

LES PHOSPHATIDES DU SÉRUM SANGUIN

par

JEAN-LOUIS DELSAL

I- GÉNÉRALITÉS :

Phosphatidylcholine
Phosphatidyléthanolamine
Phosphatidylsérine
Sphingomyéline
Acétal-phosphatides
Acides phosphatidiques
Phosphoinositides

II- PRÉPARATION D'UN EXTRAIT LIPIDIQUE TOTAL CONTENANT TOUS LES PHOSPHATIDES : (cas d'un sérum liquide fraîchement récolté)

- a) méthode de Kumagawa
- b) méthode de Bloor
- c) méthode de Folch
- d) méthode de Delsal

Autres solvants extractifs des lipides : acétone ; acétone-éthanol ; trichloréthylène ; tétrahydrofurane.

III- MÉTHODES DE PURIFICATION D'UN EXTRAIT LIPIDIQUE :

- a) méthode de Folch et Van Slyke
- b) méthode par dialyse de l'émulsion lipidique
- c) méthode de McKibbin et Taylor
- d) méthode de Johnson et Dutch
- e) méthode de Le Breton et Clément-Champougny
- f) méthode de lavage de Folch et al.

IV- MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES :

- a) Précipitation des phosphatides par l'acétone
- b) fractionnement des lipides par chromatographie
- c) fractionnement des lipides par contre courant

V- MÉTHODE COMBINÉE DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION DES LIPIDES :**VI- MÉTHODES D'HYDROLYSE DES PHOSPHATIDES :****A) Méthodes chimiques :**

- a) méthanol chlorhydrique
- b) acide chlorhydrique 6N
- c) hydrolyse alcaline

B) Méthodes enzymatiques :

- a) Lécithinase A
- b) Lécithinase B
- c) Lécithinase C
- d) Lécithinase D

VII- CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES PRODUITS D'HYDROLYSE :

- a) système de solvants pour la chromatographie sur papier
- b) révélation des spots : sérine, éthanolamine, choline, sphingomyéline, esters phosphoriques, acétal-phosphatides, acides aminés soufrés, sucres réducteurs, acides gras et aldéhydes non saturés.

VIII- ANALYSE CHIMIQUE DES PHOSPHATIDES :

- a) Phosphore lipidique
- b) Choline
- c) Ethanolamine et sérine
- d) Sphingomyéline

IX- TAUX DES DIVERS PHOSPHATIDES DU SÉRUM SANGUIN :**X- RÔLE DES PHOSPHATIDES DANS La RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS :****CONCLUSIONS :**

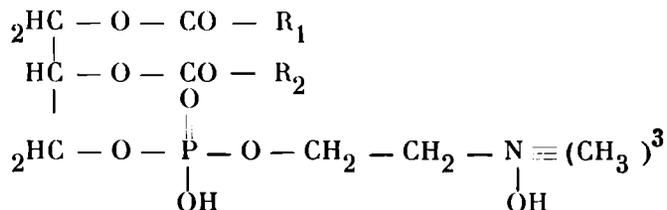
I- GÉNÉRALITÉS

L'ancienne classification des phosphatides en : lécithine, céphaline et sphingomyéline a été modifiée par Folch (1948) en : phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et sphingomyéline.

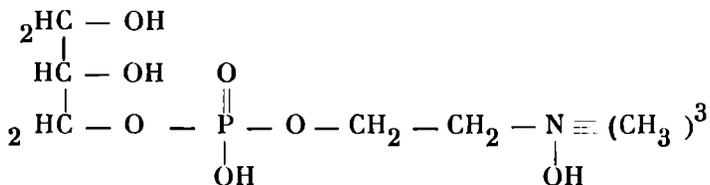
Précisons les formules de ces substances pour mieux faire comprendre leurs propriétés analytiques et leurs méthodes de dosage.

Phosphatidylcholine :

La phosphatidylcholine remplace en terminologie l'ancienne lécithine. Elle est constituée par une molécule de glycérol, une molécule d'acide phosphorique, [deux molécules d'acides gras (un saturé, l'autre non saturé) et une molécule de choline. Sa formule (forme alpha) peut s'écrire :



Cette formule a été justifiée par les nombreux travaux qui ont été effectués pour déterminer sa composition. Delezenne et Fourneau (1914) ont montré que l'enzyme contenu dans le venin de cobra (lécithinase A) sépare l'acide gras non saturé de la molécule de phosphatidylcholine laissant intact l'acide gras saturé. La phosphatidylcholine est transformée en lysophosphatidylcholine. Cette substance lyse les globules rouges du sang; l'action mortelle du venin sur le sang s'expliquant par la formation de lysophosphatidylcholine par l'enzyme du venin. D'après une autre terminologie proposée par Fairbairn (1945) cet enzyme est aussi appelé phospholipase. Dans le *Penicillium notatum* Fairbairn (1948) isole un autre enzyme (la lysophospholipase) qui agit sur la lysophosphatidylcholine pour la transformer en glycérylphosphorylcholine (forme alpha) :



Phospholipase et lysophospholipase sont synonymes de lécithinase A

dis que la forme bêta ne réagit pas. Burmaster (1946) a précisé les conditions expérimentales de ce principe. Il est donc possible de déterminer le pourcentage de l'une et l'autre forme dans un mélange. Mais pour effectuer ce dosage il faut libérer l'acide glycérophosphorique par une hydrolyse. Or cette hydrolyse vient tout fausser. Bailly et Gaumé (1934) ont montré qu'une hydrolyse alcaline du diester méthyl - bêta - glycérophosphorique donnait 1/3 de forme alpha, tandis qu'une hydrolyse acide donnait 2/3 de forme alpha. J. Folch (1942) a confirmé que la proportion des formes alpha et bêta dépendait du mode d'hydrolyse. Avec une hydrolyse acide on obtient 73 % de forme alpha et 27 % de forme bêta; au contraire une hydrolyse alcaline (barytique par exemple) permet de trouver 80 % de forme bêta. Par des hydrolyses, acide ou alcaline, il est donc impossible de savoir sous quelle forme alpha ou bêta l'acide glycérophosphorique se trouve *initialement* dans les phosphatides. Cependant si une hydrolyse chimique est incapable de résoudre la question, une hydrolyse enzymatique va permettre de le faire. Schmidt, Hershman et Thannhauser (1954) ont démontré que la glycérylphosphorylcholine obtenue par hydrolyse enzymatique de la phosphatidylcholine du pancréas avait la structure alpha. Baer et Kates (1948) synthétisent une alpha-glycérylphosphorylcholine et montrent son identité avec le produit naturel précédent. De plus Baer et Kates (1950) synthétisent une alphasphingomyéline et montrent son identité avec la dipalmitylphosphorylcholine obtenue à partir du cerveau de bœuf par Thannhauser, et Boncoddò (1948). Thannhauser, Boncoddò et Schmidt (1951) montrent également que l'acétal-phosphoryléthanolamine isolée du cerveau a aussi une forme alpha. En conclusion il semble donc bien que la forme initiale des phosphatides naturels soit alpha.

Les acides gras de la phosphatidylcholine sont le plus souvent acide palmitique et acide oléique; cependant il peut exister d'autres acides gras saturés et non saturés d'où la complexité des phosphatidylcholine (Riemenschneider et al. 1938)

Préparation de la phosphatidylcholine :

Des méthodes récentes de préparation de la phosphatidylcholine, à partir du jaune d'œuf, ont été données par Faure (1950), Pangborn (1951) Hanahan, Turner et Jayko (1951). Ces derniers trouvent dans leur préparation 75 % d'acides gras saturés et 25 % d'acides gras non saturés. L'indice d'iode de ces préparations varie d'une méthode à l'autre (Hanahan et al. 75, 78 et 88; Faure 64 et Pangborn 55). C'est qu'en effet il est très difficile, au cours des divers fractionnements chimiques effectués, d'éviter l'oxydation d'où la divergence des indices d'iode trouvés. La méthode de préparation donnée par Hanahan et al.,

aboutissant à un produit moins oxydé a notre préférence.

La méthode classique de préparation de la phosphatidylcholine du jaune d'œuf est basée sur la formation d'un complexe avec le chlorure de cadmium. C'est la méthode employée par Faure et par Pangborn. Son principe est le suivant : les jaunes d'œuf sont d'abord extraits à l'acétone qui, tout en enlevant le cholestérol et les glycérides, les déshydratent. La poudre blanc crème obtenue est extraite, par agitation, avec de l'alcool à 95°. L'extrait alcoolique est précipité par un léger excès de solution aqueuse de chlorure de cadmium. Le précipité est lavé, dissous dans le chloroforme et purifié par des précipitations successives. Le complexe phosphatidylcholine-cadmium est dissous dans le chloroforme et dissocié en phosphatidylcholine et chlorure de cadmium par l'alcool à 30 %. Cette opération est recommencée plusieurs fois jusqu'à ce que le cadmium soit complètement enlevé. Faure, Hanahan et al. terminent la purification de la phosphatidylcholine par chromatographie sur alumine. On obtient ainsi des produits dont le rapport N/P est voisin de 1. Cependant ces produits ne sont pas encore purs. Lea et Rhodes (1954) ont montré que si la phosphatidylcholine préparée par Hanahan et al. ne contient pas d'azote aminé décelable par la méthode de Van Slyke, après hydrolyse, elle en contient cependant des traces décelées par la méthode de Lea et Rhodes (chromatographie sur papier des phosphatides non hydrolysés). Ces auteurs ont montré que des acides aminés libres contaminaient la phosphatidylcholine et qu'il était possible de les enlever complètement par une chromatographie sur colonne de cellulose ou sur échangeur d'ions.

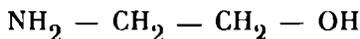
La méthode de préparation donnée par Hanahan, Turner et Jayko (1951), basée sur l'insolubilité des phosphatides dans l'acétone et ne faisant pas intervenir le complexe phosphatidylcholine-cadmium est plus simple et diminue les risques de dissociation de la phosphatidylcholine. La chromatographie sur alumine doit être suivie d'une chromatographie sur cellulose pour obtenir un produit qui donne de bonnes caractéristiques de pureté. Celles-ci doivent être les dosages de l'azote, du phosphore, de la choline, des acides gras et de leur indice d'iode ; ce qui permet d'établir les rapports : N/P ; Choline/P ; Acides gras/P qui doivent être respectivement de : 1 ; 1 ; et 2 sur un produit pur. Après hydrolyse acide (HCl 6N ; 100° ; 48 heures) la seule base décelée doit être la choline à l'exclusion d'acides aminés, d'éthanolamine ou de sérine.

Phosphatidyléthanolamine :

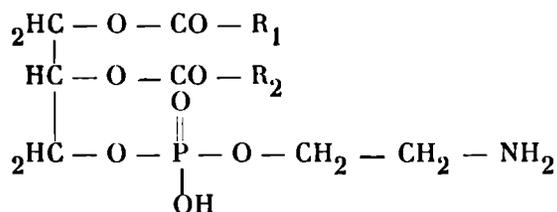
Les travaux de J. Folch (1941) ont montré que la céphaline était un mélange de phosphatidyléthanolamine, de phosphatidylsérine

et même, pour certains tissus, de phosphatidylinositol.

L'ancienne formule de la céphaline correspond à celle de la phosphatidyléthanolamine. La choline, dans la formule de la phosphatidylcholine, est remplacée par l'éthanolamine (ou colamine) :



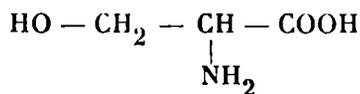
dans la phosphatidyléthanolamine. La formule d'une phosphatidyléthanolamine (forme alpha) peut donc s'écrire :



La méthode de préparation d'une phosphatidyléthanolamine sera décrite en même temps que celle de la phosphatidylsérine. On obtient une poudre blanche, facilement soluble dans l'alcool, qui se colore en brun en vieillissant même sous vide et à l'obscurité. Elle retient 1,7 % d'eau; le séchage à 80° sous vide enlève cette eau qui est reprise par la substance dans un dessiccateur à chlorure de calcium sous vide. L'indice d'iode de 70 indique la présence de deux doubles liaisons par atome de phosphore; cependant les acides gras R₁ et R₂ sont différents de ceux de la phosphatidylsérine.

Phosphatidylsérine :

Folch et Schneider (1941) constatent qu'une céphaline préparée par les méthodes usuelles avait 40 à 70 % de son azote aminé sous forme de sérine :



Folch (1941) donne le nom de phosphatidylsérine à cette nouvelle substance, la considérant comme un ester de sérine et d'acide phosphorique. Folch et Woolley (1942) montrent aussi qu'une céphaline isolée du cerveau contient d'autres phosphatides dont un contient de l'inositol. Folch (1942) donne une méthode de séparation des trois phosphatides basée sur la différence de solubilité de ces substances

dans les mélanges chloroforme-éthanol. En ajoutant à une solution chloroformique de céphaline brute des quantités croissantes d'alcool, on obtient 5 fractions dont 3 correspondent à : phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et un mélange de phosphatides dont un au moins contient de l'inositol.

La céphaline brute est préparée à partir de cervelles fraîches de bœuf. On les extrait d'abord à l'acétone, puis la céphaline est extraite à l'éther de pétrole. Celui-ci est chassé complètement et le résidu sec est dissous dans l'éther. La céphaline de la solution étherée est précipitée par 5 volumes d'alcool. Le précipité recueilli est lavé à l'acétone. La céphaline brute ainsi obtenue est une poudre jaune; on en obtient environ 15 g par Kg de tissu. Cette poudre contient 4,14 % de P; 1,59 % d'azote dont 1,51 % sont sous forme d'azote aminé; le rapport P/N est de 1,17.

La céphaline brute ainsi obtenue est fractionnée par la méthode au chloroforme-éthanol.

1 g de céphaline brute est dissous dans 8 ml de chloroforme; on ajoute 9,1 ml d'alcool absolu. Le précipité qui se forme (fraction I) est un phosphatidylinositol.

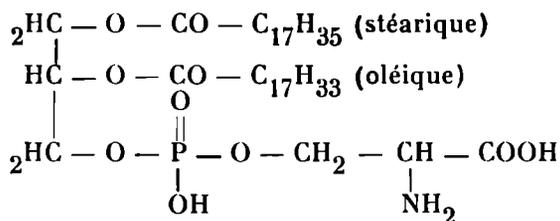
On ajoute au surnageant 2,7 ml d'alcool. Il se forme une fraction II (mélange).

On ajoute alors 25 ml d'alcool au surnageant. Le précipité obtenu (fraction III) correspond à la phosphatidylsérine.

Le filtrat est concentré à volume moitié et laissé 2 à 3 jours à la glacière. Un précipité se forme (fraction IV), (mélange).

Le filtrat est concentré à 1 ml et on ajoute 5 ml d'acétone. Après 1 jour à la glacière une substance insoluble dans l'acétone précipite (fraction V), c'est la phosphatidyléthanolamine.

La purification de ces fractions est faite par dialyse d'une émulsion aqueuse à 3 % contre de l'eau distillée 4 jours à + 4°. L'émulsion est lyophilisée; pour que la poudre obtenue soit moins floconneuse, on la met en suspension dans l'acétone, filtre et sèche. Folch (1948) précise la formule de la phosphatidylsérine et montre qu'elle correspond bien à la formule :



La phosphatidylsérine obtenue par fractionnement au moyen des solvants neutres est sous forme de sel de K et Ca. Pour obtenir la base libre correspondant à la formule précédente, il faut acidifier l'émulsion aqueuse jusqu'à pH 1,5 environ. Le précipité qui se forme est dialysé et lyophilisé. Le traitement à l'acétone permet l'obtention d'une poudre moins floconneuse et plus facile à manipuler.

La poudre desséchée sous chlorure de calcium dans le vide retient encore 1,8 % d'eau qu'elle perd à 80° sous vide.

La phosphatidylsérine est soluble dans le chloroforme, l'éther et l'éther de pétrole; insoluble dans l'éthanol, le méthanol ou l'acétone.

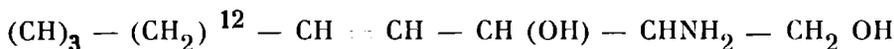
La meilleure conservation de la substance est en solution chloroformique à - 72° (neige carbonique).

L'indice d'iode de la phosphatidylsérine est de 40. Folch a montré que les acides gras liés au glycérol sont: stéarique et oléique. L'indice d'iode de la phosphatidyléthanolamine est de 78; la composition en acides gras de ces deux phosphatides est donc très différente.

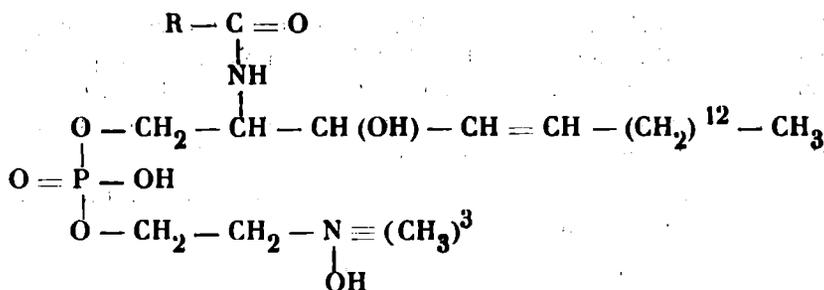
Sphingomyéline :

Nous avons étudié précédemment les monoaminophosphatides dans lesquels le rapport N/P est de 1; nous arrivons maintenant aux diamino-phosphatides de rapport N/P = 2 dont le représentant le plus connu est la sphingomyéline.

Des travaux importants sur les sphingolipides ont été effectués par Carter et al. (8 mémoires de 1947 à 1954). La formule de la sphingosine établie par Levene (1916), puis par Klenk (1929) a été nettement définie par Carter :



D'après les travaux récents sur la structure de la sphingomyéline effectués par Rouser, Berry, Marinetti et Stolz (1953), on peut lui attribuer la formule :



La sphingomyéline est donc constituée par : de la choline, de la sphingosine, de l'acide phosphorique et un acide gras R. La sphingomyéline diffère nettement des autres phosphatides par sa grande stabilité. Elle est souvent en association avec des cérébrosides dont elle est séparée par chromatographie sur alumine dans un solvant éther de pétrole-méthanol (9/1) (Thannhauser et Setz, 1936). Dans les phosphatides insolubles dans l'éther isolés du poumon de bœuf, la sphingomyéline est associée avec la dipalmitylphosphatidylcholine. (Thannhauser, Benotti et Boncoddo, 1946).

La sphingomyéline est une substance blanche cristalline, non hygroscopique, stable à l'air et à la lumière. Elle est soluble dans le benzène, l'alcool chaud, l'acétate d'éthyle chaud ; insoluble dans l'acétone et dans l'éther. Klenk et Rennkamp (1941) ont montré que la sphingomyéline n'était pas touchée par l'éthylate de sodium. Thudichum (1901) avait déjà signalé que la sphingomyéline est beaucoup plus résistante aux alcalis que les monoaminophosphatides.

Schmidt, Benotti, Hershman et Thannhauser (1946) ont fait des études quantitatives et sont arrivés à la conclusion que la sphingomyéline résiste à la potasse normale à 37° pendant 24 heures. Dans ces mêmes conditions, les monoaminophosphatides sont hydrolysés. Cette propriété analytique très importante a été appliquée pour la préparation de sphingomyéline pure.

Thannhauser et al. ont mis au point des méthodes de préparation de la sphingomyéline à partir du poumon (1946), de la rate et du cerveau (1948). On isole d'abord la fraction lipidique insoluble dans l'éther qui est ensuite fractionnée par l'acide acétique-acétone. Le précipité obtenu contient principalement la sphingomyéline avec de petites quantités d'hydrolécithine, de cérébrosides et d'acides aminés libres. Le filtrat au contraire est enrichi en hydrolécithine. Le précipité est purifié par une hydrolyse alcaline (agitation 4 à 5 jours à 37° avec NaOH 0,25 N). La sphingomyéline résistante à cette hydrolyse alcaline est séparée. Elle est purifiée par recristallisation dans un mélange

acétate d'éthyle-méthanol. Les cérébrosides sont enlevés par chromatographie sur alumine. Les phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine, par adsorption sur magnésie (Taurog et al., 1944), et les sels minéraux par dialyse contre de l'eau distillée. Le produit obtenu à partir du cerveau a un point de fusion de 170—171°.

La composition de la sphingomyéline du cerveau est différente de celle isolée du poumon ou de la rate.

Sphingomyéline du cerveau : Les acides gras trouvés sont : acide lignocérique, acide stéarique, acide nervonique (non saturé), dans les proportions approximatives de 1:2:2. Il n'y a pas d'acide palmitique. La sphingosine est un mélange d'hydrosphingosine (saturée) et de sphingosine non saturée. Carter et al. (1947) signalent également une hydrosphingosine dans les cérébrosides.

Sphingomyéline de la rate et du poumon : Les acides gras sont tous saturés et constitués par une proportion égale d'acide lignocérique et d'acide palmitique.

Par l'exposé rapide de ces résultats, on se rend compte de la complexité de la sphingomyéline. La sphingomyéline du sérum n'a pas été l'objet jusqu'à présent d'un travail similaire. La composition des acides gras ni celle de la sphingosine (saturée ou non) n'ont été déterminées. Pour appliquer la méthode de Thannhauser et al. à la préparation de la sphingomyéline du sérum, il faudrait utiliser une quantité énorme de sang ; il est certain que les méthodes modernes de chromatographie ou d'électrophorèse sur papier permettront d'aborder ce problème.

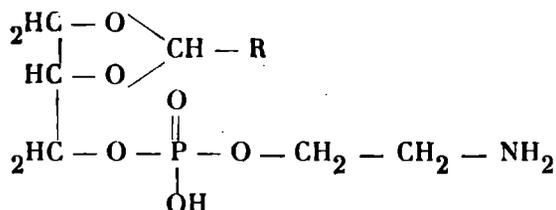
Les phosphatides que nous venons de décrire ont été mis en évidence et dosés dans le sérum ; il existe cependant d'autres substances à base de phosphore qui ont été décelées dans d'autres organes et dont la présence n'a pas été, jusqu'à maintenant, signalée dans le sérum. Nous allons les passer rapidement en revue.

Acétal-phosphatides :

Ces composés ont été décelés dans le cytoplasme des cellules par la coloration des aldéhydes avec le réactif de Schiff (Feulgen et Rossenbeck, 1924). Le groupement aldéhyde de ces substances est lié. Feulgen et Voit (1924) les appellent : plasmalogènes.

En 1939 Feulgen et Bersin isolent ce composé à partir du muscle de bœuf et l'identifie à un acétal de glycerylphosphoryléthanolamine. Thannhauser et al. (1951) donnent une méthode de préparation de l'acétal phosphatide du cerveau. L'hydrolyse de ce composé par l'acide acétique à 20 % à 37°, pendant 48 heures, fournit un alpha glyceryl-

phosphoryléthanolamine. La formule d'un acétal-phosphatide est donc :



La transformation des aldéhydes en acides gras permet de trouver les acides palmitique et stéarique.

Les acétalphosphatides du cerveau contiennent donc du palmitaldéhyde et du stéaraldéhyde; la teneur en aldéhyde palmitique étant plus grande qu'en aldéhyde stéarique.

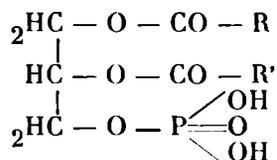
Ces substances sont dosées par leur aldéhyde avec le réactif de Schiff. La meilleure méthode est celle préconisée par Ehrlich, Taylor et Waelsch (1948) en comparant avec un témoin de palmitaldéhyde et de stéaraldéhyde (Anchel et Waelsch, 1944).

Signalons que ces substances sont résistantes (comme la sphingomyéline) aux alcalis, mais sont rapidement hydrolysés par les acides à la température du laboratoire. Il faut tenir compte de ce fait dans le dosage direct de la sphingomyéline.

Acides phosphatidiques :

Parmi les lipides phosphorés nous devons signaler également la présence des acides phosphatidiques. Ces acides contiennent du phosphore mais pas d'azote et ont un caractère acide très marqué.

Ils se dissolvent dans l'eau lorsqu'ils sont à l'état de sels (K, Na, Am, Mg); cependant si on libère les acides phosphatidiques des cations ils sont alors solubles dans l'éther, le chloroforme, le benzène, etc. Un acide phosphatidique simple peut se représenter par la formule :



De tels acides ont été trouvés dans les feuilles de choux par Chibnall et Channon (1927, 1929)

Machebœuf, Levy et Faure (1935, 1937), Faure (1940) ont montré que dans les bacilles tuberculeux on rencontre des acides phosphatidiques complexes dans lesquels le glycérol est remplacé par des glucides. C'est à certains de ces acides phosphatidiques que le bacille tuberculeux doit certains de ces caractères biologiques (fixation de l'alexine en présence de l'antisérum homologue).

M. C. Pangborn (1941 à 1947) isole à partir du muscle cardiaque une substance qu'elle appelle *cardiolipide*. L'hydrolyse alcaline de *cardiolipide* donne de l'acide linoléique, de l'acide oléique et un polyester d'acide phosphorique et de glycérol. Le *cardiolipide* sert d'antigène spécifique dans le sérodiagnostic de la syphilis.

Faure et Coulon (1948) mettent au point une méthode de préparation des acides phosphatidiques. Grâce à cette méthode ils ont pu isoler un acide glycéro-inosito-phosphatidique contenu dans le germe de blé (1953) et obtenir un acide glycéro-inosito-phosphatidique cristallisé à partir du muscle cardiaque de bœuf (1954).

Mais il ne faudrait pas conclure que les acides phosphatidiques préexistent dans les tissus. Il faut se rappeler que Hanahan et Chaikoff (1947, 1948) ont montré l'existence d'enzymes thermostables (dans la carotte et le chou) capables de couper la base azotée (choline) de l'acide phosphorique. L'activité d'un tel enzyme peut expliquer l'isolement d'acide phosphatidique des feuilles de chou par Chibnall et Channon.

Dans les solvants organiques polaires, Legault-Demare et Faure (1951) ont montré que les sels minéraux ou organiques des acides phosphatidiques sont à l'état moléculaire. Dans les solvants organiques apolaires, les sels minéraux des acides phosphatidiques sont à l'état micellaire, alors que les sels organiques de ces acides sont à l'état moléculaire.

Nous n'avons pas connaissance de l'existence d'acide phosphatidique dans le sérum.

Phosphoinositides :

Ce sont les lipides à base d'inositol et de phosphore; quelques-uns ont été isolés du cerveau, du foie, du soja et du bacille tuberculeux.

Folch et Woolley (1942), Folch (1946) isolent un diphosphoinositide dans lequel l'inositol est présent sous forme d'inositol diphosphate. Il peut aussi être classé comme un acide phosphatidique; isolé à l'état de sel de Ca, Mg qui contient une molécule d'acide gras et une molécule de glycérol.

Folch (1947) isole du soja un phosphoinositide ; ce phosphatide est différent du lipositol isolé par Woolley (1943) qui contient de l'acide tartrique et pas de glycérol.

McPherson et Lucas (1947) montrent la présence d'inositol dans les phosphatides du foie.

De Suetoe-Nagy et Anderson (1947) montrent l'existence de phosphoinositides dans les bacilles tuberculeux.

A notre connaissance de tels phospholipides n'ont pas été signalés dans les lipides du sérum humain.

II-PRÉPARATION D'UN EXTRAIT LIPIDIQUE TOTAL CONTENANT TOUS LES PHOSPHATIDES.

Cas d'un sérum liquide fraîchement récolté :

a) *Méthode de Kumagawa* : Dans cette méthode, les protéines du sérum sont coagulées par l'alcool bouillant, filtrées dans une cartouche d'extraction et extraites, dans l'appareil de Kumagawa, par l'alcool bouillant puis par l'éther à 35°. Les solutions alcooliques et éthérées sont concentrées, sous vide, à la plus basse température possible, jusqu'à siccité et le résidu sec est dissous dans du chloroforme. Cette solution chloroformique est évaporée sous vide à faible température et le poids de ce nouveau résidu sec est compté comme lipides totaux.

Sur du sérum fraîchement récolté, cette méthode à l'alcool-éther bouillant enlève bien tous les lipides. Machebœuf et Berger-Jeulin (1950) en hydrolysant le coagulum protéinique ne retrouvent en effet plus d'acides gras, ce qui est bien une preuve que tous les lipides ont été arrachés des protéines.

Lorsque l'on redissout les lipides dans le chloroforme, on entraîne avec les lipides des impuretés non-lipidiques ; parmi celles-ci nous signalerons entre autres de l'urée et des acides aminés. Le poids des lipides déterminés par la méthode de Kumagawa est donc par excès. On peut le prouver par l'expérience suivante : si on dissout ces lipides dans le mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volume) et si on pratique sur cette solution la méthode de lavage de Folch et al. (1951), le poids des lipides diminue de 20 à 25 %, les teneurs en cholestérol et en phosphore lipidique, avant et après le lavage, restant identiques. On a donc éliminé environ 25 % d'impuretés qui n'étaient solubles

dans le chloroforme que grâce aux lipides, et qui, par cette méthode de lavage, sont séparés des lipides et passent dans la phase aqueuse. Si nous évaporons cette phase aqueuse à basse température sous vide, nous constatons que l'extrait sec obtenu est complètement insoluble dans le chloroforme, mais est en grande partie soluble dans l'alcool à 95°. On pourrait objecter que la phase aqueuse contient du méthanol (3 % environ) et que certains lipides pourraient passer dans cette phase à la faveur du méthanol. L'objection n'est pas valable car si on augmente considérablement le volume d'eau et baisse ainsi le pourcentage du méthanol, la quantité des lipides retrouvés est la même : la faible teneur en méthanol de la phase aqueuse après lavage n'a donc aucune action. D'ailleurs l'extrait sec de cette phase aqueuse est complètement insoluble dans le chloroforme, justifiant que les lipides du sérum restent dans la phase chloroformique. Folch et al. montrent que le lavage des lipides extraits du cerveau fait perdre 1% de lipides principalement des diphosphoinositides. Pour les lipides du sérum, cette méthode de lavage n'enlève que les substances non-lipidiques.

Nous pensons donc que l'on ne doit pas accepter le poids des lipides dosés par la méthode de Kumagawa comme exact, mais qu'il faut y faire subir une correction en lavant ces lipides par la méthode de Folch.

Le poids des lipides donné par la méthode de Kumagawa, suivi d'un lavage selon Folch, peut, à notre avis, servir de méthode de référence pour comparer avec les autres méthodes d'extraction. Il reste cependant à vérifier que l'extrait lipidique ainsi obtenu est pur. Ceci peut être fait par une chromatographie sur colonne (acide silicique préférable à l'alumine). On doit éluer la totalité des lipides adsorbés puisque des lipides purs (cholestérol, esters de cholestéryle, acides gras, triglycérides, phosphatides) sont élués quantitativement (Nous reviendrons un peu plus loin sur cette question).

Certains auteurs dissolvent le résidu sec d'extraction alcoolo-éthéré dans l'éther de pétrole. En 1912 MacLean a donné une méthode de purification des phosphatides. En 1939 Folch et Van Slyke ont montré que des substances non lipidiques, telles que l'urée, le glucose, les acides aminés, les sels minéraux se dissolvent dans l'extrait alcoolo-éthéré (confirmé par Christensen (1939) et par Pernokis, Freeland et Kraus (1941)). Par contre, ces substances ne se dissolvent pas dans l'éther de pétrole. On pourrait donc penser que la dissolution du résidu sec, obtenu après évaporation de l'alcool-éther, dans l'éther de pétrole permet d'éliminer ces substances. Il n'en est rien. Folch et Van Slyke (1939) montrent que l'extrait lipidique dans l'éther de pétrole a des rapports N/P trop élevés qui ne correspondent pas

aux teneurs des phospholipides. Cet azote en excès a été identifié par les auteurs comme étant de l'urée et des acides aminés. Si l'urée en effet est bien insoluble dans l'éther de pétrole, elle est soluble quand elle est en présence des lipides. Rouhi, Blass et Machebœuf (1953) ont montré qu'il en était bien ainsi : le cholestérol et la lécithine séparément sont incapables de solubiliser de façon stable l'urée dans l'éther de pétrole, mais lorsqu'ils sont associés, et c'est le cas des extraits lipidiques totaux, l'urée peut se dissoudre notablement dans l'éther de pétrole. C'est donc l'action combinée du cholestérol et des phosphatides (Foch et Van Slyke avaient écrit : lipides) qui fait passer de l'urée dans les lipides dissouts dans l'éther de pétrole. Comme, de plus, l'éther de pétrole ne dissout pas la sphingomyéline (Reiser et Dickert, 1954), nous déconseillons d'employer l'éther de pétrole et recommandons l'emploi du chloroforme. Celui-ci dissout bien tous les lipides, mais dissout également des impuretés non-lipidiques que nous éliminons par la méthode de lavage de Folch.

Mais la méthode de Kumagawa est longue, aussi a-t-on cherché des méthodes permettant d'extraire beaucoup plus rapidement les lipides du sérum.

b) *Méthode de Bloor :*

En Amérique la méthode de Bloor (1928) est classique. Le sérum est extrait par un mélange d'alcool et d'éther (3/1 en volume). Boyd (1936), dans une étude de cette méthode, indique que, pour avoir une extraction maximum, il ne faut pas descendre au-dessous de 20 volumes de solvant pour 1 volume de sérum ; on peut faire l'extraction à froid.

Il a été reproché à la méthode de Bloor qu'elle extrayait du phosphore inorganique accompagnant le phosphore organique des phosphatides. La délipidation par l'alcool-éther à froid que nous avons souvent pratiquée montre que le sérum, avant et après délipidation, contient la même teneur en phosphore minéral (Delsal, 1944). C'était donc une preuve que l'alcool-éther n'extrayait pas de phosphore minéral. Une démonstration récente a été faite par Van Slyke et Sacks (1953) avec du phosphate disodique marqué. La conclusion de leur travail apporte une preuve directe de l'absence de phosphore minéral dans l'extrait alcoolo-éthéré.

La méthode de Bloor extrait-elle complètement les lipides et particulièrement les phospholipides du sérum ? Pour une extraction des lipides d'un tissu, autre que le sérum, il a été montré que la méthode de Bloor extrait moins. Pour le sérum, il en est de même, car dans bien des cas la teneur en phosphore lipidique de l'extrait est

plus faible que par d'autres méthodes. Fillerup et Mead (1953) sont également de cet avis et ils trouvent que la méthode de Bloor extrait moins de lipides que la méthode au méthylal-méthanol. Il faut cependant faire remarquer qu'il n'a pas été vérifié si les autres méthodes, chloroforme-méthanol, méthylal-méthanol par exemple, extraient du phosphore minéral. L'excès de phosphore lipidique dosé dans ces méthodes serait erroné si nous nous trouvions en présence de phosphore minéral. Il faudrait, dans des expériences complémentaires, comparer la teneur en phosphore lipidique extrait par ces diverses méthodes, mais après avoir fait subir aux lipides la méthode de lavage de Folch. L'absence de phosphore minéral dans la phase aqueuse et la teneur constante, avant et après lavage, du phosphore lipidique apportera la preuve que ces méthodes n'extraient pas de phosphore minéral et que par conséquent la méthode de Bloor extrait moins de phosphatides que d'autres méthodes.

c) *Méthode de Folch :*

Pour le tissu nerveux McKibbin et Taylor (1949), Brante (1949) ont montré que tous les lipides ne sont pas extraits par la méthode de Bloor. On a donc jugé nécessaire d'introduire une extraction supplémentaire du tissu avec un autre solvant des lipides, de pouvoir plus élevé que le mélange de Bloor. Ce second solvant est habituellement le chloroforme. Mais les méthodes de McKibbin et Taylor ou Brante sont longues, compliquées et par suite du traitement des tissus avec des solvants bouillants, la nature chimique des lipides en est modifiée. Folch et al. (1951) homogénéisent le tissu pendant trois minutes avec le mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volume) dans la proportion d'au moins 20 ml du mélange par gramme de tissu. Le mélange est ensuite filtré sur papier filtre sans graisse ou de préférence sur verre fritté. Cet extrait brut est lavé par une méthode que nous décrirons ultérieurement.

Schmidt et al. (1946) avaient déjà employé le mélange chloroforme-méthanol (1/1) pour compléter l'extraction par l'alcool-éther. Albrink (1950) extrait les lipides du sérum par le chloroforme-méthanol (2/1) et lave cet extrait selon la méthode de Folch.

D'après nos expériences personnelles, le mélange chloroforme-méthanol (1/2) extrait mieux les phosphatides du sérum que le mélange chloroforme-méthanol (2/1).

d) *Méthode de Delsal :*

En 1944 nous avons montré que le méthylal, tout en précipitant les protéines du sérum, avait un grand pouvoir extractif vis-à-vis des lipides. Nous avons préconisé alors l'emploi d'un mélange

méthylal-méthanol (4/1 en volume). Ce mélange précipite les protéines à l'état finement divisé, ce qui favorise l'extraction des lipides. La méthode est pratiquée à froid et l'évaporation des solvants se fait à basse température sous vide. Le résidu sec est dissous dans le chloroforme. L'extraction des lipides du sérum par cette méthode nous a toujours donné entière satisfaction.

R. Ardry et Mlle Fontaine (1951), dans une étude sur la délipidation du sérum, ont comparé l'extraction au méthylal-méthanol à la méthode de Kumagawa. Les résultats sont identiques et ces auteurs notent « l'efficacité remarquable du mélange méthylal-méthanol ». Sur un sérum lyophilisé, réhydraté à 0,5 %, R. Ardry et Mme Risbec (1951) trouvent que le mélange méthylal-méthanol délipide en deux épaissements de 12 heures à -5°. La délipidation obtenue est comparable à celle réalisée par la méthode de Kumagawa.

Fillerup et Mead (1953) en Amérique ont fait un essai des différentes méthodes d'extraction des lipides du plasma et ont adopté la méthode au méthylal-méthanol comme donnant les résultats les plus élevés et les plus réguliers. Fillerup et Mead évaporent à sec, sous azote, à pression réduite, à température du laboratoire, l'extrait méthylal-méthanol. Le résidu sec est dissous dans l'éther de pétrole et cet extrait est compté comme lipides totaux. D'après ces auteurs, les résultats obtenus par la méthode de Bloor sont inférieurs à ceux fournis par notre méthode.

Fillerup et Mead (communication personnelle) m'ont signalé que le méthylal-méthanol était employé à l'Université de Los Angeles pour l'extraction des lipides de tissu (Voir Schjeide *J. biol. chem.* 1954 - 211 - 355). La méthode extrait tous les lipides et a l'avantage supplémentaire de ne pas extraire de grandes quantités de substances contaminantes. L'extrait lipidique selon la méthode de Delsal serait fractionné, avec un rendement de presque 100 %, par chromatographie sur colonne d'acide silicique selon la méthode de Fillerup et Mead. Il faut sans doute attribuer cette constatation à la dissolution de l'extrait sec dans l'éther de pétrole.

Si on dissout en effet l'extrait sec dans le chloroforme, le poids des lipides obtenu est identique à celui donné par la méthode de Kumagawa. Après le lavage, par la méthode de Folch, la diminution des lipides est du même ordre : 20 à 25 %. Le méthylal-méthanol extrait donc aussi des substances non-lipidiques dans la même proportion que la méthode de Kumagawa et, pour être exacte, la méthode d'extraction par le méthylal-méthanol doit être suivie d'un lavage des lipides selon la méthode de Folch.

Nous avons mis au point récemment (1954) une méthode

d'extraction par le méthylal-méthanol qui, tout en fractionnant les lipides, les purifie. Le poids des lipides est indentique à celui dosé par la méthode de Kumagawa, combinée avec la méthode de lavage de Folch (méthode de référence). Nous expliquerons cette méthode à propos du fractionnement des lipides.

Autres solvants extractifs des lipides :

Acétone : L'acétone extrait bien le cholestérol, si on ajoute préalablement au sérum un volume d'eau distillée (Delsal 1950), les graisses neutres et théoriquement ne devrait pas extraire les phosphatides puisque ceux-ci sont insolubles dans ce solvant. Cependant Favarger (1949), Borgstroem (1952) ont montré que l'extrait acétonique contenait des phospholipides, la teneur variant avec la teneur en graisses neutres. L'acétone est donc un mauvais solvant des lipides totaux, puisqu'il n'extrait les phospholipides que partiellement. En y ajoutant une partie d'éthanol, le mélange est un bon solvant du cholestérol et même des phosphatides.

Trichloréthylène : Paget et Pierrart (1939) utilisent un mélange acétone-alcool-trichloréthylène pour l'extraction des lipides du sérum. Cette méthode, entre nos mains, n'a pas donné de bons résultats. D'après Ardry et Mlle Fontaine (1951), le trichloréthylène serait un bon solvant des phospholipides, mais un mauvais solvant du cholestérol.

Tétrahydrofurane : Cremer et Schuhler (1949) signalent que le tétrahydrofurane dissout facilement les phosphatides et spécialement la céphaline. Des expériences devraient être faites avec ce solvant pour l'extraction des phospholipides du sérum.

Nous avons vu que tous les lipides obtenus par ces diverses méthodes d'extraction conduisaient à un extrait lipidique souillé par des substances non-lipidiques. Nous allons voir maintenant quelles sont les méthodes utilisées pour purifier un extrait lipidique brut.

III - MÉTHODES DE PURIFICATION D'UN EXTRAIT LIPIDIQUE :

a) *Méthode de Folch et Van Slyke (1939) :*

Les protéines et les lipides du sérum sont précipités complètement par le fer colloïdal ; les substances solubles dans l'eau sont éliminées par lavage du précipité avec de l'eau contenant un peu de sulfate de magnésie. Les lipides de ce précipité lavé sont ensuite extraits, par agitation du précipité humide, avec de l'alcool-éther. Les substances non-lipidiques ont ainsi été éliminées.

b) Méthode par dialyse de l'émulsion lipidique :

Sinclair (1948) dialyse les phosphatides émulsionnés dans l'eau, contre de l'eau distillée, à $+4^{\circ}$, pendant 3 à 5 jours, pour les purifier (l'émulsion est agitée pendant la durée de la dialyse).

Sinclair constate que la teneur en azote, phosphore et choline de ces phosphatides dialysés est au-dessus de celle calculée pour un mélange de lécithine, céphaline, sphingomyéline. Il y aurait donc encore des impuretés et de plus il constate que dans certains cas la perte en phosphore est appréciable au cours de la dialyse. Dans tous les cas, de la choline est perdue (5 à 20 % du total).

Cette méthode de purification par dialyse a été utilisée par Wynn et Williams (1950) ainsi que par Blass, Rouhi, Lecomte et Machebœuf (1953).

c) Méthode de McKibbin et Taylor (1949)

La purification des extraits lipidiques de plasma est faite par émulsion répétée du chloroforme avec une solution aqueuse 0,25M de chlorure de magnésium, congélation, décongélation et enlèvement de la couche aqueuse. Pour une bonne purification des lipides du plasma il faut effectuer au moins 12 lavages. La perte en lipides n'excède pas 4 % calculé sous forme de monoaminophosphatide.

d) Méthode de Johnson et Dutch (1951) :

La précipitation des protéines du sérum est faite par l'acide trichloracétique (Volume égal d'acide trichloracétique 20 % contenant du chlorure de magnésium 0,4 M, et de sérum). Les lipides sont extraits par l'alcool bouillant, puis trois fois par l'alcool-éther (3/1). Après évaporation des solvants, le résidu sec est dissous dans l'éther de pétrole-chloroforme qui est lavé à l'eau. Les résultats obtenus sont comparables à ceux de la méthode de McKibbin et Taylor.

e) Méthode de Le Breton (1921) et Clément-Champougny (1952) :

Cette méthode a été préconisée pour les phosphatides ; ceux-ci sont précipités par l'acétone en présence de chlorure de magnésium (double précipitation). Le précipité est ensuite lavé par de l'éther et de l'eau contenant 1 % de chlorure de sodium et 0,5 % de chlorure de magnésium.

f) Méthode de lavage de Folch et al. (1951) :

Un bécber de capacité légèrement plus grande que le volume de l'extrait lipidique à laver est immergé dans un plus grand bécber

plein d'eau distillée aux 9/10ème et de capacité au moins 10 fois le volume de l'extrait à laver. Celui-ci est versé dans le petit bécher avec une pipette effilée. On doit éviter tout courant d'eau en retour dans la pipette ainsi que les remous lors de l'écoulement de l'extrait lipidique (dans chloroforme-méthanol : 2/1) qui doit donc se faire lentement. L'ensemble est couvert et abandonné une nuit, de préférence à la glacière.

Le lendemain le système a l'aspect suivant : Une phase inférieure chloroformique contenant les lipides dans le petit bécher et occupant environ les 3/5ème du volume initial de l'extrait.

Une phase supérieure eau-méthanol contenant les impuretés non-lipidiques et à l'interphase une accumulation de lipides sous forme de flocons. Dans l'extrait des lipides du cerveau pour lesquels cette méthode a été mise au point, Folch signale aussi des protéolipides dans ces flocons. Nous n'avons pas vérifié si des protéolipides se trouvaient également dans les lipides du sérum.

La phase aqueuse est enlevée à la pipette aussi complètement que possible sans perturber les flocons (une couche d'eau de 3 à 4 mm restant au-dessus des flocons).

On ajoute alors du méthanol pour solubiliser les flocons et avoir une solution limpide de cet extrait lipidique lavé. Si on veut connaître le poids des lipides il suffit de chasser les solvants sous vide à basse température et de peser le résidu sec. Cette méthode donne d'excellents résultats avec les lipides du sérum. La teneur en substances non-lipidiques ainsi enlevée est, comme nous l'avons déjà vu, de 20 à 25 %.

Toutes ces diverses méthodes de purification, que nous venons de décrire, aboutissent sans doute à des lipides plus ou moins purs. Nous avons appliqué la méthode de Folch avec succès sans la comparer à d'autres méthodes. Il est même possible que la méthode de Folch ne purifie pas complètement les lipides. La méthode par chromatographie sur colonne d'acide silicique de Fillerup et Mead permet, tout en fractionnant les lipides, de se rendre compte du taux d'élution et d'en déduire la pureté respective des lipides purifiés par ces diverses méthodes. Ceci nous amène donc à étudier les diverses méthodes employées pour fractionner les lipides.

IV - MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES :

a) *Précipitation des phospholipides par l'acétone :*

Les phospholipides sont précipités par l'acétone à partir d'extraits lipidiques totaux. Sinclair et Donan (1942) trouvent que la précipitation est incomplète en l'absence de chlorure de magnésium et « presque complète » après l'addition à l'acétone de petites quantités de solution saturée de chlorure de magnésium dans l'alcool. Certains phosphatides sont d'ailleurs solubles dans l'acétone. (Lovern et Olley, 1952).

Favarger (1949) montre que même après l'addition de chlorure de magnésium la précipitation n'est pas complète. Borgstroem confirme ce fait et ajoute que la méthode de précipitation par l'acétone-chlorure de magnésium sépare bien les phospholipides des graisses neutres mais que par contre les acides gras libres accompagnent les phospholipides dans leur précipitation.

De nombreux auteurs emploient cette méthode de précipitation des phospholipides et la font suivre de méthodes de purification appropriée au tissu utilisé. Cependant lorsque l'on veut faire une chromatographie sur papier des phospholipides ou de leur produit d'hydrolyse, le chlorure de magnésium gêne et en le supprimant on réalise une précipitation incomplète.

Il semble cependant que l'on puisse précipiter les phosphatides par l'acétone-chlorure de magnésium, mais on doit, comme l'a montré Mac Laklan (1944) pour la détermination de l'indice d'iode, évaporer la solution de phosphatides obtenue et redissoudre ceux-ci dans le chloroforme. Comme il se forme un complexe phospholipides-magnésium, celui-ci est détruit en évaporant à sec et les phospholipides passent quantitativement dans le chloroforme. Le chlorure de magnésium ne gêne plus alors la chromatographie sur papier.

b) *Fractionnement des lipides par chromatographie :*

Thannhauser et Setz (1936) séparent les cérébrosides de la rate des sphingomyélines par chromatographie sur alumine. Cette méthode est employée pour la purification de la sphingomyéline.

Trappe (1940 à 1942), Selbach et Trappe (1944) étudient la chromatographie sur alumine des lipides du sérum. Ceux-ci sont dissous dans l'éther de pétrole (auquel on est souvent obligé d'ajouter quelques gouttes de benzène pour tout solubiliser).

Les esters de cholestéryle sont élués par le tétrachlorure de carbone; le cholestérol libre et les glycérides sont élués par le

chloroforme et les phospholipides par le méthanol.

Mais l'alumine alcaline provoque la saponification des glycérides et l'autoxydation des acides gras (Trappe, 1940). Aussi supprime-t-on beaucoup de ces réactions secondaires en éliminant l'alcali de l'alumine par lavage avec l'acide chlorhydrique, avec l'eau et en titrant ensuite l'alumine selon la méthode de Brockmann et Schodder (1941) que l'on trouve détaillée dans « Substances naturelles de synthèse » de L. Velluz, volume IV, 1952. Il est absolument indispensable de titrer l'alumine et d'indiquer l'activité employée. Les résultats sont en effet variables selon le degré d'adsorption de l'alumine. Nous regrettons que certains auteurs ne précisent pas le degré d'activité de l'alumine qu'ils emploient, rendant impossible la comparaison de leurs travaux avec d'autres.

En employant de l'alumine, activité II, nous avons vérifié que : les esters de cholestéryle sont élués quantitativement par le tétrachlorure de carbone, le cholestérol libre et les glycérides par le chloroforme ; les phospholipides sont mieux élués par l'alcool à 80° que par le méthanol, par contre les savons sont en partie adsorbés. Sur un extrait lipidique d'un sérum la méthode de Trappe nous a donné de bons résultats pour les esters de cholestéryle et le cholestérol libre. Les dosages effectués par chromatographie sont en accord avec les dosages chimiques. Par contre les phospholipides et la fraction lipidique les accompagnant ne sont jamais élués complètement. La méthode de Trappe est donc applicable seulement pour les esters de cholestéryle et le cholestérol libre.

Deux autres méthodes ont été décrites pour la séparation des esters de cholestéryle et du cholestérol libre : Hess (1947) adsorbe les lipides sur l'alumine ; il élue les esters de cholestéryle par 10% d'éther dans l'éther de pétrole et le cholestérol libre par 10% d'alcool dans l'éther de pétrole. Nous n'avons pas essayé cette méthode, celle de Trappe nous donnant de bons résultats. Fillerup et Mead signalent qu'entre leurs mains la méthode de Hess n'a pas donné de bons résultats. Dans la méthode de Kerr et Bauld (1953) les esters de cholestéryle sont élués par l'éther de pétrole et le cholestérol libre par le benzène. Ils emploient de l'alumine activité II. Ces auteurs ne constatent pas d'hydrolyse des esters de cholestéryle, ce que nous n'observons pas non plus en employant cette même alumine et la méthode de Trappe. Kerr et Bauld extraient les lipides du sérum par l'acétone-alcool (1/1) ; si on emploie l'alcool-éther pour extraire les lipides, les phospholipides qui sont extraits également sont élués en même temps que le cholestérol libre par le benzène et interfèrent avec la réaction de Liebermann-Burchard utilisée pour le dosage du cholestérol. Fai-

sons remarquer que l'acétone-alcool extrait aussi des phospholipides.

Taurog, Entenman, Fries et Chaikoff (1944) séparent les phosphatides à base de choline en les adsorbant sur magnésie et en les éluant par le méthanol; cependant il est impossible d'éluier les phosphatides ne contenant pas de choline, ce qui restreint considérablement l'emploi de leur méthode.

Hanahan et al. (1951) utilisent l'alumine pour isoler la phosphatidylcholine des phospholipides du jaune d'œuf.

Bevan et al. (1951) indiquent que les phospholipides à base de choline (phosphatidylcholine, sphingomyéline) peuvent être séparés des phospholipides à base d'éthanolamine et de sérine par chromatographie sur colonne de cellulose.

Lea et Rhodes (1953), R. H. Smith (1954) ne confirment pas ce travail et montrent que la cellulose est capable seulement d'adsorber les impuretés solubles dans l'eau (acides aminés libres) contenues dans les phosphatides, mais qu'elle ne les sépare pas.

Cependant toutes ces méthodes sont restrictives et ce qu'il est intéressant de pouvoir réaliser, c'est de séparer quantitativement les lipides du sérum en plusieurs fractions.

L'alumine, nous l'avons vu, ne permet pas une élution quantitative des phosphatides. Borgstroem (1952) préconise l'emploi d'acide silicique déjà étudié partiellement par Trappe. Les graisses neutres et les acides gras libres sont élués par le chloroforme tandis que les phospholipides sont élués *quantitativement* par le méthanol. Borgstroem en utilisant 30 mg. de lipides par gramme d'acide silicique (marque Baker activée 24 heures à 120°) montre que les graisses neutres obtenues sont sans phospholipides. La séparation des phosphatides et des acides gras libres est plus complète avec l'acide silicique qu'avec la précipitation par l'acétone-chlorure de magnésium.

Les esters de cholestéryle sont élués par un mélange éther de pétrole-benzène (4/1), ils sont contaminés par des triglycérides. Le cholestérol, les glycérides et acides gras sont élués par le chloroforme. Si ce mélange ne contient pas de monoglycérides on peut séparer les graisses neutres des acides gras libres par l'alcool alcalin; si ce mélange contient des monoglycérides, la séparation est faite avec de l'Amberlite IRA-400. Les acides gras sont élués par un mélange éthanol-HCl concentré (4/1). Les phospholipides sont élués par le méthanol.

Fillerup et Mead (1953), Mead et Fillerup (1954) ont repris le travail de Borgstroem et l'ont appliqué aux lipides du plasma. L'élu-tion des substances pures leur a permis d'établir que : les esters de

chlestéryle étaient élués par 1% éther dans l'éther de pétrole, les triglycérides par 3% d'éther dans l'éther de pétrole, le cholestérol libre par 10% d'éther dans l'éther de pétrole, les phospholipides par 25% de méthanol dans l'éther. Lorsque le plasma est fraîchement récolté et les lipides extraits avec soin, il n'y a pas d'acides gras libres, ceux-ci ayant d'ailleurs des propriétés toxiques. Pour 50 mg. de lipides ils emploient 13 g d'acide silicique, l'éther de pétrole a un point d'ébullition entre 60° et 70°. La colonne a un diamètre de 2 cm et une hauteur de 7 cm; l'acide silicique est lavé par du méthanol absolu, par de l'acétone, par de l'éther anhydre sans peroxyde, puis par de l'éther de pétrole. Les lipides sont ajoutés dans la colonne en solution dans l'éther de pétrole. L'éluion des lipides est quantitative (le minimum est de 95%; la moyenne sur les lipides de 7 plasma est de l'ordre de 98%). Cette méthode nous semble excellente et à notre avis est une des meilleures méthodes de fractionnement des lipides du sérum, par chromatographie sur colonne, publiées jusqu'à ce jour.

c) Fractionnement des lipides par contre-courant :

L. C. Craig (1944) a montré que la méthode par contre-courant permettait le fractionnement de nombreuses substances lipidiques. Les lois mathématiques de répartition d'une substance entre deux solvants non-miscibles ont été étudiées et elles permettent de prévoir cette répartition. Cette méthode a déjà été appliquée par de nombreux chercheurs.

Des appareils nouveaux ont été construits par Lath et Ruthven (1951) et l'appareil en cascade de Kies et Davis (1951), mais il semble que l'appareil de Craig soit le meilleur.

La méthode de Craig a été utilisée par: Scholfield, Dutton, Tanner et Cowan (1948), Scholfield, McGuire et Dutton (1950), McGuire et Earle (1951), pour l'étude des phosphatides des végétaux; par Lovern (1952) pour la séparation des phosphatides du cerveau de bœuf. Il utilise l'éther de pétrole et l'éthanol aqueux; avec ce système de solvants il sépare la phosphatidylcholine des phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine, ces deux derniers n'étant pas séparés. Lovern montre que, dans les phospholipides bruts du cerveau de bœuf, il existe des substances à base de choline différentes de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline.

Cole, Lathe et Ruthven (1953) fractionnent les lipides du cerveau. Ils emploient un système: tétrachlorure de carbone-méthanol-eau; avec 49 distributions ils obtiennent: la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine dans les tubes 4 à 16; viennent ensuite la sphingomyéline (tube 21), la lécithine (tube 27), les cérébrosides

(tube 29), le cholestérol (tube 35) et les graisses neutres (tube 45).

Cole, Lathe et Ruthven (1953), dans un autre mémoire, étudient la séparation des lipides du placenta déjà étudiés par Pratterol (1946). Ils isolent des lipides à teneur élevée en phosphore et à faible teneur en azote; ces lipides sont d'un nouveau type.

La méthode par contre-courant a été utilisée par Ahrens et Craig (1952) pour la séparation des acides gras élevés; par Cannon, Zilch et Dutton (1952) pour la séparation d'esters méthyliques d'acides gras élevés; par Ahrens et Craig (1952) pour la séparation des acides biliaires. 20 distributions dans un système acide acétique-n-heptane permettent d'obtenir à partir d'un extrait alcoolique de bile de bœuf deux grandes fractions: une contenant les acides biliaires; l'autre contenant les acides gras, les triglycérides, le cholestérol et les esters de cholestéryle. Ahrens et Craig annoncent une publication relative à la séparation des acides gras, du cholestérol et des esters de cholestéryle. Ahrens et Craig (1951), dans une note très résumée au 43ème congrès de «l'American society for clinical investigation» signalent qu'ils séparent les lipides du plasma humain en trois groupes: phospholipides — cholestérol — triglycérides + esters de cholestéryle. Le fractionnement de ce troisième groupe étant en cours et sera suivi de l'étude de leurs acides gras. La méthode employée n'a pas été décrite en détail mais les travaux sont certainement très avancés.

Cette méthode par contre-courant permet donc l'analyse de mélanges lipidiques très complexes et on peut espérer avec elle une meilleure séparation que par la chromatographie sur colonne.

Cependant d'après le travail de Olley (1953) la concentration initiale en lipides a une grande importance. L'auteur montre en effet que la distribution des phospholipides bruts d'un extrait acétonique de muscle d'aiglefin entre l'éther de pétrole et un mélange acétone-alcool, varie beaucoup avec la concentration de l'extrait. Lorsque la concentration des phosphatides de l'extrait augmente, le passage dans la phase éther de pétrole est favorisé. D'après Olley cet effet serait général. La méthode par contre-courant devra donc se faire avec un extrait lipidique concentré pour obtenir une meilleure séparation.

Le seul résultat numérique donné par Ahrens et Craig (1951) pour les lipides du plasma humain est que dans un litre de plasma humain il y a moins de 25 mg d'acides gras libres. Ce fait est en accord avec Fairbairn (1945) qui signale que, sur un tissu frais, lorsque l'autolyse est évitée, il n'existe que des traces d'acides gras libres, et est confirmé par Mead et Fillerup (1954) pour le plasma sanguin.

On remarquera que dans cette méthode par contre-courant les glycérides se trouvent avec les esters de cholestéryle. Borgstroem trouve également que sur colonne d'acide silicique 3,5 % de glycérides sont trouvés dans la fraction esters de cholestéryle. Dans les esters de cholestéryle que nous isolons par la méthode de Trappe nous trouvons souvent plus d'acides gras que n'en contiennent les esters, montrant ainsi que cette fraction doit être souillée par des glycérides. Dans la méthode de Fillerup et Mead les glycérides sont séparés des esters de cholestéryle et cette fraction semble pure.

Récemment Douste-Blazy, Polonovski et Valdiguié (1952) ont décrit une méthode de fractionnement des lipides par chromatographie de partage à contre-courant sur papier.

Pour conclure, nous pouvons espérer avoir deux bonnes méthodes de séparation des lipides du sérum : une par chromatographie sur colonne d'acide silicique ; une autre par contre-courant. Ces deux méthodes doivent être en accord et fournir des fractions pures. La connaissance de la composition exacte de ces fractions pures permettra une étude plus détaillée du métabolisme des lipides dans les cas pathologiques.

V - MÉTHODE COMBINÉE DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION DES LIPIDES :

Nous avons vu que le méthylal-méthanol était un mélange extractif convenable pour les lipides du sérum ; mais l'extrait brut obtenu contient des impuretés non-lipidiques dont on doit se débarrasser par la méthode de lavage de Folch. Nous avons essayé (Delsal 1954) de mettre au point une méthode qui, tout en extrayant les lipides totaux, permette de fractionner les lipides et en même temps d'obtenir des lipides purifiés. Nous avons observé que, dans un mélange contenant 66 % de méthanol, l'éther de pétrole dissout uniquement le cholestérol, les esters de cholestéryle et une partie des glycérides ; les phospholipides et l'autre partie des glycérides, restant dans la phase méthanol-eau, sont extraits, après concentration, par l'éther. On peut donc fractionner les lipides en deux groupes : fraction I contenant les stérols libres ou estérifiés ; fraction II contenant les phosphatides. Le poids total des lipides de ces deux fractions est égal à celui obtenu après extraction des lipides par la méthode de Kumagawa suivie du lavage des lipides bruts par la méthode de lavage de Folch. On peut donc assurer que cette méthode extrait bien tous les lipides et que de

plus ces lipides sont aussi bien purifiés que par la méthode de lavage de Folch.

Si l'on fractionne de nouveau par chromatographie sur alumine selon la méthode de Trappe la fraction I, on sépare les esters de cholestéryle et le cholestérol libre, le rendement étant de 95 % environ. Si l'on fractionne dans les mêmes conditions la fraction II, le rendement est bien plus faible, de l'ordre de 85 %. La mauvaise élution de la méthode de Trappe provient donc des phosphatides. La phosphatidylcholine étant éluee quantitativement dans ces conditions, il faut attribuer le mauvais rendement d'élution aux autres phosphatides qui sont partiellement ou totalement adsorbés. Une combinaison de la chromatographie sur colonne d'alumine et une chromatographie sur papier des produits d'hydrolyse nous permettrait de voir si ce sont la phosphatidyléthanamine, la phosphatidylsérine ou la sphingomyéline qui ne sont pas élués.

Pour caractériser les phosphatides il est commode d'étudier leurs produits d'hydrolyse. Voyons donc maintenant quelles sont les méthodes d'hydrolyse utilisées qui permettent une hydrolyse totale des phosphatides.

VI - MÉTHODES D'HYDROLYSE DES PHOSPHATIDES :

(A) Méthodes chimiques :

a) *Méthanol chlorhydrique* : Artom (1945) propose d'utiliser le méthanol chlorhydrique 6N à l'ébullition au réfrigérant à reflux pendant 6 heures. Brante (1940), Taylor et McKibbin (1951), Levine et Chargaff (1951), Lea et Rhodes (1954) trouvent que cette méthode d'hydrolyse ne donne le maximum ni en azote, ni en choline. Par contre ils recommandent la méthode d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6N.

b) *Acide chlorhydrique 6N* : Cette méthode est utilisée avec succès par Folch (1948), Wynn et Williams (1950), Blass, Rouhi, Lecomte et Machebœuf (1953), Gertler, Kream et Baturay (1954). Ces derniers auteurs effectuant une hydrolyse à 100° *sous reflux*, montrent qu'après une telle hydrolyse faite avec de la sérine, de l'éthanamine et de la choline pure, on retrouve bien : 97 \pm 4 % de sérine, 94 \pm 3 % d'éthanamine et 100 \pm 5 % de choline, mais il faut faire une hydrolyse d'au moins 24 heures pour qu'elle soit totale. Lea et Rhodes (1954) effectuent l'hydrolyse en *tubes scellés* à 100°. Au bout de 3 heures, l'hydrolyse est totale et les auteurs pensent qu'une hydrolyse

prolongée n'est pas nécessaire si l'on veut doser les acides gras, l'azote aminé et la choline. Nous pouvons expliquer cette différence par le fait qu'au cours de l'hydrolyse en tubes scellés il n'y a pas de perte d'acide chlorhydrique tandis qu'avec une hydrolyse sous reflux la teneur en acide chlorhydrique devient de plus faible en plus faible et il est nécessaire de prolonger l'hydrolyse jusqu'à 24 heures pour qu'elle soit totale.

Nous conseillons cette méthode d'hydrolyse lorsque l'on veut étudier par chromatographie sur papier les produits d'hydrolyse: sérine, éthanolamine et choline.

c) *Hydrolyse alcaline*: Si on ne veut doser que la choline une hydrolyse par la baryte en solution saturée pendant 2 heures à l'ébullition au réfrigérant à reflux donne une teneur maximum en choline. Dans ces conditions la sérine et l'éthanolamine sont partiellement détruits.

L'hydrolyse par la potasse normale à 37° pendant 24 heures, nous l'avons déjà vu, n'hydrolyse que la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine; la sphingomyéline restant intacte.

B) Méthodes enzymatiques:

Nous résumons l'action des divers lécithinases sur les phosphatides en suivant la classification des lécithinases donnée par Conradi et Ercoli (1933) et adoptée par H. J. Deuel Jr. (1951).

Lécithinase A:

Cet enzyme présent dans le venin de cobra et des reptiles de la famille vipère, dans le pancréas et la pancréatine commerciale enlève l'acide gras non saturé de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine en donnant des lysophosphatides. Le pH d'activité de la lécithinase A du pancréas de cheval à 37° est 6, 8-7, 0. L'enzyme est activé par les sels de calcium et inhibé par le cholestérol. Hanahan (1954) a étudié le site d'action de la lécithinase A sur la lécithine. Feeney, MacDonnell et Fraenkel-Conrat (1954) ont décrit l'effet de la lécithinase A sur le jaune d'œuf.

Lécithinase B:

Cet enzyme se trouve dans l'*Aspergillus oryzae* et le *Penicillium notatum*. Il agit sur la lysophosphatidylcholine en libérant l'acide gras saturé et en donnant l'ester de choline de l'acide glycérophosphorique. Cet enzyme se trouve également dans la plupart des organes animaux ainsi que dans le sang. Son pH d'activité est 3, 5-4, 0.

La lécithinase B, spécifique des lysophosphatides, est aussi activée par les sels de calcium.

Lécithinase C :

C'est une choline phosphatide qui libère la choline. Elle a été isolée par Hanahan et Chaikoff dans les feuilles de choux et la carotte. Son pH d'activité est 5,2-5,9; elle est stable à la chaleur.

Lécithinase D :

Cette glycéro-phosphatase coupe la molécule phosphatide en diglycéride et ester de choline de l'acide phosphorique. Elle est identique à la toxine alpha de *Clostridium welchii*. Son pH d'activité est 7,0-7,6. Elle est activée par les sels de calcium. La lécithinase D agit sur la phosphatidylcholine et plus lentement sur la sphingomyéline; elle est inactive vis-à-vis de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylsérine. Cet enzyme peut être séparé de la toxine thêta et concentré par la méthode de Roth et Pillemer (1953) au méthanol froid. Son titrage peut se faire rapidement par la méthode manométrique de Zamecnik, Brewster et Lipmann (1947).

L'action de la lécithinase D sur le sérum signalée par Nagler (1939) et étudiée par Petermann (1946) sur diverses fractions protéiniques mérite de retenir l'attention des chercheurs et permet de résoudre certains problèmes. C'est ainsi, par exemple, que Ahrens et Kunkel (1949) ont montré que les phosphatides stabilisent les lipides du sérum. La destruction de la phosphatidylcholine du sérum par hydrolyse enzymatique (lécithinase D) fait apparaître un trouble qui est linéairement proportionnel à la teneur totale en lipides. La concentration en phospholipides d'un sérum, nécessaire pour la formation de complexes avec les protéines, apparaît être un facteur important pour la taille des particules de lipides qui sont ou masqués ou visibles.

L'action de la lécithinase D sur la lécithine a été étudiée par Hanahan et Vercamer (1954).

VII - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES PRODUITS

D'HYDROLYSE DES PHOSPHATIDES :

Après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6N le liquide est refroidi et les acides gras sont enlevés par filtration. La solution est évaporée à sec sous vide, puis séchée sous P₂O₅ et KOH. La solution

est ajustée à pH 7; la concentration de cette solution doit être d'environ 1 mg d'acide aminé par ml. On en prend 0,01 ml pour faire la chromatographie sur papier.

a) *Systèmes de solvants pour la chromatographie sur papier :*

Chargaff, Levine et Green (1948) emploient :

n-butanol-morpholine (3/1). Les divers Rf obtenus sont :

0,11 pour la sérine, 0,30 pour la choline et 0,51 pour l'éthanolamine.

Levine et Chargaff (1951) indiquent un système :

n-butanol-diéthylène glycol-eau (4/1/1). Les Rf obtenus sont :

0,18 pour la sérine, 0,35 pour l'éthanolamine, 0,43 pour la choline.

Gertler, Kream et Baturay (1954) utilisent les mêmes solvants.

Les Rf sont :

0,20 pour la sérine, 0,37 pour l'éthanolamine, 0,51 pour la choline.

Munier (1951) dans un solvant à phase alcaline :

n-butanol (50) monochlorhydrate du glycol (10) ammoniacal 21° Bé (5) eau (16), trouve les Rf suivants :

sérine 0,16; choline 0,30; éthanolamine 0,64.

Dans un solvant à phase acide n-butanol (100 ml) acide acétique (30 ml), Munier ajoute de l'eau goutte à goutte jusqu'à très léger excès et laisse décanter. Il obtient les Rf de sérine 0,30; acétate d'éthanolamine 0,51; acétate de choline 0,55.

La méthode de Munier avec un solvant en phase alcaline donne un bon résultat.

b) *Révélation des spots :*

Identification de la sérine et de l'éthanolamine :

Après séchage du papier on pulvérise une solution à 0,1% de ninhydrine dans le n-butanol. On chauffe quelques minutes à 80°. Les spots de sérine et d'éthanolamine apparaissent en violet. La colorimétrie des éluats donne une droite de 0 à 60 gamma d'acide aminé.

Identification de l'éthanolamine seule :

Munier (1951) indique que l'éthanolamine, en milieu faiblement alcalin, se combine à froid aux aldéhydes et aux cétones pour donner des oxazolidines substituées. On pulvérise le chromatogramme avec le réactif suivant : Quinone 0,5 g; pyridine 10 ml; n-butanol 40 ml. l'éthanolamine donne un spot *immédiatement* coloré en brun-rouge.

Identification de la choline :

Chargaff, Levine et Green (1948) révèlent la choline par action de l'acide phosphomolybdique (pulvérisation d'une solution aqueuse à 2% d'acide phosphomolybdique); le papier est lavé ensuite au n-butanol, puis à l'eau. Le phosphomolybdate de choline ainsi formé est réduit par le chlorure stanneux (le papier est passé lentement dans une solution fraîchement préparée de 0,4% de chlorure stanneux dans HCl 3N). Les spots bleu foncé se détachent sur fond blanc bleuâtre. Le papier est séché et les surfaces des spots sont mesurées. Il existe une relation linéaire entre les surfaces des spots et le logarithme de la concentration en choline (Fisher, Parsons et Morrison, 1948), Gertler, Kream et Baturay (1954) séchent le papier à la température du laboratoire, puis le soumettent à la vapeur d'eau et au gaz ammoniac; ce prétraitement donne des spots plus nets.

On peut révéler la choline en plongeant le papier dans une solution aqueuse de reineckate d'ammonium 0,05M pendant 2 heures ou plus, suivi d'un lavage à l'eau pour enlever l'excès de réactif et d'un séchage. On obtient des spots roses (Baer et Kates, 1950.)

La choline peut être révélée par action du bichromate de potassium à 60° pendant 1 heure, on a un spot légèrement brunâtre; cette coloration est intensifiée par action d'une solution d'hématine à 60° pendant 10 minutes (Baker, 1947; Hack, 1953).

Identification de l'ensemble ; sérine, éthanolamine, choline :

Munier (1951) révèle sur un même chromatogramme la sérine et l'éthanolamine par la ninhydrine et ensuite la choline par les vapeurs d'iode (Brante, 1949). Les spots de choline sont colorés en brun tandis que ceux de sérine et d'éthanolamine sont colorés en violet.

Identification de la sphingomyéline :

Les chromatogrammes sont soumis à l'action de la potasse 0,1 N à la température du laboratoire pendant 20 heures. La sphingomyéline résiste à l'hydrolyse. Les produits d'hydrolyse des autres phosphatides sont éliminés par lavage abondant à l'eau puis à l'acétone. La sphingomyéline qui reste est révélée par le test au bichromate-hématine (Hack, 1953).

Identification des esters phosphoriques :

Hanes et Isherwood (1949) pulvérisent une solution d'un molybdate acide. Un chauffage de 7 minutes à 85° produit l'hydrolyse des esters sans décomposition du papier. L'acide phosphorique libre produit

à partir des esters forme un complexe phosphomolybdate. En traitant le papier par l'hydrogène sulfuré, il y a réduction et formation de spots bleu intense sur un fond faiblement chamois. Cole, Lalle et Ruthven (1953) utilisent cette méthode en modifiant la formule du réactif de Hanes et Isherwood. Rouser, Berry, Marinetti et Stotz (1953) utilisent aussi le réactif de Hanes et Isherwood avec la modification de Rouser et Neuman (1952).

Dans ce test des esters phosphoriques la sphingomyéline réagit plus lentement que les glycérophosphatides (Hack, 1953).

Cependant Wade et Morgan (1953) font l'objection que le papier est rendu très fragile par cette hydrolyse acide. Ils préfèrent employer une méthode basée sur la fixation des ions ferriques par les esters phosphoriques et réaction de l'ion ferrique libre par l'acide sulfosalicylique. Le papier est pulvérisé avec une solution à 0,1 % de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dans l'éthanol à 80°, séché à l'air à la température du laboratoire, et pulvérisé ensuite avec une solution à 1 % d'acide sulfosalicylique dans l'éthanol à 80°. En séchant, les phosphates donnent des spots blancs sur fond mauve pâle. Le pH de 1,5-2,5 (virage au rouge du bleu de thymol) est optimum pour la formation de la couleur. Si le papier est fortement tamponné (alcalin), on doit augmenter la concentration de l'acide sulfosalicylique jusqu'à 10 %. La méthode permet de détecter de 1-2 gamma de phosphore dans un spot de 1 cm².

Identification des spots d'acétal-phosphatides :

Hack (1952) hydrolyse le groupement acétal en présence de solution aqueuse de chlorure mercurique et révèle le spot des aldéhydes par la fuchsine sulfitée ou par une solution aqueuse de 2-4 dinitro-phenylhydrazine. L'hydrolyse peut aussi être faite avec 20 % d'acide acétique à 37° pendant 48 heures (Thannhauser, Boncoddio et Schmidt, 1951).

Identification d'acides aminés soufrés :

Chargaff, Levine et Green (1948) utilisent la propriété des acides aminés soufrés (cystéine, cystine, méthionine) de catalyser l'oxydation de l'azide de sodium par l'iode : $2\text{NaN}_3 + \text{I}_2 \rightarrow 2\text{NaI} + 3 \text{N}_2$.

Les papiers sont séchés à 95° pendant 30 minutes puis pulvérisés avec une solution aqueuse d'iode 0,05 N contenant 1,5 % d'azide de Na. Des spots blancs sur fond brun clair indiquent la position des acides aminés soufrés. La cystéine produit une réduction immédiate; la cystine demande 15 minutes et la méthionine 60 minutes.

Identification des sucres réducteurs :

Partridge (1948) les révèle par pulvérisation avec une solution contenant parties égales de nitrate d'argent N/10 et de solution ammoniacale 5N. Les sucres donnent des spots bruns foncés.

Chargaff, Levine et Green (1948) préfèrent la réaction au dichlorure de m-phénylénédiamine (solution à 0,2M dans l'alcool à 76°). Le papier est pulvérisé et chauffé 5 minutes à 105°; on obtient des spots fluorescents à la lampe de quartz.

Identification d'acides gras et aldéhydes non saturés :

L'acide osmique les colore en noir. Il colore d'ailleurs en noir les phosphatides qui ont des acides gras non saturés dans leur molécule ainsi que la sphingosine de la sphingomyéline.

La méthode par chromatographie sur papier des produits d'hydrolyse des phosphatides du sérum permet de doser la choline, la sérine et l'éthanolamine et de déterminer ainsi les taux en phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline des lipides du sérum. Cette méthode peut être combinée avec les méthodes chimiques de dosage; mais ces méthodes nécessitent, pour être précises, un prélèvement important de sang; c'est pourquoi nous adoptons de préférence la méthode chromatographique soit seule, soit combinée avec une méthode d'électrophorèse sur papier (Blass, Machebœuf et Rebeyrotte, 1953; Blass, Lecomte et Polonovski, 1954).

VIII - ANALYSE CHIMIQUE DES PHOSPHATIDES :

a) *Dosage du phosphore lipidique :*

De nombreux auteurs évaluent la teneur en phosphatides totaux des lipides d'un sérum par un dosage de phosphore lipidique. Cependant cette méthode a été critiquée par Le Breton (1921) et Le Breton et Pantaléon (1947). Selon ces auteurs le dosage de phosphore lipidique ne correspond pas aux phosphatides en raison de la présence de phosphore non-phosphatidique entraîné dans le précipité acétonique purifié. Dans le rein, le foie, le poumon, Le Breton (1921) trouve de l'ordre de 20% de phosphore lipidique qui n'est pas phosphatidique. En est-il de même pour les phosphatides d'un sérum? Il semble cependant que sur les phosphatides d'un sérum isolés par chromatographie sur acide silicique et purifiés par chromatographie sur cellulose, on soit en droit de faire un dosage de phosphore lipidique qui correspondra bien à la totalité des phosphatides. Le dosage

du phosphore lipidique est effectué après minéralisation par l'acide sulfurique-eau oxygénée ou par l'acide sulfurique-acide perchlorique ou par l'acide sulfurique-acide nitrique et titrage du phosphore minéral selon la méthode de Fiske et Subbarow (1926) ou Bell et Doisy (1920) - Briggs (1922) - Machebœuf et Delsal (1943) ou Berenblum et Chain (1938). Le coefficient 25 est généralement employé pour transformer le poids de phosphore lipidique trouvé en phosphatides.

b) *Dosage de la choline :*

Après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6N à 100°, sous reflux ou en tubes scellés; ou après hydrolyse barytique; on précipite la choline par le reineckate d'ammonium fraîchement préparé. Le reineckate de choline est lavé au n-propanol, à l'éther anhydre, dissous dans l'acétone et dosé à 520 millimicrons ou 327 millimicrons selon les méthodes de Beattie (1936) ou Winzler et Mezerve (1945).

Le dosage de choline libre dans le plasma peut se faire par la méthode de Appleton, LaDu; Levy, Steele et Brodie (1953); mais ce dosage n'est cité ici que pour mémoire car il n'existe pas de choline libre dans les extraits lipidiques du plasma.

Albrink (1950) préfère cependant précipiter la choline par l'acide phosphotungstique sous forme de phosphotungstate de choline. Le précipité est lavé et décomposé par la soude dans une réaction volumétrique quantitative (Folch et Fitzsimmons).

La teneur en chlorure de choline trouvée correspond à l'ensemble : phosphatidylcholine + sphingomyéline.

c) *Dosages de l'éthanolamine et de la sérine :*

Les dosages directs proposés par Axelrod, Reichenthal et Brodie (1953) semblent donner toute satisfaction. L'éthanolamine et la sérine sont précipités par le dinitrofluorobenzène sous forme de N-2,4 dinitrobenzène éthanolamine et N-2,4 dinitrobenzène sérine. Le premier est soluble dans le chloroforme et le second reste dans la phase aqueuse. Le dosage final colorimétrique est effectué à 420 millimicrons.

On peut aussi séparer la sérine et l'éthanolamine par la méthode de Artom (1945): après hydrolyse la sérine n'est pas adsorbée par la permutite, tandis que l'éthanolamine est adsorbée.

d) *Dosage de la sphingomyéline*

Après hydrolyse par la potasse normale à 37° pendant 24 heures, la sphingomyéline résistant seule à cette hydrolyse peut être isolée. On peut la purifier par chromatographie sur alumine qui

enlève les cérébrosides et par adsorption sur magnésie qui enlève les phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine qui n'auraient pas été hydrolysés complètement. La sphingomyéline ainsi purifiée peut être hydrolysée par l'acide chlorhydrique 6N et le dosage de choline effectué sur l'hydrolysate. On a ainsi la teneur en sphingomyéline.

Comme on connaît la teneur en choline de l'ensemble : phosphatidylcholine + sphingomyéline, la différence donne la teneur en choline due à la phosphatidylcholine. Cette teneur multipliée par 5,56 donne le poids de phosphatidylcholine.

On peut aussi doser directement la sphingosine sur les hydrolysats par la méthode de McKibbin et Taylor (1949) par extraction de la sphingosine par le chloroforme et titrage de l'azote par le réactif de Nessler, après minéralisation par l'acide sulfurique-eau oxygénée.

IX - TAUX DES DIVERS PHOSPHATIDES DU SÉRUM HUMAIN

La proportion des phosphatides à base de choline est très élevée dans les lipides du sérum :

D'une part : Kirk (1938); Thannhauser, Benotti et Reinstein (1939); Erickson et al. (1940); Blix (1940); Brante (1940); Artom (1941, 1945); Marenzi et Cardini (1943); Albrink (1950), trouvent un maximum de 80 %. D'autre part, Taurog et al. (1944); Hack (1947); Sinclair (1948), trouvent beaucoup plus : de 90 à 95 %.

Quel est donc le taux exact ?

Le taux de 90-95 % est peut-être par excès car les auteurs arrivant à cette conclusion titrent la choline par le reineckate et cette méthode n'est pas spécifique. De plus, la grande majorité de ces auteurs ne purifient pas leurs extraits lipidiques et introduisent par là même de grandes sources d'erreur; cependant, des travaux récents ont été publiés sur des extraits lipidiques purifiés.

Axelrod, Reichenthal et Brodie (1953) purifient leur extrait lipidique par la méthode au fer colloidal de Folch et Van Slyke (1939); de plus, ils font des dosages *directs* d'éthanolamine et de sérine en utilisant des réactions spécifiques (N-2,4 dinitrobenzène éthanolamine, N 2,4 dinitrobenzène sérine). Ils trouvent que le plasma humain contient environ : 3 % de phosphatidyléthanolamine et 5 % de phosphatidylsérine. Cette méthode de dosage directe de l'éthanolamine et de la sérine est certainement bonne et ces auteurs confirment ainsi la

présence d'au moins 90 % de phosphatidylcholine dans le plasma humain.

Mazurier (1951), dans une thèse de Pharmacie, avait déjà trouvé de l'ordre de 2 % de phosphatidyléthanolamine dans le plasma humain; par contre, les chromatographies sur papier de l'éthanolamine et de la sérine avaient été négatives pour le sérum de bœuf et de cheval.

Blass, Rouhi, Lecomte et Machebœuf (1953), avec des lipides purifiés par dialyse, trouvent moins de 4 % de phosphatidyléthanolamine et un peu moins de 1 % de phosphatidylsérine. Leurs résultats cadrent avec ceux d'Axelrod et al. Ils trouvent également les mêmes résultats pour le plasma de cheval et sont ainsi en contradiction avec Mazurier. Sinclair (1948) donne une teneur de 3 à 8 % de céphaline pour le plasma humain; par contre, comme Mazurier, il ne trouve pas d'azote aminé dans les phosphatides du sérum de bœuf.

Gertler, Kream et Baturay (1954); Kream et Gertler (1954) emploient des extraits lipidiques bruts et contaminés par une forte proportion d'azote non-lipidique.

De tous ces travaux on peut conclure qu'au moins 90 % des phosphatides du sérum humain normal sont à base de choline; il n'existe qu'une faible teneur en phosphatidyléthanolamine (3 à 8 %) et en phosphatidylsérine (1 à 5 %).

Blass, Rouhi, Lecomte et Machebœuf (1953) en reprenant et étendant le travail de Wynn et Williams (1950) ont émis l'hypothèse que les phosphatides du plasma contiendraient un phosphatidypeptide. Les lipides du sérum sont purifiés par dialyse ou électrodialyse de l'émulsion des lipides dans l'eau jusqu'à ce qu'un chromatogramme ne donne plus qu'un seul spot se colorant à la ninhydrine. Les phosphatides sont ensuite précipités par l'acétone et hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6 N à l'ébullition pendant 48 heures. L'électrorhéophorese (Machebœuf et al. 1953) révèle la présence de 9 spots d'acides aminés. Ce peptide a donc suivi les phosphatides au cours de leur précipitation. Cette hypothèse de l'existence d'un phosphatidylpeptide doit cependant être confirmée par d'autres méthodes d'isolement et de purification des phosphatides.

Nous nous permettons d'insister pour que toutes les recherches soient faites en utilisant d'abord des extraits lipidiques *purs*, soit de sérum humain normal, soit de sérum pathologique. Il est donc indispensable de connaître la meilleure méthode de purification des lipides parmi celles que nous avons citées. Il faut ensuite fractionner ces lipides par des méthodes appropriées (chromatographie sur colonne, contre-cou-

rant) et appliquer les méthodes de chromatographie sur papier ou d'électrophorèse sur papier ou de combinaison de ces deux méthodes (Blass, Lecomte et Polonovski, 1954) soit sur les produits d'hydrolyse des phospholipides, soit directement sur les phospholipides purifiés. La méthode que viennent de publier Lea et Rhodes (1954) permet de doser de 1 à 5 gamma N de phosphatidyléthanolamine en présence de phosphatidylcholine (jusqu'à 1000 gamma N) sans hydrolyse préalable des phosphatides. Elle est basée sur la méthode colorimétrique à la ninhydrine de Moore et Stein (1948) (modifiée en 1954). Cette méthode d'une très grande sensibilité (plus sensible que la méthode de dosage d'azote aminé de Van Slyke) appliquée aux phospholipides purifiés du sérum humain doit donner d'excellents résultats.

X - ROLE DES PHOSPHATIDES DANS LA RÉACTION DE FLOCCULATION ANTIGÈNE-ANTICORPS :

Les lipides des immunsérums jouent-ils un rôle dans la réaction de floculation antigène-anticorps?

Parmi les lipides, Tayeau et Neuzil (1946) ont montré le rôle négatif du cholestérol, en appliquant aux immunsérums la méthode de délipidation de Tayeau (1941) au saponoside qui permet d'enlever sélectivement le cholestérol d'un sérum. Nous avons vérifié (Delsal, Perez et Laporte, 1950), qu'un immunsérum délipidé par la méthode de McFarlane (1942) (qui enlève le cholestérol) conservait intégralement ses propriétés floculantes et ainsi, par une autre méthode, nous avons confirmé le rôle négatif du cholestérol.

Mais un immunsérum délipidé par la méthode à l'alcool-éther à 15° perd ses propriétés floculantes; comme cette méthode de délipidation enlève une grande partie des phospholipides, faut-il donc conclure que ceux-ci ont un rôle capital dans la réaction de floculation? Dans notre article nous avons montré qu'une délipidation par l'éther à -70°, en incorporant quelques % d'alcool (Delsal, 1949), enlève, dans certains cas, plus de lipides et particulièrement plus de phospholipides que la méthode à l'alcool-éther à -15°. Dans ces conditions la réaction de floculation n'est pas supprimée. Ces expériences nous permettaient de conclure (comme la délipidation n'était pas totale et qu'il restait encore des phospholipides) qu'un faible pourcentage des phospholipides jouaient peut-être un rôle, mais que les lipides n'étaient sans doute pour rien dans le phénomène de floculation. Nous avons conclu que la méthode de délipidation par l'alcool-éther à -15° dénaturait sans doute les anticorps, dénaturation des protéines, se mani-

festant par la perte des propriétés floculantes, avec conservation des propriétés antitoxiques pour les sérums antitoxiques. Orlans (1952) dans une publication sur le même sujet, commet une erreur de traduction de notre article (Delsal, Perez et Laporte, 1950). Elle nous fait dire que la délipidation par l'acétone-éther n'affecte pas la vitesse de floculation, ce qui nous met ainsi en contradiction avec le travail de Katsura (1950). Au sujet de l'acétone nous avons dit «qu'après une délipidation d'un sérum de cheval antipseudoglobuline de porc, par l'acétone-éther à -15°, les propriétés floculantes ont complètement disparu». Cette conclusion est donc en parfait accord avec l'observation de Katsura sur un sérum antitoxique délipidé par l'acétone qui ne flocule plus avec la toxine correspondante.

Krueger et Heidelberger (1950), en appliquant une méthode analytique quantitative, trouvent qu'après délipidation par l'alcool-éther un antisérum flocule plus lentement que le sérum non délipidé mais qu'en attendant plus longtemps et en centrifugeant le précipité antigène-anticorps à des vitesses plus élevées, une floculation complète avait bien lieu.

Katsura (1950) en étudiant quantitativement la réaction de floculation de sérums antitoxiques montre qu'un sérum antitoxique digéré conserve son pouvoir floculant après délipidation. Le sérum brut délipidé par l'alcool-éther ou l'acétone ne flocule plus, mais il peut retrouver la faculté de floculer par digestion peptique.

Ces deux travaux apportent donc la preuve du rôle négatif des lipides, et particulièrement des phospholipides, dans la réaction de floculation.

Orlans (1952) étudie plusieurs systèmes anticorps-antigène. L'extraction des lipides à froid par l'alcool-éther produit une perte complète de floculation d'un sérum de lapin antioalbumine et anti-albumine de cheval; une floculation retardée, mais complète, d'un sérum de lapin antiglobuline de cheval; et une floculation retardée avec de faibles changements dans la courbe de précipitation pour un sérum de cheval antipneumocoque type 1.

La précipitation des anticorps non-floculants n'est pas rétablie par l'addition des lipides extraits, de sérum frais, de céphaline ou lécithine ou en présence d'un système antigène-anticorps précipitant hétérologue.

Mais les résultats les plus remarquables du travail d'Orlans sont le rétablissement du pouvoir floculant d'un sérum de lapin délipidé non-floculant lorsqu'il est mélangé avec une petite quantité, bien définie, d'un anti-sérum homologue non-délipidé et la coïnci-

dence des courbes de précipitation dans la zone d'anticorps. Ces résultats restreignent la généralité des conclusions de Krueger et Heidelberg basée sur les recherches avec trois antisérums de chevaux.

Orlans indique que le traitement, utilisé pour extraire les lipides et qui fait perdre le pouvoir floculant, peut agir de trois façons :

1) l'absence des lipides peut directement affecter la floculation par augmentation de la solubilité.

2) Le traitement peut distordre les molécules d'anticorps, soit par l'action directe des solvants, soit comme résultat de l'enlèvement des lipides, qui peuvent être essentiels pour maintenir la configuration des molécules.

3) par agrégation des protéines du sérum.

Il est difficile de faire cadrer les théories émises pour la précipitation des systèmes antigène-anticorps si on admet que le changement dans la molécule d'anticorps est complet; mais si on admet que le changement est incomplet et consiste en un affaiblissement de la valence ou en une réduction de la perte d'attraction pour l'eau lorsque l'anticorps est combiné avec l'antigène, chaque explication est possible.

En conclusion de tous ces travaux, nous confirmons que les phospholipides n'ont pas, en eux-mêmes, d'action sur la réaction de floculation antigène-anticorps et que c'est la méthode de délipidation par l'alcool-éther à -15° qui dénature les protéines.

Sven Arrhenius (1944) constate que les constantes diélectriques des protéines délipidées, par cette méthode, diffèrent de celles du sérum brut et que la structure interne des protéines est modifiée. La perte du pouvoir floculant doit être attribuée à ce changement de structure.

Cependant la question n'est pas parfaitement résolue et d'autres travaux sont encore nécessaires pour renforcer cette opinion; il faut aussi se garder de généraliser les résultats obtenus pour un système antigène-anticorps déterminé et chaque système doit être étudié séparément.

CONCLUSION

Nous avons exposé, dans cette étude, l'état actuel de la question sur les phosphatides du sérum. Cependant des progrès sont encore à réaliser pour pouvoir disposer, en chimie clinique, de méthodes

à la fois simples et précises pour le dosage des divers phosphatides du sérum. Après avoir extrait, du sérum ou du plasma, tous les phosphatides on doit isoler et purifier les phosphatides par chromatographie sur colonne d'acide silicique et de cellulose. La chromatographie sur papier, imprégné d'acide silicique, des phosphatides purifiés et non hydrolysés permettra en suite d'effectuer le fractionnement des divers phosphatides. Cette méthode est plus facilement applicable que la chromatographie des produits d'hydrolyse; cependant cette dernière méthode confirmera les résultats obtenus par la première. Ces méthodes pourront être appliquées facilement à un échantillon réduit de sérum ou de plasma et permettront d'étudier le métabolisme des phosphatides dans les cas pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahrens et Kunkel - J. Exp. Med. 1949 (90) 409
Ahrens et Craig - J. Clin. Inv. 1951 (30) 626
Ahrens et Craig - J. Biol. Chem. 1952 (195) 299
Ahrens et Craig - J. Biol. Chem. 1952 (195) 763
Albrink - J. Clin. Inv. 1950 (29) 46
Anchel et Waelsch - J. Biol. Chem. 1944 (152) 501
Appleton, LaDu, Levy, Steele et Brodie - J. Biol. Chem. 1953 (205) 803
Ardry et Fontaine - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 (33) 1497
Ardry et Risbec - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 (33) 1504
Arrhenius - The Svedberg - p. 419
Artom - J. Biol. Chem. 1941 (139) 65
Artom - J. Biol. Chem. 1945 (157) 585 et 595
Axelrod, Reichenthal et Brodie - J. Biol. Chem. 1953 (204) 903
Baer et Kates - J. Biol. Chem. 1948 (175) 79
Baer et Kates - J. Am. Chem. Soc. 1948 (70) 1394
Baer et Kates - J. Biol. Chem. 1950 (185) 625
Baer et Kates - J. Am. Chem. Soc. 1950 (72) 942
Baer et Kates - J. Biol. Chem. 1953 (200) 251
Baer et Kates - J. Am. Chem. Soc. 1953 (75) 621
Bailly et Gaumé C. R. Acad. Sci. 1934 (198) 2258 et (199) 793
Baker - Quart. J. Micr. Sci. 1947 (88) 463
Barry, Sato, et Craig - J. Biol. Chem. 1951 (188) 299
Beattie - Biochem. J. 1936 (30) 1554

- Bell et Doisy - J. Biol. Chem. 1920 (44) 55
Berenblum et Chain - Biochem. J. 1938 (32) 286 et 295
Bevan, Gregory, Malkin et Pool - J. Chem. Soc. 1951-841
Blass, Machebœuf et Rebeyrotte - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 (35) 953
Blass, Rouhi, Lecomte et Machebœuf - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 (35) 959
Blass, Lecomte et Polonovski - Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 (36) 627
Blix - Biochem. Z. 1940 (305) 129
Bloor - J. Biol. Chem. 1928 (77) 53
Borgstroem - Acta Physiol. Scand. 1952 (25) 101 et 111
Boyd - J. Biol. Chem. 1936 (114) 223 et (115) 37
Brante - Biochem. Z. 1940 (305) 136
Brante - Acta Physiol. Scand. 1949 (18) Suppl. 63
Brante - Nature 1949 (163) 651
Briggs - J. Biol. Chem. 1922 (53) 13
Brockmann et Schodder - Ber 1941 (74) 73
Burmester - J. Biol. Chem. 1946 (164) 233 et 165-565
Cannon, Zilch et Dutton - Anal. Chem. 1952 (24) 1530
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1947 (169) 77
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1947 (170) 269-285-295
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1951 (191) 727
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1951 (192) 197
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1952 (199) 283
Carter et al. - J. Biol. Chem. 1954 (206) 613
Chargaff, Levine et Green - J. Biol. Chem. 1948 (175) 67
Chibnall et Channon - Biochem. J. 1927 (21) 225-233-479-1112 et 1929 (23) 168-176
Christensen - J. Biol. Chem. 1939 (129) 531
Clément-Champougny - Arch. Sci. Physiol. 1952 (6) 363
Contardi et Ercoli - Biochem. Z. 1933 (261) 275
Gole, Lathe et Ruthven - Biochem. J. 1953 (54) 449
Cole, Lathe et Ruthven - Biochem. J. 1953 (55) 17
Craig - J. Biol. Chem. 1944 (155) 519
Craig et Post - Anal. Chem. 1949 (21) 500
Craig - Anal. Chem. 1950 (22) 1346
Craig - Methods in Medical Research 1952 (5) 3
Cremer et Schuhler - Biochem. Z. 1949 (320) 112
Delsal - Bull. Soc. Chim. Biol. 1944 (26) 99
Delsal - Bull. Soc. Chim. Biol. 1944 (26) 282
Delsal - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 (31) 122
Delsal - C. R. Soc. Biol. 1950 (144) 66
Delsal - Perez et Laporte - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 (32) 219
Delsal - Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 (36) 1329

- H. J. Deuel Jr. - The Lipids - Vol. 1 - 1951 - 421 et Vol. 11 - 1955 - 23
De Suetoe-Nagy et Anderson - J. Biol. Chem. 1947 (171) 749-761
Douste-Blazy, Polonovski et Valdignié - C. R. Acad. Sci. 1952 (235) 1643
Ehrlich, Taylor et Waelsch - J. Biol. 1948 (173) 547
Erickson, Avrin, Teague et Williams - J. Biol. Chem. 1940 (135) 671
Fairbairn - J. Biol. Chem. 1945 (157) 633
Fairbairn - J. Biol. Chem. 1948 (173) 705
Faure - Thèse Sciences Paris 1940
Faure et Coulon - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 (30) 533
Faure - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 (32) 503
Faure et Legault-Demare - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 (32) 509
Faure et Morelec-Coulon - C. R. Acad. Sci. 1953 (236) 1104
Faure et Morelec-Coulon - C. R. Acad. Sci. 1954 (238) 411
Favarger - Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 1949 (7) 371
Feeney, MacDonnell et Fraenkel-Conrat-Arch. Biochem. Biophys. 1954
(48) 130
Feulgen et Rossenbeck - Z. Physiol. Chem. 1924 (135) 230
Feulgen et Voit - Arch. Ges. Physiol. 1924 (206) 389
Feulgen et Gruenberg-Hoppe Seyl. Z. 1938 (161) 257
Feulgen et Bersin - Z. Physiol. Chem. 1939 (260) 217
Fillerup et Mead - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953 (83) 574
Fisher, Parsons et Morrison - Nature 1948 (161) 764
Fiske et Subbarow - J. Biol. Chem. 1926 (66) 375
Fleury et Lange - C. R. Acad. Sci. 1933 (196) 1416 et J. Pharm. Chim.
1933 (17) 107 - 196 - 313 - 409
Fleury-C. R. Acad. Sci. 1948 (226) 441
Fleury - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 (30) 519 - 521
Fleury et Guitard - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 (30) 525 - 528
Fleury et Le Dizet - C. R. Acad. Sci. 1950 (230) 1321
Fleury et Le Dizet - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 (32) 495
Fleury et Le Dizet - C. R. Acad. Sci. 1952 (234) 2024
Fleury et Le Dizet - Bull. Soc. Chim. Biol. 1952 (34) 665
Fleury et Le Dizet - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 (35) 883
Fleury et Le Dizet - Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 (36) 971
Folch et Van Slyke - J. Biol. Chem. 1939 (129) 539
Folch et Van Slyke - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939 (41) 514
Folch - J. Biol. Chem. 1941 (137) 51
Folch et Schneider - J. Biol. Chem. 1941 (139) 973
Folch et Woolley - J. Biol. Chem. 1942 (142) 963
Folch - J. Biol. Chem. 1942 (146) 31 - 35
Folch - Fed. Proc. 1946 (5) 134
Folch - Fed. Proc. 1947 (6) 252
Folch - J. Biol. Chem. 1948 (174) 439

- Folch - *Ann. Rev. Biochem.* 1948 (17) 147
Folch, Ascoii, Lees, Meath et LaBaron - *J. Biol. Chem.* 1951 (191) 833
Gertler, Kream et Baturay - *J. Biol. Chem.* 1954 (207) 165
Hack - *J. Biol. Chem.* 1946 (166) 455
Hack - *J. Biol. Chem.* 1947 (169) 137
Hack - *Anat. Rec.* 1952 (112) 275
Hack - *Biochem. J.* 1953 (54) 602
Hanahan et Chaikoff - *J. Biol. Chem.* 1947 (168) 233
Hanahan et Chaikoff - *J. Biol. Chem.* 1947 (169) 699
Hanahan et Chaikoff - *J. Biol. Chem.* 1948 (172) 191
Hanahan, Turner et Jayko - *J. Biol. Chem.* 1951 (192) 623
Hanahan - *J. Biol. Chem.* 1954 (207) 879
Hanahan et Vercamer - *J. Am. Chem. Soc.* 1954 (76) 1804
Hanes et Isherwood - *Nature* 1949 (164) 1107
Hess - *J. Lab. Clin. Med.* 1947 (32) 1163
Huennekens, Hanahan et Uziel - *J. Biol. Chem.* 1954 (206) 443
Johnson et Dutch - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1951 (78) 662
Katsura - *Jap. J. Exp. Med.* 1950 (20) 657
Kerr et Bauld - *Biochem. J.* 1953 (55) 872
Kies et Davies - *J. Biol. Chem.* 1951 (189) 637
Kirk - *J. Biol. Chem.* 1944 (140) 509
Klenk - *Z. Physiol. Chem.* 1929 (185) 169
Klenk et Diebold - *Z. Physiol. Chem.* 1931 (198) 25
Klenk et Rennkamp - *Z. Physiol. Chem.* 1941 (267) 145
Kream et Gertler - *Bull. N. Y. Acad. Med.* 1954 (30) 319
Krueger et Heidelberger - *J. Exp. Med.* 1950 (92) 383
Lathe et Ruthven - *Biochem. J.* 1951 (49) 540
Lea et Rhodes - *Biochem. J.* 1953 (54) 467
Lea et Rhodes - *Biochem. J.* 1954 (56) 613
Lea et Rhodes - *Biochem. J.* 1955 (59) V
Le Breton - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1921 (3) 539
Le Breton et Pantaléon - *Exp. Ann. Biochim. Médicale* 1947 (7) 111
Legault-Demare et Faure - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951 (33) 1013
Levene - *J. Biol. Chem.* 1916 (24) 69
Levine et Chargaff - *J. Biol. Chem.* 1951 (192) 465
Lovern - *Biochem. J.* 1952 (51) 464
Lovern et Olley - 2ème Congrès Int. Biochim. 1952 Abst. p. 163 
Machebœuf, Levy et Faure - *Ann. I. P.* 1935 (55) 547
Machebœuf, Levy et Faure - *C. R. Acad. Sci.* 1935 (200) 1547
Machebœuf, Levy et Faure - *C. R. Acad. Sci.* 1937 (204) 1843
Machebœuf et Delsal - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1943 (25) 116
Machebœuf et Berger-Jeuilin - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1950 (32) 17

- Machebœuf, Rebeyrotte, Dubert et Brunerie - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 (35) 334
- Machebœuf, Dubert et Rebeyrotte - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 (35) 346
- Mac Laklan - J. Biol. Chem. 1944 (152) 97
- Mac Lean - Biochem. J. 1912 (6) 355 et 1915 (9) 351
- Marenzi et Cardini - J. Biol. Chem. 1943 (147) 363
- Marinetti, Berry, Rouser et Stotz - J. Am. Chem. Soc. 1953 (75) 313
- Mazurier - Thèse Pharmacie Paris 1951
- McFarlane - Nature 1942 (149) 439
- McGuire et Earle - J. Am. Oil Chem. Soc. 1951 (28) 328
- McKibbin et Taylor - J. Biol. Chem. 1949 (178) 17-29
- McPherson et Lucas - Fed. Proc. 1947 (6) 273
- Mead et Fillerup - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954 (86) 449
- Moore et Stein - J. Biol. Chem. 1948 (176) 337
- Moore et Stein - J. Biol. Chem. 1954 (211) 907
- Munier - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 (33) 862
- Nagler - Brit. J. Exp. Path. 1939 (20) 473
- Olley - Biochim. Biophys. Acta 1953 (10) 493
- Orlans - Brit. J. Exp. Path. 1952 (33) 451
- Paget et Pierrart - Bull. Soc. Chim. Biol. 1939 (21) 528-537
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1941 (137) 545
- Pangborn - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1941 (49) 484
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1942 (143) 247
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1944 (153) 343
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1945 (161) 71
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1947 (168) 351
- Pangborn - J. Biol. Chem. 1951 (188) 471
- Partridge - Nature 1948 (158) 270
- Pernokis, Freeland et Krauss - J. Lab. Clin. Med. 1941 (26) 1978
- Petermann - J. Biol. Chem. 1946 (162) 37
- Pratt, Kaucher, Richards, Williams et Macy - Am. J. Obst. Gynec. 1946 (52) 402
- Price et McCullagh Lewis - Biochem. J. 1929 (23) 1030
- Reiser et Dieckert - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954 (87) 622
- Riemenschneider, Ellis et Titus - J. Biol. Chem. 1938 (136) 255
- Roth et Pillemer - J. Immunol. 1953 (70) 533
- Rouhi, Blass et Machebœuf - C. R. Soc. Biol. 1952 (146) 847
- Rouhi, Blass et Machebœuf - C. R. Acad. Sci 1953 (236) 539
- Rouhi, Blass et Polonovski - Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 (36) 1417
- Rouser et Neuman - Fed. Proc. 1952 (11) 268
- Rouser, Berry, Marinetti et Stotz - J. Am. Chem. Soc. 1953 (75) 310
- Schjeide - J. Biol. Chem. 1954 (211) 355

- Schmidt, Hershman et Thannhauser - J. Biol. Chem. 1945 (161) 523
Schmidt, Benotti et Thannhauser - Fed. Proc. 1946 (5) 152
Schmidt, Benotti, Hershman et Thannhauser - J. Biol. Chem. 1946
(166) 505
Scholfield, Dutton, Tanner et Cowan - J. Am. Oil Chem. Soc. 1948
(25) 368
Scholfield, McGuire et Dutton - J. Am. Oil Chem. Soc. 1950 (27) 352
Selbach et Trappe - Arch. Psychiat. Nervenheilk. 1944 (117) 541
Sinclair et Donan - J. Biol. Chem. 1942 (142) 659
Sinclair - J. Biol. Chem. 1948 (174) 343
R. H. Smith - Biochem. J. 1954 (57) 130
Taurog, Entenman, Fries et Chaikoff - J. Biol. Chem. 1944 (155) 19
Taurog, Entenman et Chaikoff - J. Biol. Chem. 1944 (156) 385
Tayeau - C. R. Acad. Sci. 1941 (212) 575
Tayeau - Bull. Soc. Chim. Biol. 1944 (26) 287
Tayeau et Neuzil - C. R. Soc. Biol. 1946 (140) 509
Taylor et McKibbin - J. Biol. Chem. 1951 (188) 677
Thannhauser et Setz - J. Biol. Chem. 1936 (116) 527
Thannhauser - Benotti et Reinstein - J. Biol. Chem. 1939 (129) 709
Thannhauser, Benotti et Boncoddo - J. Biol. Chem. 1946 (166) 669-677
Thannhauser et Boncoddo - J. Biol. Chem. 1948 (172) 135-141
Thannhauser, Boncoddo et Schmidt - J. Biol. Chem. 1951 (188) 417-423-237
Trappe - Biochem. Z. 1940 (305) 150-1940 (306) 316-1941 (307) 97
Trappe - Z. Krebsforschung 1942 (53) 47
Trappe - Z. Physiol. Chem. 1942 (273) 177
Trappe - Klin. Woch. 1942 (21) 651
Van Slyke et Sacks - J. Biol. Chem. 1953 (200) 525
Velluz - Substances naturelles de synthèse 1952 (4) 138
Wade et Morgan - Nature 1953 (171) 529
Williamson et Craig - J. Biol. Chem. 1947 (168) 687
Winzler et Meserve - J. Biol. Chem. 1945 (159) 395
Woolley - J. Biol. Chem. 1943 (147) 581
Wynn et Williams - Nature 1950 (165) 768
Zamecnik, Brewster et Lipman - J. Exp. Med. 1947 (85) 381

Manuscrit reçu pour impression le 2 juin 1955
