

CHROM. 18 418

## Note

### Dosage du mannitol par chromatographie gaz-liquide appliqué à la Diatomée antarctique *Fragilaropsis kerguelensis*

ALAIN SANCHO\*, GEORGES COMBAUT et HENRI JUPIN

Laboratoire de Biologie Végétale, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, F-66025 Perpignan Cedex (France)

et

LOUIS PIOVETTI

Département de Chimie, Université de Toulon et du Var, Château Saint-Michel, F-83130 La Garde (France)

(Reçu le 12 novembre 1985; manuscrit modifié reçu le 16 décembre 1985)

Dans le cadre de l'étude des premiers produits formés lors de la photosynthèse des algues à fucoxanthine<sup>1</sup>, nous avons cherché à mettre au point une méthode d'analyse des polyols acycliques —tel le mannitol— qui puisse s'appliquer aux diatomées. Ces dernières —contrairement aux phéophycées— présentent des taux en mannitol très faibles ce qui rend la chromatographie liquide haute-performance (CLHP) des polyols à l'état libre inadaptée compte-tenu de la sensibilité insuffisante de la détection réfractométrique. Par ailleurs les volumes de culture de diatomées au laboratoire ne peuvent qu'être limités, la biomasse récoltée est donc réduite. Cette biomasse est surtout constituée de silice qui forme la paroi externe bivalve de ces algues unicellulaires microscopiques. En ce qui concerne la matière organique, elle est majoritairement de type lipidique. Cette particularité d'incorporer le carbone préférentiellement sous forme de lipides, générale pour le monde phytoplanctonique, est encore plus marquée pour les populations antarctiques qui nous intéressent ici<sup>2</sup>. Il s'agit donc d'identifier et de doser des polyols en solutions extrêmement diluées. Par ailleurs les diatomées sont isolées par filtration des milieux de culture, le résidu végétal est donc gorgé d'eau très concentrée en sels alcalins. L'extrait aqueux des polyols des diatomées ne pourrait donc être injecté en CLHP sans un désalage préalable. Cette opération, peut être évitée si l'on réalise l'analyse par chromatographie gaz-liquide (CGL) sur les acétates de polyols. Ces derniers sont en effet isolés dans une phase organique facile à séparer de la phase aqueuse très concentrée en sels. Les conditions d'acétylation et le choix du polyol de référence restaient à déterminer. Les essais préliminaires sont réalisés sur un clone d'une phéophycée cultivée au laboratoire *Sargassum muticum*. La méthode d'évaluation des polyols par CGL, contrôlée par iodométrie et par CLHP est alors appliquée à l'étude d'une diatomée antarctique *Fragilaropsis kerguelensis*.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### Appareils

CGL. Ce travail est effectué sur un chromatographe Varian 3700. La colonne

(2 m × 0,3 mm) est remplie de phase SP 2340 (methyl silicone à 75% de cyanopropyle) à 3% sur Supelcoport DMCS de granulométrie 100–120 mesh. Les conditions de température de la colonne sont les suivantes: isotherme à 205°C ou programmation, 180°C pendant 1 min puis 180°C à 250°C à 4°/min. La température de l'injecteur est 270°C, celle du détecteur (FID) 280°C, le débit d'azote 20 ml/min.

*CLHP.* Le chromatographe Waters Assoc. utilisé a été préalablement décrit<sup>3,4</sup>. La colonne (250 × 5 mm I.D.) est une LiChrosorb NH<sub>2</sub> de granulométrie moyenne 5 μm (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.). Le solvant d'éluion est un mélange acétonitrile-eau (80:20 v/v) avec un débit de 1 ml/min. Le détecteur réfractométrique est un appareil Jobin Yvon de la série iota.

### *Iodométrie*

La méthode est basée sur l'estimation de la quantité d'acide périodique consommée pendant l'oxydation des polyols. L'iode libéré est dosé par une solution étalon d'hyposulfite de sodium<sup>5</sup>.

### *Polyols de référence*

Les mannitol, sorbitol, adonitol et inositol sont des produits commerciaux (E. Merck) pour usage biochimique. Les rhamnitol, fucitol, ribitol, arabinitol, xylitol et galactitol sont obtenus par réduction des oses correspondants par un borohydrure alcalin (NaBH<sub>4</sub>, 1 h à l'abri de la lumière à température ambiante). L'excès de borohydrure est éliminé par addition d'acide acétique et évaporation sous vide des solvants en excès.

### *Préparation des acétates de polyols*

Le mode opératoire s'inspire de la méthode proposée précédemment<sup>6</sup>: à 0,1 g de polyol (ou le résidu de la réduction de 0,1 g des oses de référence) sont ajoutés 0,1 ml de méthyl-1-imidazole et 1 ml d'anhydride acétique. Après 10 min de réaction à température ambiante sous agitation, 4 ml d'eau sont ajoutés et les acétates formés sont extraits par 3 × 4 ml de chlorure de méthylène. Le solvant est chassé, les acétates sont dissous dans l'acétone et cristallisés par addition d'eau froide. Ils sont ensuite récupérés de la solution hydro-éthanolique par filtration.

### *Étalonnages*

*CLHP.* Les mélanges de références sont effectués à partir d'une solution de mannitol (i) à 14,82 mg/ml et d'une solution d'adonitol (e) à 9,04 mg/ml. À 0,1 ml de la solution d'adonitol sont ajoutés successivement 0,03, 0,1, 0,2 et 0,3 ml de la solution de mannitol conduisant à des rapports de masse ( $m_i/m_e$ ) de 0,49, 1,64, 3,28, 4,92 respectivement.

Les rapports des aires correspondantes en CLHP sont  $(A_i/A_e)_{\text{polyols}}$  0,53, 1,75, 3,37 et 5,02. La courbe d'étalonnage  $m_i/m_e = f\{(A_i/A_e)_{\text{polyols}}\}$  est une droite d'équation  $y = 0,99x - 0,059$ . Le coefficient de corrélation est  $r = 0,999$  et l'erreur-type d'estimation  $\sigma_m = 0,013$ .

*CGL.* Les mélanges de références sont effectués à partir d'une solution de mannitol (i) à 1,14 mg/ml et d'une solution d'adonitol (e) à 1,32 mg/ml. A 0,1 ml de la solution d'adonitol sont ajoutés successivement 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 ml de la solution de mannitol conduisant à des rapports  $m_i/m_e$  de 0,21, 0,43, 0,86 et 1,72 respectivement.

Ces solutions de mannitol et d'adonitol sont acétylées dans les conditions décrites ci-dessus. Le produit de l'acétylation en solution dans le dichlorométhane est évaporé à sec sous vide puis injecté en CGL dans le chloroforme. On obtient respectivement des rapports de surface  $(A_i/A_c)_{\text{acétates}}$ : 0,23, 0,42, 1,09 et 2,09.

La courbe d'étalonnage  $mi/me = f\{(A_i/A_c)_{\text{acétates}}\}$  est une droite d'équation  $y = 0,792 x + 0,046$ . Le coefficient de corrélation est  $r = 0,998$  et l'erreur-type d'estimation  $\sigma_m = 0,025$ .

#### *Cultures de la phéophycée Sargassum muticum et isolement du mannitol*

Des clones de *Sargassum muticum* sont obtenus par multiplication végétative à partir de fragments d'algues nettoyés et cultivés sur un milieu gélosé<sup>7</sup>. Les fragments sont remis en milieu liquide aéré à salinité de 30 g l<sup>-1</sup> sous un éclairage de 50  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Un doublement de masse est obtenu en 12 à 15 jours.

La morphologie des thalles garde dans ces conditions des caractères juvéniles (absence de flotteurs).

592 mg du clone de *S. muticum* sont extraits à l'état sec broyé et tamisé, par 4 × 5 ml d'eau distillée. Après lyophilisation de la solution aqueuse, on obtient un résidu de 320 mg qui est dissous dans 4 ml d'eau. Des parties aliquotes de cette solution seront soumises aux analyses par iodométrie, CLHP et CGL selon les modes opératoires décrits ci-dessus.

#### *Culture de la diatomée Fragilaropsis kerguelensis et extraction des polyols*

La souche utilisée pour ce travail a été isolée à partir d'échantillons d'eau de mer prélevés entre les îles Kerguelen et Heard au cours des campagnes Apsara II et Antiprod III. La culture est faite à 2°C sous un éclairage de 45  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dans un milieu d'eau de mer standardisé, milieu F précédemment décrit<sup>8</sup> et les diatomées sont récoltées après 15 jours. On prépare ainsi 5 l de culture. Les diatomées sont isolées sur filtre millipore Whatman No. 4 et broyées dans l'eau distillée (20 ml) aux ultra-sons pendant 6 × 20 s. 60 ml d'éthanol sont ajoutés à la solution aqueuse de façon à précipiter les protéines et la silice des diatomées. Après filtration, la solution hydro-alcoolique est concentrée sous vide. Les polyols sont extraits par agitation pendant 10 min dans 3 ml d'eau distillée. Les essais d'acétylation et les analyses en CGL seront conduits sur des parties aliquotes de cette solution aqueuse.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Mise au point de la méthode*

Le dosage iodométrique<sup>5</sup> permet d'évaluer à 170 mg le poids de polyols (nous montrerons par CGL qu'il s'agit essentiellement de mannitol) dans 592 mg (poids sec) du clone de *S. muticum*.

L'analyse par CLHP est effectuée sur l'extrait aqueux du clone de *S. muticum* en utilisant l'adonitol comme référence interne (Fig. 1). La courbe d'étalonnage permet de déterminer le poids de mannitol à partir de la surface relative du pic correspondant à l'adonitol. On obtient ainsi un poids de 182 mg dans les 592 mg du clone de *S. muticum*.

L'analyse par CGL est réalisée sur le dérivé obtenu en acétylant les eaux d'extraction du clone de *S. muticum* après addition d'adonitol comme référence interne.

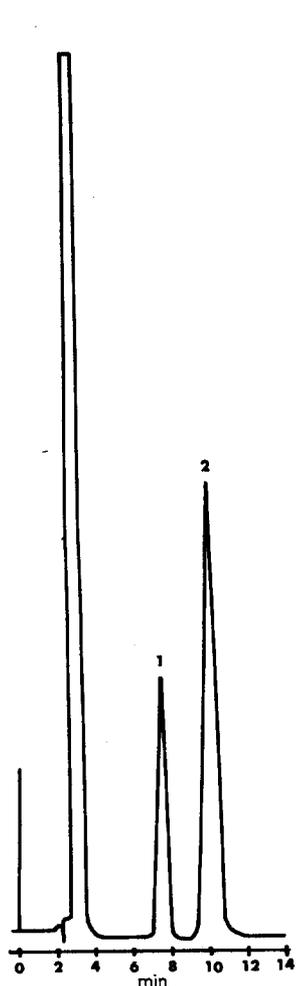


Fig. 1. Chromatogramme (CLHP) de l'extrait aqueux du clone de *S. muticum* (adonitol référence interne). 1 = Adonitol; 2 = mannitol.

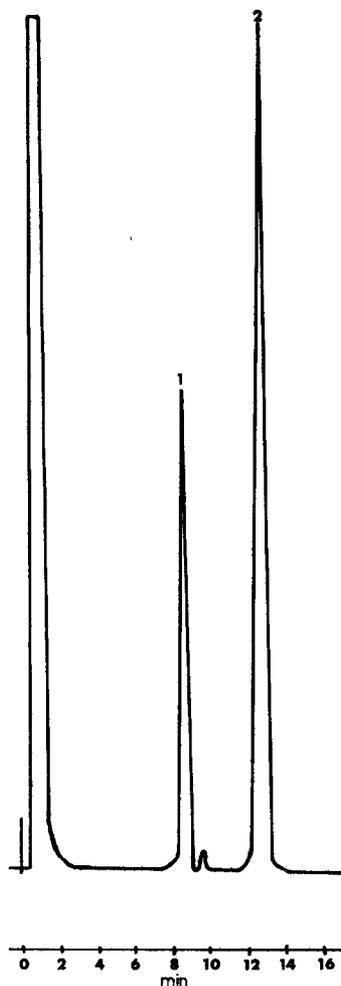


Fig. 2. Chromatogramme (CGL) des acétates de polyols du clone de *S. muticum* (Adonitol référence interne). Colonne en programmation de température (180°C pendant 1 min; 180°C à 250°C à 4°/min). 1 = Adonitol; 2 = mannitol.

On notera (Fig. 2) que le mannitol est largement majoritaire dans le clone de *S. muticum*. Afin d'optimiser la réaction d'acétylation nous faisons varier les proportions des réactifs, définissant ainsi les conditions notées A, B, C, D et E. Pour chacune d'elles la solution à acétyler S est obtenu en ajoutant 0,3 ml d'adonitol à 9,04 mg/ml (correspondant à 2,7 mg d'adonitol) à 0,1 ml de solution aqueuse d'extraction du clone (correspondant à 4,5 mg de mannitol d'après les résultats obtenus pas CLHP). Dans les conditions standards notées A, nous acétylons 0,1 ml de la solution S par 1 ml d'anhydride acétique en présence de 0,1 ml de méthyl-1-imidazole. Dans les conditions B, C, D et E, des volumes de 0,1 ml de S sont acétylés respectivement par

TABLEAU I

POIDS DE MANNITOL DANS 592 mg DU CLONE DE *S. MUTICUM* ÉVALUÉ PAR IODOMÉTRIE, CLHP ET CGL

Pourcentages de mannitol dosé par rapport au résultat obtenu par CLHP. Précision iodométrie<sup>11</sup> 2%; CLHP 1%; CGL 2%.

	Iodométrie	CLHP	CGL				
			A	B	C	D	E
Poids (mg)	170	182	143	139	180	161	130
Pourcentage	93	100	79	77	99	89	72

2, 4, 8 et 20 ml d'anhydride acétique en présence de 0,2, 0,4, 0,8 et 2 ml de méthyl-1-imidazole. Le Tableau I présente l'évolution du pourcentage de mannitol dosé en fonction des conditions d'acétylation.

On constate que la méthode iodométrique ne met en évidence que 93% du poids du mannitol présent dans l'échantillon. Une gamme de conditions d'acétylation faisant varier les poids de réactifs dans des proportions de 1 à 20 permet d'évaluer par CGL entre 70 et 100% du mannitol présent. Les conditions notées C et D déterminent une gamme permettant de doser entre 90 et 100% du mannitol présent. C'est dans cette gamme qu'il faudra se placer lorsqu'il s'agira d'appliquer la méthode au dosage du mannitol et autres polyols dans les diatomées.

*Application de la méthode à l'évaluation des poids de polyols dans la diatomée *Fragilariopsis kerguelensis**

A partir de 5 l de culture de la diatomée antarctique *F. kerguelensis*, on obtient une biomasse de 80 mg qui conduit, dans les conditions décrites en partie expérimentale, à 12 mg d'extrait aqueux dans 3 ml de solution. Après recherche des conditions optimales d'acétylation, on obtient pour l'échantillon de *F. kerguelensis* étudié: 0,52 mg de mannitol; 0,18 mg de sorbitol et 0,10 mg d'arabinitol (Fig. 3) soit un ensemble de 0,8 mg de polyols. Rappelons ici que la méthode, telle que nous l'avons décrite ci-dessus, a été mise au point sur une prise d'essai correspondant à 4,5 mg de mannitol contenus dans une partie aliquote des eaux d'extraction du clone de *S. muticum*. Dans le cas de la diatomée, on dose environ dix fois moins de mannitol (0,52 mg). Nous avons donc testé la méthode en diluant dix fois l'échantillon d'extrait aqueux du clone de *S. muticum* ce qui correspond à une prise d'essai de 0,45 mg pour un volume de 0,1 ml de solution.

L'application des conditions d'acétylation notées C permet alors d'évaluer à 182 mg le poids de mannitol dans les 592 mg du clone. On a montré par ailleurs que la méthode était encore applicable sur une solution diluée 50 fois: dans ces conditions, 90 µg de mannitol dans 0,1 ml de solution aqueuse et 54 µg d'adonitol sont acétylés par 20 µl d'anhydride acétique en présence de 2 µl de méthyl-1 imidazole. L'évaluation du poids de mannitol dans les 592 mg du clone de *S. muticum* est alors de 184 mg.

Ces résultats pourront être appliqués à une étude comparative des polyols d'un certain nombre de diatomées antarctiques. En effet, sur les souches récoltées au

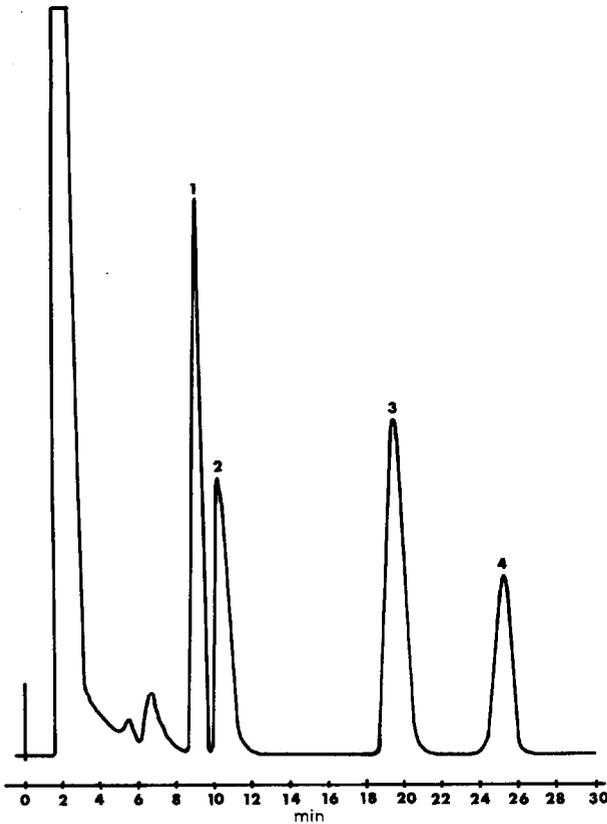


Fig. 3. Chromatogramme (CGL) des acétates de polyols de *Fragiliaropsis kerguelensis* (adonitol référence interne). Température de la colonne isotherme à 205°C. 1 = Adonitol; 2 = arabinitol; 3 = mannitol; 4 = sorbitol.

cours des campagnes Apsara II et Antiprod III nous nous proposons d'étudier —sur le plan de la composition en polyols— l'influence d'un certain nombre de facteurs inhérents aux conditions de culture: salinité, éclaircissement, photopériode, température, phases de croissance. Les résultats préliminaires que nous venons d'exposer montrent que pour réaliser ces études comparatives il suffira de s'adresser à des volumes de cultures n'excédant pas 1 l. Pour le cas particulier de *F. kerguelensis* cultivée dans les conditions ci-dessus décrites, 1 l de culture correspond à 104  $\mu\text{g}$  de mannitol et à 160  $\mu\text{g}$  de polyols totaux. Or nous venons de montrer que la méthode est fiable au minimum jusqu'à l'évaluation de 90  $\mu\text{g}$  de mannitol. Il sera alors probablement possible, sur des volumes de culture relativement réduits, faciles à mettre en oeuvre, de réaliser l'étude de la production par photosynthèse des polyols lors de la croissance des phéocécées et au cours de la multiplication des diatomées. A l'heure actuelle l'assimilation photosynthétique est mesurée par l'incorporation du  $^{14}\text{C}$  dans le mannitol. Cette technique nécessite de réaliser les cultures en présence de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  comme source de carbone inorganique<sup>9,10</sup>.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. C. Duval, H. Jupin et C. Berkaloff, *Physiol. Veg.*, 21 (1983) 1145.
- 2 E. Smith et I. Morris, *Science, (Washington, D.C.)*, 207 (1980) 197.
- 3 L. Serve, L. Pioveti et N. Longuemard, *J. Chromatogr.*, 259 (1983) 319.
- 4 L. Serve, L. Pioveti et N. Longuemard, *J. Chromatogr.*, 292 (1984) 458.
- 5 G. Combaut, Y. Bruneau, G. Jeanty, C. Francisco, J. Teste et L. Codomier, *Phycologia*, 15 (3/4) (1976) 275.
- 6 A. M. Blakeney, P. J. Harris, R. J. Henry et B. A. Stone, *Carbohydr. Res.*, 113(2) (1983) 291.
- 7 G. Giraud, *Physiol. Veg.*, 21 (1983) 551.
- 8 R. R. L. Guillard et J. H. Ryther, *Can. J. Microbiol.*, 8 (1962) 229.
- 9 R. H. Reed, I. R. Davison, J. A. Chudek et R. Foster, *Phycologia*, 24 (1985) 35.
- 10 M. Penot, J. Dumay et M. Pellegrini, *Phycologia*, 24 (1985) 93.
- 11 M. C. Cameron, A. G. Ross et E. G. V. Percival, *J. Soc. Chem. Ind.*, 67 (1948) 161.