

RECHERCHES SUR LE METABOLISME DES GLYCERIDES ET DES PHOSPHOLIPIDES DANS LE PARENCHYME DE POMME—I.

ANALYSE DES LIPIDES A L'AIDE DE DIVERSES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

P. MAZLIAK

Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences de Reims, Marne, France

(Received 26 October 1966)

Résumé—Les lipides extraits du parenchyme de pomme ont été divisés en plusieurs catégories (paraffines, glycérides et phospholipides) par plusieurs procédés chromatographiques. Les lipides neutres forment seulement le quart du poids des lipides totaux. Aucune différence significative n'a été trouvée dans les compositions en acides gras des lipides neutres ou polaires. Les phospholipides des tissus, séparés par chromatographie sur couche mince ou sur papier silicé, sont principalement: la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine, l'acide phosphatidique, la phosphatidylserine, le phosphatidylinositol et plusieurs autres constituants mineurs. Les produits de désacylation de ces phospholipides de pomme ont été préparés.

Abstract—The lipids extracted from apple parenchyme have been divided into several classes (paraffins, glycerides and phospholipids) by several chromatographic procedures. Neutral lipids form only one-quarter of total lipids (on a weight basis). No significant differences have been found in the fatty acids compositions of neutral or polar lipids. The phospholipids of the tissue separated by thin-layer or silica loaded paper chromatography are mainly phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidic acid, phosphatidylserine, phosphatidylinositol and several other minor constituents. Deacylation products from these apple phospholipids have been prepared.

DE NOMBREUX travaux ont été consacrés à l'étude du métabolisme des glycérides et phospholipides des tissus animaux ou des microorganismes.¹⁻³ Les recherches concernant le métabolisme de ces mêmes lipides chez les plantes supérieures sont beaucoup moins nombreuses.⁴⁻⁵ L'analyse chimique des glycérides ou phospholipides, dans certains tissus de végétaux supérieurs (feuilles, tubercles, rhizomes, cultures de tissus) a cependant été effectuée récemment par plusieurs auteurs.⁶⁻¹² Dans le présent travail, nous abordons

- 1 R. J. R. ROSSITER et K. P. STRICKLAND, In *Lipide Metabolism* (Edited by K. BLOCH), p. 69. John Wiley, New York (1960).
- 2 R. M. C. DAWSON, In *Essays in Biochemistry* (Edited by P. N. CAMPBELL and G. D. GREVILLE), Vol. 2, p. 69. Academic Press, New York (1966).
- 3 R. M. C. DAWSON et D. N. RHODES, *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*. John Wiley, New York (1964).
- 4 E. J. BARRON et P. K. STUMPF, *Biochem. Biophys. Acta* **60**, 329 (1962).
- 5 G. M. CHENIAE, *Plant Physiol.* **40**, 235 (1965).
- 6 B. W. NICHOLS, In *New Biochemical Separations* (Edited by A. T. JAMES and L. J. MORRIS), p. 322. Van Nostrand, New York (1964).
- 7 P. S. SASTRY et KATES, *Biochemistry* **3**, 1271 (1964).
- 8 B. W. NICHOLS, *Phytochem.* **4**, 769 (1965).
- 9 C. F. FREEMAN, P. GOOD, H. F. DAVIS et S. D. FOWLER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 424 (1964).
- 10 R. O. WEENINK et F. B. SHORLAND, *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 613 (1964).
- 11 B. W. NICHOLS et A. T. JAMES, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **66**, 1003 (1965).
- 12 R. DOUCÉ, *Compt. Rend.* **259**, 3066 (1964).

l'étude du métabolisme de ces substances dans le parenchyme de pommes. Un certain nombre de données ont en effet été acquises récemment sur le métabolisme des acides gras dans le parenchyme de pomme et cela nous a incité à entreprendre, dans ce même tissu, l'étude du métabolisme des lipides bruts, glycérides et phospholipides non hydrolysés.

Meigh et Hulme¹³ ont montré que la maturation de la pomme s'accompagne d'une biosynthèse importante d'acides gras insaturés (notamment d'acide linoléique) dans le parenchyme de la "pelure" du fruit; parallèlement l'activité lipoxydase des mitochondries de ce parenchyme de "pelure" s'accroît au cours de la maturation. Mazliak et Pommier-Miard¹⁴ ont aussi observé une augmentation notable de l'acide linoléique dans le parenchyme central ("pulpe") de pommes mûrissant à basse température. Des expériences d'incorporation d'acétate-1-¹⁴C dans les acides gras du parenchyme central de pommes vertes¹⁵⁻¹⁶ nous ont permis de noter, en 1965, que l'acide oléique est très rapidement synthétisé dans ce tissu à partir de ce précurseur; l'acide linoléique se forme plus lentement et beaucoup plus lentement encore les acides palmitique, stéarique et linolénique. Dans une série de recherches récentes sur l'incorporation de divers précurseurs marqués (acétate-1-C¹⁴, malonate-1-3-C¹⁴, glucose-U¹⁴-C) dans les lipides des mitochondries du parenchyme central de pomme, Ben Abdelkader¹⁷⁻¹⁸ a constaté que ces particules cytoplasmiques synthétisent très activement, à partir des divers précurseurs, les acides monoéthyléniques, oléique et palmitoléique, moins activement les acides saturés palmitique et stéarique, très peu l'acide linoléique. Ce travail suggère que le site cellulaire de la biosynthèse des acides insaturés, dans le parenchyme de pommes, pourrait se trouver par exemple sur les membranes de l'ergastoplasme, si riches en phospholipides. Dans l'étude présentée ci-dessous, nous cherchons à savoir dans quelles molécules lipidiques entières (phospho-, di- ou triglycérides) sont incorporés les acides gras formés par les cellules entières du parenchyme, à partir de l'acétate-1-¹⁴C. Le renouvellement des autres parties des molécules lipidiques est également étudié dans le tissu entier, en suivant l'incorporation dans les molécules de deux autres précurseurs marqués: le glycérol-1-3-¹⁴C et l'acide phosphorique marqué au ³²P.

Avant d'exposer nos recherches purement physiologiques, nous présentons dans un premier article les résultats fournis par les diverses techniques chromatographiques que nous avons employées pour analyser les lipides bruts du parenchyme.

RESULTATS

1. Acides Gras des Lipides Totaux

Les lipides totaux sont extraits du parenchyme des fruits par le mélange chloroforme-méthanol selon la méthode de Folch¹⁹ modifiée par Bligh et Dyer²⁰. Les acides gras des lipides totaux sont analysés sous forme d'esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie sur couche mince de silice imprégnée de nitrate d'argent; pour analyse complémentaire, les esters d'acides insaturés sont également séparés des esters saturés après formation de complexes mercuriques avec les corps éthyléniques. Nous avions

¹³ O. F. MEIGH et A. C. HULME, *Phytochem.* **4**, 863 (1965).

¹⁴ P. MAZLIAK et J. POMMIER-MIARD, *Fruits (Paris)* **18**, 177 (1963).

¹⁵ P. MAZLIAK, *Compt. Rend.* **261**, 2716 (1965).

¹⁶ P. MAZLIAK, *Fruits (Paris)* **20**, 605 (1965).

¹⁷ A. BEN ABDELKADER et P. MAZLIAK, *Compt. Rend.* **261**, 2942 (1965).

¹⁸ A. BEN ABDELKADER, These (3 ème cycle), Faculté des Sciences de Paris (1966).

¹⁹ J. FOLCH, M. LEES et G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).

²⁰ E. J. BLIGH et W. S. DYER, *Can. J. Biochem. Biophys.* **37**, 911 (1959).

déjà employé toutes ces techniques pour l'étude des acides gras totaux du parenchyme extraits par saponification directe du tissu²¹ et les résultats obtenus sur l'extrait lipidique total se sont révélés identiques à ceux obtenus précédemment sur le mélange d'acides gras résultant de la saponification directe. Les acides identifiés sont groupés dans le Tableau 1; les principaux sont l'acide linoléique (53 %), l'acide palmitique (31 %), l'acide oléique (7 %), l'acide stéarique (4,2 %) et l'acide linolénique (4 %). On compte en plus une dizaine d'acides gras mineurs apparaissant à l'état de traces. Les pourcentages des acides ont été mesurés à partir des surfaces des pics chromatographiques.

TABLEAU 1. PRINCIPAUX ACIDES GRAS IDENTIFIÉS PAR CHROMATOGRAPHIE DANS LES LIPIDES TOTAUX, LES LIPIDES NEUTRES ET LES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME

Acides [†] identifiés	Lipides totaux	Lipides neutres	Phospholipides totaux (et autres lipides polaires)	% des acides gras totaux				
				PI*	PC*	PS*	PE*	PA*
10:0 et acides inférieurs	0,20	0,20	0,40					
12:0	0,20	0,20	0,40					
14:0	0,40	1,66	0,59					
14:1	traces	traces	traces					
16:0	31	13,23	31,48	54	18,8	27	12,7	16
16:1	traces	1,08	traces					
17:0	traces	traces	traces					
18:0	4,2	6,02	5,95	25,40	10,9	26,3	17,3	5,2
18:1	7	9,26	6,17	8,80	16,4	17,8	16,1	27,3
18:2	53	63,36	50,27	12	41,2	29	37,8	39,6
18:3	4	4,99	4,73	—	12,5	—	16,4	12
19:0	traces	traces	traces					
20:0	traces	traces	traces					
20:1	traces	traces	traces					
21:0	traces	—						

† Les acides sont désignés par le nombre d'atomes de carbone qu'ils contiennent, suivi après les deux points, par le nombre de doubles liaisons.

* PI=phosphatidylinositol; PC=phosphatidylcholine; PS=phosphatidylsérol; PE=phosphatidyléthanolamine; PA=acide phosphatidique.

2. Séparation des Lipides Bruts en Diverses Classes

Les lipides totaux, en solution chloroformique sont divisés en diverses classes par chromatographie sur couche mince de silice, selon la méthode de Mangold.²² Cinq spots (quelquefois six) apparaissent sur les chromatogrammes (Fig. 1) et l'on peut faire correspondre les quatre spots principaux, (après comparaison de leurs R_f avec ceux de substances témoins, ou en comparant les chromatogrammes obtenus avec ceux publiés par Mangold) aux catégories suivantes: paraffines, triglycérides, diglycérides et phospholipides. Un petit spot supplémentaire, migrant entre les diglycérides et les phospholipides, a même R_f qu'un stérol.

D'après la densité des spots sur les chromatogrammes, les phospholipides puis les triglycérides sont les deux classes de composés les plus importantes.

²¹ P. MAZLIAK, *Fruits (Paris)* **20**, 559 (1965).

²² H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **38**, 708 (1961).

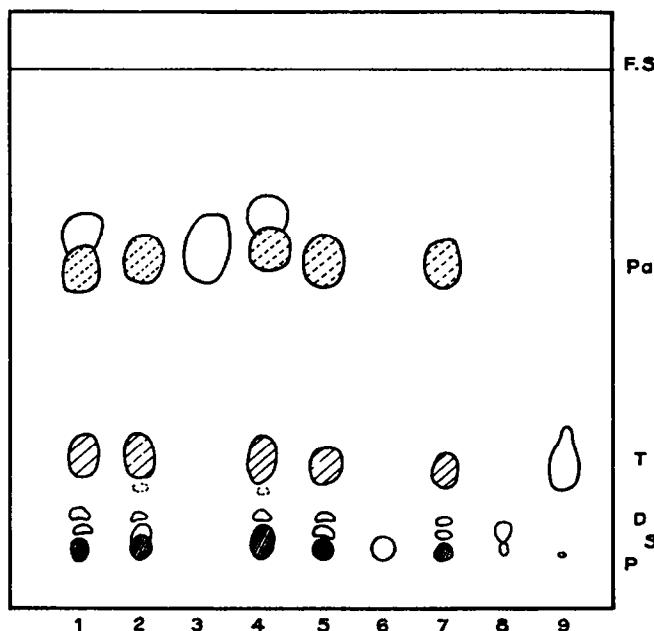


FIG. 1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES LIPIDES TOTAUX DU PARENCHYME DE POMME.

(Couche mince de silice—Solvant: ether de pétrole—éther éthylique—acide acétique: 90:10:1 en volumes) 1, 2, 4, 5, 7: diverses quantités d'extrait lipidique total en solution dans le chloroforme.

Témoins: 3: Tétradécane; 6: Phosphatidylcholine; 8: sitostérol; 9: trioléine.

F.S.: front du solvant; Pa: paraffines; T: triglycérides; D: diglycérides; S: stérols; P: phospholipides. Révélation: Dichlorofluorescéine et rayons u.v. La densité du hachuré traduit la densité des spots.

La séparation des lipides totaux en diverses classes est également réalisée sur papier silicé, selon la technique de Marinetti.²³ Sur les chromatogrammes (Fig. 2) l'extrait lipidique total se divise en cinq fractions principales identifiées par comparaison avec la migration de substances témoins ou à l'aide des chromatogrammes présentés dans la publication originale (Tableau 2). Ces fractions correspondent aux paraffines, triglycérides, diglycérides, monoglycérides et phospholipides. Un spot peu important, présent quelquefois entre les triglycérides et les diglycérides n'a pu être identifié. (On peut, d'après le R_f , penser à un spot d'acides gras libres, présents en faibles quantités.) Le spot des phospholipides présente très nettement la plus grande densité et correspond à la catégorie de lipides la plus importante dans le tissu. Les résultats de l'analyse des diverses catégories de lipides sur papier silicé s'accordent donc bien avec les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince de silice.

Ces résultats sont encore confirmés par des chromatographies de lipides bruts totaux extraits de fragments de parenchyme ayant métabolisé divers précurseurs radioactifs: (Fig. 3). Lorsque l'acétate-1-¹⁴C sert de précurseur, ce sont essentiellement des acides gras qui sont synthétisés par les cellules du tissu¹⁶ et toutes les fractions lipidiques brutes précédemment reconnues sont intensément marquées à l'exception des paraffines et des monoglycérides: une autoradiographie des chromatogrammes de séparation des lipides bruts montre trois des cinq spots précédemment révélés à la Rhodamine. Lorsque c'est du ³²P (sous forme de ³²P-

²³ G. V. MARINETTI, J. F. ERBLAND et M. BROSSARD, *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, p. 71. John Wiley, New York (1964).

phosphate inorganique) qui a été donné à métaboliser aux fragments de tissu, seul le spot de phospholipides est activement marqué: les autres spots ne sont absolument pas radioactifs. Enfin lorsque du glycérol-1-3-¹⁴C a été fourni aux fragments de parenchyme, tous les spots apparaissent sur les autoradiogrammes à l'exception des paraffines: les glycérides sont très fortement marqués (sauf les monoglycérides), les glycérophospholipides sont moins marqués.

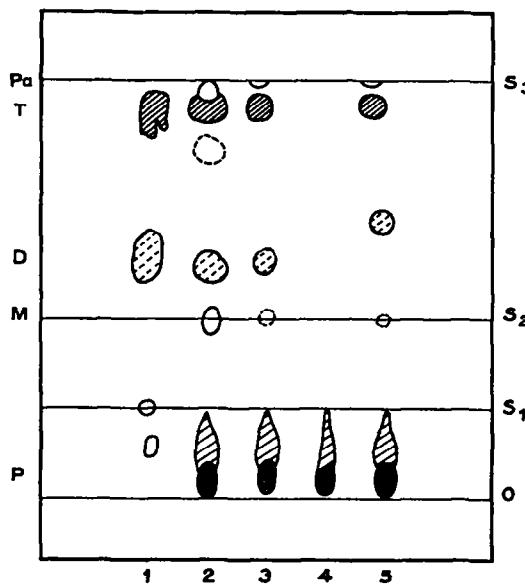


FIG. 2. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER SILICE DES LIPIDES TOTAUX DU PARENCHYME DE POMME.
(O: ligne de dépôt des mélanges à chromatographier; S₁: front du premier solvant: chloroforme-méthanol: 1/1 en volumes; S₂: front du second solvant: heptane-diisobutyl-cétone: 1/1 en volumes; S₃: front du troisième solvant: heptane-diisobutyl cétone-acide acétique: 96/6/0,5 en volumes).
2, 3, 5: diverses quantités d'extrait lipidique total en solution dans le chloroforme. Témoins: 1: trioleine commerciale (très impure); 4: acide phosphatidique. Mêmes abréviations qu'à la Fig. 1—M: monoglycérides. Révélation à la Rhodamine.

TABLEAU 2. *R_f* MESURÉS DANS LA SÉPARATION DES DIVERSES CLASSES DE LIPIDES BRUTS SUR PAPIER SILICE, SELON MARINETTI²³

Catégories séparées	<i>R_f</i> mesurés sur les chromatogrammes	<i>R_f</i> mesurés sur les chromatogrammes publiés par Marinetti ²³
Paraffines	1	1
Triglycérides	0,85-0,90	0,86-0,90
Diglycérides	0,50-0,60	0,53-0,58
Monoglycérides	0,36-0,43	0,41-0,50
Phospholipides	0,00-0,10	0,00-0,10

Les lipides neutres de l'extrait lipidique total (essentiellement tri- et di-glycérides) peuvent être facilement séparés des lipides polaires (phospholipides) par chromatographie sur colonne de silice. 452 mg d'extrait lipidique brut se divisent ainsi en 102 mg de lipides neutres élués par le chloroforme et 350 mg de phospholipides élués par le mélange chloroforme-méthanol.

La nature des fractions éluées hors de la colonne de silice est vérifiée par chromatographie des éluats sur papier silicé.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras présents dans les molécules constitutives de ces deux fractions révèle une certaine similitude de composition en acides entre lipides neutres et phospholipides (Tableau 1). Dans ces deux catégories se retrouve une composition en acides gras à peu près analogue à la composition globale des lipides totaux du parenchyme. Les phospholipides semblent cependant un peu plus riches en acide palmitique que les lipides neutres; ceux-ci contiennent au contraire un peu plus d'acide linoléique (acide majeur) et sensiblement moins d'acide palmitique (13% au lieu de 30%).

3. Analyse des Phospholipides du Parenchyme

Une première séparation chromatographique des phospholipides est réalisée sur couche mince de silice par la méthode bidimensionnelle de Lepage.²⁴ Un chromatogramme est présenté à la Fig. 4. Un très grand nombre de corps, sont présents dans l'extrait lipidique

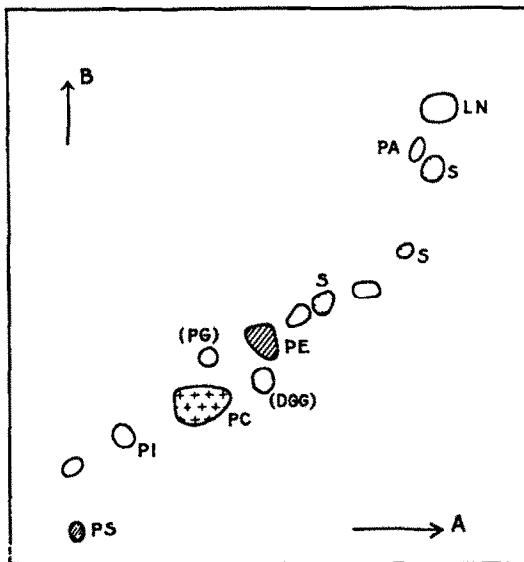


FIG. 4. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE DE SILICE DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME.

(Solvant A: chloroforme-méthanol-eau, 65/25/4 en volumes—Solvant B: diisobutylcétone-acide acétique-eau, 80/50/10 en volumes). PS: phosphatidylsérine; PI: phosphatidylinositol; PC: phosphatidylcholine; PG: phosphatidylglycérol (identification probable); DGG: digalactosylglycéride (identification probable); PE: phosphatidyléthanolamine; S: stéroïde; PA: acide phosphatidique; LN: lipides neutres. Tous les spots sont révélés par l'iode ou l'acide sulfurique concentré. Les spots révélés à la ninhydrine sont hachurés. Le spot immédiatement révélé par le réactif de Dragendorff est marqué de croix. Les spots pointillés sont immédiatement révélés en roses par l'acide perchlorique à 20%.

total puisque ces chromatogrammes peuvent présenter jusqu'à 14 spots distincts. On peut identifier parmi ces corps les composés suivants: phosphatidyl sérine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine, acide phosphatidique et lipides neutres.

²⁴ M. LEPAGE, *J. Chromatog.* 13, 99 (1964).

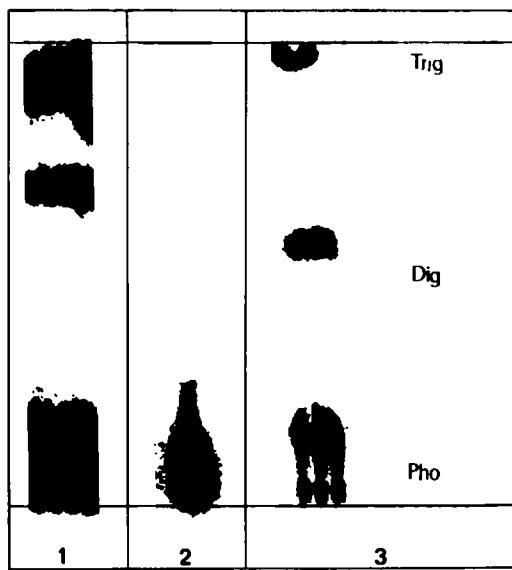


FIG. 3. FRACTIONNEMENT SUR PAPIER SILICÉ DE L'EXTRAIT LIPIDIQUE BRUT DU PARENCHYME DE POMME EN DIVERSES CLASSES, APRÈS INCUBATION DES FRAGMENTS DE PARENCHYME AVEC DIVERS PRÉCURSEURS RADIOACTIFS.

Révélation par autoradiographie; 1: après incubation en présence d'acéate-1- ^{14}C , toutes les classes sont marquées à l'exception des paraffines; 2: après incubation en présence de ^{32}P -phosphate seuls les phospholipides sont marqués; 3: après incubation en présence de glycérol-1-3- ^{14}C , glycérides et phospholipides sont marqués. Mêmes abréviations qu'à la Fig. 2.

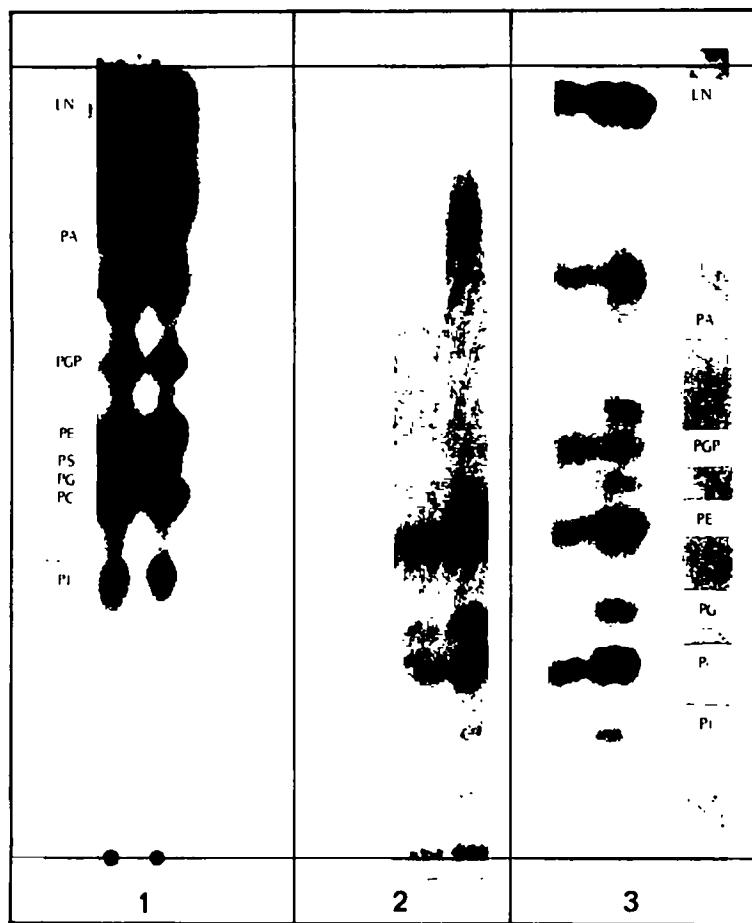


FIG. 7. SÉPARATION SUR PAPIER SILICÉ DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME APRÈS INCUBATION DE FRAGMENTS DE PARENCHYME EN PRÉSENCE DE DIVERS PRÉCURSEURS RADIOACTIFS.

1: incubation en présence d'acétate $1-^{14}\text{C}$; 2: incubation en présence de phosphate ^{32}P ; 3: incubation en présence de glycérol 1-3- ^{14}C . Révélation par autoradiographie.



FIG. 8. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER DES PRODUITS DE DÉSACYLATION DE PHOSPHOLIPIDES DE FRAGMENTS DE PARENCHYME INCUBÉS EN PRÉSENCE DE PHOSPHATE- ^{32}P .

Solvant A: phénol-eau; Solvant B: butanol-acide propionique-eau. Révélation par autoradiographie. 1: glycerylphosphorylcholine; 2: glycerylphosphoryléthanolamine; 3: glycerylphosphorylcholine cyclique; 4: glycerylphosphorylglycerol; 5: glycerophosphate; 6: glycerylphosphorylsérine; 7: diglycerylphosphorylglycerol; 8: glycerylphosphorylinositol.

Ces phospholipides sont identifiés: (1) en comparant les R_f de chaque corps dans les deux systèmes chromatographiques avec les R_f de substances témoins achetées dans le commerce ou avec les R_f publiés par Lepage (Tableau 3), (2) à l'aide des révélations spécifiques suivantes: révélation à la ninhydrine pour les phospholipides présentant un groupement $-\text{NH}_2$ libre c'est à dire la phosphatidyl sérine et la phosphatidyl éthanolamine; révélation au réactif de Dragendorff pour la phosphatidylcholine. Il reste dans l'extrait huit spots non identifiés. Trois de ces spots donnent avec l'acide perchlorique à 20 % une couleur rose, ce qui peut faire penser à des composés stéroïques, d'après Lepage. Un spot mineur sous l'emplacement de la phosphatidyl éthanolamine migre de la même façon qu'un digalactosyl glycéride selon Lepage. Un autre spot mineur au dessus de l'emplacement de la phosphatidyl choline a les mêmes R_f que le phosphatidyl glycérol, toujours d'après ce même auteur.

Une étude complémentaire de ces phospholipides est entreprise par chromatographie sur papier silicé selon la technique de Marinetti.²⁵ Un chromatogramme des phospholipides du parenchyme obtenu dans ces nouvelles conditions est présenté à la Fig. 5. L'extrait chloroformique, contenant les lipides totaux du parenchyme, se divise ainsi en 9 spots principaux. On peut identifier sur les chromatogrammes les corps suivants: phosphatidyl inositol, phosphatidylcholine, phosphatidylsérol, phosphatidylethanolamine, acide phosphatidique; les lipides neutres sont groupés dans le spot supérieur migrant presque au front du solvant. Ces identifications sont faites: (1) en comparant les R_f des corps séparés avec les R_f de substances témoins ou avec les R_f publiés par Marinetti (Tableau 4), (2) à l'aide des réactions colorées spécifiques suivantes: réaction de Dragendorff pour la phosphatidylcholine; réaction à la ninhydrine pour la phosphatidylsérol et la phosphatidylethanolamine, (3) en comparant les spectres infrarouges (Fig. 6) des substances élues du papier silicé avec les spectres infrarouges de substances témoins (ou avec ceux publiés par divers auteurs²⁶⁻²⁷). Aux cinq catégories de phospholipides citées ci-dessus, on peut ajouter les deux phospholipides supplémentaires suivants, identifiés avec une moins grande certitude, du fait de l'absence de témoins: le phosphatidylglycérol formant un petit spot surmontant la phosphatidylcholine et s'en distinguant nettement par une fluorescence différente, sous rayonnement u.v., après révélation à la Rhodamine; le diphosphatidylglycérol (cardiolipide) formant un petit spot sous l'acide phosphatidique. Deux spots supplémentaires sur les chromatogrammes représentent des substances non identifiées.

Comme dans l'étude des lipides neutres, les autoradiographies de chromatogrammes contenant des phospholipides extraits de tissus ayant métabolisé divers précurseurs radioactifs, permettent de confirmer ces résultats. Lorsque l'acéate-1- ^{14}C est le précurseur, tous les spots sont marqués; lorsque le ^{32}P -phosphate est le précurseur, tous les spots sont marqués sauf celui des lipides neutres; lorsque le glycérol-1-3- ^{14}C est le précurseur tous les spots à nouveau sont marqués (Fig. 7).

Les glycerophospholipides présents dans le parenchyme de pommes sont en outre identifiés de façon complémentaire à l'aide de leurs produits de désacylation préparés selon la méthode de Dawson modifiée par Benson et Maruo.²⁸ Les chromatographies bidimensionnelles sur papier (Fig. 8) des produits de désacylation montrent les spots représentant les corps rassemblés dans le Tableau 5, identifiés par leur R_f , et correspondant aux produits d'hydrolyse des principaux phospholipides précédemment identifiés dans le tissu.

²⁵ G. V. MARINETTI, In *New Biochemical Separations* (Edited by A. T. JAMES and C. J. MORRIS), p. 339. Van Nostrand, New York (1964).

²⁶ G. ROUSER, G. KRITCHEVSKY, D. HELLER et E. LIEBER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **40**, 425 (1963).

²⁷ M. B. ABRAMSON, W. T. NORTON et R. KATZMAN, *J. Biol. Chem.* **240**, 2389 (1965).

²⁸ A. A. BENSON et B. MARUO, *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 189 (1958).

TABLEAU 3. SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMMES

Catégories séparées	Iode	Révélation			R_f dans le solvant A			R_f dans le solvant B		
		Acide sulfurique	Ninhydrine	Réactif de Drägendorff	Mesuré	Témoin par Lepage ²⁴	Publié par Lepage ²⁴	Mesuré	Témoin	Publié par Lepage ²⁴
Phosphatidylsérine	+	+	+	—	0,0	0,14	0,0	0,0	0,0	0,06
Phosphatidylinositol	+	+	—	—	0,15	0,19	0,23	0,20	0,19	0,14
Phosphatidylcholine	+	+	—	+	0,28	0,26	0,33	0,27	0,26	0,18
Phosphatidylethanolamine	+	+	+	—	0,45	0,44	0,62	0,40	0,38	0,35
Acide phosphatidique	+	+	—	—	0,84	—	0,74	0,78	—	0,79
Lipides neutres	+	+	—	—	0,85	0,85	0,92	0,98	0,98	0,97

Chromatographie bidimensionnelle—Solvant A: chloroforme-méthanol-eau (65/25/4, en volumes); Solvant B: diisobutylcétone-acide acétique-eau (80/50/10, en volumes).

TABLEAU 4. SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER SILICE DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMMES

Catégories séparées	Révélation				R_f des substances témoins	R_f publiés par Marinetti ²⁵	Produits de désacylation*
	Rhodamine et lecture sous u.v.	Réactif (couleur de fluorescence)	Réactif de Drägendorff	Ninhydrine			
Phosphatidylinositol	+	Bleue	—	—	0,23	0,23	0,21
Phosphatidylcholine	+	Jaune	+	—	0,31	0,31	0,37
Phosphatidylglycérol (?)	+	Bleue	—	—	0,34	—	—
Phosphatidylsérine	+	Bleue	—	+	0,41	0,41	0,45
Phosphatidylethanolamine	—	Jaune	—	+	0,50	0,50	0,50
Diphosphatidylglycérol (?)	+	Bleue	—	—	0,68	—	0,57-0,67
Acide phosphatidique	+	Bleue	—	—	0,87	0,87	0,78-0,90
Lipides neutres	+	Bleue	—	—	0,94	0,94	—

* Ces produits de désacylation, identifiés par chromatographie sur papier (voir le texte) sont désignés par les abréviations suivantes: GPI = glycérylphosphoryl-*l*-inositol; GPC = glycérylphosphorylcholine; GPE = glycérylphosphoryl-glycérol; GPG = diglycérylphosphoryl-*l*-inositol; GP = glycerophosphate.

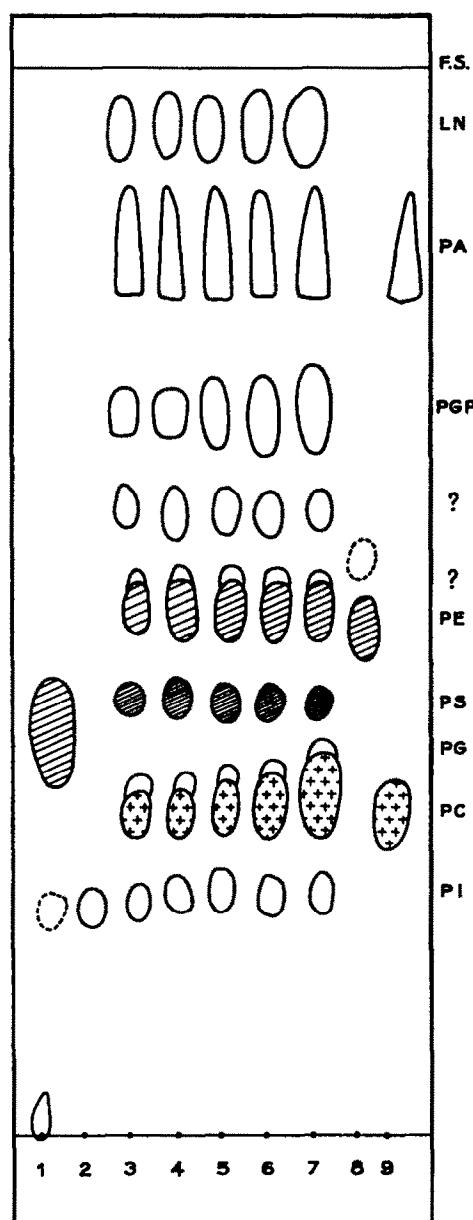


FIG. 5. SÉPARATION DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME SUR PAPIER SILICÉ (MÉTHODE DE MARINETTI).

1: Témoin commercial de Phosphatidylsérine; 2: témoin commercial de Phosphatidylinositol; 3-7: lipides totaux du parenchyme en solution dans le chloroforme, en quantités croissantes de 3 (30 μ l d'extrait) à 7 (60 μ l d'extrait); 8: témoin commercial de Phosphatidyléthanolamine ("céphaline" impure); 9: témoin commercial de Phosphatidylcholine. Mêmes abréviations et symboles qu'à la Fig. 4. Révélation générale à la Rhodamine et observation sous rayons u.v.

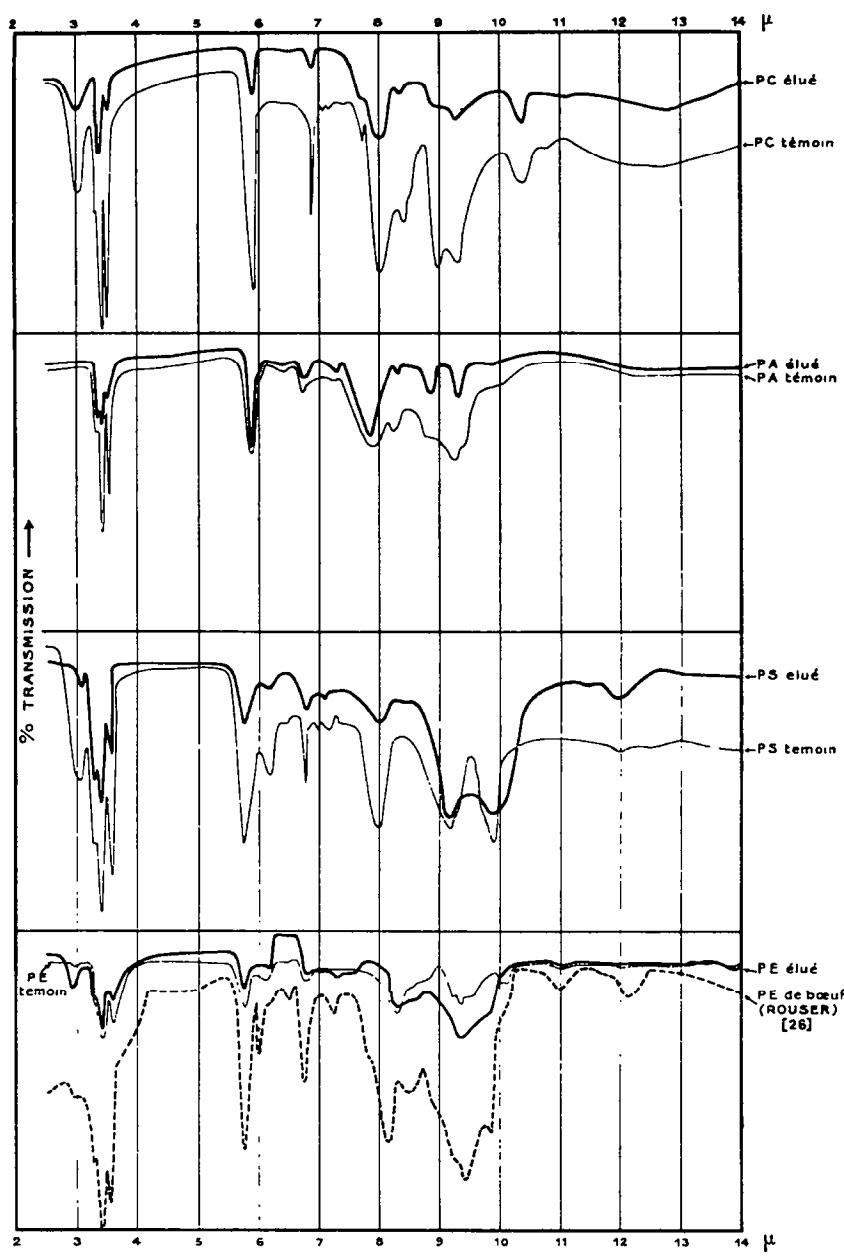


FIG. 6a.

FIG. 6. SPECTRES I.R. DES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME SÉPARÉS SUR PAPIER SILICÉ PUIS ÉLUÉ PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE. LES SPECTRES SONT COMPARÉS AVEC CEUX FOURNIS PAR LES TÉMOINS COMMERCIAUX OU AVEC LES SPECTRES PUBLIÉS PAR ROUSER *et al.*²⁶

On constate un bon accord entre les spectres fournis par les corps élués et les spectres donnés par les substances témoins. Les abréviations sont les mêmes qu'à la Fig. 5.

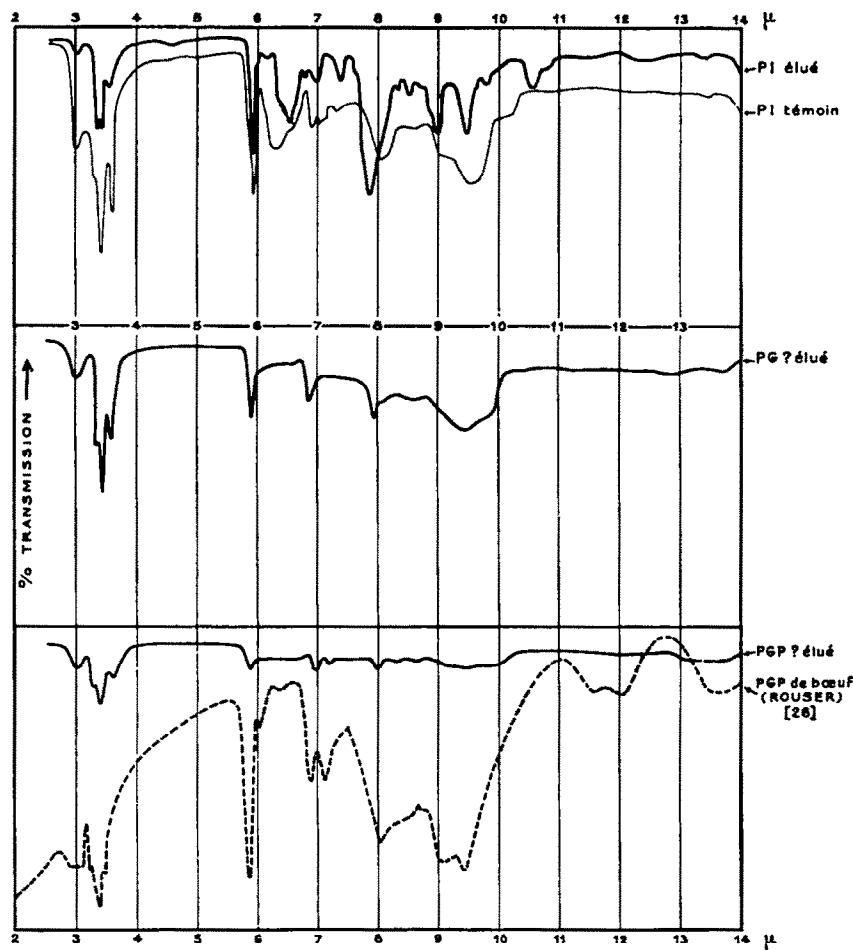


FIG. 6b.

Les quantités respectives des différents phospholipides sont mesurés par deux méthodes: (1) en dosant le phosphore présent dans les différents spots des chromatogrammes obtenus sur papier silicé. Le dosage du phosphore est fait selon la technique de Ducet,²⁹ (2) en mesurant la radioactivité totale de chaque spot sur des radiochromatogrammes obtenus après incubation de fragments de parenchyme, pendant 16 hr, dans des solutions contenant du phosphate marqué au ³²P. Les deux techniques ont donné des résultats concordants, rassemblés dans le Tableau 6. Il apparaît très nettement que les deux phospholipides majeurs du tissu sont la phosphatidylethanolamine et la phosphatidylcholine formant respectivement 40 et 35% de la masse des phospholipides totaux. L'acide phosphatidique représente encore, avec 16%, une fraction importante des phospholipides. Les autres phospholipides identifiés ne sont que des constituants mineurs du tissu.

Les acides gras des différents phospholipides ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse après séparation des phospholipides sur couche mince dans le système chromatographique chloroforme-méthanol-eau/acide silicique de Lepage. Après migration du

²⁹ G. DUCET et G. VANDEWALLE, *Ann. Physiol. Végétale* 1, 201 (1959).

solvant, les différents bandes de phospholipides sont grattées de la plaque, saponifiées directement et les acides gras sont méthylés avant d'être séparés. Les résultats ont été portés dans le Tableau I. Aucune catégorie de phospholipide ne présente une composition en acides gras bien remarquable. On constate cependant que le phosphatidylinositol est très riche en acides saturés (palmitique (54 %) et stéarique (25 %)) ce qui distingue nettement ce phospholipide des autres lipides du tissu, dont l'acide linoléique est toujours le constituant majeur.

TABLEAU 5. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES PRODUITS DE DÉSACYLATION DES PHOSPHOLIPIDES DU PARENCHYME DE POMME

Produits de désacylation	Solvant A: phénol-eau		Solvant B: butanol-acide propionique-eau		Phospholipides ayant donné les produits de désacylation
	R _f mesurés	R _f publiés par Benson et Maruo ²⁸	R _f mesurés	R _f publiés par Benson et Maruo ²⁸	
GPC*	0,91-0,95	0,89	0,28	0,29	Phosphatidylcholine
GPE	0,54-0,57	0,65	0,22	0,23	Phosphatidylethanolamine
GPC cyclique†	0,50	—	0,29	—	Phosphatidylcholine
PGP	0,38	0,40	0,22	0,17	Phosphatidylglycérol
GP	0,30	0,32	0,25	0,22	Acide phosphatidique
GPS	0,23-0,25	0,22	0,33	0,12	Phosphatidylsérine
PGPGP	0,12-0,31	0,14	0,13	0,07	Diphosphatidylglycérol
GPI	0,11-0,19	0,12	0,12	0,05	Phosphatidylinositol

* Ces abréviations sont les mêmes que celles employées au Tableau 4.

† Identification probable, d'après les données de Maruo et Benson³⁰.

TABLEAU 6. POURCENTAGE DES DIFFÉRENTS PHOSPHOLIPIDES PRÉSENTS DANS LE PARENCHYME DE POMMES

Catégories	% déterminés par le dosage du phosphore	% déterminés par la radioactivité due au ³² P
Lysophospholipides*	—	0,67
Phosphatidylinositol	3,20	1,56
Phosphatidylcholine†	35,20	32,61
Phosphatidylsérine	traces	6,89
Phosphatidylethanolamine	41,60	38,66
Diphosphatidylglycérol (?)	3,20	3,83
Acide phosphatidique	16,80	16,28
	100,00	100,00

* Mis en évidence par leur radioactivité seulement.

† Ce spot contient en plus une faible quantité de phosphatidylglycérol.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le parenchyme de pomme est un tissu végétal formé de cellules banales, non chlorophylliennes dans le fruit adulte, à métabolisme ralenti au cours de la survie au froid après cueillette. Ce métabolisme peut cependant redevenir plus actif si le fruit est mis à mûrir à

³⁰ B. MARUO et A. A. BENSON, *J. Biol. Chem.* **234**, 254 (1959).

plus haute température. En entreposant au froid un lot de pommes d'une variété donnée, on dispose donc de nombreuses unités d'un matériel biologique stable, bien homogène au point de vue de sa physiologie générale et de sa morphologie. *La composition en lipides du parenchyme de pomme est également très uniforme d'un fruit à l'autre et à l'intérieur d'un même fruit*, comme nous l'ont montré plusieurs dizaines d'analyses d'acides gras ou de phospholipides effectuées sur ce matériel depuis quelques années.

Les diverses techniques chromatographiques utilisées convergent pour établir l'existence, dans les cellules du parenchyme des pommes, de nombreuses catégories de lipides. 75% de la masse des lipides, environ, est représentée par des phospholipides. Ce sont essentiellement des glycerophospholipides se rangeant dans les catégories suivantes: phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine et acide phosphatidique. A côté de ces constituants majeurs, formant ensemble plus de 90% de la masse des phospholipides, on trouve en plus du phosphatidylinositol, de la phosphatidylsérine et les mono- et di-phosphatidylglycérol. D'autres lipides polaires sont encore présents, en très faible pourcentage. Les lipides neutres sont essentiellement constitués de triglycérides; les diglycérides cependant forment une part non négligeable de la masse des lipides neutres. Les acides gras présents dans le tissu sont répartis à peu près uniformément entre les différentes catégories de lipides. Les triglycérides sont toutefois un peu plus riches en acide linoléique que les autres lipides: ils contiennent plus de 60% de cet acide. Les phospholipides apparaissent légèrement plus riches en acides saturés (on trouve même jusqu'à 54% d'acide palmitique dans le phosphatidylinositol).

Nous exposons dans un deuxième article les résultats concernant l'étude du métabolisme de tous ces lipides dans le parenchyme de pomme.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel biologique. Les fruits utilisés sont des pommes de la variété *Golden Delicious*, cueillies vertes et placées en survie au laboratoire en chambre froide, à la température de 0-2°. Les fruits d'expérience étaient toujours en parfait état physiologique. Lorsque les expériences devaient se dérouler sur des fruits mûrs, les pommes choisies étaient placées à 18° et atteignaient la maturité en une semaine et demie environ. La couleur des fruits mûrs est jaune doré.

Les fragments de parenchyme sont découpés dans la partie centrale du péricarpe, à égale distance des couches périphériques et de la zone carpellaire. On a pris soin de n'entraîner que des tissus blancs, sans trace apparente de chlorophylle.

Extraction des lipides totaux. Cette extraction est conduite selon la technique classique de Folch¹⁹ modifiée par Bligh et Dyer.²⁰ 5 g de parenchyme sont broyés dans 18 ml de mélange chloroforme-méthanol bouillant (1 volume de chloroforme pour 2 volumes de méthanol), en présence d'un peu de sable de Fontainebleau. On rajoute après quelques instants 6 ml de chloroforme puis 6 ml d'eau distillée. Le broyat est filtré dans une ampoule à décanter. Le mortier et le résidu sont rincés par 6-12 ml supplémentaires de chloroforme. Après décanovation, deux phases se séparent: l'inférieure chloroformique, contenant les lipides est recueillie, une nouvelle fois rincée à l'eau, puis concentrée sous vide en évaporateur rotatif.

Analyse des acides gras. Après saponification des lipides par la potasse alcoolique normale, libération des acides gras par l'acide chlorhydrique, et méthylation des acides par le méthanol-trifluorure de bore (méthode de Metcalfe et Schmidt,³¹) les esters méthyliques sont traités de la façon suivante.

³¹ L. P. METCALFE et A. A. SCHMIDT, *Anal. Chem.* 33, 363 (1961).

Ces esters sont d'abord purifiés par passage sur colonne d'acide silicique et élution à l'hexane selon la recommandation de Hulanicka, Erwin et Bloch.³² L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters est conduite à l'aide d'un appareil Profit (chromagaz CG1), à détection par ionisation de flamme, muni d'un diviseur à la sortie de la colonne (1/100 e de la quantité injectée passe dans le détecteur, le reste sort de l'appareil). Les colonnes utilisées sont en laiton ou en acier inoxydable; leur longueur est de 3 m et leur diamètre intérieur d'un quart de pouce. Deux phases stationnaires sont utilisées: (1) une phase polaire: le butanediol-succinate adsorbé sur du chromosorb W (de calibre 60-80 mesh), hexamethyl/silanisé. Le pourcentage de phase stationnaire utilisé par rapport au poids total de support imprégné est de 20 %. (2) une phase apolaire: le silicone 710 formant 10 % du poids du support imprégné (le support inerte utilisé est le même).

L'identification des acides gras, décrite en détail dans une précédente publication,²¹ est faite par comparaison des volumes de rétention mesurés sur les deux phases avec les volumes de rétention de substances témoins. On vérifie que les logarithmes des volumes de rétention des acides appartenant à une série homologue varient de façon linéaire.

Deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour l'analyse des acides gras des lipides totaux: (1) séparation des esters méthyliques selon leur degré d'insaturation sur couche mince de silice-nitrate d'argent. Les spots séparés sont élus des plaques et les longueurs de chaîne sont vérifiées par chromatographie en phase gazeuse. (2) Formation des complexes mercuriques (selon la méthode de Goldfine et Bloch³³) avec les acides gras insaturés; séparation sur colonne de silice des acides saturés et des acides insaturés complexés, puis étude ultérieure de chaque groupe par chromatographie en phase gazeuse. Toutes ces méthodes complémentaires confirment les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats donnés par ces méthodes complémentaires ont été également publiés *in extenso* dans un article antérieur.²¹

Séparation des lipides bruts en diverses classes. Cette séparation est effectuée sur l'extrait chloroformique des lipides totaux par les deux méthodes suivantes.

(1) *Séparation sur couche mince de silice*, selon Mangold.²² Des plaques de verre sont recouvertes d'une couche mince (0,25 mm) de silice selon la technique classique (25 g de silicagel G pour 55 ml d'eau) en utilisant l'étalateur Desaga. (Les couches minces de silice sur plaque de verre, préparées en série par la firme Merck, nous ont également donné d'excellentes séparations.) Les plaques sont activées une demi-heure à 110° immédiatement avant leur utilisation. Le solvant de développement utilisé est le mélange éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (les volumes respectifs de chaque solvant sont sans les rapports 90:10:1). Le temps de développement est d'une heure en moyenne. La révélation des spots se fait en aspergeant la plaque à la dichlorofluorescine puis en regardant sous lumière ultraviolette, ou en carbonisant les spots par SO_4H_2 concentré.

(2) *Séparation sur papier silicé*, selon Marinetti.²³ Trois solvants sont successivement utilisés pour le développement, sur le même papier, en chromatographie ascendante. Le premier solvant est le mélange chloroforme-méthanol (1:1 en volumes) qu'on laisse monter sur le papier à une hauteur de 3 cm au dessus de la ligne de départ des spots. Le deuxième solvant est le mélange heptane-diisobutylcétone (1:1 en volumes) migrant jusqu'à 6 cm au dessus de la ligne de départ. Le troisième solvant est le mélange heptane-diisobutylcétone/acide acétique (96:6:0,5 en volumes) migrant jusqu'à 14 cm au dessus de la ligne de départ.

³² D. HULANICKA, J. ERWIN et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **243**, 2778 (1964).

³³ H. GOLDFINE et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **236**, 2596 (1961).

La révélation des spots se fait en plongeant le chromatogramme dans une solution aqueuse de Rhodamine 6G à 0,1 mg/l. puis en regardant sous lumière ultraviolette.

(3) *Séparation sur colonne des lipides neutres et des phospholipides.* Pour fractionner 450 mg des lipides totaux du parenchyme en solution chloroformique, on réalise une colonne de 25 cm de hauteur sur 1 cm de diamètre en mélangeant 20 g d'acide silicique (qualité pour chromatographie) avec 10 g d'Hyflo-Supercel puis en transformant en bouillie épaisse ce mélange à l'aide d'environ 50 ml de chloroforme.

L'élution des lipides neutres est faite par 225 ml de chloroforme sous courant d'azote léger pour créer une légère surpression à l'entrée de la colonne. Les lipides polaires sont élusés par 150 ml de mélange chloroforme-méthanol (1:1 en volumes) puis 100 ml de mélange chloroforme-méthanol (1:9 en volumes). La nature des éluats est contrôlée par chromatographie sur papier silicé comme indiqué ci-dessus.

Analyse des Phospholipides

Le phosphore lipidique est dosé selon la microméthode de DUCET et MENCL.³⁰ Après minéralisation des prises d'essai par l'acide sulfurique, décoloration totale par l'eau oxygénée, un complexe coloré phosphomolybdique est obtenu en ajoutant au milieu du molybdate d'ammonium et du chlorure stanneux. Les densités optiques sont lues au photocalorimètre à 733 m μ et rapportées aux quantités de phosphore grâce à des courbes étalon. La séparation des différentes catégories de phospholipides est effectuée par les deux méthodes suivantes:

(1) *Séparation bidimensionnelle sur couche mince de silice, selon Lepage.*²⁴ Les couches minces de silice (d'épaisseur 250 μ) sont préparées sur plaque de verre avec l'étalateur Desaga: on utilise 25 g de Silicagel G pour 55 ml d'eau distillée. Les plaques sont activées 30 mn à 110° immédiatement avant utilisation. Un spot du mélange des lipides totaux en solution chloroformique est déposé dans un coin de la plaque. Une première migration est réalisée en utilisant comme solvant de développement le mélange chloroforme-méthanol-eau (65:25:4 en volumes). Après séchage de la plaque sous azote un deuxième développement, dans une direction perpendiculaire au premier sens de migration, est réalisé à l'aide du mélange diisobutylcétone-acide acétique-eau (80:50:10 en volumes). La révélation générale des spots est faite par l'iode, la dichlorofluoresceine ou l'acide sulfurique concentré. Les révélations spécifiques de certains spots sont faites par la ninhydrine en solution dans le mélange acétone-lutidine (pour les phospholipides à fonction aminée libre), le réactif de Dragendorff (pour les phospholipides à choline) ou l'acide perchlorique (en solution aqueuse à 20%) donnant une coloration rose avec les stérols.

(2) *Séparation par chromatographie ascendante sur papier silicé selon Marinetti.*²⁵ On utilise le papier Whatman imprégné de gel de silice vendu dans le commerce. La migration se fait en chromatographie ascendante, sur une hauteur de 36 cm au dessus de la ligne de dépôt des spots, dans une cuve saturée des vapeurs du solvant depuis plusieurs heures. Le solvant de développement est le mélange diisobutylcétone-acide acétique-eau (dans les proportions 80:50:10 en volumes). La révélation des spots est faite à la Rhodamine 6G, sous lumière ultraviolette ou par autoradiographie.

Analyse des Produits de Désacylation des Phospholipides

Les produits de désacylation sont préparés par la méthode de BENSON et MARUO.²⁸ Les lipides totaux de 25 g de parenchyme de pommes, marqués au ^{32}P après incubation en présence de $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$, sont repris dans le mélange suivant: 5 ml de tétrachlorure de carbone,

100 ml de méthanol et 4 ml de potasse alcoolique 0,2 N. La saponification ménagée des phospholipides est conduite pendant 30 mn à 37°. Les acides libérés sont fixés par 2 g d'Amberlite. Les produits de désacylation, présents dans le surnageant, sont chromatographiés sur papier Whatman No. 2 dans deux dimensions: le premier solvant est le mélange phénol-eau; le second solvant est le mélange: butanol-acide propionique-eau. La révélation est faite par autoradiographie.

Analyse des acides gras des phospholipides. La solution chloroformique des lipides totaux est déposée en bande continue sur une couche mince de silice, activée. On utilise le premier développement de la méthode de Lepage pour séparer les phospholipides. Les zones révélées à la dichlorofluorescéine sont grattées avec une spatule, saponifiées par la potasse alcoolique et les acides gras, méthylés, sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

Examen des autoradiographies. Les films sensibles sont les films radiographiques Kodak, sans écrans, qualité Kodirex (pour les chromatogrammes contenant du ^{14}C) ou Regulix (pour les lipides marqués au ^{32}P). Les temps d'exposition varient d'une nuit à un mois selon les activités des lipides marqués. Le révélateur concentré rapide Guilleminot est utilisé, dilué au quart, pendant trois minutes. Après un rinçage à l'eau, un fixateur constitué d'une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium et de métabisulfite de potassium (respectivement 200 g et 20 g/l.) est utilisé pendant une demi-heure. Les plaques fixées sont abondamment rincées à l'eau avant d'être mises à sécher.