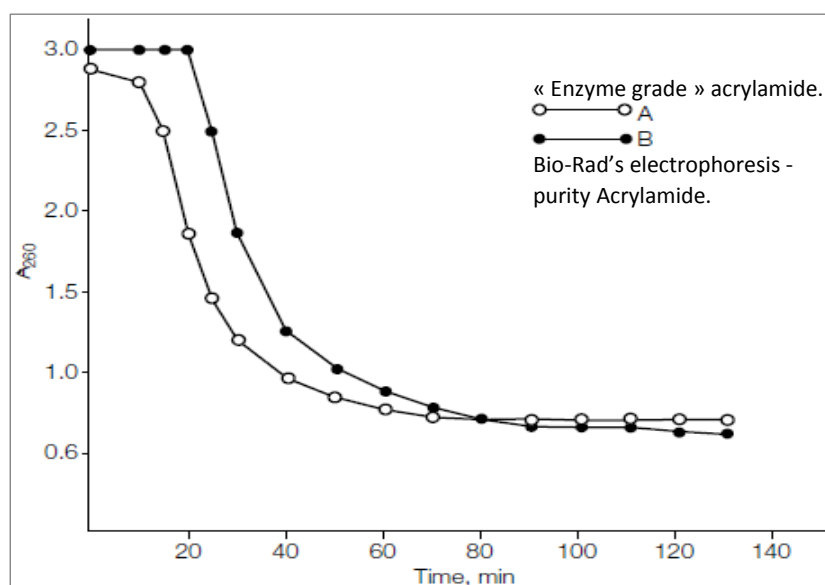


Figure 12. Suivi spectrophotométrique à 260nm de la polymérisation de 02 échantillons d'acrylamide en conditions identiques [48].

2.3.2.4.6. Gels homogènes d'acrylamide

Habituellement on a recours à des gels dont la concentration en acrylamide est homogène, c'est-à-dire constante sur toute la longueur de la plaque de gel. Les gels homogènes permettent une séparation fine des molécules, mais sur une plage réduite de masses moléculaires [45].

2.3.2.4.7. Gels en gradient d'acrylamide

Il est possible de mettre au point des gels où la concentration en acrylamide est variable [45].

2.3.2.4.7.1. Gradient continu d'acrylamide

En 1968-1969, divers auteurs publient une méthode de préparation des plaques de gel de polyacrylamide en gradient continu (de 2 à 10 % M/V d'acrylamide) pour séparation de lipoprotéines [16]. Plus récemment, d'autres publications mettent en évidence l'intérêt des gels en gradient (allant de 2 % à plus de 40 % en M/V d'acrylamide) dans la séparation électrophorétique des lipoprotéines [52–54]. En effet, la taille des mailles du gel sera de plus en plus étroite à mesure que les molécules avancent de sorte que ces dernières puisse finir par être en contact avec le gel où la concentration d'acrylamide pourra les retenir [45]. Ainsi, la résolution des lipoprotéines sériques par des gels dont les mailles se resserrent progressivement est nettement supérieure à celle obtenue avec les techniques classiques d'électrophorèse. Toutefois, de tels protocoles nécessitent l'utilisation d'un matériel spécifique : les formeurs de gradients.

2.3.2.4.7.2. Gradient discontinu d'acrylamide

Dans ce cas-ci, le gel se situant à la base (gel de séparation ou *resolving gel*) sera d'une plus grande concentration que celui du sommet (gel de concentration ou *stacking gel*) [45].

En 1971-1972, Frings et coll. [55], puis Hall et coll. [56] mettent au point un système de séparation sur colonne de gel d'acrylamide à gradient discontinu. Le sérum est précoloré par du noir Soudan B comme imprégnant lipidique, et les modifications apportées par Hall et coll. (acétylation du noir Soudan) augmentent l'affinité du colorant pour les lipoprotéines. Les chylomicrons sont difficiles à distinguer dans ces conditions, car ils ne pénètrent pas dans le gel et sont masqués par l'excès de colorant du gel de dépôt, ce qui rendrait impossible le diagnostic différentiel entre hyperlipoprotéïnémies de type IV ou V. Les modifications apportées par Moulin et coll. [57] ont permis de codifier l'emploi du gel de polyacrylamide en gradient discontinu sur colonne avec :

- ↳ Un gel à 2 % d'acrylamide où se fait le dépôt et qui est destiné à retenir les chylomicrons éventuels ;
- ↳ Un gel de séparation à 3 % d'acrylamide.

Ces gels sont coulés dans des tubes ou déposés sur un film plastique. Les lipoprotéines sont précolorées avec du noir Soudan B acétylé ou succinylé. Les chylomicrons restent dans le godet de départ à l'entrée du gel à 2 %, alors que les autres lipoprotéines pénètrent. Les VLDL traversent le gel à 2 % et sont arrêtés à la limite supérieure du gel de concentration en une bande plus au moins intense. Les LDL forme une bande parfaitement séparée des VLDL qui migrent dans le gel de séparation. Les HDL diffusent plus loin dans le gel, largement en avant des LDL. Certains sérums peuvent présenter une bande supplémentaire située juste au-dessus de celle correspondant aux LDL, il s'agit de la Lp (a). Les VLDL étant bien séparés du reste, il est plus ou moins facile de mettre en évidence les hyperlipoprotéïnémies de type I, IIa, IIb, IV et V [45].

En 2014, Pathak et coll. [58] développent et optimisent un protocole d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-Native) à faible coût et à haut débit pour le fractionnement de lipoprotéines en utilisant l'approche « Quality By Design ». Ils concluent dès lors à la meilleure résolution des lipoprotéines sur un gel de polyacrylamide en gradient discontinu avec un gel de séparation à 3,15 % et un gel de concentration à 2,5 %.

2.3.2.4.7.3. Tampons ioniques dans un système à gradient discontinu

Les gels en gradients discontinus sont dépendant de la composition différente pour chaque phase pour assurer une séparation électrophorétique optimale. On qualifie ces systèmes de discontinus ou multiphasiques (triphases), c'est-à-dire contenant trois compartiments de pH et de composition ionique différents :

- Le tampon d'électrode TRIS-Glycine, dans lequel baignent la cathode et l'anode, et qui est en contact avec le gel. Il est caractérisé par une abondance de l'ion de traîne, très chargé au pH de ce tampon (8.3), et par l'absence d'ion frontal.
- Le gel de concentration ou « *stacking gel* », tamponné par du TRIS-HCl et caractérisé par une abondance de l'ion frontal (Cl^-), par l'absence de l'ion de traîne (Glycinate⁻) et par un pH légèrement acide (6.7). Dans cette phase, les fractions entrent dans l'acrylamide et s'entassent en bandes très minces sans se séparer, afin d'augmenter la résolution de la séparation qui suivra. L'ion de traîne, provenant du tampon d'électrode, devient peu chargé suite à son entrée et sa mobilité est alors réduite, tandis que l'ion frontal, très chargé, fuit en avant créant un « vide » électrique qui laisse les molécules à séparer immobiles jusqu'à l'arrivée de l'ion de traîne. L'acrylamide y est très peu concentré de sorte que toutes les fractions migrent ensemble à la même vitesse.
- Le gel de séparation « *Resolving gel* », phase dans laquelle les fractions entassées dans le gel précédent se séparent les unes des autres. Au pH de ce gel (8.9 - tamponné par TRIS-HCl), l'ion de traîne, issu du tampon d'électrode via le gel de concentration, et l'ion frontal, présent initialement bien qu'en faible quantité, se retrouvent très chargés. Ils migrent donc tous les deux très vite car non ralentis par les mailles du gel. L'entassement n'est plus

assuré, et les molécules se séparent suivant leurs propres propriétés physico-chimiques (taille et charge).

L'ion frontal doit toujours conserver sa charge et être de très petite taille. Un ion inorganique est généralement employé à cette fin. L'ion de traîne doit quant à lui être un produit pouvant changer de charge (de la neutralité à la charge) en fonction du pH des divers compartiments. Un acide aminé (la Glycine notamment), ayant un pHi proche du pH du gel de concentration, est souvent employé [45,59].

Ce phénomène de « compactage – séparation » est dénommé Isotachophorèse [60].

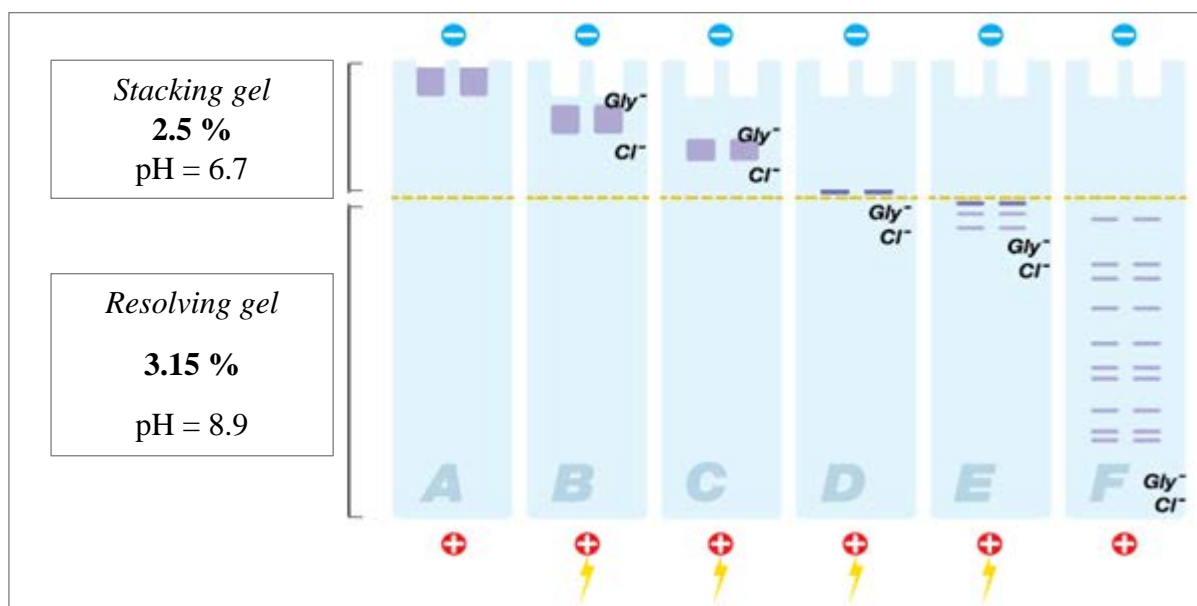


Figure 13. PAGE-Native a gradient discontinu [47].

Gly⁻ = ion glycinate ; *Cl⁻* = ion chlorure.

3. DOSAGE DE LA LIPOPROTEINE (a)

Elle est dosée par des méthodes immunologiques recourant à un anticorps spécifique anti-Apo (a). Actuellement, la méthode la plus utilisée est l'immunonéphélométrie ou l'immunoturbidimétrie [29,61].

4. DOSAGE DES APO A-1 ET APO B

Les apo A-1 et B sériques sont exclusivement dosées par immunoprécipitation. Il existe des techniques pratiquées en milieu solide (méthode de Mancini, de Laurell...), mais elles ne sont plus utilisées. Actuellement, les dosages des apo A-1 et B, automatisés, reposent sur des méthodes turbidimétriques ou néphélométriques mettant en jeu une réaction immunologique (antigène-anticorps) en milieu liquide [29,62].

DEUXIÈME PARTIE :

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE III^{ème} :

Matériels et méthodes



1. MATERIELS

L'étude a nécessité l'usage de plusieurs appareils analytiques et outils de laboratoire, de différents réactifs et des outils informatiques, l'ensemble étant énuméré ci-dessous.

1.1. Appareils analytiques :

- Automates d'analyses biochimiques :
 - ↳ CX9 Pro[®] - BECKMANN
 - ↳ Selectra ProM[®] - ELITECH GROUP
- Appareil de migration électrophorétique verticale CONSORT[®] modèle 4100 (02 plaques de 10mm×10mm à 12 puits chacune) ;
- Générateur de courant CONSORT[®] pour migration électrophorétique ;
- Spectrophotomètre à cuve en Quartz ;
- Balance qualifiée KERN[®] ALT220-5DAM ;
- pH-mètre METTLER TOLEDO[®].

1.2. Matériel de laboratoire :

- Centrifugeuse ;
- Etuve et bain marie ;
- Micropipettes à volumes fixes et variables calibrées (TRANSFERPETTE[®] et CAPP[®]) (*voir. Annexe IV*) ;
- Instruments et verrerie de paillasse (Béchers, Erlenmeyers, pipettes et pipettes Pasteur, Büchners, fioles jaugées, tubes, cupules d'alicotage, éprouvettes, spatules) ;
- Pompe et cloche à vide.

1.3. Réactifs

1.3.1. Réactifs pour dosage des lipides sériques :

- TRYGLICERIDES, CHOLESTEROL et HDL-CHOLESTEROL P (SPINREACT[®]) respectivement pour le dosage des triglycérides, du cholestérol total et du cholestérol-HDL sous CX9 Pro[®] ;
- TRIGLYCERIDES SL et CHOLESTEROL SL (ELITECH CLINICAL SYSTEMS[®]) respectivement pour le dosage des triglycérides et du cholestérol total sous Selectra ProM[®].

1.3.2. Réactifs pour la réalisation des gels de polyacrylamide et la migration électrophorétique :

- Acide borique : Acide orthoborique (CHEMINOVA[®]) ;
- Acrylamide (SIGMA-ALDRICH[®]) ;

- Anhydride acétique (RIEDEL-DE HAËN®) ;
- Bis-acrylamide : N,N'-méthylènebis(acrylamide) (SIGMA-ALDRICH®) ;
- Dioxane : 1,4-Dioxane (BIOCHEMA®) ;
- EDTA : Acide éthylénediaminotétraacétique (RIEDEL-DE HAËN®) ;
- Ethylène glycol : 1,2-ethanediol (Reagent plus® / SIGMA-ALDRICH®) ;
- Glycérol ;
- Glycine (SIGMA-ALDRICH®) ;
- HCl : Acide chlorhydrique pur à 37% (LABOSI®) ;
- Isobutanol : 2-Methyl-1-propanol (SIGMA-ALDRICH®) ;
- Noir soudan B ;
- PSA : Persulfate d'ammonium (SIGMA-ALDRICH®) ;
- Pyridine : (SIGMA-ALDRICH®)
- Saccharose : D (+) Saccharose pur (LABOSI®) ;
- TEMED : N,N,N',N'-Tetraméthylethylènediamine (SIGMA-ALDRICH®) ;
- TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (LABOSI®) ;

1.4. Outils informatiques

Plusieurs logiciels informatiques ont été utilisés afin d'acquérir, traiter et d'exploiter les données récoltées.

- **Scanner de bureau EPSON® Stylus**

Par sa haute résolution, il permet de numériser des images de qualité maîtrisée pour l'ensemble des plaques scannées ce qui améliore la reproductibilité des résultats ;

- **Mesurim pro**

Réalisé par Jean-François Madre, et distribué gratuitement sur internet [63], ce logiciel est destiné à réaliser différents types de mesures sur les images, après acquisition externe ou numérisation directe via un scanner couplé (comme c'est le cas pour notre protocole), parmi elles on retrouve la « mesure sur bande » (par intensité d'émission ou d'absorbance) qui peut être exploitée afin de réaliser des conversions graphiques permettant d'obtenir des profils densitométriques sur les migrations réalisées ;

- **MedCalc®**

Est un calculateur médical distribué sur internet [64], très utile pour le traitement de données statistiques, il est exploité afin de réaliser les graphiques du monitoring spectrophotométrique ;

- **Microsoft® Office 2016.**

2. METHODES

L'étude est réalisée au sein de deux établissements :

- ↳ Le laboratoire d'analyses médicales « Dr KHELIL » à Larbaâ Nath Irathen, s'agissant de la récolte des échantillons sanguins, leur traitement pré analytique et le dosage biochimique des paramètres lipidiques ;
- ↳ Le laboratoire de Biochimie à la faculté de Médecine de Tizi-Ouzou, concernant la mise au point de la technique électrophorétique et son application analytique ultérieure.

La population de l'étude est constituée de tout individu consultant auprès du laboratoire d'analyses médicales pour un bilan lipidique dont le résultat démontre une hyperlipidémie conformément aux normes du laboratoire (**triglycéridémie $\geq 1.6g/L$ et/ou cholestérolémie $\geq 2.2g/L$**) et ce durant une période de six (06) semaines d'affilée.

La récolte des échantillons sanguins se fait sur deux différents tubes de prélèvement :

- ↳ Un tube à Héparinate de Lithium, dont le plasma surnageant après centrifugation servira pour l'analyse des paramètres biochimiques sur place ;
- ↳ Un tube à EDTA, dont le plasma est séparé par centrifugation à 6000 *tours/mn* pendant 15mn au frais [58], qui est ensuite acheminé au laboratoire de Biochimie et stocké au frais (2-8°C) pour une analyse électrophorétique dans un délai de 07 jours.

En parallèle, les données cliniques disponibles sur les patients sont récoltées auprès de cliniciens ayant collaboré à l'étude (D^r Malki, Endocrinologue et D^r Fernane, Cardiologue).

2.1. Dosage des paramètres lipidiques sanguins

Deux automates (cf. 1.1 *Appareils analytiques*) ont servi au dosage des paramètres biochimiques de la population de l'étude.

Ils se basent sur des principes analytiques analogues que ce soit pour le dosage des triglycérides, du cholestérol total ou bien du cholestérol -HDL.

2.1.1. Dosage des triglycérides

Méthode enzymatique colorimétrique à point final, se basant sur le principe de « Trinder ». Le principe du dosage [65] automatisé est résumé dans le schéma ci-après :

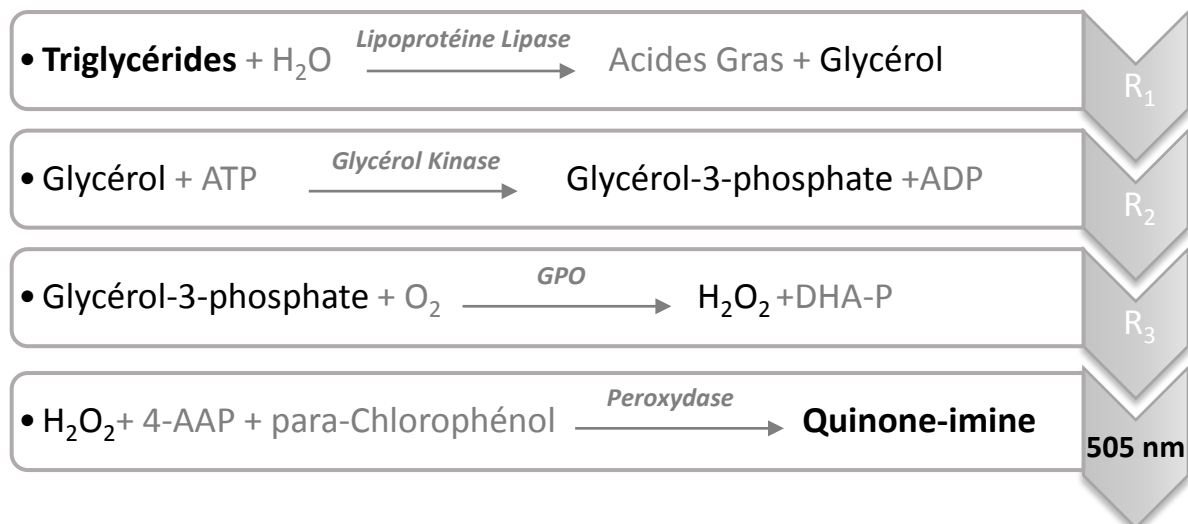


Figure 14. Schéma représentatif de la méthode de détermination de la triglycéridémie.

4-AAP = Amino-4-antipyrine ; DHA-P = Dihydroxyacétone phosphate ;
 GPO = Glycérol-3-phosphate oxydase ; R = Réaction.

2.1.2. Dosage du cholestérol total

Méthode enzymatique colorimétrique à point final, se basant sur le principe de « Trinder ». Le principe du dosage [66] également automatisé, est résumé dans le schéma ci-dessous :

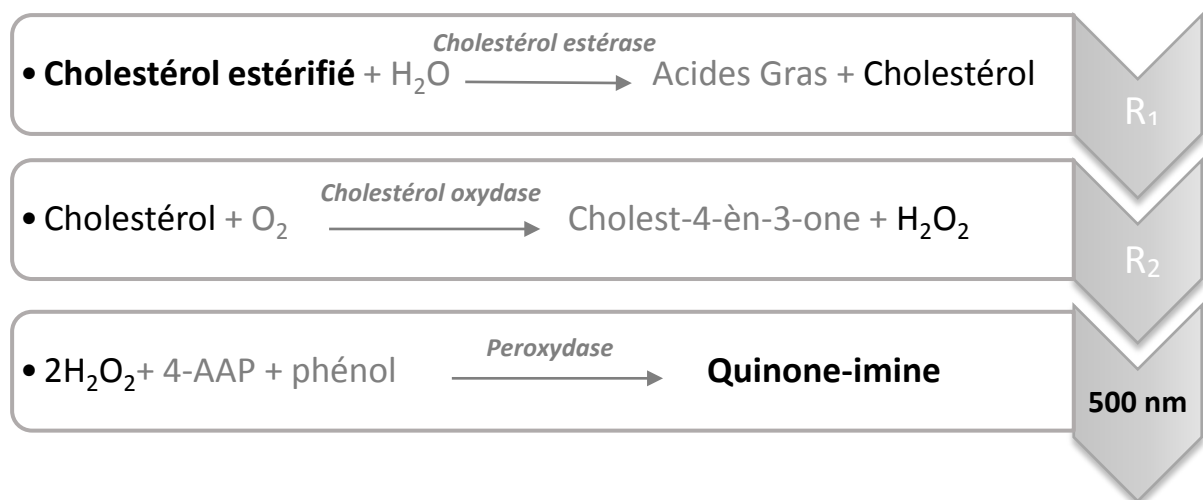


Figure 15. Schéma représentatif de la méthode de détermination de la cholestérolémie.

4-AAP = Amino-4-antipyrine ; R= Réaction.

2.1.3. Dosage du cholestérol-HDL

Le dosage repose sur le même principe que celui pour la quantification de la cholestérolémie totale. Néanmoins, les LDL et VLDL sont préalablement précipitées par du Phosphotungstate en présence d'ion Magnésium. Après centrifugation, le surnageant ne contenant plus que des HDL est dosé comme cité pour le cholestérol total [67].

2.1.4. Evaluation du cholestérol-LDL

L'évaluation du cholestérol-LDL repose dans notre cas sur l'application de la formule de Friedewald dans ses conditions de validité, une fois les autres paramètres lipidiques dosés (cf. *CHAPITRE II - 1.3 bilan lipidique systématique*).

2.2. Lipoprotéinogramme

La séparation des lipoprotéines plasmatiques est réalisée grâce à une technique d'électrophorèse sur plaques verticales de gels de polyacrylamide, en gradient discontinu de polyacrylamide (*Figure 16*). Ladite technique se base sur l'adaptation de deux protocoles préexistants :

- Celui mis au point par Frings et coll.[55] modifié par Hall et coll.[56], en tubes ;
- Celui mis au point par Pathak et coll.[58], en plaques.

Plusieurs essais empiriques ont été réalisés afin de maîtriser la technique mise en place et d'en optimiser les résultats. La variation de paramètres tels la concentration des gels, la température de polymérisation du gel et celle de la migration, la nature et le pH des tampons, la quantité de catalyseurs, ainsi que la nature et la quantité du colorant ont grandement influé sur les résultats obtenus.

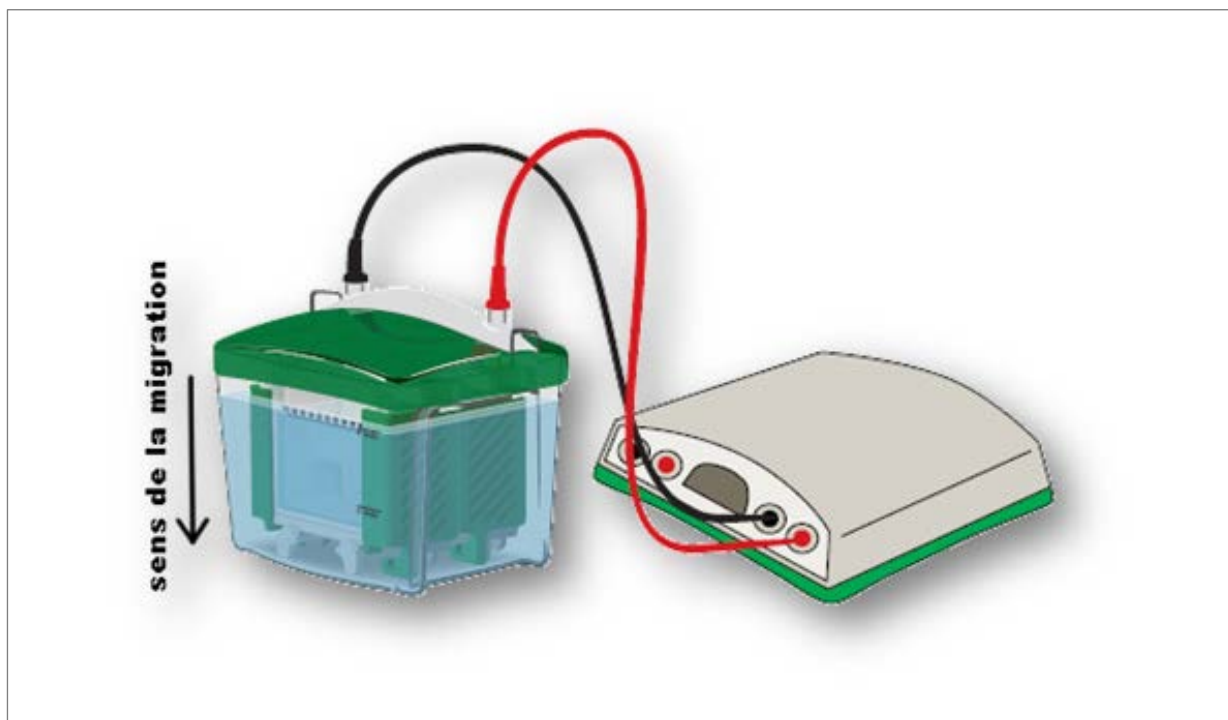


Figure 16. Dispositif de migration électrophorétique verticale.

2.2.1. Optimisation du protocole

Un bon gel de polyacrylamide pour migration électrophorétique se caractérise par une limpidité parfaite, une structure compacte, et une grande élasticité sans rupture (*Figure 17-A*). Ces qualités sont essentiellement dues à la formation de longues chaînes de polyacrylamide reliées entre elles par du bisacrylamide formant une structure tridimensionnelle apte à assurer le rôle de tamis moléculaire, et en jouant sur les proportions d'acrylamide et de bisacrylamide ainsi que sur le rapport pondéral entre les deux, on arrive à calibrer de façon adéquate les mailles du tamis en question afin de retenir, ralentir, ou laisser passer telle ou telle molécule (ie. Lipoprotéine).

Cependant, la formation de longues chaînes polymérisées et donc d'un gel de qualité supérieure n'est assurée qu'en cas de validation de trois conditions essentielles :

- Une température optimale ;
- Des quantités optimales d'initiateur et d'accélérateur de polymérisation (catalyseurs) ;
- L'absence d'agents annihilant les réactions radicalaires (tel l'Oxygène).

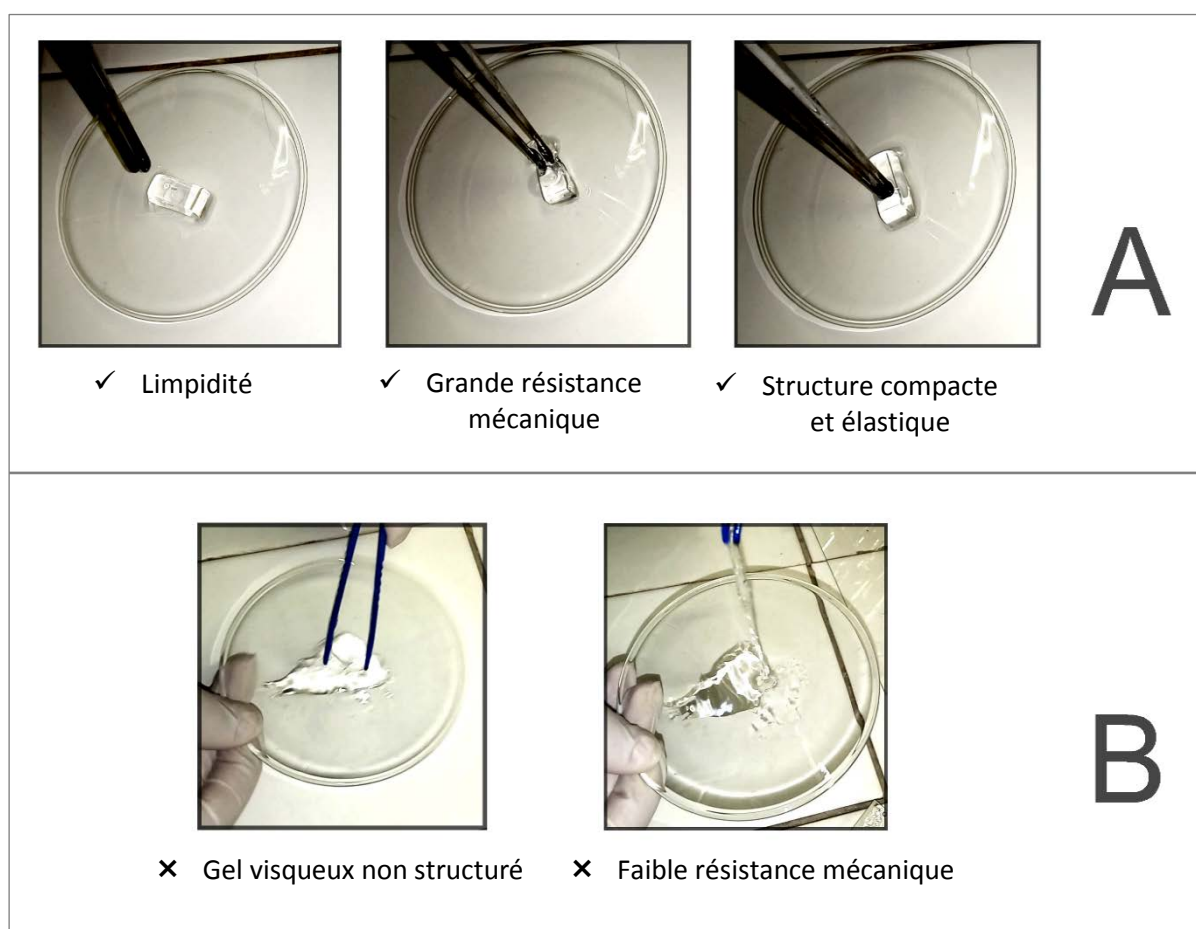


Figure 17. Caractéristiques des gels de polyacrylamide pour migration électrophorétique :

A. Bonne polymérisation B. Mauvaise polymérisation.

2.2.1.1. Préparation des catalyseurs

La qualité des gels de polyacrylamide obtenus est étroitement liée aux proportions de catalyseurs (TEMED et PSA) ajoutés à la solution gélifiante. Pour ainsi dire, une adaptation des quantités de catalyseurs devra se faire pour chaque variation des indices « T » et « C » (définition en *page 33*) au risque d'observer :

- Un retard de polymérisation lors d'ajout de quantités insuffisantes, chose qui expose la solution durant une plus grande période aux facteurs extérieurs (l'Oxygène notamment) ;
- Une polymérisation trop rapide lors d'ajout de quantités importantes, chose qui aboutit à la polymérisation en courtes chaînes de polyacrylamide et à une structure inapte à jouer le rôle de tamis moléculaire ;
- Un « étouffement » de la réaction radicalaire lors d'ajout de quantités excessives, chose qui annule considérablement la polymérisation.

Le TEMED est communément utilisé à l'état pur ou rajouté directement aux solutions tampons, mais afin d'augmenter l'exactitude des volumes prélevés à la micropipette (*voir Annexe IV*), nous avons jugé utile la préparation d'une solution distincte à 10% V/V dans de l'eau purifiée, opération qui multiplie par 10 les volumes ultérieurement prélevés et qui divise par le même facteur l'imprécision des pipetages tout en évitant des incompatibilités en solution. Aussi, le PSA est le plus souvent utilisé en solution à 10% mais nous avons préféré le faire en solution à 1% P/V pour les mêmes raisons que précédemment cité. Cependant, l'usage de plus grands volumes fait qu'ils ne soient plus négligeables, et devront être pris en compte dans le calcul des concentrations en acrylamide et en bisacrylamide des solutions (cf. 2.2.1.2 *Préparation des solutions mères*). Les solutions préparées sont stockées au frais ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) en flacons ambrés (*Figure 18*), pour une durée maximale de 07 jours.



Figure 18. Solutions préparées de TEMED et de PSA en flacons ambrés.

2.2.1.2. Préparation des solutions mères

La littérature rapporte que la limite d'exclusion moléculaire concernant les chylomicrons est aux environs de $T = 2\%$ et celles des VLDL aux environs de $T = 3\%$, limites pour lesquelles les molécules citées ne peuvent pénétrer dans le gel (cf. *CHAPITRE II - 2.3.2.4.7.2. Gradient discontinu*). Il est également démontré que le maillage du gel est amélioré en augmentant l'indice « C » et ce jusqu'à une limite de 5% au-delà de laquelle des structures anarchiques commencent à se former, structures représentées par des polymères circulaires (lorsqu'une molécule de bisacrylamide se condense avec les deux extrémités de la même chaîne de polyacrylamide) et des doublets (par liaison réticulant-réticulant). Ces structures aboutissent à la formation de gels faiblement homogènes, peu reproductibles, et par conséquent inaptes pour l'électrophorèse [68].

Les calculs faits sur les protocoles de Frings, Hall et Pathak ont abouti aux résultats suivants :

Tableau 5. Tableau récapitulatif des indices T et C des différents gels répertoriés.

protocole		T (%)	C (%)
Frings & coll.	<i>Stacking gel</i>	3.125 %	20 %
	<i>Resolving gel</i>	3.85 %	2.6 %
Hall & coll.	<i>Stacking gel</i>	3.375 %	3.7 %
	<i>Resolving gel</i>	3.15 %	4.76 %
Pathak & coll.	<i>Stacking gel</i>	2.5 %	4.76 %
	<i>Resolving gel</i>	3.15 %	4.76 %

Trois solutions mères basées sur les protocoles de Hall et Pathak, cinq fois (5×) concentrées, sont préparées à partir d'acrylamide et de bisacrylamide à différentes proportions, dissous dans de l'eau purifiée, puis stockées au frais ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) pour une durée maximale d'un mois :

- Solution mère à $T = 13.440\%$ et $C = 4.76\%$, qui après dilution au 5ème et ajout des volumes adéquats de catalyseurs donnera une solution gélifiante de *stacking gel* à 2.5% ;
- Solution mère à $T = 17.763\%$ et $C = 3.7\%$, qui après dilution au 5ème et ajout des volumes adéquats de catalyseurs donnera une solution gélifiante de *stacking gel* à 3.375% ;
- Solution mère à $T = 16.666\%$ et $C = 4.76\%$, qui après dilution au 5ème et ajout des volumes adéquats de catalyseurs donnera une solution gélifiante de *resolving gel* à 3.15% .

Il est à noter que les volumes de catalyseurs sont non négligeables et inclus dans les calculs, ainsi donc des concentrations intermédiaires prévoyant la dilution par ajout des catalyseurs sont établies et ont servi au calculs des concentrations des solutions mères précédemment citées. En outre, les dilutions au 5^{ème} pour l'obtention des solutions intermédiaires sont effectuées dans les tampons de gel adéquats (cf. 2.2.1.3 *Préparation des tampons*)

Les migrations initiales ont montré le peu d'intérêt qu'a le *stacking gel* à **T = 3.375 %** (utilisé par Hall et coll.) car étant d'une trop grande densité et dont les mailles ne pouvaient laisser passer, dans nos conditions, les VLDL (dont la limite d'exclusion à 3%). Nous avons dès lors abouti aux gels utilisés par Pathak et coll. qui se présentent en gradient discontinu avec des *stacking gel* à **T = 2.5 %** et **C = 4.76 %**, et des *resolving gel* à **T = 3.15 %** et **C = 4.76 %**, système qui fût adopté pour la suite de l'étude.

2.2.1.3. Préparation des tampons

Il est décrit d'une part dans la littérature des systèmes qualifiés de continus où les tampons d'électrode et le tampon dans lequel l'acrylamide a été solubilisé (i.e. tampon du gel en tant que tel) sont les mêmes, et d'autre part des modes d'électrophorèse où plusieurs tampons sont utilisés. On qualifie ces systèmes de discontinus ou multiphasiques (cf. *CHAPITRE II - 2.3.2.4.7.3. Tampons ioniques dans un système à gradient discontinu*). Il est cependant à noter que les conditions ioniques et de pH se doivent d'être compatibles avec la stabilité des molécules à analyser, on évite généralement les milieux trop acides ou trop alcalins : pour la plupart des molécules biologiques (lipoprotéines dans notre cas), les pH acceptables sont de l'ordre de 6 à 10.

Dans les migrations que nous avons réalisées, deux types de tampons ont été essayés conformément au système à gradient discontinu de polyacrylamide :

2.2.1.3.1. Tampon Tris - Borate - EDTA (TBE)

Il s'agit du tampon TBE décrit dans le protocole de Pathak et coll. [58] en système monophasique et préparé ainsi :

- ↳ Dans une fiole de 2 litres sous agitation magnétique (notre cuve de migration nécessite 1.6 litres), ajouter à une certaine quantité d'eau purifiée :
 - De l'EDTA en tant que chélateur car il permet de retenir les impuretés métalliques capables d'inhiber la polymérisation (à raison de 3 mmol/l). Vu que sa masse molaire est de 292.24 g/mol, la quantité à ajouter est de 1.753 g pour 2 litres de solution ;
 - De l'ACIDE BORIQUE ou acide orthoborique (à raison de 80 mmol/l). C'est un triacide faible dont le pK_{a1} est de 9.28 à 24.85 °C pour le couple $B(OH)_3 / B(OH)_4^-$, puis 10.7 et 13.8 pour les deux derniers couples acide / base. Par contre, en présence d'un excès

de polyol, l'acide borique en solution aqueuse exprime mieux son acidité. Etant donné que sa masse molaire est de 61.83 g/mol, la quantité à ajouter est de 9.892 g pour 2 litres de solution ;

- Du TRIS en tant que base tamponnante (à raison de 90 mmol/l). Etant donné que sa masse molaire est de 121.14 g/mol, la quantité à ajouter est de 21.804 g pour 2 litres de solution.

↳ Laisser la solution s'homogénéiser puis ajuster avec de l'eau purifiée. Vérifier et ajuster si nécessaire le pH à 8.3 avec la base ou l'acide. Après préparation, le tampon est stocké au frais ($\approx 4^\circ\text{C}$) et est valide durant un (01) mois.

Pour notre part, ce tampon a été utilisé en tant que tampon d'électrode. S'agissant des tampons de gels, plusieurs essais ont été réalisés afin d'améliorer la résolution finale des lipoprotéines par amélioration de l'effet de tassement et ce notamment en jouant sur le pH des deux tampons incorporés dans le gel et en prenant en considération le comportement de l'acide borique en présence de Tris (tri-hydroxylé et donc apparenté aux polyols) de sorte que l'ion de traine $B(OH)_4^-$ aie un comportement électrophorétique adéquat (cf. *CHAPITRE II - 2.3.2.4.7.3. Tampons ioniques dans un système à gradient discontinu*).

Deux hypothèses en découlent :

a) Le Tris n'interagit pas en tant que Polyol

Dans ce cas, l'ion borates $B(OH)_4^-$ présent dans le tampon d'électrode est ciblé comme ion de traine et sa charge est modulée en faisant varier le pH des tampons des gels d'une unité par rapport au pKa classique de l'acide borique (9.2) et ce en la soustrayant ($9.2 - 1 = 8.2$) pour le *stacking gel* et en l'ajoutant ($9.2 + 1 = 10.2$) pour le *resolving gel*. Ceci permet la réduction de la fraction $B(OH)_4^-$ au niveau du *stacking gel* (derrière son ralentissement électrophorétique) et son l'augmentation au niveau du *resolving gel* (d'où l'augmentation de sa mobilité et sa fuite outrepassant l'échantillon).

L'ion de traine devant être exclusivement dans le tampon d'électrode, nous avons utilisé des tampons Tris - HCl - EDTA pour les tampons de gel aux différents pH indiqués plus haut.

- Pour le tampon du *stacking gel* : 2.42 g de Tris sont dissous dans 100ml. 80 mg d'EDTA sont ajoutés. Le pH est ajusté à 8.2 avec HCl
- Pour le tampon du *resolving gel* : 6.05 g de Tris sont dissous dans 100ml. 80 mg d'EDTA sont ajoutés. Le pH est ajusté à 10.2 avec HCl ;

b) Le Tris interagit en tant que polyol

Comme décrit dans la littérature, l'ion borate $B(OH)_4^-$ en présence d'un excès de polyol forme un complexe qui se comporte comme un acide plus fort dont le $pK_a = 6.5$. Le Tris étant un poly hydroxyle, nous avons supposé son éventuelle interaction. Suivant cette hypothèse, la charge de l'ion borates $B(OH)_4^-$ présent dans le tampon d'électrode est modulée en faisant varier le pH des tampons des gels d'une unité par rapport au pK_a modifié de l'acide borique (6.5) et ce en la soustrayant ($6.5 - 1 = 5.5$) pour le *stacking gel* et en l'ajoutant ($6.5 + 1 = 7.5$) pour le *resolving gel*.

Pour cela deux tampons THE ont été préparés :

- Pour le tampon du *stacking gel* : 1.21 g de Tris sont dissous dans 100ml. 80 mg d'EDTA sont ajoutés. Le pH est ajusté à 5.5 avec HCl
- Pour le tampon du *resolving gel* : 1.815 g de Tris sont dissous dans 100ml. 80 mg d'EDTA sont ajoutés. Le pH est ajusté à 7.5 avec HCl ;

Après migrations, nous avons constaté que dans les deux hypothèses le TBE ne pouvait améliorer la qualité des résultats électrophorétiques. Comme le montre la figure ci-dessous (*Figure 19*), bien que les fractions HDL soient arrivées au bout de la plaque de migration, les autres fractions (VLDL et LDL) restent accumulées et peu résolues à l'entrée du gel de séparation ce qui témoigne d'un mauvais tassement initial et d'une mauvaise résolution consécutive.

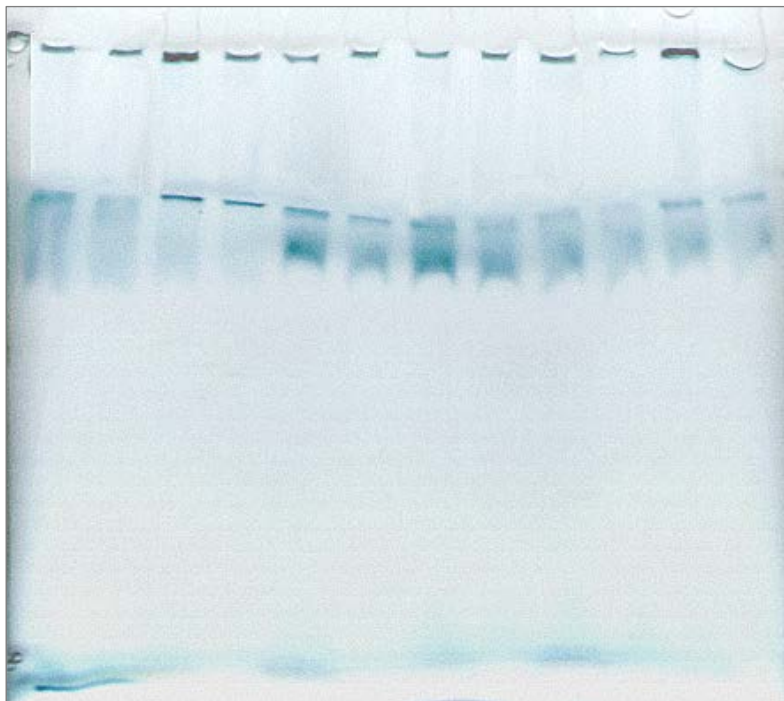


Figure 19. Migration électrophorétique des lipoprotéines plasmatiques dans un tampon TBE sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu.

2.2.1.3.2. Tampon Tris - Glycine / Tris - HCl

De nos jours, Le système triphasique avec concurrence du Tris, des ions glycinate et des anions Cl^- est l'un des plus utilisés en électrophorèse car étant très performant tout en restant facilement accessible. L'ion frontal est le Cl^- , dont la charge ne varie pas en fonction du pH. L'ion de traîne est la glycine (glycinate⁻) : cette dernière, dont le $\text{pH}_i = 06$, est peu chargée à $\text{pH} = 6.7$ (pH du tampon de *stacking gel*) ce qui permet un tassement des fractions lipoprotéiques au niveau du gel de concentration (*Figure 20*) mais chargée négativement à $\text{pH} 8.9$ (pH du *resolving gel*) ce qui augmente sa mobilité d'où la fin de l'effet de tassement au niveau du gel de séparation (cf. *CHAPITRE II - 2.3.2.4.7.3. Tampons ioniques dans un système à gradient discontinu*).

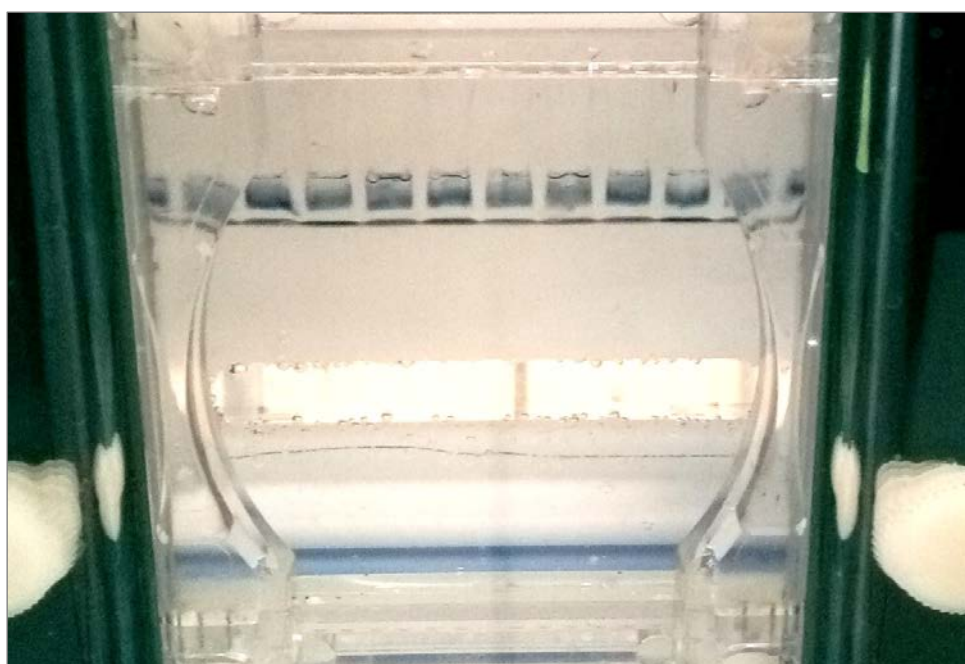


Figure 20. Phénomène de tassement de l'échantillon sérique visible au fur et à mesure de l'avancée dans le *stacking gel*.

Tampon utilisé : Tris – Glycine / Tris – HCl.

Pour notre part, nous avons préparé ce tampon conformément au protocole de Frings et coll. amélioré par Hall et coll. [55,56] comme suit :

❖ Tampon d'électrode Tris - Glycine :

Dans une fiole de 2 litres, 12 g de Tris et 57.6 g de Glycine devraient être dissoutes dans de l'eau pure tout en ajustant le pH à 8.3 avec l'un ou l'autre des solutés. Mais selon Hall et coll., les concentrations doivent être divisées par 05 afin de diminuer la force ionique de la solution et par conséquent les interférences ioniques à l'origine de la baisse de résolution, ce qui réduit les quantités à 2.4 g de Tris et 11.52 g de Glycine pour 2 litres de solution.

❖ **Tampon du *stacking gel* Tris - HCl :**

Selon le ratio appliqué dans la solution dédiée au *stacking gel* de Frings et coll., le Tris représente seulement $\frac{1}{8}$ des 5.98 g ajoutés initialement à 100 ml de solution mère d'où :

$$C_{TRIS} = 0.75 \text{ g}/100 \text{ ml} = 0.75 \%$$

Sachant que les volumes adéquats de PSA et de TEMED ajoutés à ce type de gel sont respectivement 500 μl et 200 μl (total = 700 μL), et que le volume sans catalyseurs est de 10 ml – 700 μl = 9.3 ml, une adaptation par rapport à la dilution engendrée dans les 10 ml de la solution finale devait se faire et ce de la manière suivante :

$$0.75 \% \times 10 \text{ ml} = C_1 \times 9.3 \text{ ml}$$

$$\text{Donc : } C_1 = 0.806 \%$$

Où : C_1 représente une concentration intermédiaire

$$C_{TRIS \text{ finale}} \times 8 \text{ ml} = 0.806 \% \times 10 \text{ ml}$$

Où : 8 ml (10 ml – 2 ml) représentent le volume du tampon ajouté à 2 ml de solution mère d'acrylamide lors de la préparation du gel (dilution initiale au $\frac{1}{5}$ éme).

$$\text{Donc : } C_{TRIS \text{ finale}} = 1.0075 \text{ g}/100 \text{ ml} = 1.0075 \%$$

A ajuster au pH = 6.7 avec du HCl.

❖ **Tampon du *resolving gel* Tris - HCl :**

La préparation se fait de la même façon que décrite précédemment, sauf que dans ce cas-ci le Tris représente $\frac{1}{4}$ des 18.3 g ajouté initialement pour 100 ml de solution mère d'où :

$$C_{TRIS} = 4.575 \text{ g}/100 \text{ ml} = 4.575 \%$$

Les volumes adéquats de PSA et de TEMED ajoutés à ce gel sont respectivement de 400 μl et 150 μl (total = 550 μl), de ce fait le volume sans catalyseurs devient 10 ml – 550 μl = 9.45 ml. $C_1 = 4.841 \%$ représente dès lors la concentration intermédiaire et on aboutit à :

$$C_{TRIS \text{ finale}} = 6.0512 \text{ g}/100 \text{ ml} = 6.0512 \%$$

A ajuster au pH = 8.9 avec HCl.

Après préparation, les tampons sont stockés au frais ($\approx 4^\circ\text{C}$) et sont valides durant un (01) mois sauf pour le tampon d'électrode qui n'est valide que quinze (15) jours seulement (à raison de 6-8 migrations) car une prolifération microbienne et des dépôts de glycine sur la cuve après chaque migration sont le plus souvent notables.

Pour ses meilleures qualités résolutive comparativement au TBE, le tampon Tris-glycine a été retenu pour la réalisation de la technique.

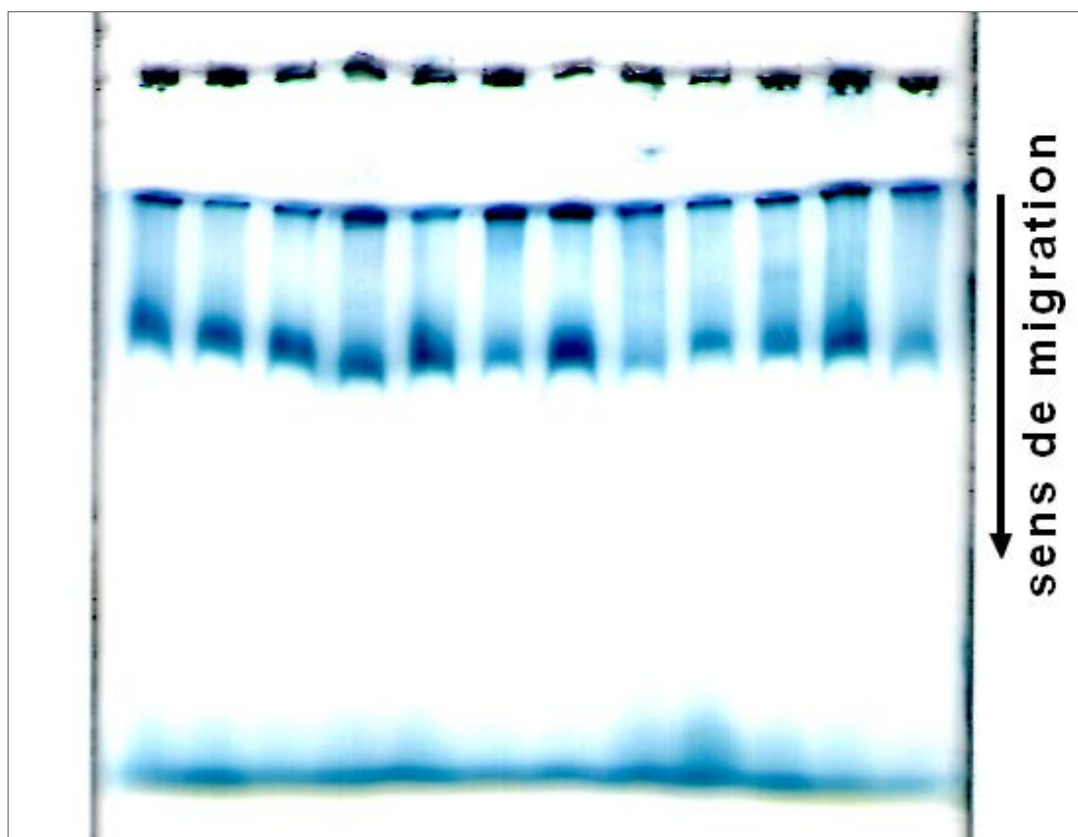


Figure 21. Migration électrophorétique des lipoprotéines sériques précoulées au ASBB dans un système tampon triphasique Tris-Glycine/Tris-HCl en gradient discontinu de polyacrylamide.

2.2.1.4. Optimisation de la température de polymérisation

La température est un élément clé de la cinétique des réactions chimiques, au même titre que la cinétique de polymérisation de l'acrylamide qui en est grandement affectée. La température initialement suggérée, d'environ 04°C [69,70], a tendance à produire des gels peu limpides, très poreux et peu reproductibles (*Figure 17-B*) tandis qu'aux températures égales ou supérieures à 25°C, les gels acquièrent des propriétés élastiques, une bonne limpidité et une porosité maîtrisée (*Figure 17-A*). Ceci peut être expliqué par la formation de liaisons « hydrogène » entre les molécules de bisacrylamide (04 / molécule) à basse température, liaisons progressivement rompues par l'élévation de température jusqu'à un optimum de 60°C, bien que cette dernière ne soit pas conseillée car donnant naissance à une réaction trop rapide qui produit de trop courtes chaînes de polymères [50]. Une température avoisinant les 25°C est dès lors recommandée.

2.2.1.5. Monitoring spectrophotométrique UV

Suivant les recommandations de Bio-Rad [48] et conformément aux travaux de Chen et Chrumbach [51], nous avons réalisé des monitorings spectrophotométriques à 260 nm et à 275 nm de la polymérisation des différents gels que nous avons préparé tout au long de la phase d'essais et d'optimisation afin d'aboutir à des gels de qualité et de porosité adéquate.

Tel que mentionné précédemment, des dilutions des catalyseurs (cf. 2.2.1.1 *Préparation des catalyseurs*) et une calibration des micropipettes (voir. *Annexe IV*) ont été réalisés et ce afin de réduire les erreurs sur les volumes prélevés, étant donné l'ordre micrométrique des volumes manipulés et sachant que ce type d'erreurs influence considérablement la cinétique de polymérisation et par conséquent la qualité des gels produits.

Dans ce qui suit, la préparation des gels ainsi que le suivi cinétique de la polymérisation sont réalisés avec le PSA à 1% P/V et le TEMED à 10% V/V en solutions aqueuses.

2.2.1.5.1. Monitoring à 260 nm

Dans son bulletin n°1156 [48], Bio-Rad préconise un suivi spectrophotométrique de la cinétique de polymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide à 260 nm, qui témoigne de la qualité résolutive ainsi que de la reproductibilité de la porosité des gels préparés (cf. *CHAPITRE II - 2.3.2.4.5 Cinétique de polymérisation*).

Le bulletin met en évidence, entre autres :

- ↳ L'influence des impuretés sur la vitesse de polymérisation ;
- ↳ Le début optimal et maîtrisé de la polymérisation, qui devra s'amorcer à 20 minutes concernant le *resolving gel*, et plus précocement pour le *stacking gel* (à 10 minutes) cela étant expliqué par l'exposition à l'air de ce dernier (le *resolving gel* étant recouvert par de l'isobutanol durant sa polymérisation) et par conséquent sa susceptibilité accrue à l'inhibition par l'oxygène atmosphérique ;
- ↳ L'achèvement optimal et maîtrisé de la polymérisation après environs 90 minutes (environs 80 minutes pour les *stackings gels* exposés à l'air), qui laisse apprécier le rendement de la réaction, élément important pour la reproductibilité des gels préparés et ainsi des migrations.

Lors des premiers essais effectués (*Figure 22*), nous avons remarqué que le spectrophotomètre ne pouvait chiffrer les valeurs d'absorbance dans l'intervalle de temps initial (de 0 à 19 minutes). Ce n'est qu'à partir de 20 minutes que les absorbances commencent à décroître. Ceci s'explique par l'absorption élevée des monomères à la longueur d'onde de 260 nm et l'usage d'une cuve en Quartz de 10mm au lieu d'une lecture optique sur plaque d'01mm,

donnant par application de la loi de Beer-Lambert des absorbances qui dépassent les limites de détection de l'appareil ($A = 3.0$).

Ainsi donc, l'amorce de la polymérisation était indétectable car la zone allant de 0 à 20 minutes sortait du domaine du monitoring.

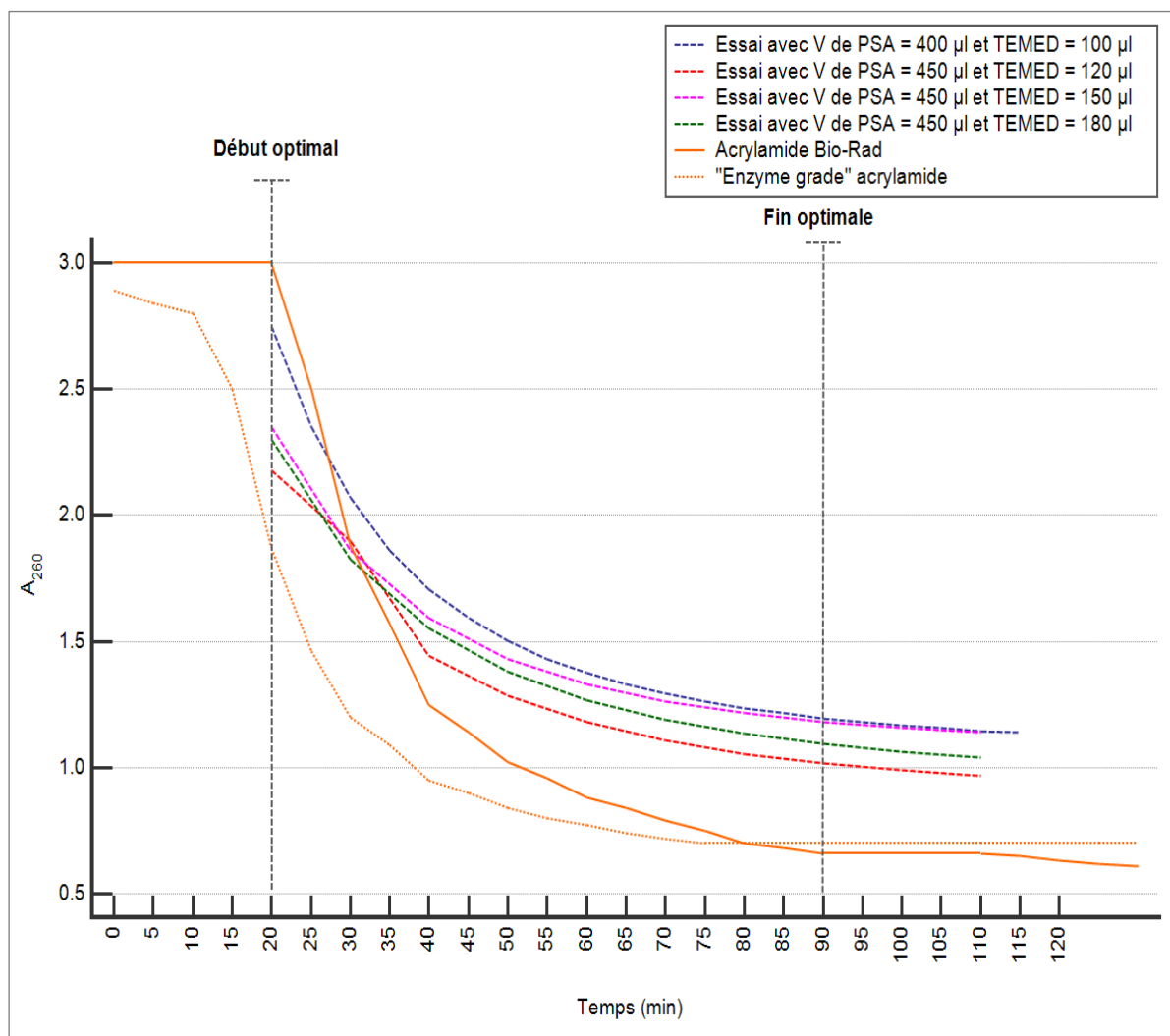


Figure 22. Suivi de la cinétique de polymérisation du gel à 3,15 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 260 nm.

Aussi, l'allure initiale de la courbe de l'essai avec 400 μ l de PSA sur le gel à 3.15% (de couleur bleue sur la *Figure 22*) montre une meilleure analogie avec le modèle fourni par Bio-Rad que celles avec 450 μ l de PSA, bien que l'accélération qui s'en est suivie (de 30 à 90mn) soit encore insuffisante. Cela a mené à augmenter les volumes de TEMED dans les essais ultérieurs sur le gel à 3.15% (cf. 2.2.1.5.2 *Monitoring à 275 nm*).

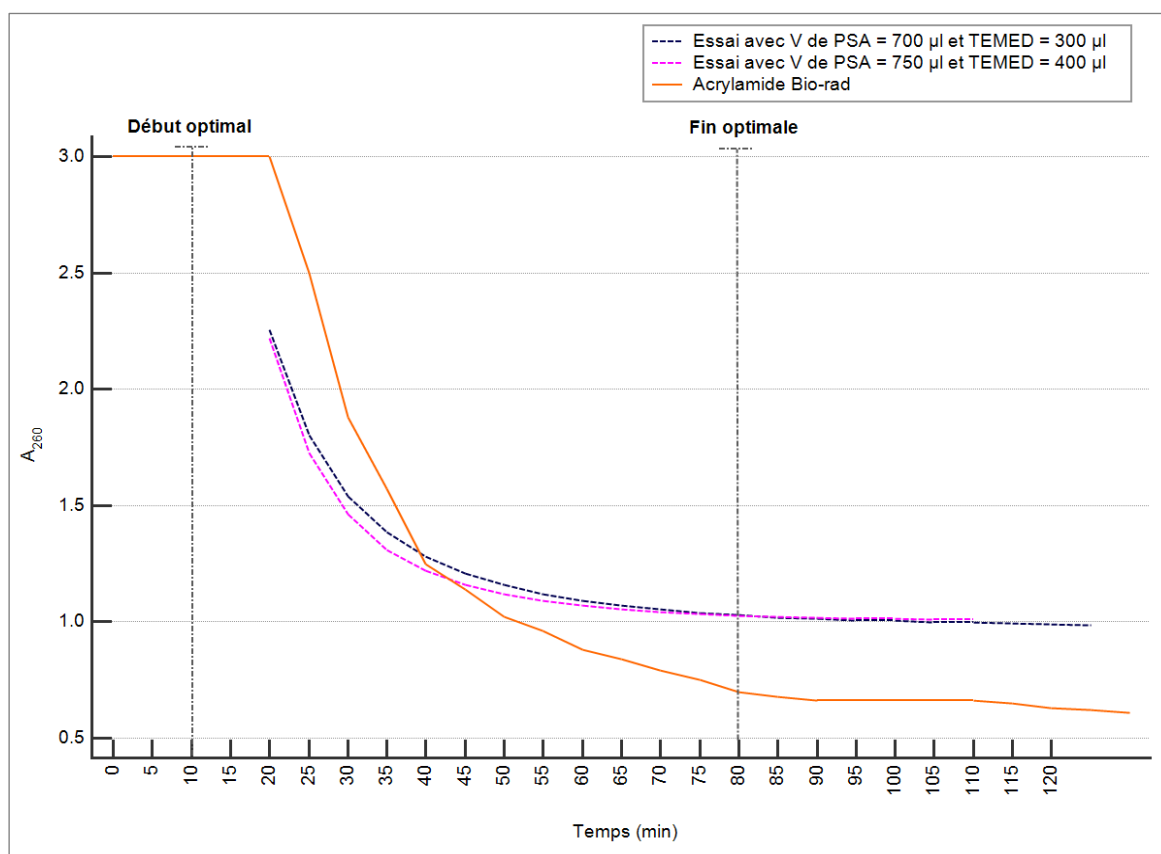


Figure 23 : Suivi de la cinétique de polymérisation du gel à 2,5 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 260 nm.

2.2.1.5.2. Monitoring à 275 nm

Selon les travaux de Chen et Chrumbach [51], une bonne maîtrise d'une technique d'électrophorèse repose sur la connaissance exacte des concentrations en gel et de leur reproductibilité, et la manière la plus simple d'estimer le degré de conversion des monomères en polyacrylamide réticulé serait de mesurer la concentration résiduelle des groupements « Vinyle » ($-C=C$) par spectrophotométrie en se servant de balayage optique continu, travaux qui ont abouti à fixer une longueur d'onde optimale de 275 nm.

Conscient des contraintes et limites rencontrées lors des essais du monitoring précédant (cf. 2.2.1.5.1 *Monitoring à 260 nm*), nous avons opté pour le suivi cinétique de la polymérisation des gels à 275 nm ce qui dans le cas de bonnes conditions de catalyse et de température :

- Permet d'apprécier le suivi dans le laps de temps initial (de 0 à 20 minutes), car les monomères se retrouvent dans une zone de demi-absorbance où la sensibilité des résidus vinyle est réduite mais la spécificité y est grandement améliorée, chose qui permettrait de confirmer les recommandations de Bio-Rad en matière d'amorce de la polymérisation, à savoir 10 minutes pour le *stacking gel* et 20 minutes pour le *resolving gel*.
- Permet de calculer le rendement de la polymérisation ;

- c) Montre une légère augmentation des absorbances juste avant le début de la polymérisation, phénomène qui peut s'expliquer par l'initiation des premiers radicaux dans le milieu.

Ainsi donc, par appréciation du moment de déclenchement de la polymérisation, le moment approximatif de son achèvement, le rendement des réactions ainsi que l'allure globale des courbes du monitoring, nous avons pu conclure sur les quantités adéquates de catalyseurs à rajouter aux solutions gélifiantes :

▪ **Pour le stacking gel**

Des volumes de **500µl de PSA 1%** et **200µl de TEMED 10%** sont retenus, et 11 essais sont réalisés (*Figure 24*) afin de vérifier la reproductibilité des tracés et l'absence de facteurs de variations autres que ceux connus et maîtrisés. L'essai dont les volumes de PSA = 600µl et de TEMED = 350 µl (*de couleur rose sur la Figure 24*) atteste son inadéquation en matière de début, fin et rendement de la réaction. Ceci est dû aux volumes excessifs de catalyseurs ajoutés ce qui initie trop vite la polymérisation ;

▪ **Pour le resolving gel**

Des volumes de **400µl de PSA 1%** et **150µl de TEMED 10%** sont retenus, et 09 essais sont réalisés (*Figure 25*) afin de vérifier la reproductibilité des tracés et l'absence de facteurs de variations autres que ceux connus et maîtrisés.

Aussi, le rendement de la réaction de polymérisation est calculé pour chaque essai :

$$\text{Rendement \%} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance finale}}{\text{Absorbance initiale}} \right) \times 100 \%$$

Tableau 6. Rendement des réactions de polymérisation des gels à 2.5%.

Stacking gel (T = 2.5%)	
essai	rendement (%)
1	87.9
2	85.7
3	85.6
4	83.1
5	82.7
6	85.8
7	83.4
8	86.5
9	86.2
10	85.1
11	83.5
moyenne	85.0

Tableau 7. Rendement des réactions de polymérisation des gels à 3.15%.

Resolving gel (T = 3.15%)	
essai	rendement (%)
1	84.5
2	85.0
3	82.3
4	84.4
5	84.5
6	85.1
7	84.3
8	84.5
9	85.6
moyenne	84.5

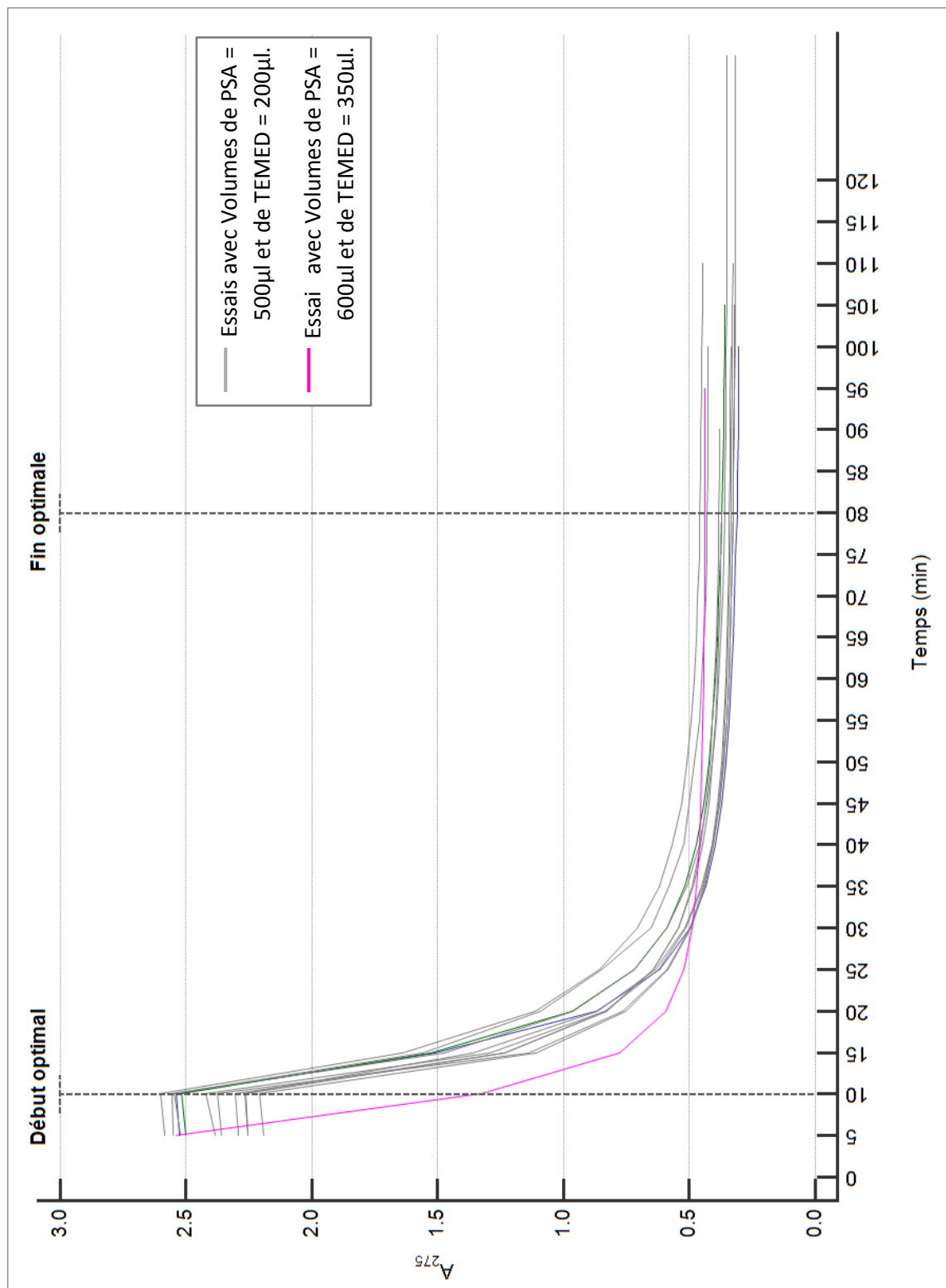


Figure 24. Suivi de la cinétique de polymérisation des gels à 2,5 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 275 nm.

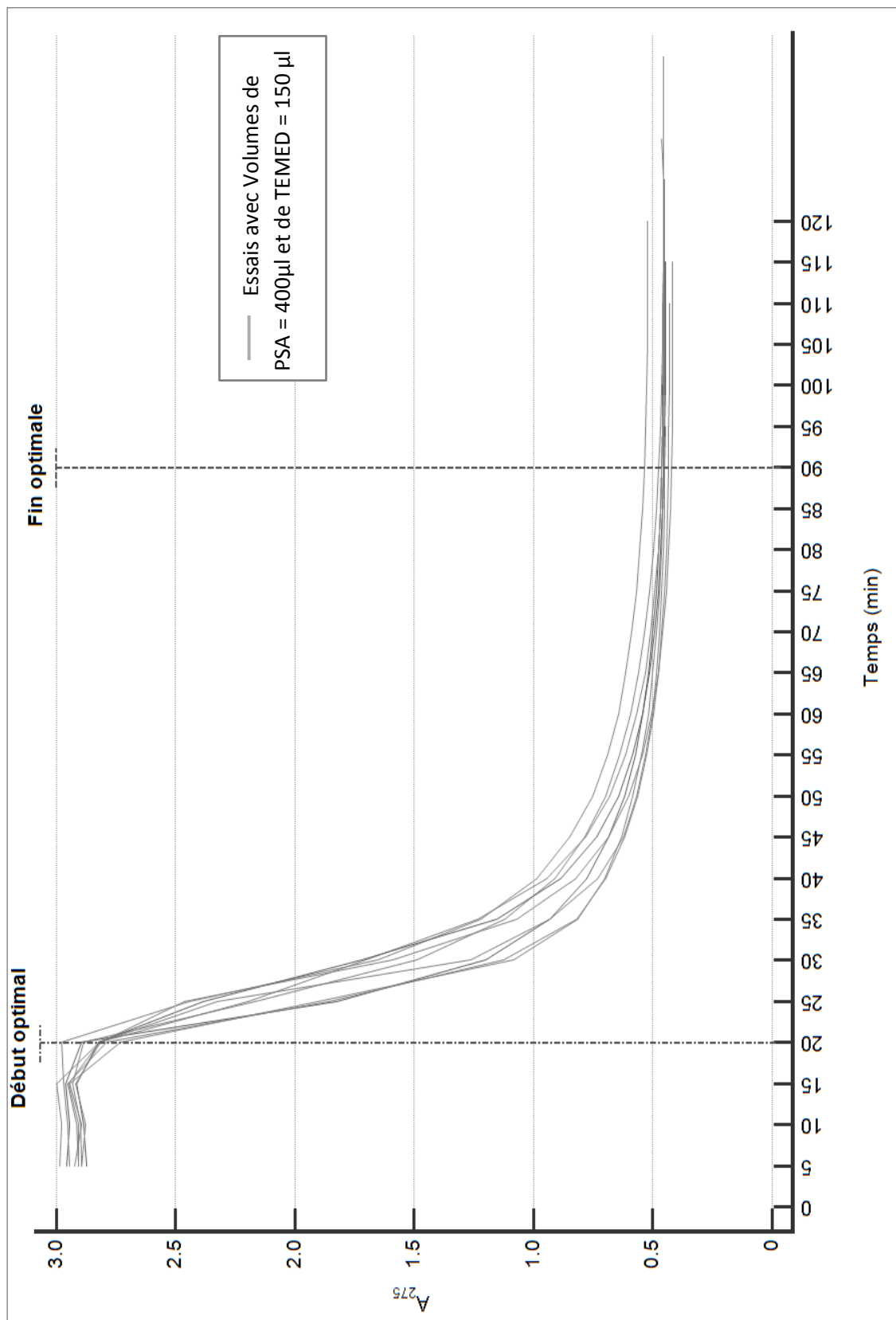


Figure 25. Suivi de la cinétique de polymérisation des gels à 3,15 % de polyacrylamide par spectrophotométrie UV-Visible à 275 nm.

2.2.1.6. Préparation du colorant

Le noir soudan B (ou Sudan Black B « SBB ») est un imprégnateur lipidique appelé « Lysochrome » en référence à sa forte lipophilie, il a tendance à imprégner avec une nuance noir bleutée. Il est dit colorant à tort car il n'interagit aucunement avec les structures mises en évidence, mais se contente seulement d'être dissous et ainsi refléter la présence de lipides.

Des études ont démontré, grâce à des séparations chromatographiques suivies par une analyse infrarouge et spectrométrique, que le noir soudan B est en fait constitué d'un mélange de plusieurs substances (ce qui explique certaines nuances orangées quelques fois) dont les plus abondantes sont le SBB-I (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-4-[(4-phenylazo-1-naphthalenyl)-azo]-1H-perimidine) avec une proportion avoisinant les 20% et le SBB-II (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-6-[(4-phenylazo-1-naphthalenyl)-azo]-1H-perimidine) (Figure 26) dont la proportion est aux alentours de 60%, deux isomères qui ne diffèrent que par le positionnement du radical chromophore [71]. Ainsi donc, les deux groupements « amino » secondaires de la 1H-perimidine s'avèrent être les lieux de l'acétylation du SBB-I et SBB-II formant ainsi des amides qui imprègnent plus intensément et plus spécifiquement les lipides [72].

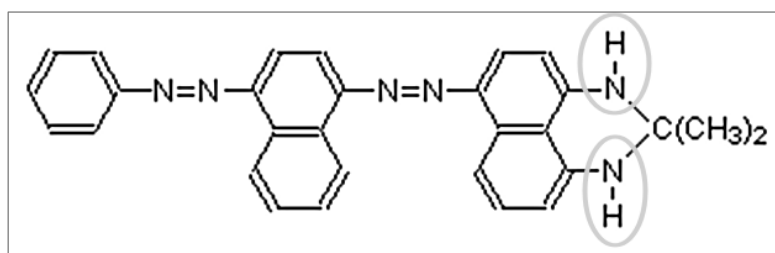


Figure 26. Structure chimique du Noir Soudan B II (SBB-II).

Les cercles en gris représentent les lieux de fixation des radicaux « acétyle ».

Deux imprégnateurs ont été testés durant notre étude: le noir soudan B natif (SBB) ainsi que le noir soudan B acétylé (ASBB) préparé au laboratoire.

Le noir soudan B est préparé selon la méthode rapportée par Mc Donald [73] avec de légères modifications telles que l'intégration de la Dioxane qui stabilise le noir soudan B en solution glycolique :

- ↳ On Ajoute progressivement de la Dioxane à 100mg de noir soudan B tout en agitant jusqu'à dissolution complète et obtention d'une solution saturée, le tout au bain marie à 95°C ;
- ↳ On complète jusqu'à 10ml avec de l'éthylène glycol ;
- ↳ On filtre à chaud sur papier Wattman n°2 puis à froid sur un second papier Wattman n°2 (la filtration à froid prend plus de temps). ;

- ↳ Enfin, on récupère la solution colorante à 1% de SBB dans une fiole et on la conserve à l'abri de la lumière. La solution est valide durant un (01) mois.

Les premiers essais ont conclu à une faible intensité de la coloration par le SBB ainsi qu'une faible spécificité de l'imprégnation des lipoprotéines (formation de trainées colorées sur la jonction VLDL / LDL ainsi que des dépôts aux puits).

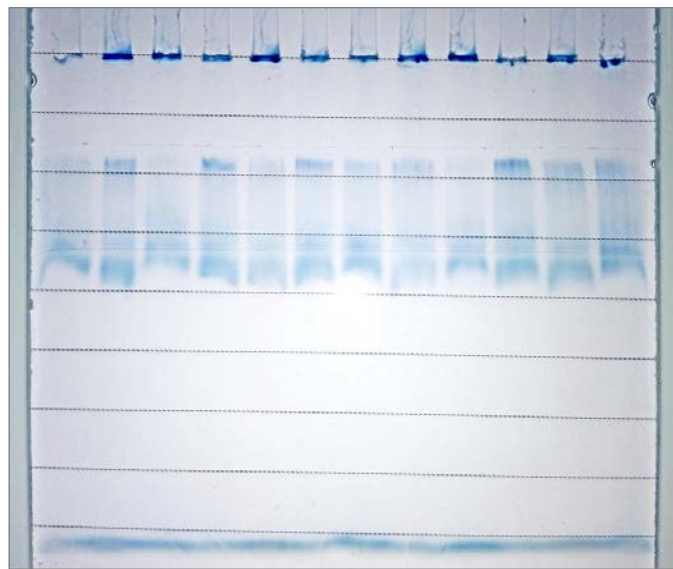


Figure 27. Tracés électrophorétiques des lipoprotéines sériques précolorées au Noir soudan B natif.

De ce fait, le noir soudan B acétylé est synthétisé et ce suivant la méthode de Lillie modifiée par Hall [56], avec de légères optimisations concernant les étapes de purification notamment :

- ↳ On dissout 2.5 grammes de noir soudan B dans 60ml de Pyridine par agitation magnétique, sous hôte ;
- ↳ On ajoute progressivement 40ml d'anhydride acétique, on laisse ensuite la mixture reposer à température ambiante durant une nuit complète ;
- ↳ Après ajout d'un excès d'eau à la mixture anhydre (environ 5 litres), le noir soudan B acétylé aura tendance à précipiter, il est dès lors récolté par filtration sous vide au travers d'un papier Wattman n°2 ;
- ↳ On laisse ensuite le papier sécher à température ambiante, puis on le traite avec de l'acétone jusqu'à épuisement total. L'acétone est finalement évaporée à pression réduite à une température d'environ 40°C pour éviter toute détérioration du ASBB.
- ↳ On concasse en dernier lieu le sédiment obtenu jusqu'à obtention d'une poudre fine d'ASBB qui est après coup stockée sous dessiccateur chimique (gel de silice) jusqu'à usage.

Le noir soudan B acétylé ainsi synthétisé est ensuite préparé en solution à 1% P/V, comme suit :

- ↳ On dissout 100 mg d'ASBB dans 3ml de Dioxane à température ambiante. La Dioxane sert non seulement à améliorer la dissolution de l'imprégnateur mais également à stabiliser les liaisons amides de l'ASBB ;
- ↳ On complète le volume à 10ml avec de l'éthylène glycol ;
- ↳ On filtre la solution sur papier Wattman n°2. La solution est stockée au frais ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) et est valide durant un (01) mois.

Les essais de migration effectués ont montré un large excès de colorant dans les puits de dépôt des échantillons (*Figure 28-A*), phénomène qui tends à masquer l'éventuelle présence de chylomicrons. Pour parer à cela, nous avons jugé utile de préparer, par la même méthode, une autre solution de ASBB à 0.5% qui a été intégrée à notre protocole final.

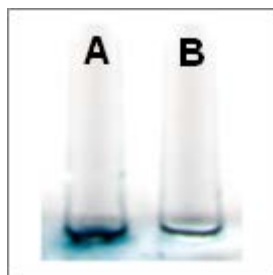


Figure 28. Photographie comparative des résidus de colorant dans deux puits de migration :

A. sérum imprégné au ASBB 1% B. sérum imprégné au ASBB 0.5%

Noter le grand excès de colorant dans le puit « A » après migration bien que le sérum utilisé (qui est le même dans les deux puits) soit normolipémiant et dépourvu de chylomicrons.

2.2.1.7. Préparation de l'épaississant de dépôt

L'usage d'un gel de dépôt, tel que préconisé par Frings et coll. [55] ainsi que Hall et coll. [56], est abandonné dans notre méthode car même s'il fournit à l'échantillon une certaine densité qui lui permet de rester dans le puit après ajout du tampon d'électrode, il masque bien souvent la présence d'éventuels chylomicrons. Ceci impose par contre l'usage d'un épaississant pour échantillon qui permet à ce dernier de rester en phase homogène au fond du puit même après ajout du tampon d'électrode.

Le glycérol est l'épaississant de choix lors des séparations électrophorétiques des protéines. Cependant, et s'agissant des lipoprotéines, le saccharose lui est préféré car le premier cité risque de dénaturer la structure du globule lipoprotéique étant lui-même le composant central des triglycérides.

Une solution aqueuse saturée en Saccharose est donc préparée et stockée au frais ($\approx 4^{\circ}\text{C}$).

2.2.2. Protocole finalisé

La mise en place du protocole s'étend sur deux jours consécutifs :

2.2.2.1. Premier jour

Tel que précédemment cité (cf. 2.2.1.2 *Préparation des solutions mères*), deux types de gels sont retenus dans le protocole optimisé :

- Un gel de concentration (*stacking gel*) à $T = 2.5 \%$ et $C = 4.76 \%$;
- Un gel de séparation (*resolving gel*) à $T = 3.15 \%$ et $C = 4.76 \%$.

Les solutions servant à la préparation des gels, à savoir les solutions mères, les solutions tampons, ainsi que les catalyseurs (PSA et TEMED) sont mises à température ambiante avant utilisation.

Une ligne horizontale est tracée au marqueur à 6 cm du bord inférieur de la plaque, et sert de repère limite pour le coulage du *resolving gel*. Le *stacking gel* sera coulé ultérieurement sur une épaisseur de 1 cm (*figure ci-dessous*).

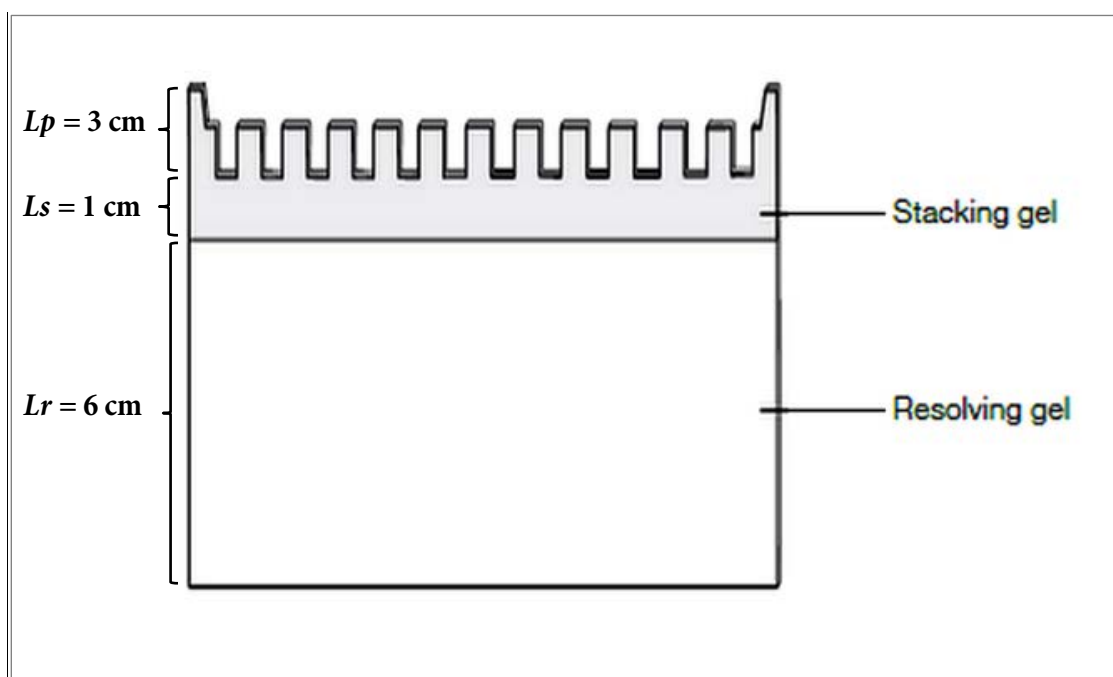


Figure 29. Épaisseur des gels à couler.

L_p = Longueur des puits ; L_s = Longueur du *stacking gel* ; L_r = longueur du *resolving gel*.

Notez bien que ces dimensions correspondent à des plaques de 10cm de hauteur (dont 7cm de parcours de migration) ; pour des plaques de plus grandes dimensions, le *resolving gel* occupera une plus grande hauteur et les migrations seront plus longues mais de meilleures résolutions seront attendues.

Après montage de la plaque dans le dispositif, les gels sont préparés suivant un ordre chronologique bien défini.

2.2.2.1.1. Préparation du gel de séparation à 3.15 %

Il représente le premier gel à couler (gel du fond). La préparation se fait comme suit :

- ↳ Dans une fiole de 10 ml, 2 ml de solution mère de polyacrylamide à $T = 16.666 \%$ et $C = 4.76 \%$ sont dilués avec 8 ml du tampon de gel séparation (pour sa préparation voir. 2.2.1.3.2 *Tampon Tris - Glycine / Tris - HCl*) ;
- ↳ La solution est dégazée en agitant énergiquement dans un Büchner relié à une pompe à vide, à raison de 2×10 minutes afin d'éliminer l'oxygène dissout pouvant inhiber le processus de gélification. Le dégazage est amélioré en chauffant dans un bain marie à 30°C , processus qui dévie l'équilibre tonométrique de l'oxygène vers la phase gazeuse ;
- ↳ 9 ml environs de la solution dégazée sont versées dans une fiole jaugée de 10 ml en évitant toute formation de bulle d'air afin d'y ajouter les volumes adéquats de catalyseurs, à savoir $400 \mu\text{l}$ de PSA et $150 \mu\text{l}$ de TEMED. Le volume est ensuite ajusté par la même solution dégazée ;
- ↳ Le mélange est versé délicatement dans un erlenmeyer de 25 ml (assez étroit pour limiter l'interface avec l'air) pour y effectuer une homogénéisation par une légère agitation ;
- ↳ A ce stade, la solution gélifiante est injectée immédiatement avant début de polymérisation dans les deux plaques jusqu'aux repères horizontaux, puis elle est recouverte avec une couche d'Isobutanol qui a pour but de non seulement protéger la solution en cours de polymérisation de l'oxygène atmosphérique, mais aussi d'éviter la formation de ménisques à l'interface « air – gel – verre ». La polymérisation s'effectue ensuite en étuve à 25°C ;
- ↳ Après la fin de la polymérisation (90 mn) et l'élimination de l'Isobutanol, un gel de concentration est directement préparé et coulé en haut du gel précédent.

2.2.2.1.2. Préparation du gel de concentration à 2.5 %

La préparation se fait de la même façon que décrite précédemment et en suivant les mêmes étapes sauf que pour ce gel :

- Une solution mère de polyacrylamide à $T = 13.440 \%$ et $C = 4.76 \%$ est diluée avec un tampon pour gel de concentration (pour sa préparation voir. 2.2.1.3.2 *Tampon Tris - Glycine / Tris - HCl*) ;
- Le dégazage se fait à raison de 4×10 minutes pour éliminer le maximum d'oxygène dissout inhibant la polymérisation (ce gel n'étant pas recouvert par l'Isobutanol, il est trop exposé à l'air) ;
- Des volumes de $500 \mu\text{l}$ de PSA et de $200 \mu\text{l}$ de TEMED sont ajoutés ;

- Vu le début accéléré de gélification qui est à 10 minutes, l'injection de la solution gélifiante se fait encore plus rapidement dans les 1 cm réservés à celle-ci ;
- Le peigne servant à former les puits est introduit juste après coulage du gel puis est retiré avant la fin de la polymérisation (environ 60 minutes au lieu de 80mn). Etant donné qu'il adhère au gel, il risque de déchirer celui-ci s'il est retiré ultérieurement ;
- Le processus de gélification se déroule dans une cloche à vide (*figure ci-dessous*) avec chauffage au bain marie à une température de 30 °C.



Figure 30. Photographie montrant le processus de polymérisation dans une cloche à vide.
La cloche est introduite telle qu'elle au bain marie durant le processus de polymérisation.

Après retrait délicat du peigne, la migration ne sera effectuée que le lendemain (cf. 2.2.2.2 *Deuxième jour*). Les gels doivent être conservés entre temps à température ambiante à l'abri de tout courant d'air et pour un délai maximal de 20 heures. Au-delà, le gel se dénature au niveau des jonctions des puits et devient inexploitable.

2.2.2.1.3. Préparation des échantillons (précoloration et épaissement)

- ↳ Les sérums récoltés sont stockés à environ 04°C et analysés dans un délai ne dépassant pas les sept jours. Ils sont remis à température ambiante en compagnie de la solution imprégnatrice et de la solution épaississante avant la suite de la procédure ;
- ↳ Les échantillons sont préparés suivant des proportions de « 4 volumes de sérum / 1 volume de colorant / 1 volume d'épaississant » : 20 µl de solution épaississante de saccharose (cf. 2.2.1.7 *Préparation de l'épaississant de dépôt*) sont ajoutés à 20 µl d'ASBB à 0.5 % (cf. 2.2.1.6 *Préparation du colorant*), le tout est additionné de 80 µl de sérum. Après mélange

au vortex et incubation à 37 °C pendant 30 minutes, les sérums précolorés sont laissés s'imprégner toute une nuit à température ambiante.

2.2.2.2. Deuxième jour

2.2.2.2.1. Injection des sérums

Au 2^{ème} jour, les sérums sont injectés dans les puits de la plaque à raison de 10 µl par puit comme le montre la figure ci-dessous.



Figure 31. Photographie de l'opération d'injection de sérums précolorés dans les puits de dépôt.

2.2.2.2.2. Lancement de la migration

Le dispositif fixant la plaque est trempé dans la cuve de migration électrophorétique préalablement remplie avec le tampon d'électrode (cf. 2.2.1.3.2 *Tampon Tris - Glycine / Tris - HCl*). La migration électrophorétique a lieu à température ambiante ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) sous une tension constante de 40 V, et est achevée quand le front de migration défini par les HDL arrive à 01 cm du bord inférieur de la plaque. Elle dure 08 heures environs.

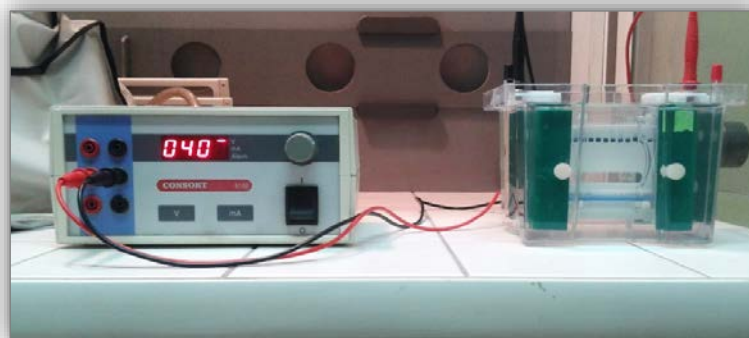


Figure 32. Photographie du processus de mise sous tension de la migration électrophorétique.

2.2.2.3. Scan des plaques et analyse densitométrique

A la fin de la migration, le générateur est mis hors tension et la plaque est délicatement retirée puis séchée de l'excès de tampon d'électrode.

A défaut d'un densitomètre adéquat, les plaques sont analysées informatiquement à l'aide du logiciel « Mesurim Pro » après avoir été scannées (par un scanner de bureau). Certains paramètres devront par contre être fixés afin d'assurer une certaine reproductibilité des scans et des intégrations graphiques consécutives :

- ↳ Un jumelage du logiciel et du scanner devront être effectués, avec la mise en commun de la résolution des scans qui définit ainsi l'échelle qui devra être conservée pour toutes les analyses (150 dpi pour notre cas) ;
- ↳ Le 100% blanc est effectué une seule fois à l'aide du logiciel, en délimitant une zone du gel ou l'échantillon n'a pas traversé (entre les parcours de migration) ;
- ↳ La lecture densitométrique est effectuée sur une largeur de 20 pixels afin de tamponner les variations pouvant avoir lieu sur la largeur d'une même bande. Elle est initiée au-dessus des puits à une distance de 5 mm de leur fond, afin d'englober un quelconque dépôt épais.

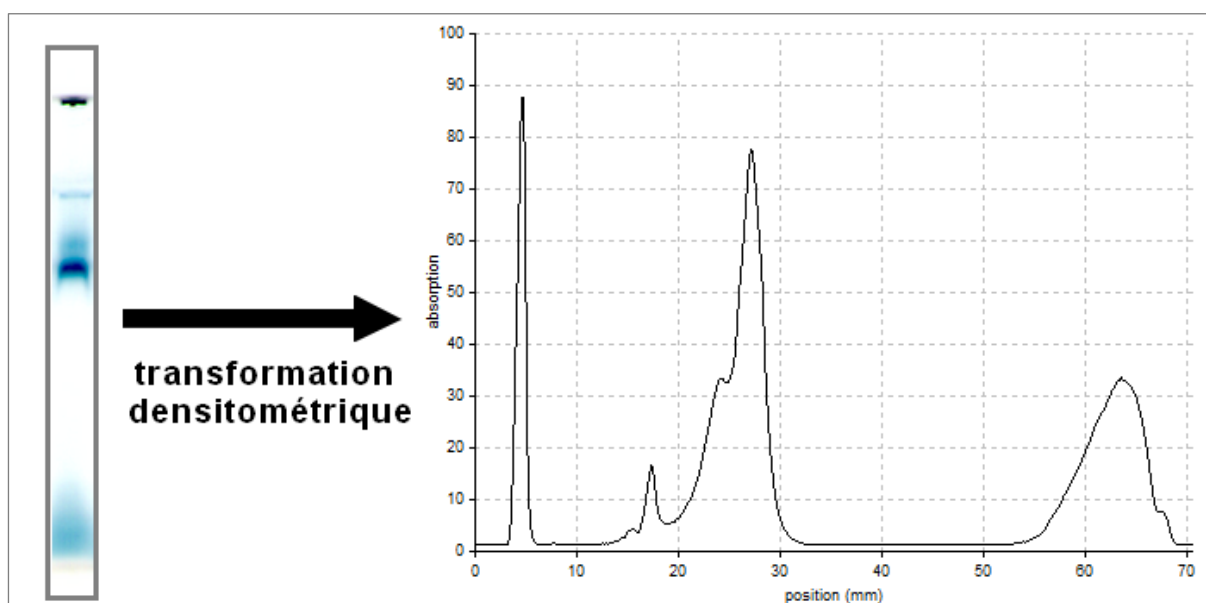


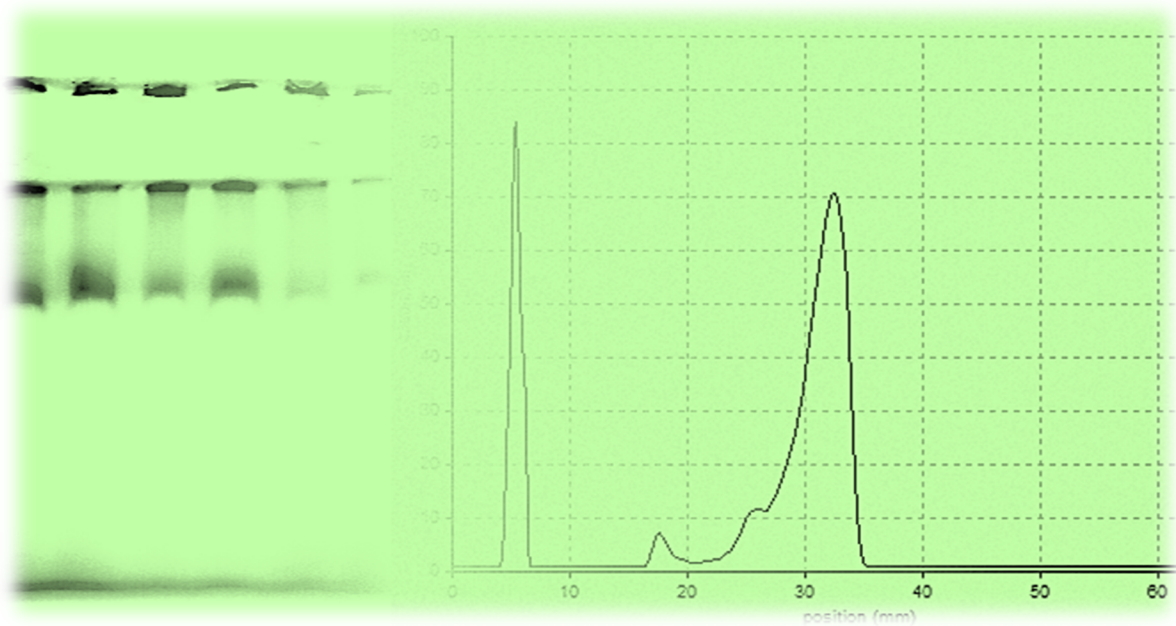
Figure 33. Exemple d'une lecture densitométrique à l'aide de Mesurim Pro.

DEUXIÈME PARTIE :

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE IV^{ème} :

Résultats et discussion



La population de l'étude, telle que citée précédemment, est constituée de tout individu adulte consultant auprès du laboratoire d'analyses médicales pour un bilan lipidique dont le résultat démontre une hyperlipidémie conformément aux valeurs seuils du laboratoire (**triglycéridémie $\geq 1.6g/L$ et/ou cholestérolémie $\geq 2.2g/L$**) et ce durant une période de six (06) semaines d'affilée.

1. RESULTATS DES BILANS LIPIDIQUES DE BASE

Quatre-vingts douze (92) sérums issus de patients adultes sont ainsi constatés comme hyperlipidémiques et sont conservés en vue d'une séparation électrophorétique des lipoprotéines sériques suivant le protocole mis en place au laboratoire (cf. 2.2.1.8 *Protocole finalisé*). Les données complètes concernant leurs bilans lipidiques de base (triglycéridémie, cholestérolémie totale, cholestérolémie liée aux HDL et cholestérolémie liée aux LDL) sont mentionnées en *Annexe V*.

1.1. Sex-Ratio de la population de l'étude

La répartition de la population de l'étude selon le sexe fait retrouver un ratio de 61%/39% en faveur des femmes (56 femmes contre 36 hommes). Cela ne pouvant être extrapolé vers une tendance féminine à l'hyperlipidémie dans la région, car selon une ancienne étude faite au même laboratoire en 2015 sur le thème des dysthyroïdies dans la région, 1208 consultations de sexe féminin ont été rapportées contre seulement 180 masculines (pointant du doigt la tendance des femmes à aller consulter plus que les hommes).

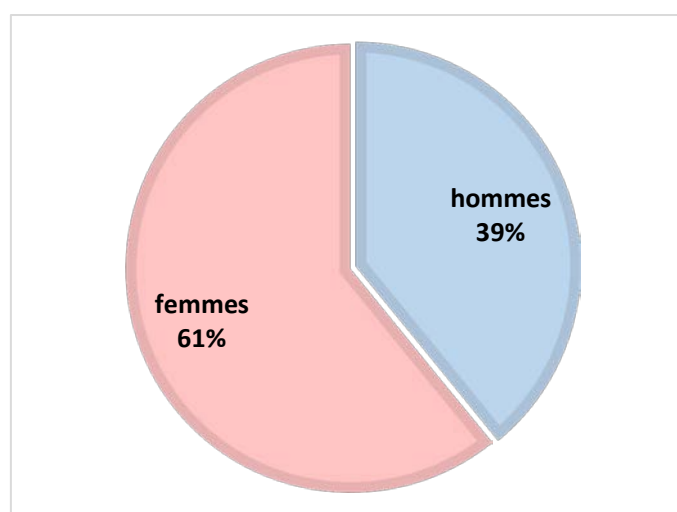


Figure 34. Sex-ratio de la population de l'étude.

1.2. Répartition des hyperlipidémies dans la population de l'étude

1.2.1. Les hypertriglycéridémies

Selon les directives du *National Cholesterol Education Program* (NCEP) américain [36], les hypertriglycéridémies sont classées en trois catégories en fonction des risques associés croissants sur la santé du patient :

- *Risque limite* : lorsque la triglycéridémie est en limite haute
 $1.5 \text{ g/l} \leq \text{Triglycéridémie} < 2.0 \text{ g/l}$;
- *Risque élevé* : lorsque la triglycéridémie est élevée
 $2.0 \text{ g/l} < \text{Triglycéridémie} < 5.0 \text{ g/l}$;
- *Risque très élevé* : lors d'hypertriglycéridémies franches
 $5.0 \text{ g/l} \leq \text{Triglycéridémie}$.

Ces directives ont ainsi permis de répartir la population de l'étude en classes (*histogramme ci-dessous*) et d'étudier par la suite leurs profils électrophorétiques, obtenus suivant notre protocole.

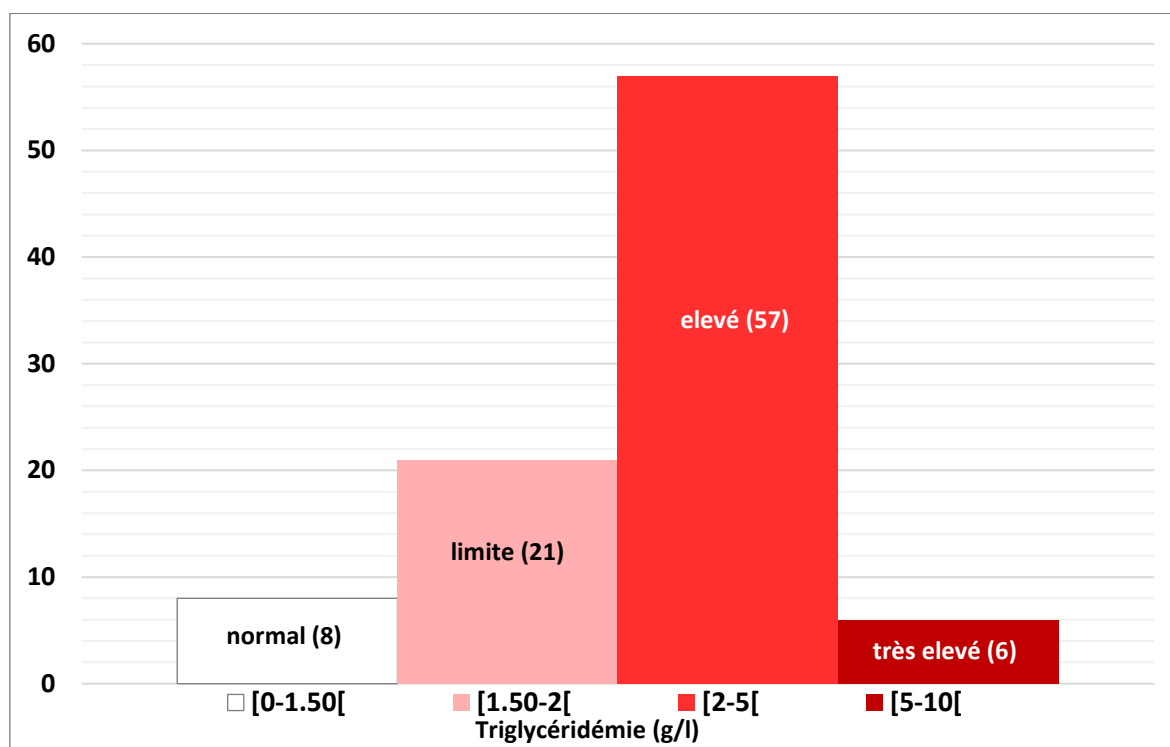


Figure 35. Histogramme représentant la distribution de la population d'étude selon les taux de triglycéridémie.

1.2.2. Les hypercholestérolémies

Selon les mêmes directives [36], les hypercholestérolémies sont classées en deux catégories en fonction des risques associés croissants sur la santé du patient, cardiovasculaires en particulier :

- *Risque limite* : lorsque la cholestérolémie est en limite haute

$$2 \text{ g/l} \leq \text{Cholestérolémie} < 2.4 \text{ g/l} ;$$

- *Risque élevé* : lorsque la cholestérolémie est élevée

$$2.4 \text{ g/l} \leq \text{Cholestérolémie} .$$

Ces directives ont également permis de répartir la population de l'étude en classes (*histogramme ci-dessous*) et d'étudier par la suite leurs profils électrophorétiques, obtenus suivant notre protocole.

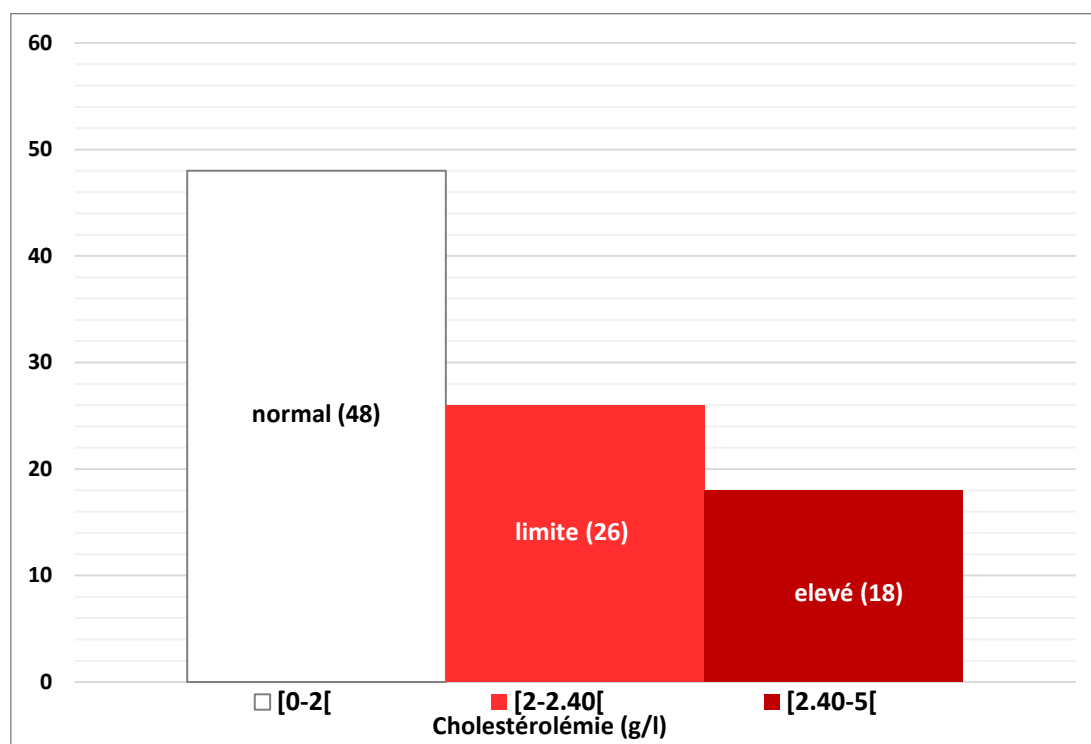


Figure 36. Histogramme représentant la distribution de la population d'étude selon les taux de cholestérolémie.

2. RESULTATS DES LIPOPROTEINOGRAMMES

Une migration électrophorétique a été réalisée pour chacun des 92 sérums récoltés. Cependant, dans les résultats qui vont suivre, nous n'aurons sélectionné que les profils les plus explicites qui puissent motiver l'usage du lipoprotéinogramme dans le bilan lipidique.

Il est à rappeler également, afin d'éviter toute discordance dans les interprétations qui suivent, que les points de départ des scans densitométriques se trouvent à 5mm en amont du fond du puit, et ce dans le but d'englober tout dépôt de colorant ou de chylomicrons lors de l'analyse. Ainsi donc:

$$\text{coordonnée de l'interprétation de la bande (mm)} = \text{coordonnée du scan (mm)} - 5\text{mm.}$$

2.1. Etude de profils normaux

Premièrement, nous avons jugé utile d'analyser, en faisant appel à notre protocole, des témoins « normaux » afin de confirmer ce qu'a rapporté la littérature en terme de distribution des différentes fractions lipoprotéiques, et de créer ensuite une référence sur la base de laquelle les échantillons pathologiques sont interprétés.

Les témoins normaux en question sont issus de pools de sérums normolipémiques (c'est-à-dire $0.5 \text{ g/l} < \text{triglycéridémie} < 1.6 \text{ g/l}$ et $1.5\text{g/l} < \text{cholestérolémie} < 2.2 \text{ g/l}$) récoltés sur des personnes sans antécédents médicaux connus (personnes saines). Deux exemples sont illustrés dans les figures ci-après (*Figure 37* et *Figure 38*).

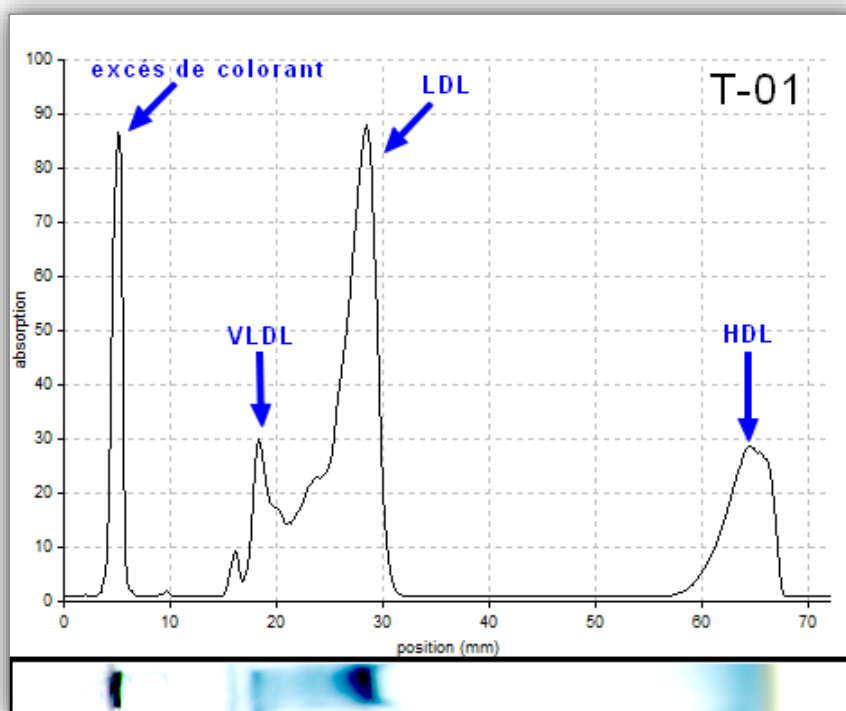


Figure 37. Lipoprotéinogramme du pool-témoin 01.

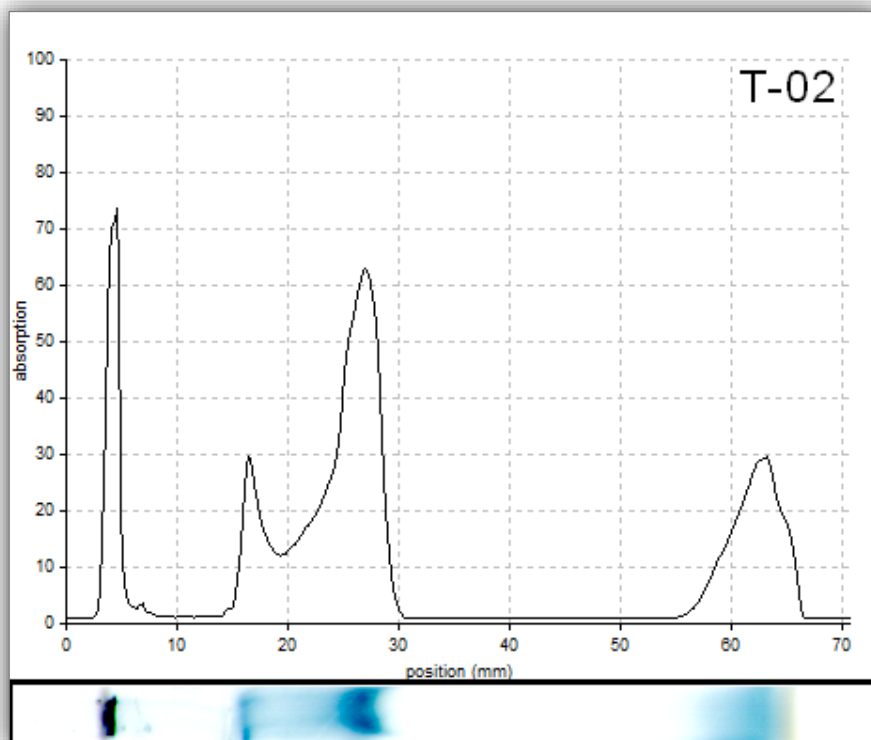


Figure 38. Lipoprotéinogramme du pool-témoin 02.

Le premier constat fait est la distribution logiquement attendue des fractions lipoprotéiques. Ces dernières se présentent de la façon suivante allant du puit de dépôt au bord final :

- ↪ Un léger excès de colorant au dépôt représenté par un pic unique à base étroite ne dépassant pas les 03mm de largeur. Ainsi donc, et contrairement aux systèmes comportant un gel de dépôt, la présence éventuelle de chylomicrons pourra être visualisée par un élargissement de la base du pic ;
- ↪ Une bande fine à l'interface des deux gels (à 10mm environs) qui passe le *stacking gel* puis est retenue par le *resolving gel*. Elle est représentée par la fraction VLDL qui a une absorption voisine de 30% mais peut-être d'intensité variable chez les personnes normales, bien que n'atteignant pas le seuil d'intensité normal des LDL ;
- ↪ Une bande dont le pic densitométrique est d'une largeur de 6mm à la base environs (mais qui peut s'étaler selon les sous-fractions présentes), et qui pénètre dans le gel de séparation se retrouvant entre 20 et 25mm généralement. Elle est représentée par la fraction LDL.
- ↪ Une bande en front de migration, qui peut se présenter sous différents aspects : de fine à très élargie (15mm de largeur s'étendant de 50mm à 65mm), et de claire à sombre (20% à 70% d'absorption). Elle est représentée par la fraction HDL, fraction hétérogène en soi (composée de sous-fractions HDL₁, HDL₂, et HDL₃) chose qui expliquerait cette variabilité d'aspect chez les profils normaux analysés.

L'absence de standards lipoprotéiques nous a mené à isoler les fraction HDL de sérums témoins « X » et « Y » par précipitation des autres fractions (pour la technique voir. *CHAPITRE III - 2.1.3 Dosage du cholestérol-HDL*) et les faire migrer aux cotés des sérums totaux dans le but de confectionner des témoins HDL propre au laboratoire (*figure ci-dessous*).

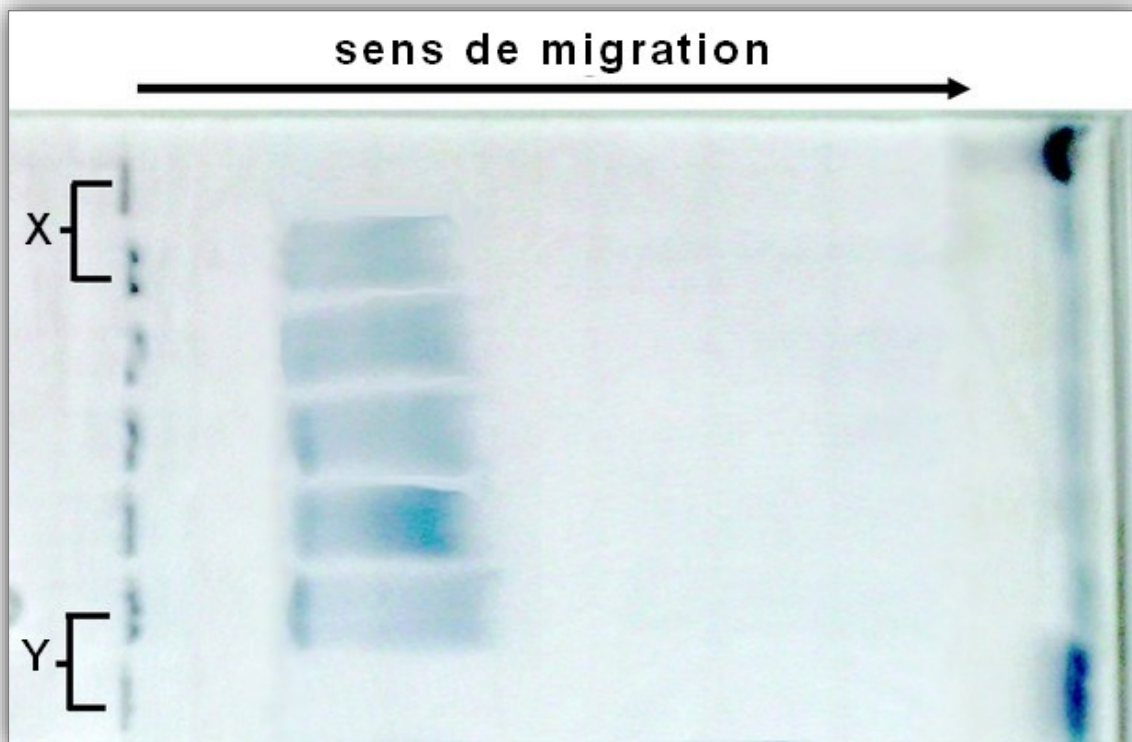


Figure 39. Lipoprotéinogramme avec usage de témoins HDL.

Mis à part la confirmation par les témoins préparés du positionnement des fractions HDL en front de migration, l'autre constat fait est la relativité d'imprégnation des différentes fractions d'un même sérum : les fractions HDL des sérums totaux « X » et « Y » ont une coloration beaucoup plus faible que celle enregistrée par leur fractions HDL isolées quand bien même la précoloration soit faite avec des proportions similaires d'ASBB. Ceci ne peut être expliqué que par le fait que, contrairement aux méthodes de colorations post-séparation électrophorétique où une même et pareille teneur de colorant atteint chaque fraction (la coloration se fait à saturation), la précoloration se présente avec un volume initial d'imprégnateur (20µl dans notre cas) qui se partage en d'inégales proportions suivant l'importance de chaque fraction : cela constitue donc un élément capital à prendre en compte dans l'interprétation des résultats lors d'élévations franches de certaines fractions.

2.2. Etude des hypertriglycériémies

Sur les 84 cas d'hypertriglycériémies observés, 06 cas d'hypertriglycériémies franches avec un risque très élevé sur la santé (classement *NCEP*) ont été observés :

- 03 cas d'hypertriglycériémies franches pures (*Figure 40*), à savoir les patients « 05 », « 69 » et « 73 » : le patient « 05 » présente un diabète de type 2 équilibré, le patient « 69 » une maladie de Crohn, et le « 73 » une hypertension artérielle maîtrisée.
- 03 cas d'hypertriglycériémies franches avec élévation concomitante de la cholestérolémie (*Figure 41*), à savoir les patients « 62 », « 76 » et « 92 » : le patient « 62 » présente un diabète de type 2 non traité et le « 76 » une surcharge pondérale.

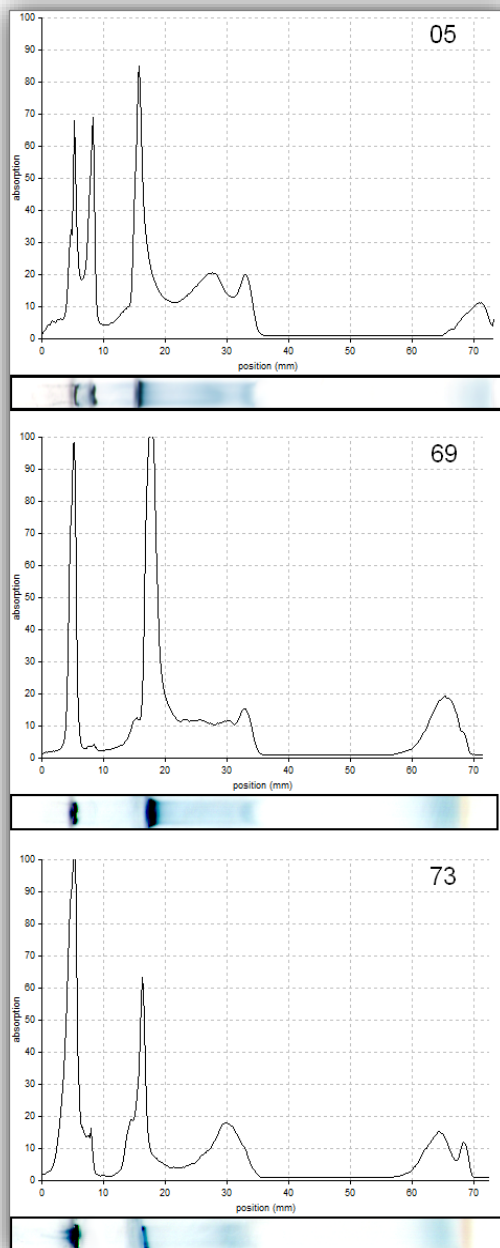


Figure 40. Profils électrophorétiques des hypertriglycériémies franches pures.

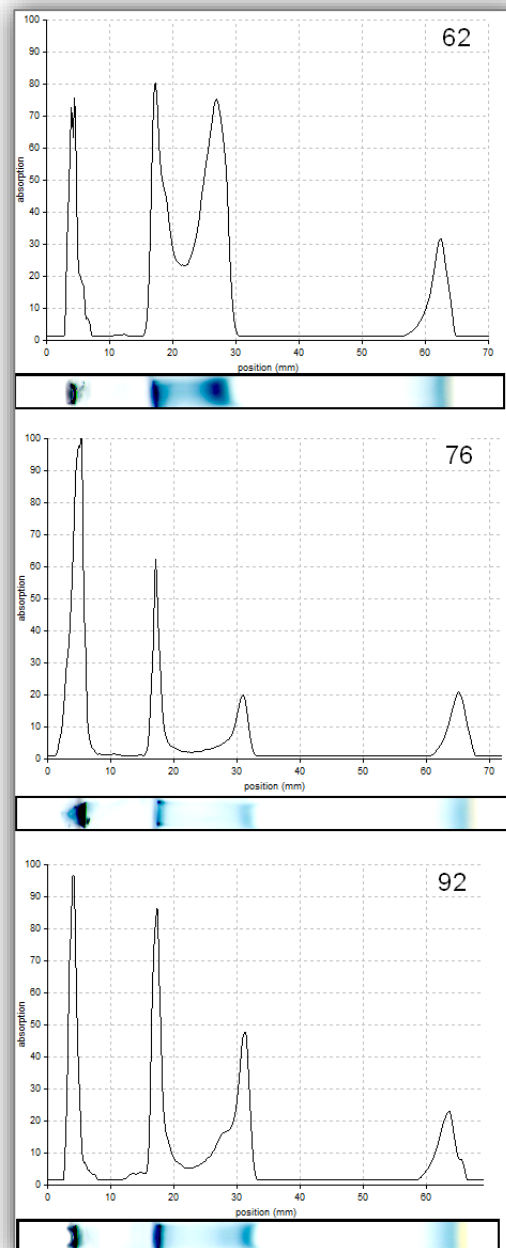


Figure 41. Profils électrophorétiques des hypertriglycériémies franches mixtes.

Le premier constat fait est l'élargissement de la bande de départ et du pic correspondant au de-là des 03mm enregistrées lors d'un dépôt de colorant, témoignant de la présence de chylomicrons (patients 62, 73 et 76 notamment). Aussi, un dédoublement de la bande de départ est présent au profil « 05 » : la grande variabilité de la taille des chylomicrons (de 75nm à 1µm) laisse à croire que, tel que rapporté par certains ouvrages, les particules les plus petites peuvent pénétrer légèrement dans le gel de concentration à 2.5%.

Une attention particulière doit cependant être portée à deux comparaisons d'échantillons :

- Premièrement, en comparant les échantillons « 62 » et « 76 » qui, malgré les résultats quasi-identiques de leurs bilans lipidiques de base constituant les seuls bilans lipidiques sur lesquels les cliniciens ont tendance à se baser, affichent cependant des profils électrophorétiques diamétralement opposés : chylomicronémie avec élévation modérée des VLDL d'un côté pour le patient « 76 » laissant croire à un type V de Fredrickson (plus ou moins maîtrisable avec un régime hypolipidique et hypoglycémique), et hyper pré β - et β - lipoprotéïnémie de l'autre (élévation des VLDL et LDL) faisant suspecter un type IIIb de Fredrickson sur lequel s'est greffé une hyper VLDL-émie majeure due à la déviation hépatique de l'excès de glucose, cela concernant le patient « 62 » (tare génétique qui requiert dans tous les cas un traitement).
- Deuxièmement, en comparant les échantillons « 69 » et « 73 » qui présentent eux aussi des chiffres lipidiques analogues tandis que leurs profils restent différents : une hyperglycémie endogène pour le premier, véhiculée par l'excès de VLDL (nettement visible à l'interface des deux gels) et une hyperglycémie exogène pour le second, véhiculée quant à elle par la présence de chylomicrons au dépôt. Les approches thérapeutiques devant être, bien évidemment, toutes aussi différentes.

Outre les 06 cas cités précédemment, 78 cas d'hypertriglycémies, englobant ceux à risque élevé et ceux à risque « limite » sur la santé du patient, ont été répertoriés. Certaines comparaisons de sérums présentant des taux semblables de lipides s'avèrent également intéressantes :

- 03 échantillons, à savoir les « 29 », « 90 » et « 98 » présentent des hypertriglycémies mixtes à risque élevé dont les chiffres lipidiques restent très voisins. La Figure 42 illustre leurs profils électrophorétiques respectifs.
- 02 échantillons, à savoir les « 57 » et « 59 » présentent à leur tour également des hypertriglycémies mixtes dont les chiffres lipidiques restent comparables. La Figure 43 illustre leurs profils électrophorétiques respectifs.

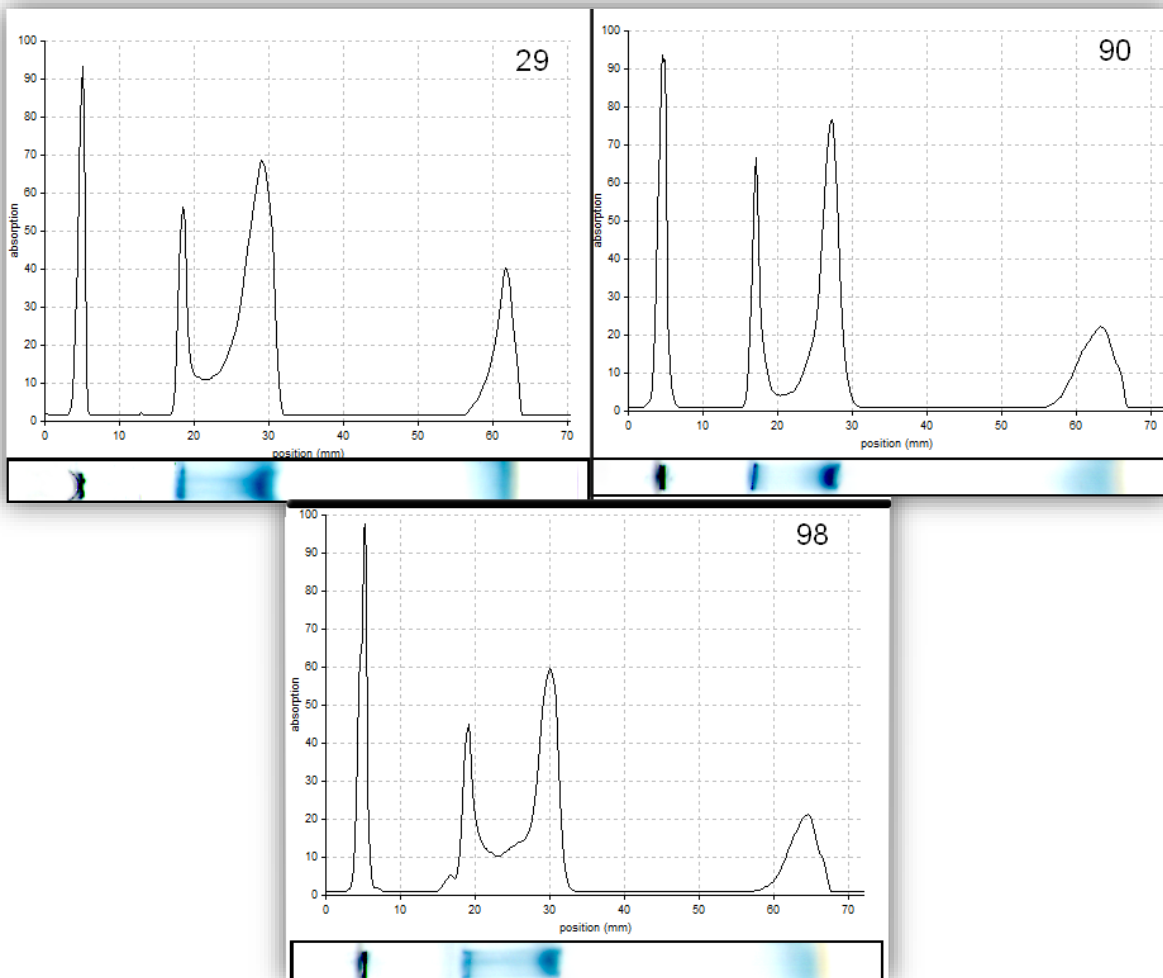


Figure 42. Profils électrophorétiques des échantillons « 29 », « 90 » et « 98 ».

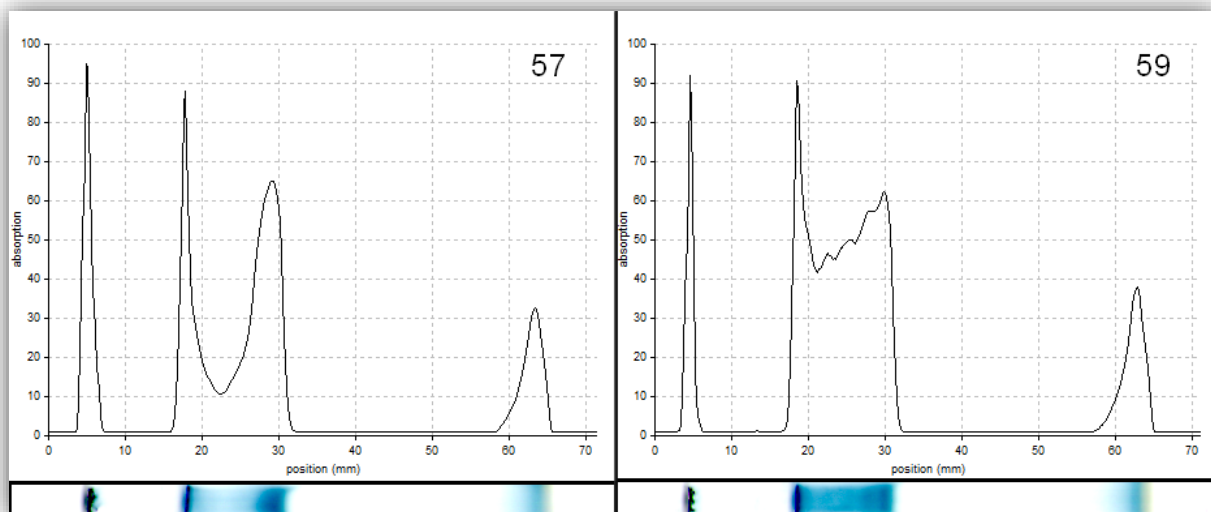


Figure 43. Profils électrophorétiques des échantillons « 57 » et « 59 ».

La Figure 42 montre parfaitement la variabilité pouvant occurrer sur la disposition des pré β -lipoprotéines et des β -lipoprotéines : bien que les sous-fractions ne soient pas parfaitement résolues, un étalement est clairement visible sur les profils « 29 » et « 98 » apanage de la présence d'une multitude de sous-fractions de lipoprotéines de densités faibles, à l'inverse de l'échantillon « 90 » qui présente des pics étroits sur les bandes de VLDL et de LDL témoins d'une homogénéité de composition des classes. Le risque cardiovasculaire étant lié d'avantage aux sous-fractions denses telle la Lp (a) qui, selon la littérature, se placent en position intermédiaire entre les VLDL et les LDL, il serait judicieux d'affirmer qu'un bilan lipidique de base ne pourrait faire la part des choses sur les risques qui ne restent décelables que par lipoprotéinogramme.

Le même constat est fait concernant la Figure 43 où l'échantillon « 59 » présente une « *Broad-Band* » reflétant clairement une hyperlipoprotéïnémie type III, contrairement à l'échantillon « 57 » qui laisse croire en un type V avec présence simultanée de chylomicrons au dépôt et une augmentation des VLDL, et ce bien qu'ayant des valeurs lipémiques voisines.

En dernier lieu, un cas intéressant qui puisse étayer notre hypothèse de la distribution relative de l'imprégnateur (*page 72*) est présenté dans la figure ci-dessous : les valeurs de cholestérolémie totale sont très voisines pour les échantillons « 52 » et « 76 », avec une élévation concomitante de la triglycéridémie de l'ordre de 4 g/l pour le patient « 52 » et du double pour le patient « 76 » (8 g/l). Force est de constater que les fractions à basses densités, hors chylomicrons, de l'échantillon « 76 » paraissent fortement diminuées et que les fractions HDL des deux échantillons paraissent analogues. Or qu'en se penchant sur les taux de cholestérol-HDL des deux échantillons, on constate aisément l'écart important (0.88 g/l pour le « 76 » et 0.33 g/l pour le « 52 »). Ce constat peut être expliqué par la spoliation de l'ASBB par les chylomicrons de l'échantillon « 76 » et vient ainsi étayer l'hypothèse précédente.

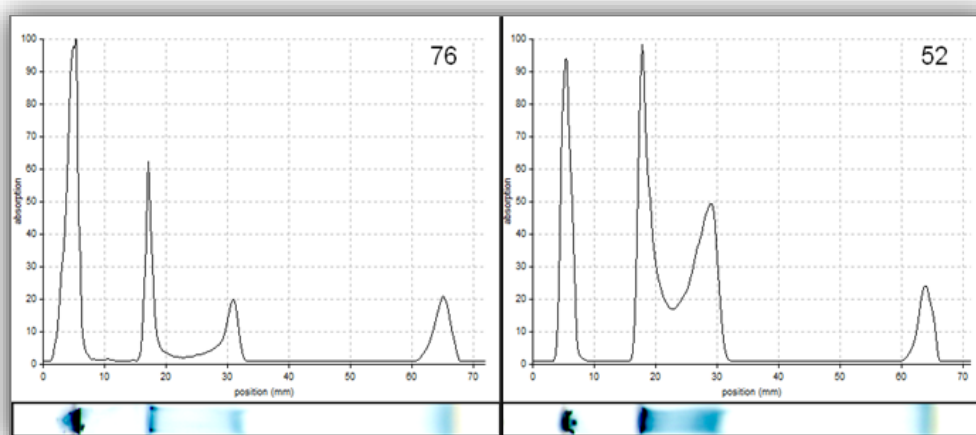


Figure 44. Profils électrophorétiques des échantillons « 52 » et « 76 ».

2.3. Etude des hypercholestérolémies

44 cas d'hypercholestérolémie ont été observés dont :

- 18 cas d'hypercholestérolémie avec un risque élevé sur la santé.
- 26 cas d'hypercholestérolémie avec un niveau de risque « limite ».

Suivant la même démarche d'analyse et de discussion des résultats, on s'intéresse à la comparaison de certains profils électrophorétiques hypercholestérolémiques qui, bien que présentant des valeurs rapprochées en termes de taux de lipides sériques, montrent toutefois des discordances dans leurs profils électrophorétiques. Il s'agit cette fois de comparer :

- Les échantillons « 26 », « 78 » et « 96 », le premier cité est issu d'un patient souffrant d'HTA et suivi pour épilepsie (sous Carbamazépine) (*Figure 45*) ;
- Les échantillons « 18 » et « 91 » (*Figure 46*).

Sur la *Figure 45*, l'attention est portée sur la fraction de lipoprotéines de haute densité en front de migration : les échantillons « 78 » et « 96 » présentent une fraction étalée sur une longueur de 10mm environs, contrairement à l'échantillon « 26 » qui présente quant à lui une concentration de la coloration atteignant 60% d'absorption à 57mm du puit. Ceci s'explique par le sous-fractionnement élevé des HDL chez les patients « 78 » et « 96 » dont probablement la sous-fraction HDL₂ qui reste le facteur vasculoprotecteur par excellence. Un tel état de fait ne peut être démontré avec un simple bilan lipidique comportant le dosage du cholestérol-HDL et n'est constaté qu'après fractionnement des lipoprotéines sériques.

Concernant les profils d'échantillons sur la *Figure 46*, les valeurs de leurs bilans lipidiques de base sont quasiment identiques avec une hypercholestérolémie limite, cependant ils montrent eux aussi des lipoprotéinogrammes différents :

- Premièrement, le profil « 18 » montre un pic de LDL franc avec diminution concomitante des VLDL, à l'opposé du profil « 91 » qui présente un profil relativement normal. Le risque athérogène, véhiculé par les LDL, n'est par ce fait plus équivalent pour les deux patients.
- Deuxièmement, un étalement de la bande des HDL du profil « 91 » est constaté sur une longueur de 10mm, à l'opposé du profil « 18 ». Ceci démontre une fois de plus la présence d'une multitude de sous fractions d'HDL chez certains patients et non chez d'autres.

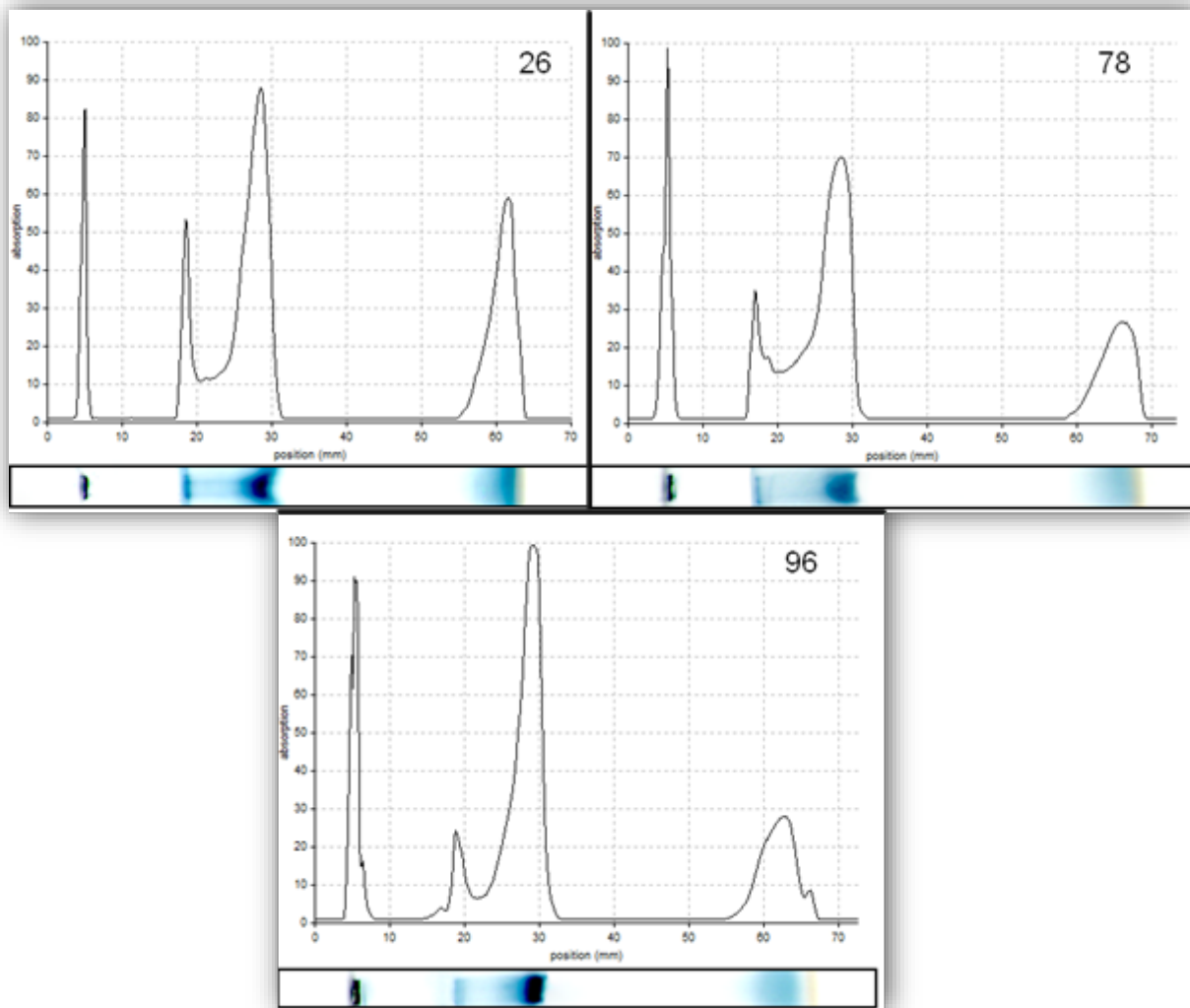


Figure 45. Profils électrophorétiques des échantillons « 26 », « 78 » et « 96 ».

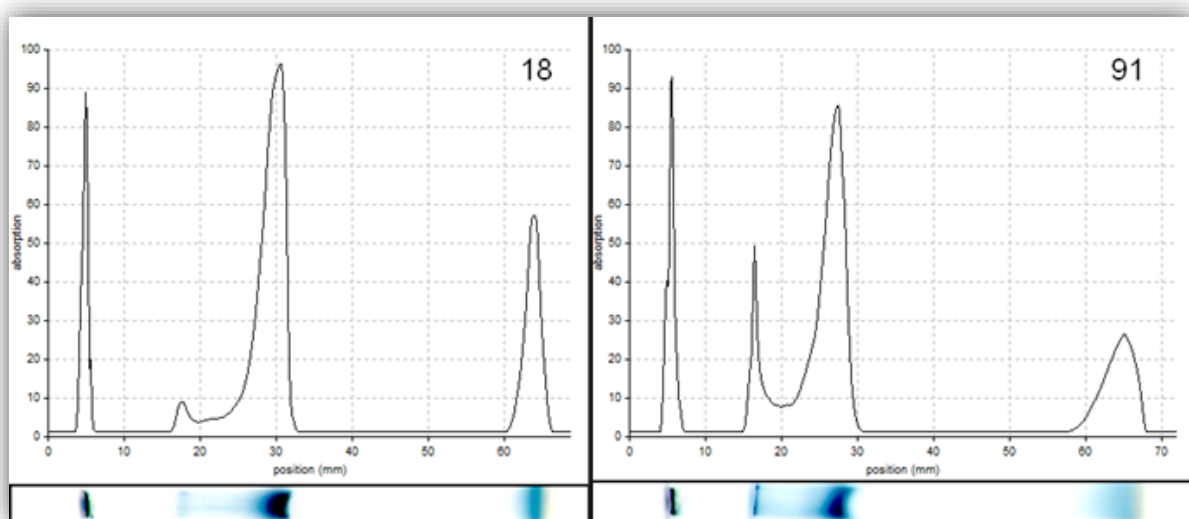


Figure 46. Profils électrophorétiques des échantillons « 18 » et « 91 ».

2.4. Etude de profils perturbés

2.4.1. Profils normolipémiques de personnes diabétiques

Bien que ne faisant pas partie de la population de l'étude, nous avons tout de même analysé des sérums normolipémiques issus de personnes diabétiques, le but étant de sonder l'impact général des traitements antidiabétiques sur la distribution des fractions lipoprotéiques, et d'étayer par ce fait l'intérêt de notre technique.

Ainsi donc, les profils « 81 » et « 86 » (*Figure 47*) sont des tracés issus de l'analyse d'échantillons sériques de personnes souffrant de diabète de type 2 équilibré par des antidiabétiques oraux exclusivement, tandis que les profils « 80 » et « 82 » (*Figure 48*) sont ceux de patients souffrant de diabète de type 2 traités par antidiabétiques oraux et Insuline.

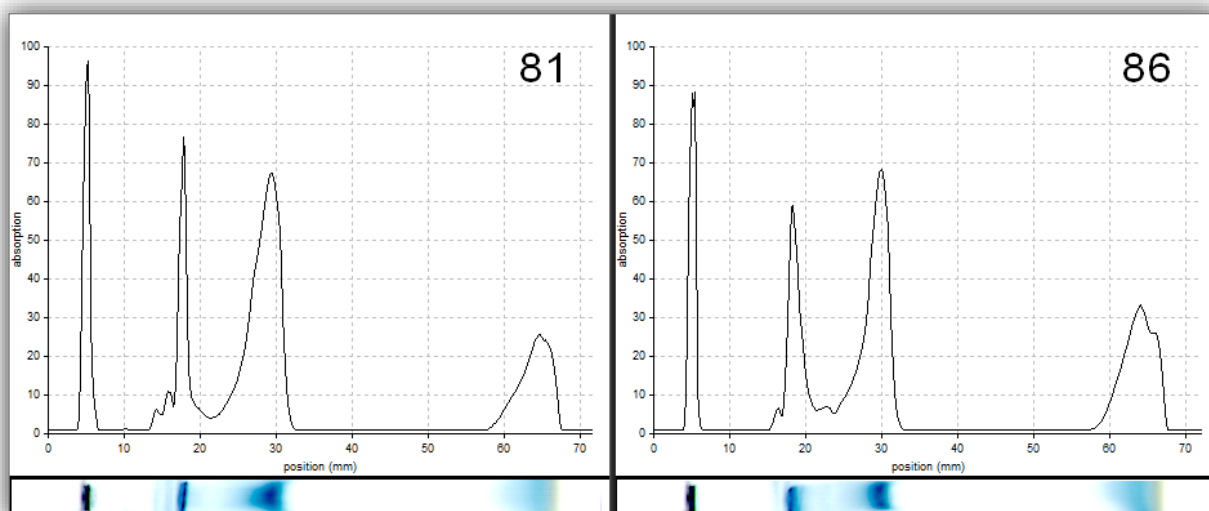


Figure 47. Profils électrophorétiques de patients normolipémiques sous antidiabétiques oraux.

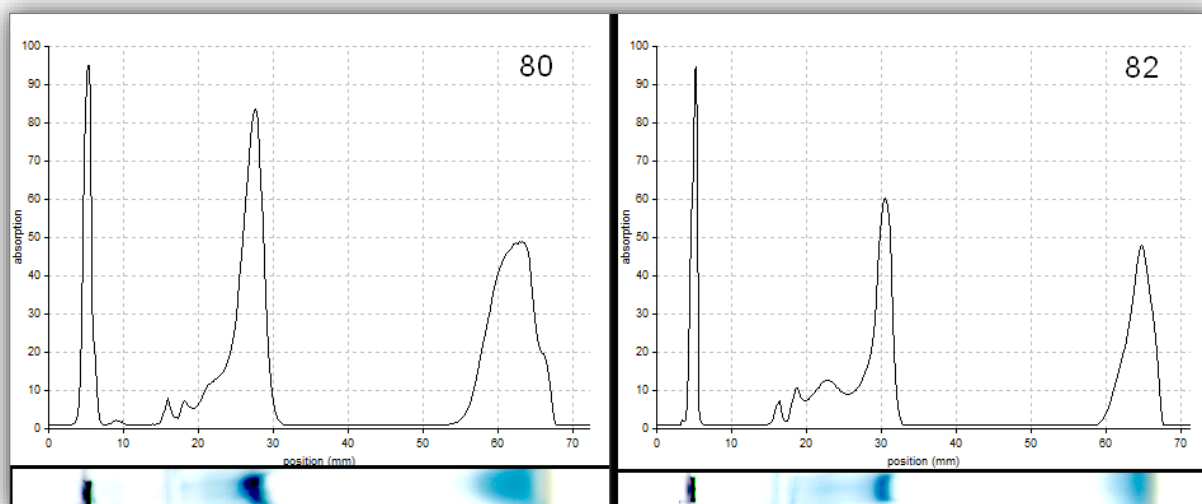


Figure 48. Profils électrophorétiques de patients normolipémiques sous antidiabétiques oraux et insuline.

Force est de constater l'élévation des VLDL chez les patients sous antidiabétiques oraux tandis que les patients traités par ADO et insuline, bien qu'ayant des valeurs lipidiques proches des patients précédents (TG, CT et HDL-C), présentent tout de même une fraction VLDL beaucoup plus basse, ceci pouvant être expliqué par l'action double de l'insuline sur les taux de VLDL : elle inhibe non seulement leur production hépatique mais accélère également leur métabolisme.

L'interprétation des résultats précédents démontre ainsi un autre intérêt du lipoprotéinogramme qui permet de mettre en évidence les anomalies de répartition des fractions lipoprotéiques même avec des taux lipidiques sanguins normaux et comparables de cholestérol et de triglycérides.

2.4.2. Profils présentant des fractions supplémentaires

Quelques profils d'échantillons analysés ont montré un pic supplémentaire se plaçant le plus souvent entre les VLDL et les LDL (*Figure 49*). Il nous est impossible, en l'absence de fractions-témoins, de conclure quant à leur nature bien que la littérature [16] les désigne comme Lp (a).

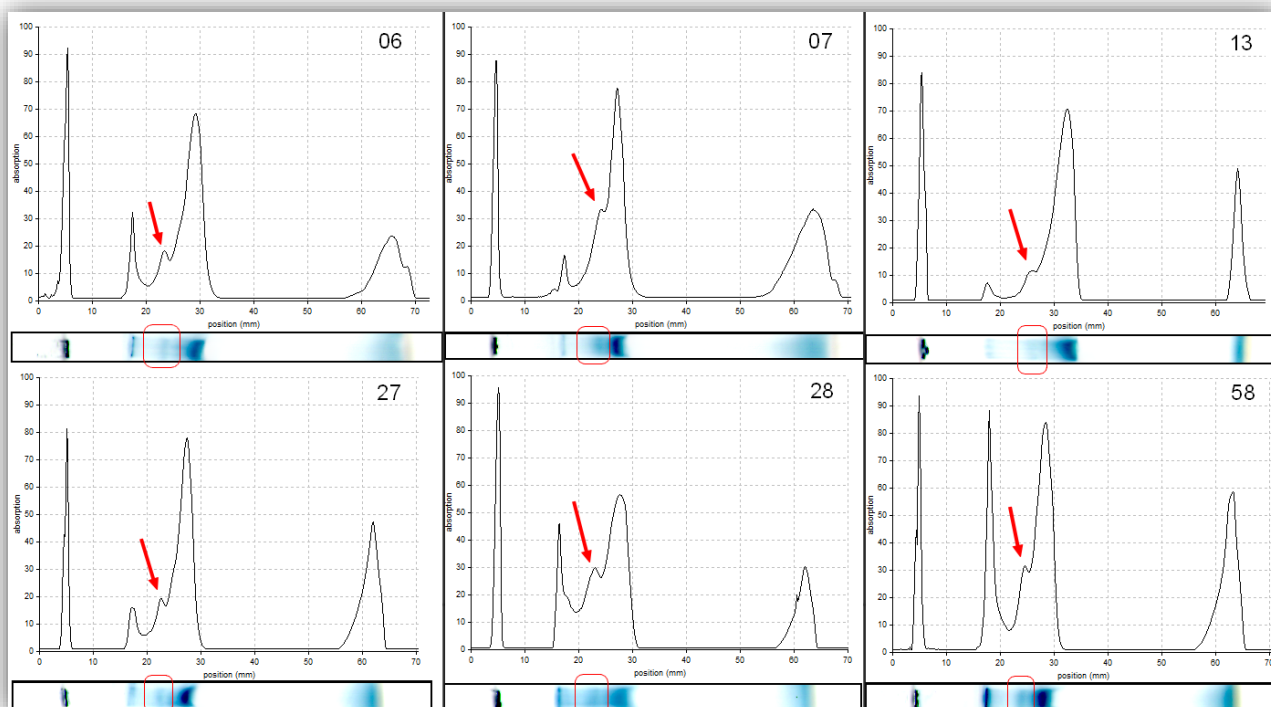


Figure 49. Profils électrophorétiques présentant des bandes supplémentaires.
Les fractions supplémentaires sont indiquées en rouge.

2.5. Limites de la technique

Bien que la technique séparative des lipoprotéines mise au point soit assez résolutive pour pouvoir distinguer les grandes fractions lipoprotéiques (chylomicrons, VLDL, LDL et HDL), et qu'elle soit basée sur des principes physiques fondés et simples (reproductibilité des gels par la maîtrise des conditions opératoires, séparation des fractions par mise à profit des limites d'exclusion de leurs tailles), elle comporte tout de même certaines limites qui ne sont que d'ordre technique et qui restent aisément franchissables par la mise à disposition de matériel adéquat :

- Incapacité de la technique en question à réaliser un sous-fractionnement des classes lipoprotéiques, qui puisse montrer les différentes sous-classes de LDL et de HDL notamment, ceci à défaut de la disponibilité d'un formeur de gels en gradient ;
- Indisponibilité de témoins lipoprotéiques de migration, en particulier les témoins de sous- fractions qui permettraient de concevoir une idée des sous-fractions confondues dans les trainées de LDL et de HDL observées.
- Usage d'un logiciel informatique qui, bien que développé par des professionnels du domaine biologique et bien que nous ayons standardisé toutes les étapes relayant la plaque après migration jusqu'au rendu graphique final, ne puisse remplacer un densitomètre qualifié tant en sensibilité qu'en spécificité des résultats obtenus a une longueur d'onde propre à l'imprégnateur (ASBB) ;
- Usage d'une cuve de migration standard qui ne permette pas de contrôler la température de migration, ce qui influe négativement sur l'aspect des bandes lors de l'élévation de la température de la pièce ou celle de la cuve durant la migration (formation d'arcs par un effet Joule accentué). Une cuve de migration thermostatée et réglée à 15°C contribuerait grandement à la qualité du rendu final.

CONCLUSION



CONCLUSION

Le lipoprotéinogramme constituait encore, il y a de cela quelques années, un des paramètres du bilan de base dans l'exploration des anomalies lipidiques (EAL). De nos jours, il est relégué au second plan par les praticiens de la santé sous prétexte que les informations qu'il puisse apporter sont jugées peu poignantes dans la prise de décisions cliniques concernant les patients dyslipidémiques.

L'étude que nous avons menée a abouti à la mise en place et l'optimisation d'un protocole complet pour la mise en œuvre d'une séparation électrophorétique des lipoprotéines plasmatiques sur un support à haute résolution : le polyacrylamide. Ledit support se présente en gradient discontinu de gels de polyacrylamide préparés au laboratoire et polymérisés *in situ*.

A la suite de la phase d'optimisation, une étape ayant pour but l'évaluation de l'intérêt de la méthode a été conçue par mise à profit de sérums hyperlipémiques issus du laboratoire d'analyses médicales du D^r Khelil, à Larbaâ Nath Irathen. Cette seconde étape a abouti à des constatations sans équivoque concernant l'intérêt du lipoprotéinogramme : une distinction entre les différents types d'hyperlipoprotéinémies primaires décrites par Fredrickson et coll. ainsi que celles secondaires à d'autres pathologies est primordiale dans la décision thérapeutique à entreprendre vis-à-vis de chaque entité pathogénique. Pis encore, le risque cardiovasculaire que véhiculent les lipoprotéines de basses densités ne peut être véritablement évalué qu'en estimant le sous-fractionnement de ces dernières, de même que pour le facteur vasculo-protecteur que véhiculent les lipoprotéines de hautes densités (ou du moins, certaines d'entre elles). Force est de croire alors que le lipoprotéinogramme reste, par sa capacité à séparer les classes et les sous-classes lipoprotéiques, un élément incontournable dans le diagnostic et le suivi pathologique, dans la prévision et la prévention des risques cardiovasculaires ainsi que dans la mise en route de thérapies à visée normolipémiante.

Bien que notre technique n'ait pas abouti au sous-fractionnement hautement résolu des LDL et des HDL, il n'en demeure pas moins que la mise à disposition d'un formeur de gradient et son adaptation au protocole mis en place pourraient aisément faire atteindre ce but et par conséquent améliorer grandement les résultats et l'intérêt de la méthode.

Références bibliographiques :

1. Pr. Y. Touitou. Biochimie : structure des glucides et lipides [Internet]. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. [cité 26 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SGLbioch/index.html>
2. lipide — Wiktionnaire [Internet]. [cité 24 févr 2017]. Disponible sur: <https://fr.wiktionary.org/wiki/lipide>
3. Polonovski J, Mandel P, Biserte G, Tayeau F. Les Constituants des organismes vivants. 10^e éd. Paris: Masson; 1977. (Polonovski M. BIOCHIMIE MEDICALE).
4. International Union of Pure and Applied Chemistry, Organic Division - Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, and Commission on Physical Organic Chemistry Glossary of names of organic compounds and reactive intermediates based on structure [Internet]. International Union of Pure and Applied Chemistry. 1994 [cité 27 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/class/index.html>
5. Fahy E. A comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research*. 16 févr 2005;46(5):839-62.
6. Louisot P. Biochimie générale et médicale. Paris: Simep; 1989.
7. Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev*. juin 1991;55(2):288-302.
8. Weinman S, Méhul P. Toute la biochimie. Paris: Dunod; 2013.
9. Bailey AE, Swern D, Formo MW, Applewhite TH. Bailey's Industrial oil and fat products. 4th ed. New York: Wiley; 1979. 1 p.
10. Jenkins TC. Fatty Acid Composition of Milk from Holstein Cows Fed Oleamide or Canola Oil. *Journal of Dairy Science*. mars 1998;81(3):794-800.
11. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): Nomenclature of Lipids [Internet]. Lipid nomenclature Lip-1 & Lip-2. 1976 [cité 25 févr 2017]. Disponible sur: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/lip1n2.html#p16>
12. Licence STE – Biochimie 1 : Les lipides [Internet]. Disponible sur: plage-desinvolte.pagesperso-orange.fr/d_agora/d_biochimie/lipides.pdf
13. Valdiguié P. Biochimie clinique. 2^{ème}. Paris; Cachan, France: Technique et Documentation ; Editions médicales internationales; 2000.
14. Marshall WJ, Bangert SK. Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic. Paris: Elsevier; 2005.
15. Servier Medical Art. Banque d'images PowerPoint | Servier [Internet]. Servier. [cité 21 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>
16. Métais P, Agnéray J, Férard G, Fruchart JC. Biochimie clinique: 1 Biochimie analytique. 2^e éd. Vol. 1. Paris: SIMEP; 1990.

BIBLIOGRAPHIE

17. Kamstrup PR, Tybjaerg -Hansen A, Nordestgaard BG. Genetic Evidence That Lipoprotein(a) Associates With Atherosclerotic Stenosis Rather Than Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 juill 2012;32(7):1732-41.
18. Arnold von Eckardstein. Renaissance d'un facteur de risque cardiovasculaire [Internet]. Roche Diagnostics. [cité 25 avr 2017]. Disponible sur: http://www.roche-diagnostics.ch/fr_CH/home/media/news-archiv/Lipoprotein-a.html
19. Métails P, Agnéray J, Férard G, Fruchart JC, Jardillier JC, Revol A, et al. *Biochimie clinique: 2 Biochimie métabolique*. Vol. 2. Villeurbanne: SIMEP; 1985.
20. Pr. A. Raisonnier. *Biochimie: Lipides et lipoprotéines* [Internet]. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. [cité 27 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/LLbioch/index.html>
21. Boulanger P, Polonovski J, Tayeau F, Mandel P, Biserte G. *Biochimie pathologique*. Paris; New York: Masson; 1973. (Polonovski M. BIOCHIMIE MEDICALE).
22. Fredrickson DS, Lees RS. A system of phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation*. mars 1965;31:321-7.
23. de Gennes JL. Idiopathic hyperlipemia. Proposition of a simplified classification. *Presse Med*. 10 avr 1971;79(18):791-5.
24. Khachadurian AK, Uthman SM. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab*. 1973;15(1):132-40.
25. Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science*. 11 déc 1981;214(4526):1239-41.
26. Chanu B. Hypertriglycémie : danger pour les artères. *Presse Med*. 1999;28(36):2011-7.
27. Gotto AM. Triglyceride: the forgotten risk factor. *Circulation*. 24 mars 1998;97(11):1027-8.
28. Pr. François Schiele. L'Athérosclérose [Internet]. Besançon Cardio. [cité 1 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.besancon-cardio.org/cours/09-atherosclerose.php>
29. Bonnefont-rousselet D. Le bilan lipidique en 2016. *FEUILLETS DE BIOLOGIE*. mai 2016;(330):39-52.
30. TNB : Fiche [Internet]. 2017 [cité 28 mars 2017]. Disponible sur: http://www.codage.ext.cnamts.fr/cgi/nabm/cgi-fiche?p_code_nabm=0996&p_date_jo_arrete=%25&p_menu=FICHE&p_site=AMELI
31. Foubert L. Élévation du cholestérol et/ou des triglycérides. In: *Traité de Médecine AKOS*, 1-1199. Paris: EMC (Elsevier Masson SAS); 2008.
32. Saunier V, Portugal H. Cholestérol LDL [Internet]. EM-Consulte. [cité 14 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/61054/cholestérol-ldl>
33. Myara J. Cholestérol HDL [Internet]. EM-Consulte. [cité 14 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/61053/cholestérol-hdl>

34. Myara J. Cholestérol total [Internet]. EM-Consulte. [cité 14 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/61055/cholestérol-total>
35. Vaubourdolle M, Luc G, Bard J-M. Biochimie, hématologie. 4^e éd. Rueil-Malmaison: Wolters Kluwer; 2013. p. 451-472. (Le Moniteur internat).
36. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 17 déc 2002;106(25):3143-421.
37. Techniques électrophorétiques [Internet]. [cité 6 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E1.html>
38. Electrophorèse (technique). Aspects théorique et pratique [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html
39. phorésie — Wiktionnaire [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: <https://fr.wiktionary.org/wiki/phor%C3%A9sie#fr>
40. Techniques électrophorétiques-Applications [Internet]. [cité 6 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>
41. Coutouly G, Klein E. Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique. Rueil-Malmaison: Doin; 2006.
42. Memoire Online - Etude comparative de l'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse sur l'automate capillarys - Mohamed Nabil ATIG [Internet]. [cité 10 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.memoireonline.com/04/14/8834/Etude-comparative-de-l-electrophorese-sur-gel-et-l-electrophorese-sur-l-automate-capillarys.html>
43. Électrophorèse — Wikipédia [Internet]. [cité 12 mai 2017]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se>
44. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide — Wikipédia [Internet]. [cité 12 mai 2017]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se_sur_gel_de_polyacrylamide
45. Electrophorèse des protéines en gel d'acrylamide [Internet]. S. I. I.T.U. B. 2017 [cité 12 mai 2017]. Disponible sur: http://professeur.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/files/umcm-gauthier_didier/wf/wf/documents/siitub%20electro%20page-110520.docx
46. Gelfi C, Righetti PG. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels I. Effect of different cross-linkers. *Electrophoresis*. févr 1981;2(4):213-9.
47. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection [Internet]. Bio-Rad Lab., Hercules (Ca, USA): Bio-Rad; [cité 12 mai 2017] p. 1-47. (Electrophoresis). Report No.: 6040. Disponible sur: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
48. Menter P. Acrylamide polymerization - A practical approach [Internet]. Bio-Rad Lab., Hercules (Ca, USA): Bio-Rad; 2000 [cité 12 mai 2017] p. 1-8. (Electrophoresis). Report No.: 1156. Disponible sur: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1156.pdf

BIBLIOGRAPHIE

49. Righetti PG, Gelfi C, Bosisio AB. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels. III. Effect of catalysts. *Electrophoresis*. févr 1981;2(5-6):291-5.
50. Gelfi C, Righetti PG. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels II. Effect of temperature. *Electrophoresis*. févr 1981;2(4):220-8.
51. Chen B, Chrambach A. Estimation of polymerization efficiency in the formation of polyacrylamide gel, using continuous optical scanning during polymerization. *J Biochem Biophys Methods*. mai 1979;1(2):105-16.
52. Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, Lowe F, Blanche PJ, Krauss RM. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res*. déc 1992;33(12):1876-81.
53. Li X, Innis-Whitehouse W, Brown WV, Le NA. Protocol for the preparation of a segmental linear polyacrylamide gradient gel: simultaneous determination of Lp[a], LDL, and HDL particle sizes. *J Lipid Res*. déc 1997;38(12):2603-14.
54. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Meth Enzymol*. 1986;128:417-31.
55. Frings CS, Foster LB, Cohen PS. Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel. *Clin Chem*. févr 1971;17(2):111-4.
56. Hall FF, Ratliff CR, Westfall CL, Culp TW. Serum lipoprotein electrophoresis: an improved polyacrylamide procedure. *Biochem Med*. oct 1972;6(5):464-70.
57. Moulin S, Fruchart JC, Dewailly P, Sezille G. Lipoprotein electrophoresis on acrylamide-agarose plates, with discontinuous acrylamide gradient. *Clin Chim Acta*. 15 janv 1979;91(2):159-63.
58. Pathak M, Chaudhary N, Rathore AS. Development of a low-cost, high-throughput native polyacrylamide gel electrophoresis (N-PAGE) protocol for lipoprotein sub-fractionation using Quality by Design approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. avr 2014;92:119-26.
59. Oya F, Oya T, Toda K. Serum lipoprotein estimation by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *Nagoya J Med Sci*. août 1974;37(1-2):23-7.
60. Principe de l'électrophorèse des protéines dans le Western blot [Internet]. Cours de Biochimie. [cité 3 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.cours-de-biochimie.fr/western-blot.php>
61. Goussault Y. Lipoprotéine (a) [Internet]. EM-Consulte. [cité 14 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/61110/lipoprotéine-a>
62. Goussault Y. Apolipoprotéines A1 et B [Internet]. EM-Consulte. 2017 [cité 14 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/61034/apolipoprotéines-a1-et-b>
63. Madre J-F. Téléchargement — Acces Mésurim Pro [Internet]. [cité 11 juin 2017]. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/acces/logiciels/mesurim/telechargement>
64. MedCalc statistical software version 17.5.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) [Internet]. [cité 11 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.medcalc.org/>

BIBLIOGRAPHIE

65. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* oct 1982;28(10):2077-80.
66. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* avr 1974;20(4):470-5.
67. Grove TH. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem.* avr 1979;25(4):560-4.
68. Righetti PG, Gelfi C, Bosisio AB. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels. III. Effect of catalysts. *Electrophoresis* [Internet]. févr 1981 [cité 12 mai 2017];2(5-6):291-5. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150020507>
69. Catsimpoilas N. *Methods of protein separation*. New York, NY: Plenum Press; 1976. 326 p. (Biological separations; vol. 2).
70. An der Lan B, Chrambach A. Modification of pH gradients in isoelectric focusing by the pH of the anolyte. *Electrophoresis.* avr 1980;1(1):23-7.
71. Pfüller U, Franz H, PreiB A. Sudan Black B: Chemical structure and histochemistry of the blue main components. *Histochemistry.* 1977;54(3):237-50.
72. Casselman WGB. Acetylated Sudan Black B as a reagent for lipids. *Biochim Biophys Acta.* juill 1954;14(3):450.
73. Mc Donald HJ, Ribeiro LP. Ethylene and propylene glycol in the pre-staining of lipoproteins for electrophoresis. *Clin Chim Acta.* mai 1959;4(3):458-9.

ANNEXES



ANNEXE I. Principaux acides gras rencontrés dans la nature [8].

Nom	Nombre de carbone		Nombre de doubles liaisons				Formule
			Position des doubles liaisons				
Laurate	12	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$
Myristate	14	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$
Palmitate	16	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$
Palmitoléate	16	1	9				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
Stéarate	18	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$
Oléate	18	1	9				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
Linoléate	18	2	9, 12				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
α -Linoléate	18	3	9, 12, 15				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
Arachidate	20	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$
Arachidonate	20	4	5, 8, 11, 14				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$
Béhénate	22	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$
Lignocérate	24	0					$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COO}^-$

A noter que c'est la base conjuguée de chaque acide qui est représentée, étant donné que c'est la forme retrouvée au pH physiologique.

ANNEXE III. Tableau récapitulatif des caractéristiques biologiques des différentes hyperlipoprotéïnémies classées selon Fredrickson et coll. [19].

Type	Aspect du plasma	PI-Cholestérol	PI-Triglycérides	Electrophorèse des lipoprotéines du sérum sur papier en tampon albumineux	Densité de flottation fractions majeures	Fréquence globale	Pouvoir athérogène
I	Lactescent	Concentration habituelle	↑↑↑	 chylomicrons	$d < 0,94$	très rare	0
II _a	Clair	Concentration habituelle	↑↑↑	 β-lipoprotéines	$1,019 < d < 1,063$	0,1-0,5 %	+++
II _b (II+IV)	Clair ou ± Trouble	Concentration habituelle	↑↑↑	 β-lipoprotéines + pré-β-lipoprotéines	$1,019 < d < 1,063$ $d < 1,006$	1,5 %	+++
III	Trouble	Concentration habituelle	↑↑↑	 β-lipoprotéines « broad band »	$1,006 < d < 1,019$ + « floating β-lipoppr. »	rare	+++
IV	Opalescent	Concentration habituelle	↑	 pré-β-lipoprotéines	$d < 1,006$	8 à 14 %	++
V	Lactescent	Concentration habituelle	↑↑↑	 chylomicrons + pré-β-lipoprotéines	$d < 0,94$ $d < 1,006$	< 1 %	+

ANNEXE IV. Tableaux récapitulatifs de la calibration des pipettes.

1. TRANSFERPETTE® à volume variable de 100 à 1000 µl

Valeur théorique (µL)	Valeurs observées (µL)			Ecart (µL)	pourcentage d'erreur (%)
	essai 01	essai 02	essai 03		
100	102.09	100.74	100.92	1.25	1.3
200	200.25	201.59	199.97	0.62	0.3
300	300.23	300.97	300.96	0.72	0.2
400	399.17	401.86	401.01	1.23	0.3
500	500.24	500.8	499.79	0.42	0.1
600	599.07	599.22	602.41	1.37	0.2
700	700.49	699.45	699.09	0.65	0.1
800	800	799.77	802	0.74	0.1
900	903.63	901.37	902.94	2.65	0.3
1000	1004.17	1003.59	1002.7	3.49	0.3

2. CAPP® à volume variable de 10 µl à 100 µl

Valeur théorique (µL)	Valeurs observées (µL)				Ecart (µL)	Pourcentage d'erreur (%)
	Essai 01	Essai 02	Essai 03	Moyenne des essais		
10	11,57	10,7	11,64	11,30	1,30	13,0
20	21,45	21,69	21,83	21,66	1,66	8,3
30	31,62	32,46	31,06	31,71	1,71	5,7
40	42,07	41,79	41,84	41,90	1,90	4,8
50	51,75	52,06	52,25	52,02	2,02	4,0
60	61,62	60,78	64,21	62,20	2,20	3,7
70	73,47	71,98	71,99	72,48	2,48	3,5
80	84,04	81,5	82,45	82,66	2,66	3,3
90	90,25	92,96	94,12	92,44	2,44	2,7
100	103,28	100,99	101,49	101,92	1,92	1,9

3. TRANSFERPETTE® à volume variable de 25 µl à 250 µl

Valeur théorique (µL)	Valeurs observées (µL)				Ecart moyen (µL)	Pourcentage d'erreur (%)
	Essai 01	Essai 02	Essai 03	Moyenne des essais		
25	27,23	24,24	27,18	26,22	1,72	6,9
30	29,75	30,56	31,04	30,45	0,62	2,1
35	36,1	35,56	37	36,22	1,22	3,5
40	40,3	39,46	39,12	39,63	0,57	1,4
45	43,71	45,76	45,62	45,03	0,89	2,0
50	50,71	49,46	50,83	50,33	0,69	1,4
60	58,9	59,29	59,74	59,31	0,69	1,2
70	69,71	69,85	71,1	70,22	0,51	0,7
80	70	90	80	80,00	6,67	8,3
90	91,51	91,89	90,06	91,15	1,15	1,3
100	100,11	101,63	100,78	100,84	0,84	0,8
110	108,23	109,42	111,03	109,56	1,13	1,0
120	120,58	121,2	119,71	120,50	0,69	0,6
130	131,26	129,23	129,93	130,14	0,70	0,5
140	139,39	139,27	139,38	139,35	0,65	0,5
150	150,95	149,72	149,92	150,20	0,44	0,3
160	159,5	161,74	160,06	160,43	0,77	0,5
170	169,37	169,75	172,15	170,42	1,01	0,6
180	180,63	181,14	178,89	180,22	0,96	0,5
190	188,94	190,21	190,37	189,84	0,55	0,3
200	199,72	200,62	199,8	200,05	0,37	0,2
210	210,03	212,1	210,9	211,01	1,01	0,5
220	220,17	220,14	220,22	220,18	0,18	0,1
230	230,24	230,18	230,52	230,31	0,31	0,1
240	239,89	241,76	240,25	240,63	0,71	0,3
250	250,07	249,89	251,03	250,33	0,40	0,2

ANNEXE V. Tableau récapitulatif du bilan lipidique général de la population de l'étude.

CODE PATIENT	TG (g/L)	CH-TOTAL (g/L)	CH-HDL (g/L)	CH-LDL (g/L)
				(Friedwald)
2	2.13	2.67	0.57	1.67
3	2.81	1.74	0.42	0.76
4	3.07	1.52	0.3	0.61
5	6.26	1.77	0.24	inapplicable
6	3.65	1.88	0.4	0.75
7	1.17	3.03	1.04	1.76
8	2.84	2.4	0.43	1.40
9	3.09	2.01	0.26	1.13
10	2.33	1.55	0.29	0.79
11	2.16	1.72	0.81	0.48
12	1.75	1.68	0.3	1.03
13	3.27	2.28	0.36	1.27
14	1.78	1.74	0.52	0.86
15	1.93	1.55	0.89	0.27
16	1.72	1.43	0.74	0.35
17	1.71	1.89	0.51	1.04
18	1.56	2.23	0.52	1.40
19	2.05	2.09	0.33	1.35
20	1.72	2.29	0.52	1.43
21	2.21	1.43	0.46	0.53
22	1.91	1.41	0.43	0.60
23	1.99	1.78	0.34	1.04
24	0.73	2.36	0.4	1.81
25	1.03	2.3	0.47	1.62
26	1.58	2.52	0.52	1.68
27	1.24	2.13	0.51	1.37
28	2.43	1.91	0.38	1.04
29	2.12	2.12	0.54	1.16
30	2.61	1.47	0.22	0.73

ANNEXES

CODE PATIENT	TG (g/L)	CH-TOTAL (g/L)	CH-HDL (g/L)	CH-LDL (g/L)
				(Friedwald)
31	1.65	2.43	0.66	1.44
32	2.24	2.13	0.36	1.32
33	2.67	2.09	0.9	0.66
34	0.76	2.41	0.41	1.85
35	1.77	1.63	0.31	0.97
36	3.69	2.6	0.26	1.60
37	2.81	2.52	0.43	1.53
38	3.78	2.62	0.38	1.48
39	2.79	1.63	0.46	0.61
40	3.51	1.86	0.33	0.83
41	2.33	1.75	0.51	0.77
42	1.02	2.25	0.7	1.35
43	2.05	1.66	0.47	0.78
44	3.37	1.61	0.45	0.49
45	2.35	2.45	0.59	1.39
46	2.2	1.86	0.46	0.96
47	2.56	2.05	0.35	1.19
48	2.73	1.45	0.52	0.38
49	2.61	1.32	0.35	0.45
50	2.85	1.86	0.3	0.99
51	2.52	1.68	0.63	0.55
52	4.47	2.8	0.33	inapplicable
53	3.09	1.68	0.35	0.71
54	2.85	1.6	0.49	0.54
55	3.65	2.52	0.4	1.39
56	2.2	1.46	0.55	0.47
57	2.88	2.07	0.39	1.10
58	1.99	2.14	0.65	1.09
59	2.74	2.17	0.64	0.98
60	2.7	1.79	0.38	0.87
61	2.28	1.73	0.54	0.73
62	8.89	2.86	0.42	inapplicable
63	1.74	2.02	0.55	1.12

ANNEXES

CODE PATIENT	TG (g/L)	CH-TOTAL (g/L)	CH-HDL (g/L)	CH-LDL (g/L)
				(Friedwald)
64	3.52	1.87	0.62	0.55
65	2.07	2.37	0.59	1.37
66	1.88	1.55	0.7	0.47
67	2.11	1.83	0.63	0.78
68	1.85	1.84	0.68	0.79
69	7.02	1.57	0.8	inapplicable
70	1.83	1.36	0.7	0.29
71	2.38	1.26	0.68	0.10
72	2.38	1.85	0.7	0.67
73	8.61	1.67	0.43	inapplicable
74	2.15	2.7	0.34	1.93
75	2.53	2.35	0.65	1.19
76	8.31	2.86	0.88	inapplicable
77	1.97	1.77	0.4	0.98
78	1.26	2.34	0.4	1.69
79	2.21	1.85	0.53	0.88
83	2.98	1.54	0.28	0.66
85	2.16	1.82	0.4	0.99
88	1.76	1.97	0.41	1.21
89	2.12	1.74	0.35	0.97
90	2.11	2.12	0.52	1.18
91	1.57	2.24	0.48	1.45
92	6.34	2.76	0.9	inapplicable
93	2.02	1.76	0.43	0.93
94	2.1	2.05	0.35	1.28
95	1.8	2.21	0.57	1.28
96	1.26	2.63	0.57	1.81
97	3.71	2.19	0.29	1.16
98	2.09	2.11	0.42	1.27
99	3.77	3.57	0.62	2.20

Résumé

De nos jours, l'incidence des atteintes cardiovasculaires ne cesse de croître, malgré la prévention médicale axée entre autres sur le bilan lipidique de base qui, à lui seul, ne permet cependant pas l'exploration complète des anomalies lipidiques, d'où la nécessité de pratiquer des examens complémentaires afin de mieux cerner l'étiologie ; parmi eux subsiste le lipoprotéinogramme. Cet ouvrage décrit l'optimisation d'une technique séparative des lipoprotéines plasmatiques, basée sur un principe électrophorétique, sur gel de polyacrylamide en gradient discontinu d'acrylamide, et la mise en place consécutive d'un protocole optimisé. L'intérêt de la technique est ensuite évalué sur un échantillon de population de Larbaâ Nath Irathen atteint d'hyperlipidémies en tout genre. Les résultats démontrent que le protocole mis en place trouve tout son intérêt dans la classification des différentes dyslipoprotéinémies d'où découlerait une adaptation thérapeutique à chacune d'elle, et dans la prévision des risques cardiovasculaires par la visualisation des fractions athérogènes et vasculo-protectrices d'où ressortirait une meilleure prévention de ces risques.

Mots clés : Lipoprotéinogramme, lipoprotéines sériques, polyacrylamide, gradient discontinu, porosité, catalyseurs, hyperlipidémie, précoloration, Noir soudan B acétylé, migration électrophorétique, risques cardiovasculaires.

Abstract

Nowadays, the incidence of cardiovascular disease continues to increase despite medical prevention with focuses on the basal lipid balance which, however, does not allow the complete exploration of lipid abnormalities, where the necessity of applying additional examinations to better identify the etiology; Among them remains the lipoproteinogram. This work describes the optimization of a plasma lipoproteins' separation technique based on an electrophoretic principle, on polyacrylamide gel "PAGE-Native" in a discontinuous gradient of acrylamide, and the successive setting up of an optimized protocol. The interest of the technique is then evaluated on a sample of Larbaâ Nath Irathen's population with hyperlipidemias of all kinds. The results demonstrate that the protocol set up is of particular interest in the classification of different dyslipoproteinemias, resulting in therapeutic adaptation to each dyslipoproteinemia, and in the prediction of cardiovascular risks through the visualization of atherogenic and vasculoprotective fractions, which would lead to better prevention of these risks.

Keywords: Lipoproteinogram, serum lipoproteins, PAGE-Native, discontinuous gradient, porosity, catalysts, hyperlipidemia, pre-staining, Acetylated Sudan black B, electrophoretic migration, cardiovascular risks.