

Medicine. — *Sur les couches monomoléculaires des protéines et des lipoides de poumon normal ou intoxiqué par le phosgène.* Par E. GORTER, J. J. HERMANS et ONG SIAN GWAN.

(Communicated at the meeting of October 31, 1942.)

1. Les protéines de poumon normal ou intoxiqué par le phosgène de porc ont des propriétés physiques et biologiques différentes. En effet, la solubilité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire et le spectre d'absorption dans l'ultra-violet des deux protéines montrent une différence nette¹). Cette différence se révèle également dans le choc anaphylactique du cobaye²).

Il serait intéressant de savoir comment se comportent les couches monomoléculaires des protéines et des lipoides de poumon normal ou intoxiqué de porc³).

2. *Technique expérimentale.*

Selon la technique habituelle 10 mm³ de solution de protéines pures sont soigneusement déposés tangentiellement à la surface de solution tampon. Celle-ci consiste pour le $pH < 3$ d'une solution d'acide chlorhydrique seule ou mélangée à une solution de chlorure de sodium et pour le $pH > 3$ d'un tampon véronal-acétate. La quantité de protéines dans la solution à examiner était déterminée par trois méthodes différentes : précipitation alcool-acétonique, pesée après évaporation d'une quantité déterminée, différence de pesées des protéines avant et après la dissolution.

Le poumon a été épuisé au Soxhlet à l'aide d'ether de pétrole ou d'acétone pendant 15 à 20 heures. La quantité de lipoides était déterminée par pesée après évaporation d'un volume connu. La solution tampon utilisée avait un $pH \sim 1$ ou $pH \sim 2$ (acide chlorhydrique 0,1 et 0,01 N). On employait 5 ou 10 mm³ pour une mesure.

3. *Résultat obtenu avec les protéines.*

La surface S en mètre carré occupée par un milligramme de protéines est égale à

$$S = A \times l$$

A est une constante dépendant de la largeur de la surface étudiée et de la concentration des protéines et l la longueur en c.m. de la surface. Il y a avantage de porter à l'ordonnée non la valeur de S , mais le logarithme de S

$$\log S = \log A + \log l$$

En effet, si l'on commet une erreur dans la détermination de la concentration des protéines et par suite la valeur de A , la forme de la courbe reste la même, de sorte qu'on peut la comparer avec une autre courbe.

La figure 1 et le tableau 1 montre les courbes $S = f(pH)$, pH étant la concentration en ions hydrogène de la solution tampon, de deux poumons de porc différents. Dans le poumon 123 les protéines ont été isolées à partir d'un poumon frais normal ou d'un poumon frais intoxiqué par le phosgène. La courbe du poumon normal 123 a deux maxima, qui

1) ONG SIAN GWAN, Proc. Ned. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, **44**, 872 et 1024 (1941)

2) ONG SIAN GWAN, *ibid*, **45**, 774 (1942).

3) Voir pour l'aperçu général des couches monomoléculaires de protéines: E. GORTER, Annual Review of Biochemistry, **10**, 619 (1941). E. GORTER, Surface tension and films in The Chemistry of the Amino Acids and Proteins by CARL L. A. SCHMIDT, U.S.A.

montrent que la solution examinée contient deux protéines différentes. Les maxima correspondent à des points isoélectriques des protéines. Si l'on compare cette courbe avec celle du poumon intoxiqué 123, on constate que la dernière courbe a une forme semblable, elle est cependant aplatie et abaissée. Les maxima et le minimum sont déplacés vers le pH supérieur. Un autre poumon frais 125 examiné de cette manière a donné un résultat comparable.

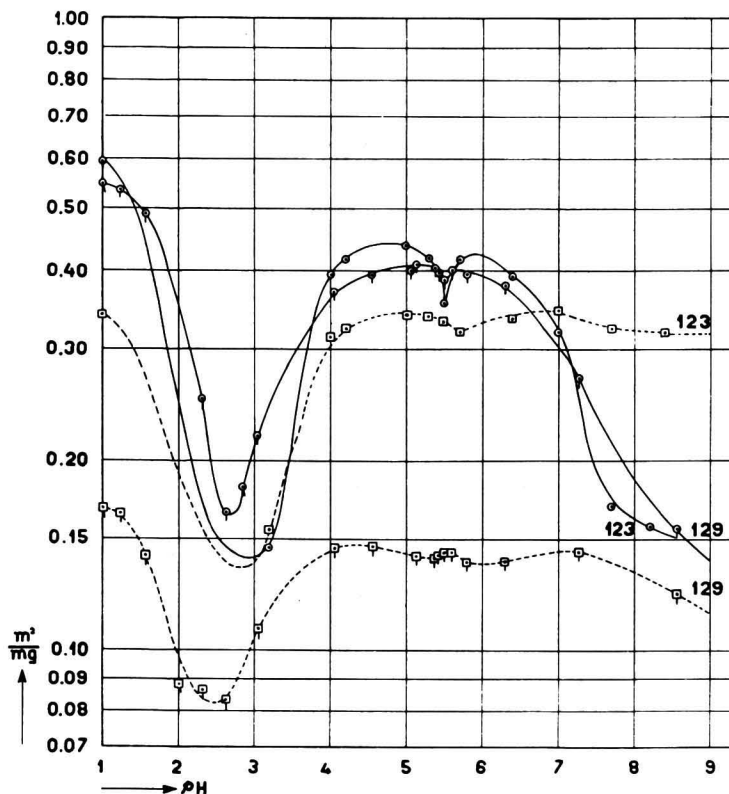


Fig. 1.

Relation entre la surface en m^2 par mg de protéines et le pH en coordonnées semi-logarithmiques.

- ○ ○ poumon normal
 --- □ □ poumon intoxiqué par le phosgène

La différence des courbes de poumon normal ou intoxiqué est encore plus marquée dans le poumon sec 129. Dans ce cas les protéines ont été isolées soit à partir de poumon desséché normal soit à partir de poumon desséché et ensuite intoxiqué. La courbe est fortement abaissée, ce qui indique qu'une partie de protéines ne s'étalent plus ou s'étalent moins complètement. Elle est dissoute ou bien elle est insoluble. L'étude de la forme des courbes montre que les groupements NH_2 de la molécule protéique ne sont pas attaqués par le phosgène. Par contre l'écart de la courbe du poumon normal avec celle du poumon intoxiqué à $pH = 7$ montre que les groupements $COOH$ ne sont plus libres après l'action de phosgène ¹⁾. Un autre poumon sec 130 examiné a donné un résultat semblable.

Ces résultats montrent qu'il existe une différence nette entre la courbe de poumon normal

1) Se rapporter à E. GORTER, H. VAN ORMONDT et T. M. MEYER, Biochem. J. 29, 38 (1935).

TABLEAU 1.
Relation entre la surface en m² par mg de protéines et le pH.

| pH | Poumon frais 123 | | pH | Poumon desséché 129 | |
|-----|------------------|----------------|------|---------------------|----------------|
| | S _n | S _i | | S _n | S _i |
| 1.0 | 0.592 | 0.350 | 1.01 | 0.548 | 0.168 |
| 3.2 | 0.145 | 0.155 | 1.23 | 0.534 | 0.165 |
| 4.0 | 0.387 | 0.314 | 1.57 | 0.490 | 0.141 |
| 4.2 | 0.416 | 0.324 | 2.00 | — | 0.882 |
| 5.0 | 0.437 | 0.340 | 2.32 | 0.250 | 0.865 |
| 5.3 | 0.418 | 0.338 | 2.63 | 0.166 | 0.832 |
| 5.5 | 0.355 | 0.333 | 2.85 | 0.182 | — |
| 5.7 | 0.416 | 0.321 | 3.05 | 0.219 | 0.108 |
| 6.4 | 0.392 | 0.336 | 4.05 | 0.371 | 0.145 |
| 7.0 | 0.319 | 0.345 | 4.55 | 0.394 | 0.146 |
| 7.7 | 0.169 | 0.324 | 5.06 | 0.399 | — |
| 8.2 | 0.157 | — | 5.13 | 0.408 | 0.141 |
| 8.4 | — | 0.319 | 5.38 | 0.404 | 0.140 |
| | | | 5.42 | 0.397 | 0.141 |
| | | | 5.50 | 0.387 | 0.143 |
| | | | 5.61 | 0.401 | 0.143 |
| | | | 5.80 | 0.394 | 0.138 |
| | | | 6.29 | 0.378 | 0.138 |
| | | | 7.28 | 0.271 | 0.143 |
| | | | 8.56 | 0.156 | 0.123 |

S_n, surface en m² par mg de protéines de poumon normal,

S_i, surface en m² par mg de protéines de poumon intoxiqué.

et celle de poumon intoxiqué. De plus, la courbe de poumon desséché intoxiqué se diffère de celle de poumon frais intoxiqué par un nombre d'étalement *S* plus petit, ce qui montre que l'action de phosgène est plus active dans le premier cas.

4. Action du phosgène sur les protéines étalées en couche monomoléculaire.

Il serait intéressant de savoir si la modification moléculaire après l'intoxication est immédiate et irréversible. Pour cela on étale une couche monomoléculaire de protéines sur la solution tampon et on fait agir le phosgène à travers un petit arrosoir en verre dur sur toute la surface étudiée (fig. 2).

En tenant l'ampoule de phosgène (point d'ébullition 8,2° C.) dans la main, le phosgène s'évapore graduellement. Dans l'expérience relatée on attend une minute après l'étalement, puis on fait agir le phosgène pendant une minute et on attend de nouveau deux minutes avant les mesures. La quantité de phosgène évaporée était 0,843 gr. On fait des expériences témoins sans phosgène avant et après l'expérience d'intoxication. Pour ces témoins on attend également 4 min. après l'étalement de la couche monomoléculaire. Les deux témoins ont donné sensiblement le même résultat. Pour le calcul on a pris la moyenne de ces témoins. La figure 3 montre le résultat de l'expérience à pH = 5,25.

La surface *S* occupée par 1 mg de protéines sous pression zéro est obtenue par extrapolation de la droite représentée par l'équation

$$S = a + b (F - \bar{F})$$

où *F* désigne la force en dynes/cm, *a* et *b* sont des constantes à déterminer. On trouve

| | | |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| protéines de poumon normal 135 | $a_1 = 275,5 \times 10^{-3}$ | $b_1 = 9,0 \times 10^{-3}$ |
| les mêmes après l'action de phosgène | $a_2 = 333,5 \times 10^{-3}$ | $b_2 = 8,6 \times 10^{-3}$ |

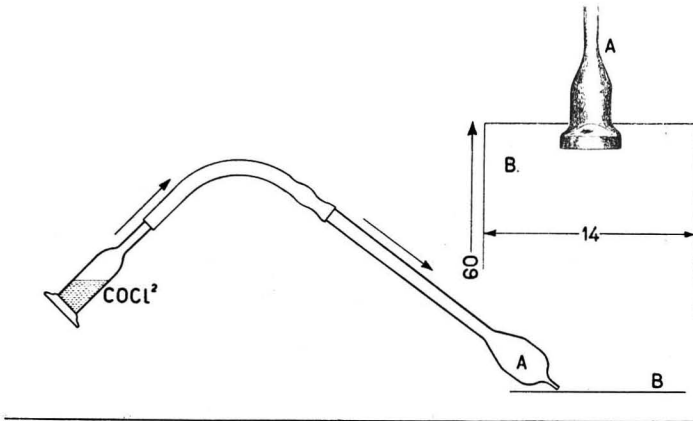


Fig. 2.

Action du phosgène sur la couche monomoléculaire de protéines.

A = arrosoir en verre dur

B = couche monomoléculaire de protéines.

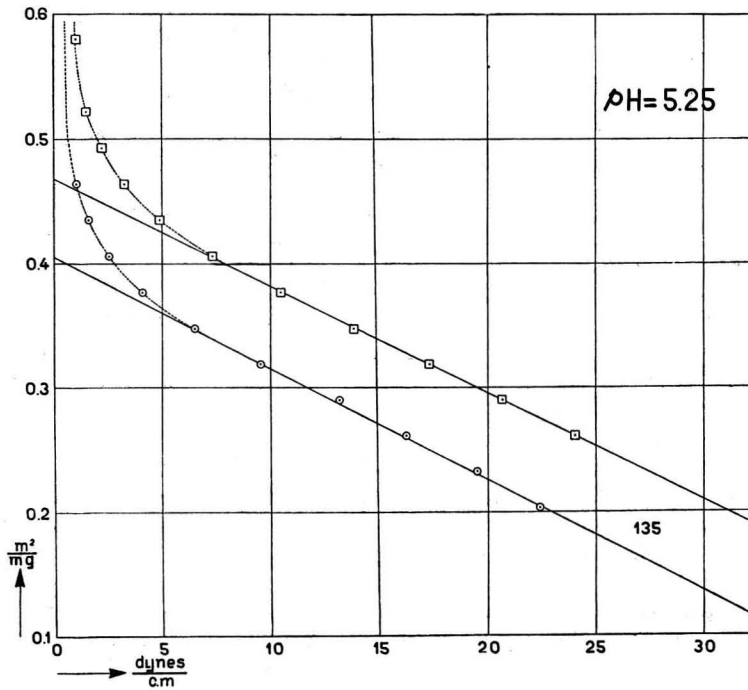


Fig. 3.

Relation entre la surface en m^2 par mg de protéines et la pression superficielle des protéines normales ou traitées par le phosgène. Poumon 135.

○ poumon normal

□ poumon intoxiqué

La surface occupée par 1 mg de protéines sous pression zéro est égale à

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| protéines de poumon normal | $S_1 = 0,405 \text{ m}^2/\text{mg}$ |
| les mêmes après l'action de phosgène | $S_2 = 0,468 \text{ m}^2/\text{mg}$ |

On peut se demander si la différence de surface observée $S_2 - S_1 = 0,063 \text{ m}^2/\text{mg}$ est réelle. L'écart type de la différence est égal à $\sigma_{S_2-S_1} = 1,906 \times 10^{-3}$ et le rapport $\frac{S_2-S_1}{\sigma_{S_2-S_1}} = 33,1$. La différence de surface observée est fortement significative. L'action de phosgène sur les protéines est donc immédiate. D'autres expériences réalisées à $\text{pH} = 1$ et $\text{pH} = 8,2$ donnent des résultats moins nets et difficiles à reproduire. Voici les moyennes de trois expériences chacune, à $\text{pH} = 1$, $S_1 = 0,499$, $S_2 = 0,516$ et à $\text{pH} = 8,2$, $S_1 = 0,192$ et $S_2 = 0,224 \text{ m}^2/\text{mg}$.

5. Résultat obtenu avec les lipoides.

Les lipoides ont donné des résultats reproduits dans le tableau 2. La surface moyenne par mg de lipoides est égale à $\bar{S}_n = 0,583 \text{ m}^2$ pour le poumon normal et $\bar{S}_i = 0,718 \text{ m}^2$ pour le poumon intoxiqué.

La différence de ces moyennes est-elle significative. A l'aide de la distribution de t , on trouve $t = 2,363$ et la probabilité pour que, $t > 2,363$ est égale à $P = 0,06$. La différence est significative, mais elle n'est pas très marquée. Si l'on avait examiné trois extraits lipoidiques de plus dans les mêmes conditions, on aurait $P < 0,01$ et la différence deviendrait très significative.

TABLEAU 2.

Lipoides de poumon normal et de poumon intoxiqué par le phosgène.

| | Poumon normal | | Poumon intoxiqué | | Différence $S_i - S_n$ |
|--|---------------|-------|------------------|-------|---------------------------|
| | S'_n | S_n | S'_i | S_i | |
| Poumon 135, extrait acétonique | 2.22 | 0.49 | 5.87 | 0.77 | +0.28 |
| Poumon 135, extrait à l'éther de pétrole | 2.36 | 0.56 | 1.89 | 0.64 | +0.08 |
| Poumon 133, extrait acétonique | 7.07 | 0.70 | 4.74 | 0.79 | +0.09 |
| Poumon 133, extrait à l'éther de pétrole | 2.37 | 0.58 | 2.72 | 0.67 | +0.09 |
| Moyennes | | 0.583 | | 0.718 | +0.135 |

S'_n et S_n , surface en m^2 par cc d'extrait lipoidique ou par mg de lipoides de poumon normal.

S'_i et S_i , surface en m^2 par cc d'extrait lipoidique ou par mg de lipoides de poumon intoxiqué.

On peut en conclure que la différence obtenue $S_i - S_n$ est due à des variations qualitatives des substances lipoidiques. On sait que le nombre d'étalement S d'une substance lipoidique est d'autant plus élevé à mesure qu'elle contient plus de groupes polaires par molécule. Ainsi, par exemple, l'acide oléique occupe une surface deux fois plus grande que l'acide palmitique. Le même résultat a été observé entre la lécithine et la hydrolycithine, de même entre l'acide myristique (C^{14}) à 40°C et l'acide stéarique (C^{18}) à la même température. Cette explication, y inclut le cas d'une oxydation de substances lipoidiques par le phosgène, nous paraît plus probable que celle qui attribue une plus grande étale-

ment par la formation de complexes qui s'étaient moins bien et qui pourraient être formés par polymérisation.

Il est à remarquer que les lipoides de poumon montrent des anomalies dans l'étalement moléculaire, comme on a constaté dans un mélange de lipoides différents.

6. *Points isoélectriques des protéines.*

La détermination du point isoélectrique a été réalisée à l'aide de poudre de quartz couvert d'une couche de protéines et placé dans un champ électrique (méthode de H. G. BUNGENBERG DE JONG). On trouve ainsi pour les protéines du poumon normal 123 un point isoélectrique égal à 4,58 et pour les protéines du même poumon intoxiqué la valeur 5,16. Il y a donc une différence nette. Elle se montre également dans la courbe $v = f(pH)$ où v désigne la vitesse des particules et pH la concentration en ions hydrogène. La courbe du poumon intoxiqué est plus aplatie, elle correspond à celle obtenue par les couches monomoléculaires (fig. 1).

(Laboratoire KAMERLINGH ONNES, Clinique médicale des Enfants de l'Université et Instituut voor preventieve Geneeskunde à Leyde).
