

BBA 76383

MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES DU LAIT HUMAIN.

PREPARATION, ETUDE MORPHOLOGIQUE ET COMPOSITION CHIMIQUE

M. B. MARTEL, P. DUBOIS et R. GOT

Equipe de Recherche C.N.R.S. No. 66, Laboratoire de Biochimie I, U.E.R. de Chimie-Biochimie, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621-Villeurbanne, et Laboratoire d'Histologie, U.E.R. Médicale Lyon-Sud, B.P. 12, 69600-Oullins (France)

(Reçu le 22 février, 1973)

SUMMARY

Human milk fat globule membranes. Preparation, morphological studies and chemical composition

Two procedures for the preparation of the human milk fat globule membranes have been used, and morphological and enzymatic comparisons were made. Membranes obtained by the churning procedure were investigated for their protein, lipid, carbohydrate and amino acid contents. Analysis of the proteins by acrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate were also performed. Several bands are observed: two of these represent glycoproteins. Nucleic acids were analysed on a sucrose density gradient.

Des études morphologiques et biochimiques¹⁻⁴ ont montré que les globules lipidiques du lait de vache sont entourés par une membrane présentant une grande similitude avec les membranes plasmiques des cellules épithéliales de la glande mammaire.

Le lait humain ne semble pas avoir été l'objet de beaucoup de recherches. Toutefois, nous avons montré récemment la présence d'enzymes marqueurs des membranes plasmiques, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique dans les membranes des globules lipidiques de laits colostraux⁵. Il nous a alors semblé intéressant d'étudier la composition chimique de ces membranes. De ce point de vue, les seules références que l'on possède se rapportent au lait bovin^{1,6-9}; or des différences importantes apparaissent dans les résultats publiés sur ces membranes, consécutives aux traitements préliminaires des globules lipidiques, nécessaires à leur obtention.

Nous avons donc été amenés à préciser une méthode de préparation des membranes des globules lipidiques du lait humain, en utilisant des contrôles morphologiques et enzymatiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Les laits colostraux, prélevés entre le 3^e et le 10^e jour après la parturition sont traités dans les deux heures qui suivent le prélèvement, sans être refroidis. La crème

obtenue par une centrifugation à 20 °C pendant 1 h à $2500 \times g$ est lavée dans 10 fois son volume d'un tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.2) puis recentrifugée dans les mêmes conditions.

Méthodes

(1) Préparation des membranes

Deux méthodes de préparation ont été appliquées. Dans la première, la crème diluée de moitié dans le tampon précédent est soumise à un barattage lent au Polytron, le tube étant maintenu dans la glace afin d'éviter un échauffement excessif. Après formation des granules de beurre, le babeurre est dilué 10 fois dans le tampon et centrifugé 1 h à $40000 \times g$, à +4 °C. Le culot de membranes ainsi obtenu est lavé dans 30 fois son volume de tampon et recentrifugé dans les mêmes conditions. Il a été vérifié qu'à ce stade, les eaux de lavage ne contiennent aucune protéine du lactosérum.

Dans la deuxième méthode, la crème diluée est congelée durant 3 h à -20 °C. Après décongélation à 4 °C, les membranes sont préparées comme dans la première méthode.

(2) Analyses chimiques

A une suspension de membranes dans l'eau distillée (1-2 mg de protéines par ml) sont ajoutés 2 vol. d'éthanol. Le précipité récupéré par centrifugation est délipidé selon la méthode de Munro et Fleck¹⁰. Cette méthode permet l'extraction des acides ribonucléiques (et désoxyribonucléiques s'ils sont présents) par la technique de Schneider (*cf.* réf. 11). Il est admis qu'une absorbance de 32 correspond à une concentration en RNA de 1 mg par ml. Les protéines¹² et les oses neutres¹³ sont dosés par les méthodes classiques sur des parties aliquotes du précipité délipidé, redissous dans la soude normale, contre des témoins serum albumine humaine et galactose-mannose (1:1, v/v).

L'acide sialique¹⁴ et les hexosamines¹⁵ sont déterminés après hydrolyse du précipité éthanolique, respectivement par HCl 0.05 M pendant 45 min à 80 °C et par HCl 4 M pendant 4 h à 100 °C, par rapport à des témoins acide *N*-acétylneuraminique et chlorhydrate de glucosamine.

Les monosaccharides sont identifiés par chromatographie en couche mince (DC-Alurolle cellulose Merck) dans le solvant butanol-pyridine-HCl 0.1 M (5:3:2, v/v/v) après avoir été libérés par hydrolyse à 100 °C dans HCl 1 M durant 3 h pour les oses neutres et dans HCl 4 M durant 4 h pour les oses aminés. Les hydrolysats sont purifiés par chromatographie sur colonne de Dowex 50 (200-400 mesh) dans HCl 0.3 M. La révélation est effectuée par pulvérisation d'oxalate d'aniline.

Les acides aminés sont dosés par un analyseur automatique (Unichrom Beckman) après hydrolyse de la suspension de membranes par HCl 6 M pendant 24 h et 48 h à 100 °C en tube scellé.

Les lipides totaux sont extraits par la méthode de Folch *et al.*¹⁶. La phase riche en chloroforme est évaporée jusqu'à siccité sous un flux d'azote, à température ambiante. Le résidu lipidique est immédiatement pesé, puis redissous dans un volume précis de la phase inférieure de Folch *et al.*¹⁶ et conservé à -20 °C dans un flacon rodé. Le phosphore lipidique est dosé sur une partie aliquote de cet extrait selon la méthode de Chen *et al.*¹⁷. Le taux de phospholipides est calculé en multipliant par

25 la valeur obtenue pour le phosphore⁹. Les glycérides¹⁸, le cholestérol libre¹⁹ et estérifié²⁰ sont dosés directement sur la suspension membranaire.

Les lipides neutres sont analysés par chromatographie en couche mince sur plaque de gel de silice F 254 (Merck) dans les systèmes solvants: éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (9:10:1, v/v/v) ou hexane-éther éthylique (50:50, v/v). Le cholestérol libre ou estérifié est révélé spécifiquement par la méthode de Lowry²¹ et les lipides totaux par le réactif à la vanilline. Après extraction des lipides neutres par l'acétone, les lipides polaires sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur plaques de gel de silice selon la méthode de Parsons et Patton²². Leur position est détectée par exposition aux vapeurs d'iode. Ils sont ensuite révélés par des réactifs spécifiques à chacun d'entre eux²³.

(3) *Electrophorèse et ultracentrifugation*

Les protéines sont solubilisées dans le dodécyl sulfate de sodium à 3% et analysées par électrophorèse en gel d'acrylamide selon la méthode de Anderson *et al.*⁸ Les glycoprotéines sont mises en évidence selon Glossman et Neville²⁴. Les poids moléculaires sont estimés à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant la sérum albumine humaine (monomère et dimère), la trypsine et l' α -lactalbumine humaine.

Un extrait d'acides nucléiques obtenu par la méthode de Scherrer et Darnell²⁵ est analysé par ultracentrifugation de zone en gradient de saccharose (5–20%) selon Britten et Roberts²⁶. Un acide nucléique soluble de levure (4 S) marqué au ³H est utilisé comme témoin; la radioactivité de chaque fraction est déterminée en scintillation liquide (Packard Tricarb) après précipitation sur filtre Whatman (GF/B).

(4) *Microscopie électronique*

(a) *A transmission*. Les culots obtenus après barattage ou congélation-décongélation sont fixés au glutaraldéhyde à 2.5% dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4 puis post-fixés à l'acide osmique à 1%. Après inclusion dans l'araldite, les coupes sont faites sur un ultramicrotome LKB type Ultratome III, avec des couteaux de verre, et colorées à l'acétate d'uranyle associé au citrate de plomb. Les observations sont faites sur un microscope JEM 7.

(b) *A balayage*. Les culots entiers sont fixés au glutaraldéhyde à 2.5% dans le tampon phosphate, après un lavage rapide; ils sont déshydratés et montés sur un porte-échantillon. La métallisation de toute la surface est réalisée par évaporation d'or. Les observations sont faites sur un microscope à balayage Cambridge "Stereoscan".

RÉSULTATS

(1) *Comparaison des 2 méthodes de préparation des membranes*

Deux critères biochimiques ont été choisis pour évaluer la qualité des méthodes de préparation: le rendement en protéines, classiquement employé pour évaluer une quantité de matériel membranaire, et la récupération d'une activité enzymatique que des études antérieures⁵ nous ont permis de considérer comme caractéristique des membranes de la glande mammaire, la galactosyltransférase.

Il ressort des résultats consignés dans le Tableau I que ces deux critères sont très en faveur de l'homogénéisation. En effet, pour une même quantité de crème, le taux de protéine y est de deux fois supérieur et il ne semble pas que l'on puisse attribuer ce meilleur rendement à une éventuelle contamination par des protéines du lactosé-

rum. D'une part, les membranes obtenues par les deux méthodes sont lavées dans les mêmes conditions; d'autre part, un contrôle réalisé par électrophorèse en gel d'acrylamide sur un lavage supplémentaire lyophilisé s'est avéré totalement négatif.

L'activité de transfert du galactose, exprimée en activité totale ou en activité spécifique, aussi bien à un accepteur endogène qu'à la *N*-acétylglucosamine, confirme encore plus nettement l'intérêt de l'homogénéisation.

TABLEAU I

COMPARAISON DES TAUX DE PROTÉINES ET DES ACTIVITÉS DE TRANSFERT DU GALACTOSE SUR ACCEPTEURS ENDOGÈNES OU SUR *N*-ACÉTYLGLUCOSAMINE DE DEUX PRÉPARATIONS MEMBRANAIRES OBTENUES À PARTIR DE 50 ml DE LAIT HUMAIN PAR CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION OU PAR BARATTAGE DE LA CRÈME

	Protéines (mg)	Transfert du galactose en radioactivité (cpm par min d'incubation)			
		Accepteur endogène		<i>N</i> -Acétylglucosamine	
		Totale	Spécifique/mg protéines	Totale	Spécifique/mg protéines
Congélation-décongélation	2.4	0	0	64	26.5
Barattage	4.4	12	2.7	297	67.5

Ces résultats biochimiques sont corroborés par l'étude morphologique.

(A) *Microscope à transmission*

(a) *Après barratage* (Fig. 1), on observe dans le culot la présence de nombreuses microvésicules de taille variable (de 0.05 à 0.35 μ m) limitées par une membrane simple. Il n'est pas possible d'y mettre en évidence un matériel quelconque. Ces microvésicules se trouvent réparties au sein d'un matériel hétérogène. Il reste de rares globules lipidiques reconnaissables à leur taille beaucoup plus importante et à l'aspect caractéristique de leur contenu.

(b) *Après congélation-décongélation* (Fig. 2), les microvésicules sont exceptionnellement présentes. Les images observées évoquent l'aspect de membranes "rompues et étalées" et non pas "organisées en vésicules" comme c'est le cas après barattage.

(B) *Microscope à balayage*

(a) *Après barattage* (Fig. 3), on retrouve les microvésicules observées avec le microscope à transmission; entre les vésicules parfaitement identifiées, on trouve un matériel correspondant peut-être à des fragments de membranes rompues.

(b) *Après congélation-décongélation* (Fig. 4) on peut observer de larges fragments membranaires, étalés à la surface du culot, repérables au niveau des fractures occasionnées dans le culot lors de la préparation, confirmant ainsi les observations faites en microscopie électronique à transmission.

C'est donc la préparation par barattage qui a été adoptée pour la suite de ce travail.

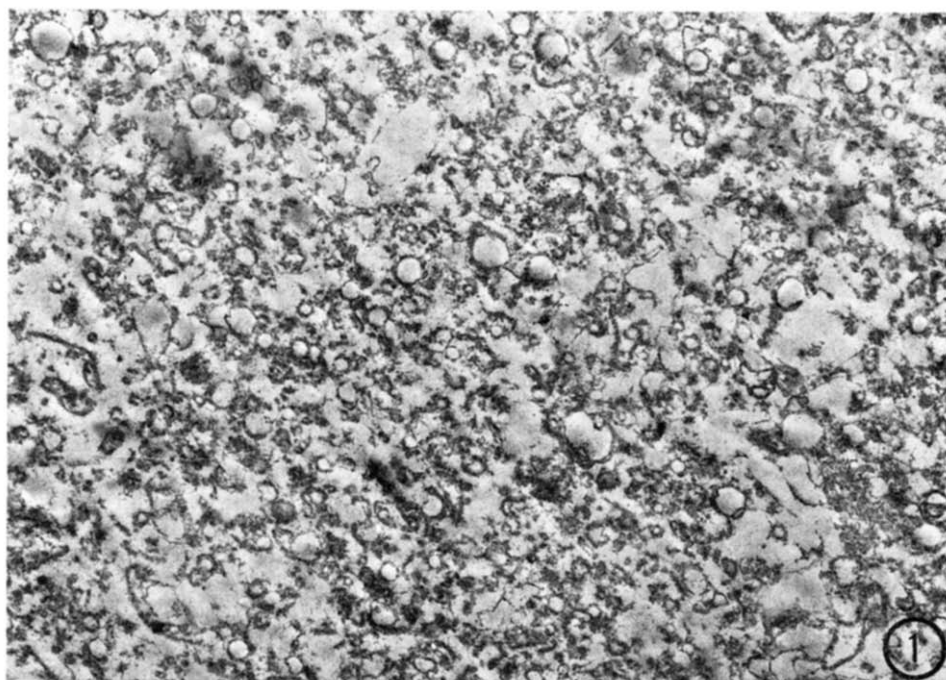


Fig. 1. Membranes obtenues par barattage. Noter la présence de nombreuses microvésicules. Coloration acétate d'uranyle + citrate de plomb. $\times 12\,500$.

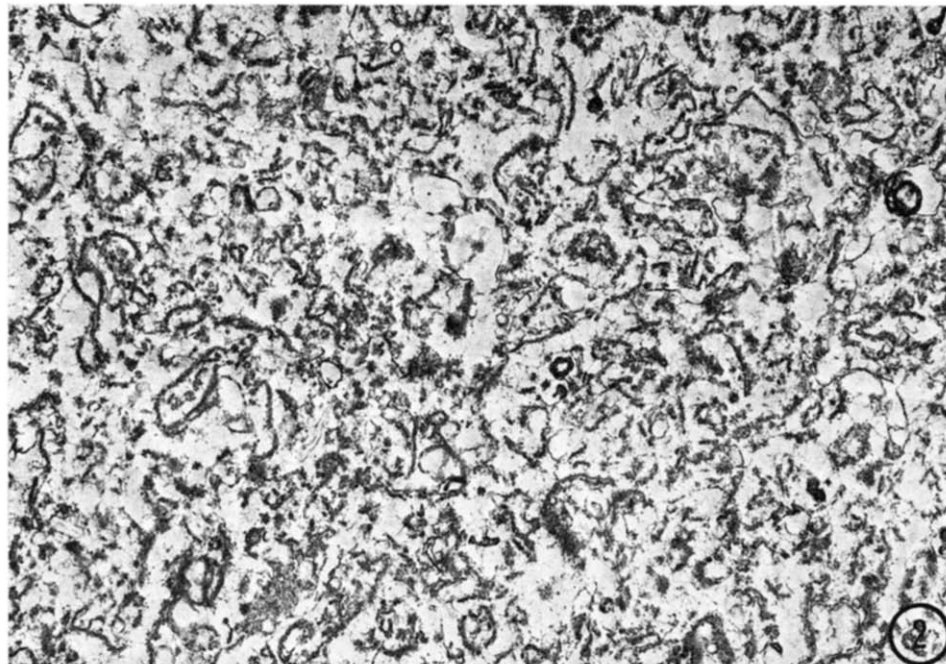


Fig. 2. Membranes obtenues par congélation-décongélation. Noter l'absence de microvésicules et la présence de "fragments" de membranes. Coloration acétate d'uranyle + citrate de plomb. $\times 12\,500$.

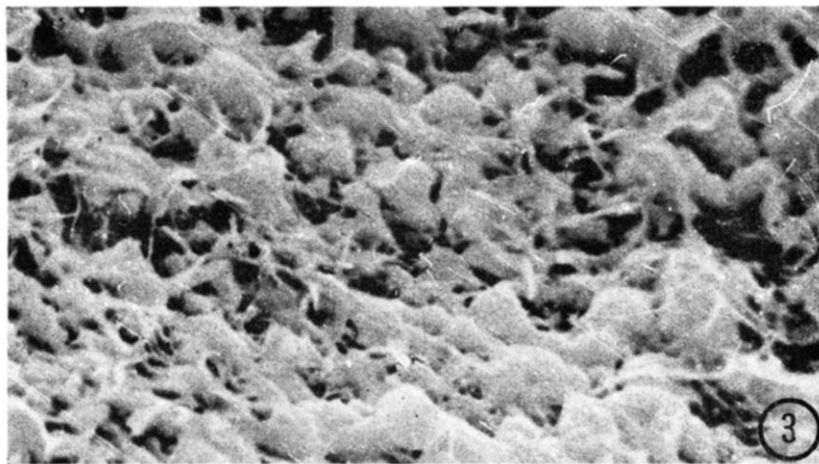


Fig. 3. Membranes obtenues par barrattage. Microscope à balayage. Présence de microvésicules. Coloration acétate d'uranyle + citrate de plomb. $\times 17000$.



Fig. 4. Membranes obtenues par congélation-décongélation. Microscope à balayage. Absence de microvésicules, fragments de membranes étalées. Coloration acétate d'uranyle + citrate de plomb. $\times 22000$.

(2) *Analyses chimiques*

Les dosages des constituants glucidiques, lipidiques et nucléiques sont rapportés dans le Tableau II. Les chiffres représentent la moyenne d'essais réalisés sur trois préparations différentes, correspondant chacune au lait d'une seule mère. Il existe des variations individuelles relativement importantes, remarquées également chez la vache par Anderson et Cheeseman⁶.

TABLEAU II

COMPOSITION EN GLUCIDES, LIPIDES ET ACIDES NUCLÉIQUES DES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES DU LAIT MATERNEL

Les valeurs sont exprimées en mg/mg de protéine sauf pour les glycérides dont le taux est exprimé en nmoles/mg de protéine.

<i>Component</i>	<i>Composition (mg/mg de protéine)</i>
Hexoses	0.045 ± 0.02
Hexosamines	0.044 ± 0.015
Acide sialique	0.018 ± 0.01
Lipides totaux	1.46 ± 0.5
Phospholipides	0.085 ± 0.03
Cholesterol libre	0.051 ± 0.02
Cholesterol estérifié	0.01 ± 0.005
Cholesterol/phosphore lipidique (rapport molaire)	1.4
Glycérides	40 ± 20
Acide ribonucléique	0.015 ± 0.01
Acide désoxyribonucléique	0

Les valeurs d'oses neutres et d'acide sialique des membranes des globules lipidiques du lait humain sont voisines de celles du lait bovin⁹. Il est difficile de comparer les chiffres que nous avons obtenus pour les osamines de ceux publiés par les mêmes auteurs, car ils sont exprimés en mole % par rapport aux acides aminés.

La chromatographie en couche mince permet d'identifier le galactose, la glucosamine et le glucose. La présence de glucose, qui n'est pas un constituant des glycoprotéines humaines, peut être attribuée à des glycolipides, car la libération des glucides analysés par chromatographie a été réalisée à partir des membranes totales.

Une analyse qualitative des glycérides a montré une nette prédominance des triglycérides par rapport aux diglycérides, les monoglycérides ne se trouvant qu'à l'état de traces; ces constatations sont en accord avec les chiffres de Bracco *et al.*⁷: 58% de triglycérides, 8.1% de diglycérides et traces de monoglycérides. Mais, là encore, l'expression différente des résultats ne permet pas de comparer les valeurs totales des glycérides. Notre chiffre moyen, 40 nmoles/mg de protéine, est voisin de celui donné par Colbeau *et al.*²⁷ pour les microsomes du foie de rat.

On note également la présence d'acides gras libres. Il faut d'ailleurs envisager la possibilité d'une contamination par les lipides du beurre.

Le taux de phospholipides paraît faible; en revanche, celui de cholestérol est très voisin de ceux publiés pour les membranes des globules lipidiques humains⁷ ou

bovins⁹. La sphingomyéline, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanoline, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol ont été identifiés comme dans les membranes bovines¹.

La présence d'acide nucléique avait été signalée dans les membranes des globules lipidiques bovins²⁸. La Fig. 5 donne le diagramme d'ultracentrifugation en gradient de saccharose des acides ribonucléiques des membranes des globules lipidiques

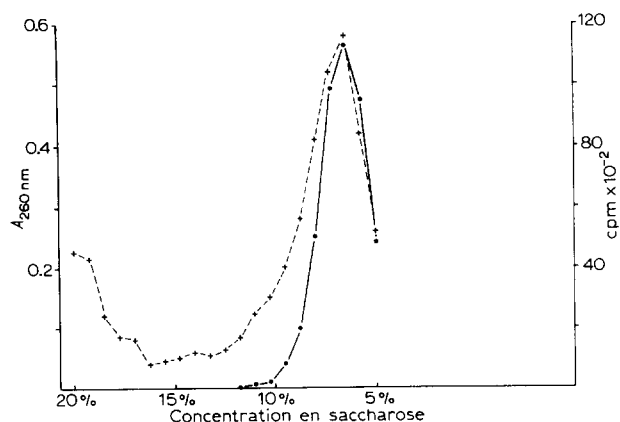


Fig. 5. Centrifugation en gradient de saccharose 5–20% pendant 16 h à 20000 rev./min dans le rotor SW 25-1 d'une ultracentrifugeuse Spinco, modèle L du RNA des membranes des globules lipidiques et d'un témoin RNA soluble de levure (4 S) marqué au ³H. +---+, $A_{260\text{ nm}}$; ●—●, radioactivité ³H.

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES DU LAIT MATERNEL

Les valeurs sont exprimées en mole %. Elles sont calculées par extrapolation des résultats obtenus après 24 h et 48 h d'hydrolyse. Le tryptophane et la demi-cystine n'ont pas été déterminés.

Acide aminé	Composition en acides aminés (mole %)
Lysine	8.5
Histidine	4.6
Arginine	9
Acide aspartique	9.1
Thréonine	6.4
Sérine	6.6
Acide glutamique	12
Proline	6.7
Glycocolle	7.9
Alanine	8.3
Valine	7.5
Isoleucine	5.1
Leucine	8.3
Tyrosine	1.2
Phénylalanine	2.4

humaines. Un seul pic d'absorbance apparaît, correspondant à une faible vitesse de sédimentation, caractéristique des RNA de membranes.

Le dosage des acides aminés est donné dans le Tableau III. Bien que la composition en acides aminés d'un mélange de protéines ne soit que d'un intérêt limité, on peut constater cependant que les valeurs obtenues sont assez voisines de celles publiées par Kobyłka et Carraway⁹ pour les membranes des globules lipidiques bovins, avec, en particulier, des taux élevés d'acide glutamique et d'acide aspartique.

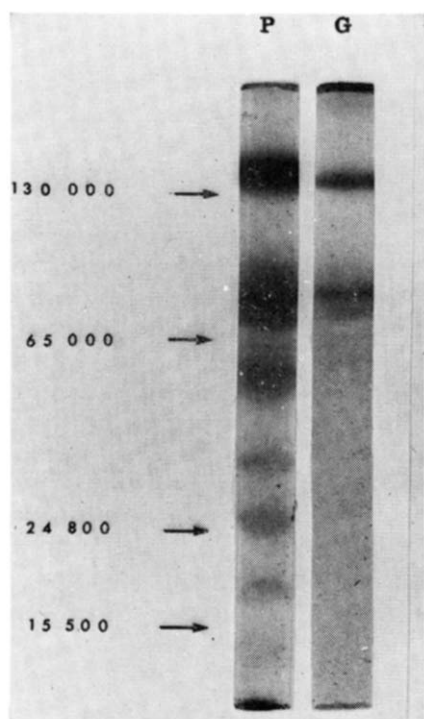


Fig. 6. Electrophorèse en gel d'acrylamide des protéines des membranes des globules lipidiques du lait humain, solubilisées dans le dodécyl sulfate de sodium à 3 %. P, révélation des protéines par le bleu de Coomassie. Dépôt approximatif: 150 μ g de protéines. G, révélation des sucres par la méthode périodate-Schiff. Dépôt approximatif: 500 μ g de protéines. Les flèches marquent la position des marqueurs dont les poids moléculaires sont indiqués.

L'électrophorèse en gel d'acrylamide des protéines membranaires solubilisées par le dodécyl sulfate de sodium est représentée sur la Fig. 6, avec la double révélation protéines-glucides. Les essais effectués sur plusieurs préparations donnent sensiblement la même répartition; ainsi, on retrouve toujours les deux bandes glycoprotéiques majeures. Si l'on se réfère aux marqueurs utilisés, leurs poids moléculaires apparents seraient respectivement de 160 000 et 84 000.

DISCUSSION

Les deux méthodes de préparation, homogénéisation et congélation-décongélation ont été utilisées pour préparer les membranes des globules lipidiques du lait

bovin, mais à notre connaissance, aucune étude comparative n'a été effectuée. Dans le cas des membranes du lait humain, les critères biochimiques et morphologiques confirment l'intérêt de l'homogénéisation. La présence, uniquement dans les membranes préparées par cette méthode, d'une activité de transfert de galactose à des accepteurs endogènes, par définition membranaire, est particulièrement intéressante. Cette activité est en effet caractéristique de l'appareil de Golgi. Rappelons que, dans un travail antérieur⁵, nous y avons également mis en évidence une activité thiamine pyrophosphatase, absente de la phase soluble, confirmant ainsi la présence d'éléments golgiens dans les membranes des globules lipidiques du lait humain.

Les difficultés d'obtention en quantité suffisante du lait humain n'ont pas permis de réaliser une étude quantitative aussi précise des principaux constituants des membranes des globules lipidiques que celles qui ont été effectuées pour le lait bovin. Néanmoins, aussi bien pour les glucides que pour les lipides ou les acides aminés, un certain nombre de concordances ont pu être mises en évidence.

D'ailleurs, il paraît vraisemblable que les membranes des globules lipidiques du lait humain sont hétérogènes. Une récente étude morphologique de mécanisme de la sécrétion lactée de la chèvre, du cobaye et de la vache²⁹ montre que les membranes des globules lipidiques portent sur leur surface interne un matériau dense qui dériverait du cytoplasme. Nous-mêmes avons montré la présence d'enzymes marqueurs, non seulement de l'appareil de Golgi et des membranes plasmiques, mais encore du réticulum endoplasmique. Cette observation confirme donc que les membranes des globules lipidiques du lait humain comportent plusieurs populations membranaires.

Il apparaît ainsi nécessaire de soumettre ces membranes à un fractionnement du type de ceux que l'on utilise pour obtenir des fractions submicrosomiques. Des essais préliminaires par gradient discontinu de saccharose se sont avérés efficaces. Une étude plus approfondie de la constitution et des structures des sous-fractions ainsi obtenues semble donc s'imposer, à condition que l'on ne soit pas limité par les difficultés d'obtention de ce matériel rare qu'est maintenant le lait humain frais.

RÉSUMÉ

Les membranes des globules lipidiques du lait maternel ont été préparées par congélation-décongélation et par barattage. Cette dernière méthode donne le meilleur rendement en protéine ainsi qu'en activité lactosamine synthétase. Des contrôles morphologiques effectués en microscopie électronique par transmission ou à balayage confirment les résultats biochimiques. La composition en protéines, aminoacides, sucres, lipides et acide nucléique est déterminée. L'analyse des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide met en évidence deux glycoprotéines majeures correspondant respectivement à des poids moléculaires de 160 000 et 84 000. L'ultra-centrifugation en gradient de saccharose montre que les acides nucléiques ont une vitesse de sédimentation faible.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Uzan et Monsieur le Docteur E. Vicario dont la compréhension et l'aide nous furent indispensables pour l'exécution de la microscopie à balayage.

REFERENCES

- 1 Keenan, T. W., Morré, D. J., Olson, D. E., Yunghans, W. N. et Patton, S. (1970) *J. Cell. Biol.* 44, 80-93
- 2 Dowben, R. M., Brunner, J. R. et Philpott, D. E. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 1-10
- 3 Shahani, K. M. (1966) *J. Dairy Sci.* 49, 907-920
- 4 Patton, S. et Trams, E. G. (1971) *FEBS Lett.* 14, 230-232
- 5 Martel-Pradal, M. B. et Got, R. (1972) *FEBS Lett.* 21, 220-222
- 6 Anderson, M. et Cheeseman, G. C. (1971) *J. Dairy Res.* 38, 409-417
- 7 Bracco, U., Hidalgo, J. et Bohren, H. (1972) *J. Dairy Sci.* 55, 165-172
- 8 Anderson, M., Cheeseman, G. C., Knight, D. J. et Shipe, W. F. (1972) *J. Dairy Res.* 39, 95-105
- 9 Kobylka, D. et Carraway, K. L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 288, 282-295
- 10 Munro, H. N. et Fleck, A. (1966) *Analyst* 91, 78-88
- 11 Cheftel, C. et Bouchilloux, S. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 170, 15-28
- 12 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 13 Winzler, R. J. (1955) dans *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D., ed.), Vol. 2, pp. 290-292, Interscience, New York
- 14 Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1975
- 15 Elson, L. A. et Morgan, W. J. (1933) *Biochem. J.* 27, 1824-1828
- 16 Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497-509
- 17 Chen, P. S. Jr., Toribara, T. Y. et Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756-1758
- 18 Eggstein, M. et Freutz, F. H. (1966) *Klin. Wochenschr.* 44, 262-267
- 19 Assous, E. F. et Girard, M. L. (1962) *Ann. Biol. Clin.* 20, 973-986
- 20 Ferrand, P. et Rieffel, C. (1958) *Ann. Biol. Clin.* 16, 299-307.
- 21 Lowry, R. R. (1968) *J. Lipid Res.* 9, 397
- 22 Parsons, J. G. et Patton, S. (1967) *J. Lipid Res.* 8, 696-698
- 23 Wagner, H., Hörhammer, L. et Wolff, P. (1961) *Biochem. Z.* 334, 175-184
- 24 Glossman, H. et Neville, D. J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6339-6346
- 25 Scherrer, K. et Darnell, J. E. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 486-490
- 26 Britten, R. J. et Roberts, R. B. (1960) *Science* 131 32-33
- 27 Colbeau, A., Nachbaur, J. et Vignais, P. M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 462-492
- 28 Swope, F. C. et Brunner, J. R. (1965) *J. Dairy Sci.* 48, 1705-1707
- 29 Wooding, F. B. P. (1971) *J. Cell. Sci.* 9, 805-821