

FRACTIONNEMENT DES LIPIDES DU SÉRUM SANGUIN PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES.

par

J.-L. DELSAL. *

L'extraction des lipides totaux du sérum sanguin peut être faite par du nombreux solvants organiques, mais le mélange méthylal-méthanol (4/1), à froid, a un pouvoir extractif beaucoup plus grand; il permet une délipidation totale soit d'un sérum liquide [3, 5, 6], soit d'un sérum lyophilisé [1, 2].

Il peut être intéressant, dans certains cas, à partir de cet extrait lipidique total, d'obtenir diverses fractions lipidiques. Les glycérides, stérides et phosphoaminolipides sont les plus importants. La méthode que nous décrivons permet la séparation en deux groupes: glycérides et stérides d'une part; phosphoaminolipides d'autre part, sans avoir recours à la chromatographie sur colonne [5, 7, 8, 11] ou sur papier [4]. Cette méthode est basée sur la différence de solubilité de ces fractions dans le mélange de solvants: méthylal, méthanol, éther de pétrole, eau. Les substances minérales et organiques non-lipidiques, extraites par le méthylal-méthanol et solubles dans l'eau, restent dans la phase aqueuse: on obtient donc ainsi des fractions lipidiques purifiées.

Les expériences suivantes indiquent comment nous avons procédé pour déterminer le pourcentage de méthanol, dans le mélange de solvants, qui permet d'obtenir les glycérides et stérides dans une fraction I avec seulement des traces de phosphoaminolipides et les phosphoaminolipides dans une fraction II.

* Bull. Soc. ch. biol. 36, 1954, 1329-1334

Proportion de méthylal-méthanol-éther de pétrole permettant de séparer les glycérides et stérides des phosphoaminolipides.

A) Sans addition d'eau.

10 ml de sérum de cheval sont précipités par 30 ml du mélange méthylal-méthanol. Les protéines sont lavées d'abord avec le méthylal-méthanol, puis avec du méthanol. Tous ces extraits sont versés dans une ampoule à décanter. On ajoute ensuite de l'éther de pétrole (35-60°) et dans certains cas de l'eau pour obtenir deux phases. Les glycérides et stérides passent dans la phase méthylal éther de pétrole (fraction I) tandis que les phosphoaminolipides restent dans la phase méthanol-eau (fraction II). En faisant varier le pourcentage de méthanol dans le mélange on obtient une bonne séparation. La solution lipidique, après l'extraction des glycérides et des stérides par l'éther de pétrole, est concentrée sous vide, jusqu'à départ presque complet du méthanol. Si on extrait, de nouveau, cette solution aqueuse (1 volume), après addition de 1/2 volume d'éthanol à 95°, par 1 volume d'éther de pétrole on isole le reste des lipides contenant les phosphoaminolipides. On a donc bien séparé les lipides totaux en deux fractions: la première contenant les glycérides et 100 p. 100 des stérides et la deuxième contenant au moins 95 p. 100 des phosphoaminolipides.

Expérience I. — Pour 10 ml de sérum on a employé 50 ml du mélange méthylal-méthanol pour la précipitation et les lavages soit: 40 ml de méthylal et 10 ml de méthanol. Les lavages avec le méthanol ont été faits avec 10 ml du solvant. La solution lipidique contient donc: l'eau provenant des 10 ml de sérum, 40 ml de méthylal et 20 ml de méthanol. Si on néglige l'eau apportée par le sérum (qui est constante dans toutes ces expériences) et si l'on ne tient pas compte de l'éther de pétrole ajouté (qui est extrait par la suite) ce mélange de solvants contient 33 p. 100 de méthanol. Cette notation est évidemment arbitraire, mais elle permet de fixer les idées. Les lipides sont extraits par 40 ml d'éther de pétrole et la phase méthanol-eau restante est lavée deux fois avec 20 ml d'éther de pétrole. Les lipides contenus dans l'éther de pétrole constituent la fraction I. La solution méthanol eau est évaporée sous vide et extraite, comme il a déjà été indiqué précédemment, avec de l'éther de pétrole. Les lipides de cette deuxième extraction constituent la fraction II. Les fractions I et II sont analysées au point de vue cholestérol [9] et phosphore lipidique [10]. Les résultats sont exprimés en gramme par

litre pour le cholestérol et en milligrammes par litre pour le phosphore lipidique.

Expérience II. — Méthylal : 40 ml ; méthanol : 40 ml (50 p. 100 méthanol).

Expérience III — Méthylal : 40 ml ; méthanol : 80 ml (66 p. 100 méthanol).

Expérience IV. — Méthylal : 40 ml ; méthanol : 120 ml (75 p. 100 méthanol).

TABLEAU I.

Méthanol p. 100	33		50		66		75	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Cholestérol.	0,80	—	0,90	—	1,02	—	0,83	—
P lipidique.	39,3	2,4	10,1	36	4	42,5	2,7	38,4

Le tableau I des résultats obtenus permet de se rendre compte qu'en augmentant la proportion de méthanol dans le mélange il est possible de séparer les stérides des phosphoaminolipides. Cependant la fraction I contient encore trop de phosphore lipidique.

Cette première série d'expériences a été faite avec seulement l'eau correspondant aux 10 ml de sérum. La série suivante d'expériences, avec addition d'eau, montre que l'on obtient une bien meilleure séparation des lipides.

A) Avec addition d'eau.

Les expériences précédentes ont été recommencées en ajoutant, après l'éther de pétrole, 40 ml d'eau distillée. Il est nécessaire d'ajouter l'eau après l'éther de pétrole pour obtenir une meilleure séparation des stérides et des phosphoaminolipides. Dans ces conditions les résultats du tableau II montrent clairement l'amélioration obtenue.

TABLEAU II.

Méthanol p. 100	33		50		60		63	
Fractions	I	II	I	II	I	II	I	II
Cholestérol	0,95	—	1,11	—	1,08	—	1,12	—
P lipidique.	41,8	4,4	35	13,2	3,8	46,2	2,5	45,8
Méthanol p. 100	66		70		75			
Fractions	I	II	I	II	I	II		
Cholestérol.	1,11	—	0,97	0,015	1,03	0,025		
P lipidique.	1,8	50	1,7	50	0,8	51		

Le cholestérol se retrouve quantitativement dans la fraction I pour des proportions de méthanol comprises entre 50 et 66 p. 100; le phosphore lipidique diminuant progressivement lorsque la concentration en méthanol augmente. Pour 66 p. 100 de méthanol le cholestérol est quantitativement retrouvé dans la fraction I avec seulement environ 3,5 p. 100 de phosphore lipidique. La fraction II ne contient pas de cholestérol, mais 96,5 p. 100 des phosphoaminolipides. Avec 70 p. 100 et 75 p. 100 de méthanol le cholestérol de la fraction I contient un peu moins de phosphore lipidique, mais la fraction II contient un peu de cholestérol. Nous pouvons donc conclure qu'en effectuant une séparation avec 66 p. 100 de méthanol dans le mélange, les résultats obtenus sont satisfaisants.

Voici donc la technique que nous proposons pour la séparation des lipides du sérum en deux groupes : stérides + glycérides et phosphoaminolipides.

*Technique de séparation des glycérides et stérides
des phosphoaminolipides.*

10 ml de sérum sont précipités, dans un tube à centrifuger conique de 50 ml, par 30 ml du mélange méthylal-méthanol (4/1). Le méthylal-méthanol est versé goutte à goutte dans le sérum en agitant

énergiquement au moyen d'un petit agitateur effilé. Après une centrifugation de quelques minutes, à la vitesse maximum permise pour les tubes à centrifuger, ceux-ci étant capsulés avec une feuille d'aluminium pour diminuer l'évaporation au cours de la centrifugation, le solvant est versé dans une ampoule à décanter de 500 ml. Les protéines sont lavées deux fois avec 10 ml du mélange méthylal-méthanol. Le solvant est versé chaque fois dans l'ampoule à décanter. On effectue deux autres lavages des protéines avec chaque fois 40 ml de méthanol et verse celui-ci dans l'ampoule à décanter. On ajoute dans l'ampoule à décanter 65 ml de méthanol pour obtenir le pourcentage optimum de 66 p. 100 de méthanol, permettant la meilleure séparation des lipides. Après agitation on ajoute 40 ml d'éther de pétrole (35-60°). Après plusieurs retournements de l'ampoule à décanter pour avoir un mélange homogène, on ajoute 4 ml d'eau distillée. Après une nouvelle agitation, et repos de quelques minutes, on obtient deux phases : la phase éther de pétrole supérieure, avec un peu de méthylal, contenant les glycérides et les stérides et la phase méthylal-méthanol-eau inférieure contenant les phosphoaminolipides. On décante l'éther de pétrole dans un ballon I et lave la phase méthylal-méthanol-eau deux fois avec 20 ml d'éther de pétrole que l'on verse dans le ballon I. Après distillation de l'éther de pétrole, à basse température, on a la fraction I contenant les glycérides et les stérides.

Le mélange méthylal-méthanol-eau est versé quantitativement dans un ballon et les solvants sont distillés à la plus basse température possible, de préférence sous vide, en faisant attention aux projections et au moussage. Il reste finalement dans le ballon l'eau avec seulement des traces de méthanol qui ne gênent pas. On transvase quantitativement dans une ampoule à décanter le 100-150 ml et rince le ballon avec 1/2 volume d'éthanol à 95°. On extrait le mélange éthanol-eau par 1 volume d'éther de pétrole et on effectue deux lavages de la phase éthanol-eau avec 1/2 volume d'éther de pétrole. Celui-ci est versé dans un ballon II et il est distillé à basse température. La fraction II ainsi obtenue contient les phosphoaminolipides.

La fraction I (glycérides et stérides) et la fraction II (phosphoaminolipides) sont dissoutes dans le chloroforme. Ils peuvent être pesés; le dosage du cholestérol et du phosphore lipidique sont effectués sur des parties aliquotes (le cholestérol sur les lipides de 0,5 ml pour le sérum de cheval ou 0,1-0,2 ml pour le sérum humain; le phosphore lipidique sur 1 ml de sérum de cheval ou humain).

Remarques :

a) Le liquide restant, après la séparation de la fraction II a

été évaporé à sec, sous vide, et repris par le chloroforme. Il ne contient plus de lipides. Nous avons donc dans les fractions I et II la totalité des lipides du sérum.

b) Nous avons essayé de remplacer le méthanol par l'éthanol. Pour précipiter les protéines du sérum nous avons employé un mélange de méthylal-éthanol (4/1) et l'éthanol a remplacé le méthanol dans les opérations ultérieures. Avec 66 p. 100 d'éthanol la fraction I contient 1,08 g de cholestérol par litre de sérum et 1,2 mg de phosphore lipidique; la fraction II 46 mg de phosphore lipidique par litre. En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec 66 p. 100 de méthanol, nous pouvons conclure que l'on peut remplacer le méthanol par l'éthanol avec cependant une moins bonne récupération des phosphoaminolipides dans la fraction II. Le méthanol, de point d'ébullition plus faible, nous semble donc préférable.

c) En respectant les proportions des solvants cette méthode peut être appliquée aussi bien sur 1 ml que sur 100 ml de sérum.

Proportion de solvants à employer pour 1 ml de sérum :

Extraction des lipides avec 5 ml de méthylal-méthanol (4 ml méthylal, 1 ml méthanol); méthanol: 15 ml; éther de pétrole: 10 ml; eau: 4 ml. Nous avons vérifié que la fraction I contient bien tout le cholestérol, par contre la fraction II ne contenait que 90 p. 100 du phosphore lipidique.

Proportion de solvants à employer pour 100 ml de sérum :

Dans quatre tubes à centrifuger coniques de 50 ml on verse 25 ml de sérum dans chaque tube. On précipite les protéines par 20 ml du mélange méthylal-méthanol. Les protéines de chaque tube sont lavées deux fois avec 20 ml du mélange et trois fois avec 25 ml de méthanol. Dans l'ampoule à décanter de 1,5-2 litres on ajoute 400 ml de méthanol, 200 ml d'éther de pétrole et 200 ml d'eau. Comme dans les calculs précédents on ne tient pas compte de l'eau apportée par le sérum, ni du volume de l'éther de pétrole. On a ainsi réalisé une concentration en méthanol de 66 p. 100.

L'expérience faite sur le même sérum de cheval nous a donné : 172,8 mg pour la fraction I et 151,1 mg pour la fraction II.

Une chromatographie de la fraction I sur alumine activée selon la méthode de Trappe [10] permet de récupérer les esters de cholestéryle, élués par le tétrachlorure de carbone et le cholestérol libre + glycérides élués par le chloroforme. L'éluion par l'éthanol à 8° ne donne que des traces de phosphoaminolipides. La somme des fractions éluées

کتابخانه انستیتو رازی

constitue 95 p. 100 des lipides de la fraction I. La saponification des esters de cholestéryle par l'éthylate de sodium, à froid, une nuit, permet de séparer l'insaponifiable total et les acides gras. La somme de ces deux fractions constitue bien le poids des esters de cholestéryle. Si l'on précipite le cholestérol libre de la fraction éluee par le chloroforme, par le digitonoside, le reste des lipides est constitué par les glycérides.

La séparation des lipides sur 100 ml de sérum nous a permis de montrer que la fraction I contient non seulement les stérides mais les glycérides du sérum.

d) Cette méthode d'extraction et de séparation des lipides utilise seulement un volume restreint de solvants par rapport aux autres méthodes utilisées et de plus ces solvants sont facilement récupérés. De plus les sels minéraux et organiques non-lipidiques solubles dans l'eau restent, à la fin de la séparation, dans la phase aqueuse. Les lipides obtenus dans les fractions I et II sont ainsi purifiés.

CONCLUSION

Les lipides du sérum ont été séparés en deux groupes : stérides + glycérides d'une part, phosphoaminolipides d'autre part, en utilisant la différence de solubilité de ces fractions dans un mélange convenable : méthylal-méthanol-éther de pétrole-eau.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Ardry (R.) et Fontaine (Mlle). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951 **33**, 1497, 1503.
2. Ardry (R.) et Risbec (Mme). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1504, 1507
3. Delsal (J.-L.) — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26**, 99, 105.
4. Douste-Blazy (L.), Polonovski (J.) et Valdiguie (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1952, **235**, 1643, 5.
5. Fillerup (D. L.) et Mead (J. F.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, **83**, 574, 577.

6. Fleury (P.) — Fiches techniques de Chimie biologique, 1949. Sang, n° 4 bis.
 7. Hess (W. C.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, 32, 1163, 8.
 8. Kerr (L. M. H.) et Bauld (W. S.). — *Biochem. J.*, 1953, 55, 872, 875.
 9. Macheboeuf (M.) et Delsal (J.-L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, 24, 296, 308.
 10. Macheboeuf (M.) et Delsal (J.-L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, 25, 116, 120.
 11. Trappe (W.) — *Biochem. Z.*, 1940, 305, 150; 1940, 306, 316; 1941, 307, 97; *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 273, 177, 190; *Klin. Woch.*, 1942, 21, 651, 652.
-