

Conseil International pour
l'Exploration de la Mer

C.M. 1963
Comité Atlantique
No. 135 E

Etude biochimique des lipides tissulaires de Brosme brosmes Raf.

par

J. M. Gastaud

Centre Scientifique de Monaco

Depuis plusieurs années les lipides, en particulier celles extraites des foies de poissons, font l'objet de recherches importantes plus nombreuses de nos jours en raison de l'intérêt que présente ces produits. Par contre les lipides des tissus semblent n'avoir suscité que de rares travaux, ainsi avons nous entrepris une étude systématique.

Ces résultats préliminaires ont été obtenus à partir d'extraits lipidiques des tissus de Brosme brosmes (Raf.), provenant de notre mission en Atlantique N.O. à bord du navire océanographique français "Thalassa" pendant les mois d'août et septembre 1962, dans un secteur compris entre le banc Brown et l'île de Sable.

Partie expérimentale

Les lipides sont extraites d'abord à froid par l'acétone puis par l'éther éthylique, ensuite à chaud par un mélange éther de pétrole-chloroforme. Tous les solvants sont évaporés sous vide à basse température. Le résidu obtenu, de couleur marron brunâtre, liquide à la température ambiante, est maintenu sur P_2O_5 jusqu'à poids constant. Le rendement en lipides varie entre 846 et 984 mg pour cent.

Résultats

Après chromatographie en couche mince sur gel de silice (Merck), de l'extrait lipidique total, la révélation par le trichlorure d'Antimoine en solution chloroformique met en évidence trois spots: 1 spot bleu foncé ($R_f=0,15$), 1 spot à fluorescence brune ($R_f=0,63$), 1 spot jaune vif ($R_f=0,85$). Le mélange éthanol-acide sulfurique révèle également trois spots ($R_f=0,15$; bleu clair; $R_f=0,55$ correspondant au cholestérol; enfin $R_f=0,75$ rose).

Traités par le méthanol chaud, les lipides laissent déposer après quelques heures de repos à $0^\circ C$ des cristaux en formes d'aiguilles soyeuses incolores ou de rectangles légèrement colorés en jaune clair, dont le point de fusion au bloc est compris entre 129 et $131^\circ C$.

La chromatographie de ces cristaux suivant la méthode précédente suivie de la révélation par le réactif au $SbCl_3$ visualise trois spots ($R_f=0,20$; $R_f=0,27$; $R_f=0,38$) colorés en bleu clair, à fluorescence rose; puis un spot rouge violacé ($R_f=0,75$) identique au cholestérol.

La liquide surnageant, chromatographié dans les mêmes conditions révèle: 1 spot bleu clair à fluorescence rose ($R_f=0,14$); 1 spot ($R_f=0,75$) correspondant au cholestérol; 1 spot ($R_f=0,85$) à fluorescence jaune; enfin 1 spot ($R_f=0,95$) à fluorescence brune.

L'examen spectrophotométrique dans l'ultra-violet des solutions éthanoliques des cristaux d'une part, du surnageant de l'autre, montre pour la fraction cristallisée un pic à $\lambda_{max.} 294 m\mu$. ($E_{1\%}^{1cm} = 4,1$). La seconde solution ne présente aucun accident dans le tracé.

Sur cette dernière nous avons réalisé une précipitation par la digitonine et décomposition du complexe suivant la technique de Bergmann. Le spectre U.V. de la fraction précipitable présente un $\lambda_{max.}$ à $271-271,5 m\mu$. Le coefficient d'extinction moléculaire est égal à $396,2$. La cinétique de la réaction de Libermann effectuée à $25^\circ C$ sur le complexe digitonoside montre un premier maximum après $2,30$ min. de chauffage, un second après 4 min., suivi d'une inflexion et d'une remontée rapide de la courbe due semble-t-il au cholestérol dont le pourcentage varie entre 26 et 27% .

La réaction de Carr et Price fut négative; celle de Lifschütz développa à froid une coloration jaune légèrement verdâtre, différente de celle obtenue par une solution pure de 7β -hydroxycholestérol.

Après saponification par la potasse méthanolique de 348 mg. de lipides dans le dioxane on obtient après extractions alcaline et acide 68 mg. d'un résidu huileux, jaune clair, fournissant rapidement une réaction de Libermann positive. Le spectre U.V. de l'insaponifiable en solution dans l'éthanol absolu montre un maximum à $\lambda_{\text{max.}}$ 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 137,5$). En solution dans l'acide sulfurique le tracé du spectre présente un inflexion à $\lambda_{\text{min.}}$ 250 m μ , et un maximum à $\lambda_{\text{max.}}$ 310 m μ . Ces deux résultats laissaient prévoir l'existence de substances possédant dans leur cycle une double liaison ainsi qu'une fonction cétone. Cette dernière a été identifiée par les méthodes de Zimmermann (m-dinitrobenzène) dont le maximum d'absorption était à 520 m μ ; et de Gornall et Mac Donald (dinitro-2,4-phénylhydrazine). Le spectre des hydrazones obtenues montre trois accidents:

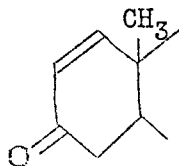
$\lambda_{\text{max.}}$ 450 m μ ; $\lambda_{\text{max.}}$ 470 m μ ; $\lambda_{\text{max.}}$ 480 m μ

La séparation en fractions cétonique et non-cétonique confirme les résultats précédents.

Conclusion

La chromatographie en couche mince révèle l'hétérogénéité des lipides tissulaires de Brosme brosmes Raf. A côté d'une teneur élevée en cholestérol, comprise entre 26 et 27 p.cent, on remarque de faibles quantités de composés doués de polarités différentes. Le traitement méthanolique ou la précipitation par la digitonine permettent de séparer le cholestérol ainsi que certaines substances possédant soit des doubles liaisons soit un hydroxyle libre. Le caractère rapide de la réaction de Libermann laisse supposer l'existence parmi le digitonoside de stérols appartenant au groupe des "fast acting" stérols de Baumann, c'est à dire soit un Δ^7 -stérol (7-déhydrocholestérol ou ergostérol) soit un stérol capable de se deshydrater facilement (7β -hydroxycholestérol) par exemple. Toutefois, si l'on tient compte des résultats de Moore et Baumann obtenus sur des tissus d'espèces animales différentes, la cinétique de la réaction semblerait due dans notre cas à la présence de 7 OH-cholestérol, malgré le caractère peu probant de la réaction de Lifschütz.

La présence de composés possédant une fonction cétone n'est pas un caractère particulier à ces lipides; par contre le déplacement du maximum à $\lambda_{\text{max.}}$ 230 m μ , semble assigner à la double liaison une position Δ^{1-2} , contrairement à ce que l'on rencontre généralement. Ainsi, la formule pourrait-elle correspondre au schéma ci-dessous:-



De plus, la valeur du coefficient d'extinction moléculaire se rapproche étroitement du coefficient de certaines substances répondant à cette formule.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos sentiments de très respectueuse gratitude à S.A.S. le Prince Souverain qui a daigné nous autoriser à participer à cette campagne, et assurer Monsieur J. Furnestin, Directeur de l'I.S.T.P.M., Président du Conseil International pour l'Exploration de la Mer de notre profonde reconnaissance pour les facilités de travail mises à notre disposition.

Bibliographie

- | | | |
|---------------------------------|------|---|
| Bergmann, W. | 1940 | J. Biol. Chem., <u>132</u> , pp.471-72. |
| Gastaud, J. M. | 1963 | Rev. Trav. Inst. Pêches marit., <u>27</u> (2), pp.221-34. |
| Moore, P. R.
& Baumann, C.A. | 1952 | J. Biol. Chem., <u>193</u> , pp.615-21. |