

Mise au point d'une méthode préparative de purification par extraction en phase solide d'un acide gras polyinsaturé à longue chaîne, l'acide docosapentaénoïque (22:5n-6 ou DPA n-6)

¹Alain Linard, Marie-Sylvie Lallemand et Philippe Guesnet

Résumé : Nous décrivons une méthode de purification d'un acide gras particulier, l'acide docosapentaénoïque (22:5n-6 ou DPA n-6) sous forme d'ester méthylique, en vue de son utilisation en expérimentation sur cultures de cellules. Les lipides sont extraits à partir de cerveaux de rats déficients en acides gras de la série n-3. Une série de chromatographie sur des petites colonnes de silice à greffon aminopropyl permet une purification d'une classe de phospholipide : la Glycerophosphatidyléthanolamine (GPE) puis, après sa transméthylation, l'obtention d'une fraction d'acides gras riche en acides gras polyinsaturés n-6 sous forme d'esters méthyliques. Ceux-ci sont ensuite purifiés par chromatographie liquide haute performance sur colonne de silice greffée C18. L'association de ces deux modes de chromatographie permet d'obtenir le DPA n-6 avec un taux de pureté de 99,3%.

Mots clés : Acides gras polyinsaturés, phospholipides, cerveau, colonne de silice aminopropylée, chromatographie liquide haute performance, purification.

Introduction

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) sont les produits du métabolisme d'acides gras essentiels fournis exclusivement par l'alimentation que sont respectivement les acides linoléique (18 :2n-6) et α -linoléique (18 :3n-3) (Guesnet et al, 2005). Le tissu nerveux se caractérise par une richesse particulière des phospholipides membranaires en AGPI-LC, notamment en acide arachidonique (20:4n-6) principal AGPI de la série n-6 et en acide docosahexaénoïque (22:6n-3 ou DHA) représentant majeur de la série n-3.

La déficience en acides gras de la série n-3 pendant la période périnatale, phase de structuration du cerveau et d'élaboration des interconnexions entre les différentes aires cérébrales, conduit à une diminution de la teneur en DHA dans les phospholipides membranaires des cellules nerveuses. Cette diminution est compensée par l'augmentation de l'acide docosapentaénoïque (22 : 5n-6 ou DPA n-6) synthétisé à partir de l'acide linoléique (18:2n-6), qui certes permet de maintenir le niveau d'insaturation des phospholipides membranaires mais n'évite cependant pas les altérations multiples des fonctions cérébrales (Bourre et al, 1984).

L'effet spécifique du DPA n-6 a été très peu étudié (Kim et al, 2003). Pour l'étude de son incorporation dans des cellules nerveuses en culture et de ses propriétés biologiques comparativement à celles du DHA, nous avons développé une méthode de purification du DPA n-6 sous la forme d'ester méthylique issu de la Glycerophosphatidyléthanolamine (GPE) de cerveau de rats déficients en acides gras de la série n-3. Le DPA n-6 est purifié successivement par chromatographie sur des colonnes de silice aminopropylée [Si-(CH₂)₃-

¹ Inra UR909 Unité de Nutrition et Régulation Lipidiques des Fonctions Cérébrales -Nu.Ré.Li.Ce.- 78352 Jouy-en-Josas cedex, ✉ Alain.linard@jouy.inra.fr ☎ 01 34 65 23 15

NH₂] pour éliminer les acides gras saturés et monoinsaturés (qui représentent près de 60 % des acides gras totaux) puis par chromatographie liquide haute performance sur colonne de silice greffée C18 pour le séparer des autres acides gras polyinsaturés.

1. Matériel et méthodes

1.1 Extraction des lipides totaux cérébraux et purification semi-préparative de la GPE (schéma 1)

Les rats utilisés pour cette étude sont des rats de souche Wistar ayant reçu un régime lipidique déficient en AGPI de la famille (n-3) depuis 3 générations (Guesnet *et al.*, 1997). Après sacrifice des animaux, le cerveau est rapidement prélevé sur glace et les lipides sont extraits selon la méthode de FOLCH *et al.* (1957); ils sont ensuite dilués dans du chloroforme à raison de 30mg/ml et conservés à -20°C.

La séparation des classes de phospholipides est effectuée par chromatographie d'adsorption sur une mini-colonne de silice à greffon aminopropyle qui contient 2 grammes de phase stationnaire, de granulométrie 40-60µm (BAKERBOND, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas). Le terme d'extraction en phase solide ou SPE est généralement utilisé dans ce cas.

Les éluions se font à température ambiante et sans appliquer aucune pression pour l'écoulement de la phase mobile. Les colonnes sont préalablement conditionnées par le passage de 8 ml du mélange chloroforme/propan-2-ol (2 :1, v/v). Après évaporation du chloroforme sous azote, l'extrait lipidique (correspondant à 60 mg de lipides totaux) est déposé à la surface de la colonne dans 500 µl de chloroforme.

Des mélanges de solvants de polarité croissante sont successivement utilisés pour éluer les lipides neutres et les classes de phospholipides selon une adaptation du protocole d'Alessandri et Langelier (Alessandri *et al.*, 2001) :

- i) les lipides neutres sont élués avec 4 ml du mélange : chloroforme/propanol 2 (2/1,v/v) ;
- ii) la Glycerophosphatidylcholine(GPC) et la sphingomyéline(SM) co-éluent avec 24 ml du mélange acétonitrile/propanol 1 (1/1,v/v) ;
- iii) la GPE est ensuite éluee avec 36 ml de méthanol. Les Glycerophosphatidylsérine et Glycerophosphatidylinositol restent pour leur part piégées sur la colonne. Les colonnes peuvent être utilisées une seconde fois après un lavage par 10 ml de dichlorométhane et 10 ml de n-hexane. Après évaporation des solvants et dilution dans du chloroforme à 0,02 % de butylhydroxytoluène (500 µl), le degré de pureté des différentes fractions recueillies est vérifié par chromatographie sur couche mince (Gilfillan *et al.*, 1983).

Les solvants (chloroforme, méthanol, n-hexane, propanol 1 et propanol 2) utilisés sont de qualité pour analyses (V.W.R), l'acétonitrile est de qualité pour CLHP (BAKER).

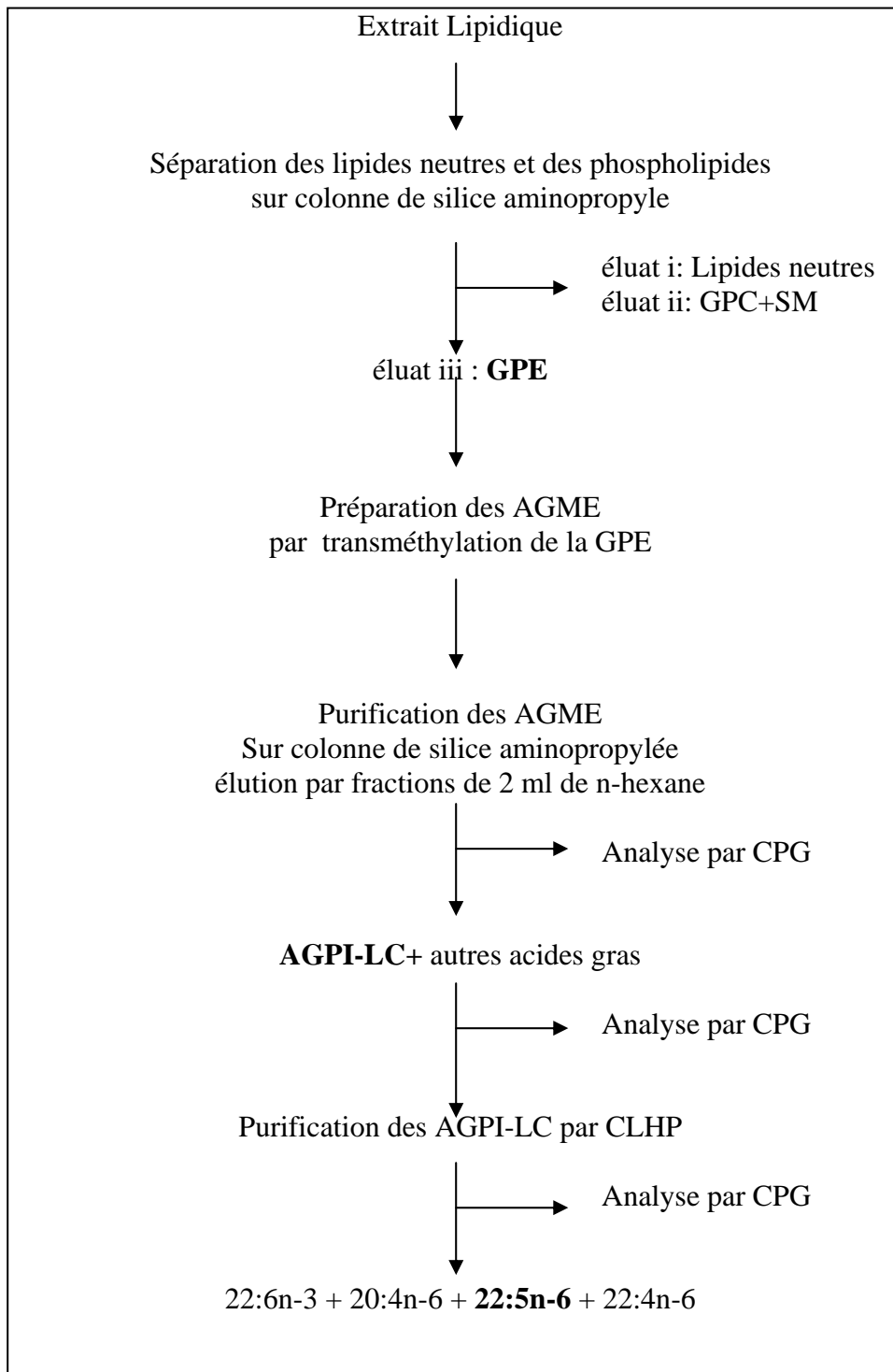


Schéma 1: méthode de purification des AGPI-LC

Eluat i : chloroforme/propanol 2 (2 /1);
 Eluat ii :acétonitrile/propanol 1 (/1);
 Eluat iii : méthanol.

1.2 Préparation des esters méthyliques d'acides gras (AGME) de la fraction GPE

La GPE est transméthylée avec 2 ml de trifluorure de bore (BF₃, Sigma) à 10 % dans le méthanol (Morrisson et Smith, 1964). Les AGME sont conservés dans un même volume de chloroforme, à -20°C. Ils sont séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire (Blondel et Linard, 1996). Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux identifiés (**Tableau 1**).

Σ AGS	24,1 ± 1.1
Σ AGMI	16,8 ± 1.0
Σ DMA	18,8 ± 1.0
20:3n-6	0,3 ± 0.1
20:4n-6	13,7 ± 0.1
22:4n-6	6,0 ± 0.1
22:5n-6	13,8 ± 0.2
22:5n-3	0,1 ± 0.0
22:n-6	5,6 ± 0.1

Tableau 1 : Composition simplifiée en AGME de la GPE de cerveaux de rats carencés en acides gras de la série n-3 (moyenne de 4 déterminations)

1.3 Purification du DPA n-6

Les différents AGME sont séparés par chromatographie sur colonne de silice aminopropylée contenant 2 grammes de phase stationnaire. Ils sont déposés à la surface de la colonne préalablement conditionnée avec 8 ml de n-hexane, à raison de 15 mg dans 300µl de n-hexane (après élimination du chloroforme sous azote). La séparation des AGME est réalisée par élution avec 14 ml de n-hexane par fractions successives de 2 ml (**Figure 1**).

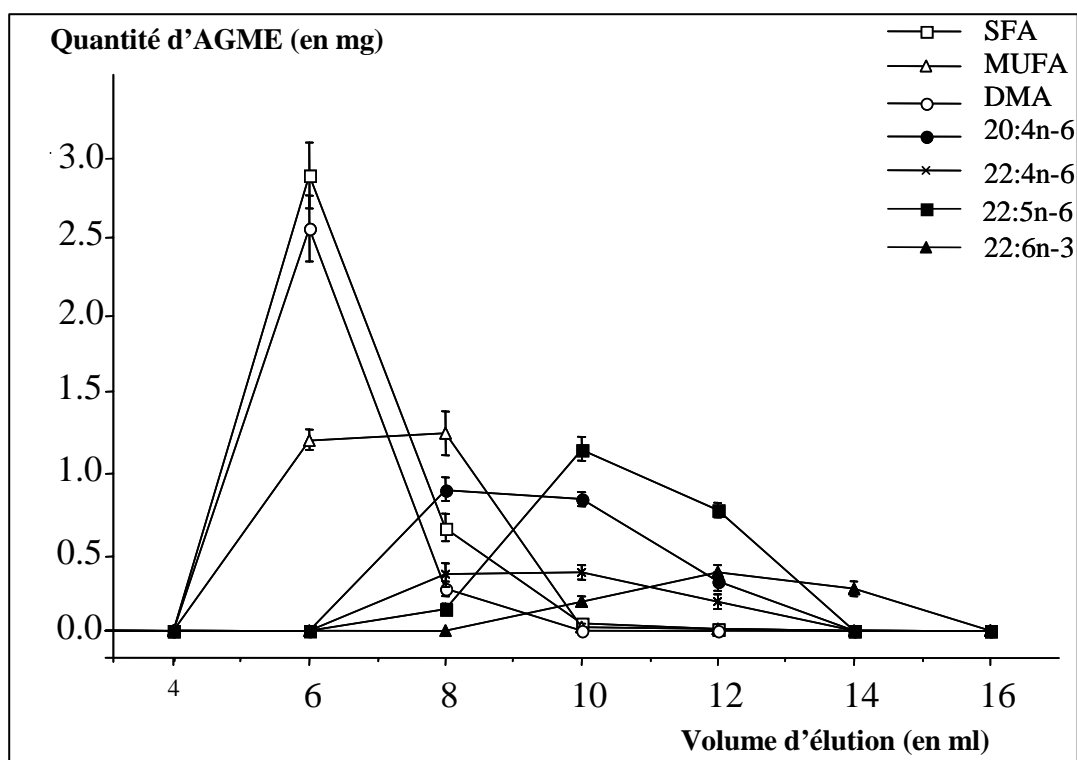


Figure 1 : Profil de l'élution des acides gras méthylés obtenus par séparation sur des cartouches de silice aminopropylée (moyenne de 4 résultats)

Les différentes fractions sont analysées par CPG après élimination de l'hexane sous azote et reprise dans 500 µl de chloroforme. Les fractions 8-12 ml renfermant les AGPI-LC (au nombre de 4) sont réunies et le DPA n-6 est séparé des autres AGPI par CLHP, selon une adaptation des travaux de Avelano *et al.* (1983).

L'appareil de chromatographie liquide haute performance utilisé comprend une pompe gradient P200, un détecteur UV 2000 (Thermo électron, Les Ulis, France) et une vanne rhéodyne munie d'une boucle d'injection de 100µl.

La séparation est réalisée sur une colonne de silice greffée C18, Ultrasphère ODS, 250 x10 mm, de granulométrie 5 µm (BECKMAN, Roissy, France) avec une phase mobile : acétonitrile-eau (93/7,v/v), à un débit de 2 ml/mn et une détection U.V à 206 nm. L'eau est de qualité pour CLHP (V.W.R). Les quantités injectées sont de 1 mg d'AGME dans 100µl d'acétonitrile. Les expériences se déroulent à température ambiante. La séparation dure 30 minutes.

Les quatre fractions correspondant chacune à un AGPI-LC spécifique (22:6n-3, 20:4n-6, 22:5n-6 et 22:4n-6) sont séparées entre les temps 13 et 25 minutes. Elles sont analysées par CPG après élimination du mélange acétonitrile-eau à l'évaporateur rotatif puis sous azote, et elles sont reprises dans le chloroforme, à raison de 1 µg/µl puis conservées à -80°C.

2. Résultats et discussion

Le cerveau carencé en acide gras de la série n-3 n'est pas l'organe le plus riche en DPA n-6 contrairement aux testicules de rat (Bourre *et al.*, 1990) mais, dans notre cas, il s'agissait d'utiliser des cerveaux de rats carencés en acides gras de la série n-3, stockés à -80°C. Le **Tableau 1** présente la composition (simplifiée) en AGPI présents dans la GPE et la **figure 1** montre la composition des fractions enrichies en AGPI méthylés à longue chaîne obtenus après séparation sur des colonnes de silice aminopropylée. Ceux-ci représentent un peu moins de 40 % des acides gras totaux et le DHA n'en représente que moins de 6% car, dans le cerveau carencé en acides gras de la série n-3, il est remplacé par le DPA n-6 qui atteint ici près de 14 %.

Les AGPI se retrouvent uniquement dans les fractions 10 et 12 ml d'hexane, les acides gras saturés et monoinsaturés ainsi que les DMA (composés résultant de la transméthylation des plasmalogènes ou éther-phospholipides, présents dans la GPE de cerveau) sont récupérés dans les fractions précédentes.

La séparation des AGPI à longue chaîne sur colonne de silice aminopropyle, avec élution par l'hexane, est fonction de leur nombre de carbones et de leur degré d'insaturation.

Une méthodologie pour séparer les acides gras polyinsaturés de la série n-3 sur des colonnes de silice aminopropyle a été décrite par Wilson *et al* (1993). Ces auteurs utilisent l'hexane pour séparer les acides gras saturés (AGS) et les acides gras monoinsaturés (AGMI), et le dichlorométhane pour récupérer les AGPI, mais ils utilisent une huile de poissons donc riche en AGPI de la série n-3.

La manipulation de ces petites colonnes est plus simple que l'utilisation de la chromatographie sur couche mince de silice imprégnée de nitrate d'argent (Christie W.W, 1982) et elle permet une pré-purification des acides gras méthylés, ce qui facilite les séparations ultérieures des AGPI-LC par chromatographie liquide haute performance.

Avec 15 mg d'acides gras déposés sur une colonne de silice, plus de 94 % (± 3 %) du DPA n-6 sont ainsi récupérés à partir des fractions 10 et 12 ml d'hexane. Il est admis que l'on peut traiter 30 mg de lipides par g de silice (Christie W.W, 1982) soit un rapport de phase de 3,3 %.

Cela était vrai pour purifier la GPE (3 %) mais un rapport plus faible (0,75 %) a été nécessaire pour séparer les AGPI à longue chaîne et éviter les contaminations par les AGMI.

Le DPA n-6 ne peut être obtenu pur que par chromatographie liquide haute performance de phase inverse. L'ordre d'éluion des AGPI-LC est le suivant : 22:6n-3, 20:4n-6, 22:5n-6 et 22:4n-6. Il résulte de la longueur de la chaîne carbonée, du nombre d'insaturation et de la position des doubles liaisons par rapport au groupement carboxylique (Narcé et *al*, 1988).

Les quantités injectées ne peuvent être supérieures à 1 mg, avec la colonne utilisée et dans nos conditions expérimentales, sans risque de contamination croisée des fractions récupérées. Pour récupérer 2 mg de DPA n-6, cinq injections sont nécessaires.

Le taux de pureté, mesuré par CPG, du DPA n-6 est de $99,3 \pm 0,2\%$.

Conclusion

L'emploi de petites colonnes commerciales de silices remplies de phase stationnaires à base de silice est relativement développé désormais. Ces différentes phases permettent de répondre à de nombreux problèmes analytiques.

La méthode ainsi décrite, en associant différents modes de chromatographie sur colonnes nous permet d'obtenir des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, en particulier le 22 :5n-6 ou DPA n-6, en quantité adaptée à nos expérimentations sur cultures cellulaires.

Bibliographie

Alessandri J.M., Goustard-Langelier B., 2001. Alterations in fatty acid composition of tissue phospholipids in the developing retinal dystrophic rat, *Lipids*, 36, 1141-1152.

Aveldano M.I., VanRollins M., Horrocks L.A., 1983. Separation and quantification of free fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography, *J.Lipid Res.* 24, 83-93.

Blondel C., Linard A., 1996. Méthode d'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, *Le cahier des techniques de l'Inra* (37): 9-14.

.Bourre J.M., Piciotti M., Dumont O., Pascal G., Durand G., 1990. Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs. Minimal requirements of linoleic acid, *Lipids* (25):465-472.

Bourre J.M., Pascal G., Durand G., Masson M., Dumont O., Piciotti M., 1984. Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-6 fatty acids, *J Neurochem.* (43): 342- 348.

Christie W.W., 1982. *Lipid Analysis*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford.

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *J.Biol.Chem.* 226,497-506.

Gilfillan A.M., Chu A.J., Smart D.A., Rooney S.A., 1983. Single plate separating of lung phospholipids including disaturated phosphatidylcholine, *J.Lipid Res.*, (24) : 1651-1656.

Guesnet P., Alessandri J.M., Astorg P., Pifferi F., Laviaille M., 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI), *OCL*, (12) :1-11.

- Guesnet P., Pascal G., Durand G., 1997. Modifying the n-3 fatty acid content of the maternal diet to determine the fetal and suckling rat, *Lipids*. (32) : 527-534.
- Kim H.Y., Akbar M., Lau A., 2003. Effects of docosapentenoic acid on neuronal apoptosis, *Lipids* (38) : 453-457.
- Morrisson W., Smith L., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluorid-methanol, *J.Lipid Res.*, (5) : 600-608.
- Narcé N., Gresti J., Bézard J., 1988. Method for evaluating the bioconversion of radioactive polyunsaturated fatty acids by use of reversed-phase liquid chromatography, *J.Chromatography*, 448, 249-264.
- Wilson R., Henderson R.J., Burkow I.C., Sargent J.R., 1993. The enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids using aminopropyl solid phase extraction columns, *Lipids* (28) : 1-54.

