

Analyse électrophorétique des lipoprotéines sériques chez les animaux domestiques

par R. CUVELIER, G. ANDRAUD, J.-A. BERGER et BEAUFRÈRE

(Note présentée par M. BRESSOU)

L'analyse électrophorétique des sérums sanguins dans la série animale présente un double intérêt : chez les animaux d'expérience, la connaissance des limites normales et des variations des caractéristiques plasmatiques peut être directement utile dans certaines recherches ; en médecine vétérinaire, leur étude, chez les animaux domestiques, peut, à priori, représenter un appoint au diagnostic de certains états pathologiques.

L'électrophorèse sur papier a donné un essor considérable à la diffusion de la méthode électrophorétique, qui est rapidement entrée dans la pratique ; en effet, en exigeant seulement une petite quantité de liquide biologique, elle a permis, par des colorations sélectives, la mise en évidence de substances fixées aux protéines. Mais son adoption a parfois été un peu hâtive. L'expérience que nous en avons et qui remonte à plus de six ans a permis à l'un de nous d'envisager une théorie originale des phénomènes tenant compte des divers facteurs en compétition au cours de l'électrophorèse et d'attirer l'attention sur les nombreuses réserves qu'appelle une utilisation précipitée du procédé [1].

La multiplicité des facteurs, intervenant sur la migration électrophorétique, explique pourquoi les expériences ne sont rigoureusement reproductibles que si de nombreuses précautions sont systématiquement observées (température stable, évaporation régulière, horizontalité et imprégnation homogène de la bande de papier, volume convenable et dépôt régulier de la substance à étudier). Il est possible alors d'obtenir une précision de plus ou moins 5 %, ce qui est suffisant pour que la méthode puisse renforcer le diagnostic clinique [6].

Cependant, des difficultés, tenant soit à l'interprétation des

diagrammes, soit à leur coloration, peuvent encore expliquer les écarts entre les résultats donnés par les auteurs.

Chez l'homme, les travaux sont nombreux ; leur connaissance est indispensable à l'interprétation des résultats recueillis chez les animaux.

On a l'habitude de classer les lipoprotéines du sérum humain en trois fractions principales, dont Swahn a précisé les caractères [7, 8] :

— La première fraction, la plus rapide, se situe au niveau de l'albumine. Ce sont les $A\alpha_1$ -lipoprotéines qui représentent 20 à 30 % des lipoprotéines totales. Leur poids moléculaire est faible (200.000). Elles sont solubles dans l'eau, contiennent 35 % de lipides dont un tiers de cholestérol et deux tiers de phospholipides.

— La deuxième fraction, plus lente (50 à 60 % des lipoprotéines totales) correspond aux β -globulines (β -lipoprotéines). Leur poids moléculaire est élevé (1.300.000). Elles sont insolubles dans l'eau. Constituées par 75 % de lipides, elles sont, à l'inverse des précédentes, moins riches en phospholipides (2/5) qu'en cholestérol (3/5).

— La troisième fraction (20 % des lipoprotéines totales) s'étend de la ligne de départ aux γ -globulines. Il s'agit des plus grosses molécules de β -lipoprotéines et des particules lipidiques en suspension dans le sérum : chylomicrons de la période post-prandiale et lipomicrons, peu influencés par le courant électrique et fortement adsorbés par le papier.

Dans tous les lipidogrammes humains, nous pouvons donc distinguer trois grandes zones :

a) *La zone des α -lipoprotéines* avec les $A\alpha_1$ lipoprotéines bien marquées et situées à cheval sur l'albumine et les α_1 -globulines, et les α_2 -lipoprotéines peu abondantes au niveau des α_2 -globulines.

b) *La zone des β -lipoprotéines principales* avec les lipoprotéines β abondantes au niveau des β -globulines et les lipoprotéine β' , entre les β et les γ -globulines. Cette division nous a été suggérée par une dyssymétrie nette de la courbe des β -lipoprotéines.

c) *Une troisième zone* : les lipoprotéines T, dont il est parfois assez difficile de préciser les limites (néphrose lipoidique). Dans les cas d'hypercholestérolémie, les fractions β et T sont considérablement augmentées.

Swahn a montré que dans des conditions d'expérience iden-

tiques, les résultats sont reproductibles et que l'intensité de la coloration du lipidogramme est proportionnelle à la teneur en lipides. On calcule les valeurs relatives des différentes fractions par rapport à la surface totale. On peut établir des chiffres normaux avec toutefois des limites assez larges dans l'inter-

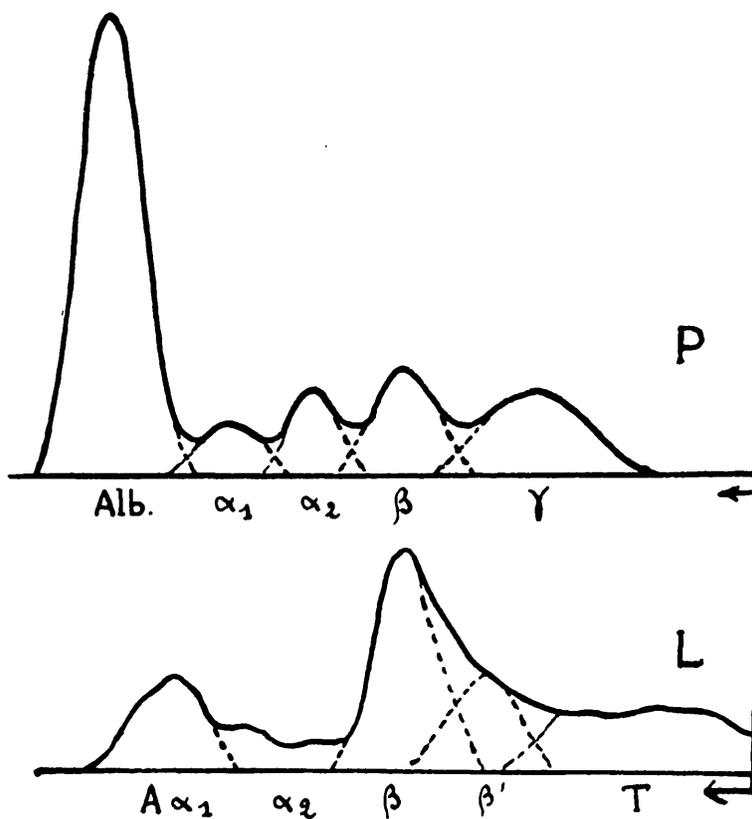


FIG. 1. — Protéinogramme et Lipidogramme de l'Homme.

prétation. Les lipoprotéines sériques de l'homme et des animaux sont susceptibles de variations physiologiques beaucoup plus larges que les protéines, sous l'influence des repas et sous l'influence de l'âge.

VALEURS RESPECTIVES DES FRACTIONS LIPOPROTEIQUES

	Nombre de cas	Dépôt de sérum en mm ³	en % de Lipoprotéines totales		Fraction T	Cholestérol en gr./litre (méthode de Bloor)	Test de Kunkel ph. en Unités Vernes	
			A α lipoprotéines					β Lipoprotéines
			α ₁	α ₂				
Homme		40	15	25 à 35	45 à 65	15 à 40	1,80	15 à 30
Lapin	12	60	25	à 35	40 à 50	20 à 30	0,300 à 0,600	10 à 20
Chien (4 à 7 ans)	9	60	55	à 65	17 à 23	18 à 22	1,50 à 1,70	7 à 15
Boeuf (2 à 5 ans)	15	60	55	à 70	13 à 20	15 à 21	0,70 à 1,10	8 à 20
Veau (6 mois)	11	60	63	à 69	13 à 18	15 à 18		< 15
Boeuf (+ de 6 ans)	9	60	53	à 65	15 à 21	18 à 25		10 à 25
Mouton (2 à 3 ans)	14	60	60	à 68	16 à 21	14 à 18	0,50 à 0,80	10 à 20
Porc (8 à 10 mois)	15	40	8 à 31	4 à 14	36 à 55	21 à 32	1 à 1,30	5 à 15
Cheval (6 à 8 ans)	10	60	55	à 70	15 à 25	10 à 20	1	15 à 30
Dinde (8 mois)	10	40	56 à 70	5 à 10		24 à 35	1	> 200
Poulet (7 mois)	19	40	43 à 48	13 à 16		37 à 42	1	> 200
Canard (6 mois)	12	40	49 à 60	9 à 11		29 à 40	1	> 200

TECHNIQUES

Les électrophorèses sont effectuées dans un appareil construit au laboratoire [1] et pouvant contenir neuf bandes tendues horizontalement. On peut de la sorte réaliser dans les mêmes conditions trois électrophorèses pour un même sérum et étudier en même temps deux sérums d'animaux et un sérum humain témoin. Sur la bande destinée à la révélation des protides, on dépose 7 à 10 mm³ de sérum ; sur celle des lipides, 40 à 80 mm³. La troisième bande, avec 20 à 40 mm³ de sérum, est coupée en deux dans le sens longitudinal ; sur une moitié nous colorons les protides et sur l'autre les lipides, ce qui nous permet de fixer exactement la position des lipides par rapport aux protéines.

Le tampon utilisé est un tampon au véronal sodique et à l'acétate de Na de pH = 8,6 et de force ionique = 0,1. La durée de l'expérience est de 12 heures.

Les protéines sont mises en évidence par une coloration lente (16 heures) dans une solution acétique de Bleu de Bromophénol (0,1 %) saturée de Chlorure mercurique ; les lipides, après un bain d'une heure dans une solution alcoolique de Noir Soudan. Les bandes colorées, rendues translucides par immersion dans un bain de paraffine, sont photométrées. Les densités optiques sont portées en ordonnée et les longueurs de papier en abscisse. Les courbes ainsi obtenues sont planimétrées pour avoir les pourcentages respectifs des diverses fractions.

Dans l'étude des lipoprotéines, nous avons utilisé aussi le test de floculation de Kunkel et Arhens au phénol. Proposée d'abord comme méthode rapide de dosage des lipoprotéines, la réaction au phénol constitue plutôt une méthode de floculation des lipoprotéines β et « lorsque l'élévation des lipides n'est pas liée à l'augmentation des lipoprotéines β , la corrélation avec le test phénolique n'est pas bonne, alors qu'elle est indiscutable lorsque l'élévation des lipides se localise aux globulines β » [2, 3].

RESULTATS

Si les mobilités des fractions protéiques des sérums d'animaux sont souvent différentes de celles du sérum humain, nous retrouvons cependant la même distribution en quatre grands groupes :

(Albumine, α β et γ -globulines). Par contre, la répartition des lipides est des plus variables.

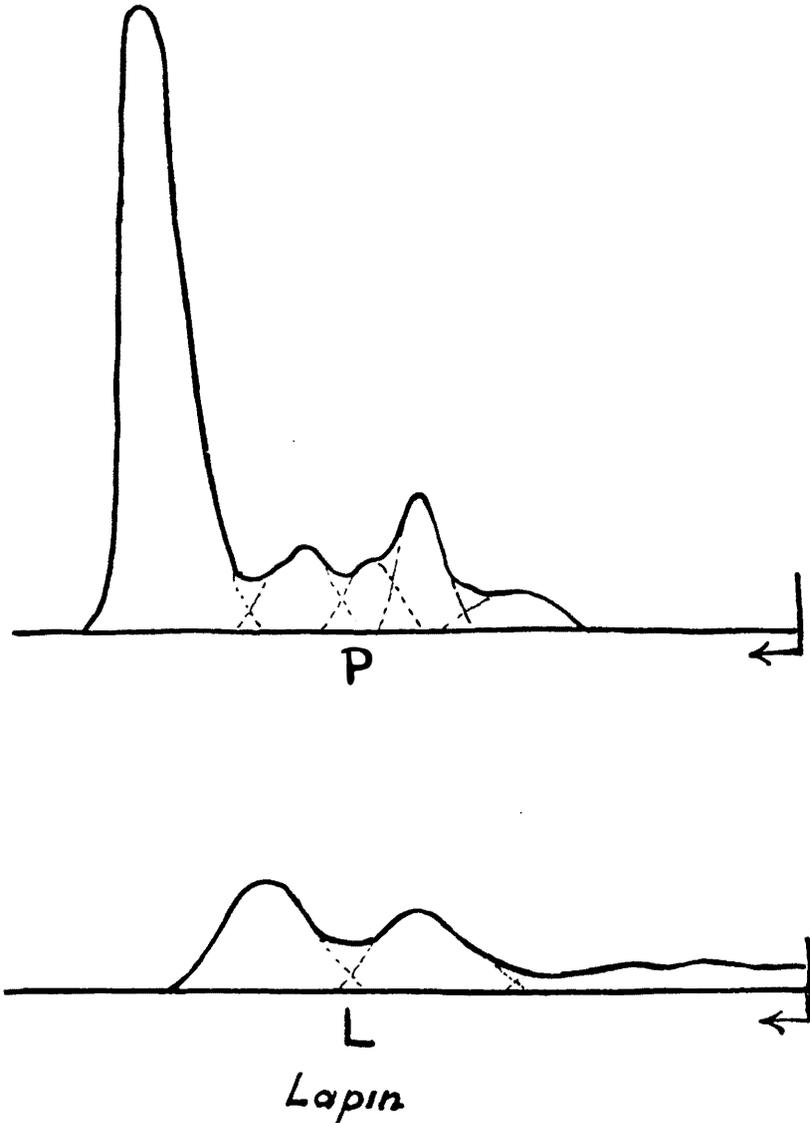


FIG. 2. — Protéinogramme et Lipidogramme du *Lapin*.

Chez le *lapin*, nous pouvons distinguer trois zones : l'une de mobilité élevée située en arrière de l'albumine (30 %), une autre au niveau des globulines β (40 %) et enfin une troisième entre

les globulines γ et la ligne de départ (30 %) avec parfois une tache sur cette ligne, due aux lipides qui n'ont pas migré.

Chez le *rat*, par contre, qui résiste à l'athérosclérose malgré un régime riche en lipides, la majeure partie des lipides se retrouve sur la fraction α la plus rapide [9].

Chez le *bœuf*, le *mouton* et le *cheval*, la répartition lipidique est sensiblement la même, avec une fraction importante en arrière de l'albumine (55 à 70 %), une fraction au niveau des β -globulines (15 à 20 %) et une traînée. Les deux dernières zones (β et T lipoprotéines) sont toujours relativement peu importantes.

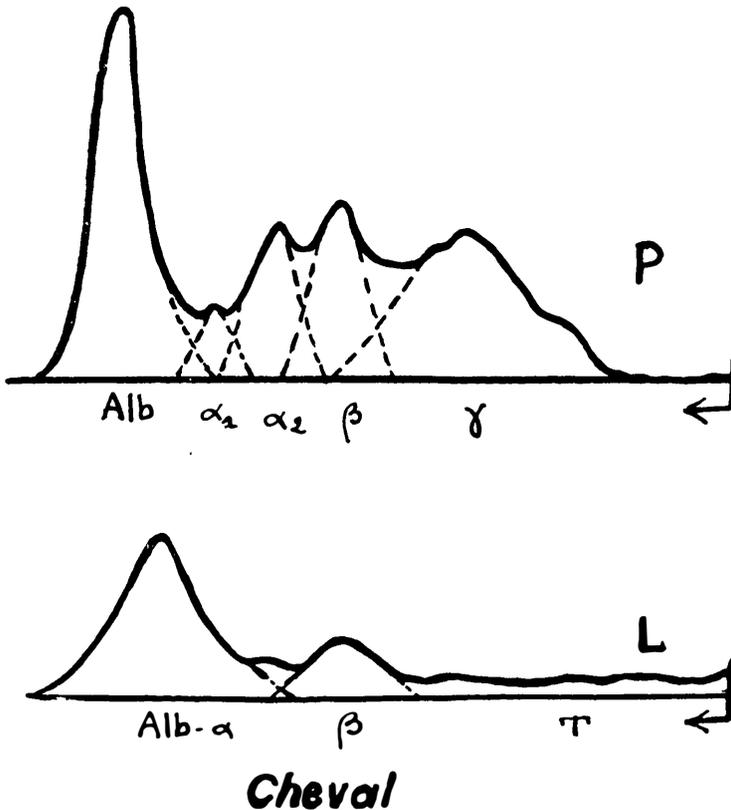


FIG. 3. — Protéinogramme et Lipidogramme du *Cheval*.

Chez les *Bovidés*, on peut noter qu'une légère tendance à la diminution du taux des A α -lipoprotéines se dessine avec l'âge,

le taux moyen étant au-dessus de 65 % chez le veau pour s'abaisser au-dessous de 60 % chez les sujets âgés de 6 à 10 ans.

Les *herbivores* sont caractérisés par une faible quantité de

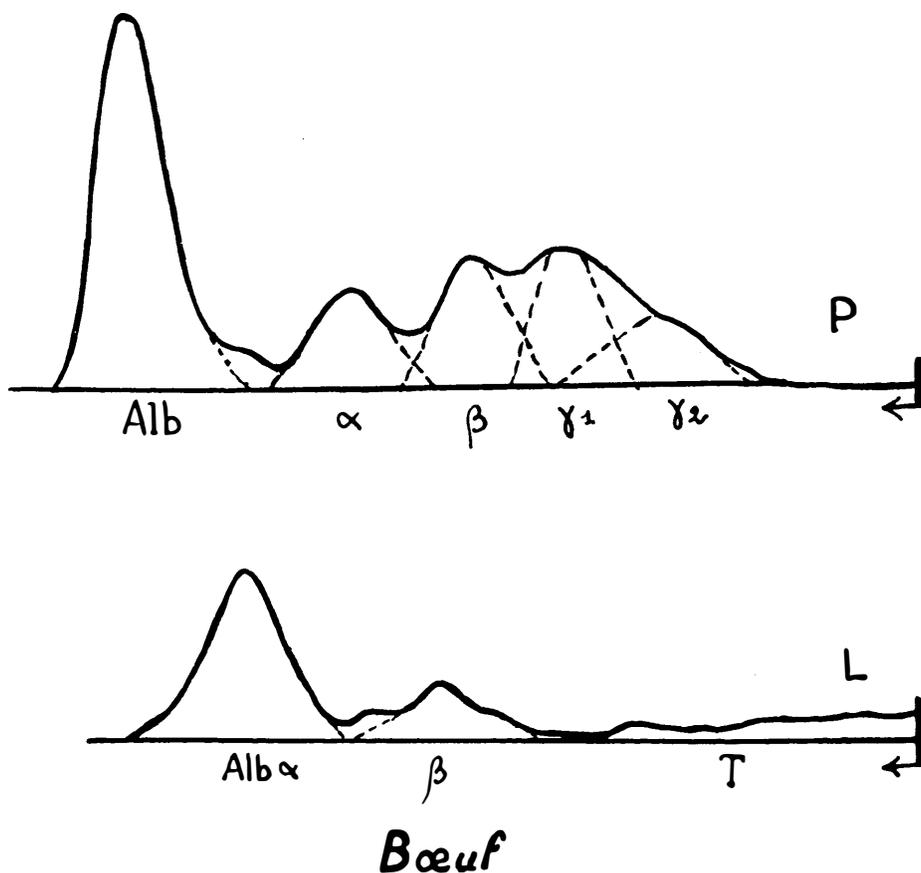


FIG. 4. — Protéinogramme et Lipidogramme du Bœuf.

lipides plasmatiques, surtout chez le bœuf et le mouton, ce qui a nécessité le dépôt de 60 mm³ en moyenne pour obtenir une coloration convenable.

La faible proportion de β -lipoprotéines et le taux de cholestérol

assez bas (0,50 à 0,70 gr. pour le mouton, 1 gr. pour le cheval et le bœuf) semblent être confirmés par une négativité presque constante du test de Kunkel-phénol (< 30 unités Vernes).

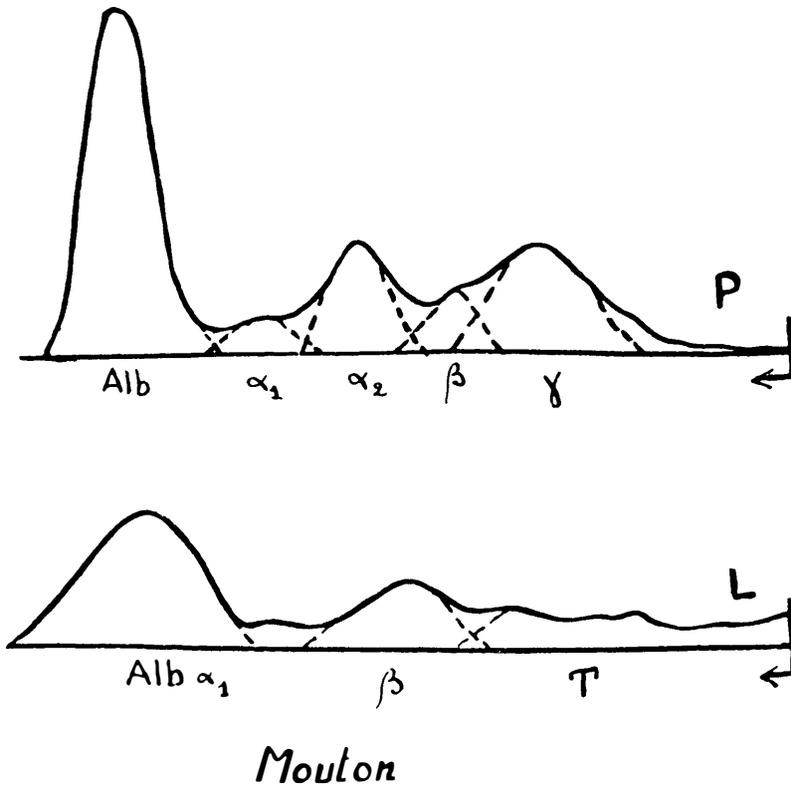


FIG. 5. — Protéinogramme et Lipidogramme du *Mouton*.

Chez le *porc*, la répartition lipidique ne ressemble pas à celle des herbivores. La fraction la plus importante se place au niveau des β -globulines. La fraction lipidique portée par l'albumine est assez large, mais peu intense. Là encore, le taux de cholestérol est bas (1 gr. 20) et le test de Kunkel-phénol est peu modifié (5 à 15 unités Vernes).

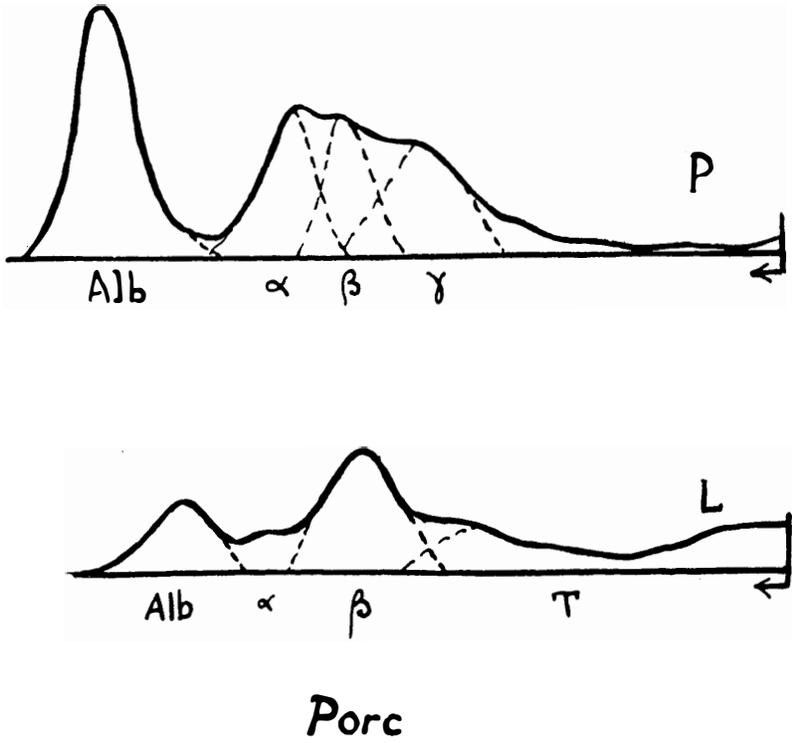


FIG. 6. — Protéinogramme et Lipidogramme du *Porc*.

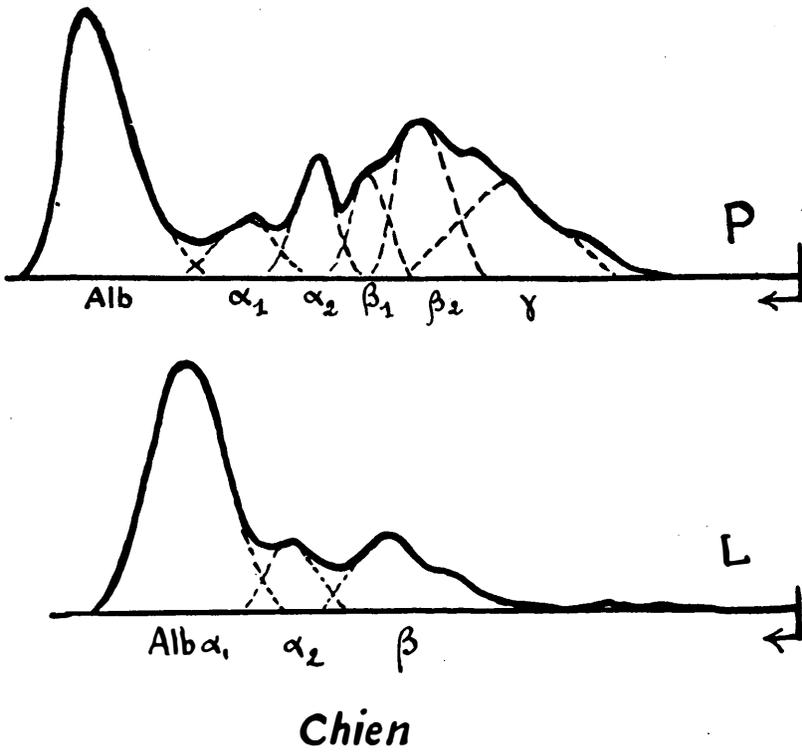


FIG. 7. -- Protéinogramme et Lipidogramme du *Chien*.

Chez le *chien*, nous ne ferons que confirmer les résultats donnés par Groulade et ses collaborateurs. Chez des animaux âgés de plus d'un an, tous les lipides plasmatiques se retrouvent sur les α_1 -globulines qui contiennent presque tout le cholestérol [4]. Là encore, le test de Kunkel-phénol oscille entre 5 et 15 unités Vernes.

Chez tous ces animaux, les lipides se répartissent d'une façon variable, mais toujours principalement sur les fractions α et β -globulines.

Chez les *oiseaux*, la distribution est toute autre : il y a deux zones lipidiques bien distinctes ; l'une se situe au niveau de

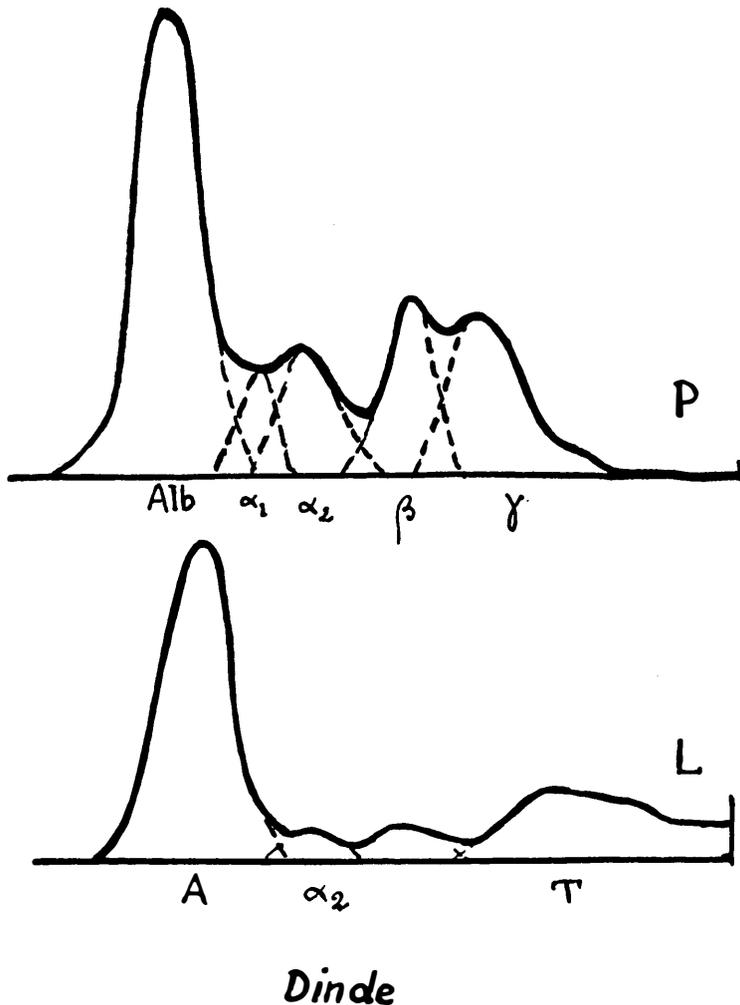


FIG. 8. — Protéinogramme et Lipidogramme de la *Dinde*.

l'albumine, l'autre forme une traînée rappelant la traînée du sérum humain entre les γ -globulines et le point de départ. Cette dernière fraction doit être formée de grosses molécules lipoprotéiques analogues aux chylomicrons et aux β -lipoprotéines de l'homme ; elles sont peut-être responsables de l'athérosclérose spontanée des oiseaux, semblable à l'athérosclérose de l'homme. La mobilité de la première fraction diminue en fonction de l'âge : les lipides se trouvent au niveau de l'albumine à l'âge de trois mois, puis au niveau des α_2 -globulines à l'âge d'un an, tandis que la surface et l'intensité de la coloration de la traînée augmentent. Entre ces deux fractions extrêmes, il reste toujours un fond coloré sur la bande et nous avons appelé cette fraction α_2 . Le test de Kunkel-phénol est toujours fortement positif et parfois même illisible (> 200 unités Vernes).

DISCUSSION

A la lumière des résultats que nous avons obtenus, la classification des zoologistes ne peut servir de base pour une caractérisation des lipidogrammes de chaque espèce, pas plus que la nature de l'alimentation (herbivores ou carnivores), ou la présence d'un estomac simple (cheval, porc) ou complexe (bœuf, mouton), la présence ou l'absence de vésicule biliaire.

De tous les mammifères, c'est l'homme et le lapin qui possèdent le plus de β -lipoprotéines ; mais de tous les mammifères, seuls l'homme et l'écureuil présentent spontanément de l'athérosclérose [5].

Avec un régime surchargé en lipides, le comportement des animaux est très différent : les uns sont réfractaires à l'athérosclérose, comme le rat ; d'autres y sont très sensibles, comme le lapin. Le chien exige des conditions particulières, comme l'addition à sa nourriture de thiouracil [5]. Cependant son taux de cholestérol et celui des lipides totaux sont voisins de celui de l'homme. A l'examen des lipidogrammes, on s'aperçoit que les animaux réfractaires à l'athérosclérose ont un pourcentage d' α -lipoprotéines supérieur à celui des β -lipoprotéines. On sait en effet que les grosses molécules de lipoprotéines seraient responsables de l'athérosclérose. Ce sont celles d'ailleurs que l'on trouve en grande quantité chez le poulet et c'est par la transformation de ces grosses molécules de β -lipoprotéines en molécules plus petites et de mobilité analogue à celle des α -globulines que le rat

soumis à un régime hyperlipidique évite l'athérosclérose. On pourrait peut-être, comme le font Lemaire et Cottet, classer les animaux en trois catégories :

1° Ceux qui font de l'athérosclérose spontanée ou de l'athérosclérose provoquée (le poulet) ;

2° Ceux qui ne présentent pas d'athérosclérose spontanée, mais qui sont sensibles à l'athérosclérose provoquée (le lapin) ;

3° Ceux qui résistent aussi bien à l'athérosclérose spontanée qu'à l'athérosclérose provoquée. Mais une connaissance encore plus approfondie des lipides sériques, du cholestérol, des phospholipides, de leur fixation sur les protéines et du rapport entre ces constituants est nécessaire et nos recherches se poursuivent dans ce sens.

En résumé, la répartition des lipides est très différente selon l'espèce considérée. Les lipides prédominent sur l'albumine chez le rat, le bœuf, le mouton, le cheval ; sur les globulines α_1 chez le chien ; sur les globulines β chez le lapin et chez l'homme ; sur les fractions lentes chez le porc. Les oiseaux présentent une fraction sur l'albumine et une importante traînée de migration lente.

La valeur des fractions protéiniques est indépendante de leur teneur en lipides, mais il semble que la présence d'une forte proportion de lipides au niveau de l'albumine augmente la mobilité de cette dernière.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDRAUD (G.). — Contribution à l'étude théorique et technique de l'électrophorèse sur papier et à l'analyse électrophorétique de sérums sanguins, dans la série animale. *Thèse Doctorat d'Etat en Pharmacie, Clermont-Ferrand* (1957), N° 2. (Bibliographie détaillée.
2. BERGER (J.-A.). — *Thèse Pharmacie (Etat). Toulouse*, 1953.
3. BERGER (J.-A.). — *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* (1954), Tome XIV, Fasc. III, 156.
4. GROULADE (J.), GROULADE (P.). — *Bull. Acad. Vétér.* (1957), 30, N° 5, 203.
5. LEMAIRE (A.), COTTET (J.). — *Presse Médicale* 1955), 63, N° 66, 1339.
6. NEELY (R.A.), NEILL (D.W.). — *Nature* (1955), 176, N° 4470, 33.
7. SWAHN (B.). — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1952), 4, 98.

-
8. SWAHN (B.). — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1955), 5, suppl. 9, pp. 1-11.
 9. MORRIS (R.), COURTICE (F.C.). — *Quart. J. Exper. Physiol.* (1955), 40, N° 2, 127.

*(Laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Clermont-Ferrand et Labora-
toire des Services Vétérinaires du Puy-de-Dôme).*
