

Les acides gras du parenchyme des pommes

I. — ANALYSE DES ACIDES GRAS (Nouvelles techniques)

par **P. MAZLIAK**

Laboratoire de Physiologie Végétale appliquée, Sorbonne.

LES ACIDES GRAS DU PARENCHYME DES POMMES

I. — ANALYSE DES ACIDES GRAS (nouvelles techniques)

par P. MAZLIAK (Sorbonne)

Fruits, vol. 20, n° 10, nov. 1965, p. 559 à 564.

RÉSUMÉ. — Afin de réaliser diverses expériences physiologiques sur la biosynthèse des acides gras du parenchyme des pommes, une méthode rapide d'extraction et d'analyse de ces acides a été mise au point. La chromatographie en phase gazeuse permet de mettre en évidence les acides principaux suivants : palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléinique. Ces déterminations sont confirmées par diverses techniques complémentaires : formation de complexes mercuriques avec les acides insaturés, chromatographie sur couche mince de silice-nitrate d'argent.

Dans le cadre des recherches sur la lipogenèse dans les fruits actuellement en cours au laboratoire, diverses expériences nous ont montré que le parenchyme des pommes constitue un matériel biologique intéressant, permettant en particulier d'étudier la biosynthèse des acides gras insaturés [1]. Ces acides font surtout partie, dans le tissu vivant, des phospholipides [2] présents dans les membranes cytoplasmiques, les mitochondries, les membranes du reticulum endoplasmique, etc.

L'analyse des acides gras du parenchyme des pommes a été réalisée pour la première fois au laboratoire en 1963 [3]. La méthode utilisée à cette époque pour l'extraction des lipides du parenchyme était cependant inutilisable pour des expériences physiologiques nombreuses : 1 200 g de pulpe de pomme étaient broyés avec du sulfate de sodium, mis à sécher pendant 48 heures puis extraits par l'éther de pétrole. Outre qu'elle exigeait une grande quantité de matériel biologique, la méthode présentait l'inconvénient d'être très longue, ce qui favorisait la dégradation enzymatique ou l'auto-oxydation des lipides étudiés. D'autre part le solvant très apolaire utilisé pour l'extraction n'entraînait peut-être pas tous les phospholipides du tissu. Enfin les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras n'avaient été vérifiés par aucune méthode complémentaire.

Dans le présent article sont exposées les nouvelles techniques utilisées pour l'analyse des acides gras contenus dans 6 g de parenchyme de pomme. Cette quantité représente la masse de tissu utilisée dans une seule expérience de biosynthèse. L'extraction des acides est réalisée par saponification directe du tissu et les analyses chromatographiques sont contrôlées par diverses méthodes complémentaires.

Extraction des acides gras.

Les fruits utilisés sont des pommes de la variété Golden Delicious, cueillies vertes et placées en survie, au laboratoire, dans une chambre à 0° C. Les expériences sont conduites sur des fragments de parenchyme de fruits verts, en bon état physiologique. Les fragments sont découpés dans la partie médiane de la pulpe ; on a pris soin de n'utiliser dans les expériences ni la zone verte périphérique, ni la zone carpellaire.

Le tissu végétal est broyé avec un peu de sable de Fontainebleau dans 50 ml de potasse alcoolique (1 N). La saponification directe est poursuivie pendant deux heures sous reflux en entretenant une ébullition douce du mélange. Après séparation de l'insaponifiable à l'éther, les acides gras sont libérés par l'acide chlorhydrique, repris par l'éther de pétrole, puis méthylés par le mélange méthanol-trifluorure de bore selon la méthode de METCALFE et SCHMITZ (4). Les esters méthy-

liques des acides gras sont ensuite purifiés par une chromatographie préliminaire sur colonne d'acide silicique et élution à l'héptane, selon la recommandation de FULCO et BLOCH (5).

Chromatographie des acides totaux.

L'analyse du mélange global des esters méthyliques est conduite par chromatographie en phase gazeuse sur deux phases stationnaires : un polyester polaire (butane-diol-succinate) et une graisse silicone apolaire. Les Fig. 1 et 2 présentent les chromatogrammes obtenus ; les conditions expérimentales utilisées pour l'analyse sont indiquées en légende des figures. Les résultats analytiques sont groupés dans le tableau 1. Les identifications sont faites en tenant compte des volumes de rétention mesurés dans les deux systèmes chromatographiques utilisés ; avec ces deux systèmes, nous avons vérifié que les logarithmes des volumes de rétention mesurés pour les séries homologues d'acides

FIG. 1. — Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du parenchyme de pomme sur polyester polaire. S : pic de l'éther de pétrole. Conditions expérimentales : colonne en acier inoxydable ; longueur : 3 m ; diamètre intérieur : 6 mm ; phase stationnaire : butane-diol-succinate adsorbé sur Chromosorb W silanisé (20 g de phase stationnaire pour 100 g de support). Granulométrie du support : 60-80 mesh. Gaz vecteur : azote. Débit : 3 l/h. Température : 212° C. Détecteur à ionisation de flamme. Appareil Chromagas C. G. 1 (licence C. N. R. S.).

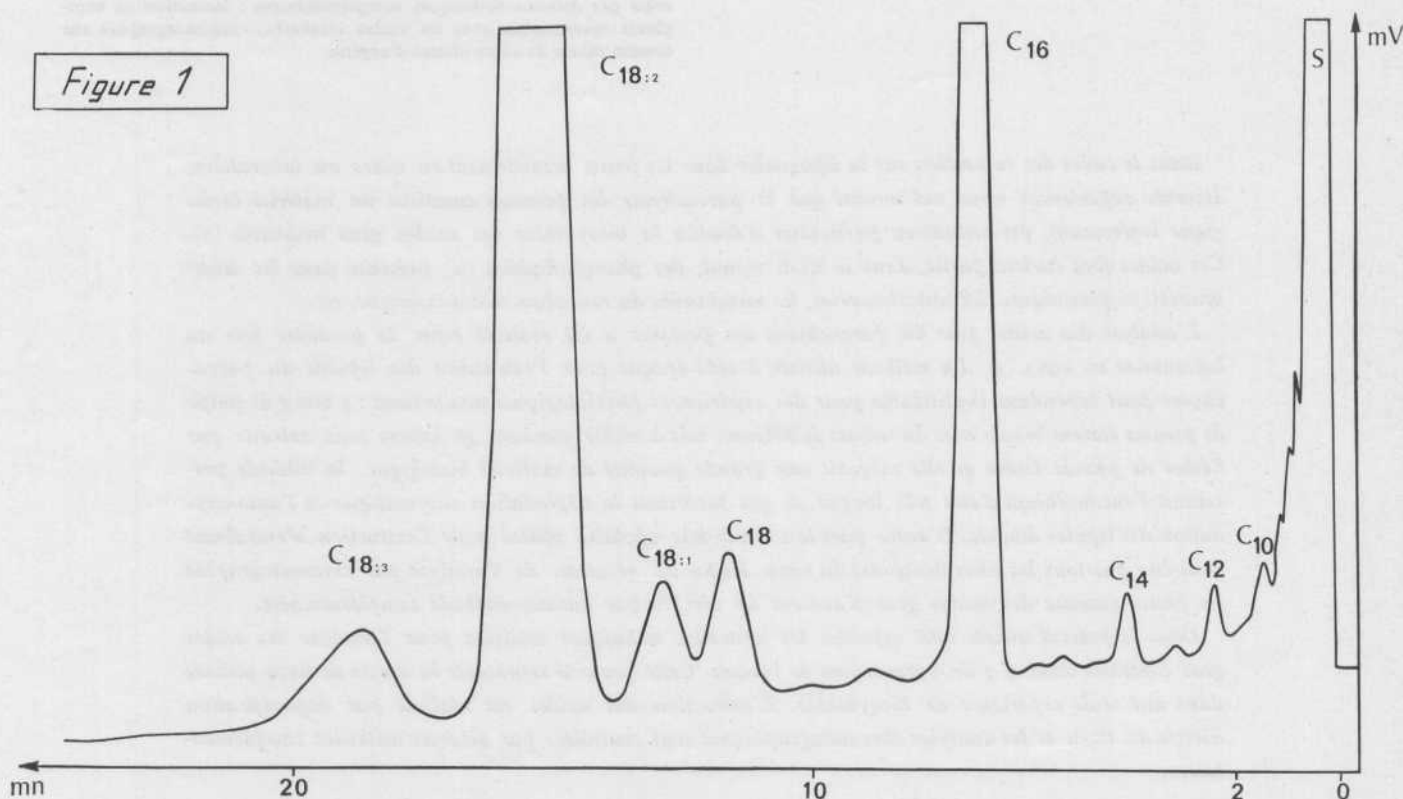


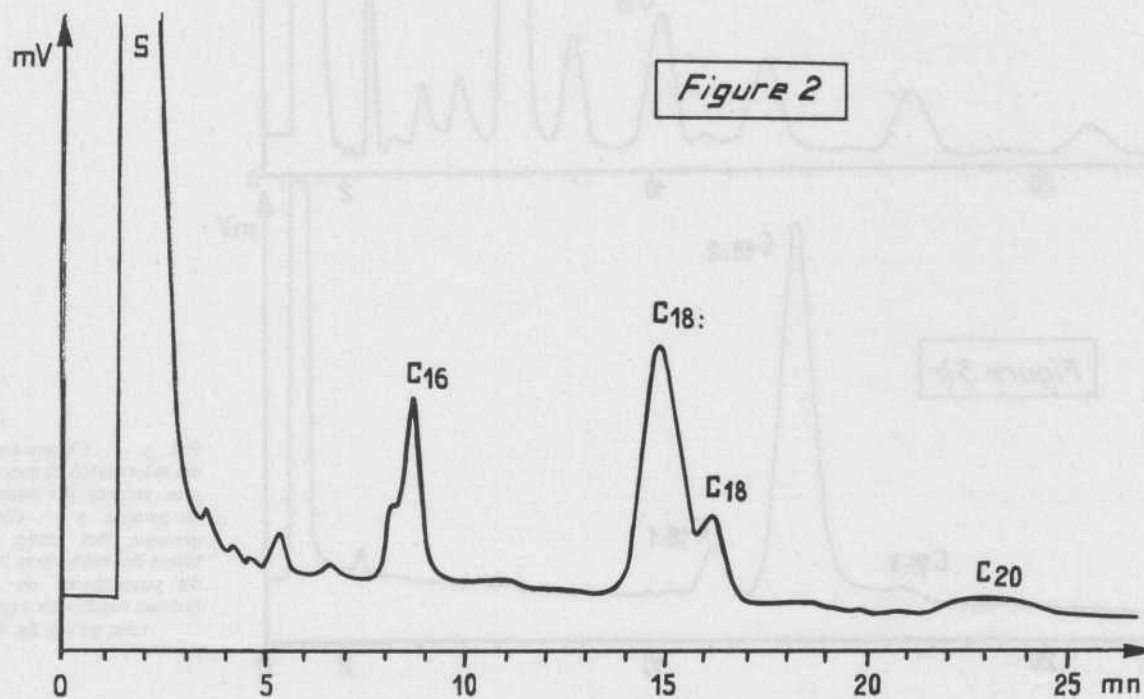
TABLEAU I

Analyse des acides gras du parenchyme de pomme (les acides gras apparaissant en fort pourcentage sont en caractères gras).

(V_R = volume de rétention relatif corrigé)

ACIDES IDENTIFIÉS	ABRÉVIATIONS UTILISÉES	CHROMATOGRAPHIE SUR PHASE POLAIRE		CHROMATOGRAPHIE SUR PHASE APOLAIRE	
		log V_R mesuré	log V_R du témoin	log V_R mesuré	log V_R du témoin
caprique.....	C ₁₀	1,00	1,04	—	—
hendécanoïque.....	C ₁₁	1,38	1,40	1,34	1,32
dodécanoïque.....	C ₁₂ ?	—	—	1,41	1,41
laurique.....	C ₁₂	1,51	1,51	1,48	1,47
tridécanoïque.....	C ₁₃	1,65	1,65	1,59	1,59
myristique.....	C ₁₄	1,76	1,75	1,73	1,73
myristoléique.....	C ₁₄ :1	1,79	1,78	1,65	1,65
pentadécanoïque.....	C ₁₅	1,87	1,87	1,86	1,86
palmitoléique.....	C ₁₆ :1	0,04	0,07	1,97	1,97
palmitique	C ₁₆	0,00	0,00	0,00	0,00
heptadécanoïque.....	C ₁₇	0,09	0,11	0,12	0,14
hexadécatriénoïque (?).....	C ₁₆ :3	0,18	0,18	1,97	1,97
stéarique	C ₁₈	0,24	0,23	0,30	0,30
oléique	C ₁₈ :1	0,27	0,27	0,26	0,27
linoléique	C ₁₈ :2	0,36	0,35	0,26	0,27
linoléinique	C ₁₈ :3	0,45	0,42	0,26	0,27
nonadécanoïque.....	C ₁₉	—	—	0,46	0,46
eicosanoïque.....	C ₂₀	—	—	0,60	0,58
eicosénoïque.....	C ₂₀ ?	0,66	—	0,49	0,51
heneicosanoïque.....	C ₂₁	—	—	0,72	0,70

Fig. 2. — Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du parenchyme de pomme sur phase stationnaire apolaire. S : pic de l'éther de pétrole. *Conditions expérimentales* : colonne en acier inoxydable. Longueur : 3 m. Diamètre intérieur : 1/4 inch. Phase stationnaire : silicone 710 adsorbé sur Chromosorb W silanisé (10 g de phase stationnaire pour 100 g de support). Granulométrie du support : 60-80 mesh. Gaz vecteur : hélium. Débit : 3 l/h. Température : 230° C. Détecteur à thermistances. Appareil Aerograph A 350 B.



gras identifiés dans le parenchyme, variaient linéairement avec le nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule de ces acides (loi de JAMES et MARTIN). Les pourcentages des divers acides sont calculés en mesurant les aires comprises sous les pics chromatographiques.

Les acides gras principaux suivants sont identifiés dans le parenchyme de pomme : *acide palmitique* (31 %), *acide stéarique* (4,5 %), *acide oléique* (4 %), *acide linoléique* (53 %) et *acide linoléique* (7 %). Quinze autres acides ont été décelés à l'état de traces. Les nombreuses analyses effectuées nous ont montré qu'au point de vue de la composition en acides gras, le parenchyme du péricarpe central forme un tissu bien homogène à l'intérieur d'un même fruit et d'un fruit à l'autre.

L'acide oléique présente parfois un pourcentage légèrement supérieur (8 %).

Diverses techniques complémentaires ont été utili-

sées pour confirmer les résultats de la chromatographie en phase gazeuse.

Séparation des acides saturés et insaturés.

Les *complexes mercuriques des acides insaturés* ont été réalisés, selon la méthode de GOLDFINE et BLOCH (6), en traitant 10 mg du mélange des esters méthyliques par 50 mg d'acétate mercurique en solution dans 10 ml du mélange méthanol-acide acétique (0,3 %) — eau (5 %). Après chauffage pendant 5 mn à 60° C, la liqueur est laissée une nuit à la température du laboratoire. Les solvants sont ensuite évaporés et le résidu sec est repris par le benzène. La solution est chromatographiée sur une colonne d'acide silicique : une première élution par 50 ml de benzène fournit le mélange des *acides saturés*. La figure 3 présente le résultat d'une chromatographie en phase gazeuse de cette fraction. Les acides insaturés ont bien été complexés par le

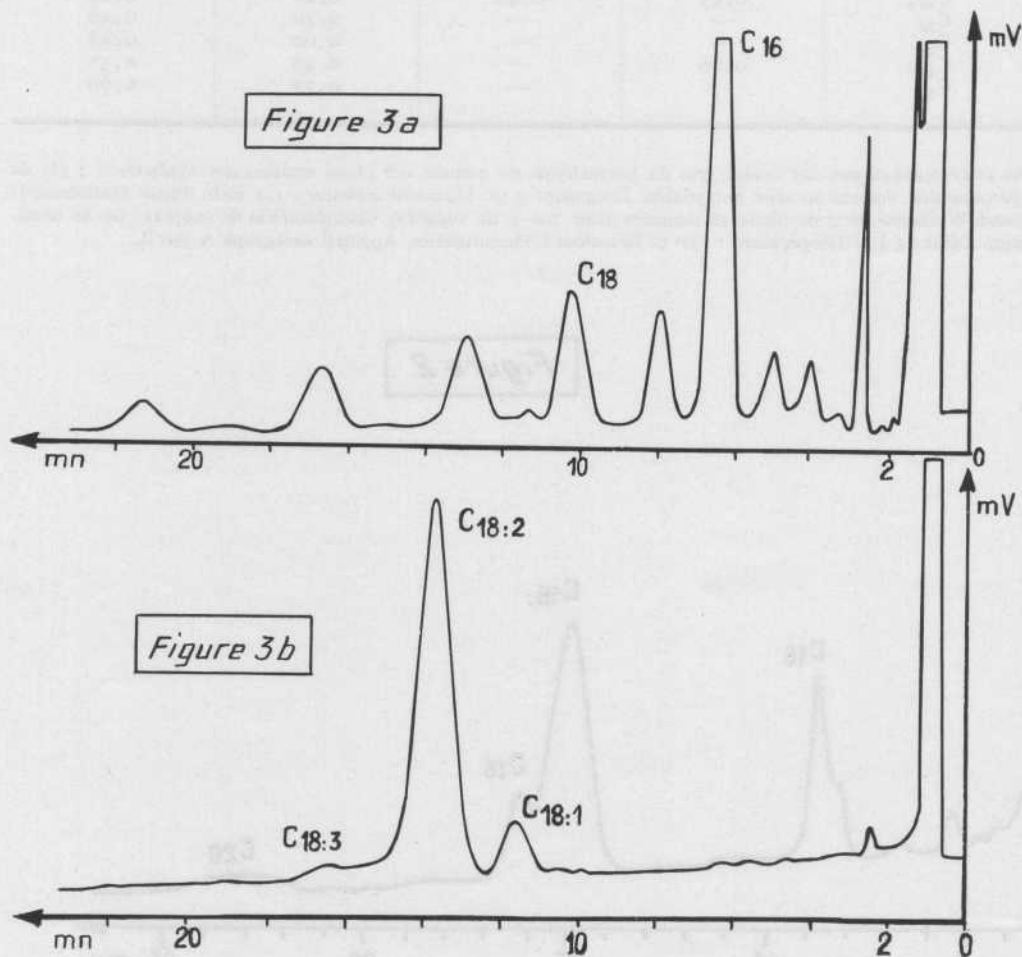
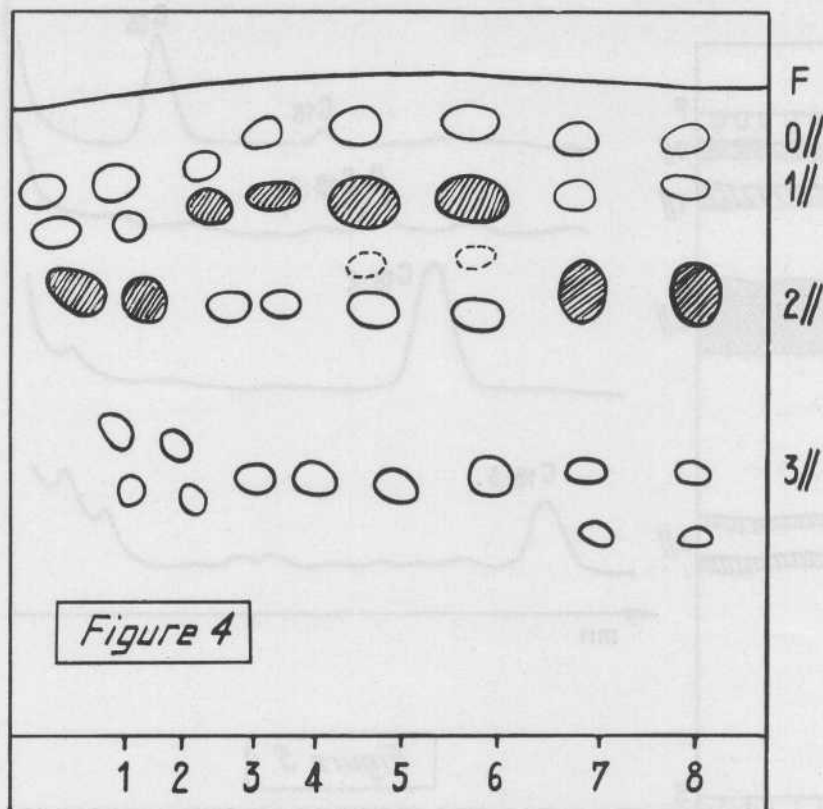


FIG. 3. — Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras saturés du parenchyme de pomme. 3 b : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras insaturés du parenchyme de pomme (mêmes conditions expérimentales qu'à la fig. 1).

FIG. 4. — Chromatographie sur couche mince de nitrate d'argent silice des esters méthyliques des acides gras du parenchyme de pomme. Solvant : n-heptane (70 %), éther éthylique (29,6 %), Ac. acétique (0,4 %). F = Front du solvant. Les spots de départ sont numérotés de 1 à 8 : 1,2 : 0,5 μ l de la solution des esters analysés ; 3,4 : 0,5 μ l d'un mélange d'acides gras témoins ; 5,6 : 1 μ l du mélange témoin ; 7,8 : 1 μ l des esters analysés. Révélation à la 2-7 dichlorofluorescéine ou par l'acide sulfurique concentré. La séparation permet de distinguer les acides par le nombre de doubles liaisons présentes dans les molécules : ces nombres sont portés à droite de la figure. Les spots hachurés sont les plus intensément colorés.



mercure, mais l'opération a entraîné la formation de produits d'oxydation ou de brisures de chaîne, comme il est classique d'en obtenir par ce traitement. Les complexes mercuriques des esters des acides insaturés sont élués de la colonne d'acide silicique par 50 ml du mélange méthanol-acide acétique (100 : 5 en volumes). Les complexes sont ensuite détruits par 5 ml d'HCl concentré. Après avoir ajouté de l'eau, on reprend les esters des acides gras insaturés par l'éther de pétrole. La figure 3 b présente les résultats d'une chromatographie en phase gazeuse de cette fraction : on retrouve bien les acides insaturés à 18 atomes de carbone : oléique, linoléique, linoléinique. Le pourcentage de ce dernier acide apparaît quelque peu réduit : une partie de l'acide initial a vraisemblablement été détruite au cours du traitement par le mercure.

Séparation des acides selon leur degré d'insaturation.

Une autre confirmation a été obtenue par chromatographie du mélange des esters méthyliques sur

couche mince de silice imprégnée de nitrate d'argent, selon la méthode décrite par HULANICKA, ERWIN et BLOCH (7).

La figure 4 présente un chromatogramme du mélange des esters provenant de la pomme : on distingue quatre spots correspondant respectivement aux esters d'acides saturés, aux esters d'acides monoéthyléniques, aux esters d'acides diéthyléniques et aux esters d'acides triéthyléniques. Ce quatrième spot apparaît fréquemment dédoublé comme apparaissent parfois dédoublés les pics de l'acide linoléinique sur les chromatogrammes en phase gazeuse ; ceci suggère la présence dans le mélange de deux acides isomères à trois doubles liaisons. Cette isomérisation pourrait être le résultat de la saponification directe utilisée pour l'extraction. Une plaque du même support ($\text{SiO}_2\text{-NO}_3\text{Ag}$) a servi à séparer une plus grande quantité d'esters des acides de pomme en quatre bandes principales (la dernière dédoublée). Les bandes, révélées par la dichlorofluorescéine sous lumière ultraviolette, ont été grattées de la plaque avec une lame de rasoir ; l'adsorbant a été traité par le méthanol et les esters ainsi élués ont été analysés par chroma-

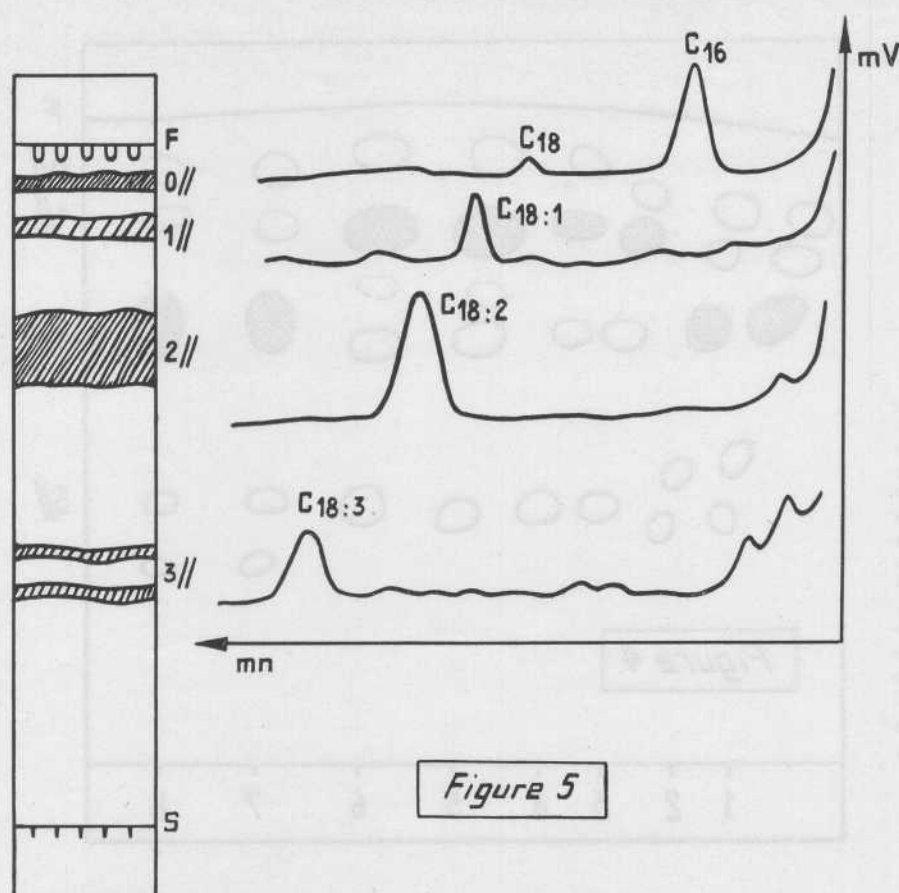


Figure 5

FIG. 5. — A gauche de la figure, on a dessiné une partie d'une plaque de silice-nitrate d'argent sur laquelle ont été séparés les acides gras du parenchyme de pomme selon le nombre des doubles liaisons présentes dans leurs molécules (S. : spot de départ — F : front du solvant. Révélation à la dichlorofluorescéine). A droite sont représentés les chromatogrammes fournis par les acides élués de chaque bande (mêmes conditions expérimentales qu'à la fig. 1).

tographie en phase gazeuse. La figure 5 présente les chromatogrammes. On retrouve les acides précédemment identifiés : *acides stéarique et palmitique* dans la première bande, *acide oléique* dans la deuxième, *acide linoléique* dans la troisième et *acide linoléique* (sous deux formes isomères ?) dans la quatrième.

Conclusions.

La saponification directe du parenchyme permet de commencer l'extraction des acides gras de ce tissu immédiatement après la mort des cellules. Le fait de plonger les fragments de parenchyme dans la potasse alcoolique bouillante dénature vraisemblablement toutes les protéines du tissu, ce qui doit empêcher la plupart des dégradations enzymatiques. Tous les lipides, polaires ou apolaires, du tissu sont attaqués par la potasse et l'extraction des acides est ainsi totale.

Les diverses techniques complémentaires utilisées donnent des résultats concordants quant à la composition en acides gras du tissu. On trouve dans ce parenchyme, parmi les constituants majeurs, des acides saturés (*palmitique, stéarique*) et des acides insaturés

(*oléique, linoléique, linoléique*). Quinze autres acides ont été décelés à l'état de traces. Remarquons qu'en ce qui concerne les constituants majeurs, l'extraction des lipides par l'éther de pétrole avait donné des résultats identiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) MAZLIAK P. Un matériel biologique intéressant pour étudier la biosynthèse des acides gras insaturés : le parenchyme de pommes (*Pirus malus* L.) *Comptes rendus*, **261**, p. 2716-2719 (1965).
- (2) BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P. Les lipides des particules mitochondriales de pomme. *Comptes rendus*, **261**, p. 2942-2946 (1965).
- (3) MAZLIAK P. et POMMIER-MIARD J. — Les lipides de la pomme. *Fruits*, **18**, 4, p. 177-183 (1963).
- (4) METCALFE L. D. et SCHMITZ A. A. — The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.*, **33**, 3, 363-364 (1961).
- (5) FULCO A. J. et BLOCH K. — Cofactor requirements for the formation of Δ^9 unsaturated fatty acids in *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.*, **239**, 4, 993-997 (1964).
- (6) GOLDFINE H. et BLOCH K. — On the origin of the unsaturated fatty acids in *Clostridia*. *J. Biol. Chem.*, **236**, 10, 2596-2601 (1961).
- (7) HULANICKA D., ERWIN J. et BLOCH. — Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **239**, 9, 2778-2787 (1964).