

Phosphonolipides du Rein et du Poumon de Bœuf

Masato TAMARI

Laboratoire de Nourriture et Nutrition, Faculté d'Éducation,
Université de Nagasaki, Nagasaki 852, Japon

(Received Oct. 31, 1988)

RÉSUMÉ

Dans ce travail nous nous sommes attachés à rechercher et à identifier les phosphonolipides contenant de la ciliatine éventuellement présents dans le rein et le poumon de boeuf. La majeure partie de la ciliatine présente dans le rein et le poumon se trouve dans la fraction lipidique; elle représente 61% et 67% de la ciliatine totale, contre 0,7% et 0,1% dans la fraction correspondant acétone-soluble, 9% et 4% dans la fraction ATC-soluble et 30% et 30% dans la fraction protéique. Le constituant majeur de l'acide gras dans les deux organes examinés est les 15 : 0, 17 : 0, 17 : 1, 18 : 0 et 20 : 3. Un extrait lipidique du rein est fractionné sur colonne d'acide silicique. La technique employée permet l'élution de trois fractions (pic I, II, III) contenant des composés phosphorés. Les première, deuxième et troisième pics contiennent respectivement 24,6%, 62,1% et 13,3% du phosphore c-p contenu dans l'ensemble des fractions lipidique, soit 1,9%, 0,1% et 1,6% du phosphore total de chaque fraction.

INTRODUCTION

On appell "phosphonates" des composés qui possèdent une liaison covalente carbon-phosphore. La démonstration de l'existence de phosphonates naturels remonte seulement à 1959, lorsque Horiguchi et Kandatsu⁽¹⁾ isolèrent, par chromatographie d'un hydrolysats de protozoaires du rumen, un composé phosphoré résistant à l'hydrolyse chlorhydrique et révélabable par la ninhydrine. Ils appelèrent "ciliatine" cette nouvelle substance et l'identifièrent a l'acid 2-aminoéthylphosphonique (2-AEPn) après en avoir réalise la synthèse chimique.

Depuis cette date, la ciliatine a été mise en évidence dans un grand nombre d'organismes⁽²⁾. Chez les ruminats, Shimizu et coll⁽³⁾. ont isolé de cerveau de boeuf petites quantités de ciliatine, tandis que Kandatsu et Horiguchi⁽⁴⁾ montraient qu'elle se trouve à une concentration appréciable (58,4 mg) dans le foie de chèvre. Nous avons isolé du foie de boeuf un "phosphonolipide" contenant de la ciliatine (acyl-glyceryl

-ciliatine)⁽⁵⁾; nous avons également obtenu, à partir de la vésicule biliaire du boeuf, une petite quantité d'un nouvel acide biliaire conjugué renfermant de la ciliatine qui constitue un analogue phosphonique de l'acide taurocholique⁽⁶⁾.

La ciliatine ainsi caractérisée dans les tissus ou les humeurs des mammifères poly-gastriques, tire vraisemblablement son origine des protozoaires présents dans leur rumen.

Dans ce travail nous nous sommes attachés à rechercher et à identifier les phosphonolipides contenant de la ciliatine éventuellement présents dans le rein et le poumon de boeuf.

MATÉRIELS et MÉTHODES

Le témoin de ciliatine est synthésé par la méthode de Kosolapoff⁽⁷⁾.

La triméthylciliatine nous ont été donnés par le professeur M. Horiguchi (Faculté d' Agriculture, Université de Tohoku, Sendai, Japan)

Le rein et le poumon de boeuf provient de l'abattoir de Nagasaki où elle est prélevé e dans les 60 minutes qui suivent la mort de l'animal : elle est conservée à -20°C jusqu' à son utilisation.

Préparation de l'acide Silicique et de la Célite.

L'acide silicique (100-200 mesh) es lavé plusieurs fois avec du méthanol : il est ensuite porté à l'étuve à 105°C pendant 12 heures.

La célite (hyflosupercel) est mise au contact avec trois volumes de NaOH 1N pendant une nuit; elle est ensuite lavée avec HCl 1N, puis avec de l'eau distillée jusqu' à neutralité, enfin avec trois volumes de méthanol est séchée par chauffage à l'étuve à 80°C pendant une nuit.

Fractionnement des Fractions Phosphorique.

Le fractionnement des fraction phosphorique est réalise du rein et poumon selon un protocole inspiré de la méthode de Schneider⁽⁸⁾.

Extraction des Lipides du Rein.

Les lipides sont extraits du rein selon un protocole inspiré des méthodes de Shioda et coll⁽⁹⁾. et de Folch et coll⁽¹⁰⁾. A 100 g du rein on ajoute une quantité du mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, en vol.) égale à 20 fois le volume de l'échantillon; l'extrait est séparé par filtration et le résidu est soumis à deux nouvelles extractions dans les mêmes conditions que précédemment. Les différents extraits sont rassemblés et lavés plusieurs fois par 0,2 volume d'eau distillée dans les conditions décrites par Folch et coll⁽¹⁰⁾. : on obtient ainsi une couche inférieure correspondant à la fraction lipidique proprement dite. Cette dernière est évaporée à sec et les lipides sont remis en solution

dans 0,5 litre de mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, en vol.). La solution est lavée plusieurs fois par 0,2 volume d'eau distillée pour éliminer toute trace éventuelle de composé hydrosoluble. La fraction lipidique est à nouveau évaporée puis redissoute dans une petite quantité de chloroforme-méthanol (2 : 1, en vol.); enfin, elle est additionnée d'acétone froide afin d'éliminer les lipides neutres. La séparation du surnageant et des lipides complexes est obtenue par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 15 minutes.

Fractionnement des Phospholipides.

Le fractionnement des phospholipides est réalisé sur colonne d'acide silicique suivant la technique de Hanahan et coll⁽¹¹⁾. On collecte des fractions de 10 ml sur lesquelles on effectue une détermination du phosphore.

Les Analyses de l'Acide Gras.

Les acides gras constitutifs ont été dosés après hydrolysé par HCl 5% dans le méthanol pendant 4 h à 100°C, par chromatographie en phase vapeur selon la méthode déjà décrites⁽¹²⁾. L'appareil utilisé pour les analyses en chromatographie en phase vapeur est un appareil Shimadzu GC-8A, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les colonnes utilisées ont les caractéristiques suivantes : longueur 2 m, diamètre 3 mm, phase stationnaire Shinchron E71 5% sur Chimalite 80-100 mesh.

Chromatographie sur Couche Mince.

La séparation des phospholipides et des phosphonolipides est obtenue par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Silicagel G Merck; épaisseur 0,5 mm). Les solvants utilisés sont les suivants : 1 : chloroforme, méthanol, ammoniacque 28% (65 : 35 : 5, en vol.); 2 : chloroforme, méthanol, acétone, acide acétique, eau (5 : 1 : 2 : 1 : 0,5, en vol.); 3 : acide acétique 0,02 M dans l'éthanol à 60%. Les différents composés ainsi séparés sont détectés à l'aide des réactifs de révélation suivants : molybdate d'ammonium pour l'ensemble des lipides phosphorés; réactif de Rosenberg⁽¹³⁾ pour les phosphonolipides; ninhydrine pour les dérivés aminés; réactif de Dragendorff pour les dérivés de la choline.

Hydrolyse Acide des Lipides.

Afin de mettre en évidence une liaison covalente C-P dans les lipides des diverses fractions, leur résistance à l'hydrolyse a été examinée après chauffage à reflux pendant 48 heures en présence d'HCl 6N.

Détermination du phosphore.

Le phosphore est dosé par la méthode de Chen et coll.⁽¹⁴⁾ après minéralisation de l'échantillon par un mélange de HClO₄ et H₂SO₄ dans des conditions déjà décrites⁽¹⁵⁾.

RÉSULTATS

1. *Mise en Évidence de la Ciliatine dans les Quatre Compartiments du Rein et du Poumon de Boeuf.*

Comme l'indique le Tableau 1, la majeure partie de la ciliatine présente dans le rein et le poumon de boeuf se trouve dans la fraction lipidique; elle représente 61% et 67% de la ciliatine totale, contre 0,7% et 0,1% dans la fraction correspondant acétone-soluble, 9% et 4% dans la fraction ATC-soluble et 30% et 30% dans la fraction protéique.

Tableau 1. Distribution de la Ciliatine dans Quatre Compartiments du Rein et du Poumon de Boeuf

Fraction		C-P ($\mu\text{g/g}$)	C-P/T-P (%)	C-P/T-C-P (%)
Rein	Fraction acétone-soluble	1,84	0,06	0,66
	Fraction lipidique	169,99	4,03	60,99
	Fraction ATC-soluble	23,93	9,78	8,59
	Fraction protéique	82,96	6,88	29,74
Poumon	Fraction acétone-soluble	0,10	0,01	0,08
	Fraction lipidique	82,18	3,00	66,84
	Fraction ATC-soluble	4,72	0,24	3,84
	Fraction protéique	35,95	3,79	29,24

C - P : Phosphore de la ciliatine (ou de ses dérivés) ;

T - P : Phosphore total ; T-C-P : Phosphore phosphonique total

Ce résultat est à rapprocher de la caractérisation de la ciliatine, libre ou liée, dans le résidu protéique de divers organismes⁽²⁾. Dans la fraction lipidique, la présence de ciliatine ne peut s'envisager que dans le cas de l'existence de phosphonolipides.

2. *Composition des Acide Grasse.*

La composition de l'acide gras dans les lipides du rein et du poumon de boeuf est indiquée dans le Tableau 2. Comme l'indique le Tableau 2, dans les deux organes examinés, on observe une composition plus ou moins importante de l'acide gras selon l'ordre croissant : 22 : 1, 20 : 1, 22 : 0, 20 : 4, 20 : 3, 17 : 0, 18 : 0, 15 : 0, 17 : 1 pour le rein et 20 : 1, 20 : 4, 18 : 0, 22 : 0, 20

Tableau 2. Composition de l'Acide Grasse dans les Lipides du Rein et du Poumon de Boeuf.

Acide gras	Rein (%)	Poumon (%)
14 : 0	0,558	0,849
15 : 0	19,063	30,088
16 : 0	0,364	0,750
16 : 1	0,681	0,782
17 : 0	16,616	16,302
17 : 1	21,051	27,753
18 : 0	16,759	4,924
18 : 1	0,008	0,026
18 : 2	0,540	0,630
18 : 3	0,416	0,423
18 : 4	0,702	0,180
20 : 1	1,547	1,126
20 : 3	14,362	7,988
20 : 4	2,706	2,301
20 : 5	0,991	0,525
22 : 0	2,453	5,355
22 : 1	1,185	—

: 3, 17 : 0, 17 : 1, 15 : 0 pour le poumon, Les 15 : 0, 17 : 0, 17 : 1, 18 : 0, 20 : 3 dans l'acide gras est le constituant majeur.

3. Chromatographie des Phospholipides du Rein sur Colonne d'Acide Silicique.

Un extrait lipidique du rein de boeuf est fractionné sur colonne d'acide silicique selon Hanahan et coll⁽¹¹⁾. On collecte des fractions de 10 ml dont la teneur en phosphore est déterminée sur des parties aliquotes de 0,1 ml. Comme l'indique la Fig. 1, la technique employée permet l'élution de trois fractions contenant des composés phosphorés.

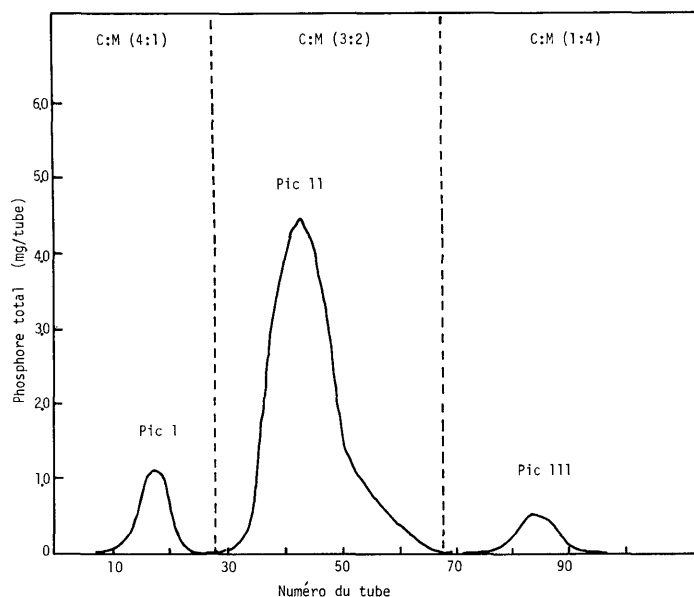


Fig. 1 Diagramme d'Élution de la Fraction Phospholipidique du Rein de Boeuf.

Chromatographie sur colonne (acide silicique 60 g, Hyflosupercel 30 g; 3×40 cm). Elution par chloroforme (C) : méthanol (M) (4 : 1, 3 : 2 et 1 : 4). On recueille des fractions de 10 ml (vitesse de sortie de l'éluant : 2 ml/min.)

Tableau 3. Répartition du Phosphore Phosphonique dans les Fractions Phospholipidiques du Rein Séparées par Chromatographie sur Acide Silicique.

Fraction	C-P ($\mu\text{g/g}$)	C-P/T-P (%)	C-P/T-C-P (%)
Pic I	42,1	1,92	24,6
Pic II	106,4	0,13	62,1
Pic III	22,8	1,62	13,3

C-P : Phosphore phosphonique ; T-P : Phosphore total ;
T-C-P : Phosphore phosphonolipidique total

Afin de détecter la présence de phosphonates dans ces pics d'élution, chacun d'entre eux est soumis à une hydrolyse chlorhydrique et l'on détermine sur une aliquote le phosphore non hydrolysable (Tableau 3).

La première fraction contient 24,6% du phosphore phosphonique et C-P présent dans l'extrait lipidique, ce qui représente 1,9% du phosphore total de cette fraction; les deuxième et troisième pics contiennent respectivement 62,1% et 13,3% du phosphore C-P contenu dans l'ensemble des fractions lipidique, soit 0,1% et 1,6% du phosphore total de chaque fraction. Ces résultats indiquent la présence de phosphonolipides au niveau des trois pics d'élution. Les frac-

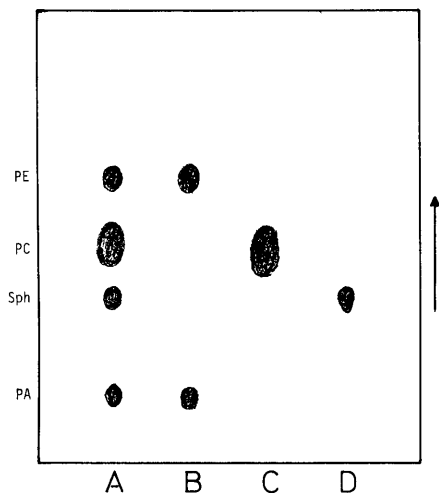


Fig. 2 Chromatographie des Pics Phospholipidiques Élués sur Colonne d'Acide Silicique.

Couche mince (0.25 mm) de Silicagel G; solvant 1. Les lipides sont révélés par la ninhydrine, le molybdate d'ammonium, le réactif de Rosenberg et le réactif de Dragendorff. A: lipides totaux; B: premier pic élué sur acide silicique; C: deuxième pic élué sur acide silicique; D: troisième pic élué sur acide silicique. PA: acide phosphatidique; PE: phosphatidyléthanolamine; PC: phosphatidylcholine; Sph: sphingomyéline

nolipide est confirmée par la résistance à l'hydrolyse du groupement phosphonique de la ciliatine, qui s'oppose à la labilité de la fonction ester de la phosphoryléthanolamine.

Le Deuxième Pic :

Ce pic contient un phospholipide et un phosphonolipide (Fig. 2, c).

Le comportement chromatographique du phospholipide correspond à celui de la phosphatidylcholine. Les conditions expérimentales mises en œuvre ne permettant pas d'obtenir une bonne séparation entre lécithine et phosphonolécithine⁽¹⁶⁾, l'analyse chromatographique a été reprise après une hydrolyse de 48 heures par HCl 6N à reflux : il est ainsi possible de montrer que le deuxième pic d'élué contenait également un analogue de la phosphatidylcholine dans lequel la triméthylciliatine remplace la phosphorylcholine. Ce phosphonolipide renferme vraisemblablement la totalité du

tions correspondantes ont donc été concentrées et des parties aliquotes soumises à une chromatographie sur couche mince de gel de silice, en utilisant la phase solvante 1 (Fig. 2).

Le Premier Pics :

la fraction correspondant à ce pic contient deux phospholipides et un phosphonolipide (Fig. 2, B). Le composé dont la mobilité est la plus faible dans le système chromatographique employé peut être identifié à un acide phosphatidique en raison de la valeur de son R_f et de l'absence de réactivité vis-à-vis de la ninhydrine et du réactif de Dragendorff.

Un deuxième phospholipide correspond à la phosphatidyléthanolamine (même valeur de R_f qu'une substance témoin, positivité de la réaction à la ninhydrine). Quant au troisième composé il s'agit d'un analogue phosphonique (phosphonocéphaline) de la phosphatidyléthanolamine dont la similitude de structure explique qu'il possède un comportement chromatographique identique à celui d'une céphaline; néanmoins, la présence de ce phospho-

phosphore C-P trouvé dans le pic 2 et représente environ la moitié du phosphore C-P contenu dans l'extrait lipidique.

Le Troisième Pic :

Le taux de phosphore C-P dans cette fraction correspond à 13,3% du phosphore C-P de l'extrait lipidique. Après hydrolyse acide, la caractérisation chromatographique de la ciliatine montre à nouveau que le troisième pic d'élution contient, non seulement un phospholipide, mais aussi un phosphonolipide. Le fait que ces deux composés se montrent résistants à une hydrolyse alcaline, réalisée selon la méthode de Dawson⁽¹⁷⁾, conduit à admettre qu'il s'agit d'un sphingophospholipide et d'un sphingophosphonolipide dont la mobilité chromatographique est identique⁽²⁾ (Fig. 2, D).

L'ensemble de résultats présentés dans ce travail montre donc que plusieurs phosphonolipides, possédant une liaison C-P, entrent dans la constitution du rein et du poumon de boeuf.

DISCUSSION

Les composés phosphoniques naturels que l'on a identifié jusqu'à présent sont pour la plupart des dérivés de la ciliatine. La présence de ciliatine a également été décelée dans plusieurs espèces de plancton^(18, 19).

Considérant que le plancton sert d'aliment pour de nombreux invertébrés marins, il est possible que la ciliatine retrouvée chez ces animaux ait une origine exogène. On a par ailleurs recherché la présence de ciliatine chez divers animaux supérieurs^(3, 4, 20).

Nous avons pu montrer que la bile de boeuf renferme un analogue phosphonique de l'acide taurocholique⁽⁶⁾ et identifié un phosphonolipide (acylglycéril-ciliatine) dans le foie de boeuf⁽⁵⁾.

Il est évident que les humains peuvent eux aussi ingérer de la ciliatine, notamment en mangeant de la viande ou des mollusques.

On ignore quel en est le devenir dans l'organisme humain.

BIBLIOGRAPHI

- 1) M. Horiguchi et M. Kandatsu, Nature, 184, 901 (1959)
- 2) "Biochemistry of Natural C-P Compounds" eds. by T. Hori, M. Horiguchi et A. Hayashi, Maruzen Ltd., Kyoto, 1984, p. 24
- 3) H. Shimizu, Y. Kakimoto, T. Nakajima, A. Kanazawa et I. Sano, Nature, 207, 1197 (1967)
- 4) M. Kandatsu et M. Horiguchi, Agric. Biol. Chem., 19, 781 (1965)
- 5) S. Hasegawa, M. Tamari et M. Kametaka, J. Biochem., 80, 531 (1976)
- 6) M. Tamari, M. Ogawa et M. Kametaka, *ibid.*, 80, 371 (1976)
- 7) G. M. Kosolapoff, J. Am. Chem. Soc., 69, 2112 (1947)

- 8) W. C. Schneider, *J. Biol. Chem.*, 164, 747 (1946)
- 9) R. Shioda, P. D. S. Wood et L. W. Kinselle, *J. Lipid Res.*, 10, 546 (1969)
- 10) J. Folch-Pi, M. Lee et C. H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)
- 11) D. J. Hanahan, J. C. Dittmer et E. Warashina, *ibid.*, 228, 685 (1957)
- 12) M. Tamari et M. Kandatsu, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1495 (1986)
- 13) H. Rosenberg, *J. Chromatogr.*, 2, 487 (1957)
- 14) P. S. Chen, T. Y. Toribara et H. Warner, *Anal. Chem.*, 28, 1756 (1956)
- 15) M. Tamari, M. Horiguchi et M. Kandatsu, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45, 433 (1971)
- 16) V. M. Kapoulas, *Biochim. Biophys. Acta.*, 176, 324 (1969)
- 17) R. M. C. Dawson, *Biochem. J.*, 75, 45 (1960)
- 18) W. W. Baldwin et J. Braven, *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 48, 603 (1968)
- 19) J. S. Kittredge, M. Horiguchi et P. M. Williams, *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, 859 (1969)
- 20) M. Tamari et M. Kandatsu, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 933 (1973)