

Cercetări marine	I.R.C.M.	Nr.8	193 - 205	1975
------------------	----------	------	-----------	------

## SUR LES FRACTIONS LIPIDIQUES DE *Mya arenaria* L .

Molnar A.,<sup>1</sup> Mirza M.<sup>2</sup> et Panteli C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches Chimiques Pharmaceutiques Bucarest

<sup>2</sup>Institut Roumain de Recherches Marines Constanta.

### ABSTRACT:

There had been determined the content and composition of free bound and total lipids from *Mya arenaria* in: glycerides, phospholipids, insaponifiables. It was shown that the phospholipids had a greater capacity to form cenapses than the other components. It was discussed that the fraction of bound lipids was richer in lecithins and lysolecithins and poorer in cephalins and lysocephalins than the free one.

La composition chimique du mollusque *Mya arenaria* a été très peu étudiée. HUMPHREY (4), DOYLE (3) ont signalé l'activité adenosintriphosphatasique du myosine et la structure chimique du style cristalline du *Mya arenaria*. ROSEN (9) a déterminé les modifications des acides organiques (pyruvique, lactique, acides volatiles) glicogène, glucose, pendant la réfrigération de ce mollusque. Le contenu des fractions lipidiques chez *Mya arenaria* n'a pas été étudié.

Le but de notre ouvrage a été constitué par l'étude des lipides qui ne sont pas encore connues et spécialement des frac-

tions phospholipidiques et insaponifiables du Mya arenaria de la mer Noire.

Une étude ressemblante sur les fractions lipidiques du Mytilus galloprovincialis a été effectuée par MOLNAR et al. (6).

#### MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Pour nos expériences nous avons utilisé le Mya arenaria cueilli le 4 Août 1973 à Cap Midia (nord Constanta). Les coquillages avaient 3-8 cm tels qu'on les trouve en proportion naturelle. Les travaux préparatifs et analytiques ont été décrits dans une antérieure étude sur les fractions lipidiques du Mytilus galloprovincialis (MOLNAR et al. (6)).

#### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

La fraction I de lipides libres obtenus par extraction à l'éther représente 6,24%, la fraction II de lipides liés extraite par le dichloréthane 2,15 % et les lipides totaux 8,39% rapportés au tissu sec (Tableau 1) et on observe que 25,6 % des lipides totaux se trouvent sous forme liée. On trouve les plus grands écarts en ce qui concerne la fraction de phospholipides totaux qui représentent 49,93 % dans la fraction II pour 19,87 % dans la fraction I. Les glycérides et les insaponifiables se trouvent dans une proportion plus réduite dans la fraction II par rapport à la fraction I; cette différence est plus marquée pour le cholestérol que pour les insaponifiables totaux. Ces données montrent que les phospholipides ont une plus grande capacité que les autres fractions lipidiques pour former des cénapses. Les auteurs ont observé la même chose chez les lipides du Mytilus galloprovincialis MOLNAR (6). En partant des données (Tableau 1) on a calculé le contenu en fraction lipidiques du tissu sec (Tableau 2). Ces données mettent encore mieux en évidence l'aptitude sensiblement plus grande des phospholipides à former des cénapses. Du total en phospholipides dans le tissu sec on retrouve 46,1% sous forme liée tandis que pour les insaponifiables totaux et les glycérides le chiffre est de 16,4% respectivement 18,1% et pour le cholestérol le pourcentage est beaucoup plus bas, ne représentant que 7,6% sous forme liée.

Tableau 1

Composition des fractions lipidiques du Mya arenaria

	Fraction I lipides libres	Fraction II lipides liés	Lipides totaux fractions I+II
Phospholipides totaux %	19,87	49,93	27,65
Insaponifiables totaux %	23,77	13,86	21,09
Glycérides %	56,36	36,21	51,26
Cholestérol %	19,47	4,77	15,61
Acides gras totaux %	63,60	57,51	62,09

Tableau 2

Contenu en fractions lipidiques du Mya arenaria (tissu sec)

	Fraction I lipides libres	Fraction II lipides liés	Lipides to- taux frac- tion I+II	Liés en total
Lipides totaux %	6,24	2,15	8,39	25,6
Phospholipides totaux %	1,24	1,08	2,32	46,5
Insaponifiables totaux %	1,48	0,29	1,77	16,4
Glycérides %	3,52	0,78	4,30	18,1
Cholestérol %	1,21	0,10	1,31	7,6
Acides gras totaux %	3,97	1,24	5,21	23,8

Nous avons observé un parallélisme entre les proportions des fractions liées et libres en Mytilus galloprovincialis, antérieurement étudié par MOLNAR et al. (6) et la répartition des fractions lipidiques dans Mya arenaria.

Pour connaître la composition des fractions de phospholipides et pour savoir lesquels des composants peuvent être trouvés dans le tissu et dans quelles proportions ils s'y trouvent sous forme libre ou liée, on a procédé à l'identification sur plaques chromatographiques en couche mince. Nous avons effectué des migrations parallèles avec les phospholipides totaux du soja et du foie de rat en connaissant l'ordre de migration de ces fractions

des phospholipides. Après le développement à la ninhydrine et à l'iode, nous avons interprété l'aspect caractéristique des plaques (Fig.1).

En connaissant l'ordre de migration des fractions de phospholipides nous avons conclu que les fractions observées contiennent les composants suivants: 1, 2, 3, - phospholipides non identifiés; 4 - céphaline (phosphatidylcolamines et probablement phosphatidylinositides); 5 - lysocéphaline; 6 - phosphatidyl-choline; 7 - sphingomyéline; 8 - lysophosphatidyl-choline; 9 - start, mélange de phosphoaminolipides. On a déterminé aussi le contenu en phosphore de chaque composant (Tableau 3).

Tableau 3

Composition des fractions de phospholipides pour  
Mya arenaria (tissu sec)

No. de la tache	Composants	P % din P total	
		Fraction I	Fraction II
1,2,3,	Phospholipides non identifiés	22,3	23,2
4	Céphalines	6,9	8,8
5	Lysocéphaline	34,0	10,6
6	Phosphatidyl-choline	13,6	33,3
7	Sphingomyélines	4,6	trace
8	Lysophosphatidyl-choline	6,0	13,7
9	Start	13,6	10,4

La répartition des composants phospholipidiques n'est pas identique dans les deux fractions de lipides libres et liées.

Les plus grandes différences apparaissent pour les composants principaux. Dans les fractions I les céphalines + lysocéphalines représentent 40,9 % des phospholipides totaux, tandis que dans la fraction II (lipides liées) leur taux est 19,9 % seulement. Par contre, les phosphatidylcholines + lysophosphatidylcholines représentent 19,4 % dans la fraction I, pour 47,0 % dans la fraction II. Ces chiffres montrent que, chez la Mya arenaria les phosphatidylcholines ont une tendance plus prononcée à former des cénapses que les phosphatidylcholamines. Ces observations ont été signalés aussi par MOLNAR et al. (6) dans une

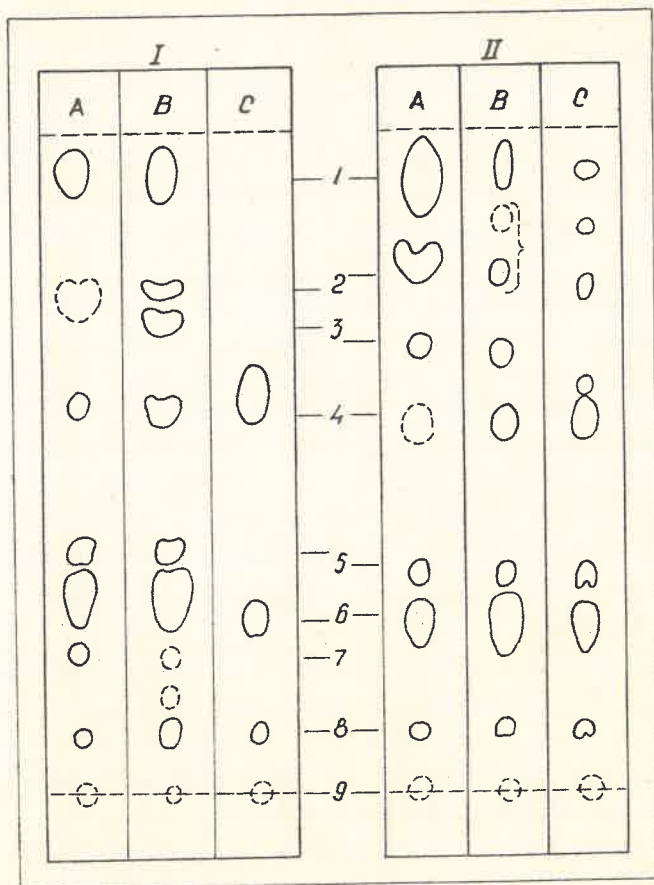


Fig.1. La chromatogramme des fractions phospholipides en comparaison avec des phospholipides totaux du soya.

I - Développement à la ninhydrine

A. Phospholipides fraction I

B. Phospholipides fraction II

C. Phospholipides de soya (les taches 1 - 9)

II - Développement à l'iode

A. Phospholipides fraction I

B. Phospholipides fraction II

C. Phospholipides de soya (les taches 1 - 9)

étude sur les lipides du Mytilus galloprovincialis. Il est possible qu'il s'agisse d'une règle générale, mais pour avoir la certitude, il est nécessaire d'élargir l'étude sur beaucoup d'espèces.

Pour la mise en évidence des stéroïdes, des caroténoïdes et de la vitamine A, les plaques chromatographiques des lipides totales et des insaponifiables correspondants aux fractions lipidiques, ont été d'abord soumises à l'observation directe, puis arrosées avec une solution de trichlorure de stibium.

Les aspects chromatographiques en comparaison avec le cholestérol, la vitamine D<sub>3</sub>, la vitamine A, le palmitate de vitamine A, et les chlorophylles sont représentées dans les Figures 2 et 3. Les observations concernant la coloration de chaque tache et leur interprétation sont synthétisées dans le tableau 4.

A l'observation directe sur les plaques chromatographiques on constate la présence de différentes taches colorées en diverses nuances de jaune. Ces taches correspondent avec les caroténoïdes ou les esters des caroténoïdes, qui traitées au SbCl<sub>3</sub>, donnent une coloration bleue. Le nombre des taches bleues est plus grand que celui des taches jaunes, ce qui s'explique par ce que l'intensité de la coloration bleue est plus grande que celle de la coloration jaune naturelle des caroténoïdes et ainsi, par cette réaction, on peut relever des quantités plus petites de caroténoïdes que par l'observation directe.

Une tache bleue, avec surface et intensité grandes qui apparaît en milieu d'une tache rose plus grande (Fig. 3, taches 5 et 6) qui ne se mettent pas en évidence par l'observation directe, présente la même valeur de R<sub>f</sub> que la vitamine A. Elle correspond avec la vitamine A, et elle est présente dans les fractions libres et liées des lipides.

Pour les lipides libres, en ce qui concerne les taches des caroténoïdes, on observe 3 taches qui sont en lipides et en fraction insaponifiables, ces taches - 3, 16, 20 - correspondent aux différents caroténoïdes. D'autres 3 taches - 1, 12, 15 - se présentent chez les lipides non saponifiés sans exister en fractions insaponifiables, mais en insaponifiables se présentent d'autres 3 taches - 4, 9, 11 - avec d'autres valeurs de R<sub>f</sub>, que n'ont pas été observées en lipides non saponifiés, elles correspondent à des esters des caroténoïdes.

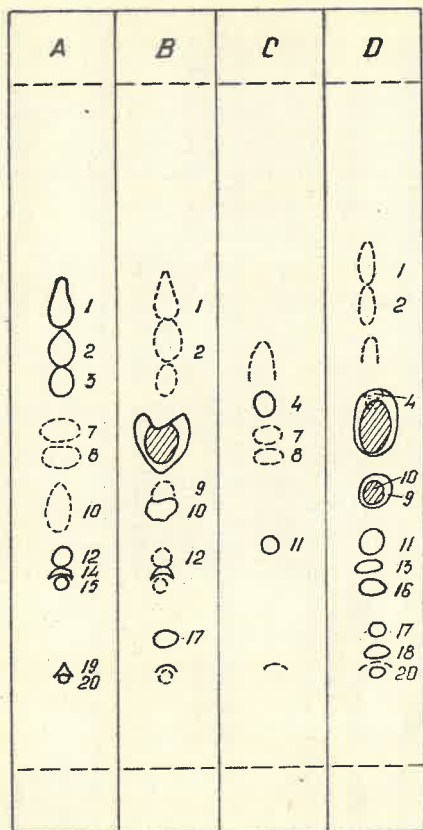


Fig.2. Aspect chromatographique des lipides libres et des insaponifiables en observation directe et après coloration au trichlorure d'antimoine.  
 A. Lipides fraction I (libres) observation directe  
 B. Lipides fraction I (libres) coloration au  $SbCl_3$   
 C. Insaponifiables dans les lipides fraction I (libres) observation directe (les taches 1-20)  
 D. Insaponifiables dans les lipides fraction I (libres) coloration au  $SbCl_3$  (les taches 1-20)

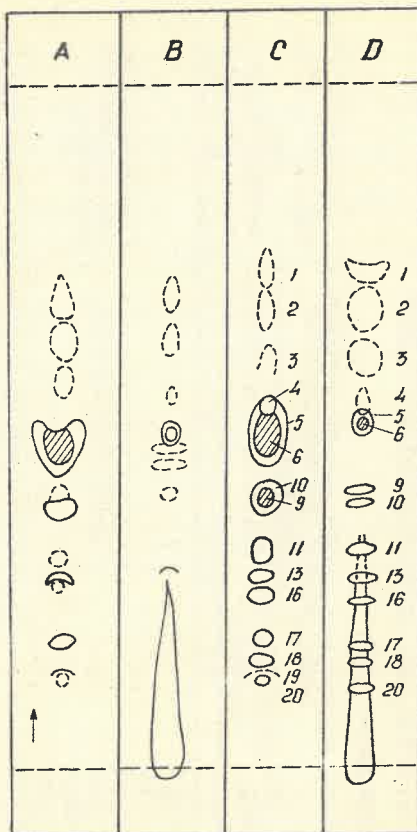


Fig.3. Aspect chromatographique des lipides libres et liés et des insaponifiables correspondants. Coloration au  $SbCl_3$ .  
 A. Lipides fraction I (libres)  
 B. Insaponifiables dans les lipides fraction I (libres)  
 C. Lipides fraction II (liés)  
 D. Insaponifiables dans les lipides fraction II (liés)(les taches 1-20)

Observations sur la coloration des chromatogrammes et leur  
interprétation

No. de la tache dans l'ordre de migration	Lipides totaux, fraction I		Insaponifiables des lipides fraction I		Interprétation des observations
	Observation directe	Coloration au $SbCl_3$	Observation directe	Coloration au $SbCl_3$	
0	1	2	3	4	5
1	Jaune	Rose-violet qui s'intensifie en 5 min. Au milieu de la tache apparaît une autre tache bleue qui s'intensifie en 10 min. Après 30 min. vire au gris.	-	Rose sale faible	Cholestérol ester + caroténoïdes ester.
2	Vert faible	Vert sale	Vert faible	Vert sale	Pigment vert
3	Jaune-orangé très faible	Gris-rose en 10 min. vire au gris	Jaune très faible	Gris-beige, vire au gris-verdâtre	Caroténoïde
4	-	-	Faible-rougeâtre	Verdâtre en 15 min. vire au bleu, en 90 min. est bleu foncé. Ne s'observe pas chez toutes plaques parce que la tache est couverte par les taches 5 et 6.	Caroténoïde qui correspond à un ester de caroténoïde en lipides non saponifiés.
5	Rose	Rose, s'intensifie en 3 min. et après vire au violacé (comme l'étalon de cholestérol).	-	Rose, s'intensifie en 3 min. et après vire au violacé (comme l'étalon de cholestérol).	Cholestérol

Tableau 4 (suite)

0	1	2	3	4	5
6	-	Au milieu de la tache apparait une grande tache bleue que l'on observe mieux sur le revers de la plaque (nuance semblable à l'etalon de vitamine A).	-	Au milieu de la tache apparait une grande tache bleue que l'on observe mieux sur le revers de la plaque (nuance semblable à l'etalon de vitamine A).	Vitamine A
7	Vert	Ne s'observe pas étant couverte par coloration des taches 5,6.	Vert tres faible	Ne s'observe pas étant couverte par coloration des taches 5,6.	Pigment vert
8	Vert	Vert (chez certaines plaques ne s'observe pas étant couverte par la coloration des taches 5,6.	Gris verdâtre, très faible.	Ne s'observe pas étant couverte par coloration des taches 5,6.	Pigment vert
9	Très faible	-	-	Bleu faible, qui apparait au milieu de la tache rose (9). En 15 min. s'intensifie, passe en bleu sale, après 30 min. en bleu sale foncé. Chez certaines plaques s'observe séparément au dessous de la tache 9.	Caroténoïde qui correspond à un ester de caroténoïde.
10	-	Rose, après 30 min. passe en rose-violacé.	-	Rose, au bord de tache au milieu apparait une coloration bleue correspondant au tache 10.	Stéroïde

Tableau 4 (suite)

	0	1	2	3	4	5
11	-	-	-	Jaune clair	Bleu claire, qui s'intensifie dans le temps. La coloration stable.	Caroténoïde qui correspond à un ester de caroténoïde.
12	Jaune-orange	Bleu après 30 min. passe en gris.	-	-	-	Ester de caroténoïde.
13	-	-	-	-	Violet-rose, pendant 30 min. passe en gris.	Stéroïde correspondant d'un ester.
14	-	Vert	-	Vert	Vert	Pigment vert.
15	Jaune-orange	Mauve, en 30 min. passe au gris.	-	-	-	Ester de caroténoïde.
16	-	Bleue très faible.	-	-	Gris-bleue, la coloration s'intensifie en 30 min.	Caroténoïde
17	-	Mauve, en 30 min. vire au gris avec la tendance de décoloration.	-	-	-	Ester de caroténoïde.
18	-	-	-	-	Rose mauve, en 30 min. passe en gris avec la tendance de décoloration.	Stéroïde qui correspond à un ester.
19	Vert	-	-	Vert	-	Pigment vert.
20	Jaune	Rose, passe rapidement in blue, puis baisse en intensité.	La tache baisse avec la couleur indéfinie.	faible, avec la couleur indéfinie.	Rose, passe rapidement in blue, puis baisse la intensité.	Caroténoïde

La présence des caroténoïdes et de leurs esters en espèces différentes des mollusques a été signalée antérieurement par CAMPBELL (2) en Mytilus edulis et Mytilus californianus, par LEE et KIM (5) en Mytilus edulis et de MOLNAR et al. (6) en Mytilus galloprovincialis. Dans cet ouvrage on montre pour la première fois la présence des caroténoïdes et leurs esters en Mya.

Les stéroïdes sont représentés par une tache grande qui correspond au cholestérol - 5 - et une autre tache - 1 - de cholestérol ester. La tache - 10 - est présente en lipides et en insaponifiables, correspondant à un autre stéroïde. La tache - 17 - est seulement en lipides, et a un correspondant en insaponifiables - 13 -. La tache - 17 - est un stéroïde ester.

Excepté ces composants, sur les plaques chromatographiques on voit 5 pigments verts. OSADA HIROMITSU (8) a séparé de l'huître japonaise les pigments verts qui sont pheophorbidae. Ces pigments dans le milieu acide virent vers le couleur verte mais en domaine alcaline vers brune. En cas de pigments verts du Mya arenaria, les plaques chromatographiques ont été arrosées avec 0,1 N HCl et 0,1 N NH<sub>4</sub>OH et les couleurs n'ont pas été modifiées, par conséquent les pigments mis en évidence sont différents de ceux isolés par HIROMITSU de l'huître.

En effectuant des migrations parallèles avec les chlorophylles, on constate que les pigments verts de Mya présentent d'autres valeurs Rf, que les chlorophylles. Donc les pigments signalés ne sont pas les chlorophylles. La chromatogramme de la fraction II de lipides (liées) et de l'insaponifiable correspondant a été plus difficile à interpréter parce que les plaques présentent une longue trainée brune, qui commence depuis la start et continue sur 1/3 de plaque. Les chromatogrammes des lipides liées présentent des composants beaucoup plus réduits que les lipides libres, mais dans les insaponifiables les lipides liées sont tous les composants qui ont été trouvées dans les lipides libres.

#### CONCLUSIONS

- Une fraction des lipides totaux contenue dans Mya arenaria est possible d'extraire par l'éthère éthylique (fraction qui est constituée par les lipides libres) et en continuant l'extraction par dichloréthane on obtiendra une autre fraction, con-

stituée par les lipides liés sous forme de cénapses). La composition des deux fractions présente de grandes différences. Le contenu en phospholipides totaux des lipides liés environ, 2,5 fois plus grande que pour les lipides libres; le contenu en triglycérides et insaponifiables des lipides liés est beaucoup plus bas que pour les lipides libres ce qui indique que les phospholipides ont une aptitude beaucoup plus grande à former des cénapses que les autres composants des lipides.

- Dans les phospholipides totaux préparés en portant des deux fractions lipidiques on a pu mettre en évidence par chromatographie en couche mince 8 fractions: lécitines, lysolécitines, céphalines, lysocéphalines, sphingomyéline et 3 fractions de phospholipides non identifiées.

- La répartition des fractions phospholipidiques est différente dans les deux fractions lipidiques (libres et liés). Les lipides liés contiennent une plus grande proportion de lécitines + lysolécitines et une proportion moindre de céphalines + lysocéphalines que les lipides libres, ce qui indique que les lécitines ont une plus grande aptitude que les céphalines à former des cénapses.

- Il est possible que la présence des phospholipides en proportion beaucoup plus grande dans la fraction des lipides liés qu'en lipides libres, et aussi que lécitines + lysolécitines se trouvent en proportion plus grande, mais céphalines + lysocéphalines dans une proportion moindre, en lipides liés que en ces libres, n'est pas une particularité chez Mya arenaria, mais ce phénomène est une règle générale qui a été observée antérieurement et à la Mytilus galloprovincialis.

- Dans les lipides nous avons déterminé le contenu des insaponifiables totaux, du cholestérol, des glycérides et on a constaté qu'une partie du cholestérol se trouve sous forme estérifiée. On a mis en évidence la présence d'un autre stéroïde et d'un stéroïde ester et de la vitamine A, qui est sous forme inestérifiée. Les chromatogrammes montrent aussi la présence de 3 caroténoïdes, de 3 esters de caroténoïdes et de 5 pigments verts non identifiés qui ne sont pas des chlorophylles.

#### BIBLIOGRAPHIE:

1. BERENBLUM I., CHAIN E., 1938 - The colorimetric determination

- of phosphate. Biochem.J., 32: 286-94.
2. CAMPBELL S.A., 1970 - Carotenoid pigments of Mytilus edulis and Mytilus californianus. Comp.Biochem.Physiol. 32, 1: 97.
  3. DOYLE J., 1966 - The chemical nature of the cristaline style. Some Contemp.Stud.Mer.Sci: 253-63.
  4. HUMPHREY G.F., 1948 - The adenosine triphosphatase activity of myosine from marine animals. Physiol. Comparata et Oecol., 1: 89-94.
  5. LEE, KONGHO; KIM, CHONG-BAE, 1971 - Pigments in marine fish and shell-fish I. Carotenoids in sea mussel Mytilus edulis. Pusan Sussan Tachak Yon'gu Pogo, Chayon Kwahak 11, (1): 57
  6. MOLNAR I.A., MIRZA M., PANTELI C., 1974 - Studiu asupra fracțiunilor lipidice din Mytilus galloprovincialis Lmk. Recherches marines IRCM, 7: 179-199.
  7. OSADA HIROMITSU, OTSUKA SHIGERU, SHIGA IVAO, 1970 - Greening of canned shell fish I Isolation of green pigments of canned oysters and their physicochemical properties C.A., 72: 119363.
  8. OSADA HIROMITSU, 1972 - Greening of canned shell fish II. Green pigments of canned oysters from Matsushima Bay. Greening of canned shell fish III. Comparison between physicochemical properties of the green pigments of row oysters and canned ones. C.A., 77: 32976 and 124973.
  9. ROSEN B., 1966 - Accumulation of organic acids during cold storage of shucked soft clams, Mya arenaria, in relation to quality. Fish. Ind. Res., 3, (2): 5-11.
  10. WAGNER H., 1960 - Neuere Ergebnisse auf Gebiet der Isolierung und Analyse von Phosphatide und Glycoliside. Fette, Anstrichmittel., 62: 1115.
  11. WINTER J., MOLNAR I.A., 1970 - Analiza fosfolipidelor totale din Helianthus annuus. II-a Conferință Republicană de Chimie-Fizică Generală și aplicată, București, 2: 227.