

Phénomènes de clarification et de lipolyse d'un plasma lipémique par le plasma de rar hépariné

Autor(en): **Le Breton, E. / Frayssinet, C. / May, P.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **13 (1957)**

Heft 1-4: **Symposium über Arteriosklerose = Symposium sur l'artériosclérose = Symposium on arteriosclerosis**

PDF erstellt am: **31.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307316>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Département de Physiologie et Biochimie Cellulaires de l'Institut de Recherches sur le Cancer du C.N.R.S. et de l'Université de Paris

Phénomènes de clarification et de lipolyse d'un plasma lipémique par le plasma de rat hépariné

Par E. Le Breton, Ch. Frayssinet et P. May

Au cours de recherches concernant les modifications des lipoprotéines cellulaires sous l'influence de facteurs diététiques ou cancérigènes, nous avons été amenés à faire quelques expériences concernant la clarification d'un plasma lipémique par un plasma posthépariné. Nous en donnerons ici le résumé, en insistant sur quelques aspects théoriques des problèmes abordés.

L'action clarifiante apparaît comme une transformation de lipoprotéines insolubles en lipoprotéines solubles¹. Notre but a été de préciser la structure de ces dernières, ainsi que le mécanisme et la cinétique de ces conversions lipoprotéiques. Pour la clarté de l'exposé, nous rappellerons très brièvement quelques notions classiques sur les forces intermoléculaires d'association des diverses molécules, ainsi que la conception actuelle de la structure des lipoprotéines.

I. Structure des lipoprotéines

A. Forces intermoléculaires intervenant dans l'association des différentes molécules. On distingue:

a) *Les liaisons ioniques* résultant de l'attraction, soit de 2 ions ou de deux groupes chargés de signes contraires, soit de l'attraction d'un ion (ou groupe chargé) et d'un dipôle.

b) *Les forces de Van der Waals*. On rassemble sous cette dénomination les forces d'orientation (attraction dipôle-dipôle), d'induction (attraction de dipôles induits), de dispersion (forces attribuées à l'existence de dipôles instantanés).

c) *La liaison hydrogène*. Dans ce cas, les molécules sont unies par un atome d'hydrogène appartenant à l'une d'elles.

¹ Solubilité étant prise dans le sens large du terme, aptitude à former une solution claire par transparence.

B. Constitution des lipoprotéines. Selon les conceptions actuelles (4 et 22), les lipoprotéines seraient en général constituées par une micelle lipidique associée à une protéine par l'intermédiaire d'une molécule de phospholipide. Les interactions lipide-lipide de la micelle seraient dues à des forces de Van der Waals; par contre, la liaison phospholipide-protéine serait de type ionique, assurée par l'attraction d'un groupement positif de la protéine et d'un groupement négatif du phosphatide.

Cependant, il existe un type de lipoprotéine très différent, jouant un rôle important dans l'action clarifiante, c'est l'association albumine-acide gras, étudiée par de nombreux auteurs (19), qui en ont souligné le caractère *ionique*. C'est sur cette lipoprotéine que nous avons porté notre attention, en raison de l'action qu'elle exerce dans le phénomène de clarification, en captant, sous forme d'un complexe soluble, les acides gras libérés (6).

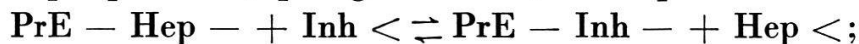
II. Principales acquisitions récentes sur le facteur clarifiant

Si on injecte de l'héparine à un animal présentant une lipémie postprandiale, son sang se clarifie rapidement (7 et 23). «In vitro», l'héparine ajoutée au plasma lipémique est sans effet, mais le plasma d'un animal hépariné depuis quelques minutes clarifie «in vitro» les sérums lipémiques (1). La clarification s'accompagne d'une *libération d'acides gras* (Shore 21, Brown 3), provenant de l'*hydrolyse des glycérides* liés aux protéines, phénomène chimique le plus important (Lindgren, 13). Gordon (6) puis Nikkila (18) ont insisté sur le rôle que joue l'albumine sérique comme accepteur de ces acides gras. Récemment, Korn (11) puis Overbeek (19) ont montré que l'action lipasique relève d'une enzyme d'un type particulier: il s'agit d'une lipoprotéine lipase. Libérée des cellules qui la contiennent par l'héparine, elle passe dans le sang et confère au plasma posthépariné ses propriétés clarifiantes. Mais la clarification d'un sérum lipémique (postrésorptif) peut-elle se réduire à l'action hydrolysante de cette lipase? Telle est la question que nous nous sommes posée.

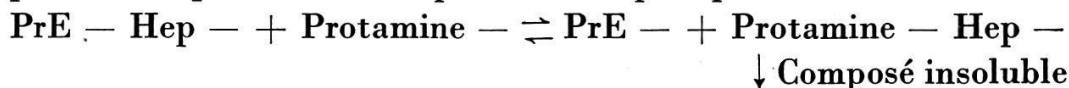
Il convient tout d'abord d'insister sur les *caractères principaux de cette enzyme*. Les expériences de Korn (12), celles de Meng et Hollett (17) et celles de Havel (8) permettent de dire que: l'enzyme est une *mucoprotéine* liée normalement aux protéines cellulaires par sa fraction polysaccharide (liaisons ioniques). L'héparine se substituerait au polysaccharide cellulaire (affinité plus grande), permettant à l'enzyme de passer dans le sang sous une forme active. Certains autres polysaccharides sulfates peuvent jouer ce rôle. La liaison enzyme-substrat se ferait – tout au moins en partie – par le polysaccharide (forces ioniques).

Tout facteur qui empêche la liaison entre l'héparine et la protéine enzyme (PrE) inhibe celle-ci:

1. Héparinase qui hydrolyse l'héparine;
2. inhibiteur plasmatique de *Meng* et *Hollett*, de nature mucosaccharidique probable, qui agirait de façon compétitive:



3. protamine qui s'unit à l'héparine en la précipitant:

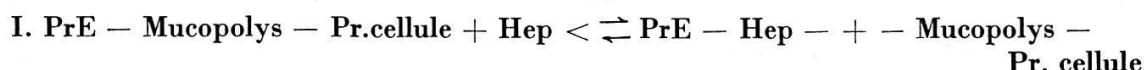


Ces deux inhibitions sont reversibles en présence d'un excès d'héparine.

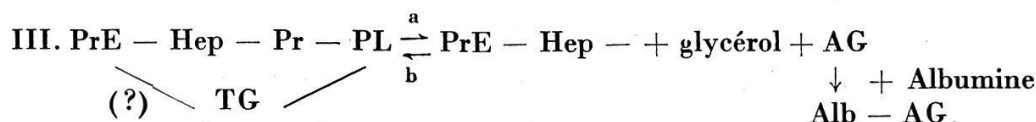
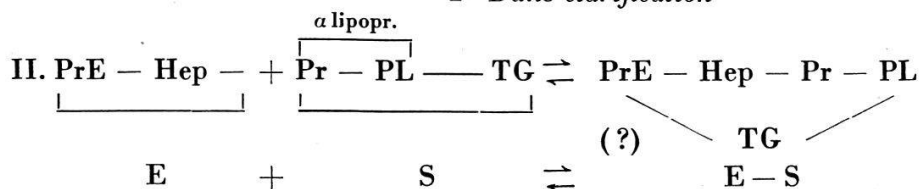
La lipoprotéine lipase n'hydrolyse pas les tri-, di- et monoglycérides libres, mais ceux incorporés dans les chylomicrons ou unis aux α et β lipoprotéines sériques (*Korn*, 11, p. 15). Dans ces deux types de lipoprotéines, le triglycéride serait uni par des forces de Van der Waals à un phospholipide, lui-même lié à la protéine par des liaisons ioniques. (On peut penser que des forces de Van der Waals interviendraient également dans l'union entre le triglycéride et la protéine lipase). La lipolyse n'aurait plus lieu, si l'union entre le glycéride et le phospholipide du chylomicron se trouvait rompue, c'est probablement ce qui se passe dans l'inhibition du facteur clarifiant par la lécithase de *Clostridium welchii*, étudiée par *Williams* (25).

En bref, après injection d'héparine à l'animal, on aurait la réaction (I) ci-dessous et l'enzyme ayant franchi la membrane cellulaire serait présente dans le plasma. Ce plasma ajouté à un sérum lipémique donnerait la lipolyse selon les réactions II et III. On aurait

1^{er} Dans cellule



2^e Dans clarification



Pr = Protéine, E = Enzyme, PL = Phospholipide, S = Substrat, AG = acide gras
TG = Triglycéride, — = liaison ionique, — = liaison de Van der Waals.

L'albumine en captant les acides gras au fur et à mesure de leur libération favorise la lipolyse, comme le ferait leur précipitation par le calcium.

III. Recherches personnelles

1. Etude de la lipoprotéine: Acide gras – albumine; technique de dosage

Nous avons porté notre attention sur la lipoprotéine acide gras – albumine; nous avons confirmé sa nature ionique et mis au point une technique rapide et sensible pour suivre la cinétique de son apparition au cours de l'action de la lipoprotéine lipase.

Nous nous sommes basés sur la métachromasie de l'éosine. L'un de nous (May, 15 et 16) a montré qu'une solution tamponnée d'éosine – colorant anionique – change de couleur en présence d'une série de substances C^+ , dites chromotropiques (albumine, sulfate de protamine, chlorure de dodécyltriméthylbenzylammonium etc. ...) qui toutes sont *colloïdales et cationiques*. De façon très symétrique, une solution de Bleu de toluidine, colorant cationique, change de couleur en présence d'une série de substances A^- toutes *colloïdales et anioniques*. De plus, les substances A^- peuvent supprimer l'effet chromotropique des substances C^+ , ce qui est une mise en évidence très simple des associations du type A-C; la classification des substances A^- et C^+ fait ressortir *le caractère ionique de la liaison entre A^- et C^+* . L'association acide gras – albumine est de ce type, comme le montre l'expérience suivante, qui illustre de façon intéressante le phénomène décrit ci-dessus.

Expérience: Une solution $0,8 \cdot 10^{-5}$ M, d'éosine en milieu tampon pH = 7, possède un spectre d'absorption visible I, dont le maximum est situé à 518 m μ . Si on y ajoute 0,02 % d'albumine de plasma de bœuf, le spectre d'absorption se transforme en une nouvelle courbe II, dont le maximum se situe à 530 m μ . Ce spectre correspond à l'éosine liée à l'albumine. Enfin, si l'on ajoute à cette dernière solution 0,001 % d'oléate de sodium, le spectre reprend sa forme initiale I, parce que l'éosine redevient libre, étant déplacée de ses associations avec la protéine par l'oléate, qui a une affinité plus grande que l'éosine pour l'albumine (fig. 1).

Ainsi, l'association acide gras – albumine appartient au type A-C, ce qui confirme sa nature ionique. Cette expérience nous a permis d'instituer une méthode rapide, adaptée à l'étude cinétique de l'action lipasique.

A. Etablissement d'une courbe de référence

On utilise une solution d'éosine $0,8 \cdot 10^{-5}$ M dans un tampon phosphate 0,05 M pH = 7 (la solution doit être fraîchement préparée et conservée à l'abri de la lumière). On y ajoute 0,8 % de plasma de rat et on constate que pour le plasma clair du rat normal, le spectre d'absorption obtenu est toujours le même, d'un animal à l'autre (6 animaux): c'est une courbe 2 semblable à la courbe II (fig. 1).

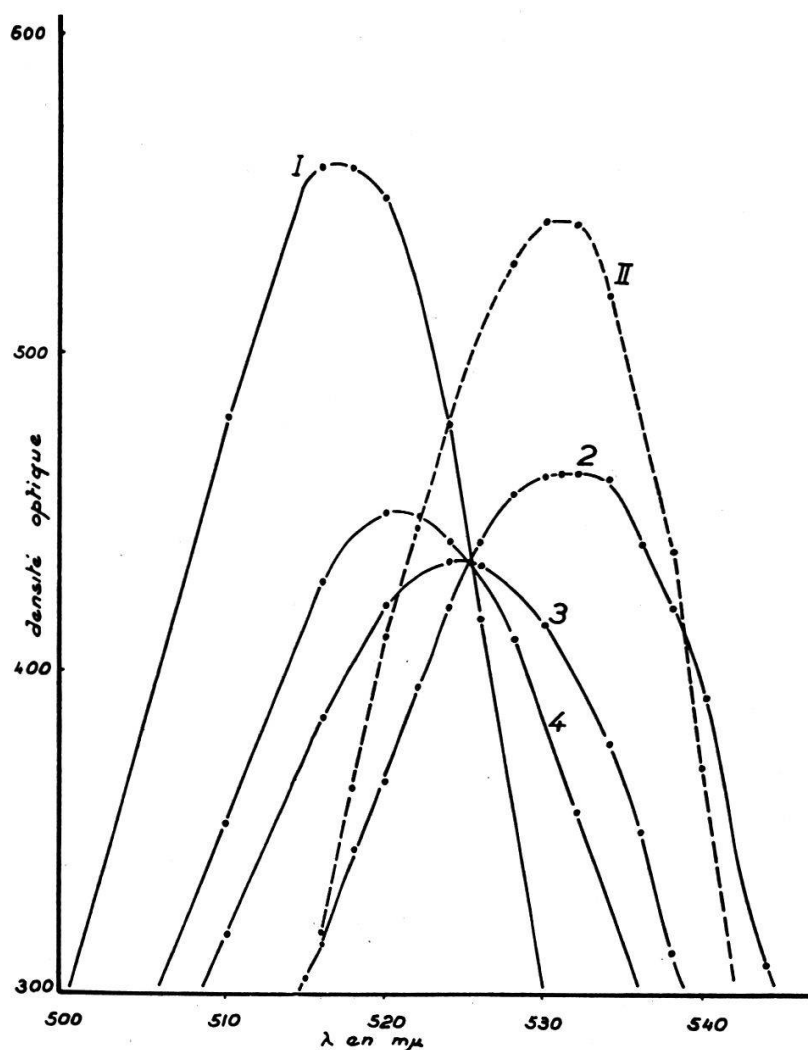


Fig. 1. Spectre I: $0,8 \cdot 10^{-5}$ M éosine. Spectre II: $0,8 \cdot 10^{-5}$ M éosine + 0,02% albumine de plasma de bœuf. Spectre 2: $0,8 \cdot 10^{-5}$ M éosine + 0,8% de plasma de rat. Spectre 3: $0,8 \cdot 10^{-5}$ M éosine + 0,8% de plasma de rat + $4 \mu\text{M}$ d'oléate par cm^3 de plasma. Spectre 4: $0,8 \cdot 10^{-5}$ M éosine + 0,8% de plasma de rat + $8 \mu\text{M}$ d'oléate par cm^3 de plasma. λ est la longueur d'onde en $\text{m}\mu$.

Si on ajoute alors des quantités croissantes d'oléate de sodium, 1 à $10 \mu\text{M}$ par ml. de plasma, le spectre se transforme progressivement et tend vers le spectre I. A chaque quantité d'oléate ajoutée, correspond un spectre bien déterminé, qui se définit le mieux par l'expression:

$$D = d_{516} - d_{536},$$

d_{516} et d_{536} étant les densités optiques de la solution sous 1 cm d'épaisseur à $\lambda = 516$ et $536 \text{ m}\mu$. On établit alors la courbe de la fig. 2, qui représente la variation D en fonction de la quantité d'oléate ajoutée; exprimée en μM par ml. de plasma.

B. Technique de mesure de la lipolyse dans un plasma

On prélève à des temps variables 0,4 ml. de plasma; on en dilue 0,2 ml. dans 25 ml. de la solution d'éosine et 0,2 dans 25 du tampon (témoin pour

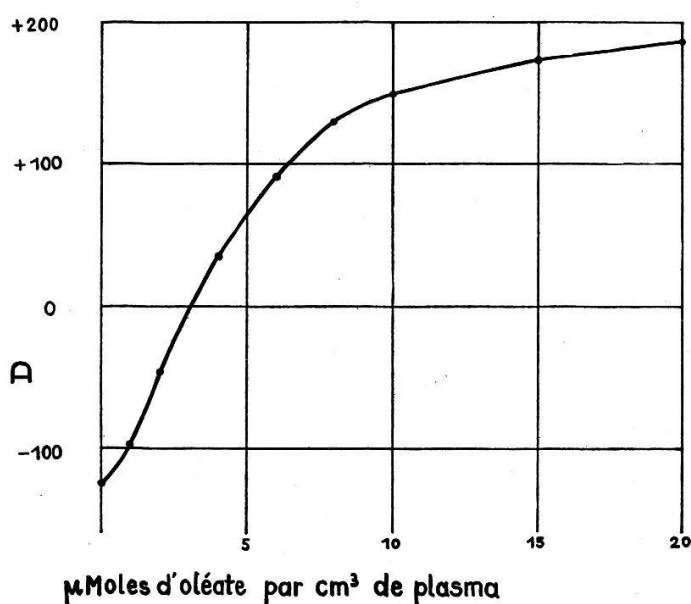


Fig. 2.

la spectrophotométrie). Deux lectures spectrophotométriques suffisent à 516 et 536 mμ. On en déduit $D = d_{516} - d_{536}$.

On peut ainsi représenter D en fonction du temps, ou encore en utilisant la courbe de la fig. 2, convertir D en concentration équivalente d'oléate, exprimée en μ M par ml. de plasma. On peut ainsi suivre l'évolution de la lipolyse. Cette méthode sensible est très rapide et utilise de très petites quantités de plasma. On peut obtenir, en quelques minutes, sur 0,2 à 0,4 ml. la quantité d'acide gras liée à l'albumine sérique. C'est à cette technique que nous nous sommes adressés pour préciser la corrélation entre l'action clarifiante et l'action lipasique d'un plasma post-hépariné vis à vis d'un plasma lipémique.

2. Clarification et lipolyse

Certaines observations expérimentales faites par d'autres auteurs et nous-mêmes, nous ont amenés à penser que si le facteur clarifiant est bien une lipoprotéine lipase, il est impossible de réduire la clarification à la lipolyse dont cette enzyme est responsable.

Nous avons constaté que, si l'on attend la fin de la résorption lipémique (10 à 12 heures après le repas gras), la lipémie postprandiale du rat se clarifie mal par action «in vitro» du facteur clarifiant, bien que l'on assiste encore à une libération parfois importante d'acides gras.

A. Technique utilisée

Le plasma lipémique est obtenu de la façon suivante: 6 ml. d'huile (huile de soja ou huile d'arachide) sont donnés par tubage stomacal à des rats mâles de 300 g. environ: 12 heures plus tard, l'animal est anesthésié

à l'éther, le sang prélevé par ponction aortique est recueilli sur du mélange de Wintrobe déshydraté. Le plasma contenant le facteur clarifiant est obtenu, en prélevant le sang d'un autre rat, 10 minutes après une injection intraveineuse de 10 mg/kg d'héparine¹. La clarification et la lipolyse sont suivies en fonction du temps d'incubation à 37° du mélange des deux plasmas. Nous exprimons la clarification par la diminution d'opacité, mesurée au spectrophotomètre Beckmann. La lipolyse est déterminée par la méthode décrite ci-dessus, en diluant la prise de plasma, d'une part avec la solution d'éosine, d'autre part, avec la solution tampon (témoin).

B. Résultats. – Pour un même plasma

a) *Clarification*: Le phénomène commence immédiatement et évolue durant la première demi-heure; il devient stationnaire à partir d'une heure. Si l'on poursuit longtemps l'incubation, on observe fréquemment une remontée de l'opacité. Signalons que dans nos expériences, il ne peut s'agir de la formation de savons de calcium, car le plasma est prélevé en présence d'un excès d'oxalate.

b) *Libération d'acides gras*: Après un démarrage brutal dans les 10 premières minutes, le phénomène diminue de vitesse, mais se prolonge au delà d'une heure; nos expériences ont été poursuivies 2 heures et l'action se continuait régulièrement.

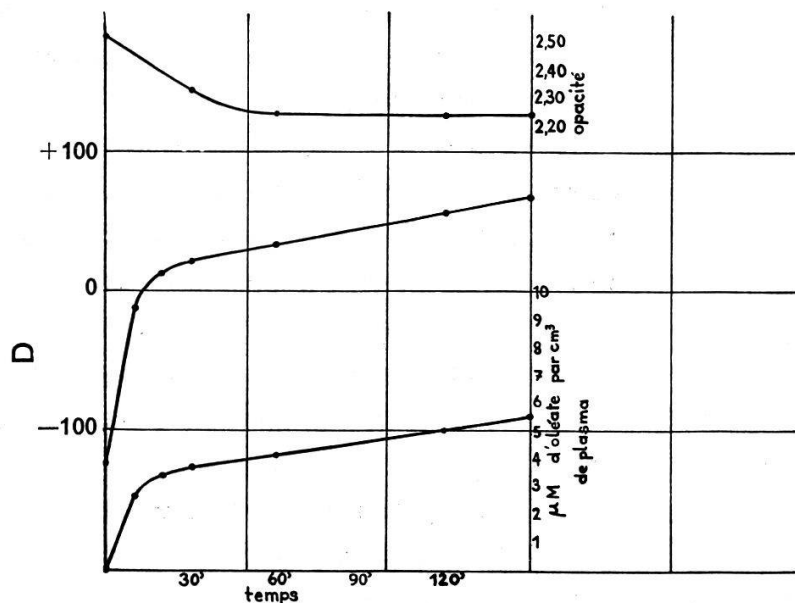


Fig. 3.

¹ Le rat no 5 du tableau montre que la quantité d'enzyme libérée atteint son maximum, 3 minutes après l'injection d'héparine.

Les courbes (fig. 3) illustrent, dans le cas d'un sérum, l'évolution des deux phénomènes et montrent que les cinétiques de la clarification et de la lipolyse ne sont pas parallèles.

Comparaison des résultats obtenus sur plusieurs plasmas

La discordance entre l'évolution des deux phénomènes apparaît encore plus nettement, si on compare les résultats obtenus après 1 heure d'incubation à 37° dans diverses expériences. Ils sont condensés dans le tableau.

Tableau 1

No des rats	Temps écoulé entre injection héparine et prélèvement (minutes)	Après 1 heure à 37°	
		Libération d'acides gras en M/ml.	Diminution de la densité optique
1	10	3	0,00
3	10	4	0,274
4	10	4,2	0,810
2	10	11	0,069
5	3	12,5	0,00
5	5	12,5	0,00
5	15	12,5	0,00

On voit que, dans certains cas, rat no 5, la lipolyse est importante pour une clarification nulle, alors que chez le rat no 4, on observe le phénomène inverse, une faible libération d'acides gras s'accompagne d'une importante diminution de l'opacité.

Ces expériences démontrent que le phénomène de la clarification de la lipémie post-résorptive par un plasma posthépariné ne saurait être ramené à l'action hydrolysante de la lipoprotéine lipase, conduisant à la solubilisation des acides gras libérés à partir des triglycérides des chylomicrons. Ce qui frappe dans l'exposé de nos résultats, c'est que l'action clarifiante est dépourvue de régularité, elle peut faire défaut à l'inverse de l'action lipasique toujours présente. Cette opposition se conçoit parfaitement, si on considère que l'action lipasique relève d'un mécanisme simple, tandis que l'action clarifiante s'avère beaucoup plus complexe, faisceau de réactions diverses, dont l'action lipasique ne serait qu'un élément. Au surplus, une clarification est un phénomène qui se prête facilement à des perturbations, une mesure d'opacité est globale, sans aucune spécificité. Nous cherchons actuellement à préciser dans quelle mesure les acides gras libérés ne risquent pas d'introduire une telle perturbation. Enfin, il y a un facteur encore mal connu et qui conditionne sans doute très étroitement l'action clarifiante, c'est la nature physico-chimique des chylomicrons, leur volume, la nature des associations entre les diverses

molécules qui les constituent etc. ... Les études poursuivies au laboratoire doivent à cet égard nous apporter des données, qui viendront compléter celles fournies par les intéressantes recherches de *Lindgren* (14) et de *Robinson* et collab. (20) d'une part, de *Jobst* et *Schettler* (10) d'autre part.

Résumé

Après avoir rappelé l'état actuel de nos connaissances sur le facteur clarifiant, on propose un schéma de son mécanisme d'action et des modifications lipoprotéiques concomitantes. Les auteurs se sont demandé, si la clarification d'un sérum lipémique peut se réduire à l'action hydrolysante de la lipoprotéine-lipase. Après l'exposé d'une méthode sensible permettant de suivre la cinétique de l'action lipasique, ils montrent qu'il n'y a pas de corrélation quantitative entre lipolyse et clarification et ils en concluent que la lipolyse conditionne la clarification, mais n'est pas seule déterminante.

Zusammenfassung

Nach einer Übersicht der Probleme, die mit dem «Clearing Factor» verbunden sind, wird ein Schema für den Wirkungsmechanismus dieses Faktors sowie für die gleichzeitige Mobilisierung der Lipoproteine vorgeschlagen. Eine empfindliche Methode wird mitgeteilt, welche die Kinetik der Lipaseaktion zu verfolgen erlaubt. Mit ihrer Hilfe wird gezeigt, daß keine quantitative Beziehung zwischen Hydrolyse und Klärung vorhanden ist und folglich, daß die Lipolyse eine Bedingung für die Klärung ist, dieselbe aber nicht allein bestimmt.

Summary

Following a critical survey of problems concerning the mechanism of action of the clearing factor, a scheme is proposed for this mechanism and for that of concomittant modifications of lipoproteins. A sensitive method has been devised for following the kinetics of the lipase action and by its use the authors establish that there is no quantitative correlation between lipolysis and clarification, as a result of which they conclude that lipolysis is a condition for clarification but does not solely determine it.

1. *Anderson, N. G., et Fawcett, B.*: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **74**, 768 (1950). – 2. *Anfinsen, C. B., Boyle, E., et Brown, R. K.*: Science **115**, 583 (1952). – 3. *Brown, R. K., Boyle, E., et Anfinsen, C. B.*: J. biol. Chem. **204**, 423 (1953). – 4. *Dervichian, D. G.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 5. *Frayssinet, C., et May, P.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 6. *Gordon, R. S., Boyle, E., Brown, R. K., Cherkes, A., et Anfinsen, C. B.*: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **84**, 168 (1954). – 7. *Hahn,*

P. F.: Science **98**, 19 (1943). – 8. *Havel, R. J.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 9. *Havel, R. J.*, et *Bragdon, J. H.*: Circulation (N.Y.) **10**, 591 (1954). – 10. *Jobst, H.*, et *Schettler, G.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 11. *Korn, E. D.*: J. Biol. Chem. **215**, 1, 15 (1955). – 12. *Korn, E. D.*, et *Quigley, Y. W.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 13. *Lindgren, F. F.*, *Nichols, A. V.*, et *Freeman, N. K.*: J. physiol. Chem. **59**, 930 (1955). – 14. *Lindgren, F. F.*, *Freeman, N. K.*, *Nichols, A. V.*, et *Gofman, J. W.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). 15. *May, P.*: C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 1343 (1955). – 16. *May, P.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 17. *Meng, H. C.*, et *Hollett, Ch.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 18. *Nikkila, E. A.*, et *Haahti, E.*: Acta chem. scand. **8**, 363 (1954). – 19. *Overbeek, G. A.*, et *Van der Vies*: Biochem. J. **60**, 665 (1955). – 20. *Robinson, D. S.*, *French, J. E.*, et *Harris, P. M.*: IIIe Colloque intern. Problèmes Biochimiques Lipides. Bruxelles, juillet 1956 (sous presse). – 21. *Shore, B.*, *Nichols, A. V.*, et *Freeman, N. K.*: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **81**, 475 (1952). – 22. *Tayeau, F. F.*: Exposés Ann. Biochim. méd. **17**, 213 (1955). – 23. *Weld, C. B.*: Proc. Can. Physiol. Soc. **1948**, 39. – 24. *Westphal, M.*, *Stets, J. F.*, et *Priest, S. G.*: Arch. Biochem. **43**, 463 (1953). – 25. *Williams, C. R.*: Biochem. biophys. Acta **13**, 72 (1954).