

N° d'ordre : 545

50376
1982
225-2

50376
1982
225-2

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

Bern BRIS

**EVOLUTION DES PROTEINES ET DES LIPIDES
AU COURS DE LA REACTION D'INCOMPATIBILITE
GAMETOPHYTIQUE CHEZ *OENOTHERA MISSOURIENSIS* SIMS,
ESPECE AUTOINCOMPATIBLE.**



Soutenue en juin 1982 devant la Commission d'Examen :

Mlle et MM.	D. COUSTAUT	Professeur à l'Université de Lille II
	G. BISERTE	Professeur à l'Université de Lille II
	R. BOURIQUET	Professeur à l'Université de Lille I
	H.F. LINSKENS	Professeur à l'Université de Nimègue (Pays-Bas)
	Ph. VERNET	Professeur à l'Université de Lille I

PARTIE TECHNIQUE

T A B L E D E S M A T I E R E S

Fiches	page
1	Mesure de l'intensité respiratoire..... T1
2	Dosage des acides aminés par une méthode automatique..... T3
3	Techniques d'électrophorèse des protéines..... T7
4	Electrophorèse préparative en film liquide à haut voltage..... T13
5	Dosage automatique des oses combinés par la méthode à l'orcinol..... T16
6	Méthodes de chromatographie des protéines..... T19
7	Dosages enzymatiques des activités glycanne-hydrolases..... T22
8	Dosage automatique des protéines par la technique de LOWRY..... T26
9	Extraction des lipides totaux pour l'étude des phospholipides..... T29
10	Extraction des lipides totaux pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras naturels..... T32
11	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique : pré- paration des colonnes..... T33
12	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique ; frac- tionnement des esters méthyliques d'acides gras naturels..... T35
13	Etude de la composition en acides gras par chromatographie gaz liquide..... T38
14	Dosage colorimétrique du phosphore..... T44
15	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique : frac- tionnement des lipides totaux..... T48
16	Chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose. Fractionnement des lipides totaux..... T50
17	Chromatographie sur couche mince des lipides..... T52
18	Préparation des esters méthyliques d'acides gras..... T58
19	Couplage des diverses techniques et protocole de purification des glycosphingolipides..... T61

20	Extraction des lipides totaux pour l'étude des glycosphingolipides.....	T62
21	Hydrolyse alcaline douce. Obtention des glycosphingolipides.....	T65
22	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique : purification des glycosphingolipides.....	T68
23	Chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose. Fractionnement des GSL neutres et acides.....	T71
24	Chromatographie d'absorption sur colonne d'acide silicique : séparation des GSL neutres.....	T74
25	Purification des GSL par chromatographie sur couche mince.....	T76
26	Dosage fluorimétrique des GSL.....	T78
27	Hydrolyse acide des GSL.....	T82
28	Dosage colorimétrique de la sphingosine et des bases à longue chaîne.....	T83
29	Etude de la composition en bases à longue chaîne (BLC) des glycosphingolipides.....	T87
30	Etude de la composition en oses des glycolipides.....	T99
31	Dosage colorimétrique du glycérol.....	T104
32	Identification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	T107
	BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE.....	T114

FICHE 1 : MESURE DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

d'après UMBREIT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F. dans
"Manometric techniques", BURGESS Pub. Co., 1959, 1-17 (T1)

L'intensité respiratoire est mesurée à l'aide du respiromètre de WARBURG à volume constant ; la mesure consiste à enregistrer la baisse de pression partielle d'oxygène consécutive à sa consommation par les tissus des styles ; la variation de pression est évaluée à température et volume constants.

APPAREILLAGE

Il consiste en une fiole présentant une tubulure latérale reliée à un manomètre rempli d'un liquide de densité connue ; la fiole est immergée dans un bain thermostaté et entre les lectures les fioles sont agitées pour assurer un échange rapide des gaz entre les phases

PRINCIPES GENERAUX

La mesure d'une consommation d'oxygène s'effectue de la façon suivante : le manomètre est ajusté à la division 250 mm du côté fermé, l'autre branche restant à la pression atmosphérique (on note la graduation). Après 30 minutes de respiration, le niveau du liquide s'est élevé du côté fermé et a donc baissé dans la branche ouverte ; pour rester à volume constant, on ramène le niveau du liquide à 250 mm côté fermé et on lit la variation de pression du côté ouvert.

Si l'on connaît le volume de la fiole, le volume de l'échantillon, la température, la densité du liquide dans le manomètre et si le seul échange gazeux qui intervient est l'oxygène, la quantité d'oxygène utilisée s'exprime par la formule : $x = h \times k$

h : hauteur de la dénivellation (du côté ouvert) lue en mm

k : constante de fiole =
$$\frac{V_g \times \frac{273}{T} + V_f \times \alpha}{P_o}$$

x est exprimé en microlitres d'oxygène (à 0°C. et 760 mm de Hg)

V_g : volume de la phase gazeuse

V_f : volume de l'échantillon

P_o : pression standard (= 10 000 pour le liquide de BRODIE du manomètre)

T : température du bain exprimée en degrés KELVIN

α : solubilité de l'oxygène (0,027).

Pour corriger les variations éventuelles de pression et de température en cours d'expérience, on ajoute à l'appareillage une fiole de WARBURG contenant de l'eau ; les variations de pression vont se lire sur le manomètre de ce thermobaromètre.

Les résultats s'expriment en Q O₂ : microlitres d'oxygène absorbés par milligramme de poids sec de tissu et par heure.

FICHE 2 : DOSAGE DES ACIDES AMINES PAR UNE METHODE AUTOMATIQUE

d'après SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S.

Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (T2)

modifiée par PIEZ K.A. et MORRIS L.

Anal. Biochem., 1960, 1, 187 (T3).

PRINCIPE

Il repose sur le fractionnement des acides aminés au moyen d'une chromatographie sur une colonne de résine échangeuse de cations fortement acide, suivi d'un dosage des acides aminés élués par une réaction à la ninhydrine. Ce dosage est effectué automatiquement au fur et à mesure de l'élution grâce à un auto-analyseur adapté à cet usage.

MATERIEL ET REACTIFS

- auto-analyseur "Technicon" ;
- résine sulfonée Dowex 50 x 8 type "Chromobeads A". Ce type de résine, soigneusement calibrée, présente une granulométrie moyenne de 24 microns ;
- colonne de 140 cm de haut et de 0,635 cm de diamètre munie d'une circulation d'eau à 60°C ;
- Varigrad composé de neuf chambres de 75 ml ;

Le "Varigrad" permet d'obtenir un gradient d'élution approprié. Ce dernier est constitué par neuf cellules qui communiquent entre elles et qui sont soumises à une agitation continue.

TABLEAU 1 : COMPOSITION DU TAMPON DU "VARIGRAD", D'APRÈS MOSCHETTO (T4).

Cellule n°	Tampon pH 3,135	Tampon pH 3,8	Tampon pH 5,0
1	70 ml + 5 ml mélange butanol 75 ml méthanol 25 ml	-	-
2	75 ml	-	-
3	75 ml	-	-
4	75 ml	-	-
5		70 ml**	5 ml**
6	6 ml	9 ml	60 ml
7	-	-	75 ml
8	-	-	75 ml
9	-	-	75 ml

On ajoute à chaque cellule 0,8 ml de Brij 35.

.Tampon pH 2,875***, pH 3,135 et pH 3,8
Citrate trisodique 5,5 H₂O..... 89,3 g
NaOH N.....300 ml

amener à ébullition

Après refroidissement, ajouter :

Thiodiglycol..... 25 ml
eau distillée bouillie qsp..... 5 litres

Ajuster au pH voulu avec HCl 6 N

.Tampon pH 5,0
Citrate trisodique 5,5 H₂O..... 89,3 g
NaOH N..... 300 ml
NaCl..... 185,35 g

Amener à ébullition

Après refroidissement, compléter avec de l'eau distillée qsp 5 litres

Ajuster à pH 5,0 avec HCl 6 N

** On prélève 20 ml du mélange que l'on remplace par 20 ml de ce même tampon, mais contenant du chlorure de sodium 2,5 M, ce qui donne une concentration finale de 0,66 M.

*** Le tampon pH 2,875 sert à équilibrer la colonne avant son emploi.

.Réactif à la ninhydrine

-solution de méthyl cellosolve diluée et "vieillie"

Préparer 24 heures avant les autres réactifs un mélange à parties égales de :

méthyl cellosolve.....	1 500 ml
eau distillée.....	1 500 ml

Cette solution est dégazée et maintenue sous atmosphère d'azote.

-solution de ninhydrine "stock"

méthyl cellosolve pur.....	500 ml
ninhydrine.....	15 g
hydrindantine.....	1,125 g
tampon acétate de Na	
pH 5,5.....	262,5 ml

Cette solution est préparée et stockée sous atmosphère d'azote.

On l'utilise en la mélangeant aux trois litres de solution de méthyl cellosolve diluée et "vieillie" ; l'ensemble est toujours maintenu sous atmosphère d'azote.

Ce réactif est étalonné avant chaque dosage par rapport à une gamme de norleucine et de proline. Les densités optiques lues pour cette gamme sont ramenées à des valeurs fixées arbitrairement et communes à tous les dosages.

Les densités optiques sont lues à l'aide de trois colorimètres : deux d'entre eux sont équipés d'un filtre à 578 m μ et l'un a une sensibilité double de l'autre. Ces deux sensibilités sont obtenues en utilisant des cuves de trajet optique différent. Celui-ci est double pour la seconde voie. Le troisième colorimètre est équipé d'un filtre à 440 m μ et est plus spécialement réservé à la lecture des colorations développées pour la proline et l'hydroxyproline.

MODE OPERATOIRE

a) La séparation chromatographique est réalisée sur la colonne remplie de la résine sulfonée Dowex 50 x 8. Cette résine permet la séparation de tous les acides aminés en une seule opération, mais nécessite une température d'élution de 60°C, et l'utilisation d'une résine parfaitement calibrée (soit 24 microns). Les amino-acides sont fixés au sommet de la colonne soit à l'aide d'une pipette ou d'une microseringue. Leur élution est réalisée par le tampon citrate de sodium, de pH et de molarité croissants et le gradient

continu est obtenu au moyen du "Varigrad" permettant le mélange progressif au cours de la chromatographie du contenu de chaque cellule de l'appareil. L'injection du tampon au sommet de la colonne est réalisée au moyen d'une pompe permettant un débit constant. Une adaptation a été apportée à ce dosage par MOSCHETTO pour séparer dans un même temps les osamines (glucosamine, galactosamine).

La chromatographie dure 19h30.

La colonne est régénérée par passage de soude 0,2 N (3/4 h), puis tampon citrate de pH 2,875 jusqu'à ce que le pH de l'éluant soit identique à celui du tampon de départ.

b) Dosage : Il est réalisé simultanément : une partie aliquote de l'éluat est prélevée et mélangée au réactif à la ninhydrine. La colonne du liquide ainsi formée est d'autre part fragmentée par injection de bulles d'azote et le tout est amené dans un bain-marie à 95°C où le mélange circule pendant un certain temps (15 minutes).

Le mélange passe ensuite dans les cuves des trois colorimètres dont un enregistreur multiple inscrit les densités optiques.

Le calcul des quantités d'acides aminés mises en jeu dans le dosage est réalisé à partir des courbes d'élution. Il consiste à mesurer la surface de chaque pic de la courbe en l'assimilant à un triangle

$$(S = H \times \frac{B}{2}).$$

Des essais préliminaires avec des mélanges témoins d'acides aminés ont permis de calculer les coefficients de réaction, c'est à dire les surfaces données par 1 μ mole de chaque acide aminé. Ces coefficients varient en fonction des caractéristiques de l'appareil et des conditions d'utilisation : vitesse d'élution, proportion de réactif à la ninhydrine par rapport à l'éluat, durée du chauffage, mais sont reproductibles dans des conditions bien déterminées d'expérience.

FICHE 3 : TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

A) ELECTROPHORESE EN AGAROSE

d'après SCHEIDEGGER J.J.

Int. Arch. Allergy Basel 1955, 7, 103 (T5).

REACTIFS

- tampon véronal sodé pH 8,2 (force ionique 0,05)
 - . véronal sodé..... 79,3 g
 - . HCl N.....115 ml
 - . eau distillée qsp.....5000 ml
- agarose à 0,9 % dans du tampon
- fixateur :
 - . méthanol..... 600 ml
 - . acide acétique..... 20 ml
 - . eau distillée qsp.....1000 ml
- colorant protéique :
 - . amidoschwarz..... 1 g
 - . méthanol..... 60 ml
 - . acide acétique..... 10 ml
 - . eau distillée qsp..... 100 ml
- décolorant :
 - . méthanol..... 600 ml
 - . acide acétique..... 200 ml
 - . eau distillée qsp.....1000 ml

MODE OPERATOIRE

Sur chaque lame de verre dégraissée à l'alcool (75x25 mm), 3 ml d'agarose sont coulés, à chaud, à l'aide d'une pipette. Après solidification de l'agarose, une fente est pratiquée à l'aide d'un embout de seringue relié à une trompe à vide, à 33 mm de l'extrémité cathodique. Les lames sont alors disposées dans une cuve à électrophorèse et leurs extrémités reliées, par des ponts de papier filtre, à la solution tampon contenue dans le bac à électrodes ; la tension est de 20 volts aux extrémités de la lame. On effectue le dépôt de la solution à étudier (10 mg/ml) sous tension pour éviter la diffusion (quelques microlitres sont déposés à l'aide d'une micropipette) La migration dure deux heures ; les lames sont alors retirées, les protéines fixées dans le fixateur pendant 3 heures ; les lames sont ensuite séchées au papier filtre et colorées (10 minutes dans la solution d'amidoschwarz). Elles sont ensuite passées dans le bain décolorant qui est renouvelé plusieurs fois.

B) *ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE*
d'après KOHN J.
Clin. Chim. Acta, 1957, 2, 297 (T6)

Nous utilisons les bandes sèches de Sepraphore III de 18x2,5 cm

REACTIFS

- tampon véronal sodé pH 8,6
 - . véronal acide..... 4,236 g
 - . véronal sodé.....27 g
 - . eau distillée qsp..... 3 litres.

- coloration des protéines à l'amidoschwarz
 - colorant :
 - . amidoschwarz..... 2 g
 - . méthanol..... 160 ml
 - . eau distillée..... 200 ml
 - . acide acétique..... 40 ml
 - décolorant :
 - . méthanol..... 500 ml
 - . eau distillée..... 450 ml
 - . acide acétique..... 50 ml

- coloration des glycoprotéines

Nous utilisons le réactif de Schiff après oxydation périodique.

- a) acide periodique :
 - . para-periodate de sodium..... 1,84 g
 - . H₂SO₄ N..... 18,8 ml
 - . eau distillée..... 11,2 ml
 - . acétate de sodium 0,5 M..... 15 ml
 - . éthanol absolu..... 100 ml

Filtrer la solution avant usage

- b) solution réductrice :
 - . iodure de potassium..... 5 g
 - . hyposulfite de soude..... 5 g
 - . eau distillée..... 100 ml
 - . HCl concentré pur..... 2,5 ml
 - . éthanol absolu..... 150 ml

Cette solution doit être préparée extemporanément

c) réactif de Schiff :

Selon la méthode de KRAMM et KOLB (T7), mettre 1 500 ml d'eau distillée dans une fiole de trois litres ; ajouter 4,5 g de fuschine basique et agiter pour dissoudre. Ajouter 9,6 g de métabisulfite de potassium. Mélanger et laisser reposer 5 à 10 minutes. Ajouter alors 40 ml d'acide sulfurique 6 N ;

bien mélanger et boucher. Laisser reposer une nuit. Essorer à la trompe à eau sur deux feuilles de papier Whatman n° 1 après avoir ajouté 3 g de charbon activé et laisser reposer 45 secondes. Le temps total de filtration ne doit pas excéder 3 minutes.

Titration du réactif de Schiff :

Prélever 10 ml de réactif

Ajouter 20 ml d'eau distillée

5 ml d'empois d'amidon.

Titrer le SO_2 libre par une solution d'iode décimale ; on obtient en millimoles la quantité de SO_2 libre par la formule suivante :

$$\frac{5 \times \text{Nbre de ml de solution iodée}}{10} = X \text{ millimoles de } \text{SO}_2 \text{ libre}$$

Pour 100 ml de réactif, X doit être compris entre 2,8 et 4,8 millimoles. Si le taux de SO_2 libre n'est pas suffisant, augmenter sa valeur par une addition d'une quantité calculée de métabisulfite de potassium (1,2 g pour augmenter de 1 millimole la teneur en SO_2 libre dans un litre de réactif).

Le réactif est stable une huitaine de jours à 4°C et à l'obscurité. Il est utile de contrôler le taux de SO_2 avant chaque emploi.

Eau sulfureuse :

- . métabisulfite de potassium..... 4 g
- . HCl RP..... 10 ml
- . eau distillée qsp..... 1000 ml

- bain de transparence pour les bandes d'acétate colorées soit à l'amidoschwarz, soit au réactif de Schiff après oxydation périodique

- . méthanol..... 37 ml
- . eau distillée..... 50 ml
- . diacétone alcool..... 8 ml
- . acide acétique..... 5 ml
- . glycérol..... 1 à 2 gouttes.

MODE OPERATOIRE

Les bandes d'acétate de cellulose sont mises à tremper pendant quelques minutes dans le tampon de migration véronal sodé de pH 8,6. L'excès de tampon est éliminé par passage entre deux feuilles de papier filtre ; elles sont ensuite placées sur le portoir de la microcuve (Jouan) qui peut contenir six bandes.

Le dépôt de 15 à 20 µl d'une solution protéique est fait à 2 cm de l'extrémité cathodique de la bande, par capillarité à l'aide d'une lamelle microscopique.

La migration dure une heure quarante cinq avec une différence de potentiel de 140 volts.

Après migration, on réalise la coloration des protéines et des glycoprotéines.

Pour révéler les protéines, les bandes sont placées 5 minutes dans le colorant, 5 minutes dans un bain d'acide acétique à 5 %, puis dans trois bains successifs de décoloration.

La transparisation des bandes s'effectue de la même manière pour les deux colorations par passage dans un bain de transparence 5 minutes et séchage à l'étuve à 105°C sur une plaque de verre, jusqu'à ce que le fond soit parfaitement transparent.

La coloration des glycoprotéines s'effectue de la manière suivante :

- fixation des bandes 5 minutes dans de l'alcool absolu ;
- séchage entre deux feuilles de papier filtre ;
- passage 5 minutes dans l'acide periodique ;
- lavage trois minutes dans de l'alcool à 70 p. 100 (v/v) ;
- nouveau séchage ;
- passage 15 minutes dans la solution réductrice jusqu'à décoloration ;
- lavage à l'alcool à 70 % pendant 2 à 3 minutes ;
- séchage entre deux feuilles de papier filtre ;
- passage 15 minutes dans le réactif de Schiff ;
- rinçage dans trois bains successifs d'eau sulfureuse (5 minutes dans chaque bain) ;

C) *ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN DISQUE*
d'après ORNSTEIN L.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321 (T8)

et DAVIS B.J.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404 (T9)

Nous utiliserons la méthode simplifiée de HJERTEN S. dans *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 79, 393 (T 10) à l'aide d'un appareil Canalco.

COMPOSITION DES GELS ET DES TAMPONS UTILISES

- Solutions de réserve (se conservent à 4°C en flacons colorés pendant plusieurs mois).

a) HCl N.....	48 ml
Trishydroxyméthylaminométhane (TRIS).....	36,3 g
N,N,N',N'tetraméthyl-éthylène-diamine (TEMED)...	0,46 ml
eau distillée qsp.....	100 ml
b) monoacrylamide (gel à 7,5 p. 100).....	30 g
bisacrylamide.....	0,8 g
eau distillée qsp.....	100 ml

- Solutions de travail (à préparer extemporanément)

solution A (de pH 8,7 à 8,9)

- 1 volume de a
- 2 volumes de b
- 1 volume d'eau distillée

Solution B

- persulfate d'ammonium..... 0,14 g
- eau distillée qsp..... 100 ml

Le mélange de ces solutions A et B à l'abri de l'air permettra la formation d'un gel d'acrylamide dont le degré de polymérisation peut être ajusté selon la concentration d'acrylamide retenue pour la solution B

- Tampon d'électrophorèse (pH 8,3)

TRIS.....	6,0 g
glycocolle.....	28,8 g
eau distillée qsp.....	1000 ml

PROCESSUS OPERATOIRE

- Préparation du gel ; migration

Les solutions A et B sont mélangées en quantités égales dans une seringue de 2 ml munie d'une tubulure capillaire. On emplit les tubes (65 x 5mm) jusqu'à 3 mm de l'extrémité supérieure en introduisant la tubulure capillaire au fond du tube et en la retirant progressivement pendant le remplissage tout en maintenant son extrémité sous la surface du gel. On laisse le mélange se polymériser pendant 30 minutes après avoir ajouté une goutte d'eau pour éliminer tout contact avec l'air (température : 24°C).

On débarrasse ensuite la surface des tubes de l'eau à l'aide de papier filtre. On dépose la solution protéique à la surface du gel à l'aide d'une micropipette (20 à 40 μ l de solution contenant environ 5 mg par ml de protéines). Le dépôt est stabilisé par addition de 5 mg de Sephadex G 200.

On verse environ 500 ml de tampon dans la cuve inférieure. On ajuste les tubes d'échantillons sur les raccords de la cuve supérieure. On ajoute alors une goutte de tampon à la partie supérieure de chaque tube au-dessus du Sephadex support de l'échantillon à analyser. On installe l'ensemble dans l'appareil, puis, à l'aide d'une pipette, on verse lentement le tampon dans la cuve supérieure. On ajoute enfin une à deux gouttes de bleu de bromophénol comme témoin de migration. La cuve supérieure est reliée à la cathode, la cuve inférieure à l'anode. L'ampérage utilisé est de 4 mA par tube.

Au début de l'électrophorèse, on observe une bande bleue de colorant indicateur qui se déplace dans le gel. Lorsque celle-ci atteint le bas de la colonne du gel, l'électrophorèse est terminée.

- Coloration

Les tubes d'échantillons sont placés 30 minutes à -4°C de manière à les congeler. On introduit ensuite à l'aide d'une seringue un peu d'eau froide entre le verre et le gel de manière à enlever le gel du tube sans le briser.

Les protéines sont ensuite fixées dans une solution d'acide trichloracétique à 12,5 % pendant 30 minutes.

Elles sont alors révélées par le colorant suivant :

- Solution stock de bleu de Coomassie :
 - . bleu de Coomassie..... 1 g
 - . eau distillée qsp..... 100 ml

Cette solution est diluée à 1/20 au moment de l'emploi par de l'acide trichloracétique à 12,5 %.

Le temps de coloration est de 30 minutes.

La décoloration est obtenue par séjour prolongé (48 heures minimum) des gels dans une solution d'acide trichloracétique à 12,5 %.

FICHE 4 : ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE A HAUT VOLTAGE (HIGH VOLTAGE FREE FLOW ELECTROPHORESIS)

HANNIG K.

Z. Physiol. Chem., 1964, 338, 218 (T11)

dans les conditions décrites par MOSCHETTO Y.

Thèse Doctorat Lille, 1966 (T12)

PRINCIPE

La méthode est basée sur le fractionnement des protéines suivant leur point isoélectrique.

Entre deux plaques de verre inclinées, on réalise un flux constant de tampon du haut vers le bas. Le mélange à étudier, injecté à l'extrémité supérieure est entraîné par le déplacement du liquide, cependant qu'un champ électrique, établi perpendiculairement au sens d'écoulement, permet d'en séparer les divers constituants en fonction de leur mobilité électrophorétique. Leur séparation au temps t se fait donc sous l'influence combinée d'un champ électrique et de la migration du tampon qui lui est perpendiculaire.

La place de chaque protéine, ayant une charge électrique définie, est donc la résultante de deux forces :

- 1 - différence de potentiel entre anode et cathode ;
- 2 - vitesse de migration du tampon dans la chambre.

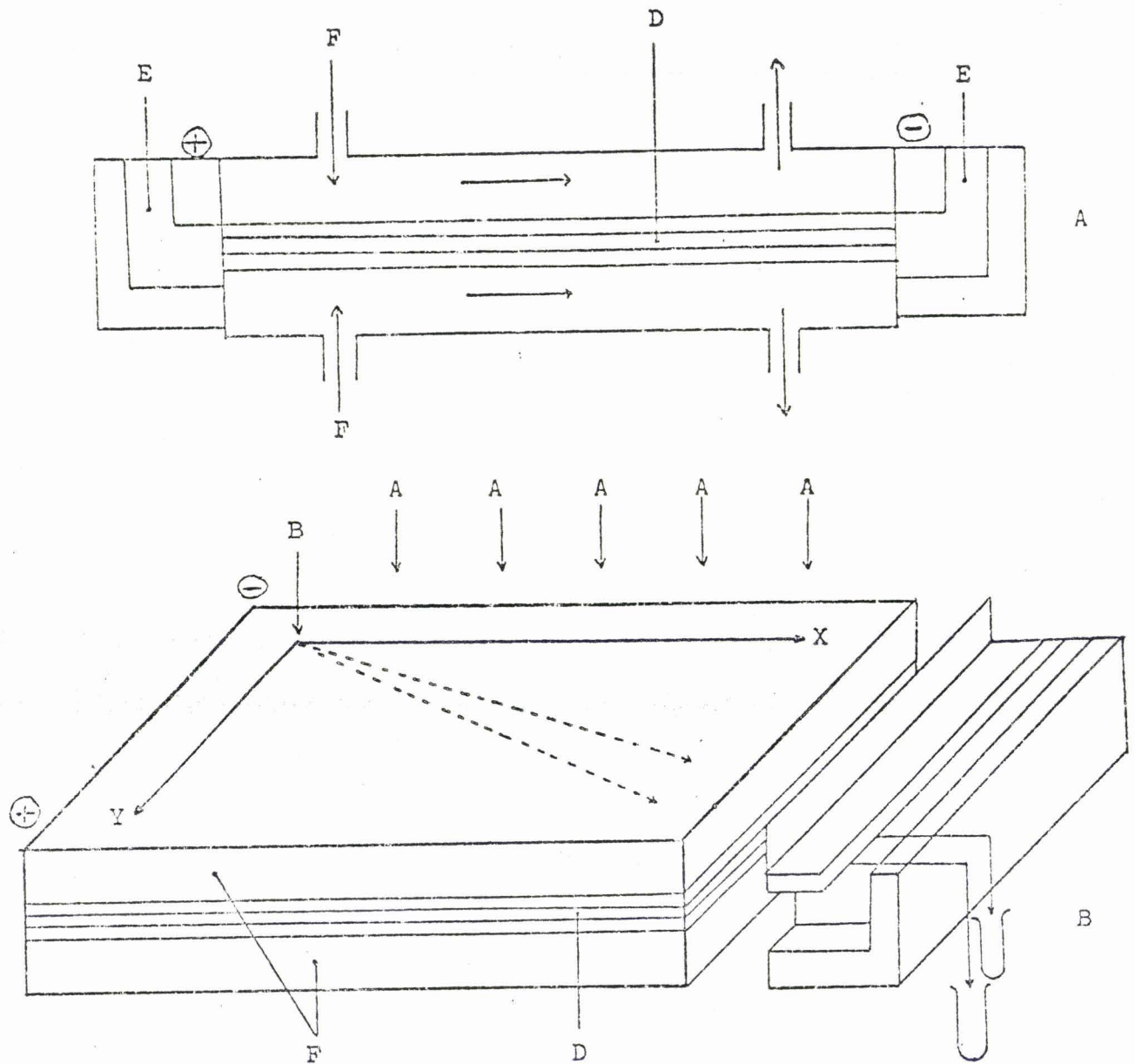
Elles se répartissent sur toute la largeur du front de déplacement et, à la sortie de la chambre, sont recueillies en 48 fractions.

TECHNIQUE

L'appareil utilisé : ELPHOR VAP est construit par la firme BENDER et HOBEIN.

Le film liquide a 0,5 mm d'épaisseur et est constitué par une solution tampon située entre deux plaques de verre de 50 x 50 cm. La plaque supérieure est percée d'un certain nombre de trous pour l'injection du tampon et de la substance. L'ensemble est situé dans une chambre où circule de l'air froid de façon à maintenir constante la température du film (5°C). A la sortie de la

FIGURE 2 :



ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE

- A = Injection du tampon dans la chambre d'électrophorèse
- B = Injection de la substance
- C = Collecteur des fractions
- D = Chambre d'électrophorèse
- E = Chambre d'électrode
- F = Refroidissement

chambre, le film est compartimenté en 48 fractions qui s'accumulent dans des godets situés en aval. A intervalles de temps réguliers, le liquide accumulé dans chaque godet est pompé et rassemblé dans 48 tubes situés dans le collecteur. La figure 2 permet de voir la manière dont sont appliquées les électrodes. Elles sont séparées de la chambre par des membranes semi-perméables. Les compartiments à électrodes sont alimentés en tampon qui est constamment renouvelé grâce à une pompe. Le tampon du film liquide dans la chambre est injecté à l'aide d'une pompe à débit constant réglable. L'intensité du courant peut être réglée de 0 à 200 mA et la tension de 0 à 2 500 volts.

Les conditions expérimentales utilisées pour le fractionnement des styles vierges, autopollinisés et xéнопollinisés sont les suivantes :

- tampon de la chambre pH 8,6
acide citrique 0,008 M
Tris hydroxyméthylaminométhane (TRIS) 0,08 M
- tampon des électrodes pH 8,6
acide citrique 0,0256 M
Tris 0,24 M
- la concentration de l'échantillon est de l'ordre de :
20 mg/ml en tampon pH 8,6 pour les styles
- vitesse d'injection de la substance : 1,7 ml par heure
la numérotation se fait à partir de l'anode
- vitesse d'injection du tampon dans la chambre : 62 ml par heure
- conditions de migration :
différence de potentiel : 2 150 volts
intensité : 160 mA.

FICHE 5 : DOSAGE AUTOMATIQUE DES OSES COMBINÉS PAR LA
TECHNIQUE A L'ORCINOL

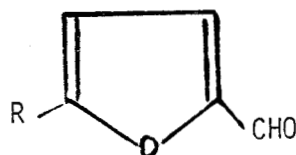
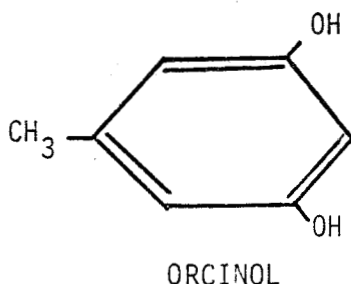
d'après TILLMANS Y. et PHILIPPI K.
Biochem. Z., 1929, 215, 36 (T13)

adaptée à l'autoanalyseur par DEMAILLE J. et coll.
Bull. Soc. Chim. France, 1965, 12, 3506 (T14)

PRINCIPE

Le principe en est simple. Les oses se dégradent en milieu sulfurique concentré à chaud en donnant un chromogène : le furfural pour les pentoses, ou ses dérivés, par exemple 5-hydroxyméthylfurfural pour les hexoses.

Les chromogènes se condensent avec des dérivés phénoliques et en particulier avec l'orcinol en donnant une coloration brun jaune.



R = H (pentose)

R = CH₂OH (hexose)

Le maximum du spectre d'absorption se situe à 420 m μ ; mais les protéines peuvent interférer à cette longueur d'onde. En effet, le tryptophane et la cystéine se condensent avec 5-hydroxy-méthyl-furfural pour donner un composé absorbant intensément à 420 m μ . Il est donc préférable pour doser les oses des glycoprotéines d'opérer les lectures à 520 m μ (2ème pic du spectre d'absorption, mais plus faible).

TECHNIQUE

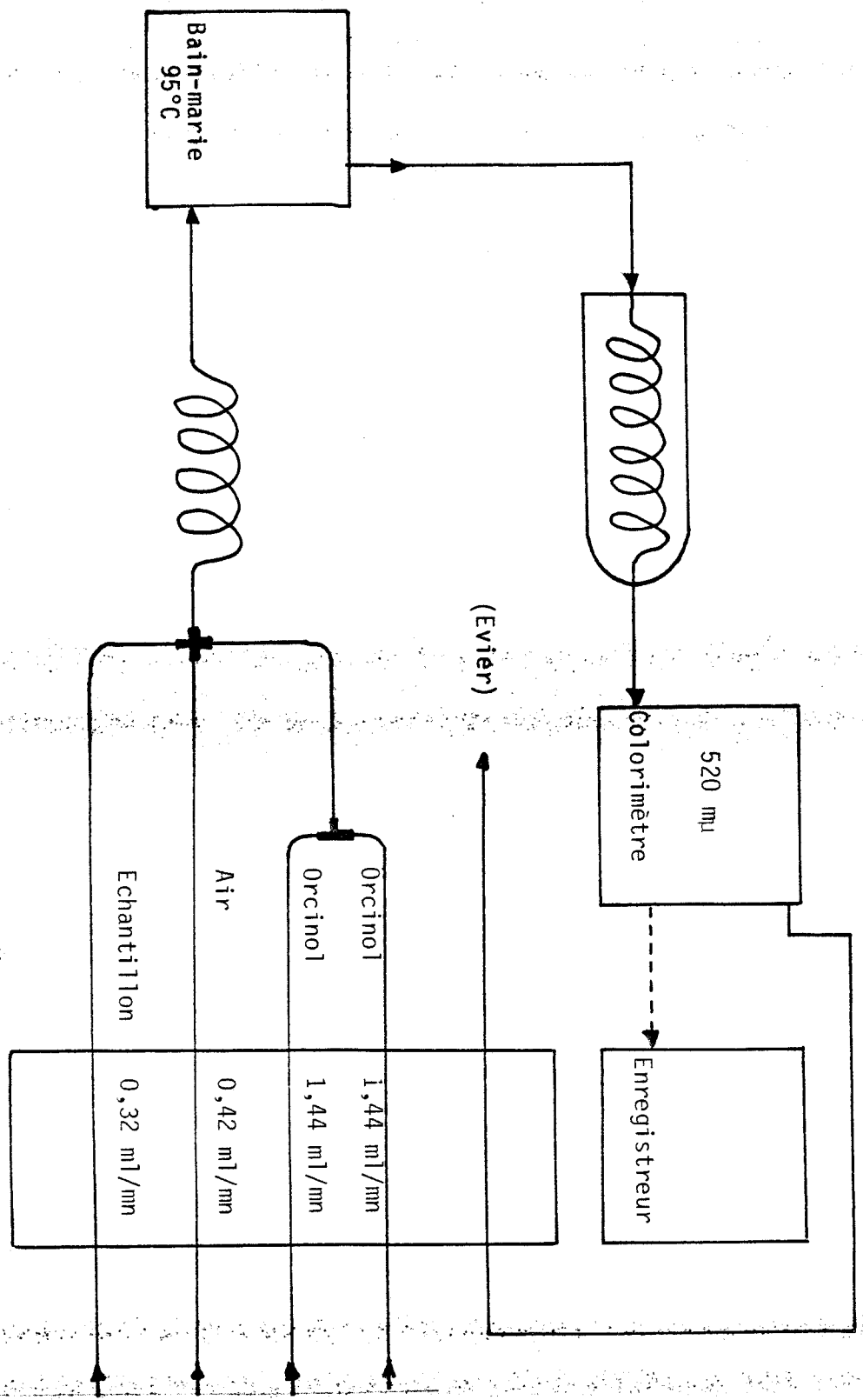
- REACTIFS

- Réactif à l'orcinol

. orcinol.....	1,6 g
. H ₂ SO ₄ 4 N.....	100 ml

DOSAGE AUTOMATIQUE DES OSES COMBINES PAR LA METHODE A L'ORCINOLO

FIGURE 3 :



Compléter à 1 000 ml avec H_2SO_4 à 66 %
Conserver à 4°C et à l'obscurité.

- Témoin interne

. glucose..... à 125 γ /ml
soit 25 mg dans 200 ml d'eau distillée.

- MODE OPERATOIRE ADAPTE AU TECHNICON

L'échantillon prélevé se trouve en contact avec le réactif à l'orcinol (amené par deux tubes de pompe différents afin d'obtenir le volume nécessaire). Le flux du liquide est segmenté à intervalles réguliers par des bulles d'air. Le tout passe ensuite dans une bobine de mélange, puis dans un bain-marie à 95°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans une bobine, les densités optiques sont lues par colorimétrie à 520 $m\mu$. Le montage permet l'analyse de 40 échantillons à l'heure sur un volume de l'ordre de 0,4 ml (figure 3).

FICHE 6 : METHODES DE CHROMATOGRAPHIE DES PROTEINES

A) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHAROSE 4B

PRINCIPE

"Séparose" est le nom déposé pour les particules sphériques de gel d'agarose. Le Séparose 4B contient environ 4 % d'agarose (HJERTEN T10) . Ces gels d'agarose en forme de perle sont utilisés pour séparer des macromolécules de poids moléculaires élevés allant jusqu'à plusieurs millions ; la limite d'exclusion du Séparose 4B est estimée à $3-4 \cdot 10^6$.

Le principe de la filtration sur gel est le suivant : les molécules de dimensions supérieures aux plus gros pores de Séparose, c'est à dire au-dessus de la limite d'exclusion, ne peuvent pénétrer dans les grains du gel ; elles traversent donc le gel dans la phase liquide entourant les grains et quittent la colonne les premières.

Par contre, les molécules les plus petites diffusent plus ou moins dans le gel, suivant leur taille et leur forme. Les molécules quittent donc le gel dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

TECHNIQUES

- REACTIF ET MATERIEL

- Séparose 4B en suspension : 250 ml
- Colonne de verre de 50 x 2,3 cm
- Tampon d'élution : Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M, pH 8,0.

- PREPARATION DU SEPHAROSE

La suspension de Séparose est versée dans un grand volume de tampon (Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M, pH 8,0) sous agitation constante à la température du laboratoire pendant 1 heure, puis le gel est laissé décanter. Le surnageant est éliminé et remplacé par du tampon ; l'opération est répétée plusieurs fois (3-4). La suspension est alors dégazée à la trompe à vide.

- PREPARATION DE LA COLONNE

Nous utilisons une colonne de verre de 50 cm de longueur et 2,3 cm de diamètre munie à son extrémité inférieure d'un opercule de verre frité n° 2 et d'un rodage à sa partie supérieure permettant d'adapter la tête d'adduction du tampon.

La colonne est remplie à moitié de tampon ; on verse alors la suspension de Sepharose dans la colonne en évitant la formation de bulles d'air (le long d'un agitateur de verre) ; on laisse le Sepharose se décanter pendant 30 minutes ; le robinet est alors ouvert de façon à laisser couler le tampon goutte à goutte (8 gouttes par minute) ce qui permet au Sepharose de se tasser de façon homogène. Lorsque le tassement est effectué (niveau de Sepharose stable), on laisse s'écouler le tampon jusqu'à ce que le liquide affleure la partie supérieure du gel. On dépose alors la solution à chromatographier (60 à 90 mg/3 à 5 ml) sur le gel à l'aide d'une seringue, le long des parois de la colonne de verre pour obtenir un dépôt régulier. Le robinet est ouvert, le débit est réglé à une goutte toutes les 2 secondes ; lorsque la solution a pénétré dans le gel, on ajoute pour rincer les parois quelques cm³ de tampon à l'aide de la seringue ; lorsque celui-ci a pénétré dans le gel, on ajoute un volume de tampon tel que, lorsque la tête d'adduction du tampon sera ajustée, ce dernier, en tombant goutte à goutte, ne perturbe pas la partie supérieure du gel.

L'éluat est recueilli par fraction de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions ; la densité optique de chaque échantillon est déterminée par spectrophotométrie à 278 m μ (protéines) et 260 m μ (acides nucléiques).

B) CHROMATOGRAPHIE SUR BIOGEL P10

PRINCIPE

Le Biogel P10 (50-100 mesh) est un copolymère d'acrylamide et de méthylène bisacrylamide qui se comporte également comme un tamis moléculaire.

Sa limite d'exclusion est faible (P.M. 10 000) ce qui permet de l'utiliser dans le dessalage de préparations (en particulier après électrophorèse en film liquide) ; lorsqu'un échantillon contient un mélange de sels

et de protéines, celles-ci, de poids moléculaires beaucoup plus élevés, sortent les premières tandis que les sels sont retenus dans les grains du gel.

TECHNIQUE

Le Biogel P10 se présente sous forme de poudre que l'on met à gonfler dans une grande quantité d'eau distillée pendant 24 heures. Le gel est ensuite lavé plusieurs fois à l'eau distillée, débullé à la trompe à vide et versé dans une colonne de verre (50 x 2 cm) selon le protocole décrit ci-dessus.

FICHE 7 : DOSAGES ENZYMATIQUES DES ACTIVITES GLYCANNE-HYDROLASES

d'après FINDLAY J., LEVY C.A. et MARSH C.A.
Biochem. J., 1958, 69, 467 (T15)

PRINCIPE

L'hydrolyse enzymatique d'un substrat synthétique : le paranitrophénylglycoside correspondant à l'activité recherchée libère du paranitrophénol ; celui-ci, en milieu alcalin, donne une coloration jaune dont le maximum d'absorption est situé à 400 m μ (figure 4). La mesure de la densité optique à cette longueur d'onde permet donc d'apprécier la quantité de paranitrophénol libéré et d'en déduire l'activité enzymatique.

Les activités suivantes ont été recherchées :

	Substrat utilisé
- α galactosidase	paranitrophényl- α -D-galactopyranoside
- β galactosidase	paranitrophényl- β -D-galactopyranoside
- α mannosidase	paranitrophényl- α -D-mannopyranoside
- N-acétyl β D glucosaminidase	paranitrophényl- β -D-N-acétyl-glucosaminide
- N-acétyl β D galactosaminidase	paranitrophényl- β -D-N-acétyl-galactosaminide

TECHNIQUE

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- solution de substrat à 3 mg/ml dans l'eau distillée..... 1,0 ml
- solution d'enzyme dans l'eau distillée..... 0,5 ml
- tampon citrate de sodium 0,2 M de pH correspondant au
 pH optimum d'activité de l'enzyme à doser..... 0,5 ml

Le temps d'incubation est de une heure à 37°C pour l'ensemble des dosages à l'exception toutefois de la détermination de l'activité N-acétyl- β -glucosaminidasique, pour laquelle le temps d'incubation n'est que de 30 minutes. Toutefois, après avoir vérifié qu'un temps d'incubation de 30 minutes pour les activités α -galactosidasique, β -galactosidasique, α -mannosidasique,

α -fucosidasique et β -fucosidasique permettait d'obtenir une libération de paranitrophénol sensiblement moitié moindre que celle obtenue en 60 minutes, nous avons standardisé un temps de 30 minutes pour certains dosages en série.

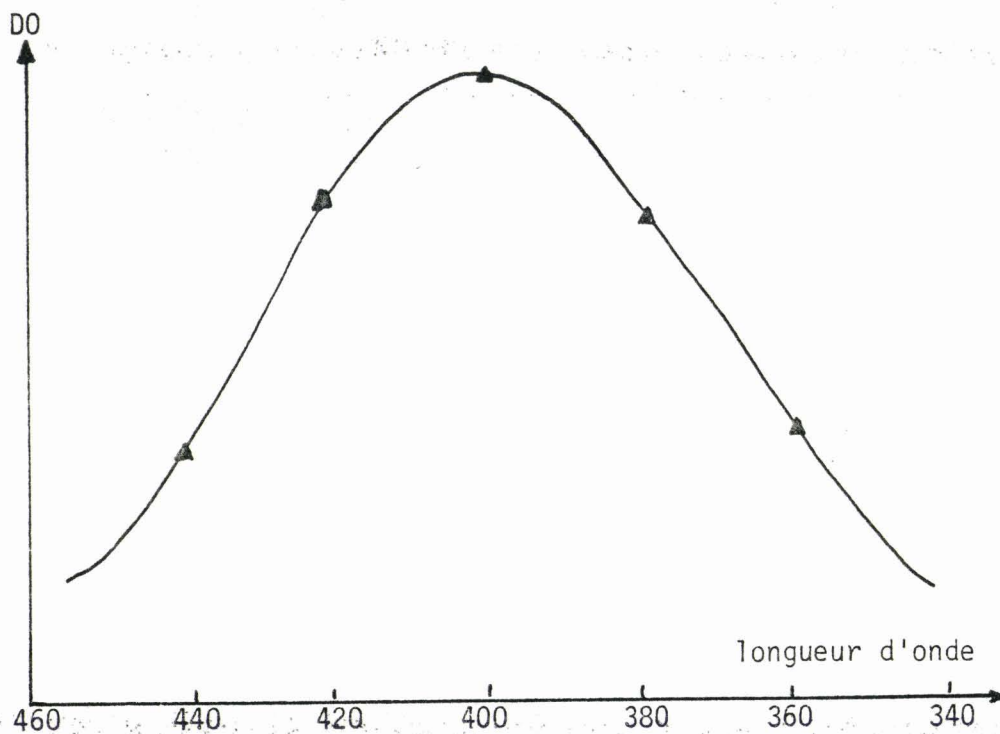
Après incubation, on ajoute 2 ml d'une solution de carbonate de sodium 0,25 M, ce qui permet d'arrêter la réaction enzymatique et de colorer en jaune le paranitrophénol libéré, en amenant le pH du milieu à 10,6. Cette libération est suivie par les variations de la densité optique à 400 m μ , longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption du paranitrophénol dans les conditions opératoires utilisées. La lecture est faite immédiatement afin d'éviter l'hydrolyse spontanée du substrat en milieu alcalin. Elle se fait contre un blanc substrat. Les valeurs obtenues sont corrigées par le blanc enzyme. Les quantités de paranitrophénol qui leur correspondent sont calculées d'après une courbe étalon (figure 4).

Celle-ci est effectuée pour des concentrations de paranitrophénol de 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, à partir d'une solution mère contenant 34,75 mg de paranitrophénol dans 500 ml d'eau distillée (soit 500 nM).

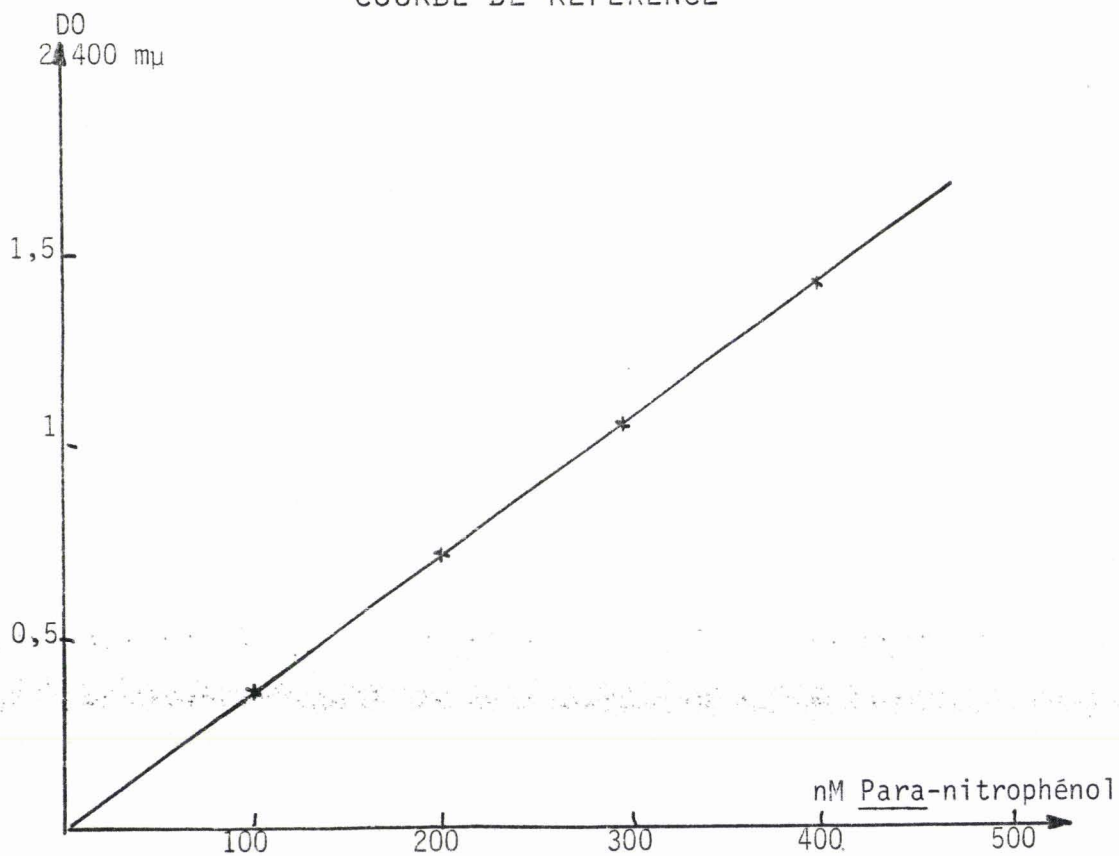
On prend : 1,0 ml de dilution de solution mère
0,5 ml d'eau distillée
0,5 ml de tampon citrate 0,2 M
2,0 ml de carbonate de sodium 0,25 M.

Plusieurs courbes étalons sont réalisées avec des tampons citrate 0,2 M de pH différents (pH 4,0 ; pH 4,5 ; pH 6,5). Les résultats sont similaires pour les trois courbes.

FIGURE 4 :
SPECTRE D'ABSORPTION DU PARA-NITROPHÉROL



COURBE DE RÉFÉRENCE



BUS
LILLE

pH	Concentration paranitrophénol (nM)	D.O. 400 nm
4,0	100	0,366
	200	0,729
	300	1,100
	400	1,450
4,5	100	0,363
	200	0,730
	300	1,100
	400	1,450
6,5	100	0,367
	200	0,735
	300	1,100
	400	1,456

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques : une unité est la quantité d'enzyme qui libère 1 nanomole de paranitrophénol par minute à 37°C.

Un dosage des protéines par la méthode de LOWRY et coll. (T16) permet d'exprimer les résultats en activité spécifique (activité par mg de protéine).



FICHE 8 : DOSAGE AUTOMATIQUE DES PROTEINES PAR LA TECHNIQUE DE LOWRY

d'après LOWRY O.H. et al.

J. Biol. Chem., 1951, 193, 265 (T 16)

adaptée à l'autoanalyseur Technicon

PRINCIPE

Le réactif de FOLIN-CIOCALTEU (réactif phosphotungstique, phosphomolybdique) est réduit par les groupements phénoliques en complexes de coloration bleue. Ce réactif dose la tyrosine, le tryptophane et la cystéine des protéines.

Les substances donnant une réaction du biuret positive en milieu alcalin réduisent le réactif de FOLIN dans le milieu réactionnel précédent. Cette addition d'ions cuivriques au milieu réactionnel permet d'augmenter la sensibilité de la réaction de 3 à 15 fois (LOWRY, T 16).

Cette technique permet un dosage des protéines avec une sensibilité 100 fois supérieure à la méthode du biuret.

TECHNIQUE

1) PREPARATION DES REACTIFS

- Préparation du réactif de FOLIN concentré :

- . tungstate de sodium..... 200 g
- . molybdate de sodium..... 50 g
- . eau distillée..... 1400 ml

Dissoudre, ajouter ensuite :

- . H₃PO₄ à 85 %..... 100 ml
- . HCl pur..... 200 ml

Ebullition à reflux : 10 heures

Ajouter en chauffant pour dissoudre :

- . sulfate de lithium..... 300 g
- . eau distillée..... 100 ml
- . brome RP en quantité suffisante pour être en excès.

Ensuite, ébullition 15 minutes pour chasser le brome en excès.

Refroidir et compléter à 2 litres.

Titrer par NaOH N en présence de phénol-phtaléine jusqu'à l'obtention d'un pH 7,8 - 7,9, ce qui donne une coloration verte. Diluer ensuite à 4 litres.

- Tampon pH 10,0

- a. carbonate acide de sodium 84 g dans 500 ml d'eau distillée
- b. soude RP 45 g dans 300 ml d'eau distillée

Mélanger les solutions a. et b. et compléter avec de l'eau distillée qsp 1 litre.

- Réactif de FOLIN dilué

- . 1 partie du réactif de FOLIN concentré..... 500 ml
- . 3 parties d'eau distillée qsp.....2000 ml

- Solution cuivrique

- a. sulfate de cuivre à 0,2 %.....1000 ml
- b. tartrate de sodium et de potassium à 0,1 %...1000 ml

Mélanger volume à volume au moment de l'emploi

- Témoin de sérualbumine

Préparer une solution mère de sérualbumine à 1 g/1 000 ml = 1 000 γ par ml.

Faire différentes dilutions :

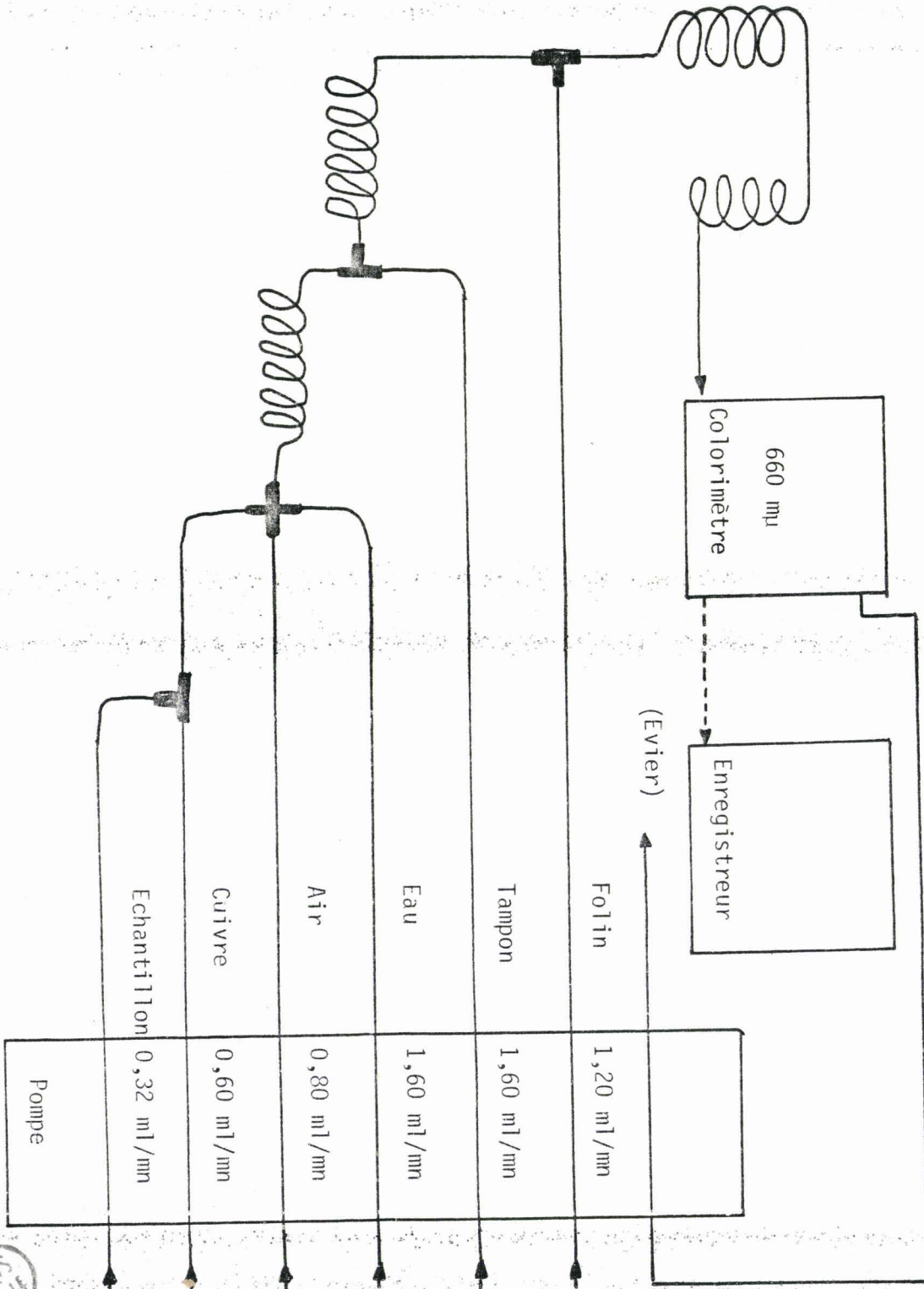
solution mère diluée au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32.

2) DOSAGE AUTOMATIQUE

Le premier échantillon est d'abord pompé, puis mélangé à la solution cuivrique. L'injection des bulles d'air va permettre ensuite de fragmenter la colonne de liquide de façon à éviter la contamination possible d'un échantillon à l'autre. Il faut noter aussi à ce niveau une dilution par injection d'eau. Après circulation dans une bobine qui permet un mélange efficace, la solution reçoit du tampon ; suit un nouveau temps de mélange (bobine), l'addition du réactif de FOLIN et un temps de circulation assez long de la colonne liquide pour permettre à la réaction qui s'effectue à ce niveau, de se développer. Chaque échantillon dosé passe dans un colorimètre muni d'un filtre à 660 m μ ; les densités optiques sont inscrites sur un enregistreur. Le montage effectué (figure 5) permet le dosage de 30 échantillons à l'heure sur un volume de l'ordre de 0,42 ml.

La teneur en protéines est calculée à partir d'une gamme étalon de sérualbumine qui est faite pour chaque série de dosages.

FIGURE 5 : DOSAGE AUTOMATIQUE DES PROTEINES PAR LA TECHNIQUE DE LOWRY



FICHE 9 : EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX POUR L'ETUDE DES PHOSPHO-LIPIDES

FOLCH J. et coll.

J. Biol. Chem., 1957, 228, 497-509 (T17)

Elle est réalisée selon la technique de FOLCH (T17) mise au point pour l'extraction des lipides du cerveau et appliquée ensuite à de nombreux tissus animaux et végétaux. Cette méthode comprend deux opérations successives :

- dans un premier temps :
une homogénéisation du tissu végétal dans le mélange chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v) ;
- dans un deuxième temps :
une purification du filtrat par lavage à l'eau saline.

Nous avons modifié cette technique (T 17) en opérant en présence d'azote liquide afin de faciliter le broyage du pollen et surtout d'éliminer toute action enzymatique.

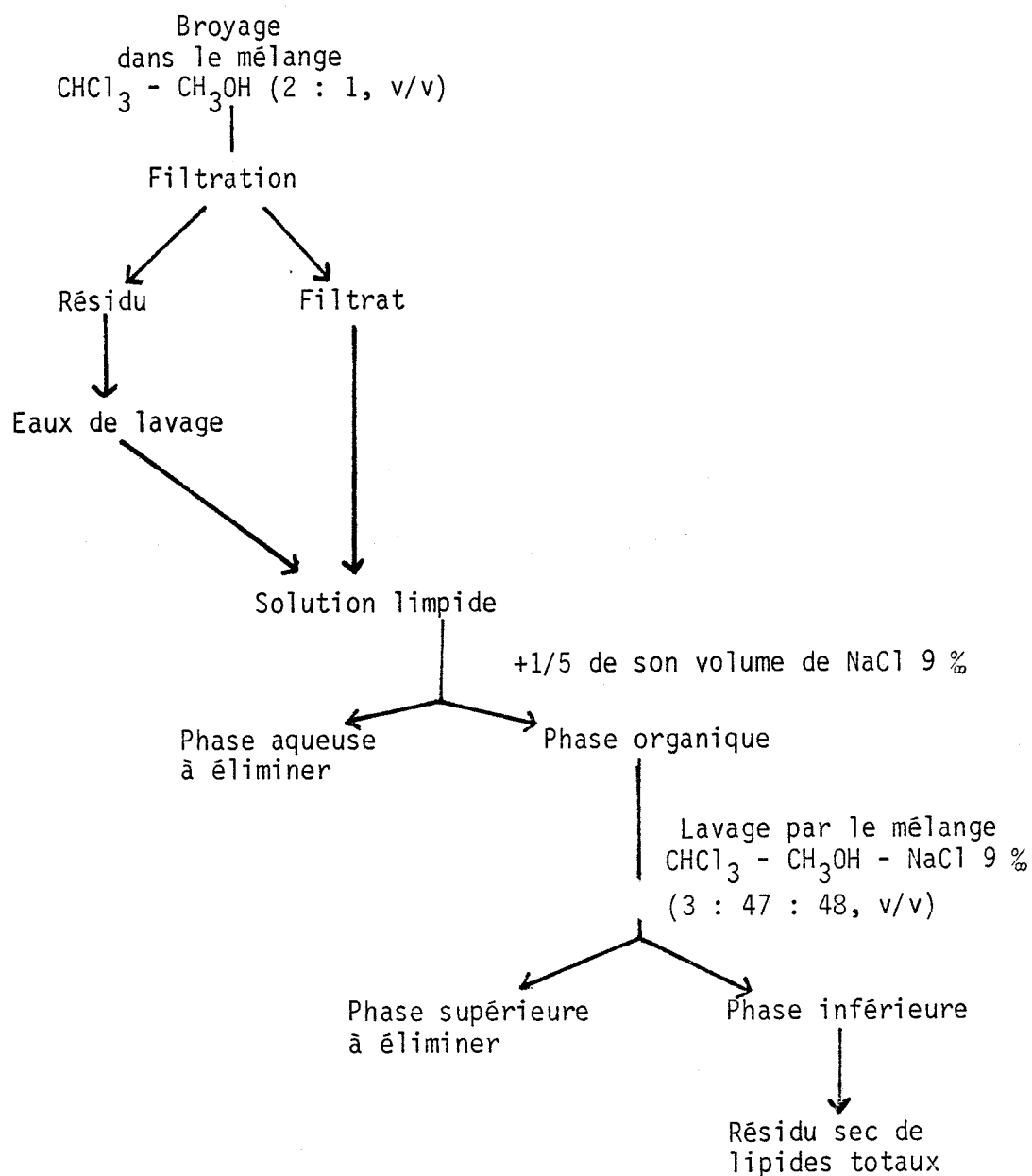
Le matériel végétal, style ou pollen, préalablement pesé, est broyé rapidement dès sa sortie du congélateur dans un mortier rempli d'azote liquide. Quand l'azote a totalement disparu les lipides sont extraits par broyage dans le mélange chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v) dans un appareil du type "Waring Blendor" puis on homogénéise dans un appareil de Potter en verre, à raison de 20 ml de solvant par g de tissus végétaux. Cette extraction est effectuée à +4°C ainsi que toutes les opérations suivantes de purification, dans des appareils préalablement refroidis et dégraissés par rinçage au mélange chloroforme-méthanol.

L'homogénéisat est filtré sur papier et le résidu lavé plusieurs fois au mélange chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v). Les solutions de lavage sont jointes au filtrat et le volume final mesuré. Le partage est obtenue par addition de 1 volume de NaCl à 9 % égale pour 5 volumes de solvant. Après agitation vigoureuse et décantation une nuit, jusqu'à ce que la couche chloroformique inférieure soit limpide et l'interphase bien nette, la phase supérieure est prélevée par siphonnage et la surface de la couche inférieure

lavée par un mélange chloroforme - méthanol - eau saline (3 : 47 : 48 v/v) afin d'éliminer toute trace de phase supérieure précédente.

La phase organique récupérée est évaporée à sec sous vide, à + 35°C. Le résidu lipidique obtenu est repris par une quantité bien déterminée de mélange chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v) et conservé à -20°C sous atmosphère d'azote dans des tubes de verre bouchés au téflon. Cette méthode est schématisée sur le tableau 6.

TABLEAU 6 : SCHÉMA D'EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX POUR L'ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES.



FICHE 10 : EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX POUR L'ANALYSE DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS NATURELS.

FATHIPOUR A. et al.

Bioch. Biophys. Acta, 1967, 144, 476 (T18).

Pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras naturels, la méthode d'extraction décrite au paragraphe précédent a dû être légèrement modifiée, (T17) afin d'éviter une éventuelle méthylation durant l'extraction. Le matériel végétal, broyé dans l'azote liquide, est homogénéisé dans du mélange chloroforme - isopropanol (2 : 1 v/v) à raison de 20 ml de mélange solvant par g de tissu.

L'extrait filtré sur papier dégraissé est évaporé à sec sous vide et le résidu lipidique, repris par quelques millilitres d'éther de pétrole 60° - 70°, est prêt pour l'analyse chromatographique sur colonne d'acide silicique.

FICHE 11 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE. PREPARATION DES COLONNES.

ROUSER G., KRITCHEVSKY G. et YAMAMOTO A.

In : "Lipid chromatographic analysis", 1967, 1, 99-162 (T25).

INTRODUCTION

Au cours de la chromatographie d'adsorption, les composés sont liés à l'adsorbant solide par des forces polaires et ioniques, et, plus faiblement par des forces non polaires ou de VAN DER WALLS. La séparation des mélanges lipidiques dépend de la polarité relative de chaque lipide : cette polarité est déterminée par le nombre et le type de groupements polaires ou hydrophobes. L'éluion de la colonne par des solvants de polarité croissante permet la séparation du mélange lipidique en classes dont la polarité augmente également (MARINETTI, 1967 (T 25)).

Il convient de noter que la séparation complète des lipides en classes n'est en général pas obtenue en une seule chromatographie en raison des chevauchements de polarité. Un fractionnement ultérieur sur couche mince ou sur un autre type de colonne est souvent nécessaire pour isoler à l'état pur, les diverses classes de lipides.

MATERIEL ET METHODES

1 - PREPARATION DU GEL DE SILICE SELON ROUSER et coll. (1967, T25)

L'acide silicique (MALLINCKRODT) 100 mesh est utilisé après lavage selon la technique de ROUSER et coll. (1967, T25).

L'acide silicique est mis en suspension dans le méthanol (1 kg/3 l de CH₃OH). Après un contact de 30 minutes, les particules les plus fines sont éliminées par aspiration. Ce lavage est répété 3 fois. Finalement le solvant est laissé à évaporer à la température du laboratoire. L'acide silicique est ensuite activé une nuit à 120°C avant l'emploi.

2 - MATERIEL

Le chloroforme et le méthanol RP sont distillés avant l'emploi. Nous avons utilisé une colonne en verre de 60 cm de haut et de 1,5 à 2 cm de diamètre, munie d'un robinet en téflon, d'un rodage femelle afin de recevoir la tête d'adduction d'azote.

3 - MONTAGE DE LA COLONNE

10 ou 20 g d'acide silicique activé à 120°C sont remis en suspension dans 50-100 ml de CHCl_3 , et équilibrés 30 mn à la température du laboratoire. Le mélange acide silicique/ CHCl_3 est dégazé sous vide puis transvasé dans la colonne munie d'un bouchon de laine de verre et remplie de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 2 : 1 (v/v).

La hauteur de gel dans la colonne est de 12 à 16 cm. La colonne est ensuite équilibrée en chloroforme par passage de 200 ml de ce solvant.

4 - DEPOT DE L'ECHANTILLON

Quand le solvant est à 2 mm au-dessus du niveau de l'acide silicique, l'échantillon lipidique repris dans 5 ml de CHCl_3 est déposé au sommet de la colonne à l'aide d'une pipette pasteur. Après pénétration du dépôt dans la colonne, les solutions de rinçage sont également déposées avec précaution au sommet de la colonne.

FICHE 12: CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE. FRACTIONNEMENT DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS NATURELS.

HIRSH J. et AHRENS H.E.
J.B.C., 1958, 233, 311 (T19)
modifiée B. CARON, Thèse, 1972.

Cette technique ne s'applique qu'au fractionnement des esters méthyliques d'acides gras naturels.

Le principe reste identique au précédent, l'acide silicique employé aussi, seuls les solvants d'élution varient.

La colonne obtenue de la même façon que précédemment est préparée dans l'éther de pétrole 60°-70° pur après trois lavages successifs de l'acide silicique par l'éther éthylique, par le mélange acétone - éther éthylique (1 : 1 v/v) et de nouveau par l'éther éthylique pur. Les solvants de polarité croissante sont ici constitués par des mélanges éther éthyliques (EE) - éther de pétrole (EP) de concentration croissante en éther éthylique.

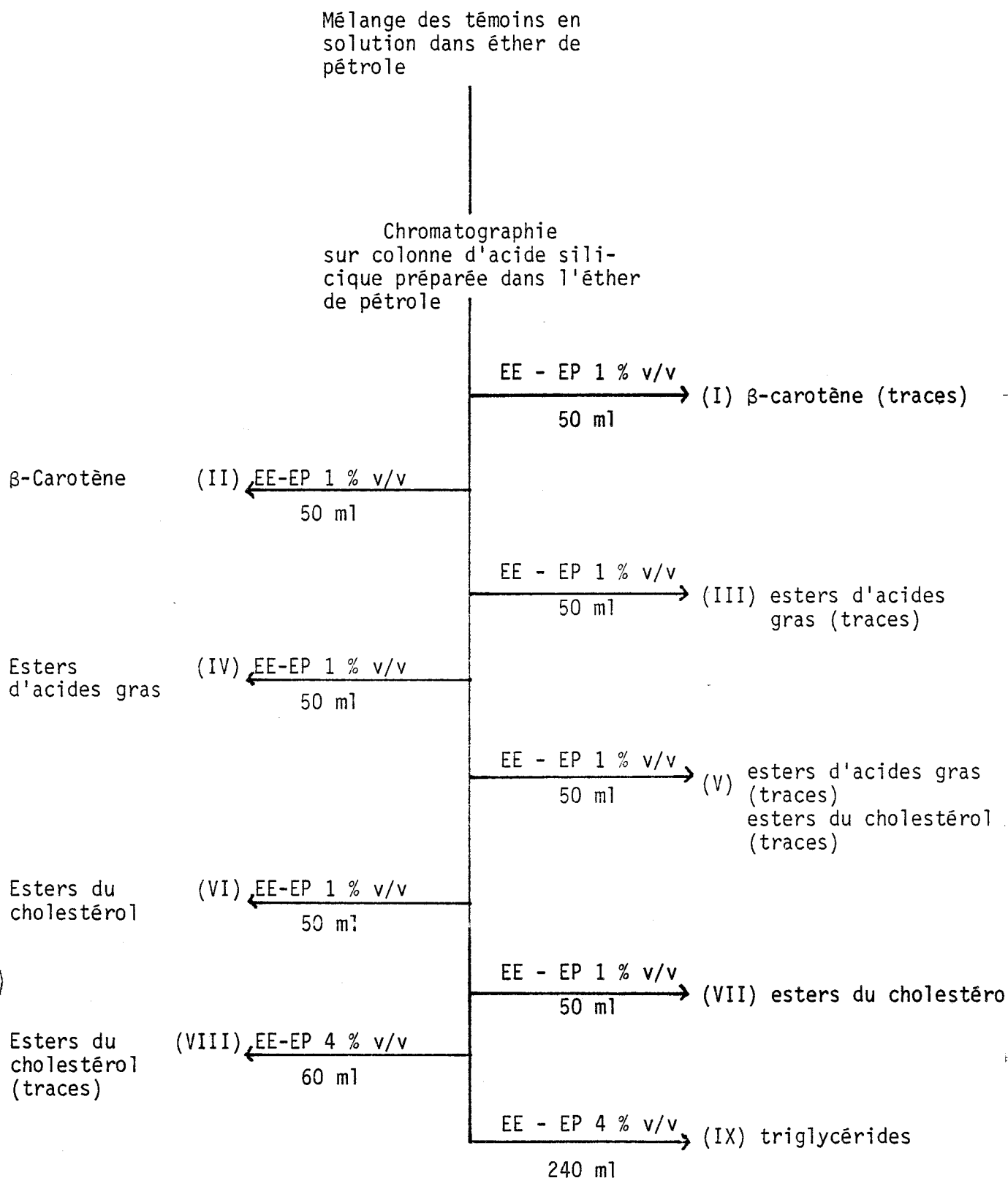
Le schéma d'élution correspond à une modification de protocole de HIRSH (T19) et a été mis au point à partir du mélange de substances témoins suivant :

- β carotène
- stéarate de cholestérol
- oléate de cholestérol
- palmitate de cholestérol
- esters d'acides gras C₁₀ à C₂₀
- triglycéride (trioléine tristéarine etc...)

Il est présenté figure 7.

C'est dans la fraction 4 que se retrouve la quasi-totalité des acides gras. Les fractions 3 et 5 n'en possèdent que des traces et toutes les autres fractions aucune.

FIGURE 7 : SCHÉMA D'ÉLUTION POUR LE FRACTIONNEMENT DES ESTERS MÉTHYLIQUES ET ACIDES GRAS NATURELS.



MODE OPERATOIRE

La colonne d'acide silicique est équilibrée en éther de pétrole (60-70°) (EP). La charge est inférieure à 15 mg de lipides totaux en solution dans l'éther de pétrole par gramme d'acide silicique.

Le schéma d'élution a été simplifié : la première fraction, éluee par 150 ml de mélange éther éthylique/éther de pétrole (1 % v/v) correspond aux hydrocarbures saturés, cires et β carotène. La seconde fraction, obtenue par passage de 50 ml du même solvant contient les esters méthyliques d'acides gras.

La pureté de cette seconde fraction sera vérifiée par chromatographie sur couches minces et son analyse effectuée par chromatographie en phase gazeuse.

**FICHE 13 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS PAR
CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE**

MATERIELS

La composition en acides gras des différentes fractions a été réalisée sur un appareil Varian 1800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Deux types de colonnes peuvent être utilisées :

- une colonne de type standard en acier inox, de 3 mètres de long et 3 mm de diamètre, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10 % en poids sur un support inerte (chromosorb W) de granulométrie 60/80 mesh AW. L'analyse s'effectue à 176°C, les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 210°C et 220°C environ. Le débit du gaz vecteur (azote R) est de 25 ml/minute à la sortie de la colonne.
- une colonne capillaire en acier inox de 50 mètres de long et 0,5 mm de diamètre, remplie de Carbo-wax 20 m. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250°C ; la colonne est stabilisée à 220°C. L'azote R est admis à la pression de 0,3 bar à l'entrée de la colonne. Ce type de colonne permet l'analyse de très faibles quantités d'esters méthyliques. Le pouvoir de résolution meilleur et le temps d'analyse réduit permettent l'analyse d'acides gras très longs tel que l'acide lignocérique (C₂₄ : 0) et nervonique (C₂₄ : 1).

IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS

L'identification de tous les acides gras reste un problème difficile à résoudre : aucune méthode prise séparément ne permet d'identifier avec certitude tous les acides gras. L'utilisation simultanée des principales méthodes permet cependant d'identifier la plupart de ces acides gras.

1 - COMPARAISON DES TEMPS DE RETENTION

Cette méthode est classique et rapide. Il suffit de comparer les temps de rétention des pics inconnus, avec ceux obtenus pour les

esters méthyliques d'acides gras témoins commerciaux. Pour un type de colonne, le temps de rétention absolu évolue avec le temps. Le temps de rétention relatif, par rapport à l'acide stéarique (C18 : 0) est constant pour un type de phase stationnaire, de température et de débit d'azote.

2 - COMPARAISON DES TEMPS DE RETENTION OBTENUS SUR DES PHASES DE POLARITE DIFFERENTE

Sur une phase polaire (DEGS), la présence d'une double liaison dans la molécule d'acide gras augmente l'adsorption sur la phase stationnaire d'où une élévation du temps de rétention par rapport à l'acide gras saturé de même longueur de chaîne. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est plus élevé et que la position de l'une d'elles est plus proche de l'extrémité méthyle de la chaîne.

Sur le carbo-wax 20 M, tous les acides gras d'une même série (saturés et insaturés) sortent avant les acides gras de la série suivante.

Sur les DEGS l'acide linoléique (18 : 3) et l'acide arachidique (20 : 0) ont des temps de rétention quasi-identique, alors qu'ils sont parfaitement séparés sur carbo-wax 20 M.

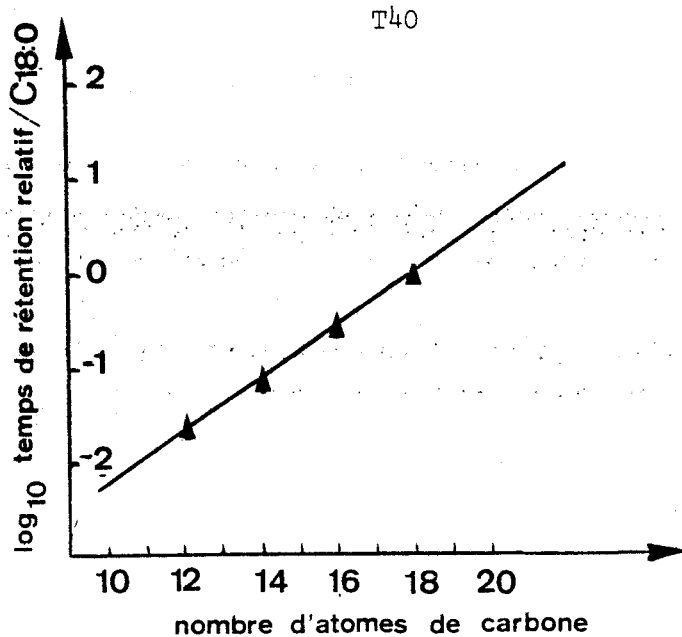
L'utilisation simultanée des deux types de phase et la comparaison des temps de rétention relatifs permettent d'identifier les acides gras à 24 et 22 atomes de carbone saturés ou non.

3 - RELATIONS ENTRE LES TEMPS DE RETENTION ET LE NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE (FIGURE 8).

Il existe pour les acides gras homologues d'une même série une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone des molécules.

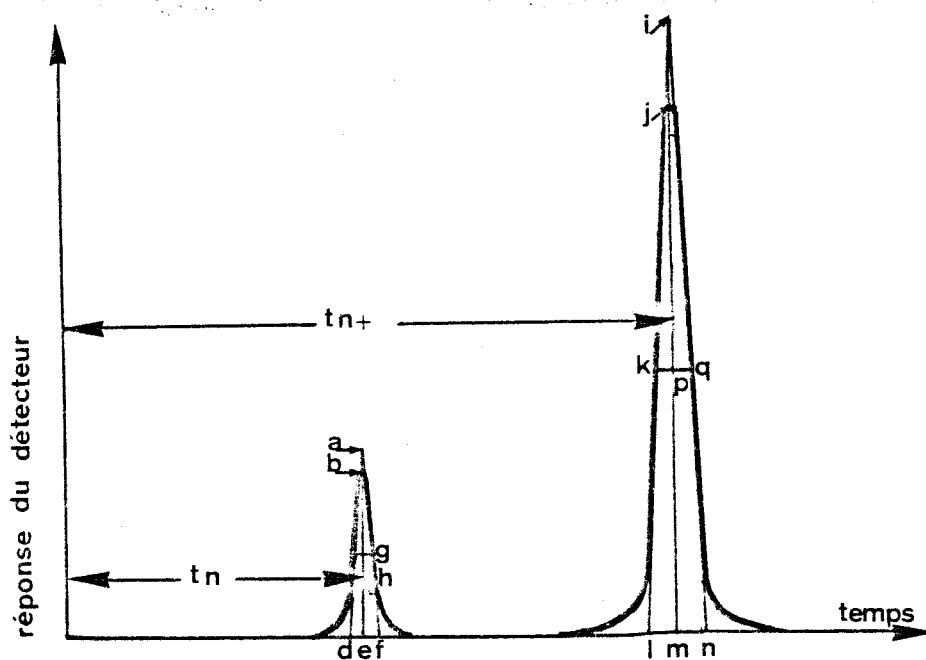
Sur une feuille de papier semi-logarithmique nous portons en abcisse le nombre de carbone de la chaîne (échelle métrique) et en ordonnée le temps de rétention (échelle logarithmique). Ainsi, pour chaque série homologue d'acides gras, nous obtenons une droite et les droites tracées sont parallèles.

Il est possible ainsi, à l'aide des temps de rétention de deux acides gras connus sur un chromatogramme et appartenant à la même série



détermination de la longueur de la chaîne carbonée

Relation entre le logarithme du temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone.



paramètres pour l'évaluation de la surface des pics de G.L.C.



FIGURE 8 : ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ACIDES GRAS.

homologue, de tracer une droite et ensuite de déterminer les temps de rétention théorique des autres acides gras de la série et de les comparer à ceux des pics inconnus.

4 - METHODE UTILISANT LES LONGUEURS EQUIVALENTES DE CHAÎNE CARBONÉE ECL

Comme par la méthode précédente, on trace la droite joignant les points obtenus en portant en abscisse le nombre d'atomes de carbone des acides gras saturés et en ordonnée les logarithmes des temps de rétention. Puis en utilisant les temps de rétention des acides

. oléique C18.....	1 W 9
. linoléique C18.....	2 W 6
. linoléique C18.....	3 W 3

on détermine sur le graphique la longueur équivalente de chaîne carbonée pour les trois types de doubles liaisons W9, W6 et W3

- . l'acide oléique possède 1 double liaison en W9
- . l'acide linoléique possède 1 double liaison en W6 et une en W9
- . l'acide linoléique possède 1 double liaison en W3, une en W6 et une en W9.

ACKMAN et coll. (1973, T21) supposent que, lorsqu'un acide gras contient plusieurs doubles liaisons, la valeur ECL de l'ensemble de celles-ci est égale à la somme des valeurs obtenues pour ces doubles liaisons prises individuellement. Ils admettent également que si un acide gras possède plus de 3 doubles liaisons, les autres situées entre la liaison en W et l'extrémité carbonyle sont affectées de la valeur ECL de la double liaison W9.

Pour le calcul, on porte le temps de rétention de l'acide oléique en ordonnée et on obtient en abscisse sa longueur équivalente de chaîne. Par différence avec celle de l'acide saturé correspondant (stéarique) on en déduit la valeur ECL de la double liaison W9. Connaissant cette valeur, et en opérant de la même façon, on déduit la valeur de la double liaison en W6 puis en W3.

Si on veut déterminer la nature d'un pic inconnu, on détermine son temps de rétention et au moyen de la droite précédente, on obtient sa longueur équivalente de chaîne carbonée. Puis par différence avec l'acide gras saturé précédent sur le chromatogramme, on déduit l'incrément dû à la

somme de ses doubles liaisons. L'incrément est composé à l'aide des valeurs ECL des liaisons W3, W6 et W9. Des hypothèses sur le nombre et la position des doubles liaisons sont formulées. Selon les résultats obtenus par d'autres méthodes d'identification, il convient de choisir l'hypothèse la plus probable.

5 - HYDROGENATION

La comparaison des chromatogrammes avant et après hydrogénation permet de préciser la longueur de chaîne des acides gras et notamment celle des acides gras insaturés.

EVALUATION DU POURCENTAGE DE CHAQUE ACIDE GRAS

Cette évaluation peut être effectuée par l'une des trois méthodes suivantes. Les paramètres servant à cette évaluation sont définis :

1 - TRIANGULATION

Les courbes de GAUSS sont assimilées à des triangles en utilisant les tangentes au point d'inflexion (triangles ADF et ILN), la surface du pic est exprimée par la formule :

$$\frac{\text{hauteur} \times \text{base}}{2}$$

2 - MESURE DE LA LARGEUR DU PIC A MI-HAUTEUR ET EN MULTIPLIANT PAR LA HAUTEUR

Les hauteurs des pics (BE - JM) sont mesurées et les valeurs 0,5.h (EH et MP) sont marquées perpendiculairement au sommet de chaque pic. La largeur à la mi-hauteur (CG - KQ) est mesurée en millimètre.

$$\text{surface du pic} = \text{BE} \times \text{CG}$$

Cette méthode, théoriquement précise, est inemployable pour les pics rapides dont les largeurs sont très faibles.

3 - PAR LE PRODUIT TEMPS DE RETENTION ABSOLU QUE MULTIPLIE LA HAUTEUR DU PIC

Cette méthode dépend du fait que la largeur du pic est une fonction linéaire du temps de rétention.

La détermination des surfaces des différents pics se fait par la mesure des hauteurs de pic (BE - JM) en millimètre et par la mesure des temps de rétention (OE - OM) en millimètre également.

$$\text{surface du pic} = \text{BE} \times \text{OM}$$

Cette méthode est rapide et précise.

Les proportions relatives des différents acides gras sont exprimées en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'esters méthyliques.

Aucune méthode de mesure n'est parfaite, et l'évaluation des pics très aplatis est entachée d'erreurs importantes.

Les compositions en acides gras présentées ont été réalisées sur colonne de DEGS. Chaque analyse est le résultat moyen de trois injections. L'identification des acides gras a été réalisée en comparant les temps de rétention, en utilisant les relations entre temps de rétention et longueur de chaîne et parfois les ECL. L'évaluation des pourcentages est réalisée par la multiplication du temps de rétention par la hauteur du pic.

FICHE 14 : DOSAGE COLORIMETRIQUE DU PHOSPHORE

CHEN P.S. et coll.

Anal. Chem., 1956, 28, 1756 (T22)

BRIGGS W.H.

J. Biol. Chem., 1924, 59, 255 (T23).

PRINCIPE

La détermination quantitative des phospholipides contenus dans l'extrait total consiste essentiellement en un dosage du phosphore après minéralisation de ces lipides.

De nombreuses méthodes permettent le dosage du phosphore lipidique. De préférence à la minéralisation par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée à 110 volumes préconisés par DELSAL, 1953 (T24), nous utilisons la minéralisation perchlorique selon CHEN (1956, T21) suivie du dosage colorimétrique du phosphore basé sur la réaction de BRIGGS (T22). Le principe de cette réaction repose sur la formation d'un complexe phosphomolybdeux - molybdique quand on ajoute à une solution d'ions phosphates des ions molybdiques et molybdeux.

Ce complexe coloré en bleu intense est dosé colorimétriquement à 650 nm.

REACTIF

1 - SOLUTION MERE DE PHOSPHORE A 1 GRAMME PAR LITRE

KH_2PO_4 RP..... 4,394 g
eau distillée qsp..... 1000 ml

2 - SOLUTION FILLE DE PHOSPHORE A 20 MG PAR LITRE

Par dilution extemporannée au 1/50 de la solution mère.

3 - REACTIF MOLYBDIQUE

Il est obtenu par dissolution à chaud de 25 grammes de molybdate d'ammonium dans 125 ml d'eau bidistillée, puis addition de 200 ml d'une solution d' H_2SO_4 (75 ml H_2SO_4 ($d = 1,84$) dans 125 ml d'eau bidistillée). Ce réactif se conserve bien.

4 - SOLUTION D'HYDROQUINONE A 1 % DANS L'EAU BIDISTILLEE

5 - SOLUTION AQUEUSE DE SULFITE DE SODIUM A 20 %

Ces deux solutions, de mauvaise conservation, sont préparées extemporanément.

6 - MELANGE HNO_3/H_2SO_4 A PARTIES EGALES EN VOLUME7 - SOLUTION AQUEUSE D'HCL O_4 à 60 %8 - NH_4OH PUR9 - H_2SO_4 7N.

MODE OPERATOIRE

Quelques ml de solution lipidique sont introduits dans une fiole de Kjeldahl. Le solvant organique est évaporé. Après addition de 1 ml de mélange sulfonitrique, la fiole est chauffée sur une rampe à minéralisation sous une hotte.

Quand les vapeurs rousses de NO_2 ont disparu et sont remplacées par des vapeurs blanches de SO_2 ajouter, après refroidissement de la fiole, 1 ml d'HCl O_4 à 60 %. Chauffer de nouveau jusqu'à décoloration totale.

Cette minéralisation nécessite environ 1 heure 30 minutes de chauffage.

Le mélange incolore et refroidi est additionné de 10 ml d'eau bidistillée, de quelques gouttes de phénol-phtaléine puis neutralisé à l'aide d'ammoniaque pure jusqu'à apparition d'une légère coloration rose. La décoloration est assurée ensuite par quelques gouttes d'acide sulfurique 7N.

Le contenu de cette fiole est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml puis complété avec de l'eau bidistillée.

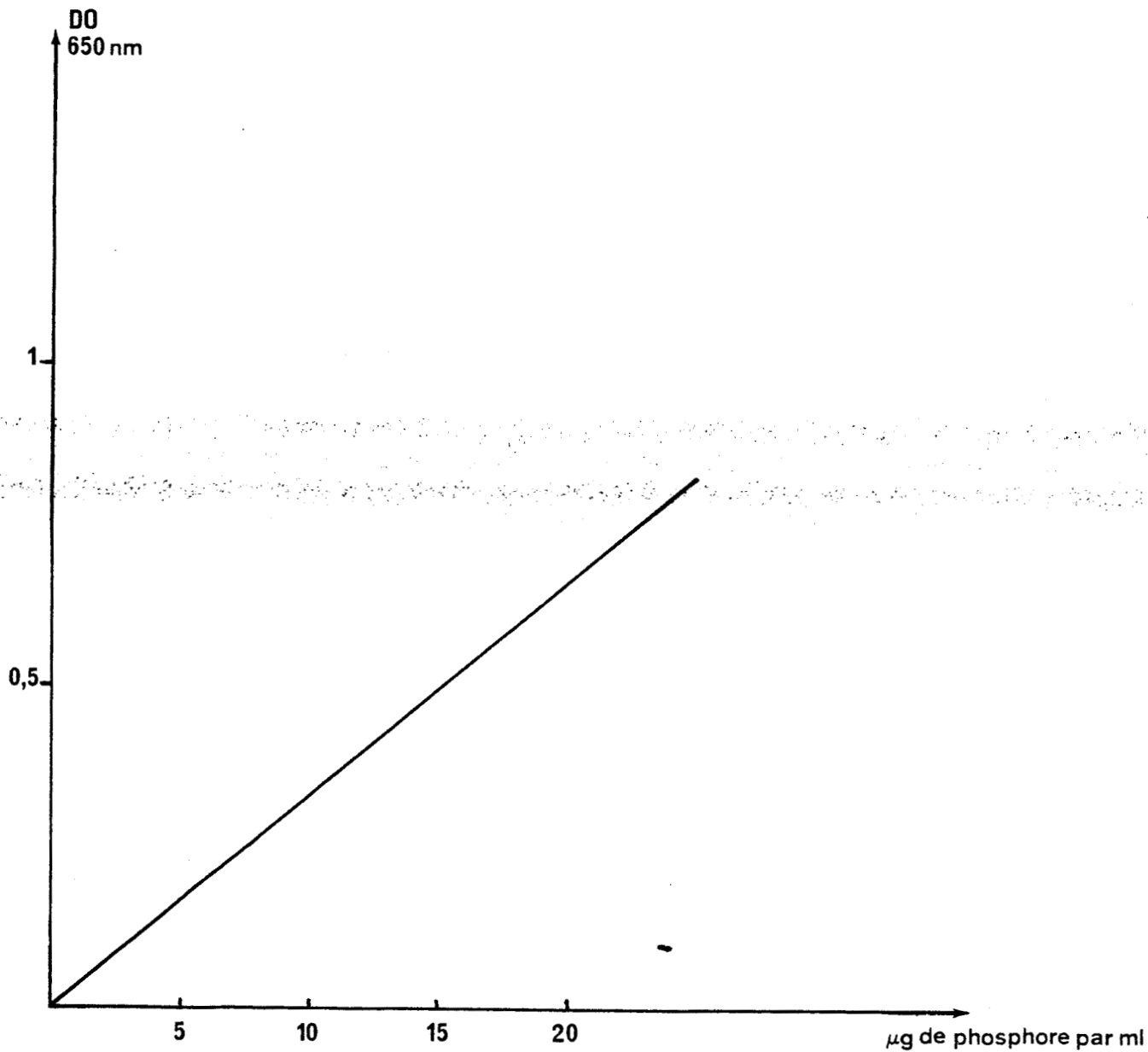
Un blanc réactif est effectué simultanément. La gamme étalon est préparée à partir de la solution fille de KH_2PO_4 à 20 milligrammes de phosphore par litre.

Dans des fioles jaugées de 50 ml, sont introduits 10 ml de la solution à doser, 10 ml du blanc réactif et 10 ml des diverses solutions standard diluées à 5, 10, 15 et 20 μg de phosphore par ml. Puis successivement sont ajoutés, à chaque fiole, 5 ml de chacune des solutions suivantes dans l'ordre indiqué.

- réactif molybdique
- solution aqueuse à 1 % d'hydroquinone
- solution aqueuse à 20 % de sulfite de sodium.

Après avoir complété avec de l'eau bidistillée, les variations de DO sont enregistrées, après 30 minutes à 650 nm l'établissement d'une courbe étalon (figure 9) permettra dès lors de déterminer la concentration en phosphore des échantillons.

FIGURE 9 : COURBE ETALON DE REFERENCE POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE.



815
LILLE

FICHE 15: CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE. FRACTIONNEMENT DES LIPIDES TOTAUX.

FREYSZ L. et coll.
Biochimie, 1971, 53, 399 (T26).

L'extrait lipidique total obtenu par la méthode de FOLCH (fiche T17) est fractionné en diverses classes par chromatographie sur colonne d'acide silicique équilibré en CHCl_3 . La charge est de 4 mg de phosphore lipidique pour 20 g d'acide silicique et la vitesse d'éluion de 3 ml/mn. L'éluion est obtenue par le passage successif de solvant de polarité croissante soit :

- A CHCl_3200 ml
- B $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$100 ml
- C $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (95/5, v/v).....100 ml
- D CH_3OH200 ml

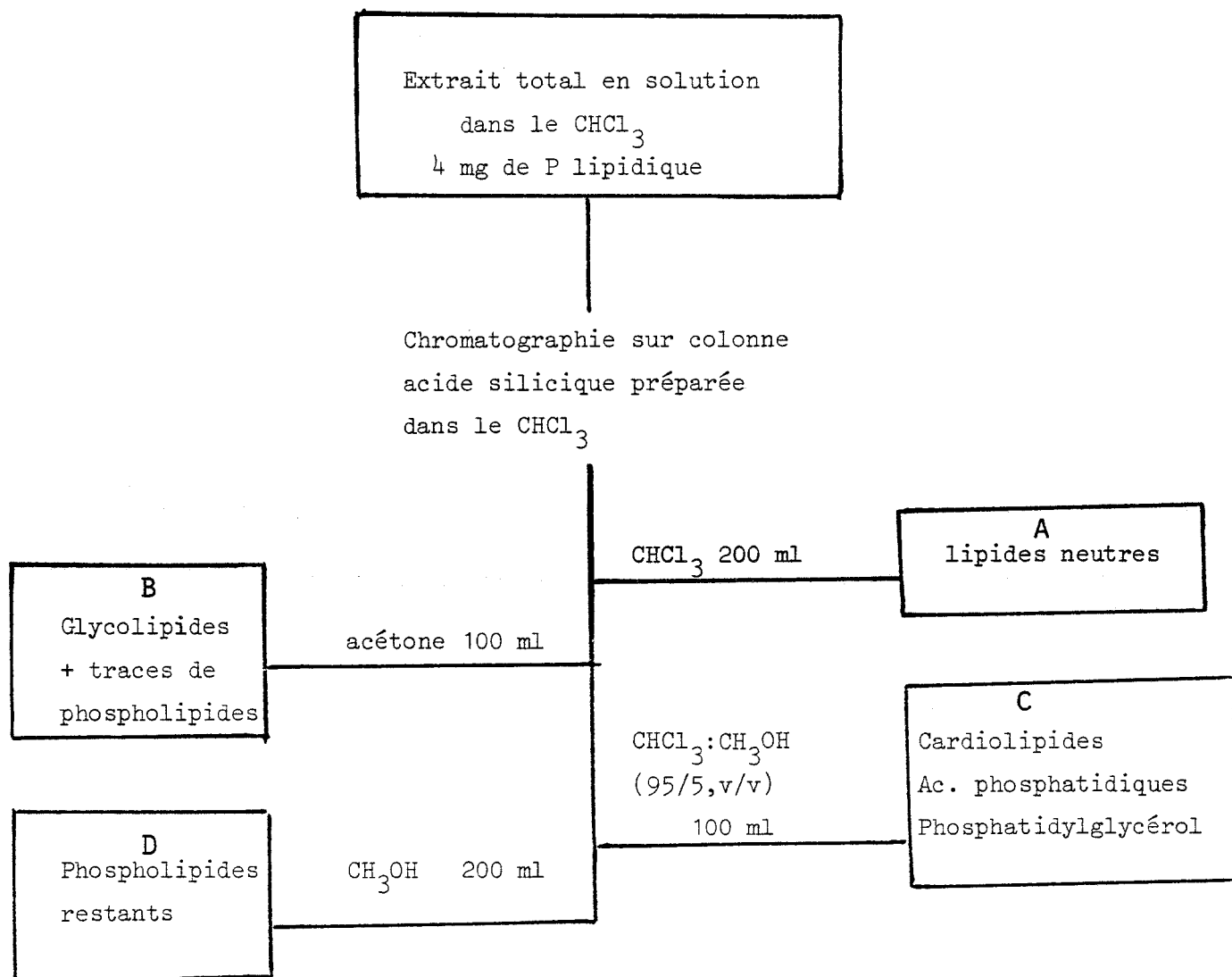
Le schéma de fractionnement est reporté tableau 10.

La fraction A éluee par CHCl_3 correspond à l'éluion des lipides neutres non retenus sur la colonne. L'acétone permet de recueillir les glycolipides au niveau de la fraction B.

Les phospholipides sont élueés en 2 temps soit une première fraction C renfermant les cardiolipides, acides phosphatidiques et phosphatidylglycérols après éluion par 100 ml de mélange chloroforme - méthanol (95 : 5 v/v) et une seconde fraction composée de tous les autres phospholipides élueés par 200 ml de méthanol pur.

Les diverses fractions recueillies sont évaporées à sec sous vide à $+35^\circ\text{C}$ et les résidus dissous dans quelques millilitres de chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v) sont ensuite étudiés qualitativement par chromatographie sur couches minces de gel de silice.

TABLEAU 10 : SCHÉMA DE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES
PAR CHROMATOGRAPHIE SUR ACIDE SILICIQUE.



FICHE 16 : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE SUR COLONNE
DE DEAE CELLULOSE. FRACTIONNEMENT DES LIPIDES
TOTAUX.

ROUSER G. et al.

The Journal of the American Oil Chem. Soc., 1963, 40, 425 (T27).

Les polymères naturels comme les celluloses échangeuses d'ions sont des adsorbants cellulosiques utilisables comme échangeurs soit de cations (carboxy - méthyl - cellulose) soit d'anions (diéthyl - amino - éthyl - cellulose ou DEAE - cellulose).

La DEAE - cellulose comme toutes les celluloses échangeuses d'ions est remarquable par deux propriétés :

- la grosseur des grains ;
- le nombre de groupements basiques fixés sur les fonctions alcools libres des unités de β -glucopyrannose.

Ce nombre est déterminé par des méthodes potentiométriques qui définissent des valeurs en mEq par gramme.

MATERIEL ET METHODES

- 1 - PREPARATION DE LA DEAE CELLULOSE SELON ROUSER ET AL., 1963 (T27).

Environ 100 grammes de DEAE - cellulose sont purifiés par 3 cycles de lavages successifs; chaque cycle comprenant dans l'ordre : HCl 1 N, eau distillée, KOH 1 N, eau distillée.

Après un dernier lavage au méthanol, et séchage à l'air, elle est conservée, sous vide, dans un récipient dont le fond est garni de potasse en pastilles. 15 grammes de ce matériel sont additionnés d'acide acétique glacial et laissés en contact pendant une nuit.

2 - MONTAGE DE LA COLONNE, ROUSER et coll., 1963 (T27)

15 g de DEAE cellulose sous forme acétate sont transférés dans une colonne de 50 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre intérieur munie d'un robinet en téflon dans le bas.

La DEAE cellulose est versée dans la colonne jusqu'à obtention d'une colonne de 20 cm de haut. Elle est lavée par passage de CH_3OH jusqu'à neutralité (6 fois le volume de la colonne), puis par passage de CHCl_3 .

3 - DEPOT DE L'ECHANTILLON

L'échantillon dissous dans du chloroforme pur est déposé avec précaution au sommet de la colonne. La quantité de lipides totaux pour une telle colonne (15 grammes de DEAE cellulose titrant 0,8 à 0,9 mEq par gramme) ne doit jamais être supérieure à 200 mg.

4 - SCHEMA D'ELUTION

L'élution réalisée par une série de solvants de polarité croissante s'effectue à la température de 4°C pour un débit de 3 ml/minute. Le tableau présenté ci-dessous, inspiré de celui de NICHOLS, 1964 (T28), schématise les éluions successives à effectuer pour séparer les divers lipides de la fraction acétonique obtenue après chromatographie de l'extrait lipidique total sur colonne d'acide silicique. Cf. fiche technique 15.

Solvants	Volume	Lipides élués
CHCl_3 pur	400 ml	monogalactosyl-diglycérides (MGDG)
CHCl_3 - CH_3OH (95:5 v/v)	200 ml	cérébrosides stérolglycosides
CHCl_3 - CH_3OH (90:10 v/v)	200 ml	digalactosyl-diglycérides (DGDG)
CHCl_3 - CH_3OH (2:1 v/v)		phosphatidylglycérol diphosphatidylglycérol (cardiolipide)
saturé avec NH_4OH concentré	200 ml	acides phosphatidiques sulfolipides

FICHE 17 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES LIPIDES.

La chromatographie sur couche mince est le moyen le plus aisé pour séparer et identifier un mélange lipidique.

MATERIEL

- Gel de silice H (Merck) à raison de 40g gel/100 ml d'eau distillée ;
- Gel de silice G (Merck) à raison de 50 g gel/100 ml d'eau distillée ;
- Etaleur Desaga - plaque de verre 20 cm x 20 cm ;
- Epaisseur de la couche de gel : 250 μ - 500 μ ;
- Application des échantillons à la seringue Hamilton sous courant d'azote afin d'éviter les dénaturations ;
- Dépôt : 20 à 80 μ de lipides ;
- Cuves de type Desaga (11 x 21 x 21 cm) et cuves sandwich de type Desaga.

SYSTEME SOLVANT

Plusieurs sortes de solvants ont été utilisés pour réaliser la séparation des diverses fractions lipidiques par chromatographie sur couches minces.

A - LIPIDES TOTAUX ET LIPIDES NEUTRES

Les lipides de l'extrait total, de l'éluat chloroformique ou des éluats étherés obtenus après passage sur colonne d'acide silicique sont séparés dans le mélange classique décrit par MANGOLD, 1961 (T29). Sa composition est la suivante : éther de pétrole 90 ; éther éthylique 10 ; acide acétique 1, v/v.

Dans ce solvant la distance de migration est de 15 centimètres.

B - PHOSPHOLIPIDES

Deux groupes de mélanges solvants ont été testés sur des plaques de gel G.

- un solvant alcalin utilisé par NICHOLS, 1964 (T 28)
 - . chloroforme 65 ; méthanol 30 ; NH_4OH 7N 4, v/v
- un solvant acide préconisé par NICHOLS, 1964 (T 28)
 - . chloroforme 170 ; méthanol 25 ; acide acétique 25 ; eau 6, v/v.

L'étude d'un mélange de phospholipides témoins (acide phosphatidique, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, lysophosphatidyléthanolamine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) a permis de déterminer les conditions les plus favorables à une étude systématique de cette classe lipidique : chloroforme-méthanol - acide acétique - eau (170 : 25 : 25 : 6, v/v) pour une distance de migration de 12 centimètres.

Dans le tableau suivant nous rapportons la valeur des Rf des phospholipides témoins chromatographiés dans les conditions décrites ci-dessus.

	Rf
Acide phosphatidique	0,64
Lysophosphatidylcholine	0,08
Phosphatidylcholine	0,34 et 0,44
Lysophosphatidyléthanolamine	0,20
Phosphatidyléthanolamine	0,57 et 0,60
Phosphatidylsérine	0,05
Phosphatidylinositol	0

C - PHOSPHOLIPIDES - CARDIOLIPIDES

L'analyse du mélange cardiolipide, acide phosphatidique, phosphatidylglycérol a nécessité un système chromatographique différent du précédent.

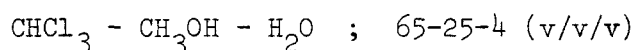
La technique précédente permet en effet de ne séparer que difficilement ces trois dérivés. Nous avons employé dans ce but la chromatographie sur couches minces selon la technique des paliers multiples. Dans ce cas, les conditions opératoires sont les suivantes :

- couche de gel de silice H de 500 μ d'épaisseur ;
- solvant 1 - acétone - éther de pétrole (1/3 v/v) qui migre sur une distance de 16 centimètres ;
- solvant 2 - chloroforme - méthanol - acide acétique - eau (80/13/8/0,3 v/v) qui migre sur une distance de 13 centimètres.

Dans un tel système, l'acide phosphatidique donne une tache dont le Rf est égal à 0,70 ; la tache de cardiolipide a un Rf supérieur à cette valeur et celle de phosphatidylglycérol un Rf égal à 0,61.

D - GLYCOPHINGOLIPIDES

De nombreux systèmes solvants ont été décrits pour assurer la séparation des diverses classes de lipides. Nous avons préféré le mélange suivant :



qui assure la séparation des GSL en fonction du nombre de résidus osidiques présents dans la molécule (ROUSER et coll., 1963, T27 ; KARLSSON et al., 1973 T30).

DETECTION

1 - REACTIFS DE DETECTION GENERALE

- a) vapeurs d'iode. Elles se fixent au niveau des doubles liaisons des acides gras. Les lipides non saturés apparaissent en brun sur fond jaune.
- b) Rhodamine 6G. Ce réactif est obtenu par dilution extemporanée de 1 volume d'une solution mère de Rhodamine à 50 mg/litre d'eau avec 1 volume de NaOH 4N. Après pulvérisation et examen sous lumière ultraviolette des plaques encore humides :
- les phosphatides et lipides acides apparaissent en bleu ou pourpre ;
 - les lipides neutres et phosphatides neutres en jaune-orange ;
 - les produits de peroxydation en bleu gris ;
 - les pigments de type chlorophylliens et caroténoïdes en bleu intense.

Lorsque les plaques sont sèches, les lipides apparaissent en jaune.

2 - REACTIFS DE DETECTION DES GSL ET DES GLYCOLIPIDES

- a) réactif de révélation des céramides (KARLSSON-PASCHER, 1971 (T31)). Par pulvérisation des plaques avec une solution d'acétate cuprique à 3 % dans H_3PO_4 à 8 % en milieu aqueux.

Après 25 minutes à 200°C, les composés de types céramides apparaissent en brun.

Les composés insaturés apparaissent plus rapidement.

b) réactif à l'ónaphtol révélateur des glycolipides (céramides-sulfolipides et gangliosides). Les plaques sont pulvérisées avec une solution d'ónaphtol à 0,5 % dans le mélange $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (1/1 v/v) puis après séchage à l'air libre, avec un mélange acide sulfurique - eau ($\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ (95-5, v/v).

La plaque est ensuite chauffée à 110°C jusqu'à apparition des glycolipides sous forme de taches pourpre - violacé sur fond blanc. Les lipides polaires apparaissent en jaune et le cholestérol en rose gris.

c) réactif à la benzidine spécifique de la liaison amide des GSL.

. solution I :

acide périodique.....228 mg
eau distillée..... 10 ml

Cette solution est diluée au 1/20 dans l'acétone au moment de l'emploi.

. solution II :

benzidine.....184 mg
 CH_3COOH RP.....0,4 ml
eau distillée.....4,4 ml
acétone..... 45 ml

La solution I diluée au 1/20 est pulvérisée sur les plaques ainsi que la solution II 5 minutes après la première.

Les GSL apparaissent en blanc sur fond bleu.

d) réactif à la ninhydrine spécifique des bases libres. Solution révélatrice de :

Ninhydrine.....0,20 g
dans { butanol..... 95 ml
 } pyridine..... 5 ml

Après pulvérisation des plaques, les bases à longues chaînes libres apparaissent en rose. Cette coloration est instable.

e) réactif à l'anthrone.

Anthrone.....0,20 g
 H_2SO_4 qsp..100 g

Après pulvérisation les plaques sont chauffées à 120°C pendant 10 minutes, recouvertes d'une plaque de verre, une réaction positive se traduit par l'apparition de taches bleu-pourpre sur fond blanc.

3 - REACTIF DES PHOSPHOLIPIDES

a) réactif de Zinzadze.

. solution I :

MoO₃.....40,11 g
 H₂SO₄ 25 N.....1000 ml

Ebullition douce jusqu'à dissolution totale.

. solution II :

Poudre de Molybdène..... 1,78 g
 Solution I..... 500 ml

15 minutes d'ébullition. Après élimination des résidus, mélanger I et II, volume à volume, puis ajouter 2 volumes d'eau.

b) réactif de Dragendorff (spécifique de la choline).

. solution I :

Bi(NO₃)₃ 5H₂O..... 1,7 g
 CH₃COOH 20 %..... qsp 100 ml

. solution II :

IK..... 40 g
 Eau distillée..... qsp 100 ml

Solution finale par mélange extemporané

5 ml de solution I
 5 ml de solution II
 20 ml de CH₃COOH RP
 100 ml d'eau distillée

Les phospholipides contenant le groupement choline apparaissent en orangé sur fond jaune pâle en quelques minutes.

c) réactif de Meillere. Ce réactif permet de détecter les phosphatidylinositols.

. solution I :

oxyde mercurique..... 1 g
 HNO₃.....10 g
 Eau distillée.....qsp 200 ml

Diluer au moment de l'emploi au 1/2.

. solution II :

acétate de baryum à 10 %.....15 ml
 CH₃COOH RP.....qsp 100 ml

Pulvériser les plaques avec le réactif I et chauffer 10 minutes à 85°-100°C.

Pulvériser ensuite les plaques avec le réactif II, et porter de nouveau à l'é-tuve pendant 2 minutes. Cette dernière pulvérisation peut être éventuellement répétée 4 à 5 fois. La présence d'inositol se traduit par l'apparition de taches roses.

d) réactif à la ninhydrine. Cette révélation est spécifique des groupements aminés des phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines.

La solution de ninhydrine à 0,2 % dans l'acétone est diluée au 1/2 extemporanément. Après pulvérisation, les chromatogrammes sont révélés par chauffage à 80°C pendant 5 minutes. La présence de lipides aminés se traduit par l'apparition de taches rose-pourpre.

FICHE 18 : PREPARATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS.

INTRODUCTION

L'identification et la répartition des acides gras des différentes classes de lipides se font sous forme d'esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide. La fixation d'un groupement méthyle sur la fonction acide des acides gras par une liaison ester, permet d'abaisser la température de vaporisation de ces composés et de diminuer les effets d'adsorption sur le support imprégné de phase stationnaire.

Des deux méthodes proposées qui conduisent à la préparation des esters méthyliques d'acides gras :

- l'une comprend une saponification suivie d'une méthylation (A) ;
- l'autre, permet d'obtenir directement par transestérification, les esters méthyliques à partir des lipides (B).

METHODE A

- SAPONIFICATION

L'extrait lipidique, après addition de 50 ml d'un mélange éthanol-éther (3 : 1, v/v) et de 0,5 ml d'une solution de KOH 10N, est chauffé à reflux pendant 2 heures. La solution de savons est transvasée dans une fiole jaugée de 50 millilitres et complétée si besoin est par de l'éthanol absolu. Par addition de 39 millilitres d'eau distillée, on obtient une solution de savons dans un mélange éthanol-eau à 50 % (+ 5 %), condition nécessaire à la limpidité de la solution.

Après addition de 75 ml d'éther de pétrole 30°-60°, et agitation vigoureuse, la phase supérieure étherée qui contient les stérols est éliminée. L'opération est recommencée 2 fois. La couche inférieure ainsi purifiée contient les sels de K des acides gras. Les acides gras sont libérés par addition de 10 ml d'HCl 1,5N. Par agitation avec 75 ml d'éther de pétrole, les acides gras libres passent dans la phase étherée. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer toute trace d'acide chlorhydrique. La phase étherée

ainsi obtenue est évaporée à sec sous vide et le résidu d'acides gras libres prêt à être méthylé.

- METHYLATION DES ACIDES GRAS LIBRES PAR LE REACTIF
AU BF_3 -METHANOL

- Préparation de la solution de BF_3 dans le méthanol : Dans un flacon de 2 litres, taré et baignant dans la glace, on introduit un litre de méthanol anhydre dans lequel on plonge un tube de verre relié au BF_3 . Quand 125 g de BF_3 sont dissous dans le méthanol le réactif est prêt. Il est cependant nécessaire de prendre quelques précautions.

- n'introduire le tube de verre dans le méthanol que lorsque le BF_3 se dégage déjà et l'en sortir avant d'arrêter le dégagement du BF_3 ;
- régler le débit du gaz de telle sorte que les vapeurs blanches de BF_3 ne s'échappent pas du flacon contenant le méthanol ;
- préparer ce réactif sous une hotte efficace ;

Ce réactif est d'excellente conservation à la température de $+4^\circ\text{C}$ dans un flacon bouché hermétiquement.

- METHYLATION DES ACIDES GRAS LIBRES

Le résidu d'acides gras libres obtenus après saponification est additionné de 3 millilitres de réactif au BF_3 méthanol (3 millilitres sont nécessaires pour 150 milligrammes d'acides gras libres).

Après 20 minutes au bain-marie bouillant, la réaction est totale et les esters méthyliques d'acides gras sont extraits pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. La solution est transférée dans une ampoule à décanter avec 20 millilitres d'eau distillée et 30 millilitres d'éther de pétrole $30^\circ-60^\circ$. Après agitation vigoureuse et décantation, la phase supérieure étherée est recueillie et filtrée sur papier afin d'éliminer toute trace d'eau. Les esters méthyliques évaporés à sec sous vide à 30°C , sont repris par une très faible quantité d'hexane pur et sont prêts à être chromatographiés.

Pour l'analyse de ces esters méthyliques, deux types de colonnes sont en général utilisées : polaires et non polaires.

METHODE B

1 - EXTRACTION

Après hydrolyse selon le protocole décrit (cf. fiche 27) les acides gras libérés ne sont que partiellement estérifiés. Ils sont donc extraits sélectivement par 3 fois 3 ml de n-hexane en vue de subir une transestérification.

2 - TRANSESTERIFICATION

Les acides gras contenus dans le n-hexane sont évaporés à sec, et repris ensuite par 3 ml de méthanol additionnés de 10 gouttes d'acide sulfurique concentré.

La transestérification se déroule à 70°C pendant 2 heures.

Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transvasés dans une ampoule à décanter avec 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure heptanoïque est filtrée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée. Les esters méthyliques sont repris par 50 µl de chloroforme en vue d'une purification sur gel de silice.

3 - PURIFICATION DES ESTERS METHYLIQUES

La transestérification n'étant jamais complète, un faible pourcentage d'acides gras ne sont pas méthylés puisqu'il s'agit d'un équilibre, il est donc indispensable d'éliminer ces composants ainsi que les éventuels contaminants provenant des solvants utilisés. Pour ces raisons, il convient de purifier les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince.

Les esters méthyliques en solution dans le chloroforme sont déposés sur des plaques de gel de silice G activées 10 minutes à 110°C.

Le solvant de migration est le benzène.

Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G. Le spot correspondant aux esters méthyliques repéré grâce à l'utilisation de témoins est gratté. Le gel de silice est déposé dans une petite colonne à chromatographie dont l'extrémité inférieure est garnie de laine de verre.

Après évaporation, les esters sont repris par le sulfure de carbone et analysés par chromatographie gaz-liquide.

*FICHE 19 ; COUPLAGE DES DIVERSES TECHNIQUES ET PROTOCOLE
DE PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES.*

KARLSSON K.A. et coll.

Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T 30)

Afin d'obtenir chaque classe de glycosphingolipides, c'est à dire Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer, nous avons suivi le protocole présenté tableau

Ce protocole préconisé par KARLSSON, 1973 (T30) correspond aux séquences suivantes :

- extraction des lipides totaux (fiche 20)
- hydrolyse des lipides totaux et obtention des GSL totaux (fiche 21)
- purification des GSL totaux par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique (fiche 22)
- fractionnement des GSL totaux en GSL neutres et acides (fiche 23)
- fractionnement des GSL neutres en Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer (fiche 24)
- purification des Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer par chromatographie préparative sur couche mince (fiche 25)

*FICHE 20 : EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX POUR L'ETUDE DES GLYCO-
SPHINGOLIPIDES*

d'après FOLCH J. et coll.

J. Biol. Chem., 1957, 228, 497-509 (T17)

*modifiée KARLSSON K.A. et coll.-Biochim. Biophys. Acta, 1973,
316, 317-335 (T30)*

INTRODUCTION

Selon la technique préconisée par FOLCH (1951-1957, T33-T17) les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme - méthanol (2 : 1 v/v). Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et agitation, on obtient un déphasage avec passage dans la phase hydro-alcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux.

Cependant, ce procédé d'extraction des lipides totaux est un facteur limitant dans l'étude des glycosphingolipides (GSL).

Il faut, semble-t-il, attribuer aux extractions incomplètes les discordances entre les résultats concernant la composition en GSL du rein (KARLSSON, 1973(T30)), les conditions trop douces d'extraction, décrites par CARTER et coll., 1969 (T32) ne conduiraient pas à une libération quantitative de l'ensemble des GSL. Les phytosphingolipides sont particulièrement difficiles à extraire et ne le sont que lors des dernières homogénéisations.

Les différentes techniques d'extraction proposées dérivent de celles de FOLCH (1951 - 1957 (T33-T17)).

En effet, le meilleur agent d'extraction (POLONOVSKI et coll., 1959 (T34)) reste le mélange CHCl_3 - CH_2OH) dans les proportions 2:1 (v/v). Seules les conditions de température varient.

Afin d'obtenir une extraction complète des GSL, nous avons donc procédé de la manière suivante.

MATERIEL ET METHODES

1 - REACTIFS

- solvant d'extraction I : chloroforme - méthanol (2 : 1, v/v) ;
- solvant d'extraction II: chloroforme - méthanol (1 : 1, v/v) ;
- solution NaCl à 9 g/l ;
- solution de lavage :
 - .chloroforme..... 3 volumes
 - .méthanol.....47 volumes
 - .NaCl 9 %.....48 volumes

2 - EXTRACTION

Le matériel (20 g de styles ou 1 g de pollen) provenant des divers clônes et croisements est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Waring Blendor dans le solvant d'extraction I, à raison de 20 ml de solvant par gramme de tissu, pendant 20 minutes.

Après deux heures de contact à la température du laboratoire, l'extrait est filtré et le résidu est homogénéisé à 4 reprises à l'aide d'un appareil de Potter, dans le solvant d'extraction I, à raison de 10 ml de solvant par gramme de tissu. Après filtration, le résidu sec est chauffé à reflux pendant une heure dans le solvant II.

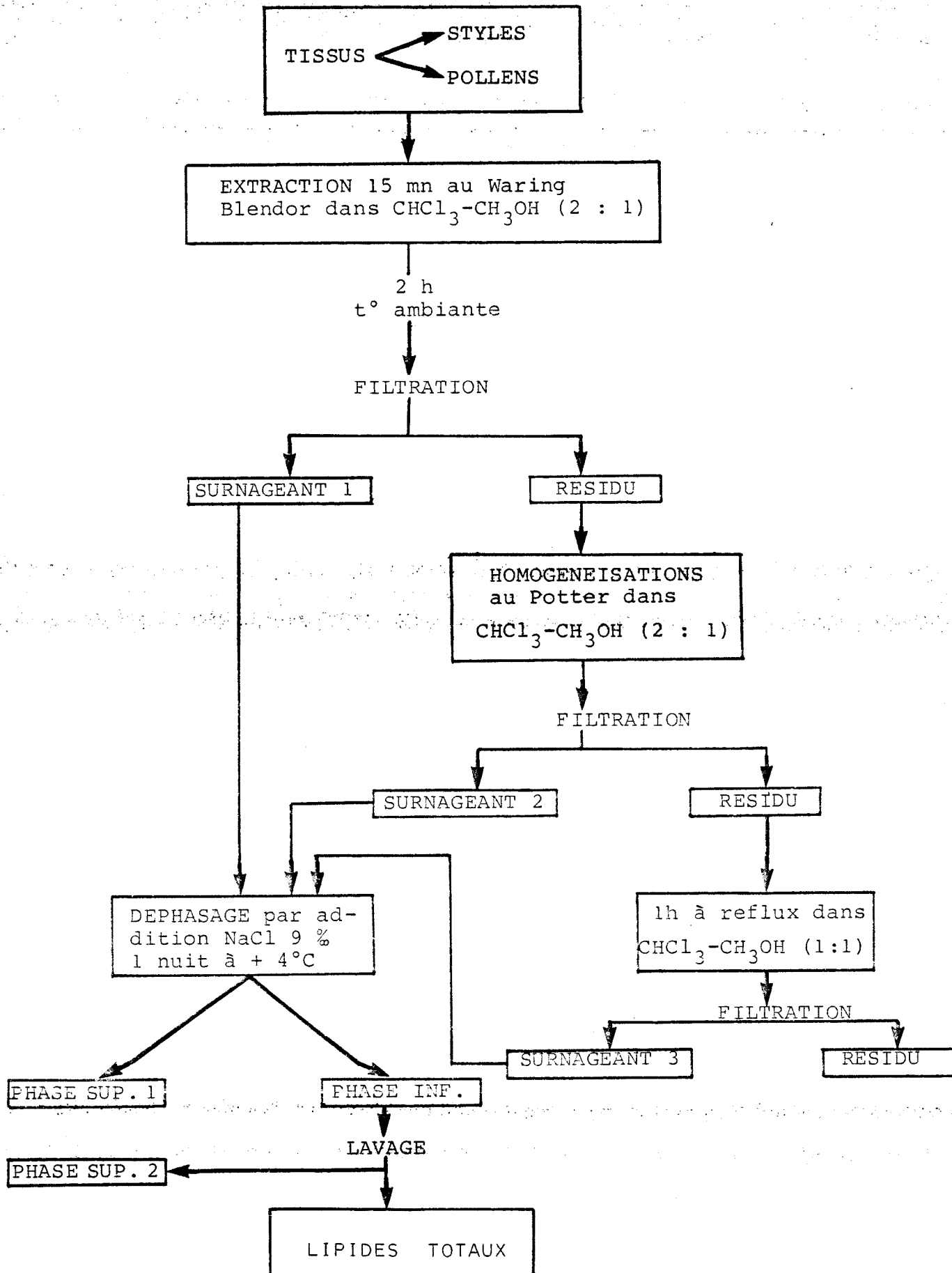
Les divers surnageants organiques sont réunis et soumis à un partage selon la technique de FOLCH par addition de 1 volume d'une solution de NaCl à 9 % pour 5 volumes de solvant. Après déphasage, une nuit à +4°C, et élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique est lavée par la solution $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-NaCl 9 \% 3 : 47 : 48 (v/v/v)}$.

La phase inférieure contenant les lipides totaux est évaporée à sec.

Les lipides sont ensuite repris dans un petit volume de solvant I et conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

Deux extractions ont été réalisées pour chaque type de tissu en fonction du génotype et de la pollinisation incompatible et compatible. Le protocole d'extraction utilisé est schématisé ci-contre (tableau 11).

TABLEAU 11 : PROTOCOLE D'EXTRACTION



FICHE 21 : HYDROLYSE ALCALINE DOUCE. OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

KARLSSON K.A. et al.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T30)

INTRODUCTION

Les GSL constituent une classe de lipides alcali-résistants. Les glycérophosphatides seront détruits par une saponification.

Le protocole opératoire comporte :

- une étape d'hydrolyse alcaline ;
- l'arrêt de cette hydrolyse par neutralisation de l'agent alcalin et acidification du milieu jusqu'à un pH compris entre 2 et 5 ;
- extraction des GSL par partage et élimination simultanée des molécules et sels hydrosolubles ;
- récupération de la phase organique contenant les GSL totaux.

Nous avons utilisé la technique de SCHMIDT modifiée par KARLSSON (1973 (T30)) qui assure une hydrolyse complète et une oxydation minimale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - REACTIFS

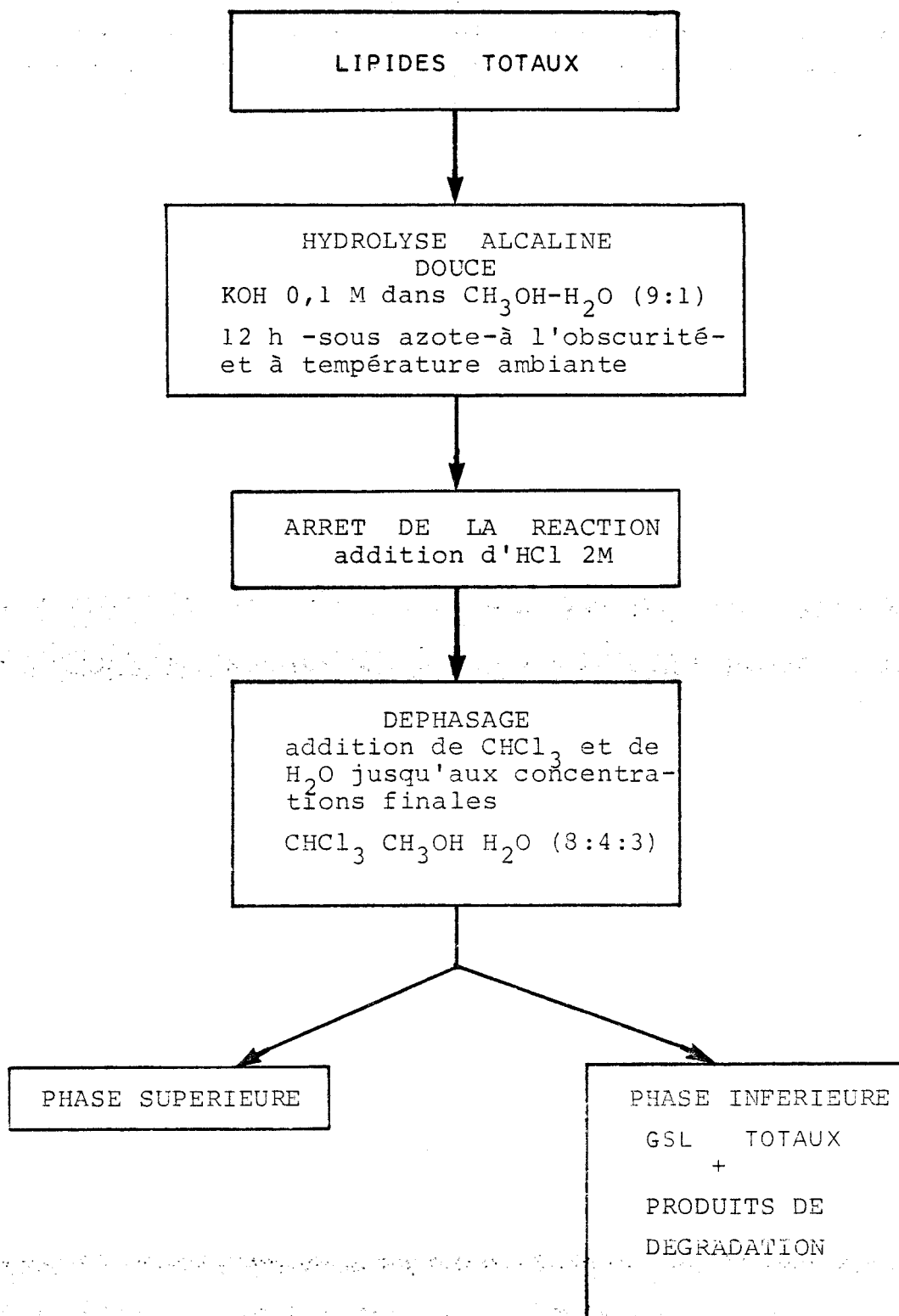
- agent d'hydrolyse : KOH 0,1 M dans du méthanol aqueux ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$, 9 : 1, v/v) ;
- HCl 2 M.

2 - HYDROLYSE ALCALINE DOUCE (tableau 12).

Un gramme de lipides totaux sont repris dans 100 ml d'agent hydrolysant. L'hydrolyse se poursuit en atmosphère d'azote, à l'obscurité sous agitation magnétique et à la température du laboratoire pendant 18 heures.

L'addition de CHCl_3 et d' H_2O jusqu'à des concentrations finales en $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ de 8,4,3 permet le déphasage selon la technique de FOLCH

TABLEAU 12 : OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX



(1957,T17). Après élimination de la phase supérieure hydro-alcoolique, la phase inférieure contenant les GSL totaux est évaporée à sec. Les GSL sont repris par le mélange solvant $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ 2 : 1, v/v et sont conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

Une partie aliquote de la phase supérieure est soumise à une analyse par chromatographie en couche mince afin de vérifier l'absence de GSL dans cette phase.

FICHE 22 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE. PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES.

KARLSSON K.A. et al.

Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 336-362 (T35)

Les GSL obtenus après hydrolyse alcaline douce sont purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl_3 . La charge est de 100 mg de lipides/gramme d'acide silicique et le volume éluant de 10 ml de solvant par gramme d'acide silicique. La vitesse d'éluion de 3 ml/mn. L'éluion est obtenue par passage successif de :

- CHCl_3 (soit 200 ml) ;
- CHCl_3 - CH_3OH , 1/3 (v/v) (200 ml) ;
- CH_3OH (200 ml).

Trois fractions A, B et C sont obtenues respectivement. La première fraction A contient les acides gras, le cholestérol et quelques pigments.

Les GSL sont élués successivement au niveau des fractions B et C. Le schéma d'éluion des GSL est présenté tableau 13 ; la figure 14 rapporte l'analyse par chromatographie en couche mince des fractions A, B, C.

TABEAU 13 : FRACTIONNEMENT DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX

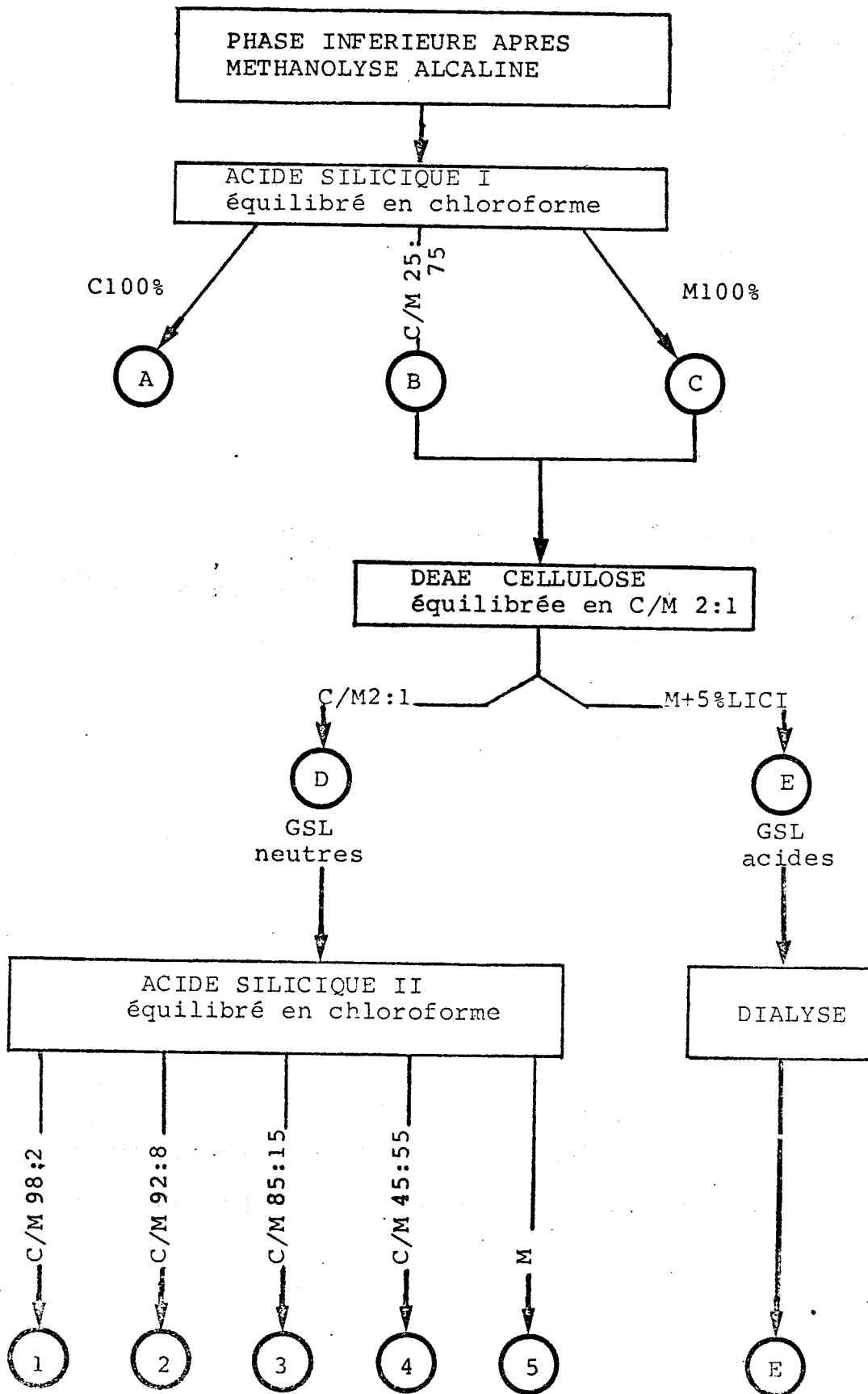
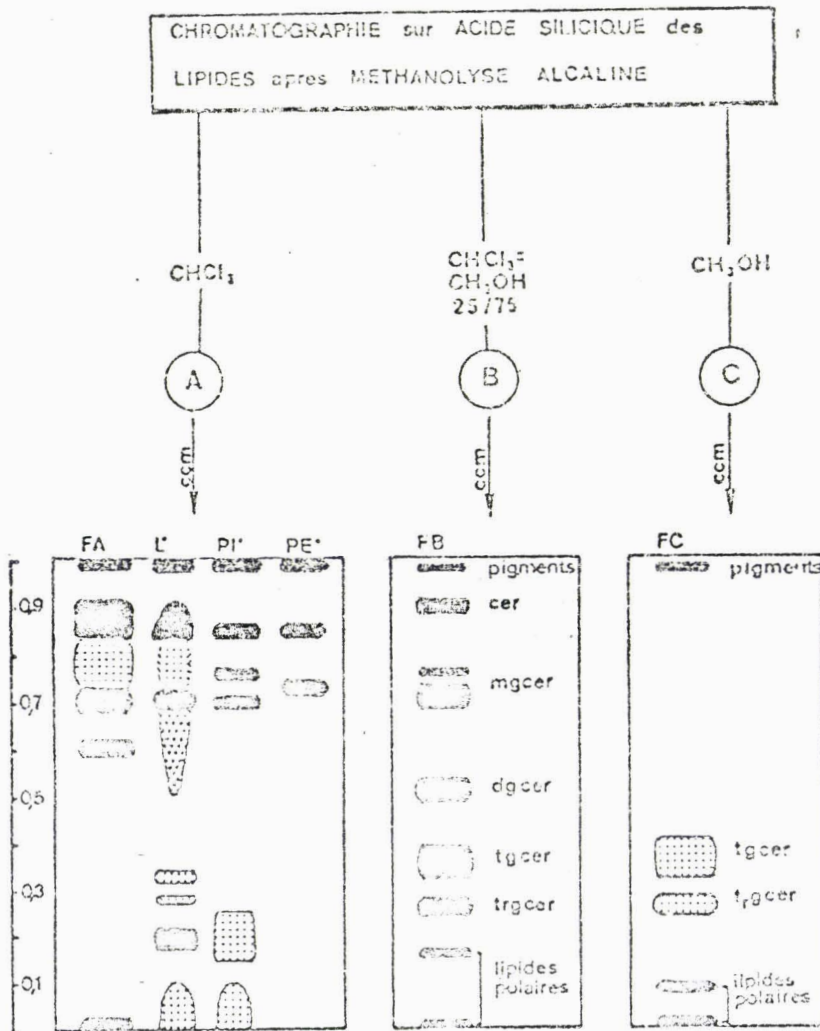


FIGURE 14 : ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS A,B,C SÉPARÉES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE.



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C
 solvant : CHCl₃-CH₃OH-H₂O (65 : 25 : 4, v/v/v)
 migration : 13 cm
 révélation : réactif à la Rhodamine 6G

- FA : fraction A
 L* : lécithine hydrolysée partiellement par le réactif alcalin
 PI* : phosphatidyl-inositol hydrolysé partiellement
 PE* : phosphatidyl-éthanolamine hydrolysée partiellement
 FB : fraction B
 FC : fraction C



FICHE 23 : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE SUR COLONNE DE DEAE CELLULOSE. FRACTIONNEMENT DES GSL NEUTRES ET ACIDES.

KARLSSON K.A. et al.

Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T30)

ROUSER G. et al., 1967

Lipid chromatographic analysis, DEKKER inc NY vol. I, 99-162 (T25)

INTRODUCTION

La séparation des lipides par chromatographie d'échanges ionique est basée sur l'échange de groupements ioniques. Cependant, des différences de polarité dûes à des groupements non ionisés comme les groupes hydroxyls peuvent également intervenir.

Trois grands groupes de lipides sont généralement séparés :

- les lipides non ionisés : neutres ;
- les lipides zwitterioniques ;
- les lipides acides.

Chacun de ces trois groupes, peut être fractionné en fonction de la différence de polarité et/ou d'acidité.

Deux types de support pour la chromatographie d'échange ionique sont possibles : la DEAE cellulose (= diéthylaminoéthyl-cellulose) et la TEAE cellulose (= triéthylaminoéthyl-cellulose). La première est généralement utilisée pour la séparation des lipides en classes, tandis que la seconde permettra la séparation des lipides ne possédant que des groupements carboxyls comme seuls groupements ionisés (ex : les acides biliaries et les gangliosides).

MATERIEL ET METHODES

1 - PREPARATION DE LA DEAE SELON KARAN-LESTER (1975, T36)

La DEAE cellulose (DE 11 Whatman) de haute capacité d'échange est mise à gonfler dans l'eau distillée. Après deux lavages à l'eau distillée et élimination des particules trop fines, la DEAE cellulose est mise en contact avec de la soude 5 % pendant 30 mn (60 g DEAE - 300 ml de NaOH à 5 %), puis elle est lavée par passage d'eau distillée jusqu'à obtention de la neutralité. La DEAE cellulose est ensuite convertie sous forme acétate par un contact de 30 minutes avec $\text{CH}_3\text{-COOH}$ à 10 %. L'excès d'acide est éliminé par lavage à l'eau distillée et au méthanol. La DEAE cellulose est alors équilibrée dans le mélange solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ dans les proportions 2/1 (v/v).

2 - MONTAGE DE LA COLONNE

On utilise une colonne à chromatographie de 1,5 cm de diamètre et 60 cm de haut munie d'un robinet en téflon dans le bas, d'une tête rodée pour l'adduction de l'azote.

Le mélange de DEAE-cellulose et de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ est versé dans la colonne jusqu'à l'obtention d'une colonne de 20 cm \pm 3 cm de haut. Elle est équilibrée par passage de 200 ml de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1.

3 - DEPOT DE L'ECHANTILLON

L'échantillon est repris dans 5 ml de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1 (v/v) et déposé à la partie supérieure de la colonne.

4 - ELUTION : PURIFICATION DES GSL NEUTRES ET ACIDES (SELON KARLSSON et al., 1973 (T35))

Les glycosphingolipides totaux purifiés sont soumis à un fractionnement par chromatographie d'échanges ioniques sur colonne de DEAE cellulose équilibrée en $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 2/1, v/v.

La charge est de 50 mg de lipides/gramme de DEAE cellulose.

L'élution est assurée par le passage successif de :

- 1 - $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 2/1 (v/v) à raison de 100 ml par gramme de cellulose ;
- 2 - CH_3OH contenant 5 % de LiCl à raison de 25 ml par gramme de cellulose.

Deux fractions D et E sont obtenues respectivement (tableau 13), la première fraction D contient les GSL neutres. Les GSL acides sont élués au niveau de la fraction E. Afin d'éliminer le LiCl contenu dans le solvant, la fraction E est mise à dialyser 4 jours contre de l'eau distillée. Les GSL acides, contenus dans la phase inférieure après déphasage, sont recueillis et évaporés à sec sous vide et le résidu repris par le mélange CHCl_3 - CH_3OH 2/1, v/v.

FICHE 24 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE.

KARLSSON K.A.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T30).

Les GSL neutres totaux sont fractionnés par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl_3 selon les conditions suivantes :

- charge de la colonne : 10 à 25 mg de lipides par gramme d'acide silicique ;
- volume éluant de chaque fraction : 20 ml/g d'acide silicique ;
- vitesse d'éluion : 2 ml/mn.

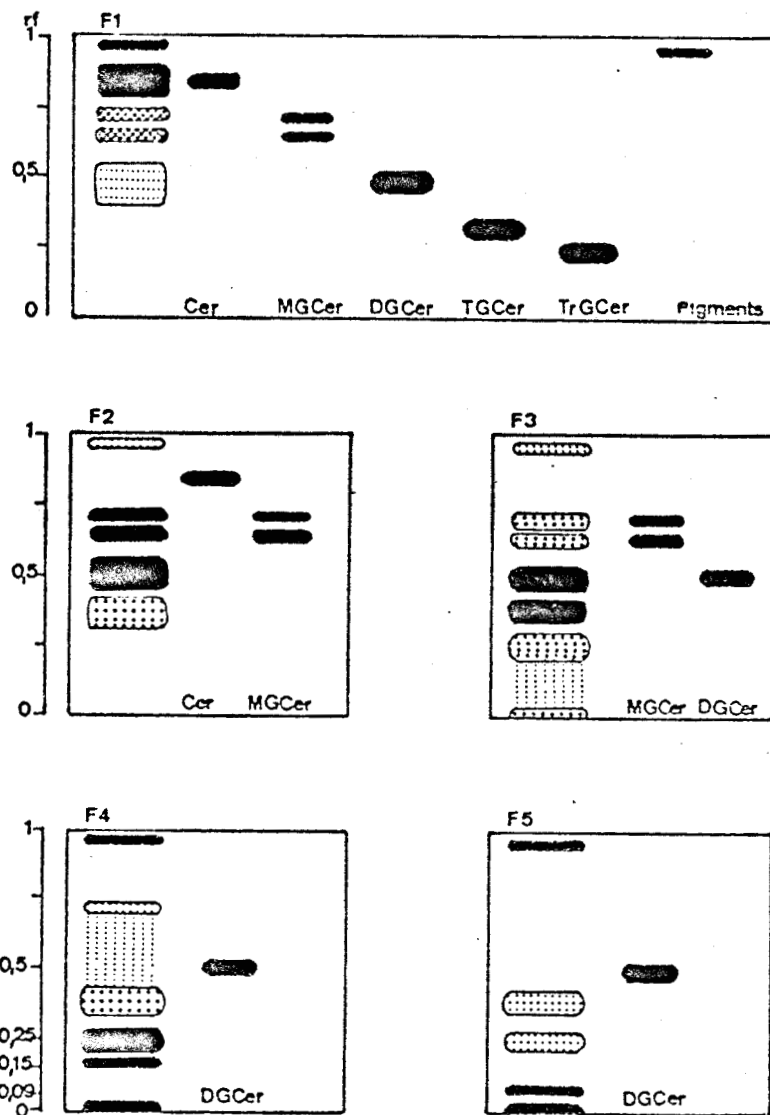
L'éluion est réalisée en augmentant la polarité du mélange éluant par des quantités croissantes de CH_3OH .

Cinq fractions sont ainsi recueillies :

- la fraction F1 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 98/2 v/v
- la fraction F2 " " " " " " : 92/8 v/v
- la fraction F3 " " " " " " : 85/15 v/v
- la fraction F4 " " " " " " : 45/55 v/v
- la fraction F5 " " " " " " : 0/100 v/v

Le schéma d'éluion est présenté tableau 13 ; la figure 15 rapporte les résultats de la chromatographie en couche mince des 5 fractions. Elles correspondent : fraction 1 (F1) principalement aux céramides et monoglycosylcéramides ; fraction 2 (F2) au mono et diglycosylcéramides ; fraction 3 (F3) en majeure partie aux di et tri-glycosylcéramides ; fraction 4 (F4) en majeure partie aux tétraglycosylcéramides ; fraction 5 (F5) à des lipides très polaires non identifiés.

FIGURE 15 : ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS F1, F2, F3, F4 ET F5 SÉPARÉES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE.



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C
 solvant : $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4, v/v/v)
 migration : 13 cm

révélation : réactif à la Rhodamine 6G
 réactif à l' α -naphtol

FICHE 25 : PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les GSL obtenus au niveau des fractions :

- FD = GSL neutres + pigments
- F1 = Céramides + (MGCer)
- F2 = (MGCer) + DGCer
- F3 = DGCer + TGCer
- F4 = (TGCer) - TRGCer
- F5 = TGCer - TRGCer - lipides polaires

nécessitent une étape supplémentaire de purification par chromatographie préparative sur couche mince en gel de silice afin d'obtenir chaque classe de GSL à l'état pur.

Les fractions correspondant aux divers GSL neutres et acides sont évaporées à sec, reprises dans 100 µl - 200 µl de CH₂OH - CHCl₃ (1/2 v/v) puis déposées dans leur totalité sur des plaques de gel de silice activées 30 minutes à 120°C (voir fiche 17).

La migration et la séparation des GSL sont assurées par le solvant CHCl₃ - CH₃OH - H₂O (65-25-4 (v/v/v)). L'emplacement des taches est révélé par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G et lecture des plaques en fluorescence, afin de ne pas modifier la structure des acides gras contenus dans les divers GSL.

Après séchage des plaques, les taches correspondant aux divers GSL (Cer - MGCer - DGCer, etc...) sont grattées et introduites dans de petites ampoules à décanter. Après addition de CHCl₃ (5 ml) et de CH₃OH (5 ml) l'élu-tion des GSL se fait par agitation vigoureuse pendant 10 minutes.

L'addition de 4,5 ml d'eau distillée et l'agitation pendant une minute permettent le déphasage qui est total après 18 heures à +4°C. La phase inférieure chloroformique contenant les GSL est recueillie et évaporée sous azote.

Le résidu sec repris par 1 ml de mélange solvant $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ 2/1 (v/v) est gardé sous atmosphère d'azote à -20°C en tubes scellés.

La pureté des fractions lipidiques est testée par chromatographie analytique en couche mince (fiche technique n° 25), d'une partie aliquote.

*FICHE 26 : DOSAGE FLUORIMETRIQUE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES**NAOI M. et al.**Analytical biochem., 1974, 58, 571-577 (T 37)*

INTRODUCTION

Les GSL forment une classe de lipides complexes caractérisés par la présence de N-acyl-sphingosine, liée soit à des hexoses (GSL neutres) ou à des hexoses sulfates (sulfatides) ou à des oligosaccharides contenant de l'acide sialique (gangliosides) ou enfin à la phosphocholine (sphingomyéline).

Seuls les dosages de la sphingosine et des bases homologues permettent d'évaluer la teneur en GSL d'un tissu. En effet, si les divers substituants de la base peuvent exister à des concentrations variables selon les GSL, une seule molécule de sphingosine par molécule de sphingolipide est présente chez tous les GSL connus.

La technique utilisée est celle préconisée par NAOI (1974,T37) quand les GSL peuvent contenir des hexosamines ou céder des amines primaires hydrosolubles.

La sphingosine, libérée par hydrolyse acide des GSL est extraite du milieu aqueux par le diéthyl-éther, puis en présence de fluorescamine donne un complexe fluorescent, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de sphingosine libérée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - REACTIFS

- agent d'hydrolyse HCl N en méthanol aqueux ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$: 82-18 v/v) ;
- NaOH 2N ;
- tampon borate de sodium 0,2 M de pH 8,0 ;
- diéthyl-éther ;
- diéthyl-éther contenant 0,015 % de fluorescamine (Fluram des Laboratoires Roche).

FIGURE 16



COURBE D'ÉTALONNAGE DES DOSAGES FLUORIMÉTRIQUES

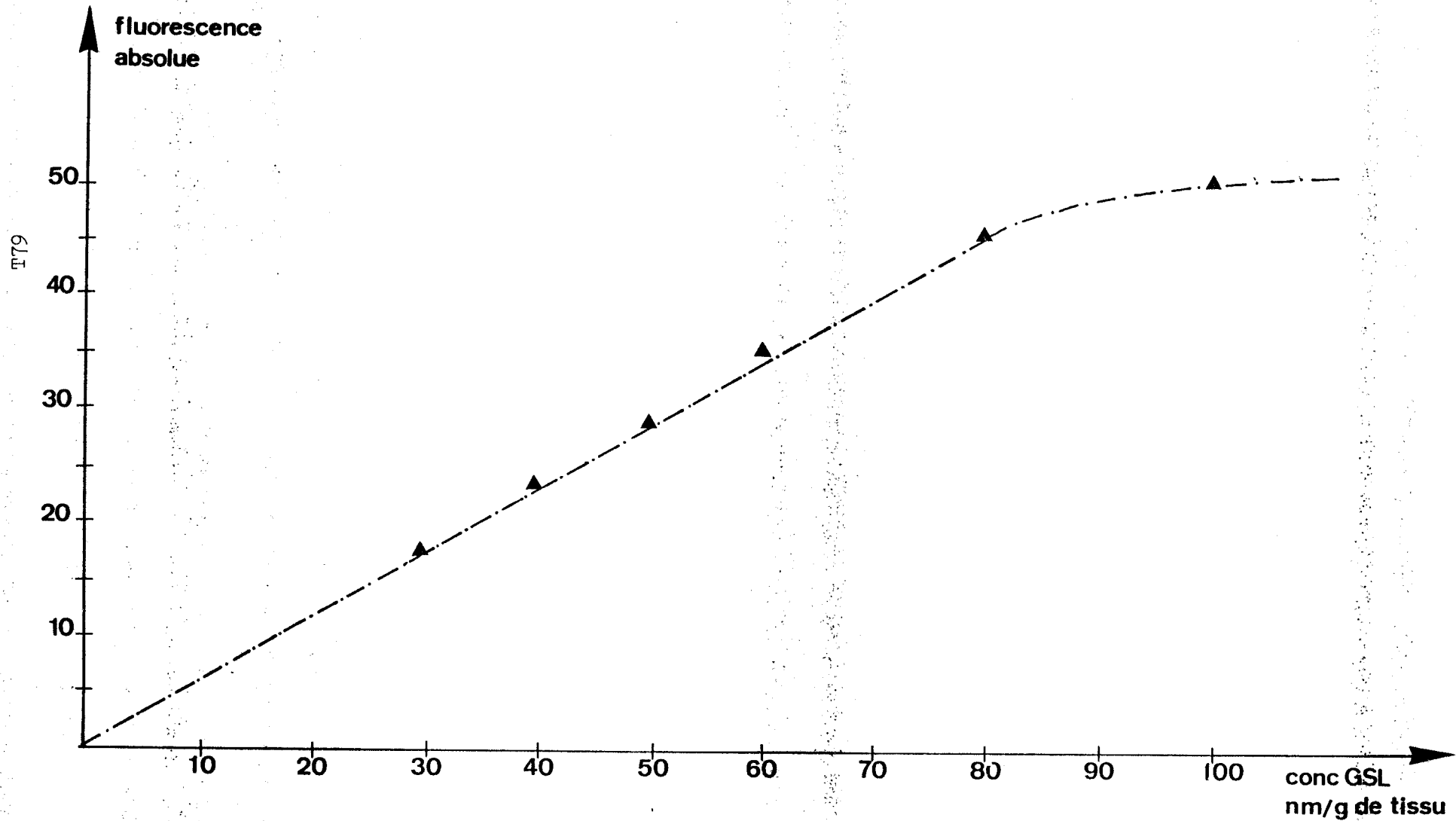
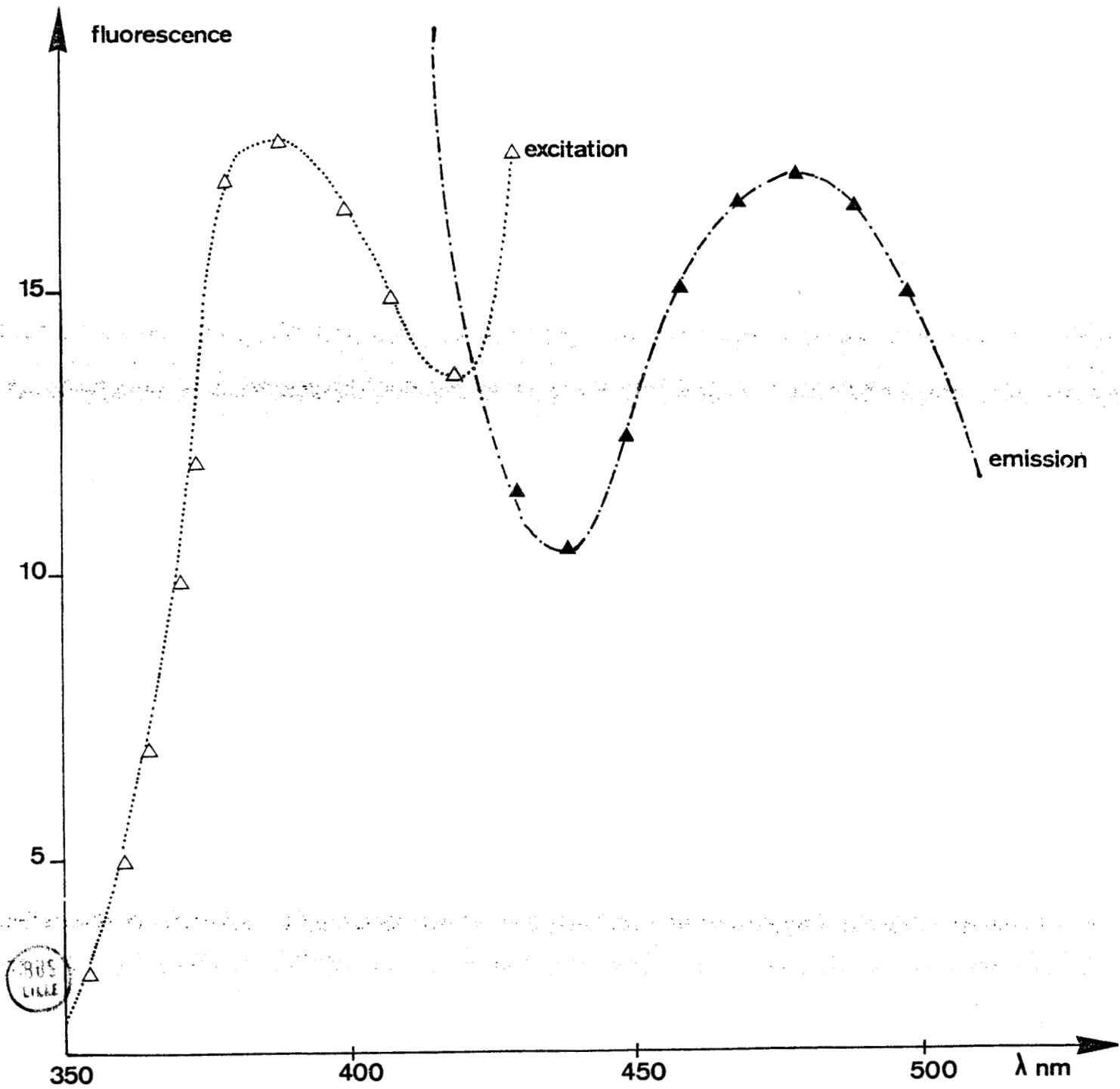


FIGURE 17

SPECTRE DE FLUORESCENCE



2 - METHODE

Les extraits de GSL (1-100 nanomoles) sont chauffés en tubes vissés à 70°C pendant 18 heures en présence de 0,5 ml d'HCl 1 M en méthanol aqueux.

Après refroidissement sur glace, l'hydrolyse est arrêtée par addition de 0,25 ml de NaOH 2N et 0,75 ml de tampon borate 0,2 M de pH 8,0.

Puis, 1,5 ml de diéthyl-éther sont ajoutés ainsi que 0,5 ml de diéthyl-éther contenant 0,015 % de fluorescamine.

Après agitation vigoureuse sur Vortex et déphasage, la phase étherée supérieure est prélevée. L'intensité de la fluorescence est appréciée sur spectrofluorimètre Zeiss pour une longueur d'onde d'excitation de 385 nm et une longueur d'onde d'émission de 480 nm.

Les spectres d'émission et d'excitation, ainsi que la linéarité de la courbe étalon ont été vérifiés et sont présentés respectivement figure 16 et figure 17.

Les résultats sont exprimés en nanomoles de GSL/g de tissu.

Quatre dosages ont été réalisés pour chaque type de tissu en fonction du génotype et du type de pollinisation.



FICHE 27 : HYDROLYSE ACIDE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

GAVER R.G. et SWEELEY C.C.

J. Amer. oil Chem. Soc., 1965, 42, 294-298 (T 38)

INTRODUCTION

Divers types de réactifs acides peuvent assurer la destruction des glycosphingolipides et libérer quantitativement les bases, oses et acides gras.

La présence d'eau dans le réactif d'hydrolyse augmente le rendement de cette hydrolyse.

Ainsi nous avons préféré la technique préconisée par GAVER et SWEELEY (1965, T38) car elle libère la totalité des bases et minimise la production d'artéfacts indésirables telles la formation de 3-O méthylsphingosine et celle de la 5-O-méthyl Δ_3 sphingosine.

MATERIEL ET METHODES

1 - REACTIF D'HYDROLYSE

Solution d'acide chlorhydrique dans du méthanol aqueux, préparé comme suit :

- HCl concentré..... 8,6 ml
- Eau distillé..... 9,4 ml
- Méthanol..... 100 ml qsp

Obtention d'une solution HCl 1M contenant 10 M d'eau.

2 - PROTOCOLE OPERATOIRE

Deux mg de GSL sont repris par 1 ml du réactif d'hydrolyse. L'hydrolyse se fait à 70°C pendant 18 à 23 heures sous atmosphère d'azote.

Au terme de l'hydrolyse, les échantillons sont refroidis jusqu'à la température ambiante, ce qui permettra après extractions sélectives les analyses ultérieures par chromatographie en phase gazeuse.

FICHE 28 : DOSAGE COLORIMETRIQUE DE LA SPHINGOSINE ET
DES BASES A LONGUES CHAINES

SWEeley C.C. et MOSCATELLI E.A.
J. Lipid Res., 1960, 1, 40 (T 39).

PRINCIPE

Cette méthode de dosage est basée sur l'extraction sélective de la sphingosine par le chloroforme à partir d'un hydrolysate acide, suivie du dosage de l'azote contenu dans les molécules.

REACTIFS

- 1) HCl 6N
- 2) Chloroforme redistillé
- 3) Méthanol redistillé
- 4) Solution standard $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 mM.

Cette solution contient 66,05 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par litre soit 0,5 μM d'azote par ml.

- 5) Mélange de minéralisation :
 - . K_2SO_440 g
 - . eau distillée.....qsp 250 ml

Ajouter à cette solution 250 ml d'acide sulfurique concentré et 2 ml d'oxychlorure de sélénium.

- 6) Réactif de Nessler
 - . solution stock
 - IK.....174,5 g
 - Hg I_2227,5 g
 - eau bouillie débarrassée du CO_2 ...100 ml

Ajouter à cette solution une quantité de solution de IK à 10 % saturée d'iode telle que la solution vire légèrement à l'orange. Compléter ensuite à 1 litre avec de l'eau distillée bouillie débarrassée du gaz carbonique.

- Solution finale :

- solution stock..... 100 ml
- Na OH 8 N..... 250 ml
- eau bouillie débarrassée du CO_2 qsp 500 ml

MODE OPERATOIRE

A - EXTRACTION SELECTIVE DES BLC (SWEETLEY et MOSCATELLI, 1960, T39)

La libération quantitative des BLC est obtenue par hydrolyse acide des sphingolipides. Après évaporation à sec des échantillons et addition de 0,5 ml d'HCl 6N, l'hydrolyse acide se poursuit 1 heure au bain-marie bouillant.

Les bases ainsi libérées sont extraites par addition de 5 ml de mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v). La couche inférieure chloroformique est recueillie après une centrifugation de 10 minutes.

Les bases restantes de la phase supérieure sont extraites par 2 fois 1 ml de mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (17/3, v/v).

Les diverses phases chloroformiques sont rassemblées, évaporées à sec pour être soumises ensuite à un dosage d'azote.

B - DOSAGE DE L'AZOTE

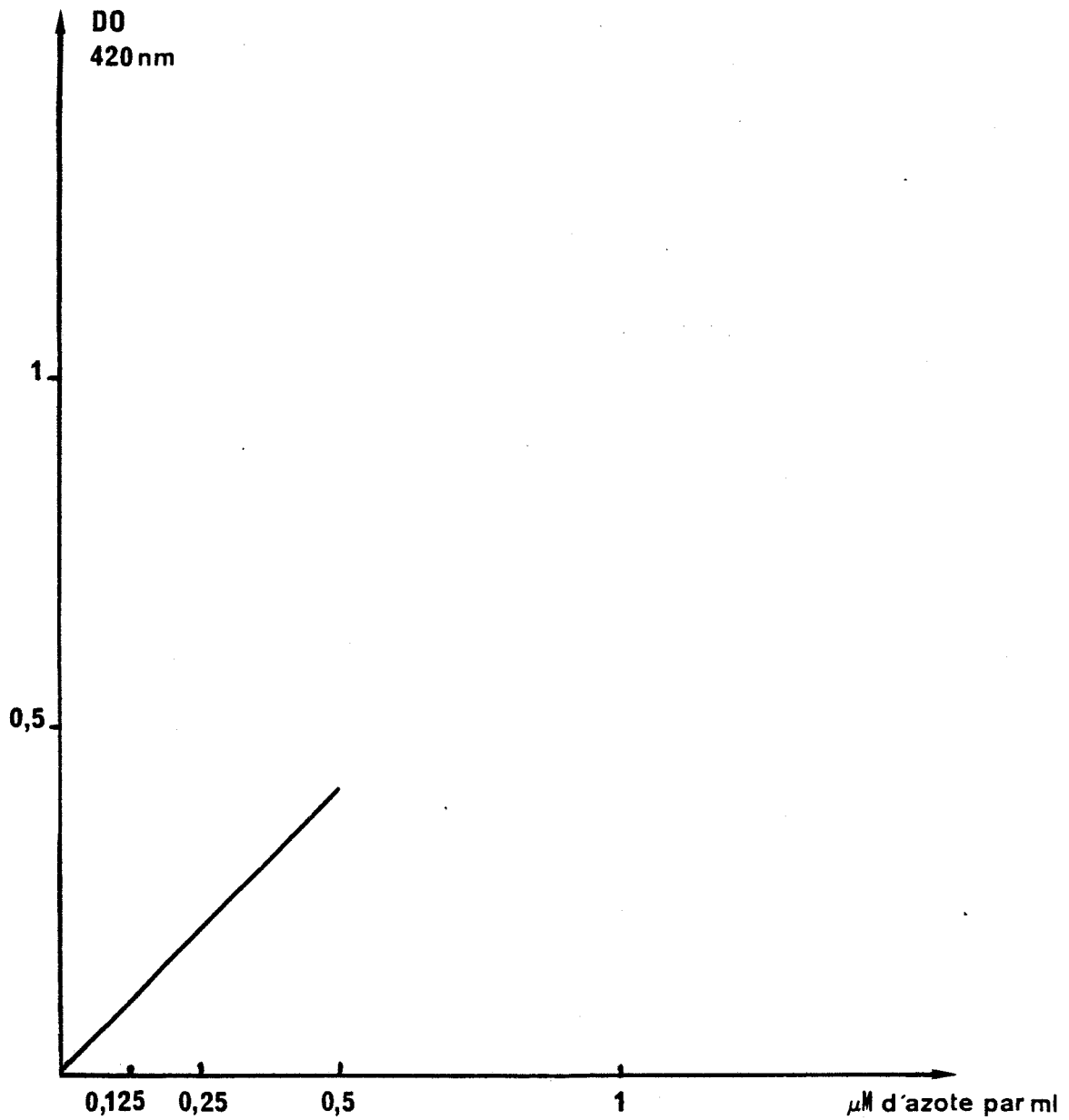
Le résidu est minéralisé en présence de sulfate de potassium, d'acide sulfurique et de sélénium utilisé comme catalyseur. L'azote transformé en ion ammonium est dosé par colorimétrie.

L'échantillon contenant une quantité d'azote toujours inférieure à 1 μM est évaporé à sec. Après addition de 0,2 ml du mélange de minéralisation, chauffage pendant 3 heures sur une rampe électrique dans une fiole de Kjeldahl et refroidissement, une goutte d'eau oxygénée à 110 volumes est ajoutée et le mélange est porté à nouveau à ébullition pendant une heure.

La minéralisation de quantités précises, de solutions standard à 0,125, 0,250, 0,500 et 1 μM d'azote par ml et un blanc réactif est effectuée simultanément.

Après refroidissement et addition de 3 ml d'eau et 2,5 ml de réactif de Nessler, les fioles sont laissées 30 minutes à l'obscurité. Les variations de DO sont enregistrées à 420 nm. Grâce à une courbe étalon (figure 18) les quantités d'azote contenues dans l'échantillon sont déterminées.

FIGURE 18 : COURBE ETALON DE RÉFÉRENCE POUR LE
DOSAGE DE L'AZOTE.



Cette méthode très sensible nécessite pour être significative l'emploi d'une vaisselle très propre, d'une enceinte de travail totalement dépourvue d'ammoniac et d'amines volatiles. Il est de plus toujours conseillé d'associer à chaque dosage deux dosages sur des solutions étalons.

*FICHE 29 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN BASES A LONGUE CHAÎNE
(BLC) DES GLYCOSPHINGOLIPIDES*

INTRODUCTION

La présence de bases à longue chaîne dans les hydrolysats acides de GSL a été démontrée par CARTER. Et, par la suite, les travaux de CARTER et de KARLSSON ont conduit à la classification de ces composés. L'analyse de ces bases impose l'identification des bases par :

- l'évaluation de la longueur de la chaîne carbonée ;
- la mise en évidence de l'existence de doubles liaisons ;
- la détermination de la position des branchements.

Ces bases peuvent être identifiées par des analyses en chromatographie sur couche mince dans divers solvants et par chromatographie en phase gazeuse (WEISS, 1967, T40).

L'instabilité de ces bases, au cours de l'hydrolyse et après, nous a conduit à retenir le protocole expérimental suivant et schématiquement illustrée par la figure 19.

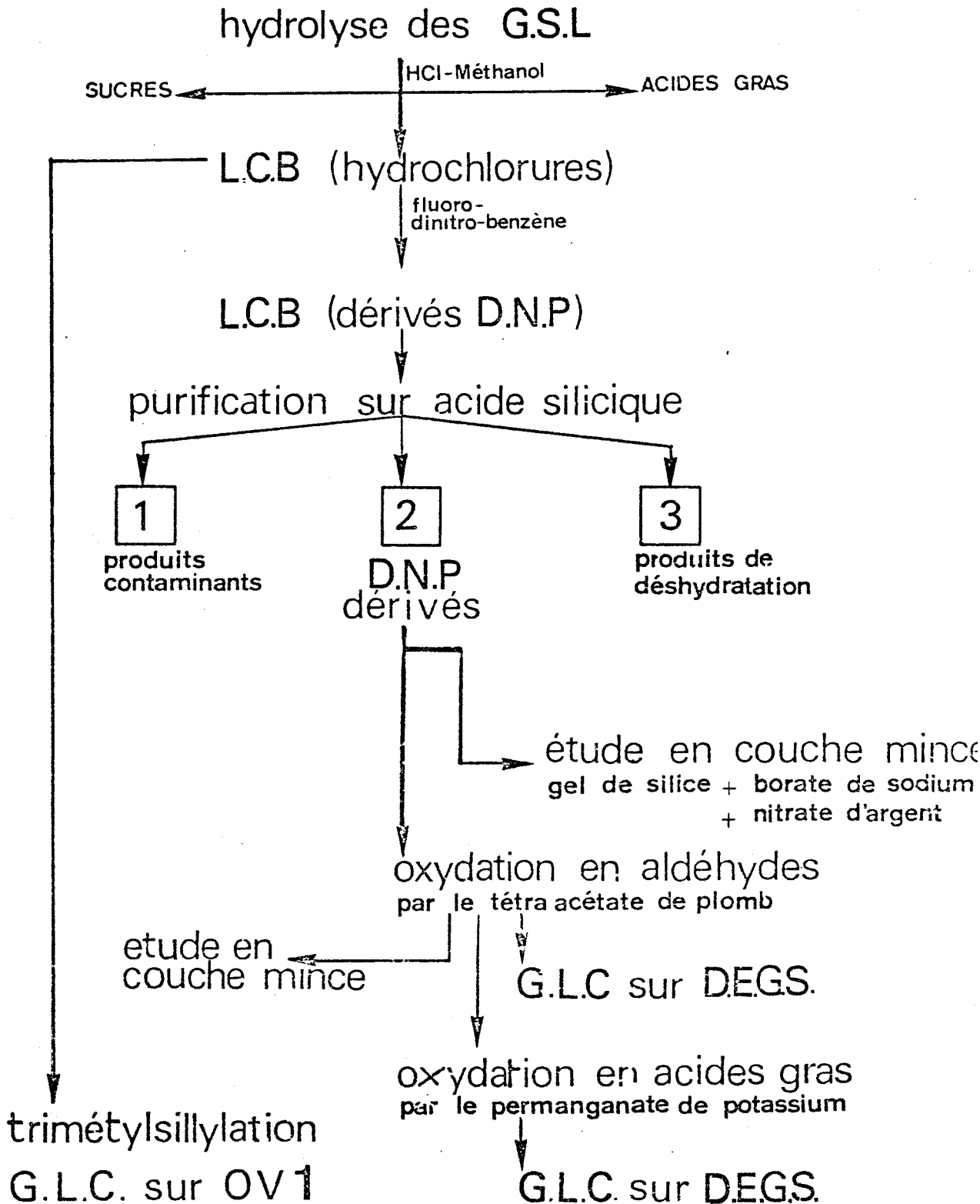
- 1 - libération des bases selon GAVER et SWEELEY (1965, fiche 27) ;
- 2 - transformation en DNP-Dérivés qui stabilisent les bases, puis études chromatographiques de ces DNP-Dérivés en couche mince et purification ;
- 3 - oxydation par le tétraacétate de plomb des DNP-Dérivés en aldéhyde puis analyses chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse ;
- 4 - oxydation par le permanganate de potassium des aldéhydes en acides gras, et analyses chromatographiques en phase gazeuse.

LIBERATION DES BASES A LONGUE CHAÎNE SELON GAVER

Pour les raisons précédemment décrites (fiche 27), nous avons choisi les conditions d'hydrolyse qui assurent la libération de la totalité des bases et qui produisent le minimum d'artéfacts.

Après une hydrolyse-acide afin de respecter la configuration des bases, les GSL sont coupés en :

FIGURE 19 : PROTOCOLE D'ANALYSE DES BASES À LONGUES CHAINES
CONSTITUTIVES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES.



- esters d'acides gras ;
- bases à longue chaîne (BLC) ;
- sucres.

Les acides gras sont extraits dans un premier temps par le n-hexane (3 fois 3 ml) puis analysés en CPG. La phase méthanolique inférieure contient les sucres et les bases (BLC).

Les BLC sont extraites sélectivement par 4 volumes de diéthyl-éther après alcalinisation du milieu jusqu'à pH 11, par addition de soude 1N.

Les BLC contenues dans le diéthyl-éther sont évaporées à sec en vue de la dinitrophénylation.

ANALYSES DES BASES SOUS FORME DE DNP-DÉRIVES

- 1 - OBTENTION DES DNP-DÉRIVES DES BASES (KARLSSON, 1970, T 41; KARLSSON et coll., 1968, T42

Les BLC (5 mg) sont reprises par 1 ml de méthanol contenant 5 μ l de 1 fluoro-2,4-dinitrobenzène. Après addition goutte à goutte de 4 ml de tampon borate de K de pH 10,5, la dinitrophénylation se poursuit à 60°C pendant 30 minutes. Le déphasage est assuré par addition de CHCl_3 , CH_3OH et H_2O jusqu'à obtention de concentrations finales en CHCl_3 - CH_3OH - H_2O , 8-4-3 (v/v/v). Les BLC-DNP dérivés contenus dans la phase inférieure sont récupérés en vue d'une purification et d'une identification par chromatographie sur couche mince.

- 2 - PURIFICATION DES DNP-DÉRIVES DES BASES (KARLSSON, 1970, T41 ; KARLSSON et coll., 1968, T42

La dinitrophénylation procure des avantages certains comme la perte minimale des composants causée par dégradation, réarrangement et condensation des bases après le clivage de la liaison amide. Cependant, les DNP-Dérivés des bases doivent être purifiés par chromatographie sur acide silicique afin d'éliminer les impuretés et les excès de réactifs et de séparer les bases des bases 5-hydroxylées. Un essai de purification des bases témoins par chromatographie sur colonne d'acide silicique nous a permis de tester la méthode. Pour cela, les tubes à chromatographie sont remplis avec 2 g d'acide silicique équilibré dans le mélange solvant diéthyl éther-hexane 3/7 (v/v).

La séparation chromatographique est assurée par le passage successif des solvants suivants :

- diéthyl éther/hexane..... 3/7..... (v/v)..... 1 p
- diéthyl éther/hexane..... 3/3..... (v/v)..... 2 p
- diéthyl éther/hexane..... 3/1..... (v/v)..... 3 p

à raison d'un volume éluant de 20 ml/gramme d'acide silicique.

- la fraction 1 correspond aux impuretés (excès de réactifs, etc...) ;
- la fraction 2 contient les DNP-Dérivés des bases ;
- la fraction 3 contient les 5-hydroxy DNP-Dérivés des bases.

Mais les très faibles concentrations en bases présentées par notre matériel, ne nous ont pas permis d'appliquer cette méthode de purification par chromatographie sur acide silicique, ainsi testée pour des bases témoins. Nous avons donc utilisé la chromatographie en couche mince pour analyser et purifier les DNP-Dérivés.

3 - ANALYSE ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES DNP-DÉRIVÉS DES BASES (KARLSSON-MARTENSON, 1968, T43

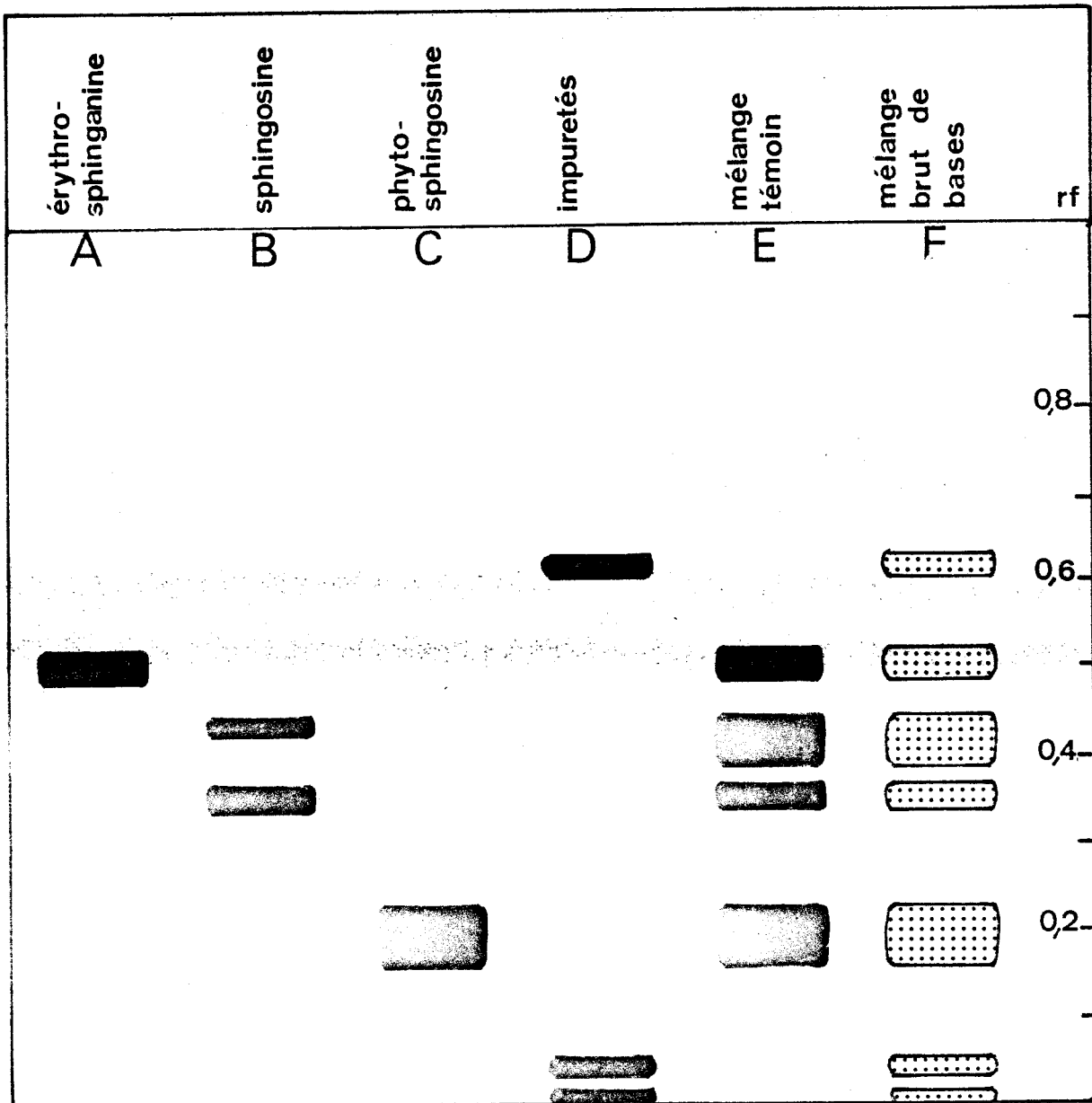
L'identification des DNP-Dérivés des bases peut se faire par chromatographie en couche mince.

Les DNP-Dérivés peuvent être séparés en di-hydroxy-dérivés saturés ou insaturés et en tri-hydroxy-dérivés, par chromatographie en couche mince sur gel de silice G contenant 2 % de borate de Na et activé 30 minutes à 120°C.

La migration est assurée par le mélange solvant chloroforme-n hexane-méthanol dans les proportions 50-50-20 (v/v/v), la dinitrophénylation colorant les BLC en jaune, aucune révélation n'est nécessaire. Les bases hydroxylées saturées migrent le plus loin, suivies par les bases di-hydroxylées insaturées, puis par les bases tri-hydroxylées (figure 20).

Après grattage des taches individuelles, les DNP-Dérivés des bases ainsi purifiées, sont élués quantitativement par le méthanol.

FIGURE 20 : SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE
DES DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS DES BASES À LONGUES
CHAINES.



Plaque de gel de silice G contenant 2 % de borate de Sodium activée 30 mn à 120°C
migration : 13 cm
solvant : chloroforme-n-hexane-méthanol (50/50/20, v/v/v)

- A : erythrosphinganine (d18 : 0)
- B : sphingosine (d18 : 1)
- C : phytosphingosine (t18 : 0)
- D : impuretés
- E : mélange de bases (d18 : 0,1 et t18 : 0)
- F : mélange non purifié de bases



ANALYSES DES BASES DINITROPHENYLEES SOUS FORME D'ALDEHYDES

1 - OXYDATION DES DNP-DERIVES EN ALDEHYDES PAR LE TETRA-ACETATE DE PLOMB (SUGITA et coll., 1976, T44)

Nous avons choisi d'oxyder les DNP-Dérivés des bases par le tétra-acétate de Pb et d'analyser les aldéhydes homologues formés.

Au cours de l'oxydation par le tétra-acétate de plomb, les bases tri-hydroxylées perdent trois atomes de carbone, tandis que les bases di-hydroxylées n'en perdent que deux. Ainsi :

- la phytosphingosine (t18 : 0) donne naissance à un penta-décanal saturé en C15 : 0 ;
- la sphinganine (d18 : 0), à un hexadécanal saturé en C16 : 0 ;
- et la sphingosine (d18 : 1) à un hexadécanal en C16 : 1.

De plus, une base di-hydroxylée (par exemple d18 : 0) et une base tri-hydroxylée possédant un atome de carbone supplémentaire (t19 : 0), conduisent après oxydation par le tétra-acétate de plomb, au même aldéhyde (dans ce cas à un hexadécanal C16 : 0).

- Mode opératoire : 2 mg de bases sous forme de DNP-Dérivés sont repris par 0,1 ml de benzène contenant 30 mg de tétra-acétate de plomb. L'oxydation se déroule à 50°C pendant 1 heure.

Après refroidissement, 5 ml d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel, ainsi que 5 ml de n-hexane. Après agitation et déphasage, les aldéhydes à longue chaîne, solubles dans le n-hexane sont recueillis et analysés par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse.

2 - ANALYSE DES ALDEHYDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE G. VAN DESSEL (1977, T45)

La séparation chromatographique sur couche mince des aldéhydes à longue chaîne dérivants des bases dinitrophénylées, est réalisée sur plaque de gel de silice G, dans le système solvant : n-hexane / diéthyléther / acide acétique dans les proportions : 90/10/1 (v/v/v).

Les aldéhydes libres, ainsi que les cétones et les plasmalogènes apparaissent en jaune après pulvérisation des plaques avec le réactif à la 2-4 dinitrophényl-hydrazine, et léger chauffage à 120°C.

La séparation des aldéhydes se fait en fonction de la longueur de chaîne et du degré de saturation (figure 21).

- Mode opératoire :

- . plaques de gel de silice G activées une heure à 120°C ;
- . solvant : n-hexane/diéthyléther/acide acétique, 90/10/1 (v/v/v) ;
- . réactif de révélation : solution de 2-4 dinitrophényl-hydrazine à 0,4 % dans HCl 2N ;
- . distance de migration : 13 cm.

3 - ANALYSE DES ALDEHYDES A LONGUE CHAINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les aldéhydes à longue chaîne peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse sans conversion préalable en un autre dérivé, en utilisant divers types de phase tels que par exemple :

- . SE 30 à 3 % sur chromosorb W-AW DMCS
- . DEGS à 15 % sur chromosorb W-H MDS 80-100 mesh
- . EGSSX à 5 % sur Gas chromosorb Q 80-100 mesh.

a) Conditions opératoires : L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée sur un appareil Varian muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne standard en inox, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10 % en poids sur un support inerte de chromosorb-W de granulométrie 60/80 mesh AW.

La température de la colonne est de 150°C, celle de l'injecteur de 170°C et celle du détecteur de 190°C.

Le débit du gaz vecteur (azote R) était de 19-20 ml/mn en tête de colonne.

b) Identification des aldéhydes à longue chaîne : L'identification des aldéhydes à longue chaîne, comme celle des acides gras est un problème difficile à résoudre.

- La comparaison des temps de rétention des pics inconnus avec ceux obtenus en utilisant des aldéhydes commerciaux est parfois impossible. En effet, les aldéhydes témoins ne sont pas tous commercialisés, et il faut les synthétiser à partir, par exemple, des acides gras homologues.

Nous avons utilisé comme témoins, les aldéhydes à longue chaîne provenant de l'oxydation par le tétra-acétate de plomb des bases à longue chaîne du commerce.

FIGURE 21

SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ALDEHYDES
DERIVANT DES BASES A LONGUES CHAINES

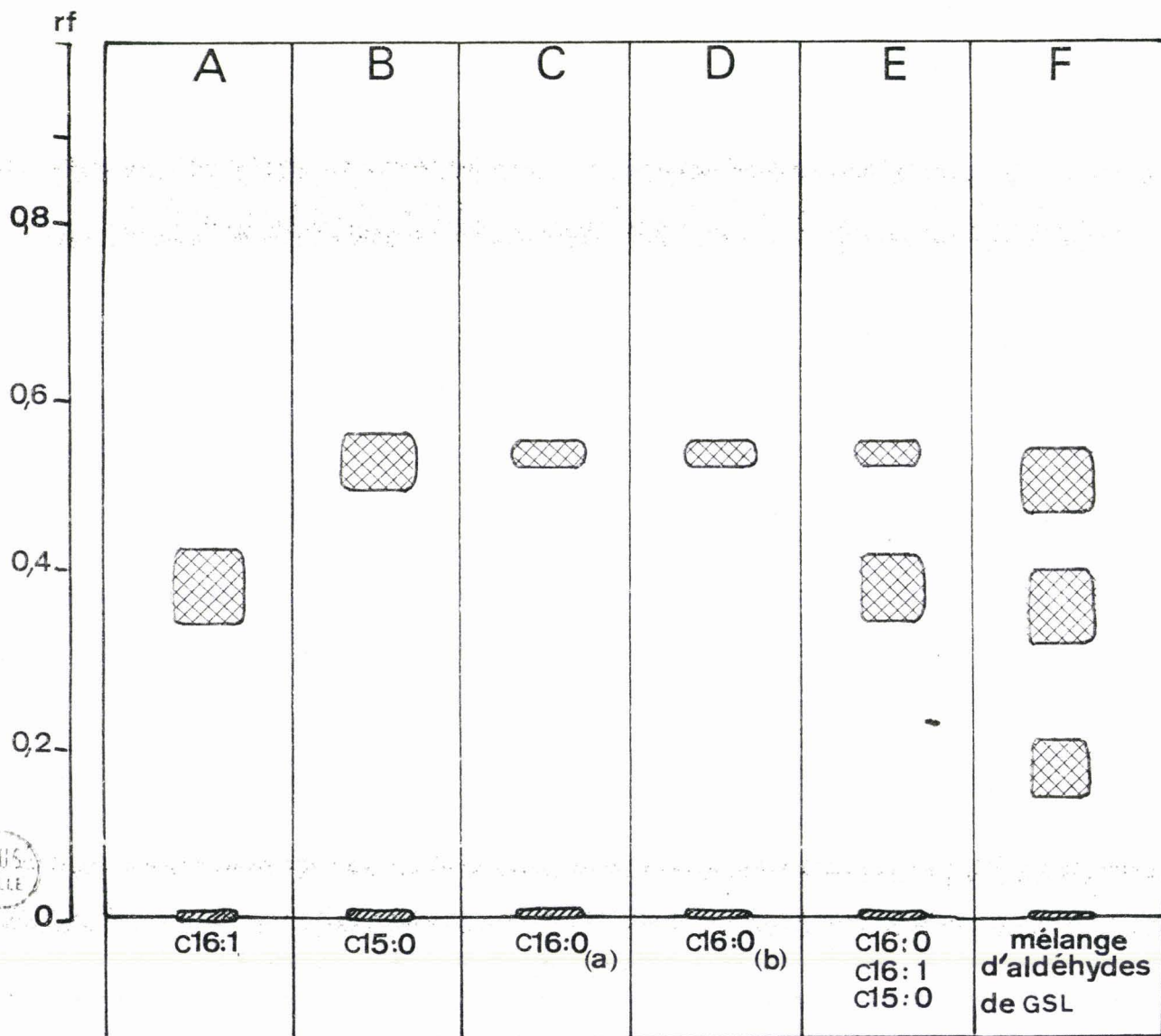
Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C.

solvant : n-hexane - diéthyléther - acide acétique (90 : 10 : 1, v/v/v)

migration : 13 cm

révélation : 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,4 % dans HCl 2N

- A : aldéhyde en C16 : 1 correspond à la sphingosine (d18 : 1)
 B : aldéhyde en C15 : 0 correspond à la phytosphingosine (t18 : 0)
 C : aldéhyde en C16 : 0(a) correspond à l'éthythrosphinganine (d18 : 0)
 C : aldéhyde en C16 : 0(b) correspond à la thréosphinganine (d18 : 0)
 E : mélange d'aldéhydes : C16 : 0,1 et C15 : 0
 F : mélange d'aldéhydes provenant des glycosphingolipides



- le pentadécanal C15 : 0 provient de la phytosphingosine t18 : 0 ;
 - le pentadécanal C15 : 1 provient de la déhydrophytosphingosine t18 : 1 ;
 - l'héxadécanal C16 : 0 provient de la sphinganine d18 : 0 ;
 - l'héxadécanal C16 : 1 provient de la sphingosine d18 : 1.
- Il existe également, pour les aldéhydes à longue chaîne, une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention, et le nombre d'atomes de carbone contenus dans la molécule. Cette relation est analogue à celle qui existe pour les acides gras homologues (fiche 12). Cependant, la longueur de chaîne équivalente à une double liaison est difficile à définir. De plus, contrairement au comportement des acides gras sur le même support, les composés en C15 (saturés ou non) ne précèdent pas les composés en C16 (saturés ou non). Le pentadécanal est caractérisé par un temps de rétention intermédiaire entre celui de héxadécanal et celui de l'héptadécanal comme l'illustre la figure 22 représentant un chromatogramme témoin. Cette difficulté rend nécessaire la confirmation de ces identifications par l'emploi d'une autre technique.

c) Evaluation du pourcentage de chaque aldéhyde : Cette évaluation peut être effectuée comme pour les acides gras :

- soit par triangulation ;
- soit par le produit de la largeur du pic à mi-hauteur, par la hauteur du pic ;
- soit finalement par le produit du temps de rétention absolu par la hauteur du pic ;

C'est cette troisième méthode que nous avons appliquée.

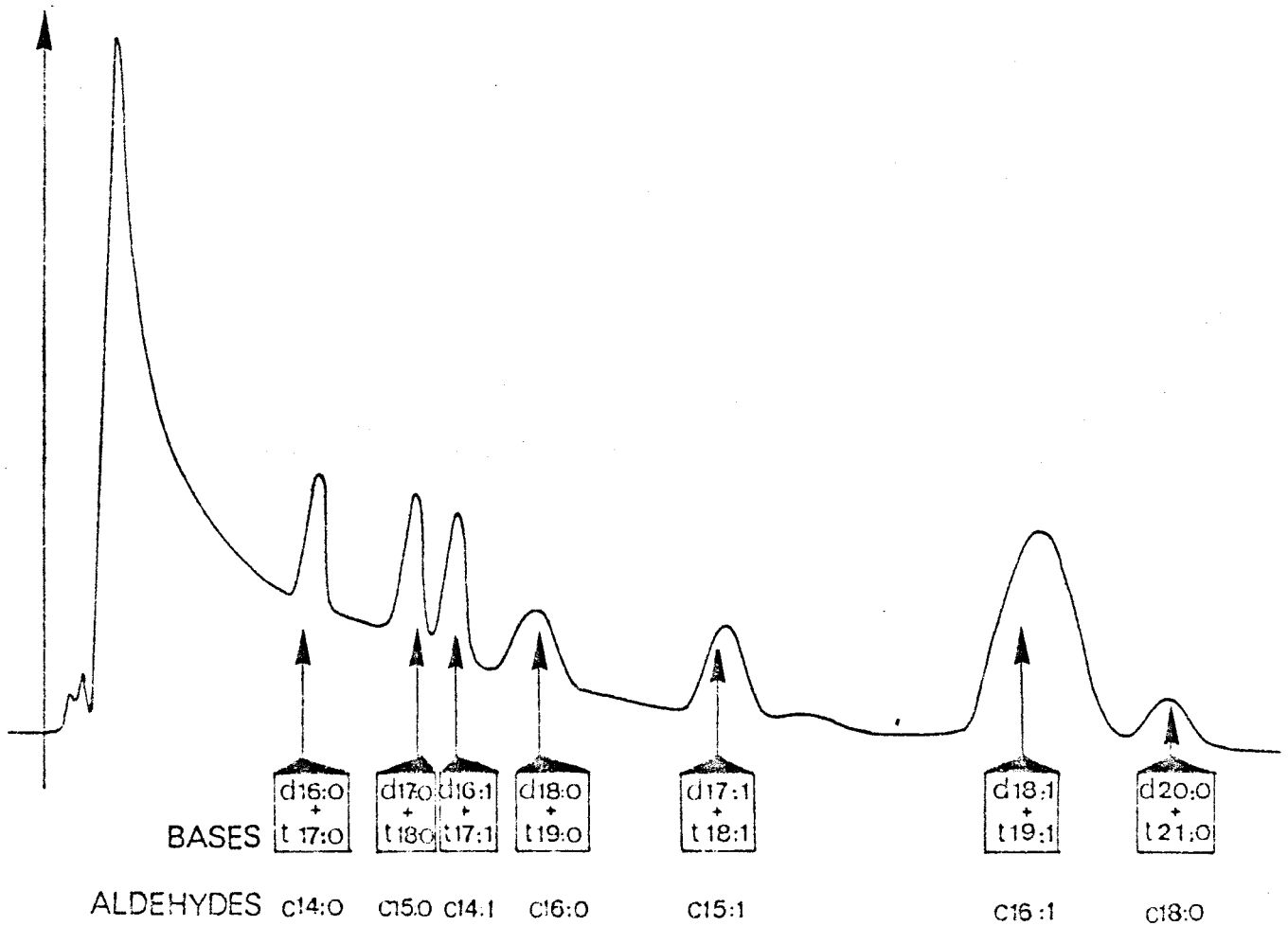
d) Conclusions : L'identification des bases sous forme d'aldéhydes présente un grand désavantage dû à l'instabilité particulière des aldéhydes.

En effet, les aldéhydes et plus particulièrement les aldéhydes à chaîne courte, se condensent et se polymérisent en dimères et trimères qui sont relativement non volatils. Cette polymérisation est accélérée en milieu alcalin.

La transformation des bases à longue chaîne en aldéhydes homologues et l'analyse des aldéhydes par chromatographie en phase gazeuse doivent être réalisées très rapidement afin d'éviter cette polymérisation.

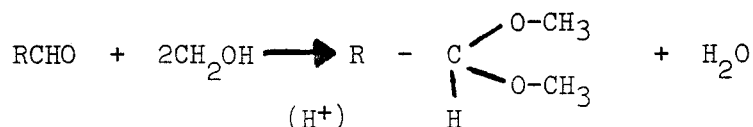
Le deuxième problème concerne l'identification des aldéhydes dont la chaîne carbonée est désaturée. Cette identification ne peut être réalisée que par

FIGURE 22 : IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
DES ALDÉHYDES DÉRIVÉS DES BASES À LONGUES CHAINES :
DIAGRAMME TÉMOIN.



l'emploi simultané de plusieurs techniques. Les aldéhydes vont donc être transformés en produits volatiles stables :

- soit sous forme de diméthyl-acétal



- soit sous forme d'alcool
- soit sous forme d'acides gras

identifiables par chromatographie en phase gazeuse.

Pour des raisons techniques (identité de colonne) nous avons opté pour la transformation des aldéhydes à longue chaîne en acides gras homologues.

ANALYSE DES BASES SOUS FORME D'ACIDES GRAS

Le passage des aldéhydes provenant des bases à longue chaîne constitutives des GSL, en acides gras homologues se fait par oxydation au permanganate de potassium.

Cette oxydation peut avoir lieu :

- soit directement sur le mélange d'aldéhydes ;
- soit après hydrogénation catalytique.

Nous avons oxydé directement les aldéhydes à longue chaîne afin de confirmer la nature des bases constitutives des GSL.

Au cours de cette oxydation, les aldéhydes désaturés sont en général partiellement détruits. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet seulement de confirmer l'identité des aldéhydes mais elle ne permet pas la vérification du dosage.

1 - OXYDATION DES ALDEHYDES EN ACIDES GRAS (SLOMIANY-HOROWITZ, 1970, T46

a) Réactifs :

- solution saturée de KMNO_4 ;
- solution saturée de NaHSO_3 ;
- soude 0,2 N ;
- H_2SO_4 RP.



b) Mode opératoire : Les aldéhydes sont séchés sous un courant d'azote à 30°C. Ils sont ensuite remis en suspension dans 0,3 ml de NaOH 0,2 N.

Après addition de la solution de KMnO_4 jusqu'à persistance de la coloration (environ 0,3 ml) et agitation vigoureuse pendant 5 minutes, le milieu réactionnel est acidifié par addition de 0,1 ml d' H_2SO_4 RP.

La solution est ensuite décolorée par addition progressive de NaHSO_3 (environ 0,3 - 0,4 ml).

Après filtration si nécessaire, sur filtre Whatman n°1, les acides gras sont extraits par le diéthyl-éther (3 x 1,5 à 2 ml).

Les acides gras contenus dans le diéthyl-éther sont évaporés à sec et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

2 - ANALYSE DES ACIDES GRAS

Cette étape nécessite préalablement :

- une étape de transestérification (fiche n° 18) ;
- une étape de purification des esters méthyliques d'acides gras (fiche n° 18) par chromatographie sur couche mince ;
- une injection sur colonne de DEGS à 10 % en poids sur support de chromosorb (fiche n° 18).

Les résultats de cette étape confirment les résultats obtenus avec les aldéhydes.

FICHE 30 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN OSES DES GLYCOLIPIDES

L'analyse de la copule glucidique des glycosphingolipides a été en partie réalisée dans le laboratoire de Monsieur FOURNET que nous remercions vivement.

Cette analyse nécessite trois étapes :

- méthanolyse ;
- trifluoroacétylation ou triméthylsilylation des oses ;
- étude par chromatographie en phase gazeuse.

I - PREPARATION DU METHANOL ANHYDRE

Un litre de méthanol et 150 grammes de K_2CO_3 sont chauffés à reflux pendant 2 heures, puis filtrés. Après addition de 50 grammes de K_2CO_3 au filtrat et distillation à $65^\circ C$, le méthanol est recueilli sur Na_2SO_4 anhydre en ayant soin d'éliminer les 20 ml de la fraction de tête et les 100 derniers.

Le méthanol est conservé à la température de $+4^\circ C$ dans un flacon hermétique et filtré juste avant l'emploi.



2 - HYDROLYSE DES GSL

Après hydrolyse des GSL et extraction des acides gras, la phase inférieure méthanolique est neutralisée par addition d'acétate d'argent (100 mg) et les oses extraits par le méthanol.

3 - METHANOLYSE

Les oses libres provenant de l'hydrolyse des GSL purifiés, et certains glycolipides natifs purifiés vont être soumis à une étape de méthanolyse.

250 μg de carbohydrate et 50 μg de méso-inositol jouant le rôle de témoin interne, sont introduits dans un tube en pyrex (Sovirel 92 Levallois Perret France) puis sont lyophilisés et desséchés toute une nuit dans un dessiccateur sur P_2O_3 .

Le résidu est repris par 2 ml d'HCl 0,5 M en solution dans du méthanol anhydre.

Les tubes sont scellés et laissés 24 heures à 80°C.

Le méthanolysat est ensuite refroidi et séché sous courant azote à 50°C.

Puis le résidu obtenu après évaporation à sec de cette solution est à nouveau dissous dans 10 à 20 millilitres de méthanol anhydre, la solution obtenue de nouveau évaporée à sec et ainsi de suite jusqu'à élimination totale de l'acide chlorhydrique.

4 - TRIFLUOROACÉTYLATION

L'échantillon sec est repris par 200 µl de dichlorométhane et 200 µl d'anhydride trifluoroacétique.

La trifluoroacétylation se déroule à 150°C pendant 5 minutes sur bac à sable. Après refroidissement, les tubes sont replacés 5 minutes dans le bac à sable. Après un nouveau refroidissement, le mélange est prêt à être analysé par chromatographie en phase gazeuse.

5 - PREPARATION DES DERIVES TRIMETHYLSILYLES

Ce procédé est général et serait applicable à tout dérivé possédant un groupement - OH, = NH, - NH₂, - COOH, - SH.

Les hydrocarbures poly-O - triméthyl-silylés sont faciles à préparer et des rendements quantitatifs sont usuellement obtenus à température du laboratoire en quelques minutes.

Le réactif utilisé pour cette triméthyl-silylation des oses est un mélange d'hexaméthylidisilazane (HMDS) et de triméthylchlorosilane (TMCS) dans la pyridine anhydre. Ce réactif peut être ajouté à un résidu sec d'oses et d'inositol ou à ces dérivés en solution dans la pyridine, l'acétonitrile ou le diméthylformamide. Dans ces conditions tous les groupements hydroxyl libres sont transformés en ester triméthylsilyl.

Le résidu, après méthanolyse, est repris par 30 ml de méthanol anhydre, puis purifié par lavage à l'éther de pétrole 30°-60°. Après agitation énergique puis décantation, la phase inférieure méthanolique est récupérée et évaporée à sec. Le résidu, est additionné de 1 ml de Tri-Sil (mélange HMDS -

TMCS dans la pyridine préparé par Varian Aérograph) et abandonné 15 minutes dans un flacon bien bouché à température du laboratoire.

Après centrifugation, le surnageant est analysé directement par chromatographie en phase gazeuse.

6 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES DERIVES TRIFLUOROACETYLES

Les dérivés trifluoroacétylés des O-méthylglycosides sont chromatographiés sur une colonne en verre (0,3 x 300 cm) remplie avec l'OV 210 à 5 % (p/p) sur Varaprot 30.

L'appareil utilisé est un Varian Aérograph modèle 2100 muni d'un détecteur à ionisation de flamme.

La programmation de la température se fait de 110° à 210° à raison de 1 degré par minute. Le débit de l'azote vecteur R est de 7,5 ml/mn.

La figure 23 présente les diagrammes témoins des oses.

Les concentrations en oses sont calculées par rapport au méso-inositol qui sert de témoin interne.

7 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES TRIMETHYLSILYL METHYLGLYCOSIDES ET DE L'HEXA O-TRIMETHYLSILYLINOSITOL

Pour ces dérivés, SWEELEY et coll., 1967 (T47) recommande une colonne dont la phase stationnaire non polaire est du type SE 30.

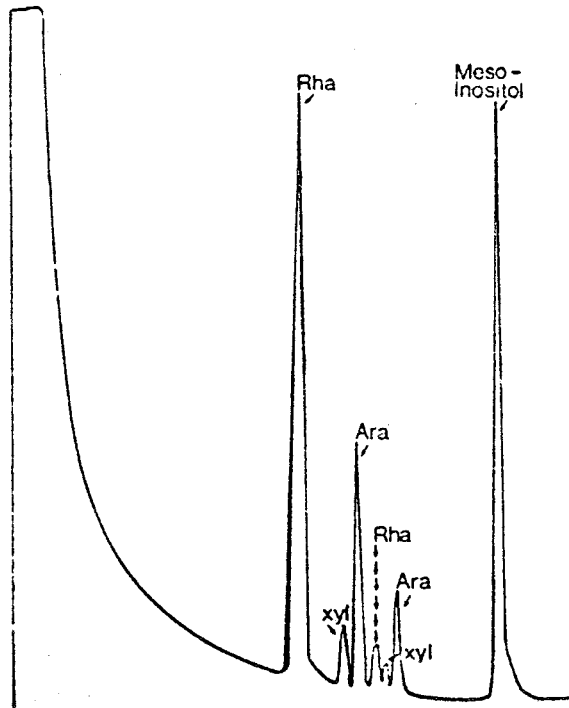
Nous avons choisi une colonne dont la phase stationnaire non polaire est constituée d'OV 17 (3 %) maintenue sur un support inerte de Chromosorb W 60-80 mesh. Sa longueur est de 10 pieds et son diamètre d'1/8ème d'inch. La température de l'injecteur est de 198°C, celle du détecteur de 225°C et la température de la colonne programmée à raison de 2°C par minute entre 115°C et 215°C. Le débit de l'azote employé comme gaz vecteur est de 25 ml par minute.

Dans ces conditions, l'analyse d'un mélange d'oses témoins (arabinose, fucose, mannose, galactose, glucose, acide glycuronique, 5 mg de chaque) et d'inositol (5 mg) traités pendant 18 heures par 2 ml de solution méthanolique d'HCl 0,75 N puis triméthylsilylés selon les techniques décrites plus haut donne les résultats illustrés par le diagramme de la figure 23.

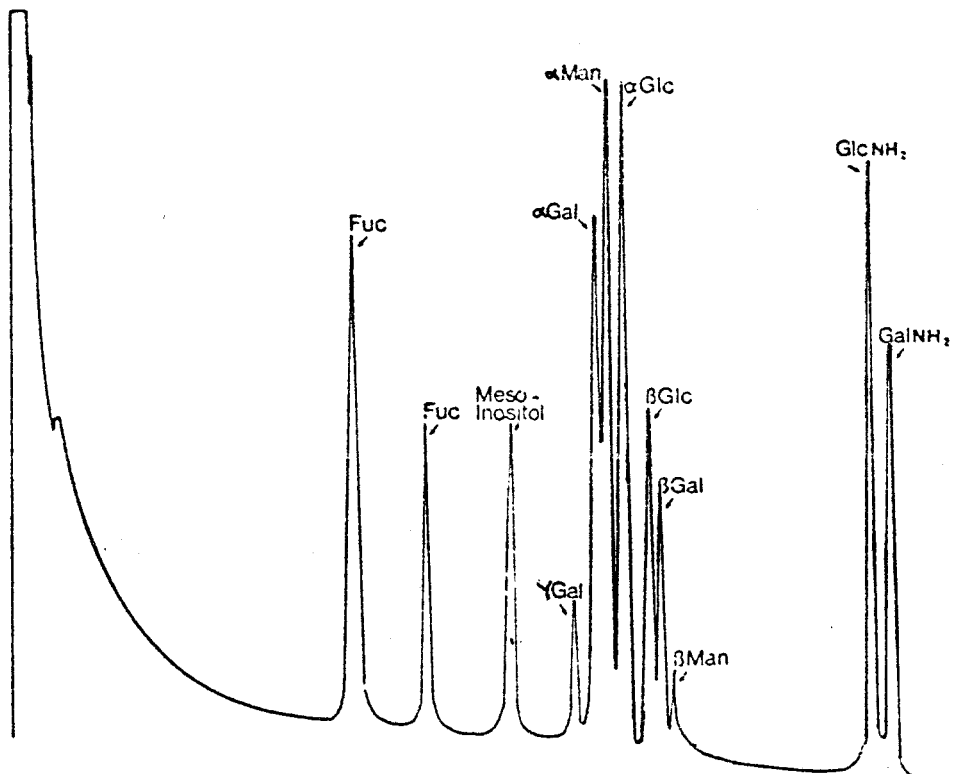
FIGURE 23

IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES OSES

A - Chromatogramme témoin des pentoses



B - Chromatogramme témoin des méthyl-pentoses, hexoses et hexosamines



8 - ANALYSE DE L'INOSITOL DU PHOSPHATIDYLINOSITOL
(ROBERTS, 1967, T48)

La technique employée est celle préconisée par ROBERTS (T48). La solution contenant le phosphatidylinositol est très soigneusement évaporée à sec (toute trace de solvant organique diminuerait en effet le taux d'hydrolyse). Le résidu sec est chauffé en présence de 2 ml d'HCl 6N pendant 48 heures à 120°C dans des tubes scellés.

Après évaporation à sec et addition 2 ml d'eau distillée et évaporation à nouveau à sec sous vide, les échantillons sont placés pendant 12 heures dans un dessiccateur sous vide en présence de potasse.

L'inositol libre additionné de 0,5 ml de Tri-Sil est laissé durant 2 heures à température du laboratoire ou 15 minutes dans la pyridine à ébullition.

Après centrifugation le surnageant est directement analysé par chromatographie en phase gazeuse sur colonne d'OV 17 dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe précédent à l'exception de la température de la colonne qui reste fixe : soit 220°C durant toute l'analyse.

FICHE 31 : DOSAGE COLORIMETRIQUE DU GLYCEROL.

*WELLS M.A. et DITTMER J.C.
Biochemistry, 1965, 4, 2459 (T 49)*

PRINCIPE

La méthode est basée sur la détermination du formaldéhyde produit par oxydation périodique du glycérol. Le formaldéhyde réagit avec l'acide chromotropique en solution dans l'acide sulfurique concentré, pour donner un composé coloré en violet que l'on dosera par colorimétrie (WELLS et coll., 1965, T 49).

Afin d'obtenir des résultats quantitatifs, le glycérol engagé dans les molécules lipidiques doit être libéré totalement et l'oxydation périodique ne doit provoquer que l'oxydation du glycérol seul.

Le glycérol est volatil et les hydrolysats ne peuvent, pour cette raison, être évaporés à sec ou même subir de réduction de volume par évaporation.

Il convient donc de réaliser l'hydrolyse en tubes scellés puis l'oxydation périodique directement dans le tube qui a servi à l'hydrolyse en présence de l'HCl lui-même.

Dans ces conditions moins de 1 % de formaldéhyde formé provient de sources diverses (oses, éthanolamine, sérine) et l'erreur est négligeable pour les dosages de glycérol de la majorité des lipides.

REACTIFS

- 1 - solution standard de glycérol à 0,25 mM par litre
- . solution stock 25 mM/l : 1,590 g de glycérol à 95 % dans 500 ml d'eau distillée

Diluer la solution au 1/100 extemporanément. La solution standard est telle que 1 ml correspond à 0,25 μ mole de glycérol.

- 2 - solution HCl 4N
- 3 - solution HCl 2N
- 4 - solution de périodate de sodium 0,1M
 Na IO_4 1,05 g
 eau distillée.....qsp 50 millilitres

Cette solution sera stockée au réfrigérateur dans une bouteille en verre brun.

- 5 - solution de bisulfite de sodium à 10 %
- 6 - réactif à l'acide chromotropique
 sel disodique de l'acide chromotropique.... 0,50 g
 eau distillée..... 50 ml
 H_2SO_4 12,5 N..... 200 ml

La solution est à préparer extemporanément.

- 7 - solution aqueuse de thiouré à 10 %

MODE OPERATOIRE

LIBERATION DU GLYCEROL PAR HYDROLYSE

L'échantillon à doser est évaporé à sec par un léger courant d'azote, puis repris par 2 ml d'acide chlorhydrique 2N. Simultanément préparer un blanc réactif et la gamme d'étalonnage à partir des solutions standards de glycérol. Introduire dans le tube correspondant au blanc réactif 2 ml d'HCl 2N et dans les tubes correspondant à la gamme étalon, 1 ml de solution standard et 1 ml d'HCl 4N. L'hydrolyse se déroule en tubes scellés, pendant 96 heures à l'étuve à 100°C.

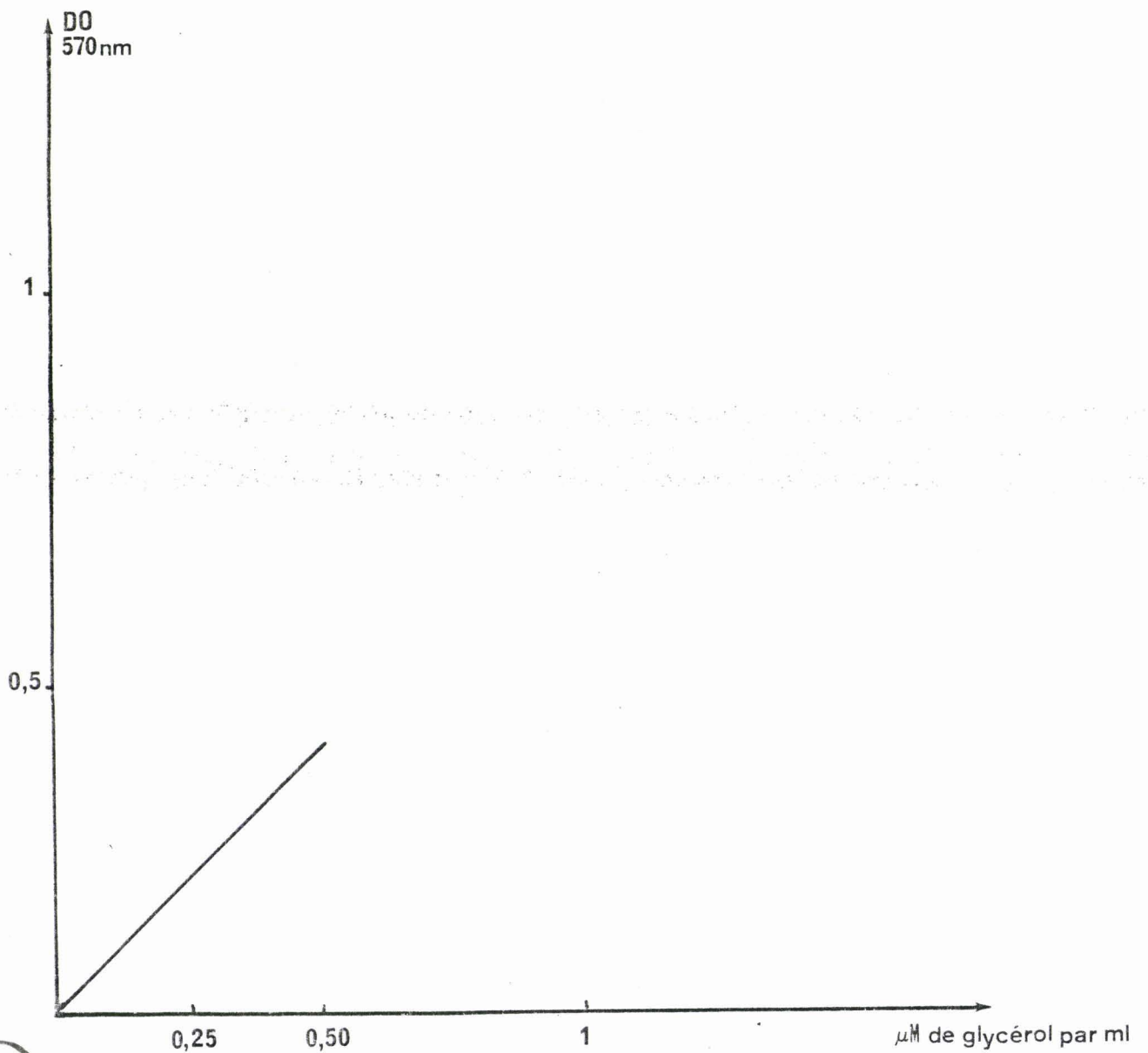
OXYDATION PERIODIQUE

Après refroidissement des tubes, 0,5 ml de périodate de sodium en solution sont ajoutés au temps t . Après exactement 5 minutes l'addition de 0,5 ml de solution de bisulfite de sodium permet de stopper la réaction d'oxydation.

DOSAGE DU FORMALDEHYDE

Prélever 1 ml de chacun des tubes. Après addition de 5 ml d'acide chromotropique, le mélange est placé au bain-marie bouillant pendant 30 minutes, puis refroidi. Le développement de la coloration est obtenu par addition de 1 ml de thiourée en solution ; les variations de DO sont enregistrées à 570 nm. Les quantités de glycérol de l'échantillon sont déterminées par référence à une courbe tracée à partir de la gamme étalon (figure 24).

FIGURE 24 : COURBE ÉTALON DE RÉFÉRENCE POUR LE DOSAGE DU GLYCÉROL.



*FICHE 32 : IDENTIFICATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES
GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE
A LA SPECTROMETRIE DE MASSE*

*BIEMANN K. in "Mass Spectrometry" Mc Graw-Hill ed., 1962 (T50)
MURATA T., J. of Lip. Res., 1978, 19, 166-171 (T51).*

La technique de CPG couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier les esters méthyliques d'acides gras avec certitude même lorsqu'ils se trouvent à l'état de traces ou s'ils présentent une structure particulière.

PRINCIPE

Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés classiquement par CPG sur une colonne capillaire de Carbowax 20 M (25 m x 0,25 mm) ; à la sortie de colonne, les esters méthyliques sont ionisés par impact d'électrons ; la séparation des ions moléculaires est effectuée par un filtre quadrupole ; la détection est réalisée par un détecteur électrique ; la vitesse de lecture est très rapide, le spectre de masse pouvant être balayé en quelques milli-secondes (appareillage Riber Mag 10-10 associé au système informatique Sydar 121).

ANALYSE D'UN COMPOSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Cinq étapes sont nécessaires pour obtenir le spectre de masse d'un composé (DHALLUIN, 1978, T52) :

- l'introduction
- l'ionisation
- la discrimination des ions formés
- la détection des ions
- le traitement des résultats de l'analyse.

a) INTRODUCTION DE L'ECHANTILLON

Les échantillons introduits doivent être volatils c'est à dire avoir une pression de vapeur au moins égale à 10^{-2} mm de mercure à une température de 150 à 200°C, température à laquelle est portée la chambre de réception

de l'échantillon. Cette condition impose l'analyse des acides gras sous forme d'esters méthyliques.

L'introduction est effectuée de façon indirecte : les acides gras en mélange sont séparés après leur passage sur la colonne de chromatographie (colonne capillaire (25 m x 0,25 mm), Carbowax 20 M, température : 130-215°C à 2°/mn, température injecteur : 230°, gaz vecteur : Helium. L'utilisation du couplage nécessite des dispositifs pour compenser en particulier la différence de pression entre les 2 appareils (1 atm. pour la CPG et 10⁻⁹ atm. pour la spectrométrie de masse).

b) IONISATION DE L'ECHANTILLON

Le spectromètre de masse utilisé Riber-Mag 10-10 permet l'ionisation par impact d'électrons : les molécules qui diffusent se heurtent à un faisceau perpendiculaire d'électrons émis par une électrode chauffée (fil de rhénium très fin) et attirés par une cathode placée face à l'électrode émettrice. L'énergie des électrons peut être ajustée entre 10 et 100 V, zone d'énergie qui permet le contrôle des processus d'ionisation et de fragmentation. La plupart des molécules organiques a un potentiel d'ionisation voisin de 10 eV (electron-volts) : un accroissement d'énergie de 5 à 10 eV provoque la fragmentation de la molécule.

La production d'ions par impact électronique peut se simplifier ainsi :



La réaction d'ionisation (1) se produit quand l'énergie des électrons atteint le potentiel d'ionisation de la molécule ; (2) et (3) sont 2 possibilités de fragmentation qui sont provoquées quand l'énergie des électrons est élevée, (2) est une simple cassure de la molécule, (3) implique un réarrangement des fragments de la molécule après cassure.

Il a été démontré que le pourcentage d'ions positifs est environ 1000 fois supérieur à celui des ions négatifs : on ne considère dans les spectres analysés que les ions positifs ; l'ionisation d'une molécule se produit très rapidement (10⁻¹⁵ secondes environ).

c) DISCRIMINATION DES IONS

L'appareillage utilisé est équipé d'un filtre quadrupole : c'est la combinaison d'un champ électrique continu et d'un champ électrique alternatif de haute fréquence qui effectue la séparation des ions. Ces champs sont appliqués à 4 barreaux métalliques dont l'arrangement spatial est illustré (figure 25) ; les barreaux sont connectés 2 à 2, diagonalement par rapport à l'axe longitudinal du quadrupole, à des générateurs à potentiel variable et à haute fréquence (megahertz). Cette disposition permet de focaliser les ions dans la région centrale du quadrupole en appliquant aux 2 paires de barreaux des courants alternatifs en opposition de phase : les ions n'atteignent le détecteur que pour un rapport tension alternative/tension continue donné. Le spectre demasse complet s'obtient par augmentation progressive du potentiel tout en gardant le rapport tension alternative/tension continue constant.

d) DETECTION DES IONS

Elle peut être électrique ou photographique.

- 1) détection électrique : Les ions positifs qui arrivent au collecteur sont neutralisés par des électrons captés de la terre après passage dans une forte résistance. La différence de tension consécutive au niveau de la résistance représente l'intensité du courant ionique qui est par la suite amplifiée.
- 2) détection photographique : Elle est utilisée pour des analyses précises de la masse des fragments : c'est une plaque photographique de format 5 x 25cm qui peut contenir 15 à 30 spectres de masse ; les spectres apparaissent sur la plaque sous forme de traits verticaux bien définis, chaque trait correspondant à un ion.

e) TRAITEMENT DES RESULTATS DE L'ANALYSE

L'arrivée des ordinateurs constitue une étape fondamentale de modernisation des spectromètres de masse qui peuvent être utilisés au maximum de leurs possibilités ; l'informatique aide l'opérateur à calibrer le spectromètre de masse avec des composés de référence.

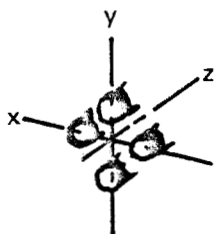
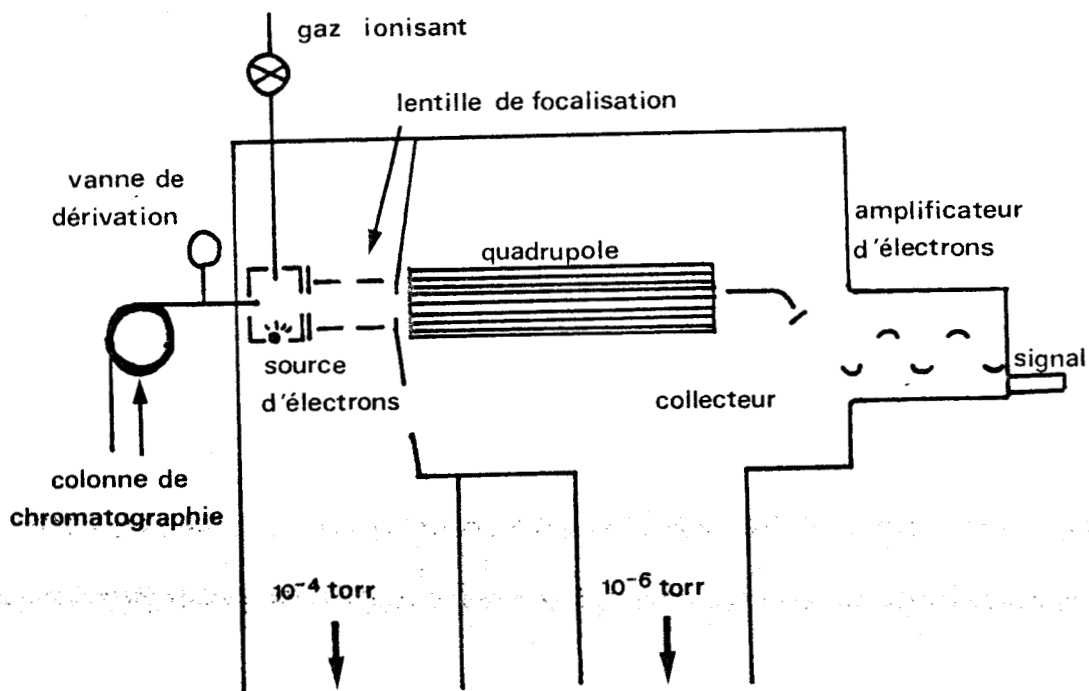
L'appareil calibré, l'échantillon est introduit ; l'acquisition des résultats commence dès que le balayage du collecteur d'ions par le détecteur est déclenché ; les résultats sont stockés en continu sur disques ou bandes magnétiques. Lorsque l'analyse de l'échantillon est terminée, l'opérateur peut faire ressortir les données acquises selon le programme qu'il a établi au départ.

ANALYSE DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS

Les ions moléculaires MH^+ des esters méthyliques d'acides gras ont des intensités fortes ; on peut donc déterminer aisément les poids moléculaires à partir des ions MH^+ même lorsque la taille de l'échantillon est faible ou lorsqu'ils présentent un degré d'insaturation élevé (MURATA, 1978, T 41).

Les diagrammes suivants présentent les spectres de masse obtenus pour les esters méthyliques d'acide stéarique, oléique, linoléique et linoléinique (figures 26 et 27).

FIGURE 25 : SCHÉMA D'UN SPECTROMÈTRE DE MASSE
QUADRUPOLE.



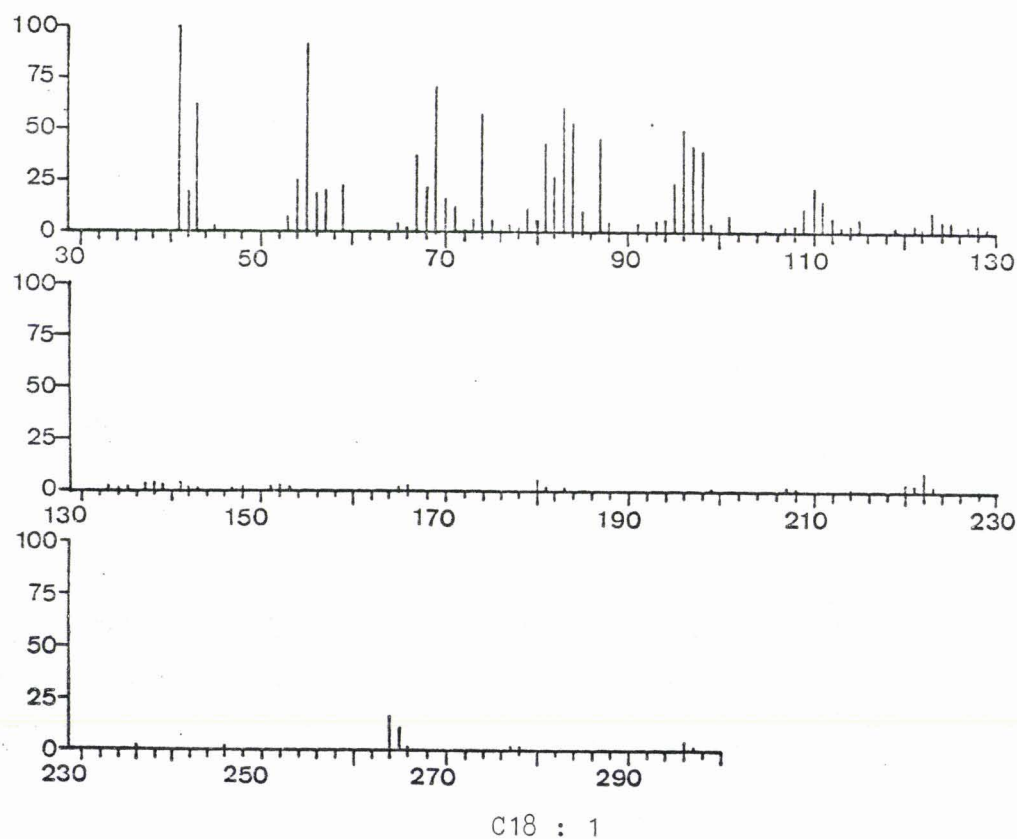
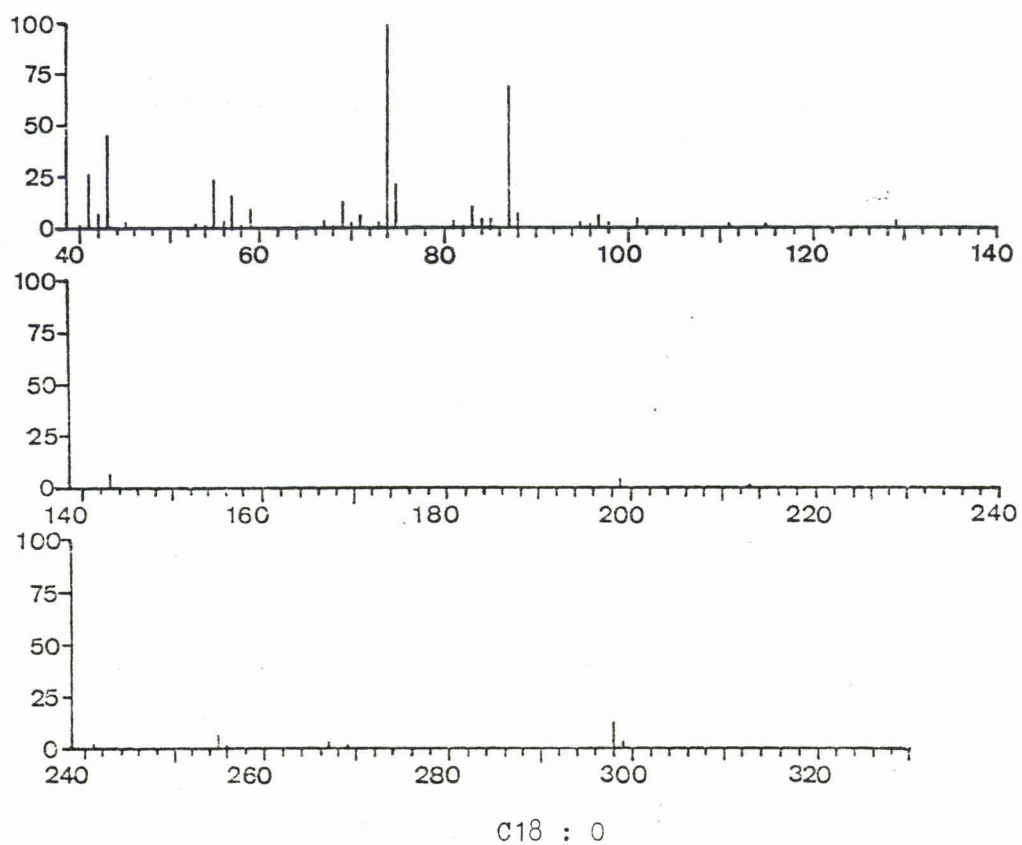
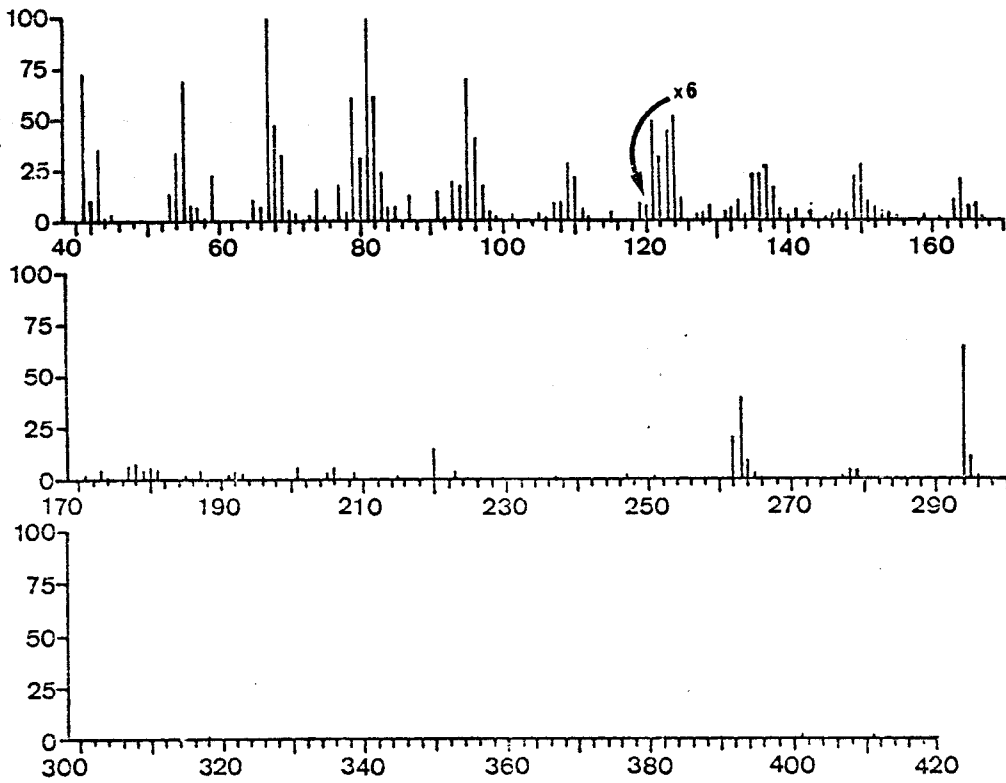
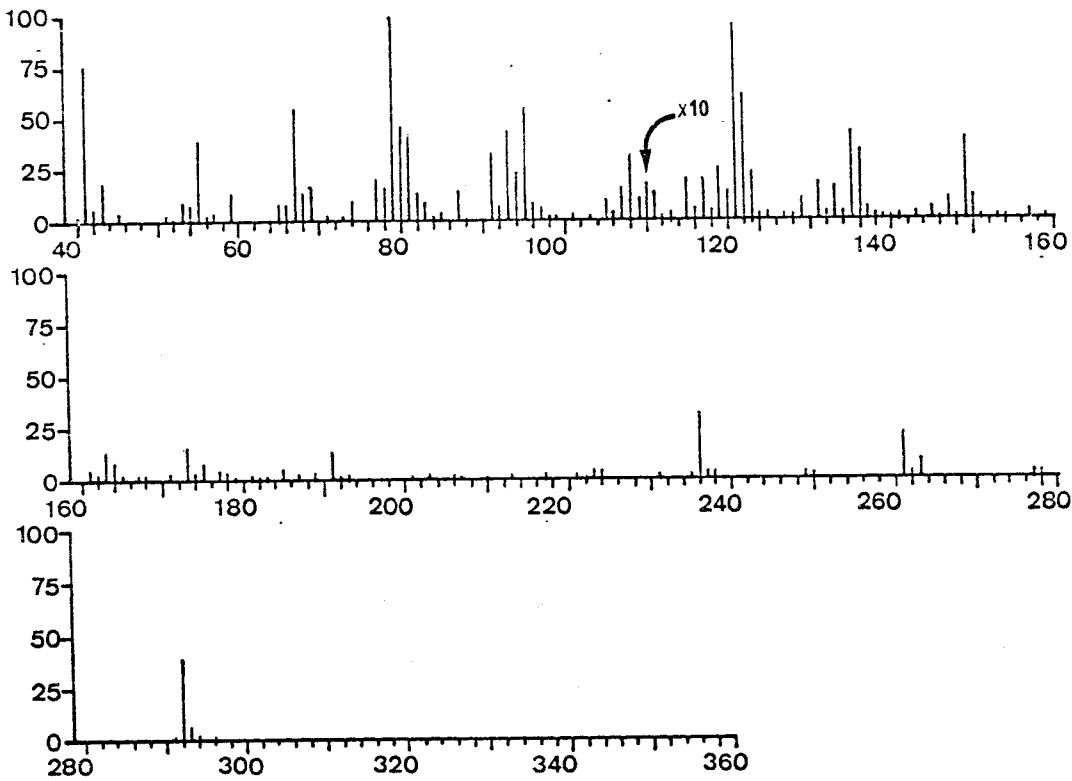


FIGURE 26 : SPECTRE DE MASSE PAR IMPACT D'ÉLECTRONS DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES STÉARIQUE ET OLÉIQUE.

T113



C18 : 3



C18 : 2

200
210
RHS
LILL

FIGURE 27 : SPECTRE DE MASSE PAR IMPACT D'ÉLECTRONS DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES LINOLÉIQUE ET LINOLENIQUE.

- BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE -

- BIEMANN K., 1962. - Mass spectrometry : organic chemical applications
Mc Graw-Hill Book Co, ed..... T50
- CARON B., 1972. - Phospholipides et glycolipides du pollen et du
style chez *Oenothera missouriensis* Sims, espèce autoincompati-
ble. Thèse Pharmacie, Lille..... T20
- CARTER H.E., D.R. STROBACH et J.N. HAWTHORNE, 1969. - Biochemistry
of sphingolipids. XVIII. Complete structure of tetrasaccharide
phytoglycolipids. *Biochem.* 8 : 383..... T30
- CHEN P.S., T.Y. TORIBARA et H. WARNER, 1956. - Microdetermination
of phosphorus. *Anal. Chem.* 28 : 1756..... T21
- DAVIS B.J., 1964. - Disc electrophoresis II Method and application
to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 : 404..... T9
- DELSAL J.L. et H. MANHOURI, 1955. - Etude comparative des dosages
colorimétrique du phosphore. Recherche d'une méthode de haute
sensibilité applicable au dosage de phosphore organique dans les
spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 : 1047... T24
- DEMAILLE J., M. DAUTREVAUX, R. HAVAZ et G. BISERTE, 1965. - Isolement,
propriétés physicochimiques et composition de l' α_2 macroglobuline
de porc. *Bull. Soc. Chim. France* 12 : 3506..... T14
- DHALLUIN J.M., 1978. - Application de la spectrométrie de masse à
l'étude de molécules glucidiques. Thèse 3ème Cycle, Lille..... T52
- FATHIPOUR A., K.K. SCHLENDER et M.H. SELL, 1967. - The occurrence of
fatty methylesters in the pollen of *Zea mays*. *Bioch. Biophys.*
Acta 144 : 476..... T18
- FINDLAY J., C.A. LEVY et C.A. MARSH, 1958. - Inhibition of glycosida-
se by aldonolactones of corresponding configuration. *Biochem.*
J. 69 : 467..... T15

- FOLCH J., A.M. LEES, J.A. MEATH et F.N. LE BARON, 1951. - Preparation of lipid extracts from brain tissues. *J. Biol. Chem.*, 191 : 833..... T31
- FOLCH J., A.M. LEES, G.H. SLOANE STANLEY, 1957. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 228 : 497..... T17
- FREYSZ L., P. BIETHR et P. MANDEL, 1971. - Cinétique de la biosynthèse des phosphatides du cerveau de poulet durant les périodes embryonnaires et postnatales. *Biochimie* 53 : 399..... T26
- GAVER R.G. et C.C. SWEELEY, 1965. - Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long chain bases by gas liquid chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 42 : 294..... T38
- HANNIG K., 1964. - Eine Neuentwicklung der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese. *Z. Physiol. Chem.* 338 : 211..... T11
- HIRSH J. et H.E. AHRENS, 1958. - The separation of complex lipid mixture by use of silicic acid chromatography. *J. Biol. Chem.* 233 : 311..... T19
- HJERTEN S., 1964. - The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. *Biochim. Biophys. Acta* 79 : 393..... T10
- KARAN K. et R.L. LESTER, 1975. - Characterization of inositol containing phosphosphingolipids from *Tobacco* leaves. *Plant. Physiol.* 55 : 120..... T36
- KARLSSON K.A. et E. MARTENSSON, 1968. - Studies on sphingosines. XIV. On the phytosphingosine content of their major human kidney glycolipids. *Biochem. Biophys. Acta* 152 : 230..... T43
- KARLSSON K.A. et G.O. STEEN, 1968. - Studies on sphingosines. The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. *Biochem. Biophys. Acta* 152 : 798..... T42
- KARLSSON K.A., 1970. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long chain bases. *Chem. Phys. Lipids* 5 : 6..... T41
- KARLSSON K.A. et J. PASCHER, 1971. - Thin layer chromatography of ceramides. *J. Lip. Res.* 12 : 466..... T30
- KARLSSON K.A., B.O.E. SAMUELSSON et G.O. STEEN, 1973. - Detailed structure of sphingomyelins and ceramids from different regions of bovine kidney with special reference to long chaine base. *Biochem. Biophys. Acta* 316 : 336..... T32
- KARLSSON K.A., B.O.E. SAMUELSSON et G.O. STEEN, 1973. - Sphingolipids composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. *Biochem. Biophys. Acta* 316 : 317..... T29

- KOHN J., 1957. - A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. Chim. Acta* 2 : 297..... T6
- KRAMM D. et C.L. KOLB, 1955. - Schiff reagent ; its preparation and its use in the determination of formaldehyde in cellulose acetate formol. *Anal. Chem.* 27 : 1076..... T7
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265..... T16
- MANGOLD H.K., 1961. - Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38 : 708..... T28
- MARINETTI G.V., 1967. - Lipid chromatographic analysis. Vol. I. G.V. Marinetti et M. Dekker ed..... T25a
- MOSCHETTO Y., 1966. - Les kératines de la laine. Etude physicochimique et fractionnement. Thèse Sc. Phys. Lille T12
- MOSCHETTO Y., T4
- MURATA T., 1978. - Analysis of fatty acid methylesters by a gas-liquid chromatography-chemical ionization mass spectrometry computer system. *J. Lip. Res.* 19 : 166..... T51
- NAOI M., Y.C. LEE et S. ROSEMAN, 1974. - Rapid and sensitive determination of sphingosine base and sphingolipid with fluorescamine. *Anal. Biochem.* 58 : 571..... T37
- NICHOLS B.W., 1964. - Separation of plant phospholipids and glycolipids. *New Biochem. Separation* : 321..... T27
- ORNSTEIN L., 1964. - Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 : 321..... T8
- PIEZ K.A. et L. MORRIS, 1960. - A modified procedure for the automatic analysis of amino acids. *Anal. Biochem.* 1 : 187..... T3
- POLONOSKI J., 1972. - Les sphingolipides. Problèmes actuels de biochimie générale. Masson Ed. : 1..... T32
- ROBERTS R.N., 1967. - Gas chromatography of inositol and glycerol. *In* : "Lipid chromatographic analysis". Marinetti G.V. Ed., 1 : 447..... T48
- ROUSER G., G. KRITCHEVSKY, D. HELLER et E. LIEBER, 1963. - Lipid composition of beef brain, beef liver and the sea anemone : two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixture. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 40 : 425..... T25
- ROUSER G., G. KRITCHEVSKY et A. YAMAMOTO, 1967. - Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. *In* : "Lipid chromatographic analysis". Marinetti G.V. Ed., 1 : 99..... T24

- SCHEIDEGGER J.J., 1955. - Une micro-méthode d'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy Basel 7 : 103..... T5
- SLOMIANY B.L. et M.F. HOROWITZ, 1970. - The glycolipids of bovine serum. *Biochem. Biophys. Acta* 218 : 278..... T46
- SPACKMAN D.H., W.H. STEIN et S. MOORE, 1958. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal. Chem.* 30 : 1190..... T2
- SUGITA M., O. ITASAKA et T. HORI, 1976. - Branched long chain bases from the bivalve *Corbicula sandai*. *Chem. Phys. Lipids* 16 : 1.... T44
- SWEeley C.C. et E.A. MOSCATELLI, 1960. - Qualitative microanalysis and estimation of sphingolipid bases. *J. Lip. Res.* 1 : 40..... T47
- SWEeley C.C. et E.V. DENNIS, 1967. - Lipid chromatographic analysis. 1 : 465..... T47a
- TILLMANS Y. et K. PHILIPPI, 1929. - Über den Gehalt der wichtigsten Protein der Nahrungsmittel an Kohlehydrat und über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstofffreiem Zucker in Eiweiss. *Biochem. Z.* 215 : 36..... T13
- UMBREIT W.W., R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER, 1959. - Manometric techniques. *Burgess pub. Co.* : 1..... T1
- VAN DESSEL G., A. LAGROU, H.J. HILDERSON, W. DIERICK et G. DACREMONT, 1977. - Quantitative determination of the neutral glycosylceramides in bovine thyroid gland. *Biochimie* 59 : 839..... T45
- WEISS B., 1967. - Thin layer chromatography and gas liquid chromatography of sphingosine and related compounds. In : "Lipids chromatographic analysis", Marinetti G.V. Ed., 1 : 429..... T40
- WELLS M.A. et J.C. DITTMER, 1965. - The quantitative extraction and analysis of brain phosphoinositides. *Biochem.* 4 : 2459..... T49

