

# RÉPARTITION DES ACIDES CITRIQUE ET MALIQUE DANS LES TISSUS DE QUELQUES INVERTÉBRÉS MARINS

par Paul V. CREAC'H

Chef de Laboratoire à l'Institut des Pêches Maritimes

Les acides citrique et malique, produits du cycle intermédiaire, se rencontrent normalement dans les divers tissus des vertébrés; il n'est toutefois pas évident *a priori* que ces mêmes acides se retrouvent aussi chez les invertébrés et à des taux voisins. L'objet du présent travail est donc d'établir à ce sujet une comparaison entre ceux-ci et les animaux supérieurs.

On a choisi comme matériel d'étude deux crustacés (*Nephrops norvegicus* Leach et *Maia squinado* Latr.), un gastropode (*Haliotis tuberculata* L.) et un lamellibranche (*Pecten maximum* L.).

## TECHNIQUE

Après une rapide dissection des animaux vivants, 50 g des divers tissus sont placés dans un mixeur avec 125 cc d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N. On recueille l'ensemble dans un ballon jaugé de 200 cc; le contenu est passé à la centrifugeuse afin de recueillir 150 cc de liqueur claire (ou un volume voisin mesuré exactement) que l'on neutralise à pH 7,5 à l'aide de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentré. Le dépôt apparu est éliminé par centrifugation.

La liqueur et les eaux de lavage de ce dépôt sont ensuite acidulées avec une ou deux gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis évaporées jusqu'à un volume voisin de 40 cc. Après refroidissement, le pH est amené à 8,2 à l'aide d'ammoniaque. Si après une heure de repos à température ordinaire, il s'est formé un nouveau dépôt, on centrifuge.

La liqueur est recueillie dans une fiole de 50 cc que l'on complète au trait avec les eaux de lavage. La fiole est vidée dans un vase à précipité. On ajoute 5 cc de solution de chlorure de Ba à 20 p. 100 et la quantité d'éthanol à 96° préalablement neutralisé nécessaire pour amener l'ensemble au titre de 72 degrés alcooliques. On agite et laisse reposer 24 heures en glacière.

Par cette méthode, adaptation de celle de PEYNAUD (5), on précipite, entre autres, sous forme de sel de Ba, la totalité des ions citriques et maliques. Le précipité centrifugé, lavé à l'éthanol à 72 p. 100 à la fois saturé de citrate et malate de Ba, est

recueilli dans un bécher; on ajoute 5 cc  $H_2SO_4$  N pour libérer les acides et la quantité d'eau distillée voulue pour obtenir un volume de 120 cc environ.

Le contenu du bécher est porté à ébullition afin de réduire son volume à 50 cc et d'évaporer ainsi toute trace d'éthanol. Le précipité de  $Ba SO_4$  n'a pas lieu d'être éliminé.

Après refroidissement, on ajoute 2 cc  $SO_4Mn$  à 5 p. 100, amène le pH à 2,8 — 3,0 à l'aide de soude 2,5 N et vide le contenu du bécher dans un ballon à distillation de 200 cc muni latéralement d'une ampoule à robinet. On ajoute 30 cc du tampon phosphorique de PEYNAUD à pH = 3,2 quelques grains de pierre ponce, adapte le ballon à un réfrigérant et chauffe jusqu'à ébullition. L'ampoule latérale contient une solution N/100 de  $MnO_4K$  que l'on fait arriver à la cadence d'une goutte par seconde, toujours selon PEYNAUD. Par oxydation, les acides citrique et malique donneront respectivement de l'acétone et de l'acétaldéhyde qui passeront dans le distillat recueilli dans un ballon réfrigéré.

Le rendement est quantitatif.

L'oxydation dure plusieurs heures et n'est terminée qu'après apparition d'un précipité brun violacé. Afin de réduire le volume final, on procède à une ou plusieurs distillations et concentre finalement, dans une fiole jaugée B.E. de 25 cc, la totalité de l'acétone et de l'acétaldéhyde apparus au cours de l'oxydation.

Sur une prise d'essai de 6 cc, on dose l'acétaldéhyde selon la méthode de FROMAGEOT et HEITZ (2) (apparition d'une coloration bleue assez fugace en présence de nitroprussiate de Na et de pipérazine).

Aux 19 cc restant, on ajoute 2 cc  $MnO_4K$  N et 0,8 cc  $H_2SO_4$  10 N. On bouche et laisse 45 minutes en contact en agitant de temps à autre. L'excès de  $MnO_4K$  est alors détruit par la quantité nécessaire de  $FeSO_4$  à saturation. Le contenu de la fiole est versé dans un ballon à distillation avec 25 cc d'eau et l'on recueille enfin 25 cc de distillat renfermant la totalité de l'acétone purifiée.

Le dosage de l'acétone s'effectue soit par iodométrie (5) soit par la méthode de FROMAGEOT (3) à l'aldéhyde salicylique.

Les résultats sont groupés dans le tableau ci-après.

A titre de comparaison, le tableau II mentionne quelques résultats relatifs aux mammifères.

## COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS

La teneur en eau des divers organes variant dans des limites assez étendues, il a semblé préférable d'exprimer les pourcentages en acides citrique et malique, à la fois dans les tissus frais et desséchés.

1° Tout comme ceux des vertébrés, les divers tissus des invertébrés étudiés renferment un pourcentage relativement faible des acides citrique et malique.

2° La concentration moléculaire de l'acide malique dans les tissus est toujours plus élevée que celle de l'acide citrique.

3° L'hypoderme et les pontes de *Maia squinado* sont particulièrement riches en acide citrique et malique. Alors que le taux d'acide citrique reste sensiblement constant au cours du développement de l'œuf, celui de l'acide malique est notablement plus élevé dans l'œuf arrivé à maturité.

4° Aucune relation n'a pu être mise en évidence d'une part entre le pourcentage des cendres et leur alcalinité et, d'autre part, la teneur en acides citrique et malique des différents tissus.

5° Si l'on compare les présents résultats à ceux de DICKENS (1), on constate que le muscle de *N. norvegicus* a la même teneur en acide citrique que celui du lapin, alors que ceux des mollusques sont moins riches. Les glandes génitales des mollusques renferment également moins d'acide citrique que celles du cobaye.

Par contre l'acide malique est nettement plus abondant dans l'hépto-pancréas des molusques que dans le foie des rats et des souris étudiés par MARSHALL et col. (4).

TABLEAU I. - *Acide citrique, acide malique et cendres dans différents tissus de quelques invertébrés marins.*

DATES	ESPÈCES ZOOLOGIQUES ET TISSUS	Cendres p. 100 du Tissu sec	Alcalinité des Cendres (%)	ACIDE CITRIQUE			ACIDE MALIQUE		
				mg. p. 100 g. tissu		Micromol. p. 100 g. tissu sec	mg. p. 100 g. tissu		Micromol. p. 100 g. tissu sec
				Frais	Sec		Frais	Sec	
10-11-52	<i>Nephrops norvegicus</i> :								
	Muscle caudal .....	8,98	53,1	2,3	10,1	52,7	2,3	10,1	75,6
4-6-53	<i>Maia squinado</i> ♀ :								
	Hypoderme .....	—	—	4,0	23,0	119,6	57,5	327,4	2443,3
	Ponte peu développée .....	—	—	5,8	19,5	101,5	35,5	119,6	892,3
	Ponte à maturité .....	—	—	4,8	20,2	105,3	64,5	272,5	2033,9
10-11-52	<i>Haliotis tuberculata</i> :								
	Muscle .....	4,97	37,8	1,1	4,0	20,9	1,7	6,2	46,2
	Branchies et chambre bran- chiale .....	7,57	57,1	3,0	12,4	64,6	3,5	14,4	107,3
	Manteau (sans le rebord) ...	3,52	59,9	1,7	10,6	55,2	10,0	61,2	457,2
	Hépto-pancréas .....	5,38	56,1	3,6	14,2	73,8	38,0	147,0	1097,7
	Glandes génitales .....	5,84	50,8	2,1	11,1	57,8	14,1	74,5	556,1
10-11-52	<i>Pecten maximus</i> :								
	Ensemble du muscle .....	5,52	31,1	1,2	4,6	23,9	5,5	21,4	159,7
	Branchies .....	19,30	14,1	0,66	6,6	34,4	3,3	33,7	251,7
	Manteau .....	18,78	79,7	0,73	6,5	33,8	1,8	16,0	119,4
	Hépto-pancréas .....	5,20	26,8	1,37	4,5	23,3	6,0	19,6	146,7
	Glandes génitales .....	11,27	98,7	1,37	7,5	38,8	3,5	19,0	142,3

\* Milléquivalents p. 100 g tissu sec.

TABLEAU II. - *Acides citrique et malique dans divers tissus de quelques mammifères*  
(milligrammes p. 100 grammes de tissus frais).

ESPÈCES ZOOLOGIQUES ET TISSUS	ACIDE CITRIQUE	ACIDE MALIQUE
<i>Lapin :</i>		
Muscle (4) .....	2,5	
Foie (4) .....	2,8	
<i>Cobaye :</i>		
Testicules (4) .....	11,5	
<i>Souris :</i>		
Foie (1) .....		1,98
Rein (1) .....		3,43
Vésicules séminales (4) .....	128	

BIBLIOGRAPHIE

1. DICKENS (F.). — *Biochem. J.*, 1941; **35**; 1011-1023.
2. FROMAGEOT (C.) et HEITZ (P.). — *Mikrochimica Acta*, 1938; **3**; 52-67.
3. FROMAGEOT (C.) et HEITZ (P.). — *Enzymologia*, 1939; **6**; 258-270.
4. MARSHALL (L.M.), FRIEDBERG (F.) et DA COSTA (W.). — *J. Biol. Chem.*, 1951; **188**; 97-100.
5. PEYNAUD (E.). — *Ann. Chim. Anal.*, 1946; **28**; 128-135.