

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES LIPIDES SUR
LES PROTÉINES SÉRIQUES PRÉALABLEMENT
PRÉCIPITÉES

par

JEAN-LOUIS DELSAL *

Deux méthodes sont décrites permettant d'extraire les lipides sur les protéines sériques préalablement précipitées par l'hydroxyde de zinc (A) et par l'acide trichloracétique 5% (B). La méthode A permet d'obtenir les lipides totaux purifiés. La méthode B sépare les lipides en deux fractions : 1° cholestérol et glycérides ; 2° phosphore lipidique.

Lorsqu'on précipite les protéines sériques *directement* par le mélange éthanol-éther ou le chloroforme-méthanol, ou le méthylal-méthanol, l'extrait lipidique obtenu contient de nombreuses impuretés non lipidiques et principalement de l'urée. La redissolution de l'extrait lipidique sec dans le chloroforme ou l'éther de pétrole purifie seulement partiellement ces lipides.

Des moyens ont été proposés pour éliminer ces impuretés. W.M. Sperry (1) décrit une microméthode basée sur le lavage des lipides selon J. Folch et col. (2). Une telle méthode est délicate en micro-analyse. Nous l'avons cependant appliquée sur les lipides de 5 à 10 ml de sérum et avons constaté une baisse de poids des lipides pouvant atteindre 25%. Ceci démontre l'importance des impuretés non lipidiques dans les extraits lipidiques directs.

Un autre moyen consiste à éliminer ces impuretés non lipidiques *avant* d'extraire les lipides. C'est ce moyen qui a retenu notre attention. De plus, notre but a été de mettre au point des méthodes simples, applicables en clinique, et permettant le dosage de maximum de substances avec le minimum de sérum.

* C.R. Ac. Sc. 1957, 244, 2252-2255

Voici deux méthodes d'analyse conduisant à des résultats intéressants.

A. *Méthode de précipitation par l'hydroxyde de zinc.* — C'est le principe de la méthode de Somogyi (3). Nous précipitons 1 ml de sérum, mélangé avec 7 ml d'eau distillée, par 1 ml de solution à 10% de $\text{SO}_4 \text{Zn}$, 7 $\text{H}^2 \text{O}$ et 1 ml de soude 0,5 N. Après 15 mn nous centrifugeons et lavons le précipité (deux fois) avec 5 ml d'eau distillée. Le premier surnageant et les deux liquides de lavages sont réunis et complétés à 25 ml avec de l'eau distillée. On peut doser, sur cette solution, notamment l'urée et le calcium.

Les lipides du précipité des lipoprotéines sont extraits par 25 ml de solvant des lipides; méthylal-méthanol (4/1) ou chloroform-méthanol (2/1) ou éthanol-éther (3/1). Après 30 mn de repos nous centrifugeons et lavons les protéines avec 10 ml de solvant. Les solvants d'extraction et de lavage sont réunis et évaporés, sous vide, à une température inférieure à 45°. Les lipides sont dissous dans le chloroforme (10 ml); ils sont presque complètement solubles à l'exception d'un très léger résidu contenant des traces de phosphore organique. Nous dosons, sur cette solution chloroformique, le cholestérol total, libre et estérifié ainsi que le phosphore lipidique. On obtient, par cette méthode, des lipides purifiés ne contenant ni urée, ni phosphore minéral (celui-ci restant avec les protéines).

Les protéines, restant après l'extraction des lipides, sont reprises dans 20 ml de solution d'acide trichloracétique à 5%. L'hydroxyde de zinc passe en solution ainsi que le phosphore minéral (qui peut être dosé), et les protéines précipitent. Les protéines ainsi obtenues sont purifiées et ne contiennent ni azote non-protéinique, ni azote lipidique. On peut, après centrifugation, les dissoudre dans de la soude N/10 et les doser par micro-Kjeldahl, par transformation en biuret ou le réactif des phénols de Folin et Ciocalteu selon la méthode de O.H. Lowry et col. (4).

Si l'on veut obtenir des protéines dénaturées au minimum, on appliquera cette méthode en précipitant les protéines à + 4° et en les délipidant à - 15°. Les protéines seront ensuite éluées du précipité d'hydroxyde de zinc, après ces opérations, par un tampon phosphaté pH 7,5, force ionique I et dialysées.

De nombreux auteurs utilisent notre méthode (5) d'extraction des lipides du sérum par le méthylal-méthanol; nous leur conseillons cette modification permettant d'obtenir des lipides purifiés.

Si l'on reprend le résidu sec lipidique dans l'éther de pétrole, au lieu du chloroforme, on dissout moins de cholestérol et de phos-

pholipides. Cependant, en employant l'éther de pétrole, il n'y a jamais de séparation en deux fractions comme nous allons l'observer dans la méthode suivante.

B. Méthode de précipitation par l'acide trichloracétique. — Nous utilisons 10 ml d'acide trichloracétique à 5% pour précipiter les protéines de 1 ml de sérum. Cette concentration est suffisante pour que la précipitation des protéines soit complète (à l'exception des mucoprotéines) et faire passer en solution : les chlorures, les sulfates, le phosphore minéral et acidosoluble, les substances azotées non-protéiniques et principalement l'urée, le calcium, le sodium. Après un contact de 15 mn et centrifugation, les protéines sont lavées deux fois avec 5 ml d'acide trichloracétique à 5%. Le premier surnageant et le liquide des deux lavages sont réunis et complétés à 25 ml avec de l'acide trichloracétique à 5%. On peut doser, sur cette solution, les composés précédemment énoncés.

On ajoute ensuite 25 ml de solvant des lipides aux protéines précipitées. Comme l'ont déjà constaté M.G. et J. Delaville (6), une partie des protéines (albumine) se dissout dans cet extrait lipidique des solvants utilisés (pH 3,0). On neutralise jusqu'à pH 6,5-7,0 (électrode de verre) avec de l'éthylate de sodium, d'abord normal, puis N/10 à la fin de la neutralisation. Les protéines précipitent complètement. Après un contact de 30 mn, on centrifuge et lave les protéines avec 10 ml de solvant qu'on ajoute, après centrifugation, à la première extraction. Les solvants sont évaporés sous vide à une température inférieure à 45°. Le résidu sec est repris par l'éther de pétrole (60°-80°). On obtient une fraction I soluble dans l'éther de pétrole ; le résidu, insoluble dans l'éther de pétrole, est soluble dans le méthanol ou l'eau distillée et constitue la fraction II. Nous constatons alors que la fraction I contient tout le cholestérol du sérum avec les glycérides et pas du tout de phosphore lipidique et qu'au contraire la fraction II ne contient pas de cholestérol et tout le phosphore lipidique sous forme d'un complexe (dont l'analyse sera donnée ultérieurement) qui a le caractère analytique tout à fait spécial d'être soluble dans l'eau distillée. On dose le cholestérol sur la fraction I et le phosphore lipidique sur la fraction II.

Après extraction des lipides les protéines se dissolvent très facilement dans la soude N/10 et peuvent être dosées. Les résultats sont sensiblement égaux à ceux obtenus avec la méthode A.

Cette méthode B ne convient pas pour le dosage des lipides totaux, c'est, dans ce cas, la méthode A qu'il faut employer.

- (1) *Methods of Biochemical Analysis*, 2, 1955, p. 83.
- (2) *J. Biol. Chem.*, 191, 1951, p. 833.
- (3) *J. Biol. Chem.*, 86, 1930, p. 655 et 87, 1930, p. 339.
- (4) *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.
- (5) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 26, 1944, p. 99.
- (6) *Ann. Pharm. Franç.*, 12, 1954, p. 109.