

## BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU FRUIT ET DE LA GRAINE DU LIERRE

MICHÈLE GROSBOIS

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée (Physiologie Cellulaire),  
12 rue Cuvier, Paris V<sup>e</sup>, France

(Received 20 July 1970)

**Résumé**—L'évolution de la composition en acides gras a été suivie dans l'appareil reproducteur du lierre (*Hedera helix* L.) au cours du développement du fruit. Les péricarpes et les graines ont été étudiés séparément. Les acides monoéniques sont abondants et particulièrement diversifiés dans le péricarpe (acides pétrosélinique, oleique, et vaccénique). Les deux parties de l'appareil reproducteur sont le site d'une grande accumulation d'acides monoinsaturés au cours de la maturation. Les acides gras qui s'accumulent sont principalement, l'acide pétrosélinique dans la graine, l'acide vaccénique et l'acide palmitoleique dans le péricarpe. Des incubations de tranches de tissus, en présence d'acétate-1-<sup>14</sup>C montrent que l'intensité d'incorporation du précurseur dans les lipides passe par un maximum, aussi bien dans la graine que dans le péricarpe, au moment du noircissement du fruit. Pour des périodes d'incubation de 2 hr, les acides gras saturés sont toujours plus marqués que les acides monoinsaturés.

**Abstract**—The evolution of component fatty acids has been followed quantitatively in the reproductive apparatus of the Ivy plant (*Hedera helix* L.) during development of the fruit, pericarps and seeds are considered separately. Monoenoic fatty acids are abundant and particularly diversified in the pericarp (petroselinic, oleic, and *cis*-vaccenic acids). Both parts of the reproductive apparatus are the sites of a very large accumulation of mono-unsaturated fatty acids during maturation. The fatty acids which accumulate are principally petroselinic acid in the seed and *cis*-vaccenic and palmitoleic acids in the pericarp. Incubation of tissue slices in the presence of acetate-1-<sup>14</sup>C shows that the intensity of incorporation of the precursor into lipids passes a maximum at the time of darkening of the fruit in the seed as well as in the pericarp. For 2 hr incubation periods, saturated fatty acids are always more heavily labelled than mono-unsaturated fatty acids.

### INTRODUCTION

LE MÉTABOLISME des lipides dans le fruit du lierre présente plusieurs particularités physiologiques et biochimiques intéressantes.

Des travaux précédents d'Ulrich<sup>1</sup> effectués sur ce matériel avaient montré la richesse de ce fruit en 'lécithines'; ces substances s'accumulent dans le péricarpe au cours du développement. A notre connaissance, cette accumulation de lipides polaires dans un organe végétal est un fait remarquable. Les seuls lipides qui s'accumulent habituellement dans les tissus végétaux sont des triglycérides de réserve.

Les fruits du lierre sont très résistants au froid et présentent la particularité d'effectuer leur développement (croissance et maturation) pendant la saison froide, ce qui les distingue nettement de la plupart des fruits des régions tempérées.

Nous avons nous-mêmes montré dans une étude précédente (Grosbois,<sup>2</sup> que la forme, le poids, la couleur des fruits du Lierre changent d'autant plus vite au cours du développement que les organes renferment plus de graines. L'intensité respiratoire des fruits (rapportée au poids de matière fraîche) reste élevée tout au long de la croissance et de la maturation sans présenter de 'crise respiratoire' bien discernable.

<sup>1</sup> R. ULRICH, *C.R.Acad. Sci.* **208**, 664 (1939).

<sup>2</sup> M. GROSBOIS, *Rev. Gen. Bot.* **75**, 245 (1968).

Des travaux déjà anciens de Palazzo et Tamburello<sup>3</sup> de Steger et Van Loon<sup>4</sup> indiquent la présence en grande quantité, dans la graine du lierre, de l'acide pétrosélinique (C18.1Δ<sup>6</sup>). Hilditch<sup>5</sup> a souligné que l'acide pétrosélinique est particulier aux graines de la famille des Ombellifères et à celle très voisine des Araliacées à laquelle appartient le lierre. Les travaux beaucoup plus récents de Lotti et Bazan,<sup>6</sup> portant sur les fruits entiers du lierre, soulignent l'importance de l'acide pétrosélinique dans le métabolisme lipidique de ces organes.

TABLEAU 1. COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PÉRICARPES ET DES GRAINES DU LIERRE

Acides gras identifiés chromatographiquement	% Des acides gras totaux		
	Péricarpes 11 Fév	Péricarpes 5 Mars	Graines 16 Janvier
C 12	traces	traces	—
C 14	traces	traces	traces
C 16	13,4	14,2	6,3
C 16 1Δ <sup>6</sup>	0,2	—	traces
C 16:1Δ <sup>9</sup>	1	18,4	traces
C 18	traces	traces	traces
C 18 1Δ <sup>7</sup>	—	—	6,4
C 18 1Δ <sup>6</sup>	2,7	—	62,5
C 18:1Δ <sup>9</sup>	5,1	5,3	4,5
C 18:1Δ <sup>11</sup>	8,5	31,2	traces
C 18:2	57,5	26,4	20,4
C 18 3	12	4,2	traces
C 20	traces	traces	traces

Ces particularités diverses nous ont incité à entreprendre une étude approfondie de la lipogénèse, dans la graine et le fruit du Lierre. L'objectif final de cette étude sera de mettre en évidence les voies de biosynthèse et de dégradation propre aux lipides particuliers contenus par la plante, de localiser dans la cellule les systèmes enzymatiques responsables de ces voies métaboliques et d'en étudier les caractéristiques physiologiques. Dans une première étape, nous avons suivi les variations de la biosynthèse des acides au cours du développement de l'appareil reproducteur de lierre.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Analyse des Acides Gras

Nous avons identifié dans les péricarpes et les graines du fruit de lierre, aux divers stades du développement, des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone (de C12 à C20). Parmi ceux-ci, seuls les acides à 16 et 18 atomes de carbone sont présents en quantités importantes (les autres représentent moins de 1 % du total, les acides gras à chaînes courtes sont plus abondants dans les lots du début du développement). L'analyse montre que, si l'on rencontre les mêmes catégories d'acides gras dans la graine et dans le péricarpe, les proportions relatives de ces acides sont par contre différentes dans les deux parties du fruit. Le

<sup>3</sup> F. C. PALAZZO et A. TAMBURELLO, *Atti R Acad Lincei*, **23**, 352 (1914).

<sup>4</sup> A. STEGER et J. VAN LOON, *J Rec Trav Chim*, **46**, 471 (1927).

<sup>5</sup> T. P. HILDITCH et E. E. JONES, *Soc Chem Ind*, **46**, 326 (1927).

<sup>6</sup> G. LOTTI et E. BAZAN, *Ric Sci*, **38**, 1112 (1968).

TABLEAU 2. PRODUITS DE L'OXYDATION DISRUPTIVE DES ACIDES GRAS INSATURÉS DU LIÈRE

Acides gras monoéthyléniques identifiés par chromatographie	Localisation		Produits de coupure théoriques attendus			Produits de coupure récupérés expérimentalement		
	Graines	Péricarpes	Ac monocarbo- xyliques	Ac dicarbo- xyliques	Ac. monocarbo- xyliques	Graine Ac. dicarbo- xyliques	Ac. monocarbo- xyliques	Péricarpe Ac. dicarbo- xyliques
C16:1Δ <sup>6</sup>		traces						
C16:1Δ <sup>9</sup>		+++	C7	C9			C7*	C9*
C16:1Δ <sup>7</sup>	traces							
C18:1Δ <sup>6</sup>	++		C12	C6	C12*	C6*		
C18:1Δ <sup>9</sup>	+	+	C9	C9	C9	C9	C9	C9
C18:1Δ <sup>11</sup>		++	C7	C11			C7	C11

\* Composés quantitativement majeurs.

Tableau 1 montre la composition en acides gras du péricarpe et des graines du fruit à des stades de maturation où les acides gras sont particulièrement diversifiés. Il faut noter la grande importance des acides gras monoinsaturés à 16 et 18 atomes de carbone dans le péricarpe et à 18 atomes de carbone dans la graine (75 % du total des acides gras dans les graines du fruit mûr).

Dans chaque ensemble d'acides monoéthyléniques ainsi défini par leur longueur de chaîne, nous avons mis en évidence en combinant les données de la chromatographie en phase gazeuse avec celles des séparations sur couche mince de silice-nitrate d'argent, plusieurs isomères de position de la double liaison. Nous avons confirmé l'identité des différents isomères de position en réalisant l'oxydation disruptive par le permanganate en milieu acide, suivant la méthode de Tinoco et Miljanich.<sup>7</sup> La double liaison est ensuite localisée dans la chaîne paraffinique d'après la longueur des produits de fragmentation mono-et dicarboxylique, identifiés par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques.

L'oxydation disruptive n'a pu être effectuée sur chacun des isomères isolés sur plaques, car nous n'avons pu récupérer par cette méthode des quantités de produits suffisantes (100 µg au moins). L'oxydation disruptive a donc été réalisée soit sur le mélange total des acides gras provenant des graines (mélange très simple), pour lequel l'acide pétrosélinique est largement majoritaire, les monoènes en C16, les diènes et triènes en C18 étant très peu abondants. Pour les acides gras des péricarpes la coupure oxydative a été réalisée sur les acides gras totaux, et sur les monoènes seuls, séparés au préalable sur colonne de Silice/Nitrate d'Argent par la méthode de de Vries.<sup>8</sup> Les résultats sont groupés dans le Tableau 2. Les résultats expérimentaux sont tout à fait en accord avec les données théoriques. L'oxydation disruptive des acides insaturés de la graine donne bien les fragments correspondants à l'acide pétrosélinique (C12 et di-C6). La coupure oxydative des acides monoènes du péricarpe permet de confirmer la présence des acides insaturés quantitativement majeurs: acide palmitoléique, oléique et vaccénique. Les produits de fragmentation obtenus sur le mélange complet des acides insaturés du Péricarpe, sont les mêmes que ceux obtenus sur les monoènes seuls, ce qui permet de penser que les diènes et les triènes présents dans le mélange sont des homologues structuraux des monoènes (double liaison proximale par rapport au carboxyle en C9 ou en C11).

#### *Formation des Acides Gras au Cours du Développement de la Graine*

*Evolution de la quantité totale d'acides gras.* L'évolution pondérale des acides gras totaux au cours du développement de la graine est représentée par la courbe 1a (Fig. 1). Si le contenu des graines en acides gras est exprimé en mg/g de matière séminale fraîche, on constate que dès le moment où les graines sont bien séparables du péricarpe, c'est à dire 3 semaines à 1 mois après la pleine floraison, jusqu'à la chute des fruits (Mars), l'accroissement de la quantité d'acides gras se poursuit régulièrement. Dans une autre série d'expériences (courbe 1a') comportant des mesures plus précoces, l'accumulation des acides gras se déroule comme pour la plupart des graines, avec une période pendant laquelle il y a très peu de synthèse lipidique, suivie d'une période de grande accumulation d'acides gras (Mazliak).<sup>9</sup> Si pour une même série d'expériences, la quantité d'acides gras présente dans les graines, à chaque date est exprimée en pourcentage de la quantité finale (Butt et Beevers),<sup>10</sup> on trouve

<sup>7</sup> J. TINOCO et P. G. MILJANICH, *Anal. Biochem.* 11, 548 (1965).

<sup>8</sup> R. DE VRIES, *J. A. O. C. S.* 40, 184 (1963).

<sup>9</sup> P. MAZLIAK, *Le Métabolisme des Lipides dans les Plantes Supérieures*, Masson, Paris (1968).

<sup>10</sup> V. S. BUTT et H. BEEVERS, *Plant Physiology*, IV B, p. 265, Academic Press, London (1966).

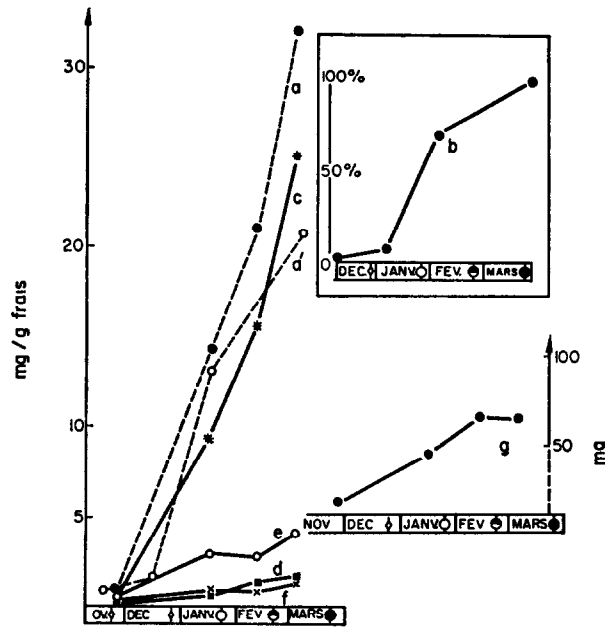


FIG. 1. EVOLUTION PONDÉRALE DES ACIDES GRAS DANS LA GRAINE

(a) et (a') Évolution des acides gras totaux (2 expériences différentes); (b) accumulation des acides gras en % du total final d'acides gras dans une graine; (c) évolution de l'acide pétrosélinique; (d) évolution de l'acide oleique; (e) évolution des acides octadécadiénoïques; (f) évolution de l'acide palmitique, (g) évolution du poids moyen des graines.

une courbe (Fig. 1b) qui présente une phase préférentielle d'accroissement se terminant par un palier, comme c'est le cas pour la plupart des graines.

*Evolution des différents acides gras.* Au début de l'évolution du fruit (26 Novembre), les graines contiennent des quantités équivalentes des divers acides gras: 187  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche d'acide pétrosélinique et 336  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche d'acides octadécadiénoïques; l'acide palmitique est moins abondant (104  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche).

Les courbes de la Fig. 1c-f montrent l'évolution pondérale des différents acides gras. L'évolution de la graine est marquée par une très grande accumulation de l'acide pétrosélinique qui atteint 27 mg/g de matière fraîche le 6 Mars (il y a 50 fois plus d'acide pétrosélinique dans un gramme de matière fraîche en fin d'évolution qu'au début). L'acide palmitique et les acides octadécadiénoïques augmentent aussi, mais beaucoup moins. Ces données se traduisent en pourcentages relatifs par une augmentation des acides en C18 1 et une diminution des acides en C16 et C18 2. Les mesures de 2 années consécutives sont groupées dans le Tableau 3. On constate que l'évolution de la composition lipidique est analogue d'une année à l'autre. L'acide pétrosélinique est donc très largement dominant dans la graine et très activement synthétisé pendant tout le développement.

Nous avons vérifié cette proposition en suivant l'intensité des biosynthèses *in vivo* à l'aide d'un précurseur radioactif des lipides: l'acétate- $\text{I}^{14}\text{C}$ .

#### *Evolution de l'Intensité des Biosynthèses d'Acides Gras dans la Graine*

Des tranches de tissu séminal ont été mises à incuber dans une solution d'acétate marqué, à diverses dates au cours du développement. Si l'on considère la radioactivité totale

TABLE 3. ÉVOLUTION DES POURCENTAGES D'ACIDES GRAS DANS LES GRAINES AU COURS DE LA MATURATION

Année 1967-1968	% Des acides gras totaux						
	C 16	C 18	C 18:1				C 18:2 C 18:3
			$\Delta^7$	$\Delta^6$	$\Delta^9$	$\Delta^{11}$	
15 Décembre	8,3	t					55,2 34 2,2
2 Février	9,2	—					68,6 21,5 t
17 Février	6,8	—					71 21 t
24 Février	5	—					73 20,8 t
Année 1968-1969							
26 Novembre	12,4	2,7	5,5	23,6	8,1	—	37,2 43 4
16 Janvier	5,9	—	6,4	62,5	4,5	—	73,6 20,4 t
11 Février	4,3	—	2,7	73	6,6	—	82,3 13,3 —
5 Mars	3,9	—	—	77,8	3,3	1,9	83 12,7 —

t = Traces.

incorporée en 2 hr dans les acides gras d'un gramme de substance fraîche (Fig. 2), on peut mettre en évidence deux phases bien distinctes dans les biosynthèses d'acides gras: pendant les 2 premiers mois de développement (de Décembre à Février) le marquage obtenu est de plus en plus intense, parallèlement à l'accroissement de la quantité totale des acides gras dans la graine. Ensuite, l'accumulation des acides gras continue sur le même rythme, tandis que l'intensité du marquage de ces acides (dans nos conditions d'expérience) diminue beaucoup. La baisse de l'activité totale incorporée par gramme de matière fraîche, vient sans doute du fait que les graines subissent un accroissement pondéral important à partir de Janvier et que cet accroissement correspond vraisemblablement à une entrée massive d'eau dans les tissus.

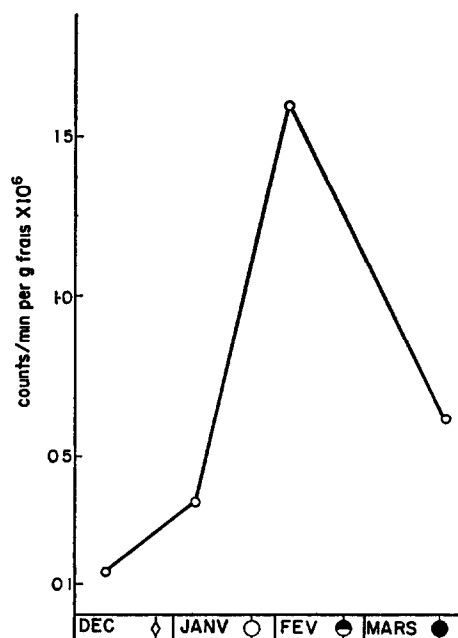


FIG. 2. EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE EN 2 hr DANS LES ACIDES GRAS DES GRAINES.

Le marquage des acides gras individuels suit globalement la même évolution que le marquage moyen des acides gras totaux (Fig. 3). On constate d'abord une augmentation du marquage de tous les acides gras dans la (Fig. 3a) première phase du développement jusque début Février, moment du noircissement des fruits. Le marquage des différents acides diminue ensuite assez brutalement. Ce phénomène est particulièrement accentué pour l'acide majeur, c'est à dire l'acide pétrosélinique. Le marquage de cet acide passe par un maximum très accentué au moment du noircissement ensuite, alors qu'il continue à s'accumuler, son marquage diminue très brutalement.

Si l'on considère l'activité spécifique des différents acides gras (Fig. 3b) on constate qu'en 2 hr d'incubation ce sont les acides saturés qui sont les plus marqués (ceci à tous les stades du développement) mais que leur activité diminue à la fin du développement. Il ne s'agit sans doute pas d'une diminution du pouvoir de synthèse, puisque les acides gras continuent

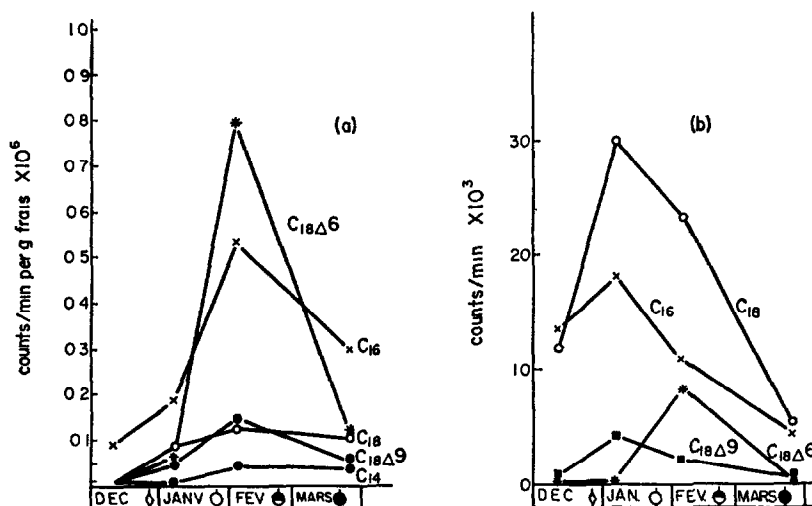


FIG. 3. EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ DES DIFFÉRENTS ACIDES GRAS DES GRAINES  
(a) Evolution de l'activité rapportée au gramme de substance fraîche, (b) évolution de l'activité spécifique

à s'accumuler mais d'un ralentissement; un temps de contact plus long que 2 hr avec le précurseur serait alors nécessaire pour obtenir la même incorporation d'acétate dans les différents acides gras. Ce point fait l'objet d'expériences en cours actuellement au laboratoire.

#### Formation des Acides Gras au Cours du Développement du Péricarpe

**Evolution de la quantité totale d'acides gras.** Le péricarpe synthétise des acides gras dès le début de la maturation du fruit (Fig. 4, Courbe a), mais cette accumulation s'accroît très nettement entre Février et Mars. Ce phénomène est encore mieux mis en évidence si l'on exprime l'accroissement de la quantité d'acides gras en pourcentage de la quantité finale observée dans un organe (Fig. 4b). On voit que le noircissement du fruit correspond à une période de grande accumulation de lipides. Pendant cette période les péricarpes grossissent également plus vite (Fig. 4c).

**Evolution des différents acides gras.** Les résultats concernant l'évolution de chacun des acides gras sont exprimés par les courbes de la Fig. 4d-g. Au début du développement du fruit, le péricarpe est surtout riche en acides *insaturés*. Leur quantité croît régulièrement tout au long de la maturation. Mais le fait le plus marquant est, l'augmentation des acides monoinsaturés à 16 et 18 atomes de carbone à partir du stade de noircissement du fruit. Il y a alors un brusque changement (qualitatif et quantitatif) dans la composition en acides gras du péricarpe, marqué surtout par l'accumulation d'acide palmitoleique  $C_{16} 1\Delta^9$ . Les acides monoéthyléniques à 16 et 18 atomes de carbone ne peuvent être séparés et dosés que dans les derniers stades de l'évolution car ils deviennent alors assez abondants. Les résultats obtenus sont groupés, dans le Tableau 4. On note en fin d'évolution, une importante augmentation de l'acide vaccénique  $C_{18} 1\Delta^{11}$  et de l'acide palmitoleique  $C_{16} 1\Delta^9$ . L'acide pétrosélinique disparaît du péricarpe à la fin de la maturation du fruit.

On peut donc conclure que la maturation des fruits de Lierre s'accompagne d'une synthèse très active des acides monoinsaturés, ce qui les distingue de nombreux autres



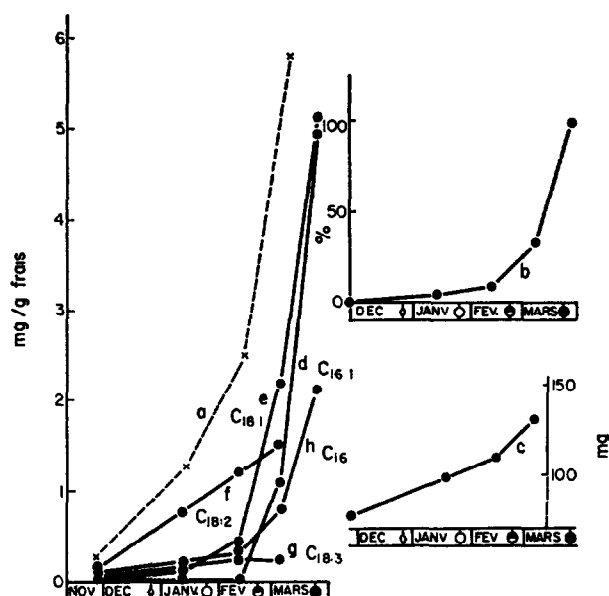


FIG. 4 EVOLUTION PONDÉRALE DES ACIDES GRAS DANS LE PÉRICARPE.

(a) Evolution des acides gras totaux; (b) accumulation des acides gras en % du total final d'acides gras dans un péricarpe; (c) évolution du poids moyen des péricarpes; (d) évolution de l'acide palmitoléique; (e) évolution des acides octadécénoïques; (f) évolution des acides octadécadiénoïques; (g) évolution des acides octadécatriénoïques.

fruits des régions tempérées froides où s'accumulent plutôt les acides di et triinsaturés.<sup>9</sup> L'évolution parallèle de l'acide palmitoléique et de l'acide vaccénique a déjà été trouvée dans un grand nombre d'organismes (bactéries, rat, différentes plantes supérieures). Une voie de biosynthèse par élongation de la chaîne 9-hexadécénoïque en acide 11-octadécénoïque, a été proposée par Kuemmel et Chapman,<sup>11</sup> pour rendre compte de ce fait. Nos résultats donnent à penser que cette voie d'élongation pourrait être active dans le péricarpe du Lierre.

Cette évolution dans le péricarpe est bien différente de celle notée dans la graine, où l'acide pétrosélinique continue à s'accumuler jusqu'à la fin du développement. On peut penser que l'accumulation brutale des acides monoinsaturés, plutôt qu'à une synthèse

TABLEAU 4 COMPOSITION EN ACIDES GRAS MONOÉTHYLÉNIQUES DU PÉRICARPE DE FRUIT 'MÛR'

Acides gras identifiés chromatographiquement	11 Février μg/g frais	5 Mars μg/g frais
C 16 1 { $\Delta^6$ $\Delta^9$	6 20	— 1080
C 18 1 { $\Delta^6$ $\Delta^9$ $\Delta^{11}$	62 117 193	— 312 1840

<sup>11</sup> D. F. KUEMMEl et D. CHAPMAN, *Lipids*, 3, 313 (1968)

continue, correspond à l'arrêt de leur utilisation dans une chaîne métabolique conduisant aux acides dunsaturés, nous avons pu constater en effet, dans certaines expériences qu'entre le 5 Mars et le 26 Mars la quantité de C18:2 n'augmentait plus. L'augmentation de C18:3 marque également un ralentissement après le 11 Février.

#### *Evolution des Acides Gras dans les Fruits dont les Graines sont Avortées*

Nous avons récolté le 25 Avril, un lot de 160 fruits très petits (3 mm dia.) coniques, noirs, dont toutes les graines sont avortées. L'analyse montre qu'ils sont très semblables au fruit de Janvier. Leur teneur en acides gras totaux est de 1,1 mg/g de matière fraîche (lot du 16 Janvier: 1,3 mg/g de matière fraîche). La composition en acides gras est également très comparable à celle des fruits de Janvier, contenant des graines.

Les fruits qui ne contiennent pas de graines, se maintiennent en vie sur le Lierre aussi longtemps que les autres. Ils ne subissent aucune évolution morphologique, aucune croissance et l'accumulation des acides gras ne s'accomplit pas comme dans les autres fruits. Il faut noter cependant que ces fruits noircissent en fin d'évolution plus vite que les autres et tombent fin Avril. La graine est donc indispensable pour que l'évolution caractéristique du métabolisme des acides gras dans le péricarpe ait lieu.

#### *Evolution de l'Intensité des Biosynthèse in vivo dans le Péricarpe*

Après incubation de tranches de péricarpes dans une solution d'acétate marqué, la radioactivité totale incorporée pendant 2 heures dans les lipides d'un gramme de matière fraîche (Fig. 5) reste stationnaire aussi longtemps que les fruits sont verts. Dès le début du noircissement du fruit, l'activité des systèmes de biosynthèse des acides gras augmente beaucoup. On constate donc, l'existence d'une période de grande accumulation des lipides dans le péricarpe. Les courbes d'évolution de la radioactivité incorporée dans chacun des

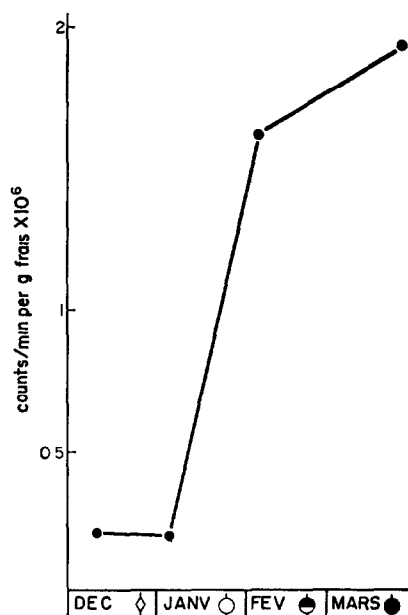


FIG 5. EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE EN 2 hr DANS LES ACIDES GRAS DES PÉRICARPES.

acides gras, par gramme de matière fraîche (Fig. 6) confirment bien que le tissu n'incorpore activement le précurseur radioactif qu'à partir du mois de Février. Les acides les plus marqués sont les acides saturés (acide palmitique et acide stéarique). Il faut noter que l'acide palmitique s'accumule au cours de la maturation, tandis que l'acide stéarique est toujours présent en quantité très faible (il n'est plus qu'à l'état de traces en Mars); cependant l'acide stéarique synthétisé dans les expériences de marquage renferme 35% de la radioactivité

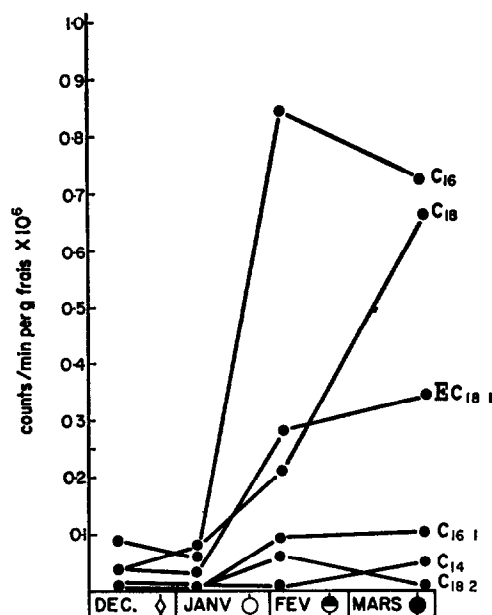


FIG. 6. EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LES DIFFÉRENTS ACIDES GRAS DU PÉRICARPE.

E C 18:1 signifie somme de tous les isomères de position en C 18:1.

totale des acides gras. Les acides saturés représentent sans doute la première étape de l'incorporation de l'acétate dans les lipides. Tout donne à penser que ces acides saturés sont par la suite désaturés.

Le groupe des acides monoéthyléniques en C18 est également bien marqué en 2 hr d'incubation. Parmi les isomères monoéthyléniques à 18 atomes de carbone (Tableau 5), l'acide oléique renferme environ 10% de la radioactivité totale et l'acide vaccénique

TABLEAU 5. POURCENTAGES DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE DES ACIDES GRAS RETROUVÉS DANS LES ACIDES GRAS MONOÉTHYLÉNIQUES EN C 18, DU PÉRICARPE DE FRUIT 'MÛR', APRÈS 2 hr D'INCUBATION

Acides gras isomères séparés sur couche mince	% De la radioactivité totale des acides gras	
	4 Février	26 Mars
C 18:1 $\left\{ \begin{array}{l} \Delta^6 \\ \Delta^9 \\ \Delta^{11} \end{array} \right.$	3,4	—
	13	9
	4,2	4,8

environ 5%. Les valeurs sont à peu près les mêmes le 11 Février et le 5 Mars, alors que la quantité pondérale de ces acides augmente (la quantité d'acide vaccénique décuple entre ces 2 dates). L'acide palmitoléique, le 4 Février et le 26 Mars ne représente que 6% de la radio-activité totale des acides gras (la quantité de cet acide est multipliée par 30 entre ces dates). Les acides diéthyléniques et triéthyléniques restent très peu marqués.

### CONCLUSIONS

L'évolution chimique de l'appareil reproducteur du lierre au cours de la croissance puis de la maturation, est marquée par une très grande accumulation d'acides gras dans les graines et dans les péricarpes (la quantité initiale d'acides gras dans la graine est multipliée par 30).

On observe une accumulation préférentielle des acides gras *monoéthyléniques*, ce qui distingue nettement le lierre des fruits usuels des régions tempérées froides. L'accumulation des lipides s'accroît très brutalement au moment du noircissement des fruits. Les deux parties du fruit ne forment pas les mêmes acides gras monoéthyléniques: dans la graine, on assiste à une augmentation énorme (250–25,000  $\mu\text{g/g}$  frais) d'un seul acide: l'acide pétrosélinique C18 1 $\Delta$ <sup>6</sup>; dans le péricarpe ce sont les acides palmitoléique C16 1 $\Delta$ <sup>9</sup> et *cis*-vaccénique C18 1 $\Delta$ <sup>11</sup> qui se déposent, l'acide pétrosélinique est très peu abondant dans le péricarpe et disparaît même en fin d'évolution.

Ces faits expliquent les résultats antérieurs de Lotti *et al.*:<sup>6</sup> ces auteurs travaillant sur l'appareil reproducteur entier (péricarpe et graines pris ensemble) avaient constaté que le pourcentage relatif d'acide pétrosélinique passait par un maximum au cours du développement, puis décroissait à partir du moment où s'accumulait l'acide palmitoléique. Cette diminution relative de l'acide pétrosélinique est due en fait, à l'augmentation de la quantité d'acide palmitoléique dans le péricarpe. En réalité, la quantité d'acide pétrosélinique augmente sans cesse dans la graine du fruit, jusqu'à la fin de l'évolution.

Ces résultats soulignent l'intérêt des divers tissus de l'appareil reproducteur du lierre pour l'étude de la synthèse des acides gras insaturés: les tissus de la graine contiennent les systèmes enzymatiques de désaturation qui agissent sélectivement en position 6–7; les tissus du péricarpe contiennent les désaturases qui agissent sélectivement en position 9–10. Le premier type d'enzyme semble agir préférentiellement sur l'acide stéarique pour donner l'acide pétrosélinique, le second type d'enzyme pourrait désaturer d'abord l'acide palmitique pour donner l'acide palmitoléique, (d'où dériverait l'acide vaccénique par élongation).

La grande période de synthèse des acides gras au moment du noircissement des fruits paraît très favorable pour l'étude de ces divers systèmes enzymatiques. La séparation des graines et des péricarpes permet de les étudier isolément.

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### *Matériel Végétal*

Tous les fruits ayant servi à notre étude proviennent du Jardin des Plantes de Paris. Seules les ombelles terminales des rameaux florifères ont été utilisées. Les lots ont été constitués de taille suffisante pour éliminer la variation individuelle. Les graines et les péricarpes sont étudiés séparément.

#### *Préparation des Acides Gras*

Les acides gras sont obtenus après saponification directe du tissu végétal broyé, par de la KOEt N à l'ébullition pendant 1 hr. Après élimination de l'insaponifiable les acides gras libérés des savons par HCl en excès, sont méthylés en présence de BF<sub>3</sub>–MeOH suivant la méthode de Metcalfe et Schmitz<sup>12</sup>. Les acides gras sont repris dans un volume connu de méthanol et différentes parties aliquotes sont prélevées. Les acides gras sont stockés à –25°.

<sup>12</sup> L. D. METCALFE et A. A. SCHMITZ, *Anal. Chem.* **33**, 363 (1961).

### *Analyse et Dosage des Acides Gras*

L'analyse des esters méthyliques des acides gras est effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec un appareil Chromagaz C.G.2 (Profit), muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les esters sont séparés dans 2 systèmes complémentaires, comportant l'un une phase stationnaire polaire, l'autre une phase apolaire. Premier système: butane-diolsuccinate (B.D.S.) à 20% au Chromosorb W 60-80 mesh:  $N_2$  à 3 l./hr, température 200°. Deuxième système: silicone 710 à 10%  $N_2$  3 l./hr, température 275°. L'identification des acides gras se fait en appliquant la loi de James et Martin.<sup>13</sup> Le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques en présence d'une quantité connue d'un témoin interne, l'ester méthylique de l'acide heptadécanoïque ajouté à une partie aliquote des esters méthyliques totaux.

### *Analyse et Dosage des Acides Monoènes Isomères de Position de la Double Liaison*

Les esters méthyliques sont séparés sur couche mince de silice imprégnée de nitrate d'argent, selon la méthode de Morris<sup>14</sup> à -25° par 3 migrations successives de toluène. Les esters sont déposés en bande, les différentes bandes séparées sont révélées par la 2-7 dichlorofluoresceine. Les bandes sont grattées et les produits élués par du MeOH-HOAc (à 0,5% d'acide). L'élution est commencée en agitant très vigoureusement (Tubmix) la silice en présence de l'éluant, puis achevée par un contact de 12 hr. On centrifuge 15 min à 11 000 tours/mn pour éliminer la silice. Chacun des éluats est dosé par chromatographie en phase gazeuse par la méthode du témoin interne. La quantité relative des isomères contenus dans le mélange est calculée, ce qui permet ensuite, connaissant la quantité totale d'acides gras de trouver la quantité absolue de chacun des monoènes isomères. Nous supposons que l'élution est totale après 12 hr de contact avec l'éluant. La reproductibilité de l'élution des esters méthyliques a été vérifiée sur une série d'expériences qui ont donné des résultats identiques.

### *Séparation des Acides Monoènes par Chromatographie d'Adsorption*

Les acides monoènes sont séparés du mélange complexe des acides gras totaux, par chromatographie sur colonne de silice imprégnée de nitrate d'argent. L'adsorbant contenant l'acide silicique et le nitrate d'argent, est préparé selon les indications de de Vries.<sup>8</sup> On utilise une colonne en verre de 8 mm de diamètre interne. La colonne est préparée avec 2 g d'adsorbant additionné de 1g de célite. La colonne est montée dans le premier solvant d'élution. Elle est ensuite protégée de la lumière. On dépose 20 mg d'esters méthyliques totaux en solution dans le minimum d'éther de pétrole en haut de la colonne. L'élution des esters méthyliques des monoènes est obtenue par Et<sub>2</sub>O-ether de pétrole 10 ml à 10% suivi de 20 ml à 3% des mêmes solvants.

### *Oxydation Disruptive des Acides Gras Insaturés*

L'oxydation disruptive par le  $KMnO_4$  en milieu acide, est conduite selon la méthode de Tinoco.<sup>7</sup> Les produits de coupure (sous forme d'esters ou de diesters méthyliques) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse dans le même système polaire que les esters méthyliques des acides gras, à 180° pour les produits les plus lourds et à 110° pour les chaînes courtes.

### *Mesure de la Radioactivité dans les Expériences Réalisées avec un Précurseur Radioactif*

La radioactivité totale des lipides est déterminée par comptage direct en scintillation liquide d'une partie aliquote (mélange scintillant: PPO 0,5% diméthyl POPOP 0,03% dans du toluène).

Les acides gras marqués sont séparés par chromatographie en phase gazeuse et leur radioactivité est mesurée simultanément par un Radiochromatographe Barber-Colman série 5000. On obtient ainsi l'activité des acides gras séparés suivant leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation. La radioactivité des acides monoènes isomères de position est mesurée par scintillation liquide après séparation des isomères par chromatographie sur couche mince.

<sup>13</sup> A. T. JAMES et A. J. P. MARTIN, *J. Biochem.* **50**, 679 (1952).

<sup>14</sup> L. J. MORRIS, D. M. WHARRY et W. E. HAMMOND, *J. Chromatog.* **31**, 69 (1967).