

This preliminary result indicates that iPA exhibits a protective effect on mice exposed to lethal doses of whole-body radiation. The mechanism of radioprotection of this compound is not known at this time. It is noteworthy that iPA can either stimulate or inhibit DNA synthesis, transformation, and mitosis in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, depending on the time of treatment and the concentration used^{14, 15}. Our results show that intermediate concentrations of iPA (0.01 to 0.05 $\mu\text{g/g}$ body wt.) produce a radioprotective effect in lethally irradiated mice. It is suggested that this effect in mice by iPA occurs through the stimulation of their lymphocytes. Additional experiments are underway with iPA to further characterize the radioprotective mechanism of this compounds¹⁶.

Zusammenfassung. (iPA) bewirkt bei Mäusen, die mit einer letalen Ganzkörperdosis bestrahlt wurden, einen Schutzeffekt. Diese Verlängerung der mittleren Über-

lebenszeit wird mit einer Dosierung von 0,01 bis 0,05 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht erreicht.

N. PRASAD, S. C. BUSHONG
and H. L. BARTON

*Department of Radiology, Baylor College of Medicine,
and Veterans Administration Hospital,
Houston (Texas 77025, USA), 23 March 1971.*

¹⁴ R. C. GALLO, J. WHANG-PENG and S. PERRY, *Science* **165**, 400 (1969).

¹⁵ B. HACKER and T. L. FELDBUSH, *Biochem. Pharmac.* **18**, 847 (1969).

¹⁶ This investigation was partially supported by the American Cancer Society Institutional Research Grant No. ACS-IN-27L/P-20. The authors wish to thank BETTY H. CHEATHAM and SHARON A. BRINEY for their technical assistance.

Evolution du métabolisme des lécithines dans la membrane érythrocytaire au cours de la conservation du sang

Les différents constituants du sang subissent des modifications au cours de la conservation et il est important de déterminer l'état métabolique d'un sang après un certain temps de stockage. Plusieurs critères peuvent être utilisés pour caractériser ces possibilités métaboliques parmi lesquels l'activité de la biosynthèse des phospholipides érythrocytaires. Cette biosynthèse qui est assez faible in vivo a été étudiée in vitro sur le sang frais par incorporation de ³²P soit dans le sang total¹ soit dans les hématies^{2, 3}. Après incorporation de ³²P dans les hématies, PAYSANT-DIAMENT et POLONOVSKI³ constatent que les acides phosphatidiques sont très fortement radioactifs. SCHMIDT et al.³ trouvent de plus une radioactivité importante dans les lysophosphatidyléthanolamines, les lécithines et les sphingomyélines. La biogenèse des phospholipides a été également étudiée avec les membranes érythrocytaires: OLIVEIRA et VAUGHAN⁴, LANDS et al.^{5, 6} ont montré qu'une activité d'acyltransférase pouvait être mise en évidence dans les membranes cellulaires des érythrocytes humains, l'acide linoléique étant préférentiellement fixé sur le carbone 2 d'une 1-acyl-glycérol phosphorylcholine.

Pour évaluer l'état métabolique de la membrane globulaire au cours de la conservation du sang, nous avons étudié l'incorporation de l'acide linoléique par les membranes érythrocytaires.

Méthodes. Nous avons utilisé le sang de douze donneurs, 6 hommes et 6 femmes, prélevé sur une solution citrate-glucose ayant la composition suivante: acide citrique, H₂O 0,67 g, citrate trisodique, 2 H₂O 2,63 g, glucose anhydre 2 g, H₂O distillée q.s.p. 100 ml.

450 ml de sang sont recueillis sur 75 ml de cette solution, le mélange est ensuite divisé en 5 échantillons conservés à 4°C. Les membranes érythrocytaires de chaque échantillon sont étudiées au temps initial et au bout de 8 jours, 15 jours, 29 jours et 43 jours. La préparation des membranes est effectuée par la méthode de DODGE, MITCHELL et HANAHAN⁷, toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Le sang est centrifugé pendant 20 min à 1000 g, les érythrocytes obtenus sont lavés 3 fois par un tampon phosphate 0,109 M de pH 7,4, puis hémolysés en tampon phosphate 0,0054 M de pH 7,4 pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g pendant 40 min, on obtient un culot de stromas qui est lavé 3 fois par un tampon phosphate 0,0054 M. Le culot final est placé dans 3 ml de tampon

0,0054 M de pH 7,4. On obtient une suspension de membranes blanche ou légèrement rosée, homogène au microscope optique et donnant des images satisfaisantes en microscopie électronique⁸. Les protéines de la suspension membranaire sont dosées par la méthode du biuret rapide⁹ et l'hémoglobine par la méthode de STORCK et ARDY¹⁰, la quantité d'hémoglobine présente dans les stromas est toujours très faible.

Un volume de 0,5 ml à 1 ml de la suspension de stromas correspondant à 3 mg de protéines est mis en incubation pendant 90 minutes à 37°C avec 6,25 nmoles de linoléate de potassium ¹⁴C, 125 μmoles de phosphate pH 7,4, 3 μmoles de MgCl₂, 2 μmoles d'ATP et 0,1 μmole de coenzyme A dans un volume total de 3 ml. Après incubation, les lipides sont extraits du milieu réactionnel par la méthode de FOLCH¹¹ et fractionnés par chromatographie sur colonne d'acide silicique, l'élution est effectuée successivement par éther-benzène 1:1, éther-éthanol 1:1 et méthanol⁸. La fraction éluée par le méthanol est étudiée par chromatographie sur couches minces de gel de silice G avec le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65:25:8:4) et révélation par l'iode ou le réactif de Dittmer modifié¹². La position des taches radioactives est indiquée par autoradiographie et la radioactivité est me-

¹ C. E. ROWE, *Biochem. J.* **73**, 438 (1959).

² M. PAYSANT-DIAMENT et J. POLONOVSKI, *Bull. Soc. Chim. biol.* **42**, 4 (1960).

³ P. M. SCHMIDT, M. BOULARD et Y. NAJEAN, *Schweiz. med. Wschr.* **46**, 100 (1970).

⁴ M. M. OLIVEIRA et M. VAUGHAN, *J. Lipid Res.* **5**, 156 (1964).

⁵ A. F. ROBERTSON et W. E. M. LANDS, *J. Lipid Res.* **5**, 88 (1964).

⁶ K. WAKU et W. E. M. LANDS, *J. Lipid Res.* **9**, 12 (1968).

⁷ J. T. DODGE, C. MITCHELL et D. J. HANAHAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119 (1963).

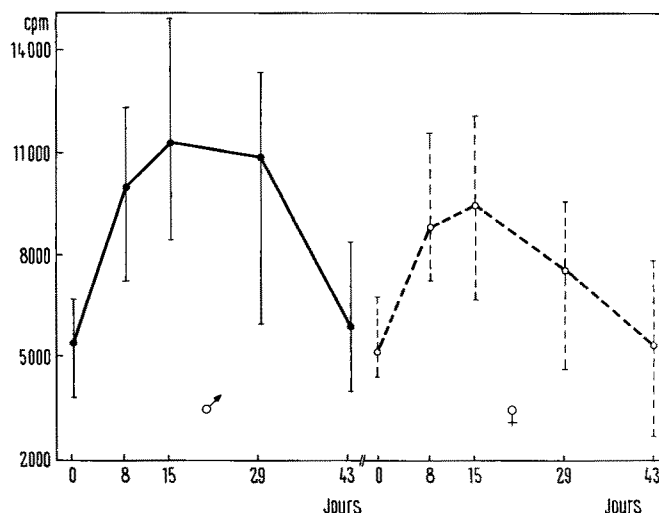
⁸ Les clichés de microscopie électronique ont été effectués par le Dr P. BRYON, Service de Microscopie électronique, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.

⁹ T. A. WEISCHSELBAUM, *Analyt. Biochem.* **2**, 335 (1961).

¹⁰ J. STOCK et R. ARDRY, *Ann. Biol.* **1957**, 197.

¹¹ J. FOLCH, M. LEES et G. H. SLOANE-STANLEY, *J. biol. Chem.* **226**, 497 (1957).

¹² V. E. VASKOVSKY et Y. KOSTETSKY, *J. Lipid Res.* **9**, 396 (1968).



Les courbes représentent les moyennes de 6 échantillons mâles et de 6 échantillons femelles. Les variations individuelles sont indiquées pour chaque temps de conservation. Pour la mesure de l'incorporation un volume de suspension membranaire correspondant à 3 mg de protéines (0,5 ml à 1 ml suivant les préparations) est placé dans le milieu d'incubation suivant: tampon phosphate pH 7,4 125 μ moles, $MgCl_2$ 3 μ moles, CoA 0,1 μ mole, linoléate de potassium ^{14}C activité spécifique 52,9 mC/mmmole 6,25 nmoles, le volume total est 3 ml. Après incubation pendant 90 min à 37°C le mélange est extrait par chloroforme-méthanol (1:1), l'extrait est chromatographié sur colonne d'acide silicique et la radioactivité de la fraction éluée par le méthanol est mesurée. Les résultats sont exprimés en cpm/mg de protéines membranaires.

surée sur un passeur automatique Biospan 4342 Nuclear Chicago.

Résultats. La fraction éluée par le méthanol à partir de la chromatographie sur acide silicique renferme 2 composés essentiels et un composé mineur séparés par chromatographie sur couches minces de gel de silice dans le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65:25:8:4). Les deux composés principaux de $R_f = 0,44$ et 0,33 ont une réaction positive au réactif de Dragendorff (formule de BREGOFF et al.¹³), par comparaison avec les R_f s de phospholipides témoins, ils se comportent respectivement comme des lécithines et des sphingomyélines.

Les fractions méthanoliques des extraits lipidiques provenant d'incubations après différents temps de conservation donnent des chromatogrammes analogues sur couches minces de gel de silice, l'autoradiographie décèle une seule tache radioactive correspondant aux lécithines. La mesure de la radioactivité effectuée sur la fraction méthanolique totale permet donc de déterminer le taux d'incorporation du linoléate dans les lécithines. Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure.

Discussion. L'incorporation de l'acide linoléique dans les membranes varie largement avec les individus, ces variations individuelles vont en s'amplifiant au cours de la conservation. Cependant tous les échantillons montrent une augmentation de l'incorporation pouvant aller jusqu'à 3 fois la valeur initiale au cours des deux premières semaines de conservation. Cette augmentation est plus importante chez les hommes que chez les femmes. Le taux d'incorporation diminue ensuite et devient sensiblement égal à la valeur initiale au bout de 4 à 6 semaines de conservation. On peut proposer une explication à ces variations: l'acide linoléique est fixé préférentiellement sur l'atome de carbone 2 du glycérol dans les phospholipides, WAKU et LANDS⁸ ont montré que cette fixation pouvait être réalisée dans les membranes érythrocytaires par une transacylation linoléyl-CoA-1-monoacyl phosphoglycéride. La biosynthèse des lécithines que nous avons observée est vraisemblablement le résultat d'une telle transacylation. Parmi les substrats nécessaires, la 1-acyl-glycérylphosphorylcholine n'existe qu'en très faible quantité dans les globules de sang frais¹⁴. Il est possible qu'au cours de la conservation une activité phospholipasique A conduise à la formation de lysolécithine, ainsi pourrait s'expliquer l'accroissement de la synthèse dans les premières semaines. La diminution de cette synthèse au cours de la conservation pourrait être ensuite la consé-

quence du vieillissement progressif des globules entraînant un ralentissement général de l'activité métabolique.

Parallèlement des modifications apparaissent dans la membrane au cours de la conservation: après 15 jours la résistance osmotique et mécanique des globules diminue et s'accompagne d'une hémolyse de plus en plus importante. La morphologie subit également des changements, on observe l'apparition de formes crénelées qui augmentent dans les 15 premiers jours de conservation pour faire place ensuite à des sphérocytes. Il est certain que ces modifications traduisent des changements importants aussi bien dans la constitution de la membrane érythrocytaire que dans son équipement enzymatique. Il semble en tout cas que du point de vue de la biosynthèse des lécithines globulaires les possibilités métaboliques de la membrane se conservent intactes pendant deux semaines environ et qu'elles s'affaiblissent au-delà de cette période. Il serait intéressant d'étudier les variations éventuelles de cette biosynthèse avec d'autres milieux de conservation.

Summary. Incorporation of linoleic acid ^{14}C by human erythrocyte membranes at different stades of blood conservation was studied for evaluating the metabolic state of these membranes. The incorporation was found to increase during the first two weeks of conservation for female and male blood, with important individual variation. However, this increase was more important for male blood. Then the incorporation decreased until the end of experimentation, after 6 weeks of conservation.

M. CIAVATTI¹⁵ et G. MICHEL

Laboratoire de Chimie Biologique,
Université Claude Bernard-Lyon I,
43, boulevard du 11 novembre 1918,
F-69 Villeurbanne (France), 19 mai 1971.

¹³ H. M. BREGOFF, E. ROBERTS et C. C. DELWICHE, J. biol. Chem. 205, 565 (1953).

¹⁴ C. F. REED, S. N. SWISHER, G. V. MARINETTI et E. G. EDEN, J. Lab. clin. Med. 56, 281 (1960).

¹⁵ Chercheur du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon, Service du Dr A. JOUVENCEAUX.