

CHROM. 5026

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES STÉRIDES ET DES ESTERS METHYLIQUES DES NOYAUX D'HÉMATIES NUCLÉÉES

G. SOULA, C. SOUILLARD, Y. MAURY ET L. DOUSTE-BLAZY

Laboratoire de Chimie Biologique, UER de Pharmacie, 31 Allées J. Guesde et Laboratoire de Biochimie du Centre Anticancéreux, Hôpital de la Grave, (31) Toulouse (France)

(Reçu le 27 avril 1970, manuscrit modifié reçu le 11 août 1970)

SUMMARY

Chromatographic study of cholesteryl esters and methyl esters in nucleated erythrocytes

Thin-layer chromatography allows the separation of four main fractions of cholesterol esters and also fatty acid methyl esters from nucleated chick erythrocytes.

The fatty acid composition is studied by gas chromatography. Among the cholesterol ester fractions, one contains 88 per 100 saturated fatty acids (mainly palmitic acid and stearic acid) and unsaturated fatty acids are preponderant: 75 per 100 in the three others.

The natural fatty acid methyl esters are mainly palmitate.

INTRODUCTION

Les esters de cholestérol du sérum des mammifères ont été particulièrement étudiés. Séparés par chromatographie sur colonne¹, chromatographie sur papier² ou sur couches minces³⁻⁸ imprégnées ou non de nitrate d'argent, leur étude a montré qu'il existe plusieurs fractions différenciées par le degré d'insaturation de leurs acides gras.

Les hématies des mammifères sont quasiment dépourvues de stérides, par contre les globules rouges d'oiseaux en renferment une plus grande quantité⁹.

Dans le présent travail, nous nous proposons de séparer les stérides d'hématies nucléées de poulet par divers systèmes de chromatographie en couche mince mono- ou bidimensionnelle. Leur composition en acides gras, étudiée par chromatographie en phase gazeuse, est comparée à celle des stérides plasmatiques.

TECHNIQUES

Préparation des hématies et extraction des lipides

Le sang est recueilli sur des animaux âgés de trois à quatre mois* par ponction

* Les prélèvements ont été effectués sur des poulets de race White Leghorn à l'École Vétérinaire de Toulouse, Service de Pathologie des volailles (Prof. J. TOURNUT) par Madame P. MONTLAUR que nous remercions vivement.

à la veine alaire sur une solution de citrate de sodium à 4 pour 100 à 2500 tours/min., le plasma est séparé et après centrifugation les globules rouges lavés à trois reprises au sérum physiologique.

La couche leucocyto-plaquettaire est soigneusement aspirée à chaque lavage, les globules rouges sont prélevés au fond du tube de centrifugation.

Le plasma, les hématies hémolysés par un volume d'eau distillée, ou les noyaux isolés¹⁰, sont additionnés de onze volumes d'alcool isopropylique, agités pendant une heure, puis de sept volumes de chloroforme et agités à nouveau une heure, selon ROSE ET OKLANDER¹¹.

Les solvants sont évaporés à sec sous vide à 37°, l'extrait lipidique est repris par du chloroforme, filtré et conservé à -20°.

Chromatographie sur colonne

Un extrait chloroformique contenant de 100 à 150 mg de lipides totaux de plasma, d'hématies ou de noyaux, est chromatographié sur une colonne d'acide silicique et d'hyffosupercel (20 g et 10 g). Les stérides et autres lipides non phosphorés sont élués par 500 ml de chloroforme.

Chromatographie en couche mince

Elles sont effectuées sur des plaques 20 × 20 cm de Silica Gel F₂₅₄ Merck (épaisseur: 250 μ) dans plusieurs systèmes de solvants préconisés par NIEMINEN¹²:

(I) *n*-hexane-benzène (5:95), sur 8 cm, puis après séchage de la plaque: *n*-hexane sur 10 cm,

(II) tétrachlorure de carbone sur 9 cm.

De plus, deux sortes de chromatographies ont été réalisées: l'une, monodimensionnelle utilisant le système I, puis après séchage de la plaque le tétrachlorure de carbone sur 16 cm; l'autre, bidimensionnelle utilisant le système I dans la première dimension, le système II dans la seconde.

Les lipides sont révélés par pulvérisation soit d'une solution d'acide phosphomolybdique à 2 g pour 100 dans l'éthanol, soit du réactif de LIEBERMANN suivies d'un chauffage quelques minutes à 110°.

En vue de l'analyse de leurs acides gras, les stérides sont révélés sur plaque par pulvérisation d'une solution éthanolique à 0.2 pour 100 de 2,7-dichlorofluorescéine, examinés en lumière ultraviolette à 254 nm et élués du silica gel par un mélange de chloroforme et d'éther à parties égales.

Hydrolyse et chromatographie en phase gazeuse

Les stérides sont saponifiés par la potasse méthanolique N à reflux au bain-marie bouillant; les acides gras sont extraits par l'éther de pétrole et, après purification, méthylés par le diazométhane dans l'éther ou par le méthylate de sodium 0.1 N dans le méthanol 2 h à 100° (bibl. 6).

Les esters méthyliques d'acides gras sont chromatographiés en phase gazeuse dans l'hexane dans un appareil Aerograph, Modèle 204 B sur colonne de diéthylène-glycol-succinate à 185° sous un débit d'azote de 40 ml/min.

Leurs concentrations molaires, exprimées en pourcentages, sont calculées après planimétrie.

RÉSULTATS

La chromatographie en couche mince dans le tétrachlorure de carbone (Fig. 1) des lipids de globules rouges de poulet et de leurs noyaux, élués par le chloroforme sur colonne d'acide silicique, révèle l'existence de quatre groupes principaux d'esters du cholestérol, accompagnés d'autres fractions en plus faible quantité. L'ensemble de ces taches est coloré en violet par le réactif de LIEBERMAN. Des lipides plasmatiques on isole cinq fractions principales et des fractions mineures.

En réalisant une première chromatographie dans le système I sur 8 cm puis une

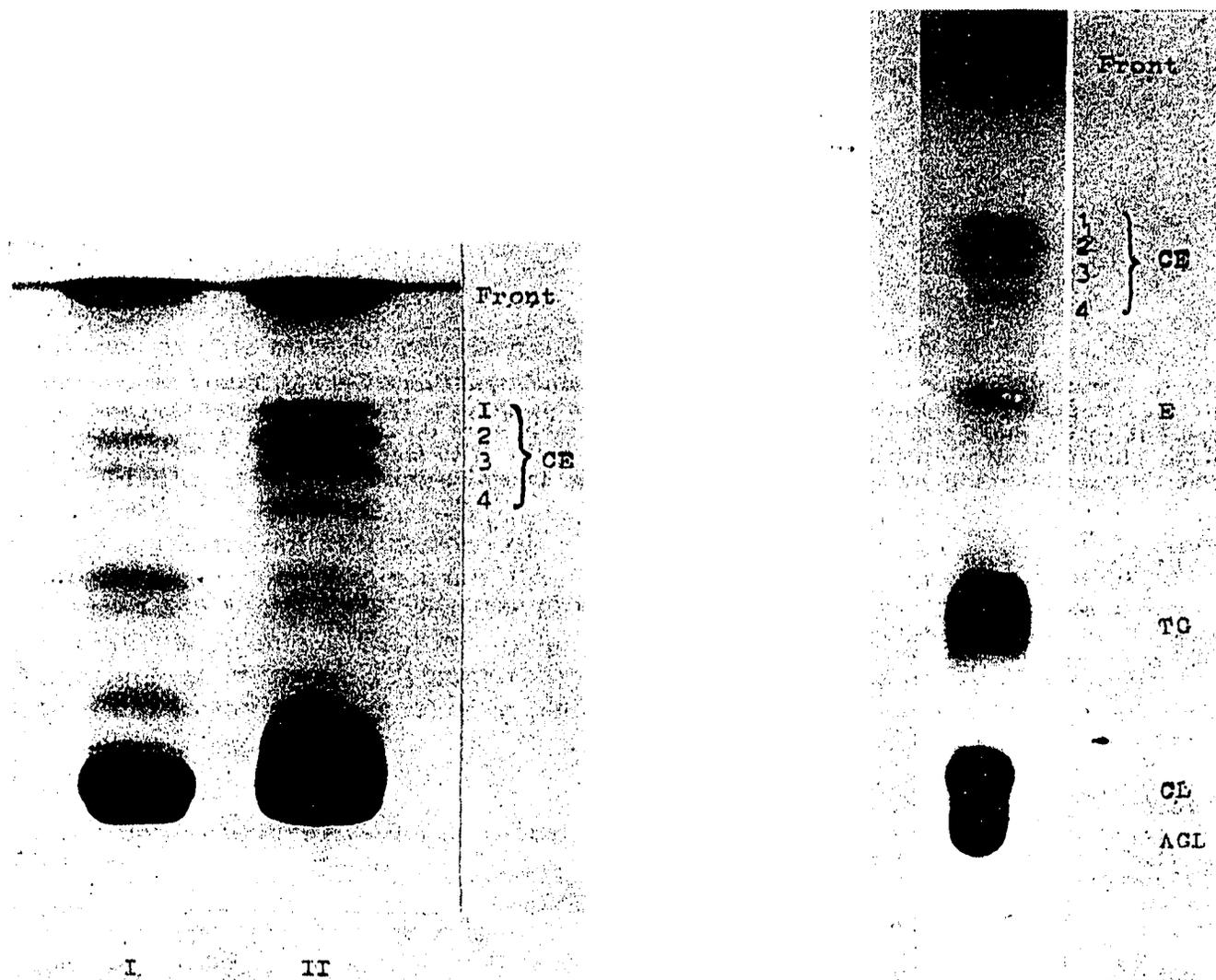


Fig. 1. Chromatographie en couche mince de Silica Gel F₂₅₄ Merck (250μ) des stérides d'hématies de poulet (I) et de noyaux globulaires de poulet (II) dans le tétrachlorure de carbone (trois passages successifs sur 9 cm). Révélation: solution éthanolique d'acide phosphomolybdique.

Fig. 2. Chromatographie en couche mince de Silica Gel F₂₅₄ des glycérides, stérides et acides gras libres de noyaux d'hématies de poulet. Premier solvant: *n*-hexane-benzène (5:95) sur 8 cm, puis *n*-hexane sur 10 cm. Deuxième solvant: tétrachlorure de carbone sur 16 cm. Révélation: solution éthanolique d'acide phosphomolybdique. CE = cholestérol estérifié, E = esters méthyliques, TG = triglycérides, CL = cholestérol libre, AGL = acides gras libres.

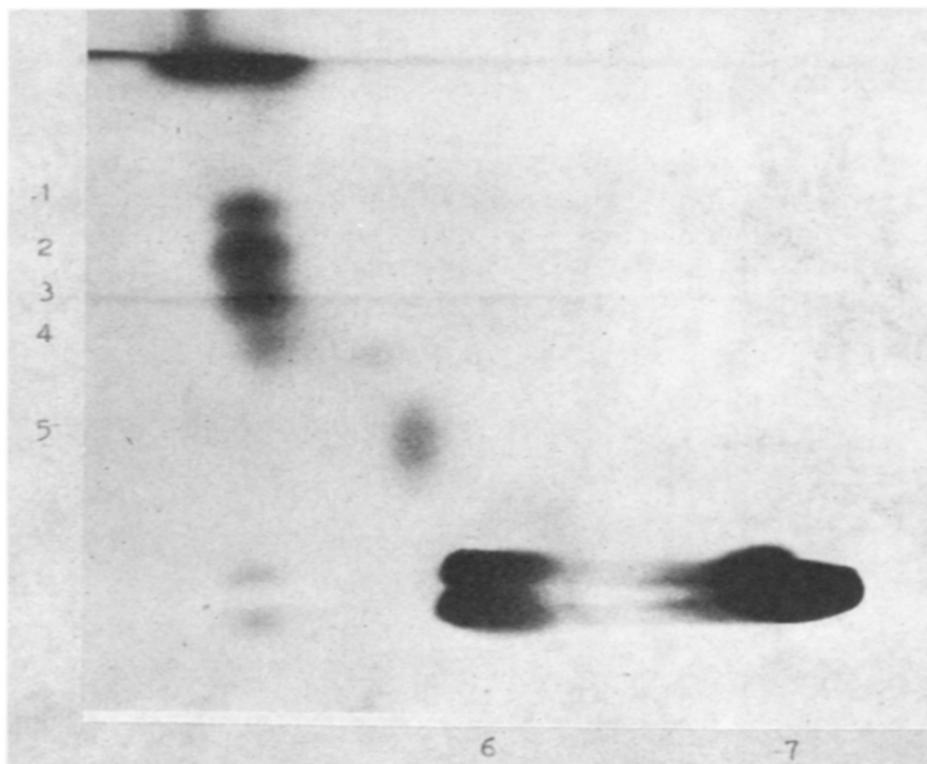


Fig. 3. Chromatographie en couche mince bidimensionnelle sur Silica Gel F₂₅₄ Merck des glycérides, stérides et acides gras libres de noyaux d'hématies de poulet. Première dimension: *n*-hexane-benzène (5:95) sur 8 cm, Deuxième dimension: tétrachlorure de carbone sur 9 cm, Révélation: acide phosphomolybdique à 2% dans l'éthanol 1, 2, 3, 4 = stérides, 5 = esters méthyliques d'acides gras, 6 = triglycérides, 7 = cholestérol libre et acides gras libres.

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES GRAS (moles pour 100) DES QUATRE GROUPES DE STÉRIDES ISOLÉS DES NOYAUX DE GLOBULES ROUGES DE POULET

	CE ₁	CE ₂	CE ₃	CE ₄
14:0	8	1	1.2	1.5
15:0	2	0	0	0
16:0	57.0	12.5	12.8	16
16:1	2	14	1	2.5
16:2	0	4	3	3.9
18:0	18	6.5	8	9
18:1	7	46	11	12.1
18:2	2.0	8	53	9
18:3	0	0	1	0
20:0	3	5	3	0
20:3	0	1	2	4
20:4	0	2	3	15
22:5 et 22:6}	1	0	1	27
<i>Saturés</i>	88	25	25	26.5
<i>Insaturés</i>	12	75	75	73.5

TABLEAU II

COMPOSITION EN ACIDES GRAS (moles pour 100) DES DIVERS GROUPES DE STÉRIDES PLASMATIQUES DE POULET

	CE_1	CE_2	CE_3	CE_4	CE_6
14:0	5	1	0	0	0
16:0	71	8	8	6	6
16:1	1	12	3	2	1
18:0	18	2	0	2	0
18:1	1	76	6	8	4
18:2	0	1	82	2	4
18:3	0	0	1	1	1
20:0	4	0	0	0	0
20:3	0	0	0	4	6
20:4	0	0	0	75	12
22:5	0	0	0	0	66
22:6	0	0	0	0	
<i>Saturés</i>	98	11	8	8	6
<i>Insaturés</i>	2	89	92	92	94

deuxième avec le tétrachlorure de carbone sur 16 cm, on sépare (Fig. 2) les diverses fractions de l'extrait chloroformique: acides gras libres (AGL), cholestérol libre (CL), triglycérides (TG) des esters d'acides gras (E) et quatre fractions de stérides (CE).

Ces deux mêmes systèmes appliqués en chromatographie bidimensionnelle (Fig. 3) réalisent une meilleure séparation des diverses fractions et en particulier des stérides.

Les quatre stérides des noyaux de globules rouges: $CE_{1,2,3,4}$ isolés après chromatographie en couche mince ont été saponifiés et leurs acides gras analysés en phase gazeuse. La composition en acides gras des quatre fractions (Tableau I) se révèle assez différente: la première (CE_1) très riche en acides saturés contient surtout des acides palmitique et stéarique (75 pour 100), les trois autres comportent en majorité des acides insaturés (75 pour 100) avec pour CE_2 surtout de l'acide oléique (46 pour 100),

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES GRAS (moles pour 100) DES ESTERS MÉTHYLIQUES DES GLOBULES ROUGES DE POULET

<i>Acides</i>	<i>pour 100</i>	<i>Acides</i>	<i>pour 100</i>
14:0	6	16:1	6
16:0	42	18:1	10
18:0	16	18:2	6
20:0	2	20:1	3
24:0	4	20:4	1
		22:5	4
		22:6	
<i>Saturés</i>	70	<i>Insaturés</i>	30

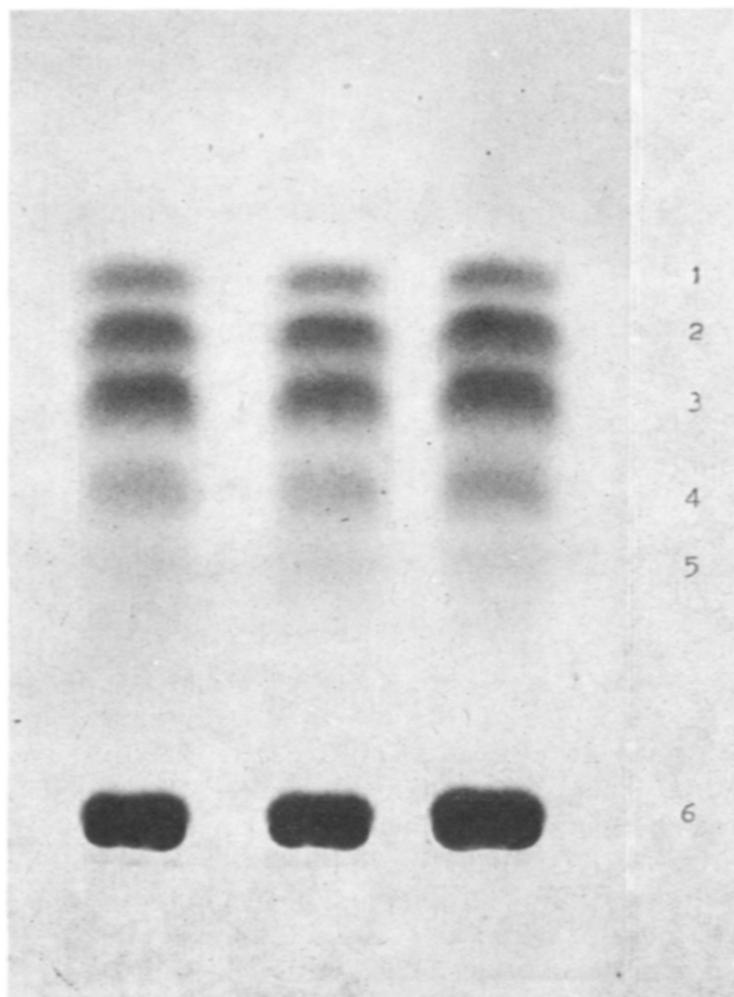


Fig. 4. Chromatographie sur couche mince de Silica Gel G Merck des stérides plasmatiques de poulet. Solvant: tétrachlorure de carbone sur 9 cm (trois migrations). Révélation: pulvérisation du réactif de LIEBERMANN suivie de chauffage 5 min à 110° . 1, 2, 3, 4, 5 = stérides, 6 = cholestérol libre, glycérides et acides gras libres.

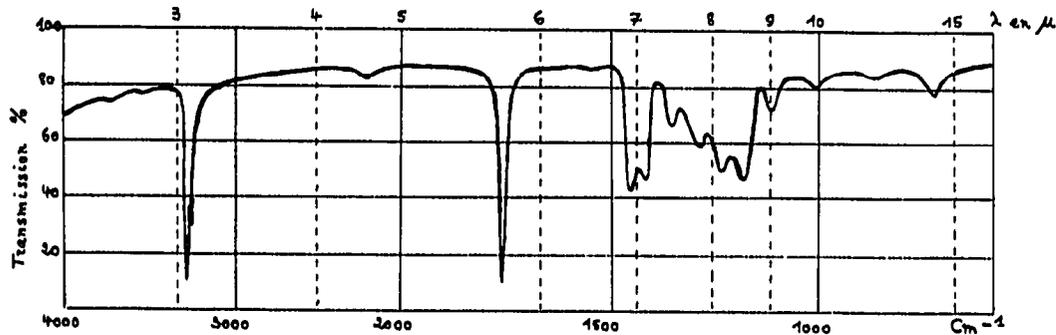


Fig. 5. Spectre infra-rouge des esters d'acides gras isolés de noyaux de globules rouges de poulet. Le spectre a été effectué entre deux lames de chlorure de sodium dans un appareil Perkin-Elmer Modèle 21 entre 4000 et 600 cm^{-1} .

pour CE_3 surtout des acides oléique et linoléique (64 pour 100) et pour CE_4 une forte proportion d'acides gras insaturés en C_{20} et C_{22} .

La composition en acides gras des cinq fractions de stérides plasmatiques (Fig. 4 et Tableau II) montre une plus nette prédominance de l'un d'entre eux: palmitate (71 pour 100) dans la première, oléate (76 pour 100) dans la seconde, linoléate (82 pour 100) dans la troisième, la plus abondante et arachidonate (75 pour 100) dans la quatrième.

Le Tableau III rapporte les proportions d'acides présents dans la tache E, dont l'analyse spectrographique infra-rouge (Fig. 5) montre des bandes d'absorption caractéristiques des groupements ester (1720 cm^{-1}) et carboxyméthylé (triplet de bandes situé entre 1170 et 1260 cm^{-1}). Ces esters qui contiennent 70% d'acides saturés, où prédomine le palmitate (Tableau III), peuvent donc être identifiés à des esters méthyliques.

DISCUSSION

La chromatographie en couche mince mono ou bidimensionnelle des stérides d'hématies de poulet, de leurs noyaux ou du plasma dans divers systèmes de solvants nous a permis de séparer plusieurs groupes d'esters de cholestérol; les plus importants d'entre eux ont été étudiés en chromatographie en phase gazeuse.

Ces résultats sont à rapprocher du fractionnement des esters de cholestérol plasmatique réalisé par PASCAUD^{1,4} sur colonne et sur couche mince d'acide silicique imprégné de nitrate d'argent. Quatre groupes sont ainsi signalés dans le plasma de rat, mais leur composition en acides gras diffère des proportions observées dans les hématies nucléées. En particulier, les stérides d'hématies renferment plus d'acides gras saturés que ceux du plasma.

Par ailleurs, nos résultats se rapprochent de ceux de ALLING *et al.*⁶ pour l'analyse des stérides plasmatiques humains, mais la composition en acides gras des stérides de noyaux globulaires diffère assez nettement de celle-ci ainsi que les proportions relatives des diverses fractions.

On remarquera que plusieurs acides gras différents se retrouvent dans une même fraction, ceci doit être attribué à l'imprécision des méthodes de séparation par chromatographie en couche mince.

Les esters méthyliques présents dans les hématies nucléées sont comparables aux composés signalés dans les extraits lipidiques de tissus animaux^{13,14} ou végétaux¹⁵. Une étude de NIEMINEN¹² démontre leur présence dans le nombreux tissus chez l'homme: cerveau, poumon, rate, coeur, intestin, foie et LEIKOLA *et al.*¹³ attirent l'attention sur leur abondance dans le pancréas.

Pour certains, il s'agirait seulement d'artéfacts formés soit dans le tissu à partir du méthanol libre, la réaction pouvant être catalysée par les bicarbonates^{16,17}, soit au cours de l'extraction par des solvants alcooliques et pendant la concentration de ces extraits¹⁸.

Il est probable que la concentration des extraits à température trop élevée favorise leur formation en provoquant une alcoololyse des triglycérides.

D'autres auteurs au contraire, suggèrent qu'en dehors d'une petite quantité d'artéfacts, ces esters d'acides gras représentent aussi dans les tissus des composés biologiques naturels dont il reste à préciser le mécanisme de biosynthèse.

FISCHER *et al.*¹⁹ démontrent leur existence naturelle dans le foie à côté de méthanol libre, tandis que AXELROD ET DALY²⁰ signalent la présence d'un enzyme hypophysaire hydrolysant la S-adénosylméthionine.

CONCLUSIONS

La chromatographie en couche mince permet de distinguer quatre fractions principales de stérides et des esters méthyliques dans les noyaux d'hématies nucléées de poulet.

Leur composition en acides gras est étudiée par chromatographie en phase gazeuse qui révèle dans les stérides, une fraction contenant 88 pour 100 d'acides gras saturés (essentiellement acide palmitique et acide stéarique) et trois autres fractions renfermant chacune 75 pour 100 d'acides gras insaturés.

Les esters méthyliques naturels sont particulièrement riches en acide palmitique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. PASCAUD, *Advan. Tracer Methodol.*, 3 (1966) 181.
- 2 J. TICHY, *Neurology*, 16 (1966) 1219.
- 3 L. J. MORRIS, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 357.
- 4 M. PASCAUD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 192.
- 5 C. ALLING, J. DENCKER, L. SVENNERHOLM ET J. TICHY, *Lancet*, II (1967) 312.
- 6 C. ALLING, L. SVENNERHOLM, ET J. TICHY, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 413.
- 7 C. MICHALEC, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 509.
- 8 N. ZOLLNER, G. WOLFRAM ET C. AMIN, *Klin. Wochschr.*, 40 (1962) 273.
- 9 M. KATES ET A. T. JAMES, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 478.
- 10 G. SOULA, Résultats non publiés.
- 11 H. G. ROSE ET M. OKLANDER, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 428.
- 12 E. NIEMINEN, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, 118 (1965) 1.
- 13 E. LEIKOLA, E. NIEMINEN ET E. SALOMAA, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 490.
- 14 H. P. KAUFMANN ET C. V. VISWANATHAN, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 65 (1963) 925.
- 15 A. FATHIPOUR, K. K. SCHLENDER ET H. M. SELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 144 (1967) 476.
- 16 A. K. LOUGH, L. FELINSKI ET G. A. GARTON, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 478.
- 17 V. P. SKIPSKI, A. F. SMOLOWE, R. C. SULLIVAN ET M. BARCLAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 106 (1965) 386.
- 18 J. FUKUDA, E. MIZUKAMI ET K. IMAICHI, *J. Biochem.*, 61 (1967) 657.
- 19 G. A. FISCHER, J. J. SAUK ET J. J. KABARA, *Microchem. J.*, 11 (1966) 461.
- 20 J. AXELROD ET J. DALY, *Science*, 150 (1965) 892.

J. Chromatog., 53 (1970) 217-224