

Université de Lille — Faculté des Sciences

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de Lille

pour obtenir le titre de Docteur ès-Sciences Physiques

par

GEORGES SÉZILLE

Licencié ès-Sciences Physiques

Assistant de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Lille

Première Thèse

Les Lipides de l'Œuf de Poule et de l'Embryon

- 1°) Étude qualitative et quantitative
- 2°) Évolution au cours du développement embryonnaire

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 18 Avril 1964, devant la Commission d'examen

JURY : MM. J. MONTREUIL, Président
GERMAIN
DURCHON
BISERTE

1964

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyens Honoraires :

MM. LEFEBVRE, P. PRUVOST.

Professeurs Honoraires :

MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, M^{me} LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMAND, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY.

Doyen :

M. PARREAU, Professeur de Mathématiques.

Assesseur :

M. DURCHON, Professeur de Zoologie.

Professeurs :

MM. BERKER, Mécanique des fluides.
BACCHUS, Astronomie.
BONNEMAN-BEMIA, Chimie et Physico-Chimie Industrielles.
BONTE, Géologie appliquée.
BOUISSET, Physiologie animale.
BUI TRONG LIEU, Mathématiques.
M^{me} CHAMFY, Mathématiques.
MM. COMBET, Mathématiques.
CORSIN, Paléobotanique.
DECUYPER, Mathématiques.
DEDECKER, Professeur associé.
N....., Analyse Supérieure et Calcul des Probabilités.
DEHORS, Physique Industrielle.
DELATTRE, Géologie.
DELEAU, Géologie.
DESCOMBES, Calcul Différentiel et Intégral.
FOURET, Physique.
GABILLARD, Radioélectricité et Electronique.
GERMAIN, Chimie générale et Chimie Organique.

GLACET, Chimie.
 GONTIER, Mécanique des Fluides.
 HEIM DE BALZAC, Zoologie.
 HEUBEL, Chimie Minérale.
 HOCQUETTE, Botanique Générale et appliquée.
 ISHAQ, Maître de Conférences associé.
 KAMPE DE FERIET, Mécanique des Fluides.
 LEBEGUE, Botanique.
 LEBRUN, Radioélectricité et Electronique.
 M^{lle} LENOBLE, Physique.
 MM. LUCQUIN, Chimie Minérale.
 MARION, Chimie.
 M^{lle} MARQUET, Mathématiques.
 MM. MARTINOT LAGARDE, Mécanique des Fluides.
 MAUREL, Chimie.
 MENESSION, Géologie.
 MONTREUIL, Chimie Biologique.
 PEREZ, Physique.
 PHAM MAU QUAN, Mécanique Rationnelle et Expérimentale.
 POITOU, Algèbre Supérieur.
 POTIER, vient d'Alger.
 ROUELLE, Professeur de Physique et Electricité Industrielle.
 SAVARD, Chimie générale.
 SCHALLER, Zoologie.
 TILLIEU, Physique.
 TRIDOT, Chimie.
 VIVIER, Zoologie.
 WATERLOT, Géologie et Minéralogie.
 WERTHEIMER, Physique.
 MM. AVARGUES, détaché à l'Energie Atomique.
 BECART, Physique.
 BOILLET, Physique.
 BOURIQUET, Botanique.
 CELET, Géologie.
 DELHAYE, Chimie.
 HERZ, Mathématiques.
 HUARD DE LA MARRE, Calcul Numérique.
 LACOMBE, Mathématiques.
 LINDER, Botanique.
 MONTARIOL, Chimie.
 POLVECHE, Géologie.
 POUZET, Mathématiques.
 PROUVOST, Géologie.

Maîtres de Conférences :

Chargés d'Enseignement :

Secrétaire :

Attaché d'Administration :

Attaché Principal :

ROBY, Mathématiques.

SCHILTZ, Physique.

VAZART, Botanique, Amiens.

MM. BLANCHARD, Chimie appliquée et Chimie de la Houille.

DANZE, Géologie.

M^{me} LEBEGUE, Physique.

M. LIEBART, Radioélectricité.

M^{me} BOUCHEZ.

M^{lle} SALLETTE.

(continued)

Avant-propos

L'aboutissement de ce travail nous donne l'occasion de témoigner notre respectueuse gratitude à notre Jury de thèse et notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous en ont permis la réalisation.

Nous remercions en particulier M. le Professeur MONTREUIL d'avoir bien voulu superviser l'ensemble de notre travail et accepter la présidence de notre Jury et MM. les Professeurs GERMAIN et DURCHON d'avoir accepté d'être nos juges.

Nous voulons également témoigner notre profonde gratitude à M. le Doyen WAREMBOURG pour la compréhension et la sympathie qu'il ne cessa de nous prodiguer durant les nombreuses années passées au laboratoire de clinique médicale de la Cité Hospitalière de Lille.

Nous tenons à assurer M. le Professeur BOULANGER de toute notre reconnaissance pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé en son laboratoire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille et pour l'inesstimable confiance qu'il nous accorda en nous chargeant de fonctions pour lesquelles nous n'étions que bien peu préparé.

Nous remercions M. le Professeur HAVEZ et tous nos camarades du Laboratoire de Chimie Biologique pour la cordialité de leur commerce.

Nous remercions également tous ceux qui nous aidèrent dans la réalisation de ce travail et en particulier, MM^{mes} BLOCK, dont la collaboration technique nous fut précieuse, ASSET, DEVYS, HEMEZ, et M^{me} MORANDI.

Nous remercions enfin M. le Professeur BISERTE qui assumait la direction de nos travaux et l'essentiel de notre formation. Sans lui, ce travail ne serait pas ; qu'il sache bien que nous ne pourrions jamais nous acquitter envers lui.

Introduction

L'œuf, a de tout temps suscité l'intérêt et la curiosité humaine.

D'un point de vue utilitaire, il tient une place importante dans l'alimentation, et cette considération suffirait à expliquer l'attention que lui portent les chercheurs de nombreux pays.

D'un point de vue scientifique, il représente pour le Biologiste et le Biochimiste, un matériel de choix puisqu'il renferme tous les éléments nécessaires au développement embryonnaire.

On entrevoit donc les immenses possibilités de recherche qu'il représente, qu'il s'agisse :

- d'études statiques de composition,*
- d'études comparatives en fonction de l'espèce,*
- d'études dynamiques concernant :*
 - les relations embryon-œuf résiduel,*
 - les relations œuf-animal ovipare,*
 - les relations œuf-animal éclos.*

Nous avons choisi :

L'étude statique et dynamique des lipides et des lipoprotéines de l'œuf de poule et de l'embryon.

PREMIÈRE PARTIE

Résumé analytique des connaissances actuelles sur les lipides et les lipoprotéines du jaune d'œuf de poule et de l'embryon

Lipides et protides se partagent la composition de l'œuf mais si l'on trouve des protéines à la fois dans le « jaune » et le « blanc », les lipides ne figurent pratiquement que dans le jaune.

NEEDHAM, en 1931 (1), JUKES, en 1932 (2), FEVOLD, en 1951 (3), ont publié des études concernant les protéines de l'œuf.

A) COMPOSITION GÉNÉRALE DU JAUNE

I. — Principaux composants macromoléculaires du jaune

CHARGAFF, en 1932 (4), isole, après délipidation du jaune, dialyse et centrifugation, un complexe lipoprotéique (la *lipovitelline*) dont l'extraction alcoolique conduit à une partie protéique : la *vitelline* et une partie lipidique essentiellement phosphatidique, qui représente 18 % de la lipoprotéine et 54 à 62 % des phosphatides du jaune.

La vitelline est une phosphoprotéine contenant 1 % de phosphore.

KAUCHER, en 1944 (5), indique que les lipides représentent environ 50 % du poids sec.

La composition est la suivante :

Glycérides	66,3 %
Cholestérol estérifié	0,7 %
Cholestérol libre	3,4 %
Cérébrosides	2,7 %
Phosphatides	27,4 %

La composition des phosphatides est la suivante :

Céphalines	25 % des phosphatides
Lécithines	72,5 % des phosphatides
Sphingomyélines	2,5 % des phosphatides

ALDERTON et FEVOLD, en 1945 (6), puis FEVOLD et LAUSTEN, (7) isolèrent, par centrifugation, une *lipovitelline* analogue à celle de CHARGAFF ; puis, par agitation du surnageant avec de l'éther, ils obtinrent un précipité lipoprotéique contenant de 36 à 41 % de phosphatides et représentant environ 40 % des lipoprotéines totales ; cette nouvelle lipoprotéine fut appelée la *lipovitellénine*.

La lipovitelline et la lipovitellénine sont différentes puisque la deuxième contient deux fois plus de lipides et, d'autre part, la vitellénine contient trois fois moins de phosphore que la vitelline.

L'ensemble des lipoprotéines isolées représente environ 31 % des solides, soit 15 % du poids du jaune et les phosphatides liés représentent environ 8 % des solides du jaune.

SHEPARD et HOTTLE, (8), après élimination des lipoprotéines précédentes, isolèrent à partir de la phase aqueuse résiduelle, une fraction protéique pure : la *livétine*, dont l'étude électrophorétique démontra l'hétérogénéité.

MECHAM et OLCOTT (9), en traitant le jaune par le sulfate de magnésium puis le sulfate d'ammonium, récupérèrent une autre protéine très riche en phosphore : la *phosvitine*.

En conclusion, on trouve dans le jaune d'œuf :

- 1) une lipovitelline,
- 2) une lipovitellénine,
- 3) plusieurs livétines,
- 4) une phosvitine.

Il semble donc que la composition générale du jaune soit connue ; c'est pourquoi, depuis 1950 les travaux sont principalement dirigés dans trois directions essentielles.

- Etude plus détaillée de la partie lipidique.
- Etude de l'homogénéité et de la structure des différentes lipoprotéines.
- Mise au point de plans généraux de fractionnement.

II. — Principaux travaux effectués sur la composition lipidique

Il convient tout d'abord, d'insister sur la complexité des différentes macromolécules présentes et sur l'abondance et la prépondérance de certaines catégories lipidiques qui rendent très laborieux l'isolement et l'identification de composés mineurs tels les stérides, les plasmalogènes, les inositides, etc...

Les techniques d'isolement et d'identification sont donc délicates et longues ; ceci explique en partie certaines discordances dans les résultats des divers auteurs.

Il faudra d'autre part tenir compte, dans l'étude critique des résultats publiés, de l'influence du régime alimentaire.

C'est ainsi que FEIGENBAUM (10), RHODES et LEA (11), BASU ROY CHOUDHURY (12), GAGE et FISH (13), ont établi l'incidence des lipides ingérés par la poule sur la composition en acides gras des fractions lipidiques du jaune ; BASU ROY CHOUDHURY, montre que l'inclusion dans le régime de 7,5 % d'acide linoléique fait passer rapidement les taux de ce même acide dans les glycérides et les phosphatides, respectivement de 12 % et 16 % à 30 %.

Par contre, HORLICK et O'NEIL (14) ne trouvent que des augmentations minimales par rapport à l'ampleur de la modification du régime et signalent à la suite de CRUICKSHANK (15), que l'augmentation des acides gras polyéthyléniques se fait aux dépens des acides gras monoéthyléniques.

COPPOCK et Coll. (16), signalent l'influence saisonnière sur les régimes et sur la composition lipidique du jaune.

a) Lipides totaux

Les lipides totaux ont surtout été étudiés du point de vue de leur composition en acides gras.

TERROINE et BELIN (17), admettent un poids de 4,8 g d'acides gras pour un jaune d'un poids moyen de 17 g.

Le tableau I résume l'essentiel des résultats obtenus par EVANS et BANDEMER (18), JAMES (19), FISHER et LEVEILLE (20), et COPPOCK (21).

Les différences de composition précédemment signalées, sont donc déjà apparentes ; cependant la richesse en acide oléique et en acide palmitique est assez caractéristique.

TABLEAU I

ACIDES GRAS (en %)	EVANS	JAMES	FISCHER	COPPOCK
Acide myristique	0,5	0,33		0,3
Acide palmitique	31,4	26,7		22,9
Acide stéarique	12,5	8,64		12,2
Acide palmitoléique	4,3	3,08		5,4
Acide oléique	40,8	46,09		39
Acide linoléique	10,2	5,65	8,9	12,6
Acide linolénique			3,8	0,8
Acide arachidonique		1,28		1,4
Acide arachidique				2,6
Acides supérieurs				2,9
Acides branchés		7,45		

b) Glycérides

Les glycérides du jaune ont été peu étudiés.

SHORLAND (22), utilisant la précipitation acétonique des phosphatides, indique que les glycérides représentent 74 % des lipides et étudie leur composition en acides gras par isomérisation alcaline.

EVANS et BANDEMER (23), séparent les glycérides par chromatographie sur colonne d'acide silicique d'après la méthode décrite par RHODES (24) et étudient la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Le tableau II résume les résultats obtenus par ces auteurs et par REISER (25).

Ces résultats sont assez concordants compte tenu du fait que ceux d'EVANS ont été obtenus par chromatographie en phase gazeuse et ceux de REISER par isomérisation alcaline ; on retrouve la prédominance en acide oléique et en acide palmitique.

TABLEAU II

ACIDES GRAS (en %)	EVANS	SHORLAND	REISER
Acide myristique	0,7	0,1	
Acide palmitique	28,4	25,4	
Acide stéarique	7	4,8	
Acides saturés totaux	36,1	30,3	31
Acide palmitoléique	5,2	7,9	
Acide oléique	46		53
Acide linoléique	12,3		
Acides insaturés en C ₁₈ ...	58,3	58,4	
Acides insaturés en C ₂₀ +C ₂₂		3,1	
Acides diénoïques			14,4
Acides triénoïques			0,18
Acides tétraénoïques			1,43
Acides pentaénoïques			2,61
Acides hexaénoïques			1,12

c) Stérides et Stérols

Peu de travaux ont été effectués sur ces composés ; nous rappellerons les résultats obtenus par KAUCHER (26) qui indique que le cholestérol libre représente 3,4 % des lipides et le cholestérol estérifié 0,7 %.

La présence de *stérides* est restée incertaine du fait de leur taux infime et des difficultés d'isolement ; les chiffres publiés varient de 0 à 0,7 % des lipides.

COOK (27) indique un taux de 0,25 à 0,3 g de stérols par jaune.

NAKANISHI (28), MILLER (29), signalent la présence de Δ^7 — cholesténol qui représenterait 1 % des stérols totaux, WINDAUS (30), signale un stérol à doubles liaisons conjuguées et STOKES (31) la présence de Δ^{5-24} — cholestadiénol et de ses isomères.

d) Phosphatides

Les phosphatides ont fait l'objet de nombreuses études. Nous citerons les travaux de SHORLAND (32), qui, par précipitation acétonique trouve une concentration de 26 % par rapport aux lipides totaux et étudie la composition globale en acides gras par isomérisation alcaline.

REISER (33) étudie également la composition en acides gras des phosphatides par isomérisation alcaline.

RHODES et LEA (34 et 35), constatant les résultats contradictoires obtenus concernant la présence de sphingomyélines, de plasmalogènes, d'inositol-phosphatides, proposent une méthode de séparation par chromatographie sur colonne d'alumine suivie d'une chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Céphalines	15 %
Lysocéphalines	2,1 %
Inositol-phosphatides	0,6 %
Lécithines	72,8 %
Lysolécithines	5,8 %
Sphingomyélines	2,5 %

LEA (36), signalait déjà en 1955 la présence de lysocomposés, de plasmalogènes et d'acides aminés. TATTRIE (37), sur la base des travaux précédents, étudie par chromatographie en phase gazeuse les acides gras des lécithines obtenues.

INOUE et NODA (38), étudient les acides gras des lécithines par chromatographie sur papier des sels mercuriques d'acides gras. HAWKE (39), sépare par chromatographie sur colonne d'acide silicique, la phosphatidyl-éthanolamine et la phosphatidyl-choline des phosphatides préalablement isolés par précipitation acétonique ; ils étudient les acides gras de chaque fraction par chromatographie en phase gazeuse.

EVANS (40), utilisant les méthodes de fractionnement sur acide silicique préconisées par RHODES (41), étudie par chromatographie en phase gazeuse les acides gras des lécithines et des céphalines.

Les tableaux III et IV résument les résultats des différents auteurs :

TABLEAU III
Composition globale des Phosphatides en acides gras

ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDES (en %)	SHORLAND	REISER
Acide myristique	0,3	
Acide palmitique	27,9	
Acide stéarique	16,1	
Acides saturés totaux	44,3	
Acides insaturés en C ₁₆	0,8	
Acides insaturés en C ₁₈	39,8	
Acides insaturés en C ₂₀	7,1	
Acides insaturés en C ₂₂	6,2	
Acides diénoïques		20,1
Acides tétraénoïques		9,1
Acides pentaénoïques		9,2
Acides hexaénoïques		3,79

Outre la richesse en acide palmitique, ces résultats montrent l'importance de l'acide stéarique et des acides polyinsaturés.

TABLEAU IV
Composition des lécithines et des céphalines

ACIDES GRAS (en %)	TATTREE	HAWKE		INOUEY	EVANS	
	L	C	L	L	C	L
Acide myristique ..	+	0,4	0,2	3,3	0,1	0,2
Acide palmitique ..	35,7	19,8	28,1	28,4	33,4	43,6
Acide stéarique ...	14,9	39,5	14,2	10,9	31,5	17,3
Acide palmitoléique.	+	1,2	4,4	0,7	2	2,8
Acide oléique	37	20,1	44,7	40,2	27,6	30
Acide linoléique ...	12,4			8,9	5,4	5,3
Acide linoléique .				1,5		
Acide arachidonique		9	4,7	4,1		
Acides insaturés C ₂₂		10	3,7			
L : Lécithines C : Céphalines						

Il ressort de l'examen de ces tableaux, que les *céphalines* sont très riches en acide stéarique ; toutefois, ici encore, nous constatons des différences entre les résultats. C'est ainsi qu'il convient de souligner la faiblesse du taux de l'acide linoléique trouvé par EVANS.

Signalons à ce sujet que, VALDIGUIE et DOUSTE-BLAZY (42), constatent d'étroites analogies de structure entre les lécithines du sérum humain et celles du jaune d'œuf. Les spectres infra-rouges sont, en particulier, indiscernables. Or le pourcentage en acide linoléique des lécithines humaines se situe aux environs de 22 %, de 21 % (WAREMBOURG et Coll.) (43), de 21,5 % (SCHRADER et Coll.) (44) ; toutefois, VALDIGUIE signale que certaines différences de composition en acides gras sont possibles.

EVANS lui-même, constatant la faiblesse des taux enregistrés, veut y voir l'influence du régime alimentaire ; mais il est alors curieux de constater que les taux d'acide linoléique qu'il trouve dans les lipides neutres (12,3 %) sont nettement plus importants et voisins de ceux trouvés par d'autres auteurs.

Les phosphatides du jaune contiennent en outre, des plasmalogènes (STEPP et Coll.) (45) ; FEULGEN (46) constate une augmentation durant le développement embryonnaire et THIELE (47) indique que le taux en est triplé après onze jours d'incubation, tout en restant inférieur à 1 % des phosphatides totaux.

McINDOE (48) indique que, dans certaines conditions d'extraction, il est possible de récupérer un matériel soluble dans l'alcool et reprécipi-

table par addition d'eau ; ces fractions seraient intéressantes pour l'étude des phosphatides contenant des acides aminés autres que la sérine.

En conclusion, on peut admettre pour le jaune un poids moyen voisin de 17 g ; le poids sec représente environ 50 % de ce poids frais et les lipides environ 36 % du poids frais.

Les lipides constituent donc une fraction importante de l'œuf (72 % environ des solides du jaune).

Ce fait prend une signification particulière lorsqu'on constate, qu'à l'exception des glucides intégrés dans les protéines, il n'y a pas de glucides libres (les « sucres » représentent environ 1 % du poids frais).

Il faut donc admettre pour les lipides, deux destinées différentes :

- participation à l'élaboration des lipoprotéines cellulaires de l'embryon ;
- source de réserve énergétique dans laquelle l'embryon puisera au fur et à mesure de ses besoins ; à ce sujet, les glycérides très abondants, semblent jouer un rôle capital.

Nous essaierons, dans nos travaux, de préciser ces différents points. On peut admettre pour les lipides la répartition suivante :

Lipides neutres	73 % environ
Phosphatides	27 %

Chaque groupe se subdivise de la façon suivante :

Lipides neutres :

Glycérides	93 %
Cholestérol + stérols	6 %
Stérides	0 à 1 %

La présence de cholestérol estérifié reste donc incertaine et nous essaierons de préciser ce point particulier.

Phosphatides :

Céphalines et lysocéphalines	17 % environ
Lécithines	73 %
Lysolécithines	6 %
Sphingomyélines	2,5 %
Inositides	0,5 %
Plasmalogènes	0,2 %

Indiquons toutefois que si la présence de sphingomyéline est certaine, bien que divers auteurs n'en trouvent pas, les chiffres fournis sont variables d'un auteur à l'autre. Signalons également la présence de cérébrosides, à un taux voisin de 2 % des lipides.

La composition globale est résumée dans le tableau V.

TABLEAU V

	en mg % de lipides	en mg par gramme de jaune frais
Glycérides	68	245
Cholestérol	4,4	16
Stérides	0 à 0,7	0,à 2,5
Cérébrosides	2	7
Céphalines	4,6	16,5
Lécithines	19,7	71
Lysolécithines	1,6	6
Sphingomyélines	0,7	2,5
Inositides	0,1	0,35
Plasmalogènes	0,04	0,14

En ce qui concerne la composition en acides gras, il est difficile de dégager des chiffres de base, car les publications ne sont pas nombreuses et les méthodes utilisées ne sont pas les mêmes ; les résultats sont discordants.

On peut schématiser comme suit cette question.

ACIDES GRAS (en %)	Lipides neutres	Phosphatides
Acides gras saturés	30 à 40	44 à 60
Acides gras monoinsaturés	49 à 54	30 à 40
Acides gras polyinsaturés	12 à 15	8 à 16 et plus

Les céphalines sont plus riches en acide stéarique que les lécithines.

III. — Principaux travaux effectués sur la composition lipidique du jaune, d'œuf mis en incubation.

MEDUSKY (49), constate que, durant les seize premiers jours, le taux des lécithines reste sensiblement constant, puis, diminue assez nettement.

KAZAKOV (50) trouve également que la concentration en phosphore décroît régulièrement.

TSUJI et BRIN (51), mènent de front l'étude des lipides du jaune résiduel et des lipides embryonnaires.

Le tableau VI schématise les variations lipidiques, au cours de l'incubation.

Les auteurs concluent à des variations maxima entre les dix-huitième et vingt-et-unième jour.

TABLEAU VI

Variations lipidiques au cours de l'incubation
(en mg par jaune résiduel ou par embryon)

JOURS		0	6	9	12	15	18	21
P.L.	jaune	66	69	69	62	51	38	18
P.L.	embryon		0,08	0,36	0,95	3,4	5,1	6,6
P.S.	embryon		0	0,06	0,15	0,3	1,2	1,7
C.L.	jaune	250	248	258	224	171	130	75
C.L.	embryon		0,5	2,5	6,8	7,2	25	36
C.E.	jaune		11	11	28	35	50	48
C.E.	embryon		0,2	1	2	19	38	139
P.L. : <i>phosphore lipidique</i> P.S. : <i>phosphore des sphingomyélines</i> C.L. : <i>cholestérol libre</i> C.E. : <i>cholestérol estérifié</i>								

Tous les constituants diminuent dans le jaune résiduel à l'exception du cholestérol estérifié qui augmente.

Dans l'embryon, au contraire, les constituants augmentent avec le temps, les stérides augmentant plus vite que le cholestérol libre.

En ce qui concerne les *phosphatides*, les *lécithines* passent dans le jaune de 78 à 86 % et les *céphalines*, de 22 à 14 %, tandis que dans l'embryon, les *lécithines* passent de 86 à 65 % et les *céphalines* de 14 à 35 %.

En conclusion, il semble que les variations les plus importantes se déclenchent aux environs du douzième jour, et continuent à progresser jusqu'à l'éclosion.

Dans le jaune, les *céphalines* disparaissent plus vite que les *lécithines*.

Dans l'embryon, ce sont les *céphalines* qui augmentent les plus vite.

Des quelques études faites sur les stérides, il ressort que les stérides augmentent beaucoup plus dans l'embryon que le cholestérol libre et que, à l'inverse des autres constituants, les stérides augmentent également dans le jaune résiduel.

IV. — Principaux travaux concernant les lipoprotéines du jaune

a) Méthodes de fractionnement des lipoprotéines

D'importants travaux ont été effectués par les auteurs Japonais et Canadiens.

1° Fractionnement des lipoprotéines en deux composants de haute et basse densité

Ces deux lipoprotéines font partie :

- l'une de la High density fraction (H.D.F.),
- l'autre de la Low density fraction (L.D.F.) des auteurs Anglo-Saxons.

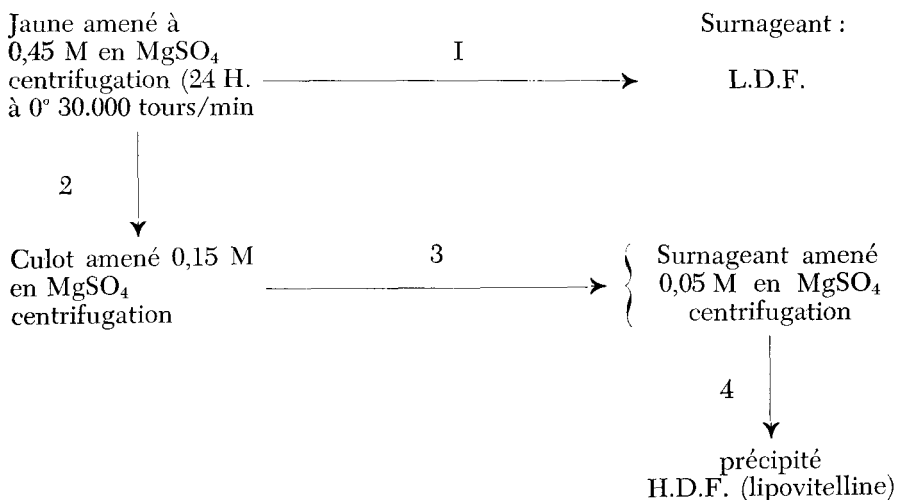
Il fut longtemps classique d'admettre la présence dans le jaune d'une proportion importante de *lipides libres*.

Or, les travaux de SCHMIDT et BESSMAN (52), de McINDOE (53), d'EVANS et BANDEMER (54), montrent que ceux-ci font partie d'un complexe de haut poids moléculaire que les traitements à l'éther scindaient en une partie précipitable (la lipovitellénine) et une partie lipidique éthéro-soluble.

Les méthodes modernes permettent de séparer les complexes lipoprotéiques sans dénaturation partielle.

SUGANO et WATANABE (55), utilisent la précipitation fractionnée par le sulfate de magnésium, ou l'ultracentrifugation du jaune amené à une concentration 0,03 M en MgSO_4 et additionné de NaCl solide. Les résultats les plus satisfaisants sont obtenus par ultracentrifugation ; on isole, une fraction *dense* sédimentable comprenant deux lipovitellines (α et β) et une fraction légère non sédimentable et beaucoup plus riche en lipides (84 % contre 20 %).

BERNARDI et COOK (56), indiquent un plan de fractionnement qui peut être schématisé de la façon suivante :



La méthode permet en outre l'obtention de la *phosvitine*, de la *livétine* γ et du mélange des *livétines* α et β .

Nous citerons également les fractionnements obtenus par SCHJEIDE et URIST (57), EVANS et BANDEMER (58), BURLEY et COOK (59), à l'aide de procédés similaires.

2°) Essais de fractionnement de la L.D.F.

TURNER et COOK (60) opèrent par dialyse et traitement par le sulfate d'ammonium ; ils obtiennent un précipité et une fraction soluble dont l'étude montre qu'il s'agit probablement de divers degrés d'altération de la même entité.

MARTIN et TURNER (61), à partir de la préparation précédente essayent en vain un fractionnement par ultra-centrifugation. *Il n'existe donc actuellement aucune méthode de fractionnement de ce complexe lipoprotéique.*

3°) Fractionnement de la H.D.F.

La fraction sédimentable en ultra-centrifugation, contient des lipoprotéines (*les lipovitellines*) et des protéines.

JOUBERT et COOK (62), préparent une lipovitelline grâce à des précipitations différentielles par le sulfate de magnésium, en mettant à profit le fait que la *phosvitine* forme avec les ions Mg^{++} des complexes insolubles.

BERNARDI et COOK (63) utilisent la chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite pour fractionner la H.D.F. :

un tampon de molarité croissante, élue les *livétines* puis la *lipovitelline* β , la *lipovitelline* α , tandis que la *phosvitine* reste fixée sur la colonne. SUGANO (64), utilise la centrifugation du jaune amené à une concentration 0,03M en $MgSO_4$; le surnageant ramené à une concentration 0,005M en sulfate et centrifugé, conduit à un précipité de *lipovitelline* β .

Le culot issu de la première centrifugation, est redissous en $MgSO_4$ 1,2M puis ramené à une concentration 0,04M et centrifugé ; l'opération est reconduite sur le culot, mais on ramène cette fois à une concentration 0,09M ; on obtient un précipité servant de base à la préparation de la *phosvitine* et une solution que l'on amène à une concentration 0,6M en sulfate et que l'on extrait par l'éther ; la phase aqueuse est ajustée à 0,1M en sulfate et centrifugée ; on obtient un culot de *lipovitelline* α .

b) Méthodes de séparation et d'étude par électrophorèse

Certains auteurs ont utilisé l'électrophorèse libre pour étudier les différents composés ainsi isolés.

SUGANO (65 et 66), montre que l'homogénéité des deux lipovitellines est fonction du pH ; la mobilité électrophorétique varie avec le tampon et avec la force ionique ; ces variations sont attribuées aux liaisons que forment les ions du tampon avec les molécules protéiques.

BERNARDI et COOK (67), montrent que l'électrophorèse libre permet (dans certaines zones de pH) de séparer la lipovitelline en ses deux composantes α et β .

Des études électrophorétiques sur papier, sur gélose et sur amidon ont été entreprises ; nous citerons les travaux de McKINLEY et Coll. (68 et 69), d'EVANS (70).

McCULLY et MAW (71) étudient par électrophorèse sur papier le jaune dilué en NaCl à 1 %, le culot de lipovitelline dilué en NaCl à 10 % et le surnageant lipovitelléninique.

Le tableau VII schématise les résultats obtenus.

La zone de phosvitine peut importante et difficilement colorable par les colorants des protéines ne représente que la fraction dissociée, dans les conditions opératoires, du complexe qu'elle forme avec les lipoprotéines (lipovitelline en particulier).

La livétine γ semble faire partie du complexe lipoprotéine-phosvitine, et est difficilement séparée des lipoprotéines en électrophorèse sur papier.

Les deux lipoprotéines sont très voisines et tendent à former une zone continue.

McCULLY et Coll. (72) constatent, grâce à un procédé de coloration décrit par HARRAP (73) qui permet la révélation des liaisons ester phosphorique, une réaction positive dans les deux zones lipoprotéiques ; cette réaction montre la présence d'un *complexe lipoprotéine-phosvitine*. Le fait de diluer le jaune ou de le traiter par des agents complexants, libère une fraction de phosvitine dont la zone colorée s'accroît d'autant en tête de l'électrophorégramme.

TABLEAU VII

Schématisation des résultats des protéinogrammes et lipidogrammes du jaune et de deux fractions

	JAUNE DILUE		SURNAGEANT		CULOT	
	Prot.	Lip.	Prot.	Lip.	Prot.	Lip.
P	++++				++++	
X	++++		++++			
Y	++++		++++			
Z	++++		++++			
P-1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0		
	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0		
	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0		
P-2	0 0 0 0	0 0 0 0			0 0 0 0	0 0 0 0
	0 0 0 0	0 0 0 0			0 0 0 0	0 0 0 0
	0 0 0 0	0 0 0 0			0 0 0 0	0 0 0 0
	ligne de départ		ligne de départ		ligne de départ	

↑

P = phosvitine

X = livétine α

Y = livétine β

Z = livétine γ

P-1 = lipoprotéine (L.D.F.)

P-2 = lipoprotéine (H.D.F.)

Prot. = Protéinogramme

Lip. = Lipidogramme

c) Composition et structure des lipoprotéines du jaune

On peut considérer à la suite de EVANS et BANDEMER (74), que la lipovitelline et la lipovitellénine représentent du point de vue protéique, 47,5 % et 38,6 % des protéines du jaune.

Les lipoprotéines totales comprennent 22 % de lipovitelline et 78 % de lipovitellénine ; tous les lipides sont compris dans ces deux complexes.

La composition du complexe lipovitelléninique a été établie par Mc INDOE (75), par EVANS et BANDEMER (76), par SUGANO et WATANABE (77), et par SCHJEIDE et URIST (78) :

	Protéines (en %)	Lipides (en %)
Mc INDOE	12	88
EVANS	18	82
SUGANO	16	84
SCHJEIDE	20	80

SUGANO et WATANABE indiquent que les phosphatides représentent 24 %, les glycérides 62 % et le cholestérol 4 % des lipides ; McINDOE indique 28,5 % de phosphatides, 67 % de glycérides et 4,5 % de cholestérol.

La composition du complexe lipovitellinique est la suivante :

	Protéines (en %)	Lipides (en %)
SUGANO et WATANABE ...	80	20
SCHJEIDE et URIST	80	20
EVANS et BANDEMER	78,7	21,3

Les compositions lipidiques sont les suivantes :

	Phosphatides (en %)	Glycérides (en %)	Cholestérol (en %)
SUGANO et WATANABE	53	42	5
SCHJEIDE et URIST ..	78	16	6

EVANS et BANDEMER indiquent en outre que les phosphatides de la lipovitelline sont surtout des phosphatidylcholines tandis que ceux de la lipovitellénine sont surtout des phosphatidyl-colamines.

BERNARDI et COOK (79), BURLEY et COOK (80) ont étudié la composition lipidique des deux lipovitellines :

	Lipovitelline α phosphatides (en %)	Lipovitelline β phosphatides (en %)
BERNARDI	55	67,5
BURLEY	52,5	53,5

Ces deux lipoprotéines contiennent des taux identiques de lipides (20 % environ).

Les compositions en acides gras ont également été étudiées :

SCHJEIDE (81), indique pour les lipides de la lipovitelline, les chiffres suivants :

Acide palmitique	40 %
Acide stéarique	12 %
Acide palmitoléique	2 %
Acide oléique	33 %
Acide linoléique	9 %
Acide arachidonique	1 %
Acides divers	2 %

EVANS et BANDEMER (82) isolent les complexes lipovitelléniques et lipovitelléniniques, puis extraient les lipides peu liés par l'éther, puis les lipides fermement liés par l'alcool.

Chaque fraction est séparée par chromatographie sur colonne en : lipides neutres, céphalines, lécithines.

Les acides gras sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

Le tableau VIII résume les principaux résultats obtenus avec les fractions phosphatidiques :

TABLEAU VIII

Composition en acides gras des phospholipides des deux fractions
H.D.F. et L.D.F.

ACIDES (en %)	CEPHALINES				LECITHINES			
	H.D.F.		L.D.F.		H.D.F.		L.D.F.	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Palmitique	31	29	28	36	43	41	42	45
Stéarique	35	44	42	27	23	19	22	14
Palmitoléique ...	1,5	1,5	2	2	1	2,5	3	3
Oléique	29	21	24	30	29	29	31	30
Linoléique	3	3,5	5	5,5	2,5	7	0,5	7,5
A : lipides peu liés. B : lipides fermement liés (voir le texte)								

En conclusion, il est possible d'admettre la présence de deux complexes lipoprotéiques essentiels, l'un de forte densité dont la protéine de base est la *vitelline*, l'autre de faible densité, dont la protéine de base est la *vitellénine*.

Le tableau IX résume l'essentiel des données actuelles.

TABLEAU IX

	LIPO- VITELLINE	LIPOVI- TELLENINE	LIPO- VITEL- LINE α	LIPO- VITEL- LINE β
Taux de protéines des lipoprotéines (en %)	79	12 à 18		
Taux de lipides des lipoprotéines (en %)	21	80 à 88	21	21
Taux de phosphatides.	53 à 78	24 à 28	53 à 55	54 à 68
Taux de glycérides ...	16 à 42	62 à 67		
Taux de stérols (en % des lipides de la lipoprotéine)	5 à 6	4 à 5		
% des lipoprotéines ..	22	78		

B) COMPOSITION GÉNÉRALE DES LIPOPROTÉINES DE L'EMBRYON

I. — Etudes concernant les lipoprotéines du sang embryonnaire

SCHJEIDE (83) étudie les lipoprotéines du sérum, par ultra-centrifugation, électrophorèse libre et électrophorèse sur papier.

L'ultra-centrifugation permet de distinguer, en plus des chylomicrons, deux catégories principales de lipoprotéines :

- Lipoprotéines légères (densité comprise entre 1,003 et 1,063) ;
- Lipoprotéines denses (densité comprise entre 1,063 et 1,21).

Dans les lipides totaux, l'évolution des pourcentages des différents lipides, du dixième au vingt et unième jour d'incubation, est la suivante :

Stérides	21 à 43 %
Stérols	5,3 à 8,5 %
Glycérides	22 à 9 %
Phosphatides	52 à 40 %

Dans les chylomicrons, on constate une augmentation des stérides et une diminution des glycérides durant le développement embryonnaire ; cette tendance se retrouve dans les lipoprotéines légères, tandis que, dans les lipoprotéines denses, on constate une diminution des pourcentages de phosphatides et une augmentation des stérides.

Du point de vue composition en acides gras, on constate, dans les lipides totaux, une diminution du taux de l'acide palmitique et un accroissement du taux de l'acide oléique :

9 ^{me} jour ...	}	acide palmitique	40 %
		acide oléique	32 %
21 ^{me} jour ...	}	acide palmitique	22 %
		acide oléique	40 %

Les stérides du sérum sont riches en acide oléique ; on trouve pour un embryon de 18 jours :

acide palmitique	10 %
acide stéarique	6 %
acide oléique	69 %
acide linoléique	14 %
acides divers	1 %

La composition des acides gras des triglycérides est la suivante :

acide palmitique	53 %
acide stéarique	9 %
acide oléique	29 %
acide linoléique	6 %
acides divers	4 %

Il est difficile de présenter une synthèse cohérente de ces quelques résultats partiels.

II. — Relations entre les lipoprotéines du sérum de poule en période de ponte et celles du jaune et du sérum d'embryon

McINDOE (84) signale que le sang de poule contient, en période de ponte, un taux important de triglycérides et de la vitelline. Par dilution, on obtient un précipité lipophosphoprotéique comprenant 20 % de protéine, et 80 % de lipides dont 25 % de phosphatides et 4 % de cholestérol.

SCHJEIDE (85) précise que, sous l'action des oestrogènes, le foie de la poule produit une phosphoprotéine et plusieurs lipoprotéines. Celles-ci se déposent dans le jaune, en traversant les parois des capillaires sanguins ; ces dépôts s'étalent sur une période de cinq jours ; c'est pourquoi, du fait de fluctuations quotidiennes, il est possible de distinguer sur la coupe d'un jaune d'œuf congelé, cinq à six couches concentriques de teintes différentes.

Ces vues sont corroborées par les expériences de FLICKINGER (86) qui, injectant du phosphore radioactif, constate un stockage de quelques heures dans le foie, puis son apparition dans les protéines circulantes et, après quelques jours, sa localisation dans le jaune en formation.

De même SCHJEIDE et URIST (87 et 88) retrouvent dans le jaune les lipoprotéines du sérum de poule en période de ponte.

Les lipoprotéines du jaune sont donc voisines de celles du sérum de poule pondeuse.

Par contre SCHJEIDE (89) signale que les lipoprotéines du sérum d'embryon sont plus voisines de celle du poulet que de celles du jaune, du fait que le passage des lipides du jaune dans l'embryon, ne se fait pas sans transformation ; SCHJEIDE et Coll. (90) indiquent que la majorité des lipides (cholestérol excepté) pénètre dans la circulation sous forme de chylomicrons à base de triglycérides ; HEVESY et Coll. (91) indiquent que les phosphatides (et probablement les triglycérides), sont resynthétisés durant leur passage.

D'autre part, si, comme le montre SCHJEIDE (92) la capacité de production de nouvelles lipoprotéines est limitée pour le foie d'un embryon de 7 jours, celle-ci s'accroît brusquement vers le treizième jour ; ce fait se traduit par une synthèse accrue de stérides, et par une décroissance régulière du taux des chylomicrons. Les stérides hépatiques sont extrêmement riches en acide oléique (95 %).

En conclusion, les lipoprotéines du jaune sont le reflet des lipoprotéines du sérum de poule pondeuse du fait qu'elles proviennent d'un transfert mécanique ; par contre, les lipoprotéines du sérum d'embryon diffèrent de celles du jaune, du fait que, d'une part, les lipides subissent certaines transformations lors de leur transfert dans la circulation embryonnaire et que, d'autre part, le foie de l'embryon élabore d'autres lipides et d'autres lipoprotéines en quantité importante dès le treizième jour.

DEUXIÈME PARTIE

Les méthodes d'analyse

I. — PRÉPARATION DES LIPOPROTÉINES DU JAUNE D'ŒUF

De nombreuses méthodes font partie de plans généraux de fractionnement tels ceux de JOUBERT et COOK (93), de BERNARDI et COOK (94), de SUGANO (95), et de SUGANO et WATANABE (96) et nécessitent des ultra-centrifugeuses ; nous avons préféré utiliser des méthodes plus spécialement adaptées aux lipoprotéines, comme celles préconisées par ALDERTON et FEVOLD (97) ou par VANDEGAER et REICHMAN (98) pour la préparation de la lipovitelline.

Technique utilisée

Nous utilisons pour la préparation de la lipovitelline une adaptation de la méthode de VANDEGAER et REICHMAN.

Le jaune est séparé du blanc ; il est lavé à l'eau distillée, puis roulé dans de la gaze pour le sécher et éliminer les chalazes ; la membrane est craquée et le jaune est pressé à travers trois épaisseurs de gaze.

On ajoute une quantité suffisante d'une solution aqueuse de NaCl à 1,6 g % glacée, pour réaliser un mélange de 3 ml d'eau salée et de 1 g de jaune ; le tout est émulsionné et centrifugé une heure à 4°, à 6.000 ou 12.000 tours/minute ; on obtient un sédiment et une phase liquide.

La phase aqueuse est décantée ; le culot est redissous dans une solution de NaCl à 5 g % (2,5 ml pour une prise de jaune initiale de 1 g), et l'on procède à une nouvelle précipitation par addition de deux volumes d'eau distillée à 4° ; on centrifuge, et on procède à deux nouvelles précipitations.

La fraction finale obtenue est essentiellement formée de Lipovitelline.

La phase liquide issue de la première centrifugation, renferme le complexe lipoprotéique de faible densité et est utilisable pour les études électrophorétiques.

Dans certains cas nous avons précipité la vitellénine sous forme d'un complexe moins riche en lipides que le complexe initial, en utilisant l'extraction étherée préconisée par FEVOLD et LAUSTEN (99).

Pour cela, la phase aqueuse est émulsionnée avec deux volumes d'éther glacé ; après quelques heures de repos en glacière, on observe :

- Une phase étherée jaune surnageante.
- Un précipité intermédiaire blanc de lipovitellénine impure.
- Une phase aqueuse inférieure renfermant les protéines.

La phase supérieure est éliminée par aspiration, et la phase inférieure par décantation ; le précipité est purifié par agitation avec de l'éther froid ; il reste une masse gélatineuse de lipovitellénine.

Les deux lipoprotéines ainsi préparées, peuvent être purifiées par de nouvelles précipitations, ou par ultra-centrifugation.

II. — MÉTHODES D'EXTRACTION DES LIPIDES

Comme ceux-ci sont intégrés dans des complexes lipoprotéiques, les agents physiques de séparation restent inopérants et il est nécessaire d'utiliser des procédés chimiques.

Parmi les agents chimiques, certains comme le méthanol ou l'éthanol, sont capables de dissocier les cénapses lipoprotéiques, mais comme ils sont en général de médiocres solvants des lipides, il convient de leur adjoindre des solvants globaux tels que l'éther, le chloroforme etc...

Nous citerons :

- La méthode de BLOOR à l'éthanol-éther, BLOOR (100, 101, 102), INSULL et Coll. (103).
- La méthode au méthylal-méthanol, DELSAL (104), FILLERUP et MEAD (105).
- La méthode de FOLCH au chloroforme-méthanol, FOLCH et Coll. (106, 107), WREN et MITCHELL (108), THUILLIE (109).

Nous donnons la préférence aux méthodes dérivées de celles de FOLCH qui permettent d'obtenir, par un partage de phase, un extrait libéré de la majorité des contaminants ; nous utilisons également les méthodes au méthylal-méthanol qui permettent une extraction plus complète des phosphatides que celle de BLOOR.

a) Méthode de Thuillie

Le jaune est introduit dans une ampoule à décantation contenant 120 ml de mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v) ; après agitation, on ajoute 160 ml d'eau distillée et on agite énergiquement. Après 24 heures de repos, la phase chloroformique sous-jacente est récupérée, et l'opération est recommencée après addition de 80 ml de chloroforme neuf ; on termine par deux lavages avec 40 ml de chloroforme ; tous les extraits sont rassemblés et filtrés.

Les pesées et les dosages sont effectués sur des fractions aliquotes de filtrat.

b) Méthode de Folch

Elle est utilisée dans le cas du jaune, mais aussi pour l'extraction des tissus en général et de l'embryon en particulier. Celui-ci est libéré des membranes, puis lavé à l'eau distillée, séché sur papier filtre et pesé.

X grammes d'embryon ou de jaune sont homogénéisés (en s'aidant d'un broyeur électrique puissant dans le cas de l'embryon) dans un volume (15 . x ml) de chloroforme-méthanol 2 : 1 (v/v) amené à ébullition ; après plusieurs agitations suivies de périodes de repos (on peut sans inconvé-

nient laisser en contact 24 heures), on centrifuge et récupère le surnageant ; le culot est remis en suspension dans 5 . x ml de mélange neuf, et centrifugé. L'opération est répétée deux fois, les extraits sont rassemblés et filtrés, le filtre est rincé et le filtrat est ajusté à 40 . x ml. On ajoute 8 . x ml de solution de NaCl à 7,5 g/litre et on agite énergiquement ; après séparation, la majorité de la phase aqueuse supérieure est éliminée par aspiration et le reste par trois rinçages précautionneux des parois et de la surface avec chaque fois 3 . x ml d'un liquide de lavage préparé en mélangeant 8 volumes de chloroforme, 4 volumes de méthanol et 3 volumes d'eau distillée ; après séparation, on récupère la phase supérieure et on ajoute 2,9 g de NaCl par litre ; ce liquide de lavage se conserve en flacon bouché.

Finalement, après ce lavage, la phase inférieure chloroformique et le résidu du dernier liquide de lavage, sont mélangés en une seule phase par addition juste suffisante de méthanol.

c) Méthode au méthylal-méthanol

(Technique de LAKSHMINARAYANA et KRUGER (110)).

Un volume de matériel est homogénéisé dans 15 volumes du mélange diméthoxyméthane-méthanol 4 : 1 (v/v) et on agite durant 30 minutes ; on amène le tout à ébullition et on centrifuge. On procède à quatre remises en suspension du culot dans de bonnes quantités de solvant. Les extraits rassemblés et filtrés sont évaporés à 40° à l'évaporateur rotatif sous vide ou sous courant d'azote.

L'extrait brut obtenu est repris par de l'hexane et la solution est filtrée.

Signalons toutefois que DELSAL et MANHOURI (111), indiquent que l'extraction des lipides par les solvants organiques conduit à des résultats erronés (jusqu'à 25 % par excès) si l'on ne fait pas suivre l'extraction par un lavage des lipides du type de celui utilisé dans la méthode de FOLCH.

III. — MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES CHROMATOGRAPHIE SUR ACIDE SILICIQUE

Les lipides se caractérisent par leur solubilité dans les solvants organiques ; toutefois, certaines classes de lipides ont un comportement particulier. C'est ainsi que l'acétone dissout les lipides à l'exception des phosphatides. De même, des différences de solubilité interviennent au sein des phosphatides eux-mêmes, suivant la polarité du solvant ; ce sont ces caractères de solubilité qui sont utilisés dans les méthodes physiques de fractionnement. Ainsi, la précipitation acétonique des phosphatides à froid à partir d'un extrait lipidique brut, est un procédé classique (POLO-NOVSKI et Coll. (112)).

Nous préférons cependant, *les méthodes chromatographiques* modernes, dont l'intérêt s'est accru depuis que l'on utilise *l'acide silicique* ; nombre de méthodes ont été mises en œuvre :

- sur colonne d'acide silicique (ou d'alumine),
- sur papier imprégné d'acide silicique,
- sur papier de fibre de verre imprégné d'acide silicique,
- en couche mince d'acide silicique (ou d'alumine).

a) Méthode de chromatographie sur colonne d'acide silicique et sur colonne d'alumine

Ces méthodes se prêtent, soit au fractionnement des lipides en classes, soit au fractionnement des composants d'une même classe ; parmi les méthodes utilisant l'acide silicique, nous citerons celle de BORGSTROM (113) pour la séparation graisses neutres-phosphatides, celle de BORGSTROM (114) pour la séparation stérides-glycérides-acides gras libres et cholestérol libre, celle de LIS et Coll. (115), celle de BARRON et HANAHAN (116) pour la séparation stérides-triglycérides-cholestérol-di et mono glycérides, celle de FILLERUP et MEAD (117) pour la séparation stérides-triglycérides-stérols-acides gras libres-phosphatides, celle de BÖTTCHER et Coll. (118), celles de HIRSCH et AHRENS (119) pour la séparation de mélanges complexes, celle de FREEMAN et Coll. (120), dont nous avons utilisé une variante lors d'un récent travail (WAREMBOURG et Coll. (121). Dans le présent travail, nous utilisons la méthode de BARRON et HANAHAN telle que ou légèrement modifiée.

1°) Technique utilisée pour la séparation des classes de lipides

L'acide silicique MALLINCKRODT (100 mesh) est lavé avec de l'éther, puis avec un mélange benzène-hexane 15:85 (v/v) et avec de l'hexane ; l'acide silicique est déposé en suspension dans l'hexane, à raison de 0,8 g dans des colonnes constituées par des pipettes de 5 ml dont le diamètre intérieur est environ de 6 mm et dont l'extrémité inférieure est garnie d'une petite bourre de laine de verre.

La confection des colonnes est une opération délicate, dont dépend en particulier la vitesse d'écoulement des solvants ; il convient d'éliminer les particules fines d'acides silicique par décantation lors des lavages ; il convient également d'éviter la formation de bulles gazeuses à l'intérieur de la colonne, car celles-ci perturbent les vitesses d'écoulement, et risquent de provoquer des cassures ; on peut minimiser ces phénomènes en procédant à un dégazage préalable de la suspension sous vide partiel ; il importe enfin, de ne jamais laisser à sec le sommet de la colonne.

La hauteur de la colonne d'acide silicique obtenue, se situe aux environs de 4 cm ; on y dépose les lipides à fractionner à raison de 10 à 15 mg en solution dans 1 ml d'hexane ; dès que la solution est absorbée, la chromatographie est mise en route, conformément au schéma suivant :

- Les stérides sont élués par 20 ml de mélange benzène-hexane 15 : 85 (v/v).
- L'ensemble des glycérides, du cholestérol libre et des acides gras libres, est élué par 15 ml de chloroforme lavé (*) - éther 1 : 1 (v/v).
- Les phosphatides sont élués par 20 ml de méthanol.

Les quatre derniers millilitres de chaque éluat servent à contrôler, par chromatographie en couche mince, l'efficacité des séparations.

(*) Il est recommandé de laver le chloroforme à l'eau et de le déshydrater ensuite par le sulfate de sodium anhydre, car, le chloroforme contient un certain taux d'alcool qui pourrait éluer prématurément certaines catégories de phosphatides.

La fraction contenant le mélange des glycérides, du cholestérol libre, et des acides gras libres, est dans certains cas séparée en deux sous-groupes ; ces fractionnements sont en général faits à des fins de chromatographie en phase gazeuse des acides gras constitutifs, il n'est donc pas indispensable de séparer les glycérides du cholestérol libre ; nous utilisons à la suite de KAUFMANN et Coll. (122) et de SYLVESTER et Coll. (123). la chromatographie sur colonne d'alumine ; l'alumine est préalablement chauffée une heure au bain-marie à 75° avec de l'acide chlorhydrique dilué à 20 %, puis lavée à l'eau courante puis à l'eau distillée, jusqu'à neutralité ; après dessiccation partielle, la déshydratation est complétée à l'étuve à 120° ; l'alumine est déposée en suspension dans l'éther dans les colonnes habituelles (voir plus haut) sur une hauteur de 45 mm environ ; on procède à deux lavages avec 8 ml de méthanol puis avec 8 ml de chloroforme lavé ; le mélange des glycérides, du cholestérol libre et des acides gras libres, est déposé en solution chloroformique ; les lipides neutres sont élués avec 20 ml de chloroforme lavé, puis les acides gras sont récupérés avec 10 ml de méthanol contenant 2 % (en volume) d'acide acétique.

Nous utilisons également le procédé préconisé par BOTTCHE (124) et qui consiste à agiter les lipides dissous dans 10 ml d'éther de pétrole avec 10 ml d'une solution aqueuse de potasse 0,05 N ; après séparation des phases, on récupère la solution aqueuse des savons alcalins ; l'opération est répétée, les phases alcalines sont rassemblées, lavées à l'éther de pétrole, amenées aux environs de pH 1 par addition d'HCl N ; les acides gras libérés sont extraits par trois agitations avec 10 ml d'éther de pétrole ; l'extract éthéré est lavé à l'eau et déshydraté sur Na₂SO₄sec.

2°) Technique utilisée pour le fractionnement des phosphatides

Les procédés de chromatographie sur colonne d'acide silicique comportent généralement l'emploi d'un gradient continu ou discontinu de méthanol dans le chloroforme ; nous citerons les travaux de BIRAN et BARTLEY (125), de LEA et Coll. (126), de POLONOVSKI et Coll. (127).

Nous utilisons les colonnes habituelles et la séquence de solvants d'élu-tion proposée par POLONOVSKI ; 10 à 15 mg de lipides totaux en solution chloroformique, sont déposés sur la colonne ; les lipides non phosphorés sont élués par 15 ml de chloroforme lavé ; le fractionnement des phospho-lipides est mis en route conformément au schéma suivant :

Solvant N° 1	chloroforme lavé-méthanol	12:1	8 ml
Solvant N° 2	chloroforme lavé-méthanol	7:1	8 ml
Solvant N° 3	chloroforme lavé-méthanol	4:1	8 ml
Solvant N° 4	chloroforme lavé-méthanol	3:2	15 ml
Solvant N° 5	chloroforme lavé-méthanol	5:4	8 ml
Solvant N° 6	chloroforme lavé-méthanol	1:1	8 ml
Solvant N° 7	chloroforme lavé-méthanol	0:1	10 ml

Les éluats sont récoltés par fractions de 1 ml et le phosphore lipidique est dosé sur le quart de chaque fraction ; la courbe d'élu-tion est construite ; les tubes correspondant à des pics individualisés sont regroupés ; les autres le sont aussi, mais de façon plus arbitraire. Les contenus rassemblés sont étudiés par chromatographie en couche mince de gel de silice.

Cette méthode permet de séparer les céphalines et une part importante des lécithines, mais il se produit ensuite un chevauchement entre, les lécithines résiduelles, les sphingomyélines et les lysolécithines (voir troisième partie).

b) Méthodes de chromatographie en couche mince

Les premiers essais de séparation des lipides par chromatographie sur papier, se sont révélés insuffisants (ROUSER et MARINETTI (128), MARINETTI et STOTZ (129). Quelques améliorations furent apportées par l'utilisation de papier imprégné d'acide silicique (LEA et Coll. (130)), DIECKERT et REISER (131)) et de nouveaux systèmes solvants (MARINETTI et STOTZ (132), CORMIER et Coll. (133), MARINETTI et Coll. (134), MARINETTI et STOTZ (135)). Mais ces méthodes ont été supplantées par la très élégante méthode de chromatographie en couche mince.

Les principaux avantages de cette méthode, résident dans un raccourcissement du temps de développement, dans un pouvoir séparatif plus important, dans la possibilité d'emploi de réactifs corrosifs de révélation, dans la possibilité d'analyser avec précision des quantités aux moins dix fois plus faibles que sur papier, et enfin dans la possibilité de réaliser facilement des chromatographies préparatives (grattage ou aspiration de la couche mince suivis d'une élution facile).

Différents travaux ont été effectués ; nous citerons ceux de MALINS et MANGOLD (136), de PRIVETT et Coll. (137), de WAGNER et HORHAMMER (138), de KAUFMANN et Coll. (139), de MULDER et WHERRETT (140) (séparation des lipides cérébraux), d'HOFMANN (141), de VACIKOVA (142), de SNYDER (143), de MICHALEC et Coll. (144) (fractionnement des stérides et des triglycérides), de ROBINSON et PHILLIPS (145) et (146), de WHERRETT et CUMMING (147).

1°) Définition et théorie succincte

Une couche adsorbante de faible épaisseur, est déposée sur une plaque de verre ; les solutions des composés à séparer sont déposées à l'extrémité inférieure ; après évaporation du solvant, la plaque est placée dans une enceinte close saturée en vapeurs du solvant de migration choisi ; on laisse celui-ci migrer par capillarité. Le solvant et les solutés entrent en compétition pour l'occupation des sites d'adsorption de la surface.

2°) Préparation des chromatoplaques

Nous utilisons le gel de silice G « MERCK » contenant 13 % de plâtre comme liant ; un étaleur spécial permet de répartir une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur sur des plaques de verre planes et carrées de 20 cm de côté ; il est du reste possible comme le signalent LEES et DE MURIA (148), de se passer de matériel spécialisé. L'adsorbant s'obtient en mélangeant 30 g de gel avec 60 ml d'eau distillée ; de l'addition d'eau à la fin de l'étalement, on dispose de 4 minutes pour la préparation de cinq plaques placées côte à côte sur un support spécial ; on laisse les plaques se solidifier et, après séchage à l'air, on termine la dessiccation par un passage de 30 minutes à l'étuve à 110° de façon à obtenir un degré d'activation précis ; les plaques sont conservées dans un dessiccateur.

3^c) Méthodes de révélation des chromatogrammes

Nous utilisons de préférence :

Pour les révélations multiples

— Une pulvérisation d'une solution aqueuse de rhodamine 6G à 1 mg % ; la lecture se fait en lumière de WOOD qui révèle les lipides sous forme de taches fluorescentes jaunes ; l'identification se fait grâce à des migrations parallèles d'étalons.

— Une pulvérisation d'acide sulfurique dilué de moitié ; la révélation s'obtient par carbonisation dans une étuve à 120° pendant 30 minutes.

— Une pulvérisation d'une solution de bleu de bromothymol à 40 mg % dans NaOH 0,01 N d'après JATZKEWITZ et MEHL (149). Les lipides sont révélés sous forme de taches ocres sur fond bleuté.

Pour les révélations spécifiques

— Révélation des lipides insaturés par exposition aux vapeurs d'iode (taches marron clair).

— Révélation à la ninhydrine par pulvérisation d'une solution à 0,2 g % dans le mélange butanol-acide acétique à 10 % 95:5 (vol/vol) ; un chauffage de 20 minutes à 105°, révèle les céphalines, les lysocéphalines et les acides aminés sous forme de taches rouges.

— Révélation des composés choliniques, par pulvérisation de réactif de DRAGENDORFF ; la formule du réactif modifié par MUNIER et MACHEBCEUF est la suivante :

Solution 1 :

nitrate de bismuth basique : 1,7 g
acide acétique à 20 % : 100 ml.

Solution 2 :

iodure de potassium : 40 g
eau distillée : 100 ml.

Au moment de la révélation, on mélange 20 ml de la solution 1 avec 5 ml de la solution 2 et avec 70 ml d'eau distillée ; ce réactif révèle les lécithines, les sphingomyélines et les lysolécithines, sous forme de taches de couleur jaune orangé.

— Révélation des composés phosphorés par pulvérisation d'un réactif dérivé de celui de HANES et ISHERWOOD (150) ; sa composition est la suivante :

Après dissolution de 3 g de molybdate d'ammonium dans 25 ml d'eau distillée, on ajoute 30 ml d'HCl N et 15 ml d'acide perchlorique concentré (à 60 %).

Après pulvérisation, un chauffage de 20 minutes à 105°, révèle les céphalines et les lysocéphalines, les lécithines et les lysolécithines, les sphingomyélines, sous forme de taches bleues sur fond grisâtre ; les cérébrosides, qui ne contiennent pas de phosphore, sont paradoxalement révélés par ce réactif.

— Révélation du cholestérol par pulvérisation du mélange anhydride acétique-acide sulfurique 4:1 (v/v), après chauffage de la plaque à l'étuve à 105° environ (ou par l'intermédiaire d'une lampe à rayons infra-rouges),

il apparaît brusquement après 10 minutes environ une coloration rouge violacée au niveau des fractions contenant du cholestérol ; en continuant le chauffage, un début de carbonisation, fait ressortir en brun les composés non cholestéroliques.

JATZKEWITZ et MEHL (151) indiquent une révélation similaire par pulvérisation du mélange acide sulfurique-acide acétique 1:1 (v/v) et chauffage 15 minutes à 90°.

Pour les révélations globales

Les couplages suivants :

- Rhodamine 6G - mélange anhydride acétique acide sulfurique.
- Rhodamine 6G - réactif à la ninhydrine-réactif de DRAGENDORFF ou réactif molybdique.

Différents modes de conservation des documents ont été proposés, telle la pulvérisation d'un liquide plastifiant. Nous préférons utiliser la photocopie directe des plaques.

4) *Chromatographie des lipides neutres*

Nous effectuons la chromatographie, soit à partir de l'extrait lipidique soit à partir de fractions individualisées ; la méthode utilisée est une adaptation de celle de MALINS et MANGOLD (152).

Les lipides sont déposés en solution chloroformique, à l'aide de micropipettes ; les taches ne doivent pas avoir plus de quelques millimètres de diamètre ; les plaques sont placées dans de petites cuves parallélépipédiques, contenant environ 100 ml du mélange : éther de pétrole (60-70°) - éther éthylique - acide acétique 90:10:1 (vol/vol).

La cuve est hermétiquement close, le développement dure environ 40 minutes et la plaque est retirée lorsque le front du solvant se situe à environ 12 cm de la ligne de départ. Après évaporation du solvant de migration, les lipides sont révélés à la rhodamine et avec le mélange anhydride acétique-acide sulfurique.

Dans ce système, la séparation de classe est la suivante, du front du solvant à la ligne de base :

hydrocarbures

Stérides

esters méthyliques d'acides gras

Triglycérides (partiellement séparés)

Acides gras libres

Cholestérol libre

Diglycérides

Monoglycérides (peu ou pas séparés des phosphatides qui ne migrent pas).

5) *Chromatographie des phospholipides*

La chromatographie s'effectue à partir des lipides totaux ou des phosphatides, par une adaptation de la méthode de WAGNER et HORHAMMER (153).

Les lipides sont déposés dans le mélange chloroforme-méthanol 1:1.

Le solvant de migration utilisé est le suivant :

chloroforme : 65 volumes

méthanol : 25 volumes

eau distillée : 4 volumes

Le développement dure environ 90 minutes ; les lipides sont révélés globalement par la rhodamine, les céphalines et lysocéphalines par la ninhydrine, les lécithines, lysolécithines et sphingomyélines par le réactif de DRAGENDORFF et les lipides phosphorés par le réactif molybdique. La séparation de classe est la suivante, du front du solvant à la ligne de base :

Lipides neutres

acides gras libres

Cérébrosides libres

Céphalines

cérébro-sulfatides

Lécithines

lysocéphalines

Sphingomyélines

Lysolécithines

aminoacides

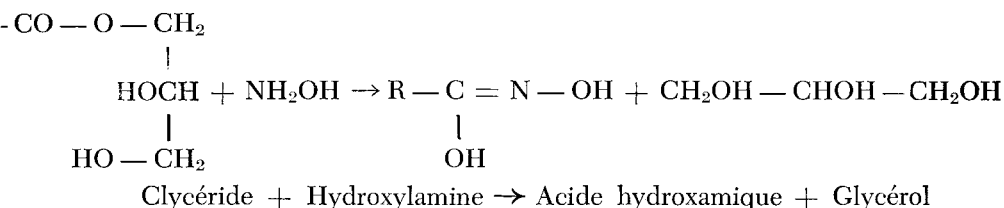
L'étude de ces méthodes montre que l'on dispose de techniques analytiques de choix : les séparations sont nettes, le chevauchement lécithine-sphingomyéline-lysolécithine signalé à propos de la chromatographie sur colonne n'existe pas ici. Il est donc logique de donner la préférence à la chromatographie en couche mince pour le fractionnement quantitatif des phosphatides ; il suffit de déposer des quantités importantes de lipides en taches rapprochées ou en trainée ; après migration et révélation partielle des taches extrêmes, on peut gratter les parties intermédiaires non révélées et éluer le matériel adsorbé. Nous éluons les stérides et le cholestérol par le chloroforme, les glycérides par le mélange éthanol-éther 1:1 (vol/vol), les acides gras libres par l'acide sulfurique dilué, les phosphatides par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (vol/vol).

IV. — DOSAGE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS LIPIDIQUES

a) Méthode de dosage des esters d'acides gras

Principe :

Les acides gras des glycérides, des stérides, et des glycérophosphatides, sont, sous l'influence de l'hydroxylamine, convertis en acides hydroxamiques.



Ces dérivés donnent avec les sels ferriques un complexe rouge qui se prête à un dosage spectrophotométrique à 520 millimicrons. Parmi les méthodes préconisées, nous utilisons celle décrite par JARRIER et POLO-NOVSKI (154).

Réactifs :

1° Chlorhydrate d'hydroxylamine à 2,5 g% en éthanol ;

2° Solution éthanolique de soude à 2,5 g% ;

3° Solution mère de perchlorate ferrique :

Chlorure ferrique anhydre	1,16 g
Eau distillée	20 ml
Acide nitrique concentré	10 ml
Acide perchlorique concentré (65 %)	15 ml

Chauffer à feu nu jusqu'à dégagement abondant de fumées, et ajouter après refroidissement :

Eau distillée	40 ml
Acide nitrique	10 ml
Acide perchlorique q.s.q.	100 ml

Conserver en glacière.

4° Solution fille extemporanée :

Dilution au 1/20^{me} de la solution mère dans l'éthanol ;

5° Solution étalon 0,005 M d'acétate de cholestérol en chloroforme.

Dosage :

Pour des prises d'essai comprises entre 1 et 6 micromolécules d'acides gras, il y a proportionnalité entre les densités optiques et les concentrations.

Une fraction convenable d'extract lipidique est évaporée à sec en tube ainsi que 0,4 ml de solution étalon (soit 2 micro-moles). Les lipides secs sont dissous dans 0,3 ml de réactif hydroxylaminique, on ajoute 0,3 ml de solution de soude et on laisse reposer 1 heure, on ajoute 10 ml de solution préparée extemporanément de perchlorate. La lecture se fait après 30 minutes contre un blanc contenant tous les réactifs.

Calcul :

Taux d'acides gras estérifiés de la prise d'essai

$$2. \quad \frac{\text{Densité optique du dosage}}{\text{Densité optique de l'étalon}} \quad (\text{micromoles}).$$

Les sphingomyélines (liaisons amides) et les acides gras libres ne donnent par la réaction des hydroxamates.

b) Méthode de dosage du cholestérol

Différentes méthodes ont été récemment proposées ; elles font appel à une réaction colorée que donne le cholestérol avec divers sels de fer.

Ces méthodes présentent l'avantage de donner des colorations stables et d'être très sensibles. (ZAK, (155), CRAWFORD (156), SEARCY et Coll. (157)). Nous avons préféré conserver l'ancienne méthode de LIEBER-

MANN et BURCHARD (158). Nous ne décrivons pas cette technique classique et n'en donnerons que le principe.

Principe :

Lorsqu'on traite une solution chloroformique de cholestérol par un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique, il se produit une coloration violette fugace qui vire au bleu puis au vert.

Nous employons une adaptation de la méthode de GRIGAUT (159) dont la phase terminale est constituée par la réaction de LIEBERMANN.

La différenciation cholestérol libre-cholestérol estérifié se fait par la même méthode après précipitation du cholestérol libre grâce à une solution éthanolique de digitonose (ou digitonine).

Lorsque les dosages sont effectués sur les éluats provenant d'une chromatographie des lipides neutres, on peut se passer de l'artifice de la digitonine, puisque stérides et cholestérol libre, se trouvent séparés.

Des méthodes fondées sur un fractionnement chromatographique préalable ont du reste été proposées, AGNERAY et Coll. (160) et AGNERAY et Coll. (161).

c) Méthode de dosage du glycérol des glycérides

Les premiers dosages ont été effectués par BLIX (162) et (163). STEWART (164) proposait d'oxyder le glycérol, libéré par saponification, grâce à l'acide periodique. Il distillait le formaldéhyde obtenu et le dosait par l'acide chromotrope.

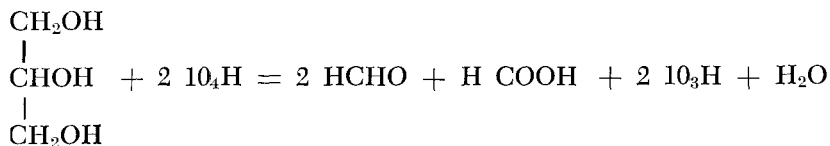
Récemment WHEELDON et BRINLEY (165) ont proposé des méthodes permettant le dosage simultané du glycérol, de l'inositol, de la sérine et de la colamine dans les hydrolysats de phosphatides.

Enfin il est possible d'envisager des dosages enzymatiques (GARLAND et RANDLE (166)).

Nous utilisons une variante de la méthode décrite par CARLSON et WADSTROM en 1959 (167).

Principe :

La méthode est fondée sur l'oxydation préalable du glycérol par l'acide periodique :



Après destruction de l'excès d'acide periodique et de l'acide iodique formé, par un réducteur, le formol est dosé par une microméthode colorimétrique par l'intermédiaire de l'acide chromotrope (acide 1,8 dihydroxy-naphtalène, 3,6 disulfonique) en milieu sulfurique.

Il se produit une coloration pourpre intense que l'on apprécie au spectrophotomètre.

Réactifs :

1° Etalon de référence :

La tripalmitine est purifiée par chromatographie sur colonne d'acide silicique. On réalise une solution mère 0,05 M en milieu chloroformique, qui sert à la fabrication d'une solution fille (par dilution au 1/100^{me} de la solution mère).

2° Etalon de travail :

Glycérine bidistillée titrée en glycérol par rapport à l'étalon de référence.

On réalise une solution mère aqueuse 0,01 M, qui sert à la fabrication d'une solution fille (par dilution au 1/100^{me} de la solution mère).

3° Solution periodique :

Periodate de potassium	230	mg
Acide sulfurique	1,25	ml
Eau bidistillée q.s.p.	100	ml

4° Réactif stanneux (à préparer de préférence extemporanément) :

SnCl ₂ , 2 H ₂ O pur	2,25	g
HCl concentré	5	ml

Dissoudre au bain-marie, ajuster à 100 ml avec de l'eau. La solution doit être parfaitement limpide.

5° Réactif chromatropique (à préparer EXTEMPORANEMENT à l'abri de la lumière).

Acide chromatropique	50	mg
Eau bidistillée	1	ml

Courbe d'étalonnage :

Lorsqu'on utilise un étalon de tripalmitine, il est nécessaire de traiter les différentes dilutions exactement comme les échantillons à doser. Mais il est plus simple d'utiliser un étalon de glycérine ajusté sur l'étalon de tripalmitine et il devient alors aisé de faire une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque série de dosages.

Dans six tubes bouchés émeri, on introduit :

Tubes N°	1	2	3	4	5	6
H ₂ SO ₄ dilué au 1/30. ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Glycérine diluée ... ml	0	0,5	1	2	3	4
Eau bidistillée ml	4	3,5	3	2	1	0
Taux de glycérol en micromoles	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4

Les tubes sont traités par l'acide periodique et les autres réactifs de la même façon que les tubes « dosages ».

Dosage :

Puisque les phosphatides contiennent du glycérol, il est indispensable d'opérer :

— Soit par une fraction chromatographique de glycérides.

— Soit par un extrait lipidique débarrassé des phosphatides par chromatographie sur colonne d'acide silicique, l'élution des lipides non phosphatidiques étant faite par 15 ml de chloroforme lavé.

Une fraction aliquote convenable d'éluat est évaporée à sec en tube.

On ajoute 5 ml d'alcool absolu, 5 gouttes de solution aqueuse de potasse à 2,5 g%. Après émulsion, on saponifie 30 minutes au bain-marie à 70° ; on acidifie avec environ 10 gouttes d'acide acétique à 6 % pour libérer les acides gras et on évapore à sec au bain-marie. On ajoute 10 ml d'éther de pétrole chaud et 1 ml de H₂SO₄ dilué au 1/30^m. On agite de façon à dissoudre le glycérol dans la phase aqueuse et les acides gras dans la phase étherée.

On élimine la majorité de la phase étherée par aspiration, on procède à deux lavages par de l'éther de pétrole neuf et on termine l'élimination de l'éther par évaporation au bain-marie.

Après avoir complété à 10 ml avec de l'eau bidistillée, on procède aux dosages en triple exemplaire comme suit :

Solution à doser	2 ml
Eau bidistillée	2,2 ml

On ajoute alors 0,5 ml de solution periodique ; après mélange on attend 10 minutes, puis on arrête la réaction par 0,5 ml de réactif stanneux ; on mélange et on attend 5 minutes ; on place les tubes dans un bain d'eau glacée et on ajoute doucement 4 ml de H₂SO₄ concentré. On bouche les tubes (pyrex à rodage en verre) et on mélange intimement. Puis on ajoute en chambre obscure, en s'aidant d'un éclairage monochromatique rouge, 2 gouttes de réactif chromotrope. On mélange et on porte 30 minutes au bain-marie bouillant à l'obscurité. On refroidit les tubes et on ajuste à 10 ml avec de l'eau bidistillée ; on lit contre le blanc à 578 millimicrons ; (le blanc est toujours légèrement coloré, mais sa densité optique doit rester inférieure à 0,1).

Pour le calcul on se reporte à la courbe étalon, en tenant compte du fait que l'on n'utilise que le 1/5^m de la prise lipidique de départ.

Les résultats sont exprimés en micromoles de glycérol.

Il est utile d'apprécier les quantités pondérales de glycérides présents dans un poids donné de lipides. La transformation est aisée car :

— Une micromole de glycérol représente 0,092 mg, la transformation des poids de glycérol en poids de triglycérides fait intervenir un coefficient multiplicateur voisin de 9,6 (9,66 pour la trioléine). La transformation des micromoles de glycérol en milligrammes de triglycérides se fera donc à l'aide d'un coefficient multiplicateur de 0,883. Il est évident que ce calcul ne peut être qu'approximatif, il n'y a donc guère d'inconvénient à arrondir à 0,9.

Il est important de signaler que cette méthode est très délicate.

d) Dosage des acides gras libres

1° Extraction

HORSTEIN et Coll. (168) utilisent l'amberlite IRA 400, pour extraire les acides gras libres des extraits lipidiques ; toutefois BOTTCHER et Coll. (169) préfèrent ,après élimination des phosphatides par chromatographie sur colonne d'acide silicique, émulsionner l'éluat avec une solution aqueuse de potasse de façon à transformer les acides gras libres en savons alcalins *hydrosolubles*.

Nous utilisons, soit le procédé précédent, soit un fractionnement chromatographique sur colonne d'acide silicique, puis sur colonne d'alumine (techniques précédemment exposées).

2° Dosage

Différentes méthodes sont utilisables et en particulier, les méthodes utilisant la neutralisation par une solution basique titrée (DOLE (170)).

Nous avons préféré utiliser une méthode colorimétrique très sensible, que nous avons expérimentée à l'occasion d'un précédent travail sur les lipides sanguins (WAREMBOURG et Coll. (171)).

Principe :

Nous avons, à la suite de BARRETO et MANO (172), utilisé une technique colorimétrique suggérée par BLIGH et DYER (173), fondée sur la formation de savons de cuivre. Ces savons mis en contact avec une solution de diéthylldithiocarbamate de sodium développent une coloration jaune que l'on apprécie au spectrophotomètre. Cette méthode ne dose pas les acides ayant moins de DIX atomes de carbone. Nous éliminons d'autre part comme nous l'avons déjà indiqué les phosphatides par chromatographie, car, d'après SVANBORG et SVENNERHOLM (174) leur présence perturbe les dosages.

Réactifs :

1° Solution de sulfate de cuivre à 10 % ;

2° Ammoniaque 0,25 N ;

3° « Réactif carbamique » :

Diéthylldithiocarbamate de sodium ...	1 g
Alcool <i>absolu</i> q.s.q.	100 ml

4° Solution étalon d'acide palmitique 0,002 M :

Acide palmitique	51,2 mg
Chloroforme q.s.p.	100 ml

Courbe d'étalonnage :

Il y a proportionnalité entre les densités optiques et les concentrations, pour des prises d'essai allant de 0,4 à 4 micromoles et plus ; c'est pourquoi nous préférons introduire systématiquement un tube étalon dans chaque série de dosages.

Dosage :

Une fraction aliquote convenable de l'éluat chromatographique contenant les lipides non phosphorés est évaporée à sec ; 1 ml de solution étalon est également évaporé à sec.

Les lipides sont dissous dans 6 ml du mélange chloroforme-méthanol (1 : 2) (vol/vol). On prépare un blanc avec 6 ml de solvant pur. On ajoute dans tous les tubes 1,6 ml du mélange :

CuSO ₄ à 10 %	5 volumes
NH ₄ OH 0,25 N	95 volumes

On agite énergiquement deux minutes. On ajoute 2 ml de chloroforme et on agite 30 secondes. On ajoute 2 ml d'NH₄OH 0,25 N et on agite 30 secondes. On centrifuge 5 minutes à 3.500 tours/minute et on prélève (à la seringue de précision, munie d'une fine aiguille qu'on introduit rapidement au fond du tube), 2 ml de la phase chloroformique sous-jacente, qui sont déposés dans un tube à analyse. On ajoute 1 ml de réactif carbamique, on ajuste à 10 ml avec du chloroforme et on lit contre le blanc au spectrophotomètre à 430 millimicrons.

Il importe d'utiliser un réactif carbamique anhydre car la présence d'eau conduit à des solutions opalescentes.

Calculs :

Taux en micromoles dans la prise d'essai :

$$2. \quad \frac{\text{Densité optique du dosage}}{\text{Densité optique de l'étalon}}$$

Taux en milligrammes dans la prise d'essai :

$$0,512. \quad \frac{\text{Densité optique du dosage}}{\text{Densité optique de l'étalon}}$$

e) Méthode de dosage du phosphore lipidique

A l'exception de quelques composés mineurs, chaque molécule de phosphatide contient un atome de phosphore et SCHMIDT (175) conseille l'usage d'un coefficient multiplicateur de 25 pour transformer le taux de phosphore en taux de phosphatides.

Le dosage peut s'effectuer soit sur l'extrait lipidique, soit sur les phospholipides.

Il convient tout d'abord de procéder à la minéralisation des lipides. Diverses techniques ont été proposées.

Les unes utilisent l'acide sulfurique et l'eau oxygénée, (FISKE et SUBBAROW (176), DELSAL et MANHOURI (177), ALLEN (178)), ou l'acide sulfurique et l'acide nitrique. Les autres utilisent une minéralisation perchlorique (KING (179), SPERRY (180), ZILVERSMIT (181-182)). Nous utilisons une variante de ces dernières méthodes.

Différents modes de dosage du phosphore sont possibles. Nous utilisons une adaptation de la méthode de BRIGGS (183).

Principe :

Le phosphore est transformé en complexe phosphomolybdique. Ce complexe est ensuite réduit, par le sulfite de sodium et l'hydroquinone, à l'état de sous-oxydes de molybdène dont la teinte bleue intense se prête à un dosage spectrophotométrique.

Réactifs :

- 1° Acide sulfurique concentré ;
- 2° Mélange nitro-perchlorique :

Acide nitrique concentré	1 volume
Acide perchlorique concentré	1 volume
- 3° Réactif molybdique :

Molybdate d'ammonium	5 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml
- 4° Solution aqueuse de sulfite de sodium à 20 % ;
- 5° Solution d'hydroquinone fraîchement préparée :

Hydroquinone pure	0,5 g
Eau distillée	100 ml
Acide sulfurique	1 goutte
- 6° Solution étalon de phosphore à 100 mg/litre

Phosphate monopotassique	43,9 mg
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Technique :

On introduit les lipides en solution chloroformique dans un tube en pyrex. Après évaporation, on ajoute 0,2 ml d'acide sulfurique. On carbonise doucement sur une petite flamme et on ajoute une goutte de réactif nitro-perchlorique ; il se produit une vive effervescence, et un chauffage doux fait passer la teinte du noir au marron foncé.

Il importe de cesser le chauffage dès l'apparition de fumées blanches qui traduisent la transformation de l'acide sulfurique en SO_3 dont le dégagement constituerait une perte en acide et risquerait d'entraîner une partie de phosphore.

On répète l'addition de réactif, autant de fois qu'il est nécessaire pour parvenir à une décoloration totale, en évitant toutefois une surcharge trop importante qui pourrait perturber les dosages.

A chaud, le mélange peut conserver une légère teinte jaune canari due à l'acide perchlorique, mais celle-ci disparaît par refroidissement.

Normalement l'opération ne demande que quelques minutes.

Dès refroidissement on complète à 6 ml avec de l'eau distillée ; lorsque la minéralisation dure plus de quelques minutes, il est nécessaire de porter le mélange 15 minutes au bain-marie bouillant pour décomposer l'acide pyrophosphorique éventuellement formé.

On prépare un blanc avec 6 ml d'eau distillée, et un étalon contenant 0,2 ml d'acide sulfurique, 0,3 ml de solution étalon et 5,5 ml d'eau distillée. Dans tous les tubes on ajoute 2 ml du réactif molybdique, on mélange et

on ajoute 1 ml de sulfite de sodium et 1 ml de solution d'hydroquinone. On place 30 minutes à l'obscurité et on lit au spectrophotomètre contre le blanc à 660 millimicrons.

Calcul :

Taux de phosphore en mg dans la prise d'essai :

$$0,03 : \frac{\text{Densité optique du dosage}}{\text{Densité optique de l'étalon}}$$

f) Dosage des sphingomyélines

La méthode précédente est utilisable pour le dosage des phosphatides totaux ou d'un constituant séparé par chromatographie ; toutefois, une technique particulière, nous a permis de doser les *sphingomyélines* sans chromatographie.

Ce dosage est fondé sur le fait que les sphingomyélines, ne sont pas, à l'encontre des autres phosphatides, altérées par une hydrolyse alcaline ménagée.

Parmi les études faites, nous citerons celles de SCHMIDT et BENOTTI (184), ANSELL (185), VAN HANDEL (186). Nous utilisons une adaptation de la méthode de ANSELL.

Réactifs :

- 1°) Solution normale de soude.
- 2°) Acide chlorhydrique dilué au 1/2.
- 3°) Acide trichloracétique à 10 % et à 2 %.
- 4°) Mélange volume à volume de chloroforme et de méthanol.

Technique :

Une fraction convenable d'extrait lipidique sec est émulsionnée dans 5 ml de solution de soude. Après 24 heures d'étuve à 37°, on neutralise par l'acide chlorhydrique. On ajoute 5,9 ml d'acide trichloracétique à 10 % et on porte deux heures à 4° environ.

Un précipité est récupéré par filtration et lavé avec de l'acide trichloracétique à 2 % jusqu'à disparition des chlorures. On dissout le précipité de sphingomyélines directement sur le filtre dans le mélange chloroforme-méthanol bouillant. Après évaporation du solvant, on procède à la minéralisation et au dosage du phosphore.

V. — MÉTHODES D'ANALYSE DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DE DIFFÉRENTES CLASSES DE LIPIDES

a) Exposé des principales méthodes utilisables

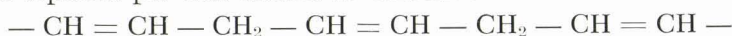
Un premier approche de la question, consiste en la détermination du nombre de doubles liaisons des acides gras.

Cette méthode, connue sous la dénomination de « *détermination de l'indice d'iode* », consiste à mettre en présence les lipides à étudier et un

réactif halogénant ; chaque double liaison est capable de fixer deux atomes d'halogène.

Parmi les techniques proposées, nous citerons celle décrite par YASUDA (187) et celle de WIJS (188).

Depuis, des méthodes plus perfectionnées ont été utilisées. MICHALEC (189) utilise la chromatographie sur papier en phase inversée. KAUFMANN (190, 191) sépare les acides gras, par chromatographie sur papier imprégné d'hydrocarbure. La chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine, est utilisée par DUTTON (192). RIEMENSCHNEIDER (193) utilise, l'acide silicique. Nous citerons également la chromatographie sur poudre de caoutchouc (BOLDINGH (194)), HERB et RIEMENSCHNEIDER (195) utilisent le procédé dit de l'*isomérisation alcaline* des acides gras polyinsaturés. En effet, les acides insaturés naturels, ont leurs doubles liaisons séparées par trois atomes de carbone :



Or les acides polyinsaturés se présentant dans le système conjugué :



donnent des bandes d'absorption intenses et caractéristiques dans la région des longueurs d'ondes allant de 200 à 400 millimicrons.

La migration des doubles liaisons s'obtient par chauffage à 180° avec une solution de potasse dans l'éthylène-glycol.

Les lectures se font à

233 268 315 346 375 millimicrons

et permettent, à partir de la connaissance de coefficients d'extinction spécifiques d'acides à 2, 3, 4, 5 et 6 doubles liaisons pour les longueurs d'ondes envisagées, de déterminer dans un mélange le pourcentage des divers acides polyinsaturés.

Toutefois, ces réactions aboutissent à des équilibres d'où l'importance des conditions opératoires. De plus, seul l'acide présentant 6 doubles liaisons est mesurable directement à 375 millimicrons. Enfin, la méthode n'est valable qu'en l'absence de doubles liaisons « trans » (HERB et Coll. (196)).

C'est pourquoi, cette méthode a finalement cédé devant les techniques modernes de la chromatographie en phase vapeur, de MARTIN et SYNGE (197).

b) Chromatographie en phase vapeur

1° Généralités

Les premiers travaux furent ceux de JAMES et MARTIN (198) et concernaient les acides gras inférieurs.

D'autres essais furent faits sur un polyester traité à l'acide phosphorique d'après METCALFE (199). Mais il est difficile d'obtenir de bonnes séparations lorsqu'on opère sur les acides gras libres.

Un progrès important fut réalisé lorsque CROPPER et HEYWOOD (200) introduisirent l'emploi des esters méthyliques d'acides gras plus volatils et non dimérisables. JAMES et MARTIN (201), BEERTHUIS et KEPPLER (202), BEERTHUIS et KEPPLER (203) et KEPPLER (204), mon-

trèrent qu'il était possible de détecter des acides à 26 et 30 atomes de carbone.

L'huile de paraffine, le dioctyl-phtalate, le benzyl-diphényl, furent utilisés dans la séparation des acides gras inférieurs, à des températures inférieures à 100° par JAMES et MARTIN (205). Ces mêmes auteurs, séparèrent, sur graisse APIEZON M à 197°C., les esters méthyliques d'acides gras ; les temps de rétention sont élevés (95 minutes pour le stéarate de méthyle sur colonne de 120 cm). DIJKSTRA (206) opérant à 230° sur colonne à base de graisse de silicone put ramener ce temps à 25 minutes.

A côté de ces phases stationnaires apolaires, dont le nombre est assez limité, il a été fait usage d'un nombre croissant de *phases stationnaires polaires* constituées par des polyesters. Nous citerons ORR et CALLEN (207 et 208), CRAIG et MURTY (209) qui utilisent le Reoplex 400 à 240°, LIPSKY (210) qui utilise des polyesters d'acide adipique et d'éthylène-glycol, dénommés : LAC-1-R 296 et LAC-2-R 446, JAMES (211) qui utilise l'adipate de polyéthylène-glycol à 175°, LIPSKY (212) qui utilise un succinate de polydiéthylène-glycol.

2°) Comparaison entre les phases polaires et apolaires

— *Sur phase apolaire*, les temps de rétention croissent avec la longueur des chaînes. Mais, à nombre égal de carbones, les acides gras insaturés sortent avant les saturés et d'autant plus vite que le nombre de doubles liaisons est plus important. C'est ainsi que l'ordre de sortie des acides gras à 18 atomes de carbone est :

Acide linoléique
Acide oléique
Acide stéarique.

De plus, à nombre de carbones et de doubles liaisons égaux, les temps de rétention sont d'autant plus courts que les doubles liaisons sont plus proches du groupement carboxylique.

Enfin, les acides insaturés à configuration CIS, se meuvent plus rapidement que les mêmes acides à configuration TRANS.

— *Sur phase polaire*, les temps de rétention sont nettement plus faibles, à même température, du fait de la moindre importance des forces de VAN DER WAALS entre solvant et soluté ; ceux-ci ayant des constitutions chimiques voisines. Cette constatation est importante car, elle permet :

- soit d'obtenir des chromatogrammes complets en des temps plus courts,
- soit de réduire les températures d'emploi.

A l'inverse de ce qui se passe sur phase apolaire, les polyesters retiennent davantage les acides insaturés du fait d'interactions plus importantes.

C'est ainsi que l'ordre de sortie des acides à 18 atomes de carbone sera :

Acide stéarique	saturé
Acide oléique	monoèneique
Acide linoléique	dièneique
Acide linoléique	trièneique

La position des doubles liaisons et la configuration CIS ou TRANS sont sans influence.

Un inconvénient majeur des polyesters, consiste en leur instabilité thermique et il est indispensable d'en tenir compte lors du choix d'une phase stationnaire polaire et de la température d'utilisation.

En conclusion : on peut admettre que les deux sortes de phases stationnaires ont leurs avantages et leurs inconvénients.

Les premières séparent modérément les acides stéarique et oléique, mais parfaitement les acides oléique et linoléique ; tandis que les secondes séparent très bien les acides stéarique et oléique, mais mal les acides oléique et linoléique, et ne séparent pas les acides linoléique et linolénique.

Signalons enfin l'usage de colonnes capillaires dont les parois internes sont recouvertes d'un film de phase stationnaire. LIPSKY (213) obtint d'excellentes séparations d'esters d'acides gras allant de C_8 à C_{24} sur une colonne de 60 m enduite d'APIEZON L.

Du point de vue pratique, l'étude par chromatographie en phase gazeuse des acides gras nécessite un travail préparatoire de libération des acides puis de méthylation.

3°) Méthodes de méthylation

α) Méthode par interestérification

Les lipides sont traités par un réactif qui réalise le transfert des acides gras estérifiant le glycérol sur le méthanol (esters méthyliques d'acides gras).

STOFFEL (214) utilise une solution méthanolique de gaz chlorhydrique, et purifie les esters par microsublimation. LUDDY et Coll. (215) utilisent le méthanol-méthoxyde de sodium et purifient les esters par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Ces techniques ont l'avantage de prévenir les isomérisations par changement de position des liaisons éthéniques.

β) Méthode par méthylation directe des sels d'acides gras

Nous citerons la technique proposée par DOWNING et Coll. (216) à partir des sels de calcium.

γ) Méthodes par méthylation des acides gras libres

Ces méthodes nécessitent une saponification préalable des lipides. Les acides gras sont ensuite libérés des savons par acidification.

Divers procédés de méthylation sont possibles :

— Par le méthanol-chlorhydrique ou sulfurique au bain-marie à 90° C, quelques heures sous réfrigérant à reflux.

— Par le diazométhane de SCHLENK et GELLERMAN (217) mais la technique est délicate et dangereuse.

— Par le trifluorure de bore d'après METCALFE et SCHMITZ (218); il s'agit d'une technique simple, rapide et efficace.

4°) Méthode personnelle de préparation des esters méthyliques

α) Libération des acides gras

Réactif de saponification :

potasse pure (pastilles) : 5 g

eau distillée : le minimum nécessaire pour dissoudre

éthanol absolu q.s.q. : 100 ml

Les lipides secs sont émulsionnés dans un minimum de 40 fois leur poids de potasse éthanolique (nous utilisons systématiquement 10 ml pour les quelques milligrammes de lipides présents dans nos préparations). On ajoute un antioxydant comme l'hydroquinone à une concentration d'environ 2% du poids de lipides. La saponification est opérée sous réfrigérant à reflux pendant 2 heures au bain-marie à 90° C. Dès refroidissement, on ajoute 10 ml d'éther de pétrole (P.E. 35-70°), et une quantité suffisante d'eau distillée pour former deux phases. Après agitation et séparation, on récupère la phase aqueuse inférieure contenant les savons alcalins solubles. On lave celle-ci deux fois à l'éther de pétrole et on acidifie à $\text{pH} = 1$ par l'acide chlorhydrique 5 N. Les acides gras sont récupérés par agitation avec de l'éther éthylique. L'extraire éthéré est lavé à l'eau puis déshydraté sur sulfate de sodium anhydre et évaporé à sec sous courant d'azote.

β) Méthylation des acides gras

Réactif :

Nous utilisons le réactif au trifluorure de bore préconisé par MET-CALFE (219).

Le trifluorure de bore gazeux est absorbé par barbotage dans un litre de méthanol *absolu* refroidi en eau glacée.

L'opération est arrêtée lorsque l'augmentation de poids est de 125 g. Ce réactif se conserve plusieurs mois en flacon bouché émeri.

Technique :

On ajoute 3 ml de réactif et on porte 2 à 3 minutes au bain-marie bouillant, en remuant et en s'aidant d'un réfrigérant à air, pour éviter une évaporation massive.

Lorsque les acides présents ont plus de 10 atomes de carbone (cas habituel), la récupération des esters s'opère en ajoutant, dès refroidissement :

Ether de pétrole (P.E. 40-60°) pur redistillé : 10 ml à 30 ml.

Eau distillée : 20 ml,

on agite et on récupère la phase étherée qui est lavée à l'eau distillée. On filtre et on évapore à sec au bain-marie à 60° C.

Les esters méthyliques peuvent être utilisés tels que pour la chromatographie en phase gazeuse.

Mais dans certains cas, nous utilisons une méthode de purification par chromatographie en couche mince proposée par RUGGIERI (220). Le solvant de migration utilisé, est le suivant :

Hexane	85 volumes
Ether éthylique	15 volumes
Acide acétique	1 volume

Les esters sont déposés en solution chloroformique.

Dans ce système, les esters méthyliques ont un R_F élevé contrairement au matériel contaminant (résidus de cholestérol ou éventuels acides gras ayant échappé à la méthylation).

Après une révélation partielle par la rhodamine 6 G, la partie intéressante est récupérée par grattage, et les esters sont élués avec du méthanol.

5°) Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques.

α Principe général

Un courant gazeux déterminé par une pression réglée par valves de précision, traverse à débit constant, une colonne remplie d'un support pulvérulent imprégné de la phase stationnaire ; une enceinte thermostatée, maintient la colonne à une température déterminée.

A la sortie, un système de détection, enregistre une propriété physique du gaz ; celle-ci est en général transformée en signal électrique, amplifié électroniquement et transmis à un appareil enregistreur.

Les produits à chromatographier, sont introduits à l'entrée de la colonne et entraînés, après vaporisation par le courant gazeux.

β) Technique utilisée

Nous utilisons soit le chromatographe « universel SHANDON » soit le chromatographe « FB₄ SHANDON » ; les caractéristiques de ce dernier sont les suivantes :

— Le gaz vecteur est l'azote introduit à une pression voisine de 2,3 kg/cm², la pression de sortie étant la pression atmosphérique ; dans ces conditions le débit se situe entre 40 et 60 ml/min.

— Les colonnes sont hélicoïdales et constituées par un tube cylindrique en acier inoxydable de 2 m de long et 2 mm de diamètre intérieur.

— Les phases stationnaires sont l'adipate ou le succinate de polydiéthylène-glycol distribués à raison de 20 % environ sur le chromosorb W (80 - 100 mesh) ou le Sil-O-Cel (60 - 100 mesh).

— Le chauffage est du type à air chaud et la température d'utilisation est de 185° ± 0,5.

— Les esters sont introduits en solution dans l'hexane ou le benzène, à l'aide d'une micro-seringue (à raison de 0,3 à 1 microlitre d'une solution d'esters à environ 10 % de concentration (poids/vol.) ; un dispositif de préchauffage maintient la chambre d'introduction à une température voisine de 300°.

— Le détecteur est du type à ionisation de flamme ; il comporte deux électrodes entre lesquelles est établie une différence de potentiel de 300 volts ; le brûleur capillaire n'est pas électrifié ce qui permet d'obtenir une grande stabilité de la ligne de base sur l'enregistreur ; le poids mini-

mum de matériel détectable est de 10^{-7} grammes ; l'hydrogène nécessaire à l'alimentation de la flamme est utilisé à une pression de $0,1 \text{ kg/cm}^2$ et est mélangé au gaz vecteur dans une cavité ménagée sous le brûleur à la sortie de la colonne ; la combustion est entretenue grâce à une circulation d'air régulée ; celui-ci provient d'une bouteille d'air comprimé et est utilisée à une pression de 1 kg/cm^2 .

VI. — ÉTUDES ÉLECTROPHORÉTIQUES DES LIPOPROTÉINES

Nous utilisons l'électrophorèse sur papier avec un appareil à évaporation (type GRASSMANN et HANNIG).

Les migrations sont faites en tampon véronal acide-véronal sodique de $\text{pH} = 8,6$ et de force ionique $= 0,1$.

Après migration les bandes sont séchées et colorées par l'une des méthodes suivantes :

a) Coloration des protéines

Nous utilisons le vert de lissamine préconisé par GORRINGE (221).

Les bandes sont plongées 15 minutes dans la solution :

Vert de Lissamine	7,5 g
Acide acétique à 15 %	1 000 ml

La décoloration du fond s'obtient dans des bains d'acide acétique à 2 %.

b) Coloration des lipoprotéines

Nous utilisons le NOIR CEROL B, préconisé par SWAHN (222) et par HAAG (223) en solution saturée ; le réactif est préparé par ébullition pendant 45 minutes sous réfrigérant à reflux, d'un excès de colorant dispersé dans l'alcool éthylique à 60 %. Ce réactif doit être fraîchement préparé et filtré avant usage (BISERTE et HAVEZ (224)). Les bandes sont plongées pendant 30 à 40 minutes dans le colorant. Le fond est partiellement décoloré par passage rapide dans deux bains d'alcool éthylique à 50 %. Les fractions lipidiques apparaissent en noir sur fond gris-noir.

c) Coloration des glycoprotéines

Nous utilisons la méthode de HOTCHKISS et Mc MANUS, modifiée par CERIOTTI (225).

Les bandes sont séchées et fixées 30 minutes dans le mélange :

Ethanol absolu.....	60 volumes
Chloroforme	30 volumes
Acide acétique	10 volumes

Après séchage, les bandes sont immergées 10 minutes dans une solution d'acide periodique à 0,5 g %. On opère alors un lavage à l'eau distillée.

On plonge les bandes dans une solution fraîche de réactif de SCHIFF. On lave 2 à 3 minutes dans quatre bains successifs d'une solution sulfureuse extemporanée obtenue en mélangeant :

Thiosulfate de sodium à 10 % ...	15 volumes
Acide trichloracétique normal ...	15 volumes
Eau courante, q.s.p.	200 volumes

Les bandes sont passées dans 3 bains d'acétone anhydre à 1 % d'acide trichloracétique. On termine par un séchage à l'air froid.

Les glycoprotéines apparaissent en violet sur fond blanc (ou légèrement rosé).

d) Coloration au bleu alcian

Ce colorant est habituellement utilisé pour la révélation des mucopolysaccharides acides (RIZZOLI) (226).

Nous utilisons la technique décrite par HEREMANS et VAERMAN (227).

Les bandes sont colorées pendant 5 minutes dans le mélange :

Bleu Alcian	10 g
Acide acétique	900 ml
Eau	100 ml

La décoloration du fond s'obtient en alternant quatre rinçages de une minute à l'eau courante avec quatre rinçages de 5 minutes à l'acide acétique pur.

On termine par un rinçage à l'eau courante.

e) Révélation des phosphoprotéines

Nous utilisons la méthode de révélation des esters phosphoriques de HANES et ISHERWOOD (228) modifiée comme suit par BURROWS et Coll. (229) :

Les bandes sont trempées dans le réactif suivant :

Molybdate d'ammonium	10 g
Eau distillée	80 ml
HCl concentré	30 ml
Acide perchlorique concentré	30 ml
Acétone pure, q.s.p.	1 000 ml

Les bandes sont placées une minute à l'étuve à 85° puis exposées à l'action des rayons ultra-violetts d'une lampe germicide « General Electric » pendant 10 minutes à 10 cm de distance.

Les phosphoprotéines se révèlent en bleu sur fond blanc ou jaunâtre (BANDŪRSKI et AXELROD) (230).

Par la suite, la totalité du papier bleuit, et les bandes protéiques révélées sont masquées.

TROISIÈME PARTIE

Travaux personnels

INTRODUCTION

Comme nous l'avons déjà indiqué, la composition lipidique générale du jaune d'œuf est connue. Toutefois, certains points restent imprécis : la présence de stérides est incertaine, celle de monoglycérides, de diglycérides et d'acides gras libres n'est pas signalée.

Il nous a donc semblé utile d'étudier ces points particuliers par des méthodes modernes telles que la chromatographie en couche mince. Comme d'autre part, les auteurs cités ne sont pas d'accord quant à la composition en acides gras des diverses fractions lipidiques, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'appliquer nos techniques habituelles de chromatographie en phase gazeuse.

Cette étude *statique* demandait à être complétée par une étude *dynamique* permettant d'aborder la question du rôle et de la destinée des différents lipides durant le développement de l'embryon ; en effet, les travaux publiés, n'abordent — incomplètement d'ailleurs — que la destinée de quelques composants majeurs et en particulier des phosphatides.

Nous avons donc essayé de faire une étude aussi complète que possible, durant un cycle d'incubation, des lipides du jaune résiduel de l'embryon.

I. — ÉTUDE GÉNÉRALE DE LA COMPOSITION DU JAUNE D'ŒUF DE POULE

A. — COMPOSITION LIPIDIQUE GLOBALE

Dans nos travaux concernant l'œuf mis en incubation, nous nous sommes attachés à utiliser des œufs de provenance d'un même élevage et fournis par une même race de poules. Par contre, pour les études statiques, nous avons préféré faire des mélanges de façon à obtenir des résultats concernant l'œuf de poule en général.

1° Etude de la composition globale

En utilisant les méthodes de dosage citées dans la deuxième partie, nous pouvons présenter la composition globale obtenue à partir des résultats de toutes nos séries de dosages, chaque série représentant un mélange de plusieurs jaunes.

Nous avons dosé le cholestérol libre, le glycérol (et les glycérides), le phosphore lipidique (et les phosphatides), les acides gras libres et les acides gras estérifiés et déterminé le pourcentage des sphingomyélines dans les phosphatides ; les résultats sont rassemblés dans le tableau X.

2° Identification et recherche d'acides gras libres

Pour confirmer la présence de ces acides gras libres, nous avons utilisé une technique d'extraction directe décrite par BÖTTCHER (23) et dont le protocole a déjà été exposé ; les acides sont étudiés de deux façons :

— Par chromatographie en couche mince de gel de silice, dans chacun des deux systèmes de solvants utilisés pour la chromatographie des lipides neutres et des lipides polaires (voir deuxième partie) ; dans ces systèmes les acides gras migrent sans se séparer ; ces études, faite simultanément sur des étalons de référence, montrent un comportement identique, de ceux-ci et de l'extrait.

— Par dépôt de ce même extrait en tache compacte sur papier filtre ; après séchage, le papier est plongé pendant 45 minutes dans une solution aqueuse d'acétate de cuivre obtenue par dilution au 1/25^{me} d'une solution mère saturée ; un lavage soigneux à l'eau courante élimine l'excès d'acétate et la feuille est plongée dans une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 1,25 g %. Il se développe une coloration brune caractéristique et spécifique, due à l'action du ferrocyanure sur les savons de cuivre formés (PERILÄ) (232), (WAGNER et Coll.) (233).

TABLEAU X

Composition lipidique moyenne du jaune d'œuf
(en mg ou en μ mole pour 100 mg de lipides)

	MOYENNE		ECART TYPE	
	(en mg %)	(en μ mole %)	(en mg)	(en μ mole)
Cholestérol total	4,3		0,2	
Glycérol	6,5		0,5	
Glycérides *	61,7		5	
Acides gras libres ***	0,4	1,6		
Phosphore lipidique ..	1,22		0,065	
Phosphatides **	30,5		1,5	
Phosphore des sphingomyélines	0,047		0,003	
Acides gras estérifiés..		257		7

L'établissement du rapport phosphore des sphingomyélines sur phosphore total montre que les *sphingomyélines* représentent 3,8 % des *phosphatides totaux*.

* : Coefficient utilisé pour passer du glycérol aux glycérides : 9,5.

** : Coefficient utilisé pour passer du phosphore lipidique aux phosphatides : 25.

*** : Le dosage a été effectué sur une quantité importante de lipides (75 à 80 mg).

La présence d'acides gras libres dans le jaune semble donc démontrée.

3° Recherche des composés mineurs de la fraction neutre des lipides du jaune ; dosage des stérides

La présence de cholestérol estérifié étant controversé (les taux indiqués par les différents auteurs varient de 0 à 1 % des lipides neutres), nous avons essayé de trouver des méthodes permettant de résoudre ce problème.

— Dans un premier temps, nous avons procédé au dosage direct sur d'importantes quantités de lipides, après élimination du cholestérol libre par précipitation digitonique ; il ne fut en aucun cas possible de mettre en évidence la présence de stérides par la réaction de LIEBERMANN (234).

Cet échec pouvait être imputé :

- soit à l'absence de stérides,
- soit à un défaut de sensibilité de la méthode.

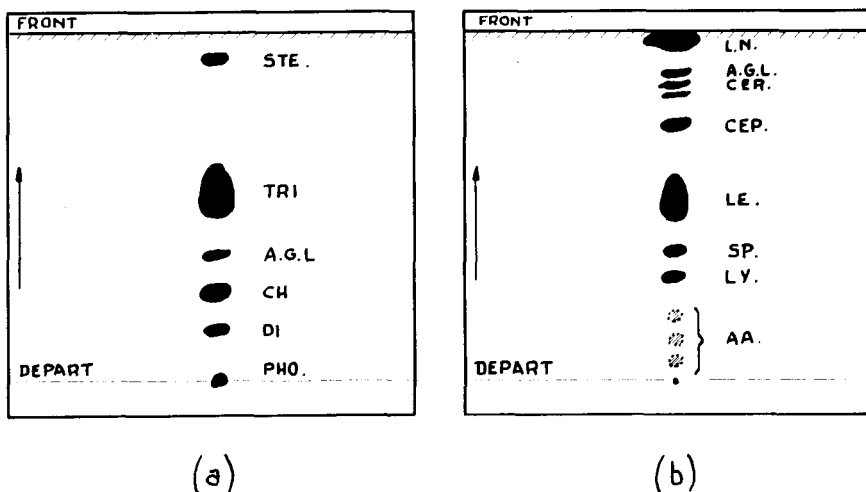
— Dans un deuxième temps, nous avons cherché à obtenir une confirmation visuelle de la présence de stérides en utilisant la chromatographie en couche mince des lipides neutres.

Outre la présence déjà connue de triglycérides, des acides gras libres et du cholestérol libre, la méthode permet de mettre en évidence, des *stérides* (de migration rapide) et un composé lent très voisin du cholestérol libre et ayant le comportement chromatographique des diglycérides (schéma n° 1 - a).

On peut donc conclure à la *présence certaine de stérides*, identifiés par des migrations parallèles d'étalons de référence et par une coloration spécifique sur plaque donnée par le cholestérol libre et le cholestérol estérifié (voir deuxième partie). On peut également conclure à la *présence probable de diglycérides*, identifiés par des migrations parallèles d'étalons de référence.

SCHÉMA 1

Chromatographie en couche mince des lipides du jaune



STE. : Stérides
 TRI. : Triglycérides
 A.G.L. : Acides gras libres
 CH. : Cholestérol
 DI. : Diglycérides
 PHO. : Phosphatides

L.N. : Lipides neutres
 CER. : Cérébrosides
 CEP. : Céphalines
 LE. : Lécithines
 SP. : Sphingomyélines
 LY. : Lysolécithines
 AA. : Aminoacides

— La présence d'une tache de stérides parfaitement séparée du reste des lipides neutres, nous a permis de mettre au point une méthode simple de dosage ; nous déposons en traînée sur toute la largeur de la couche mince de gel de silice, une quantité importante de lipides totaux (70 mg environ). Après migration dans le système solvant utilisé pour la chromatographie des lipides neutres, la fraction stéridique est localisée par révélation de deux bandes latérales.

La partie correspondante de gel est grattée et la poudre dispersée dans 10 ml de chloroforme ; après agitation et repos une nuit, le chloroforme est décanté et le résidu est lavé avec quelques millilitres de chloroforme

neuf ; les extraits sont rassemblés, évaporés et le cholestérol est dosé sur la totalité du résidu, en utilisant de préférence un ester de cholestérol (stéarate ou palmitate) comme étalon, car le cholestérol libre et le cholestérol estérifié n'ont pas la même intensité de coloration ni la même cinétique de réaction.

Les résultats furent les suivants :

Cholestérol estérifié (*)... $0,2 \pm 0,03$ mg/100 mg de lipides

Stérides $0,34 \pm 0,05$ mg/100 mg de lipides

Le rapport $\frac{\text{cholestérol estérifié}}{\text{cholestérol total}}$ est donc très faible (4,6 %).

4° Etude des phosphatides du jaune

a) Technique par chromatographie en couche mince

La chromatographie effectuée dans le système solvant chloroforme-méthanol-eau, 65 : 25 : 4 (vol/vol) permet de mettre en évidence par ordre de vitesse de migration décroissante (schéma n° 1 - b) :

— L'ensemble des lipides neutres (si l'on est parti de l'extrait lipidique total).

— Une à trois fractions mineures voisines probablement constituées de *cérébrosides* et d'*acides gras libres*.

— Une fraction *céphalinique* importante.

— Une fraction *lécithinique* très importante.

— Une fraction mineure de *sphingomyélines*.

— Une fraction également mineure de lysolécithines.

— Deux ou trois composés minimes constitués par des amino-acides libres.

— Signalons qu'il est possible, dans certains cas, de mettre en évidence une tache intermédiaire entre les *lécithines* et les *sphingomyélines* et qui correspond aux *lysocéphalines*.

La technique se prête à des dosages quantitatifs ; pour cela, les lipides sont déposés en trainée à raison de 3 à 4 mg sur toute la largeur de plaque ; après migration et révélation partielle à la rhodamine, les lipides sont groupés en trois fractions constituées par les *céphalines*, les *lécithines* et l'ensemble des *sphingomyélines* et des *lysolécithines*.

Les parties correspondantes sont grattées et éluées avec 5 ml de mélange chloroforme-méthanol 2 : 1 (vol/vol) : après quelques heures de contact avec agitations intermittentes, on décante le solvant et on complète l'extraction deux fois avec 5 ml de méthanol. Les extraits correspondants sont rassemblés, évaporés et minéralisés de façon à procéder au dosage du phosphore lipidique.

Les pourcentages moyens des trois groupes sont les suivants :

Phosphore des *céphalines* 22 %

(*) La transformation du cholestérol estérifié en stérides peut se faire approximativement à l'aide d'un coefficient multiplicateur de 1,7 qui tient compte de la masse moléculaire moyenne des acides gras estérifiant le cholestérol.

Phosphore des lécithines	68 %
Phosphore de l'ensemble des sphingomyélines et des lysolécithines	10 %

Si l'on tient compte du fait que les sphingomyélines représentent environ 4 % des phosphatides, on aboutit à la composition suivante :

Céphalines	22 % des phosphatides
Lécithines	68 % des phosphatides
Sphingomyélines	4 % des phosphatides
Lysolécithines	6 % des phosphatides

b) Technique par chromatographie sur colonne d'acide silicique

La technique utilisée, est celle décrite dans la deuxième partie.

Le couplage de la chromatographie sur colonne et de la chromatographie en couche mince de gel de silice (*), permet de décrire les résultats suivants :

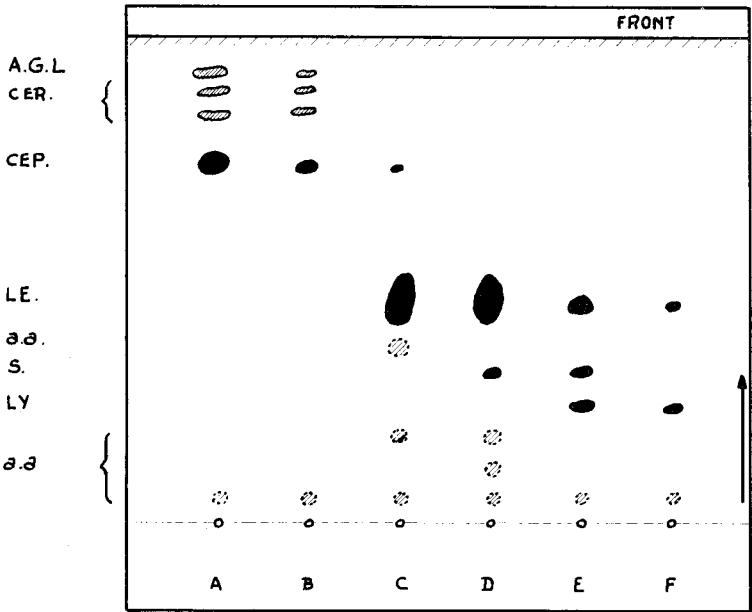
ELUANT	LIPIDES ELUES	OBSERVATIONS
Chloroforme-méthanol 12 : 1 (vol/vol)	Lipides neutres	Eventuels
Chloroforme-méthanol 7 : 1 (vol/vol)	Cérébrosides Acides gras libres <i>Céphalines</i>	
Chloroforme-méthanol 4 : 1 (vol/vol)	{ Cérébrosides Acides gras libres } <i>Céphalines</i>	Fin de l'élution
Chloroforme-méthanol 3 : 2 (vol/vol)	<i>Céphalines</i> <i>Lécithines</i>	Traces
Chloroforme-méthanol 5 : 4 (vol/vol)	<i>Lécithines</i> Sphingomyélines	Traces éventuelles
Chloroforme-méthanol 1 : 1 (vol/vol)	Lécithines <i>Sphingomyélines</i> <i>Lysolécithines</i>	Traces
Méthanol pur	Lécithines <i>Sphingomyélines</i> <i>Lysolécithines</i>	Traces éventuelles
Toutes les fractions, et spécialement celles constituées par des <i>lécithines</i> , contiennent des amino-acides.		

(*) Les modalités du fractionnement sur colonne peuvent varier avec la qualité de l'acide silicique, avec le degré d'humidité et avec la qualité des éluants ; c'est pourquoi, nous préférons procéder à des contrôles par chromatographie en couche mince plutôt que de standardiser les conditions de travail, d'autant que cette standardisation ne dispense pas d'opérer des contrôles à intervalles réguliers et à chaque changement de lot d'acide silicique ou de solvants (voir exemple d'étude schéma 2).

Nous avons également utilisé un protocole simplifié permettant l'élution et le dosage de la fraction *céphalinique* ; dans ces conditions, le *phosphore des céphalines* représente 20 % du *phosphore lipidique*.

SCHÉMA 2

Chromatographie en couche mince de gel de silice des phosphatides fractionnés sur colonne



MELANGE D'ELUTION
SUR COLONNE
(chloroforme-méthanol)

A	1 : 1	A.G.L.	Acides gras libres
B	4 : 1	CER.	Cérébrosides
C	3 : 2	CEP.	Céphalines
D	3 : 2 puis 5 : 4	LE.	Lécithines
E	1 : 1	S	Sphingomyélines
F	0 : 1	LY.	Lysolécithines
		AA.	Aminoacides

5° Récapitulation de la composition lipidique du jaune

Après cette étude, nous pouvons présenter le bilan suivant, qui rassemble les résultats exprimés en milligrammes pour 100 mg de lipides, et ceux exprimés en milligrammes par gramme de jaune frais et par jaune. Nous présentons également à titre de comparaison, la composition globale du jaune d'œuf de pigeon voyageur que nous avons déterminée par les mêmes méthodes.

Les différents dosages de lipides totaux du jaune d'œuf de poule nous ont donné un poids moyen de 5,8 g pour un poids moyen de jaune frais de 16 g ; il en résulte que les lipides représentent 35 % du poids du jaune frais.

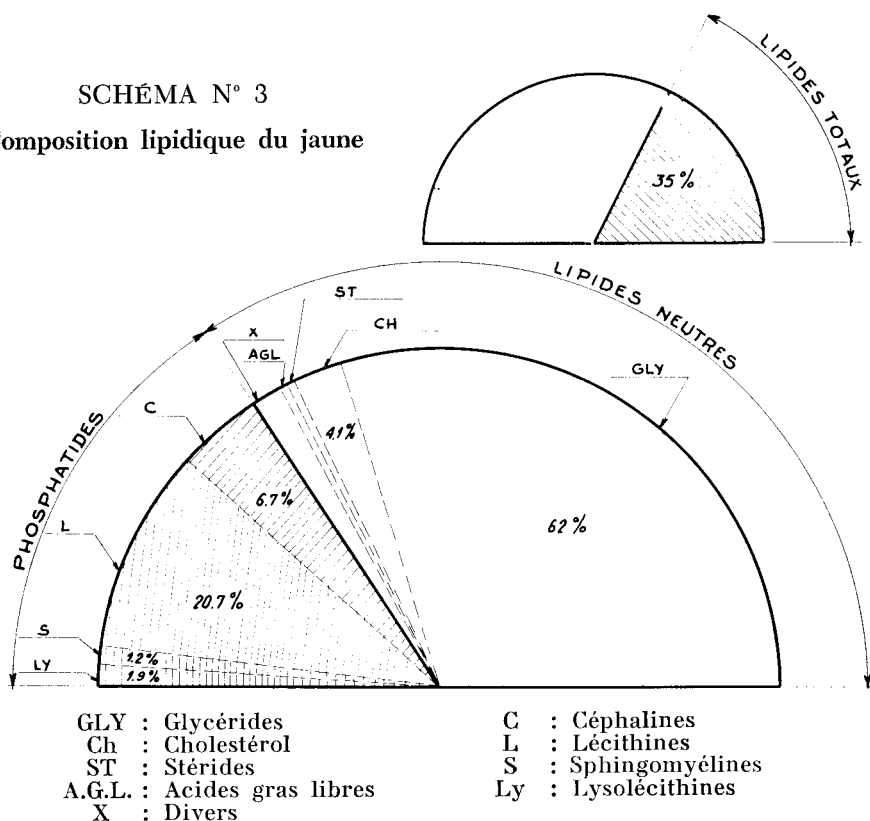
Nous avons rassemblé la composition globale dans le tableau XI et le schéma n° 3.

TABLEAU XI
Composition lipidique du jaune d'œuf

TAUX (en mg pour 100 mg de lipides)	Œuf de poule	Œuf de pigeon
Glycérides	62	58
Stérides	0,34	8,5
Cholestérol libre	4,1	4
Acides gras libres	0,4	0,5
Phosphatides	30,5	27
Céphalines	6,7	
Lécithines	20,7	
Sphingomyélines	1,2	1,8
Lysolécithines	1,9	

Les acides gras estérifiés totaux du jaune d'œuf représentent 257 ± 14 micromoles pour 100 mg de lipides.

SCHEMA N° 3
Composition lipidique du jaune



Ces résultats concordent en particulier avec ceux de ROMANOFF et Coll. (235) qui trouvent que les lipides totaux représentent 33 % du poids frais et que la composition lipidique est de 62,3 % de glycérides, 32,8 % de phosphatides et 4,9 % de stérols, vitamines, etc...

Nous signalons la constance de cette composition et en particulier celle du taux de cholestérol total comme le signalent également PENNOCK et Coll. (236), GAUJOUX et Coll. (237) et LEVY et Coll. (238).

Nous apportons en outre une confirmation de la présence de traces de stérides dans le jaune d'œuf de poule, et nous avons proposé une méthode de dosage après séparation par chromatographie en couche mince.

En ce qui concerne le jaune d'œuf de pigeon voyageur, la différence essentielle provient de la présence *de stérides à une concentration 25 fois supérieure à celle des stérides du jaune d'œuf de poule*. Faut-il voir dans cette constatation :

- L'incidence de l'absence de vésicule biliaire chez le pigeon ?
- L'incidence d'une simple différence de régime ?
- Une destinée particulière de ces stérides chez le pigeon ?

Il ne nous est pas possible de répondre à cette question.

Nous apportons également la preuve de la présence d'acides gras libres dans le jaune et nous avons proposé une méthode relativement simple de dosage.

Nous pensons en outre, en nous fondant sur les techniques de chromatographie en couche mince que *le jaune renferme des diglycérides* ; mais cette seule constatation paraît insuffisante pour en affirmer la présence et des études complémentaires semblent indispensables, d'autant que certains auteurs comme RAMASARMA et Coll. (239) signalent la présence de composés mineurs tels le cholesta-3,5, diène, 7 one qui en chromatographie en couche mince de gel de silice ont un R_F voisin de celui enregistré pour les diglycérides.

D'un point de vue quantitatif, les principaux lipides du jaune d'œuf de poule, se répartissent comme suit (voir tableau XII).

B. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS LIPIDIQUES

L'étude de cette partie importante fut réalisée par chromatographie en phase gazeuse.

1° Etude des lipides neutres totaux et des phosphatides totaux

Le tableau XIII a-b-c et le schéma n° 4 résument les résultats obtenus avec différentes séries de mélanges de plusieurs jaunes.

TABLEAU XII
Composition lipidique globale du jaune d'œuf de poule

TAUX	En mg par gramme de jaune	En mg par jaune frais
Glycérides	220	3 500
Sterides	1,2	19
Cholestérol libre	14,5	232
Acides gras libres	1,4	22,5
Phosphatides	107	1 715
Céphalines	23,4	375
Lécithines	72,5	1 160
Sphingomyélines	4,1	65,5
Lysolécithines	6,6	106
Lipides totaux	350	5 600
Acides gras estérifiés totaux (en micromoles)	900*	14 400**
Acides gras estérifiés totaux (en mg d'acide oléique)	254*	4 060**

* Par gramme de jaune.
** Par jaune.

TABLEAU XIII
Composition en acides gras des lipides du jaune d'œuf
a) Lipides totaux

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Série 1	1	26	5,5	6	43	15	2,5	1
Série 2	0,6	27	5,5	2,4	47	15,7	1	1
Série 3	1	25	7,5	4	47,5	13	1	1
Série 4	0,8	29	8,5	3,5	43	13,5	1,2	0,5
Série 5	0,5	30,5	8	5,5	42	12	0	1,5
Série 6	0,5	28	9	4,5	43	14	0,3	0,5
MOYENNES ..	0,7	27,5	7,3	4,3	44	14	1	0,9
	35,5			48,3		14	1	0,9

b) Lipides neutres

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Série 1	1	33	2	1	48,5	13	1	0,5
Série 2	0,7	27	3	4	50	14	1	0
Série 3	—	—	—	—	—	—	—	—
Série 4	1	34	5,5	7	39	11	1	0,5
Série 5	1	29	6,5	7	45,5	10	0	0,5
Série 6	1	31	5	6	44	13	0	0,5
MOYENNES ..	0,9	31	4,5	5	45,5	12	0,5	0,5
	36,4			50,5		12	0,5	0,5

c) Phosphatides

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Série 1	0,5	34	8	2	36	14,5	1	4
Série 2	0,5	27	10	2	39	18	0	3,5
Série 3	0,5	29	10,5	1,5	37,5	14,5	1	4,5
Série 4	1	35	14	4,5	28,5	13	0	4
Série 5	1	33,5	16	2,5	31	13	0	3
Série 6	1	31	16	4,5	29,5	14	0,5	3,5
MOYENNES ..	0,7	32	12,5	2,8	34,5	14,5	0,4	3,8
	45			37,3		14,5	0,4	3,8

14 : 0 Acide myristique

16 : 0 Acide palmitique

18 : 0 Acide stéarique

16 : 1 Acide palmitoléique

18 : 1 Acide oléique

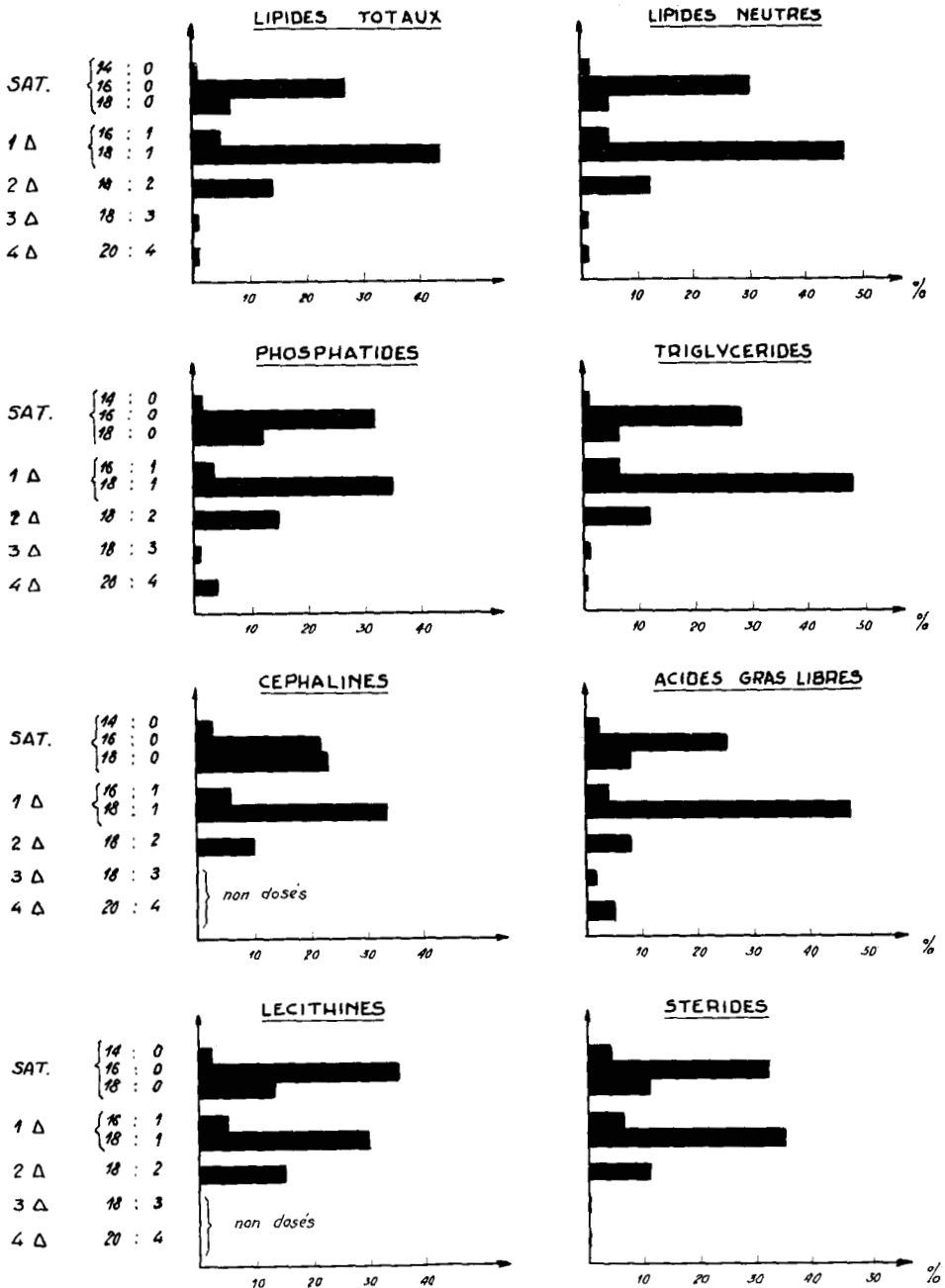
18 : 2 Acide linoléique

18 : 3 Acide linolénique

20 : 4 Acide arachidonique

SCHEMA N° 4

Composition en acides gras des lipides du jaune



L'étude comparative de ces résultats montre que :

— *Les phosphatides* sont plus riches en acides saturés et spécialement en acide stéarique.

— *Les lipides neutres* sont plus riches en acides monoinsaturés et spécialement en acide oléique (45 % environ).

— *Les lipides neutres et les phosphatides* contiennent des pourcentages voisins en acide gras polyinsaturés, les phosphatides étant toutefois nettement plus riches en acide arachidonique.

— *Les lipides neutres et les phosphatides* du jaune présentent des analogies de composition en acides gras avec les lipides correspondants du sérum humain normal dont nous rapportons la composition établie lors d'un récent travail (WAREMBOURG et Coll.) (240).

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES GLYCERIDES ET DES PHOSPHATIDES DU SERUM HUMAIN								
ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
LIPIDES NEUTRES	2	31	5	7	38	14	1	2
	38			45		14	1	2
PHOSPHATIDES ..	1	32	13	4	20	21	1	8
	46			24		21	1	8

On remarque toutefois que les lipides du jaune d'œuf contiennent un pourcentage nettement plus important d'acide oléique.

2° Etude des principaux composants des phosphatides

Les différents phosphatides sont préalablement isolés par chromatographie en couche mince sur colonne.

Le tableau XIV et le schéma n° 4 résument les résultats.

TABLEAU XIV

**Composition en acides gras des céphalines et des lécithines
du jaune d'œuf de poule**

ACIDES GRAS * (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2
<i>CEPHALINES</i>						
Série 1	4	18	27	8	29	13,5
Série 2	3,2	25,5	20	7,5	32	11,5
Série 3	2,5	28,5	19,5	4	37,5	8
Série 4	2	22	25	2,5	38	10,5
MOYENNE ...	3	22,5	23	5,5	34	11
	48,5			39,5		11
<i>LECITHINES</i>						
Série 1	1,7	38	13,5	4,5	29	13,5
Série 2	1,5	35	15,5	3,5	28	16,5
Série 3	1,5	37,5	14	3	31,5	12,5
Série 4	2,5	35,5	13	6,5	31	11,5
MOYENNE ...	1,8	36,5	14	4,3	30	13,5
	52,3			34,3		13,5

* L'acide linoléique et l'acide arachidonique n'ont pas été dosés.

L'étude comparative de ces résultats montre que dans les *céphalines*, le pourcentage d'*acide palmitique* est comparable à celui d'*acide stéarique* ; au contraire, dans les *lécithines*, la prédominance de l'*acide palmitique* sur l'*acide stéarique* est très nette. En définitive, on peut aussi considérer que le pourcentage d'acide stéarique des céphalines est nettement supérieur à celui des lécithines.

3° Etude des principaux composants des lipides neutres

Ces composants sont préalablement séparés par chromatographie en couche mince, en trois groupes : les *stérides*, les *triglycérides* et l'ensemble formé par les *acides gras libres*, les *diglycérides* et le *cholestérol libre*.

L'étude des triglycérides ne présente aucune difficulté ; par contre, celle des autres composants est délicate car, du fait de leur taux faible, il est nécessaire d'opérer sur d'importantes quantités de lipides.

Le tableau XV a-b-c et le schéma n° 4 résument la composition en acides gras de ces trois groupes.

L'étude de ces résultats montre que :

— La composition des triglycérides est analogue à celle des lipides

TABLEAU XV

Composition en acides gras des principaux composants des lipides neutres
a) Triglycérides

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Série 1	0,1	24,6	6,5	5,5	54,5	8,5	0,5	0
Série 2	0,2	25	5,5	5	50,5	13,5	0,3	0
Série 3	0,5	25	4	6	49	15,5	0	+
Série 4	1	32	5,5	7	43,5	10	1	0
Série 5	1,5	31	5	8	43	11	0,5	+
MOYENNES ..	0,5	27,5	5,5	6	48	11,5	0,5	+
	33,5			54		11,5	0,5	+

b) Acides gras libres + (diglycérides)

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4*
Série 1	2,5	27	10	5,5	43,5	4,5	4	3
Série 2	1	22,5	11	3,5	47,5	10	2,5	2
Série 3	0,5	22,5	10,5	5	49,5	11,5	0,5	+
Série 4	2	30	5,5	5	39	7,5	1,5	9,5
Série 5	2	22,5	10	4	44	10,5	0	7
Moyennes	1,5	25	8,5	4,5	46,5	8,5	1,5	4
	35			51		8,5	1,5	4

* + (traces indosables).

neutres (voir tableau XIII - b) ce fait est du reste prévisible étant donné l'énorme prépondérance de ces triglycérides dans ce groupe.

TABLEAU XV

c) Stérides

ACIDES GRAS (en p. 100)		SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
		14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Série 1		6,5	32,5	8	8,5	34	10,5	0	0
Série 2		3,5	31	15,5	6,5	32,5	10,5	+	0
Série 3		2,5	30,5	7,5	6,5	38	15	0	+
Série 4		3	36	10,5	5,5	36	10	0	+
MOYENNES ..		4	32,5	10,5	6,5	35	11,5	+	+
		47			41,5		11,5	+	+

SATURES

14 : 0

Acide myristique

16 : 0

Acide palmitique

18 : 0

Acide stéarique

1 Δ

16 : 1

Acide palmitoléique

18 : 1

Acide oléique

(monoénoïque)

2 Δ

18, : 2

Acide linoléique

(diénoïque)

3 Δ

18 : 3

Acide linoléique

(triénoïque)

4 Δ

20 : 4

Acide arachidonique

(tétraénoïque)

— L'interprétation des résultats du groupe des *stérides* et de celui des *acides gras libres* est plus délicate, car les quantités de substances étudiées sont très faibles et les résultats peuvent être faussés ; néanmoins, on peut insister sur deux points :

— La diminution du pourcentage des acides monoinsaturés des stérides.

— La présence constante et à un taux parfois assez important d'acide arachidonique dans le groupe des acides gras libres.

4° Récapitulation des résultats de la chromatographie en phase gazeuse

L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau XVI et le schéma n° 4.

TABLEAU XVI

**Récapitulation de la composition en acides gras des différents lipides
du jaune d'œuf de poule**

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Lipides Totaux ..	0,7	27,5	7,3	4,3	44	14	1	0,5
Lipides Neutres ..	0,9	31	4,5	5	45,5	12	0,5	0,5
Triglycérides	0,5	27,5	5,5	6	48	11,5	0,5	+
Stérides	4	32,5	10,5	6,5	35	11,5	+	+
Acides gras libres.	1,5	25	8,5	4,5	46,5	8,5	1,5	4
Phosphatides	0,7	32	12,5	2,8	34,5	14,5	0,4	3,8
Céphalines	3	22,5	23	5,5	34	11	non dosés	
Lécithines	1,8	36,5	14	4,3	30	13,5	non dosés	

**C. — ETUDE DES PROTÉINES ET DES LIPOPROTÉINES
DU JAUNE (ACQUISITIONS PERSONNELLES)**

Des études très complètes faites avec des moyens importants, ont été effectuées.

Nous avons toutefois tenu à compléter l'étude des lipides du jaune, par quelques techniques simples de préparation et d'analyse des principaux complexes lipoprotéiques.

1° Etude électrophorétique

Nous avons cherché à établir une description de l'électrophorégramme global du jaune. Pour arriver à ce résultat, nous avons utilisé deux procédés :

a) Des colorations spécifiques

- Vert de lissamine (protéines).
- Noir cérol (lipoprotéines).
- Oxydation periodique et réactif de SCHIFF (glycoprotéines).
- Bleu alcian (mucopolysaccharides acides).
- Révélation du phosphore (phosphoprotéines).

b) *L'étude électrophorétique de fractions isolées par des procédés chimiques classiques*

Nous avons préparé :

- *Les livétines* par la méthode de MARTIN et Coll. (241).
- *La phosvitine* par la méthode de McINDOE (242).
- *Le vitellomucoïde* par la méthode de WILLIAMS (243).
- *La lipovitelline et une lipovitellénine* par les méthodes décrites dans la deuxième partie.

Les électrophorèses sont faites à pH 8,6 en tampon véronal ; après migration, les bandes de papier sont séchées à l'air puis traitées à l'éther pour éliminer les lipides libres ou par le mélange éthanol-éther (3:1) pour obtenir une délipidation complète (ou presque complète) des complexes lipoprotéiques.

Les résultats obtenus sont les suivants :

La livétine brute donne trois fractions de nature glycoprotéique et qui correspondent par ordre de mobilité décroissante aux livétines α , β et γ .

La phosvitine très rapide, de nature phosphoprotéique est très peu colorable par les colorants des protéines, aisément mise en évidence par la révélation du phosphore et intensément colorable par le *bleu alcian* ; cette colorabilité par le bleu alcian qui est le colorant habituellement utilisé pour révéler les mucopolysaccharides acides, a été *trouvée incidemment* alors que nous cherchions à mettre en évidence d'éventuels mucopolysaccharides acides.

Le vitellomucoïde migre à la même vitesse que la livétine β et est intensément colorable par les réactifs des glycoprotéines.

L'étude électrophorétique de la *lipovitelline* et de la *lipovitellénine* montre qu'il s'agit de glyco-lipo-protéines extrêmement riches en lipides ; ces deux fractions ont des mobilités très voisines, la *lipovitellénine* étant légèrement plus rapide ; le front de la bande de lipovitellénine a une vitesse de migration sensiblement égale à celle de la *livétine* γ .

Une étude comparative faite par rapport à un sérum de poulet montre que les livétines α , β et γ ont respectivement les mêmes mobilités électrophorétiques que la sérum-albumine, les globulines α_2 et les globulines γ .

Les résultats obtenus nous ont permis d'interpréter les électrophorogrammes faits directement à partir du jaune dilué avec 2 volumes d'une solution de chlorure de sodium à 10 g % dans l'eau.

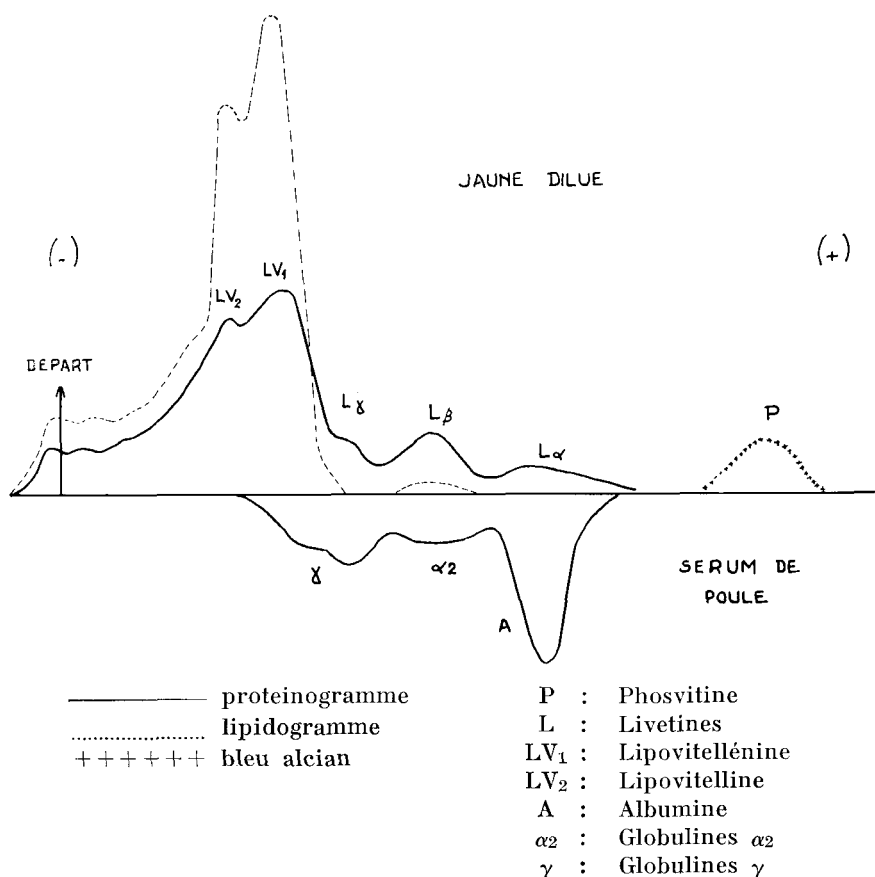
On peut ainsi mettre en évidence par ordre de mobilité décroissante (voir schéma n° 5).

— Une fraction de *phosvitine* plus ou moins importante et correspondant à la fraction libérée (dans les conditions opératoires) du complexe qu'elle forme avec les lipoprotéines.

— Deux fractions glycoprotéiques représentant les livétines α et β .

SCHEMA 5

Enregistrement densitométrique de l'électrophorèse du jaune



— La lipovitellénine ou plus exactement le complexe lipoprotéique de faible densité (L.D.F.) qui masque en partie la livétine γ.

— La lipovitelline très voisine de la précédente et parfois difficilement individualisable.

La description de ce diagramme, nous servira ultérieurement pour interpréter les variations du jaune résiduel lors des études dynamiques faites en cours d'incubation.

Il est intéressant de signaler qu'un milieu aussi complexe que le jaune d'œuf se prête, sans traitement préalable, à une étude électrophorétique directe assez satisfaisante.

2° Caractéristiques principales des lipides des lipoprotéines

Nous préparons la lipovitelline par la méthode décrite dans la deuxième partie ; le surnageant restant après la précipitation de la lipovitelline contient le complexe lipoprotéique de basse densité (L.D.F.) dont la protéine

de base est la vitellénine. Les lipides de la lipovitelline et du surnageant sont extraits puis fractionnés par chromatographie en couche mince ou sur colonne d'acide silicique ; les dosages des constituants essentiels montrent la répartition lipidique moyenne suivante (tableau XVII) :

TABLEAU XVII
Composition lipidique des complexes lipoprotéiques du jaune

En mg pour 100 mg de lipides totaux	Lipovitelline (H.D.F.)	L.D.F.
Glycérides	30,3	70
Cholestérol	7	4,7
Phosphatides	60,8	24
Autres lipides	1,9	1,3

Ces résultats montrent un taux important de *phosphatides* dans la lipovitelline et un taux très important de *glycérides* dans les lipoprotéines de basse densité.

Nous avons également établi la composition en acides gras des glycérides et des phosphatides de la lipovitelline ; le tableau XVIII résume les résultats obtenus.

TABLEAU XVIII
Composition en acides gras des principaux lipides de la lipovitelline

ACIDES GRAS (en p. 100)	SATURES			1 Δ		2 Δ	3 Δ	4 Δ
	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
Glycérides	1	23	8	3,5	52	9,5	1	2
	32			58,5		9,5	1	2
Phosphatides	1,5	32	16	2,5	31	12	0,5	4,5
	49,5			33,5		12	0,5	4,5

Une *lipovitellénine* préparée à partir du surnageant (L.D.F.) par agitation avec de l'éther (voir technique : deuxième partie) a montré des compositions discordantes d'une préparation à l'autre, car les conditions opératoires libèrent par dénaturation partielle du complexe de basse densité (L.D.F.), une fraction variable de lipides qui passent dans la phase éthérée résultant du partage de phase consécutif à l'agitation. Ceci confirme la présence d'un complexe de haut poids moléculaire ainsi que la fragilité de ce même complexe.

3° **En conclusion**, cette étude nous a permis de mettre en évidence dans le jaune :

- Une phosphoprotéine (la phosvitine).
- Une fraction glycoprotéique constituée par les livétines α , β et γ .
- Un mucoïde (le vitellomucoïde).
- Un complexe lipoprotéique stable (la *lipovitelline*) de haute densité et dont la composante lipidique est à base de phospholipides (60 % environ).
- Un complexe lipoprotéique instable de basse densité et contenant un taux important de *glycérides* (70 %) ; ce complexe, conduit par dénaturation partielle à une *lipovitellénine* de composition lipidique mal définie.

D. — COMPOSITION LIPIDIQUE DU BLANC D'ŒUF

Nous avons utilisé la méthode habituelle d'extraction des lipides par le mélange méthylal-méthanol 4:1 (vol/vol) en opérant sur la totalité du blanc.

Par les méthodes classiques de dosage, on peut déceler une quantité de *cholestérol* comprise entre 0,15 et 0,45 mg par œuf et un taux de *phosphore* compris entre 0,022 et 0,031 mg par œuf.

Pour préciser la nature de ce matériel « lipidique », nous avons soumis l'extrait à une étude chromatographique en couche mince.

On constate :

— La présence, à la fois dans les lipides neutres et dans les phosphatides de composés indéterminés dont la nature lipidique n'est pas démontrée.

— La présence dans la fraction théoriquement « phosphatidique » de taches minimes de composés ayant le même R_F que la lécithine et les mêmes propriétés tinctoriales ; signalons toutefois la présence d'un composé inconnu très riche en phosphore et de vitesse de migration lente (ce composé expliquerait peut-être le taux de phosphore « lipidique » trouvé).

— La présence dans la fraction neutre des lipides, d'un peu de *cholestérol libre*.

En conclusion, il semble, qu'en plus d'un certain matériel non lipidique, l'extraction du blanc d'œuf par les techniques utilisées pour le jaune, permette la récupération d'une très petite quantité de lipides essentiellement constituée par du *cholestérol*.

Etant donné les faibles teneurs trouvées, il est impossible de savoir s'il s'agit, de lipides intégrés dans des complexes lipoprotéiques mineurs ou de lipides qui ont diffusé à travers la membrane du jaune.

II. — ÉTUDE DYNAMIQUE DE LA COMPOSITION DU JAUNE RÉSIDUEL ET DE L'EMBRYON DURANT L'INCUBATION

A. — PROTOCOLE D'ÉTUDE

Les œufs provenant d'une même race de poules (RHODES ISLAND) sont mis en incubation à 37° C ; un récipient plein d'eau placé dans l'enceinte thermostatée, maintient une atmosphère saturée en vapeur d'eau. Au moment de l'étude, les œufs sont rapidement refroidis aux environs de 4° C ; la coquille est cassée avec précaution de façon à en libérer le contenu sans détérioration. Il s'avère difficile, au bout de quelques jours d'incubation, de ne pas déchirer la poche contenant le jaune résiduel ; dans ces conditions, il est impossible de récupérer quantitativement celui-ci. C'est pourquoi nous avons, compte tenu du fait que le blanc ne contient pas de lipides en quantité appréciable, utilisé la méthode suivante :

1° Collection du jaune résiduel

Après élimination de la coquille, l'embryon est libéré des membranes, puis lavé à l'eau distillée, séché sur papier filtre et pesé.

Tous les liquides résiduels contenant *la totalité du jaune* (*), sont homogénéisés et le volume final est mesuré.

2° Extraction des lipides du jaune et de l'embryon

a) Cas du jaune résiduel

L'opération est menée sur une fraction aliquote de la préparation précédente.

(*) Il faut cependant signaler que cette méthode n'est pas non plus parfaite, en ce sens qu'il est pratiquement impossible d'éviter la récupération d'un peu de sang embryonnaire ; nous avons jugé que cette légère souillure était moins gênante qu'une perte de jaune résiduel.

b) *Cas de l'embryon*

Le (ou les) embryon (s) sont directement homogénéisé (s) dans le solvant d'extraction choisi. L'ensemble des manipulations est conforme au protocole décrit dans la deuxième partie de ce travail.

3° Recueil du sang embryonnaire

Il est possible, dès la fin de la première semaine d'incubation, de ponctionner les vaisseaux externes à l'aide d'une pipette PASTEUR effilée ; d'autres prélèvements sont également réalisables à partir des vaisseaux du cou.

La petite quantité de sang récoltée, est immédiatement centrifugée dans des microtubes en nylon, et le plasma est récupéré.

B. — PRINCIPAUX LIPIDES EMBRYONNAIRES

Il est possible d'étudier les lipides embryonnaires dès le cinquième jour d'incubation, surtout lorsqu'on opère sur un ensemble de plusieurs embryons.

Alors que certains auteurs travaillent sur des tissus broyés et lyophilisés, nous avons préféré extraire les lipides des tissus frais et broyés, de façon à simplifier la préparation tout en obtenant, comme le signale BÖTTCHER (244), des résultats similaires.

1° Evaluation du taux de lipides totaux en fonction du développement de l'embryon

PENNOCK et Coll. (245) et HAMILTON (246) signalent des variations considérables dans les stades de développement d'embryons du même âge ; c'est pourquoi *certaines auteurs* tels GARRIGAN et Coll. (247) et HAMBURGER et Coll. (248) utilisent les caractères morphologiques de l'embryon pour apprécier le stade de développement qui dure en moyenne vingt jours et demi. Nous préférons retirer chaque jour à heure fixe les œufs à étudier et éliminer les embryons dont le développement ne semble pas correspondre au temps d'incubation.

Le tableau XIX résume les résultats obtenus pour deux séries d'œufs et concerne l'étude pondérale des embryons, des lipides totaux et des acides gras estérifiés totaux dont l'évolution en fonction du temps est analogue à celle des lipides.

Le schéma N° 6-a représente les courbes de variation des poids de l'embryon et des lipides totaux en fonction du temps d'incubation.

On constate que ces courbes n'évoluent pas parallèlement, ce que montre du reste l'établissement du rapport (poids de lipides extraits/poids frais de l'embryon) qui représente le poids de lipides (en mg) par gramme d'embryon (voir tableau XIX).

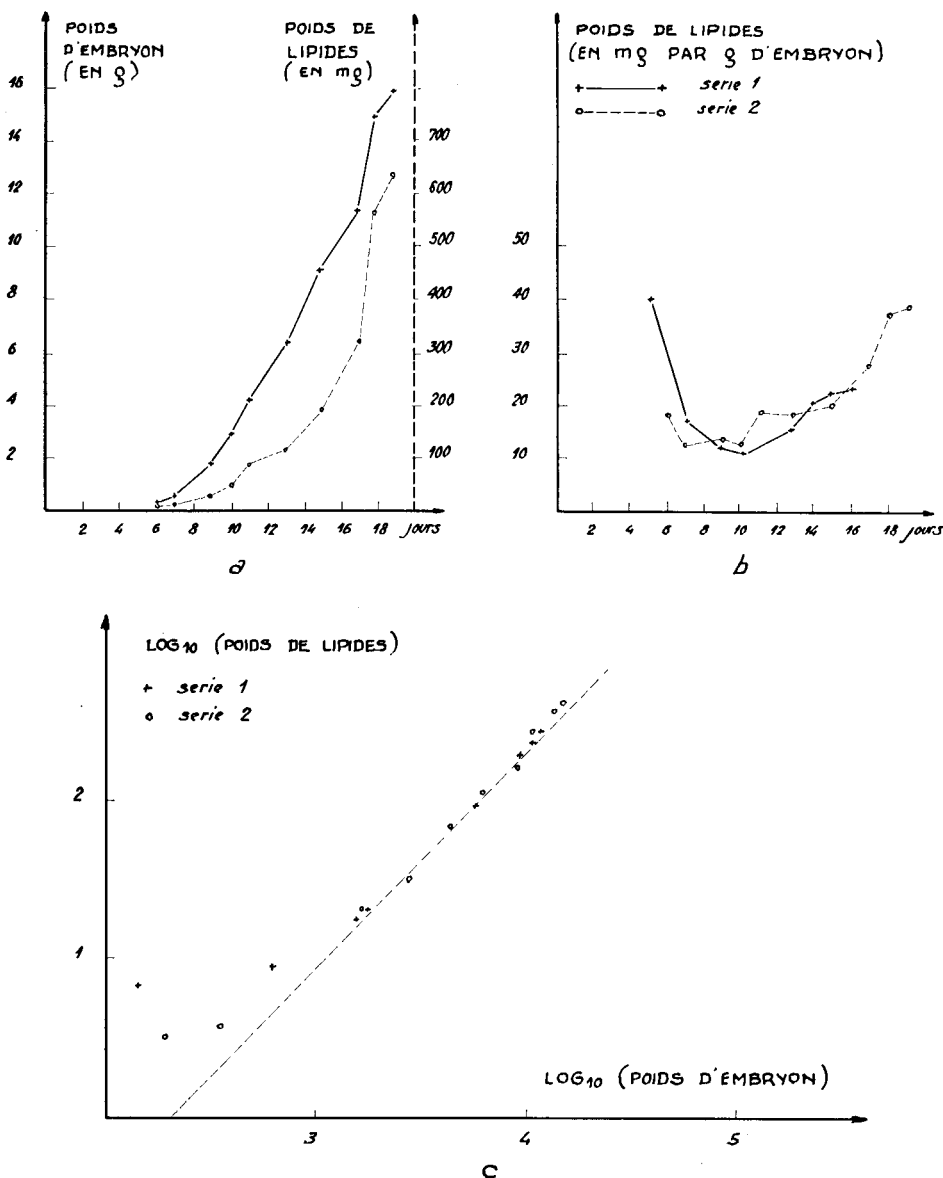
TABLEAU XIX

Variations de poids de l'embryon, des lipides totaux extraits et du taux d'acides gras estérifiés au cours du développement embryonnaire

JOURS	SERIE N° 1			SERIE N° 2			
	E (en g)	L (en mg)	L/E	E (en g)	L (en mg)	L/E	A.G.E.
5	0,174	7	40				
6				0,196	3,6	18	2,9
7	0,65	9,5	14,5	0,374	4	10,7	3,8
9	1,62	20	12,3	1,864	25	13,5	34
10	1,9	22,5	11,8	2,8	36	12,9	50
11				4,2	84	20	117
12		94					
13	6,126	100	16,3	6,285	120	19,1	240
14	9,87	207	21				
15	12,877	280	21,8	9,185	193	21	545
16	13,46	310	23				
17				11,5	325	28,2	
18				14,78	571	38,6	860
19				16,056	634	39,5	950
E = Poids moyen d'un embryon L = Poids moyen de lipides par embryon L/E = Poids de lipides (en mg) par gramme d'embryon A.E.G. = Acides gras estérifiés (en micro-mole par embryon)							

SCHEMA 6

Variations des poids de l'embryon et des lipides extraits durant l'incubation



Ce rapport décroît durant la première semaine, puis croît ensuite régulièrement à partir du *onzième jour* environ et semble se stabiliser en fin de période (voir schéma n° 6-b).

Il semble donc possible d'admettre que dans un premier temps, les lipides puisés dans le jaune sont *catabolisés* à des fins énergétiques sans anabolisme particulièrement actif dans les tissus embryonnaires (le poids moyen de l'embryon augmente donc relativement plus vite que celui des

lipides) ; dans la deuxième période au contraire, le foie de l'embryon acquiert vers le douzième jour d'incubation (SCHJEIDE) (249) une soudaine et croissante *capacité de synthèse* de différents lipides à partir des triglycérides puisés dans le jaune ; cette phase correspondrait donc à l'édification des lipoprotéines tissulaires et sanguines, et cet anabolisme se traduirait par une augmentation relativement plus rapide du poids des lipides que du poids de l'embryon ; enfin, la troisième phase correspond à une période d'état, l'embryon étant alors constitué.

Nous avons cherché à établir une relation entre les poids de l'embryon et de lipides, et sommes arrivés à la conclusion suivante :

TABLEAU XX

JOURS	Log ₁₀ Y		Log ₁₀ X	
	SERIE N° 1	SERIE N° 2	SERIE N° 1	SERIE N° 2
5	2,24		0,85	
6		2,29		0,55
7	2,81	2,57	0,98	0,60
9	3,21	3,27	1,30	1,40
10	3,28	3,45	1,35	1,55
11		3,62		1,92
13	3,79	3,80	2	2,08
14	3,99		2,32	
15	4,11	3,96	2,45	2,29
16	4,13		2,49	
17		4,06		2,51
18		4,17		2,76
19		4,21		2,80
Y = Poids moyen d'un embryon (en mg) X = Poids moyen de lipides (en mg)				

Si l'on construit la courbe représentative du logarithme du poids de l'embryon en fonction du logarithme du poids de lipides extraits, on obtient à partir du *neuvième jour environ*, une série de points pratiquement alignés.

Le tableau XX et schéma N° 6-c, résument les résultats obtenus.

Il existe donc *une excellente corrélation* entre les deux phénomènes à partir du neuvième jour d'incubation, c'est-à-dire dans la période où le foie de l'embryon acquiert ses propriétés biosynthétiques. Le schéma n° 6-c montre en outre la similitude des résultats obtenus avec les deux séries d'œufs et met en évidence le fait, qu'à partir du neuvième jour, les différents points représentatifs se situent approximativement sur une même droite. La relation entre le poids moyen d'un embryon et le poids moyen des lipides extraits est donc de la forme :

$$\text{Log}_{10}Y = 0,7 \text{ Log}_{10}X + 2,3$$

Y : Poids moyen d'un embryon (en mg)

X : Poids moyen de lipides (en mg/embryon).

2° Variations qualitatives et quantitatives des différents groupes de lipides

L'étude qualitative des différents groupes de lipides embryonnaires durant l'incubation, est faite par chromatographie en couche mince de gel de silice.

On constate que l'on retrouve dans la fraction neutre, *les mêmes constituants que dans les lipides du jaune d'œuf frais* (stérides, triglycérides, acides gras libres, cholestérol et diglycérides). Toutefois, les taches des stérides sont nettement plus accusées dans les lipides embryonnaires, et l'intensité des colorations augmente en fonction du temps d'incubation.

Sur les chromatographies des phosphatides, on constate également la *présence des mêmes constituants que dans le jaune frais*, avec toutefois une tache de *sphingomyélines* relativement plus marquée ; les proportions relatives de chaque groupe varient avec le temps ; les variations les plus évidentes sont obtenues avec les *céphalines*, dont la proportion augmente régulièrement.

a) Variations des acides gras libres et des glycérides totaux

Le taux des acides gras libres, reste faible : au 17^{me} jour il ne représente que 0,75 % *des lipides totaux*, soit environ le double de celui que l'on trouve dans les lipides du jaune frais.

Les *glycérides* passent de 2 mg par embryon au 5^{me} jour à 140 mg par embryon au 16^{me} jour d'incubation. Toutefois, d'un point de vue relatif, les glycérides, représentent 60 à 65 % des lipides jusqu'au 12^{me} jour, puis ils baissent ensuite brusquement aux environs de 40 à 45 %.

On retrouve donc dans la première période de développement les mêmes concentrations que dans le jaune, ce qui semble indiquer un simple transfert de matériel. Si on considère que vers le douzième jour, le foie de l'embryon devient éminemment capable de synthétiser *des stérides et*

des phosphatides à partir des glycérides (SCHJEIDE) (250), on conçoit aisément la chute des pourcentages de ceux-ci au sein des lipides totaux.

b) Variations du cholestérol libre et estérifié

Nous détaillerons davantage cette partie, d'autant plus que le poulet est susceptible de développer, sous l'effet d'un régime contenant un certain taux de cholestérol, des lésions de type athéroscléreux.

Le tableau XXI et les schémas n° 7-a et c résument les résultats.

La conclusion la plus importante, est qu'à la fin de la période d'incubation, le taux de cholestérol estérifié est plus important que celui du cholestérol libre.

TABLEAU XXI
Variations du cholestérol libre et estérifié

JOURS	T (en mg)	L (en mg)	E (en mg)	E/T (en %)
6	0,3	0,2	0,1	33
7	0,6	0,4	0,2	33
9	2,8	1,63	1,17	41
10	4,25	2,35	1,9	45
11	8,3	4,95	3,35	40
13	15	9,05	5,95	40
15	23	13,7	9,3	40
17	33	16,3	16,7	50
18	55,8	26,8	29	52
19	65	30	35	54

T = Taux de cholestérol total par embryon
L = Taux de cholestérol libre par embryon
E = Taux de cholestérol des stériles par embryon
Cholestérol des stériles
E/T = Rapport $\frac{\text{Cholestérol des stériles}}{\text{Cholestérol total}}$

En partant des résultats précédents, et en les exprimant par gramme de tissu embryonnaire, on peut encore constater que l'augmentation du taux de cholestérol estérifié par gramme d'embryon est très nette en fonction de la durée d'incubation (tableau XXII). Autrement dit, les stérides augmentent plus rapidement que ne se développe l'embryon ; il est donc indiscutable, compte tenu du taux infime de stérides présents dans le jaune, que *l'embryon synthétise activement ceux-ci*.

TABLEAU XXII

JOURS	Cholestérol estérifié (en mg/g d'embryon)
6	0,51
7	0,53
9	0,63
10	0,68
11	0,80
13	0,95
15	1,01
17	1,45
18	1,96
19	2,18

L'importance quantitative prise par le cholestérol, devait avoir un retentissement sur le taux de cholestérol du sang ; nous avons dosé le cholestérol total d'un mélange de sérums d'embryons de 12 à 18 jours et avons trouvé un taux de 2,7 g par litre.

Ce résultat rejoint ceux de NICHOLS et Coll. (251) qui trouvent à l'éclosion un taux de 3,6 g/litre et indiquent que le taux de cholestérol sanguin du poussin baisse ensuite rapidement, dans les huit jours qui suivent l'éclosion.

Il est donc vraisemblable que l'embryon n'utilise pas la grande quantité de cholestérol libre et estérifié qu'il synthétise en grande partie ; il constitue une réserve distribuée dans différents organes (le foie du poussin de 4 jours contient environ 9 % de son poids de cholestérol) ; ces réserves seront rapidement utilisées après l'éclosion, soit pour des synthèses hormonales, soit pour l'élaboration de pigments biliaires.

c) Variations des phosphatides embryonnaires

Des études globales faites sur deux séries différentes d'œufs mis en incubation ont donné les résultats suivants (tableau XXIII).

SCHEMA 7

Variations du cholestérol et des phosphatides de l'embryon

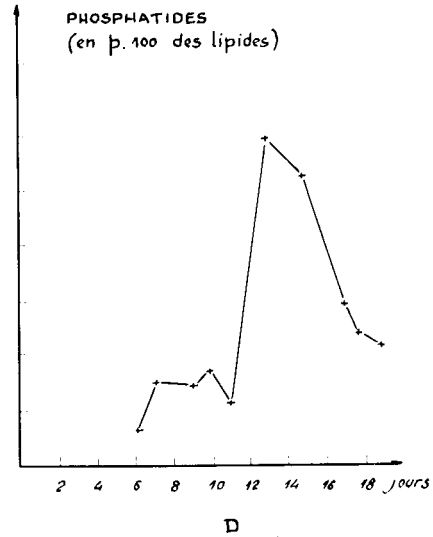
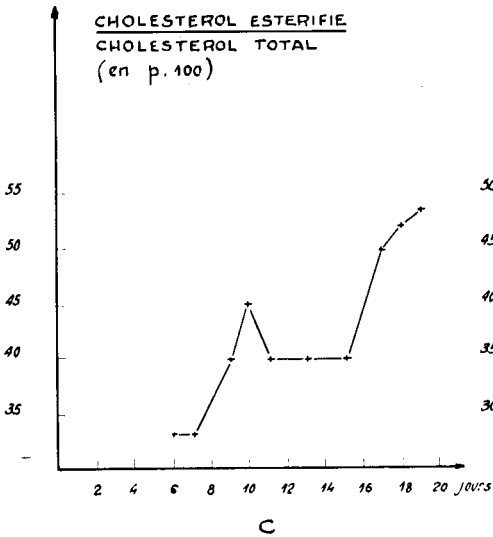
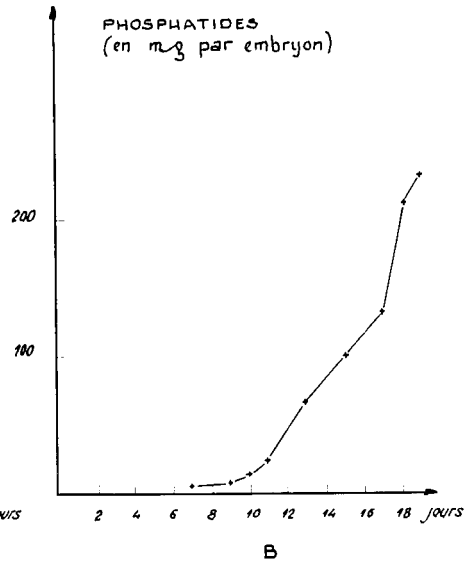
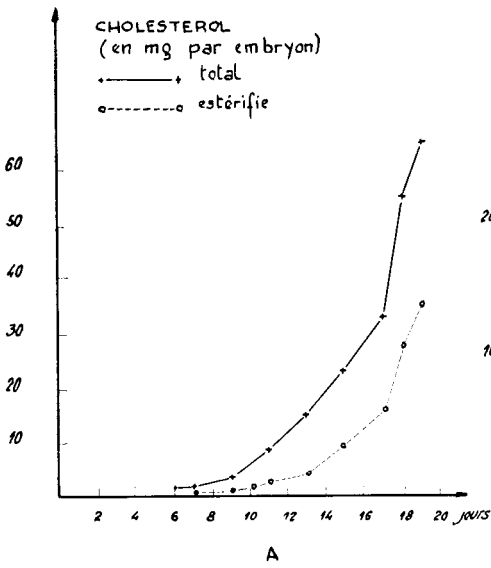


TABLEAU XXIII
Variations des phosphatides embryonnaires

JOURS	SERIE N° 1	SERIE N° 2	
	PHOSPHATIDES	PHOSPHATIDES	
	(en mg/embryon)	en mg/embryon)	(en p. 100 des lipides)
5	1,1		
6		1	27,8
7	3,5	1,3	32,5
9	12	8	32
10	15,8	12	33
11		25	30
12	47		
13	55	66	55
14	86		
15	120	100	52
16	130		
17		130	40
18		210	37
19		230	36

Aux différences individuelles près, ces deux séries évoluent de façon similaire, et le schéma n° 7-b résume les résultats obtenus avec la série n° 2.

Le tableau XXIII et le schéma n° 7-d montrent que, jusqu'aux environs du 11^{me} jour, les phosphatides représentent de 25 à 30 % des lipides ; ils augmentent ensuite brusquement pour atteindre 50 à 55 %, et redescendent aux environs de 40 %. L'explication est identique à celle que nous avons donnée à propos des glycérides et des stérides, à savoir l'acquisition des capacités biosynthétiques à cette date ; il est donc logique d'admettre à partir de cette date un catabolisme accéléré des glycérides et un changement d'allure de la courbe de synthèse des phosphatides ; ces deux phénomènes

agissent donc dans le sens d'une brusque augmentation du pourcentage des phosphatides. La stabilisation finale correspond peut-être à la mise en place de molécules de glycérides au sein des complexes lipoprotéiques et coïncide avec l'apparition en quantité importante des stérides dont on sait que la synthèse accélérée se poursuit régulièrement.

Nous avons également contrôlé par des dosages chimiques les résultats de la chromatographie en couche mince exposés précédemment et concernant les sphingomyélines et les céphalines ; nous trouvons que les *sphingomyélines* représentent environ 15 % des phosphatides, soit quatre fois plus que dans les phosphatides du jaune frais. En ce qui concerne les *céphalines*, nous trouvons les proportions suivantes :

JOURS	Céphalines (en p. 100 des phosphatides)
6	18
17	28

Ces résultats sont confirmés par TSUJI et BRIN (252) et correspondent vraisemblablement à l'édification des tissus cérébraux.

C. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIFFERENTS GROUPES DE LIPIDES

Sur les lipides les plus caractéristiques et qui sont l'objet d'une biosynthèse indiscutable (*stérides et phosphatides*) ou d'un catabolisme net (*glycérides*), nous avons déterminé la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

1° Stérides embryonnaires

Les stérides sont isolés par chromatographie en couche mince et les acides gras sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse ; les pourcentages obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

Composition en acides gras des stérides embryonnaires (résultats en p. 100)

Acide myristique	C 14:0	1,5
Acide palmitique	C 16:0	18
Acide stéarique	C 18:0	3
Acide palmitoléique	C 16:1	6,5
Acide oléique	C 18:1	52
Acide linoléique	C 18:2	19
Autres acides		non dosés

On constate l'importance des acides gras insaturés et surtout de l'*acide oléique*. Ces résultats sont, comme on pouvait s'y attendre, intermédiaires entre les résultats obtenus par SCHJEIDE (253) pour les stérides du foie qui contiennent jusqu'à 95 % d'*acide oléique* et ceux des stérides du sang circulant pour lesquels nous trouvons moins d'acides insaturés (35 % environ d'*acide oléique*) et plus d'acides saturés (25 à 40 % d'*acide palmitique* et 9 à 12 % d'*acide stéarique*) ; de toute façon, les stérides de l'embryon contiennent peu d'*acide linoléique* si on les compare aux stérides humains qui en contiennent environ 50 %.

2° Glycérides embryonnaires

En ce qui concerne les acides gras des glycérides, nous avons obtenu les résultats suivants (tableau XXV).

TABLEAU XXV
Composition en acides gras des glycérides embryonnaires
(résultats en p. 100)

JOURS	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
5	0,5	22	8,5	5	51	12	0,5	0,5
7	1	26	6	6	49	11,5	0	0,5
9	1	26	5	6	41	16	0,5	4,5
12	1	29	5,5	5,5	37	16,5	0,5	3
13	0,5	27,5	7	4	47	12	0	2
14	1	28	8	4,5	43,5	14	0	1
15	0,5	29	4	3	45,5	14,5	0,5	3
16	1	25,5	7	4,5	46	15,5	0	0,5

Ce tableau montre qu'en dehors de variations individuelles, les résultats restent voisins d'une certaine moyenne et que, par conséquent, on peut admettre qu'il n'y a pas de modification qualitative particulière et ordonnée en fonction du temps d'incubation. Il est intéressant de constater que les valeurs trouvées sont analogues à celles obtenues à partir des glycérides du jaune frais et que nous résumons ici :

C 16:0 31 %
C 18:0 4,5 %
C 18:1 45,5 %
C 18:2 12 %

Ce fait est remarquable ; il tend à prouver que la composition du jaune est parfaitement adaptée aux besoins de l'embryon.

3° Phosphatides totaux embryonnaires

Le tableau XXVI montre que la composition en acides gras présente de grandes analogies avec celle des phosphatides du jaune frais ; à l'exception d'un léger accroissement des pourcentages d'*acide stéarique* en fonction du temps, il n'existe pas de modification nette de composition ; cette augmentation est en rapport direct avec celle précitée des *céphalines* qui sont particulièrement riches en cet acide.

TABLEAU XXVI
Composition en acides gras des phosphatides embryonnaires
(résultats en p. 100)

JOURS	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
5	0,5	35,5	10	3	33,5	11	0,5	6,5
7	0,5	33,5	8,5	3	34	14	0	6,5
9	1	30	11	8,5	31	11	0,5	7
12	0,5	30,5	15	3,5	30,5	13,5	0,5	5,5
13	0,5	29	11,5	3	38,5	11	0	6,5
14	0,5	26	15	2,5	40	12,5	0	3,5
15	0,5	32,5	15	2	34	12,5	0,5	2
16	0,5	34	16	3,5	29	12	0,5	4,5

D. — CONCLUSION A L'ÉTUDE DES LIPIDES EMBRYONNAIRES

En conclusion, les principales modifications peuvent être résumées de la façon suivante :

1° Il semble exister, à partir du onzième jour d'incubation environ, une élévation importante et continue des taux de lipides, en rapport avec une biosynthèse hépatique brusquement accrue.

2° Du point de vue qualitatif, il est remarquable de constater que les compositions lipidiques du jaune frais et de l'embryon de quelques jours sont analogues ; à partir du dixième jour, un accroissement des pourcentages de phosphatides se manifeste ainsi qu'une augmentation encore plus nette des pourcentages et des taux de cholestérol libre et estérifié ; ces augmentations sont en rapport avec une biosynthèse hépatique accélérée qui porte essentiellement sur le *cholestérol estérifié*.

3° La composition en acides gras des stérides est caractérisée par un pourcentage important d'*acide oléique* et la faiblesse relative du pourcentage d'*acide linoléique* par rapport au pourcentage de ce même acide dans les stérides humains.

La composition en acides gras des glycérides et des phosphatides ne varie pas sensiblement en fonction du temps d'incubation, et présente de grandes analogies avec celle des lipides correspondants du jaune frais.

E. — PRINCIPAUX LIPIDES DU JAUNE RÉSIDUEL

1° Variations globales des lipides totaux

Nous envisagerons, les variations de volume des liquides homogénéisés ainsi que les variations des taux de lipides extraits et des acides gras estérifiés totaux.

Le tableau XXVII montre que ce n'est qu'aux environs du 12^{me} jour d'incubation qu'apparaissent des modifications sensibles du taux des lipides totaux et des acides gras estérifiés.

On constate également que le rapport

$$\frac{\text{lipides (en cg)}}{\text{liquides résiduels (en ml)}}$$

ou rapport L/V qui représente

le poids de lipides par unité de volume de liquide résiduel, est une fonction croissante du temps ; ce rapport évolue de façon approximativement linéaire en fonction du temps ; la droite théorique obtenue dans le cas présent aurait pour équation :

$$X = 0,315 t + 10$$

avec $X = L/V$ (en cg par ml)

$t =$ temps (en jours d'incubation).

2° Variations qualitatives et quantitatives des différents groupes de lipides

L'étude qualitative est faite par chromatographie en couche mince de gel de silice ; on observe une accumulation progressive de *stérides* dans les lipides neutres ; mais il est difficile de conclure en ce qui concerne les autres constituants. Les variations des stérides doivent d'ailleurs être considérées avec prudence, car les liquides résiduels en cours d'incubation peuvent être souillés par une certaine quantité de sang embryonnaire. La

chromatographie en couche mince des phosphatides ne permet pas de saisir des variations nettes. Nous avons donc procédé à une étude quantitative.

TABLEAU XXVII

Variations de volume des liquides résiduels et variations de poids des lipides totaux extraits durant un cycle d'incubation

JOURS	LIQUIDES RÉSIDUELS (en ml)	LIPIDES TOTAUX (en g)	RAPPORT L/V * (en cg/ml)	A.G.E. * (en mMole)
0	48	5,3	11	13,5
3	47	5,3	11,3	13,5
6	45	5,4	12	13,4
7	46	5,5	12	12
9	44	5,6	12,7	12
10	43	5,2	12,1	10
11	40	5,5	13,7	12,2
13	33	4,6	14	9,8
15	28	4,5	16	8,3
17	25	3,6	14,4	8,5
18	23	3,8	16,5	8,7
19	20	3,2	16	4,6
* Rapport : $\frac{\text{Lipides (en centigrammes)}}{\text{Liquides résiduels (en ml)}}$ ** A.G.E. : Acides gras estérifiés totaux (en millimoles)				

a) *Variations des acides gras libres et des glycérides*

Le tableau XXVIII résume les résultats.

Ce tableau montre une augmentation des acides gras libres, au début de la période d'incubation ; cette augmentation peut être due à une libération partielle d'acides gras à partir des glycérides du fait de la mise en incubation à 37°C, mais ce phénomène est peu important et ne peut avoir

aucune influence sur la composition en acides gras des *glycérides*. On constate ensuite une diminution globale, parallèle à celle des autres constituants, sans augmentation de concentration (voir également le schéma N° 8-d.

TABLEAU XXVIII
Variations des acides gras libres et des *glycérides*

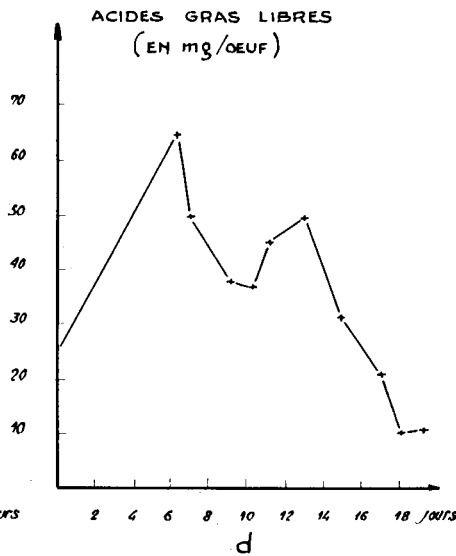
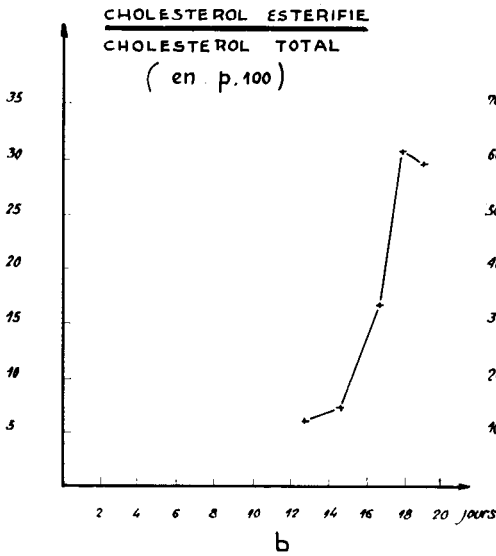
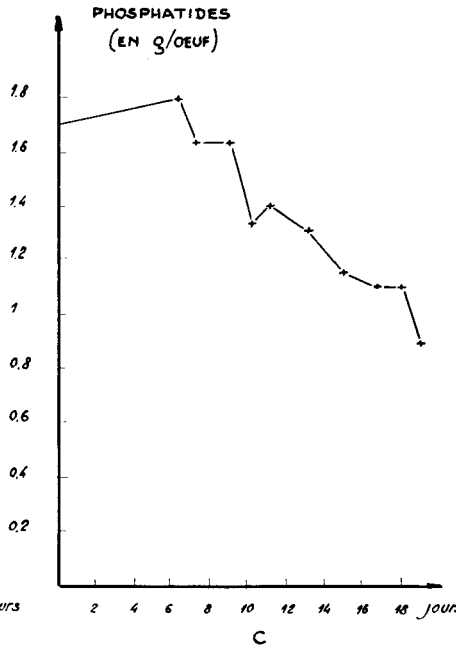
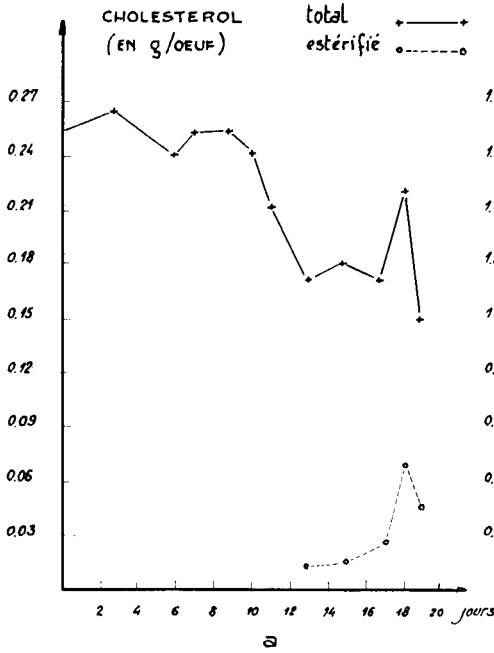
JOURS	ACIDES GRAS LIBRES		GLYCERIDES
	(en mg par œuf)	(en % des lipides)	(en g par œuf)
0	25	0,47	
3			3,8
6	65	1,2	3,3
7	50	0,9	3,6
9	38	0,68	3,7
10	37	0,71	3,5
11	45	0,82	3,8
13	49	1,07	2,9
15	31	0,69	3,1
17	21	0,58	
18	10	0,26	
19	10	0,32	2

Le tableau XXVIII montre que le taux des *glycérides* diminue lentement en fonction du temps d'incubation ; toutefois la concentration reste sensiblement constante et représente 65 à 70 % des *lipides totaux* ; ce point est important, car il montre que, lors des prélèvements faits par l'embryon sous forme de *lipoprotéines*, il n'y a pas de bouleversement spectaculaire dans la structure de ces lipoprotéines, donc, pas de prélèvement préférentiel de l'une ou de l'autre catégorie de lipides.

On est une fois de plus amené à conclure que la composition lipidique du jaune est adaptée aux besoins futurs de l'embryon ; on serait tenté de dire que les lipoprotéines du jaune sont les éléments préfabriqués de l'édifice embryonnaire.

SCHÉMA 8

Variations du cholestérol, des phosphatides et des acides gras libres du jaune résiduel



b) *Variations du cholestérol total et estérifié*

Le tableau XXIX et les schémas n° 8 - a et b) résument les résultats obtenus.

TABLEAU XXIX

Variations du cholestérol total et du cholestérol estérifié

JOURS	CHOLESTEROL TOTAL	CHOLESTEROL ESTERIFIE	RAPPORT E/T
	(en g par œuf)	(en g par œuf)	
0	0,25		
3	0,26		
6	0,24		
7	0,25		
9	0,25		
10	0,24		
11	0,21		
13	0,17	0,01	5,9
15	0,18	0,012	6,7
17	0,17	0,026	15,3
18	0,22	0,068	31
19	0,15	0,045	30
E/T : Rapport d'estérification en pour 100			

On constate que les modifications quantitatives du cholestérol total suivent l'évolution générale des lipides, la concentration reste sensiblement la même que dans l'œuf non incubé et représente environ 4,50 % *des lipides totaux*. On constate également l'apparition vers le 15^{me} jour, de taux de plus en plus importants de cholestérol estérifié ; celui-ci passe en effet de 0,2 % *des lipides dans l'œuf frais*, à 1,8 % *vers le 18^{me} jour*. Nous avons déjà signalé qu'il convenait d'être circonspect quant à la réalité de cette augmentation, étant donné qu'il est difficile, passé un certain stade d'incu-

bation, de ne pas entraîner avec le jaune une partie de sang embryonnaire qui est très riche en stérides. Cette augmentation a cependant été signalée par TSUJI et BRIN (254). Il semble difficile d'admettre une biosynthèse au sein du jaune même ; dans ces conditions, l'interprétation reste délicate.

c) *Variations des phosphatides du jaune résiduel*

Le tableau XXX et le schéma n° 8 - c montrent que les phosphatides diminuent d'une façon plus marquée à partir du 10^{me} ou 11^{me} jour alors que la concentration au sein des lipides reste voisine de 30 %. On retrouve donc la constatation faite au sujet des glycérides, à savoir que les différentes catégories de lipides sont prélevées par l'embryon, dans des proportions restant toujours égales à elles-mêmes. Les *sphingomyélines* suivent la destinée des phosphatides, puisque leur taux vis-à-vis de ceux-ci reste voisin de 4 à 5 %.

TABEAU XXX

Variations des taux de phosphatides et des taux de sphingomyélines du jaune résiduel

JOURS	PHOSPHATIDES	SPHINGOMYELINES	
	(en g par œuf)	(en g par œuf)	(en p. 100 des phosphatides)
0	1,7	0,066	3,9
6	1,8	0,0735	4,1
7	1,65	0,075	4,6
9	1,65	0,077	4,7
10	1,35	0,064	4,7
11	1,4	0,077	5,5
13	1,3	0,057	4,5
15	1,13	0,06	5,4
17	1,1	0,057	5,2
18	1,1	0,061	5,5
19	0,9	0,043	4,7

F. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIFFERENTS GROUPES DE LIPIDES DU JAUNE RÉSIDUEL

Nous avons déterminé la composition en acides gras des principales catégories de lipides par chromatographie en phase gazeuse.

1° Composition des glycérides

Le tableau XXXI montre qu'à l'exception d'inévitables variations individuelles, il n'y a pas de modification de composition en fonction du temps.

Cette constatation apporte un argument supplémentaire concernant le passage sans modification préalable des glycérides du jaune vers l'embryon et sans catabolisme concomitant ; le peu de variation du taux des acides gras libres (voir plus haut) renforce également cette hypothèse.

2° Composition des phosphatides totaux

Le tableau XXXII montre qu'il n'y pas de variation nette de la composition en acides gras durant l'incubation et que les résultats sont voisins de ceux obtenus à partir des phosphatides embryonnaires.

TABLEAU XXXI
Composition en acides gras des glycérides du jaune résiduel
(résultats en p. 100)

JOURS	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
0	1	27	6,5	6	50	9,5	0	0
2	0,5	26	4	5,5	50,5	12,5	0,5	0,5
5	1	29	4,5	7	46	12,5	0	0,5
7	1	26	5,5	4,5	47,5	15	0,2	0,8
9	0,5	25,5	4	4	52	12,5	0,3	0,7
10	0,5	28	6	6	44	13,5	0	0,5
12	1	28	5,5	5	43	14,5	1	1,5
13	0,3	23	5	4,5	57	9,5	0,3	0,5
14	0,5	29	5,5	5,5	46	11,5	0	1
15	0,5	28,5	6	6	47	11	0	1
16	0,5	25	4	5	52,5	12	0	0,5
17	0,5	23	6,5	5	51	12,5	0	1,5

TABLEAU XXXII

Composition en acides gras des phosphatides du jaune résiduel
(résultats en p. 100)

JOURS	14 : 0	16 : 0	18 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 4
0	0,5	29,5	11,5	3	37,5	13,5	0	4,5
2	0,5	32	8,5	2,5	37	14	0	5
5	0,5	26	11,5	3	37	14	0,5	7
7	0,5	28	8,5	5	39	12	0	7
9	0,5	21	12	3	40	17	1	6,5
10	0,5	31	13,5	3	35	13	0	4
12	0,5	25	13,5	2,5	41	13	0,5	3,5
13	0,5	28	11	4	38	11,5	0,5	6,5
14	0,5	28	7,5	3,5	40	9,5	0	4
15	0,5	29	11	3,5	43	9,5	0,5	3,5
16	0,5	28	11,5	3,5	43,5	9,5	0	3,5
17	0,5	27	11,5	2	41	15,5	0,5	2

G. — CONCLUSION A L'ÉTUDE DES LIPIDES DU JAUNE RÉSIDUEL

En conclusion, les principales modifications peuvent être résumées de la façon suivante :

Les diminutions importantes du taux des lipides totaux n'apparaissent que vers le 12^{me} jour d'incubation ; ces diminutions se font simultanément sur les différentes catégories de lipides, les pourcentages de celles-ci restent sensiblement les mêmes que dans le jaune d'œuf frais ; il n'y a donc pas de prélèvement préférentiel de l'une ou l'autre catégorie. On constate

toutefois en fin de période d'incubation l'apparition de plus en plus importante de *cholestérol estérifié*, l'interprétation de ce phénomène est délicate.

La composition en acides gras des glycérides et des phosphatides du jaune résiduel ne subit guère de modification durant l'incubation et est très voisine de celle des glycérides et des phosphatides embryonnaires ; ce fait montre bien l'adaptation des lipides du jaune d'œuf aux besoins futurs de l'embryon.

H. — VARIATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES DU JAUNE ET DU PLASMA EMBRYONNAIRES

L'utilisation des substances de réserve du jaune a toujours suscité l'intérêt de nombreux auteurs tels REMOTTI (255) en 1927, MORGAN (256) en 1930, RUDNICKI et Coll. (257) en 1954.

Cet intérêt s'est accru depuis que l'on sait que la membrane contenant le jaune devient, au fur et à mesure du développement de l'embryon, de plus en plus apte à absorber ces substances nutritives (SCHJEIDE) (258).

Nous avons donc cherché à préciser et à comparer les variations essentielles du diagramme électrophorétique du jaune et du plasma embryonnaire.

1° Electrophorèse du jaune résiduel

Pour des raisons déjà définies, nous avons été dans l'obligation d'étudier le mélange résiduel homogénéisé qui correspond à un mélange de blanc et de jaune d'œuf. Les variations sont peu significatives sur les électrophorégrammes colorés par le noir soudan ; la large bande lipidique qui correspond à la lipovitelline et à la lipovitellénine diminue progressivement d'intensité, mais ne disparaît pas. Une soudanophilie caractéristique apparaît au niveau d'une fraction rapide qui s'identifie à l'ovalbumine ; il peut évidemment s'agir d'un phénomène de captation d'acides gras « libres » comparable à celle qui se produit au niveau de la sérulalbumine dans le sérum mais on peut évoquer aussi l'existence d'une souillure d'origine sérique (voir plus haut).

2° Electrophorèse du plasma embryonnaire

Comme nous l'avons déjà indiqué, il est possible de ponctionner les vaisseaux extérieurs répartis à la périphérie du sac contenant le jaune résiduel, *dès le 5^{me} jour d'incubation* ; il est également possible de ponctionner les vaisseaux internes de l'embryon et en particulier ceux du cou, *dès le 9^{me} jour d'incubation*.

Dans le premier cas, on récupère un sang très opalescent et dans le second un sérum légèrement opalescent donc moins riche en complexes lipoprotéiques.

On constate :

a) Que le lipidogramme du sang des vaisseaux extérieurs est comparable à celui du jaune résiduel ; la fraction lipoprotéique prédominante possède le même comportement que le complexe lipovitelline-lipovitellénine du jaune.

b) Que le sang des vaisseaux internes a une composition différente ; on y distingue très rapidement deux fractions lipoprotéiques assimilables aux β lipoprotéines et α lipoprotéines décelées dans le sérum de l'animal adulte. L'embryon est donc capable de synthétiser des lipoprotéines sériques particulières (ces travaux confirment ceux de SCHJEIDE (259) et de VANSTONE (260).

En conclusion, les lipoprotéines du jaune se retrouvent dans le sang des vaisseaux extérieurs à l'embryon, mais le sérum de l'embryon lui-même a une composition caractéristique et les lipoprotéines du jaune qui arrivent à l'embryon par un système circulatoire externe, sont transformées en lipoprotéines sériques au niveau du foie.

I. — RECHERCHE DES CORRÉLATIONS ENTRE LIPIDES DE RÉSERVE ET LIPIDES EMBRYONNAIRES

Pour compléter ce bilan, nous avons cherché à établir les corrélations entre l'évolution de deux phénomènes inverses : l'utilisation des lipides de réserve et la synthèse des lipides embryonnaires.

Il nous a tout d'abord paru intéressant de chercher à évaluer les lipides disparus durant l'incubation ; dès le début de ce travail, nous avons en effet émis une hypothèse suivant laquelle une partie importante des lipides du jaune devait servir aux besoins énergétiques de l'embryon, étant donné qu'à défaut de glucides libres, les lipides représentaient la source la plus pratique et la plus adéquate d'éléments riches en énergie et facilement dégradables par un organisme vivant, suivant des réactions cataboliques classiques (hélice de LYNEN et entrée de l'acétyl-coenzyme A dans le cycle de KREBS).

1° Bilan lipidique au cours de l'incubation

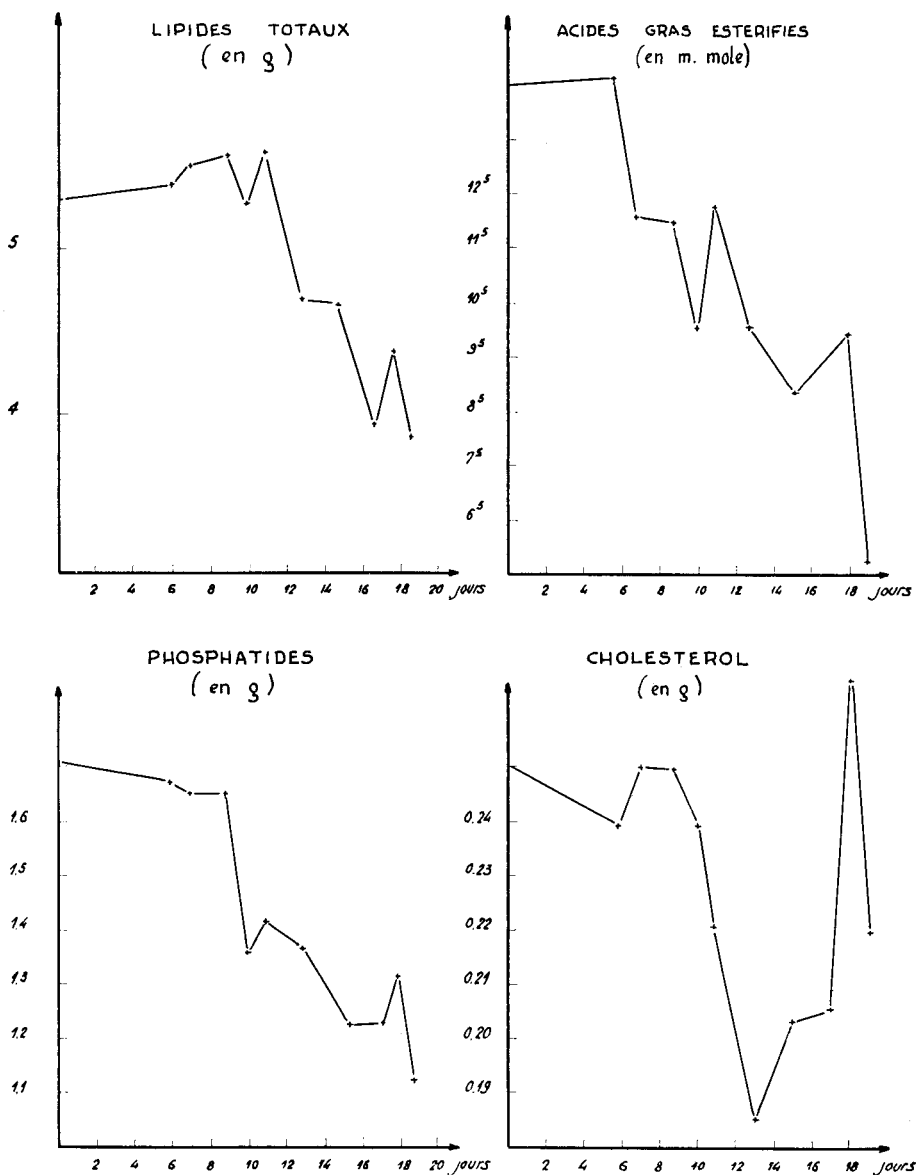
Pour essayer de calculer les pourcentages de lipides disparus, nous avons effectué la somme des lipides de l'embryon et du jaune résiduel, aux différentes époques d'un cycle d'incubation.

Le tableau XXXIII et le schéma n° 9 résument les résultats obtenus.

L'interprétation de ces résultats est évidemment délicate ; tout d'abord, cette forme d'expression des résultats peut comporter un certain nombre d'erreurs (addition des erreurs, impossibilité de tenir compte de la grosseur des œufs, erreur sur la relation entre le jour d'incubation et le développement réel de l'embryon.

SCHEMA N° 9

Variations des lipides de l'ensemble embryon-jaune résiduel



On peut cependant constater :

a) Que les pertes en lipides totaux deviennent sensibles aux environs du douzième jour, époque où le métabolisme de l'embryon se développe.

Ces pertes atteignent 30 % vers le 19^{me} jour, ce qui représente environ 1,75 g de lipides catabolisés par l'embryon en 19 jours ; comme les lipides prélevés durant ce laps de temps représentent environ 2,5 g, on voit que les pertes lipidiques représentent environ 70 % des lipides prélevés par l'embryon en 19 jours. Si l'on considère d'autre part que le poids de l'embryon de 19 jours est de 16 g, on voit que le poids de lipides catabolisés en 19 jours par gramme d'embryon est de 1,76/16 soit environ 110 mg.

TABLEAU XXXIII

Variations lipidiques de l'ensemble embryon-jaune résiduel
durant l'incubation

JOURS	LIPIDES TOTAUX		A.G.E.		PHOSPHA-TIDES		CHOLESTEROL	
	(en g)	(% de perte)	(en mMole)	(% de perte)	(en g)	(% de perte)	(en g)	(% de perte)
0	5,3		13,5		1,7		0,25	
6	5,4		13,4		1,8		0,24	
7	5,5		12	— 11	1,65		0,25	
9	5,6		12	— 11	1,65		0,25	
10	5,24		10	— 26	1,36	— 19,5	0,24	— 4
11	5,6		12,3	— 9	1,42	— 15	0,22	— 12
13	4,7	— 14	10	— 26	1,37	— 19	0,185	— 26
15	4,69	— 14	8,85	— 34	1,23	— 27	0,203	— 18
17	3,92	— 30			1,23	— 27	0,205	— 18
18	4,37	— 23	9,55	— 29,5	1,31	— 22	0,275	+ 10
19	3,83	— 31	5,55	— 59	1,13	— 33	0,22	— 10
A.G.E. = Acides gras estérifiés								

b) Que la variation du taux des acides gras estérifiés, dont le dosage est plus sensible, permet de mieux apprécier le bilan lipidique.

c) Que les pertes en phosphatides évoluent parallèlement à celles des lipides totaux et montrent donc la participation des phosphatides au catabolisme lipidique.

d) Que les variations du cholestérol total sont particulières ; en effet, le déficit est maximum aux environs du 13^{me} jour, puis il s'atténue légèrement vers la fin de la période d'incubation, il semble donc que l'embryon puisse synthétiser une certaine *quantité de cholestérol* à partir d'un certain stade de développement. Cette hypothèse est du reste confirmée par les travaux de STOKES et Coll. (261) qui isolent, à partir d'embryon de 12 à 14 jours, deux composés stéroliques représentant respectivement 2 % et 0,2 % des stérols totaux et qui ne figurent pas dans les stérols du jaune ; de plus, lorsque l'étude est faite 16 heures après l'injection d'acétate marqué (acétate-I-C₁₄), 26 % de l'activité se retrouve dans ces deux composés, et 60 % dans le cholestérol. Ces résultats montrent que l'embryon est capable de synthétiser le cholestérol ; de plus, la structure et l'activité des deux composés précédents suggèrent qu'ils interviennent dans la biosynthèse en tant que précurseurs du cholestérol.

2° Comparaison entre les pourcentages d'acides gras dans le jaune résiduel et dans l'embryon

Pour simplifier la lecture des tableaux et des graphiques, nous n'avons considéré que trois catégories principales d'acides gras, à savoir, les acides gras saturés, monoéthéniques et diéthéniques.

Les tableaux XXXIV et XXXV résument les résultats obtenus dans l'étude des glycérides et des phosphatides.

Sur le schéma n° 10 nous avons indiqué les limites extrêmes des résultats obtenus lors des études faites sur le *jaune d'œuf frais*.

On constate que :

a) Tous les pourcentages se situent approximativement dans les limites de ceux obtenus avec les œufs non incubés, *ce qui montre bien l'adaptation des lipides du jaune aux besoins de l'embryon*.

b) Les courbes de variation des acides gras des lipides du jaune résiduel et de l'embryon sont sensiblement les mêmes ; la seule différence se situe à la fin de la période d'incubation, au niveau des *phosphatides*. En effet, *les phosphatides embryonnaires contiennent un pourcentage plus élevé d'acides gras saturés*.

L'explication de ce fait est simple, puisque l'on sait que les *céphalines* sont plus riches en acide stéarique que les *lécithines*, or, l'embryon dont le cerveau est très développé par rapport aux autres organes, renferme plus de céphalines proportionnellement que le jaune.



3° Relation entre le poids de l'embryon et le poids des lipides du jaune résiduel

Si nous établissons le rapport :

$$Y = \frac{\text{Lipides totaux du jaune résiduel}}{\text{Poids de l'embryon}}$$

nous obtenons le tableau XXXVI :

TABLEAU XXXIV

Etudes comparées des acides gras des glycérides de l'embryon et du jaune résiduel

JOURS	SAT. (en p. 100)		1 Δ (en p. 100)		2 Δ (en p. 100)	
	E	J	E	J	E	J
0		34,5		56		9,5
2		30,5		56		12,5
5	31	34,5	56	53	12	12,5
7	33	32,5	55	52	11,5	15
9	32	30	47	56	16	12,5
10		34,5		50		13,5
12	35,5	34,5	42,5	48	16,5	14,5
13	35	28,5	51	61,5	12	9,5
14	37	35	48	51,5	14	11
15	33,5	35	48,5	53	14,5	11
16	33,5	29,5	50,5	57,5	15,5	12
17		30		56		12,5
SAT. = ensemble : C 14 : 0 + C 16 : 0 + C 18 : 0 1 Δ = ensemble : C 16 : 1 + C 18 : 1 2 Δ = C 18 : 2 E = embryon J = jaune résiduel						

TABLEAU XXXV

Etudes comparées des acides gras des phosphatides de l'embryon
et du jaune résiduel

JOURS	SAT. (en p. 100)		1 Δ (en p. 100)		2 Δ (en p. 100)	
	E	J	E	J	E	J
0		41,5		40,5		13,5
2		41		39,5		14
5	46	38	36,5	40	11	14
7	42,5	37	37	44	14	12
9	42	33,5	39,5	43	11	17
10		45		38		13
12	46	39	34	43,5	13,5	13
13	41	39,5	41,5	42	11	11,5
14	41,5	36	42,5	43,5	12,5	9,5
15	49	40,5	36	46,5	12,5	9,5
16	50,5	41	32,5	47	12	9,5
17		39		43		15,5

SAT. = C 14 : 0 + C 16 : 0 + C 18 : 0
1 Δ = C 16 : 1 + C 18 : 1
2 Δ = C 18 : 2
E = embryon
J = jaune résiduel

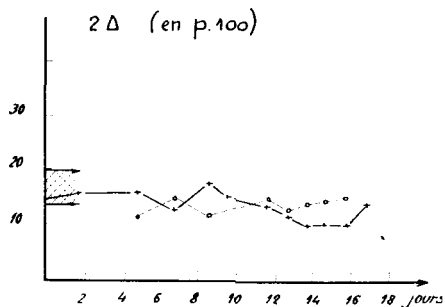
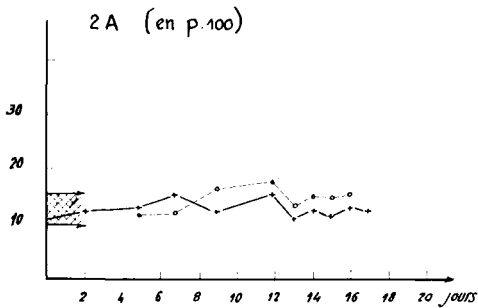
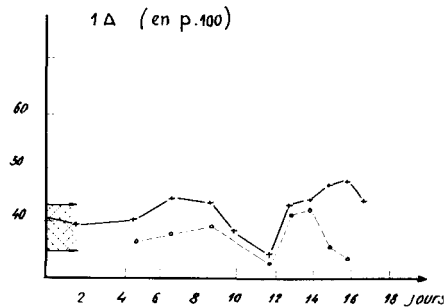
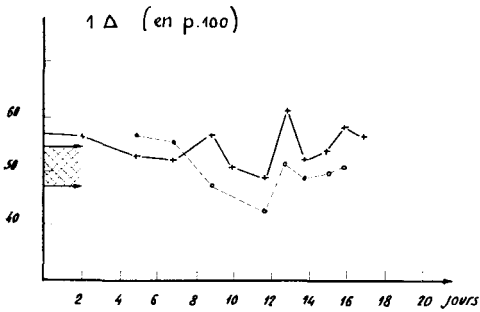
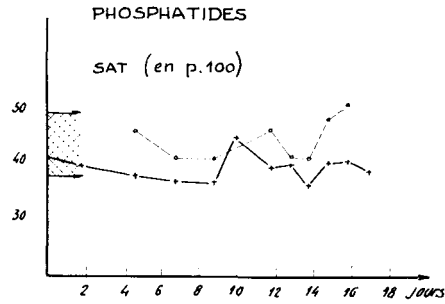
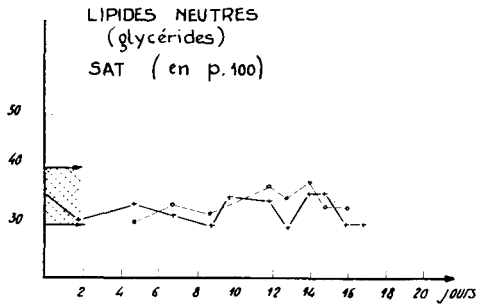
Le schéma n° 11 - a représente les variations de ce rapport entre les 9-19^{me} jours d'incubation et montre que l'on obtient une courbe régulière se présentant comme une branche d'hyperbole ; il est évidemment très difficile de tenter d'expliquer cette variation qui s'apparente étroitement à une hyperbole d'équation :

$$Y = \frac{-0,29 T + 7,9}{T - 7,3}$$

(T = temps en jours)

SCHEMA N° 10

Variations comparées des acides gras des lipides de l'embryon et du jaune résiduel

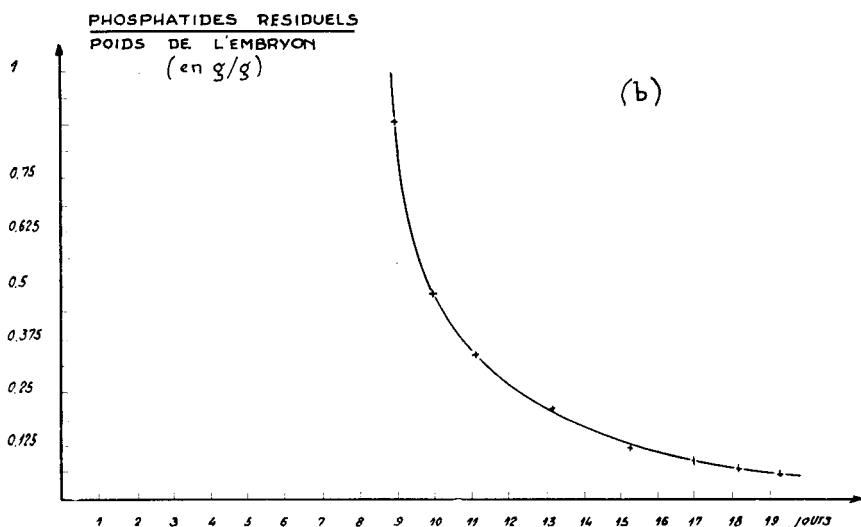
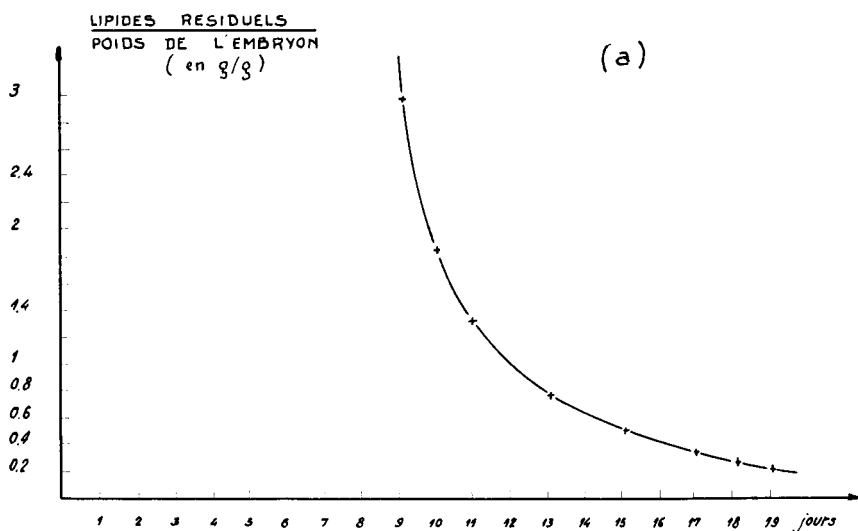


SAT : Acides gras saturés
 1 Δ : Acides gras monoinsaturés
 2 Δ : Acides gras diinsaturés
 + — + Embryon
 Jaune résiduel

 Limites des résultats obtenus avec les œufs frais

SCHÉMA N° 11

Variation en fonction du temps des lipides résiduels rapportés à un gramme d'embryon



Nous pouvons toutefois dire que ce graphique montre qu'il existe une relation entre les lipides résiduels, le poids embryonnaire et le temps, et par conséquent une relation entre les lipides prélevés, le poids embryonnaire et le temps d'incubation.

TABLEAU XXXVI

JOURS	Y (en g par gramme d'embryon)
6	28
7	14,7
9	3
10	1,86
11	1,31
13	0,73
15	0,49
17	0,31
18	0,25
19	0,2

4° Relation entre le poids de l'embryon et le poids des phosphatides du jaune résiduel

Si nous établissons le rapport :

$$Z = \frac{\text{Phosphatides du jaune résiduel}}{\text{Poids de l'embryon}}$$

nous obtenons les résultats suivants (Tableau XXXVII) :

Le schéma n° 11 - b représente les variations de ce rapport et montre que l'on obtient une courbe régulière analogue à celle obtenue précédemment.

Cette similitude montre que les prélèvements lipidiques effectués par l'embryon, sont faits *au prorata des différentes catégories présentes dans le jaune* probablement sous forme de lipoprotéines.

TABLEAU XXXVII

JOURS	Y (en g par gramme d'embryon)
0	infini
6	9,2
7	4,4
9	0,89
10	0,483
11	0,333
13	0,207
15	0,123
17	0,095
18	0,074
19	0,056

Conclusion

Nous nous sommes efforcé, durant ce travail, de dégager au fur et à mesure, les conclusions partielles inhérentes aux différentes parties de l'exposé. Nous voudrions maintenant faire la synthèse de ces diverses considérations et donner un aperçu général de l'étude entreprise.

A. — ÉTUDE STATIQUE DES LIPIDES DE L'ŒUF

Nous avons établi la composition globale du jaune d'œuf de poule (et du jaune d'œuf de pigeon).

Les lipides qui représentent 35 % du poids du jaune frais se répartissent ainsi :

Glycérides	62	%			
Stérides	0,34	%			
Cholestérol libre	4,1	%			
Acides gras libres ...	0,4	%			
Phosphatides	30,5	%	dont {		
			Céphalines	6,7	%
			Lécithines	20,7	%
			Sphingomyélines ...	1,2	%
			Lysolécithines	1,9	%

Nous avons notamment confirmé la présence d'une faible quantité de stérides et avons proposé une nouvelle méthode de dosage de ce groupe de constituants après séparation par chromatographie en couche mince de gel de silice.

Nous avons aussi apporté la preuve de l'existence d'une petite quantité d'acides gras libres (0,4 %).

En utilisant la chromatographie en phase gazeuse, nous avons revu en détail la composition en acides gras des différentes catégories de lipides séparés. Nous avons relevé en effet dans la littérature de nombreuses discordances parmi les résultats fournis par différents auteurs. A la suite de notre expérimentation, nous pouvons présenter la schématisation suivante :

- *Lipides totaux* : On y trouve une prédominance très nette de l'acide oléique (44 %) et l'acide saturé le plus important est l'acide palmitique (27 %).
- *Triglycérides* : Ils représentent la très grande majorité des lipides neutres et ont une composition très voisine de celle des lipides totaux ; la prédominance des pourcentages en acide oléique est encore plus nette (48 %).
- *Phosphatides* : Ils sont généralement plus riches en acides gras saturés. Les céphalines sont plus riches en acide stéarique qu'en acide palmitique.
- *Acides gras libres* : Leur pourcentage d'acide arachidonique est loin d'être négligeable (4 %).
- *Stérides* : Ils se caractérisent par une richesse nette en acide palmitique (32 %), qui égale presque celle en acide oléique (35 %).

En résumé, ce profil de composition est très caractéristique des lipides du jaune d'œuf.

Nous n'avons pas cherché à reprendre systématiquement l'isolement des lipoprotéines du jaune. Nous avons simplement décrit le diagramme électrophorétique du jaune total qui contient par ordre de mobilité décroissante :

- Une fraction de phosvitine.
- Deux fractions glycoprotéiques (livétines α et β).
- La lipovitellénine (ou plus exactement le complexe lipoprotéique de faible densité ou L.D.F.) qui masque en partie la livétine γ .
- La lipovitelline mal séparée de la précédente.

En ce qui concerne la répartition lipidique d'ensemble des deux groupes de lipoprotéines, la lipovitelline contient un taux très important de phosphatides (60 %) tandis que, dans le complexe lipoprotéique de faible densité, la prédominance des glycérides est très nette. Il faut signaler que la composition lipidique de ce complexe lipoprotéique est toutefois variable suivant les modalités de préparation.

La composition en acides gras de la lipovitelline est caractérisée par la haute teneur en acide oléique des glycérides (52 %) et le pourcentage élevé en acide palmitique des phosphatides (32 %).

Signalons que la composition lipidique du blanc d'œuf est pratiquement négligeable.

B. — ÉTUDE DYNAMIQUE DES LIPIDES DU JAUNE RÉSIDUEL ET DE L'EMBRYON DURANT L'INCUBATION

En étudiant les variations du poids de l'embryon en fonction du poids des lipides extraits, on peut distinguer trois périodes essentielles :

— Durant la première période, qui s'étend jusqu'au douzième jour, il apparaît que les lipides puisés dans le jaune soient essentiellement catabolisés à des fins énergétiques.

— Le douzième jour semble constituer un tournant de la vie embryonnaire. A cette date le foie de l'embryon acquiert une importante capacité de synthèse des différents lipides à partir des glycérides du jaune. Durant cette période, le rapport : Poids de lipides/poids de l'embryon augmente.

— La troisième période, observée durant les derniers jours de l'incubation, peut être considérée comme une période d'état.

a) Variation des lipides embryonnaires

En ce qui concerne les *variations quantitatives*, on peut résumer les résultats de la façon suivante :

- Les *glycérides* représentent 60 à 65 % des lipides jusqu'au douzième jour, puis ils baissent brusquement aux environs de 40 à 45 %.
- En ce qui concerne les *stérides*, ceux-ci augmentent plus rapidement que ne se développe l'embryon. L'embryon les synthétise donc activement et constitue une réserve distribuée dans différents organes, le foie notamment. Ces réserves sont ensuite rapidement utilisées après l'éclosion (synthèses hormonales, élaboration de pigments biliaires) ; c'est au niveau des stérides que l'on observe la seule biosynthèse spécifique.
- Quant aux *phosphatides*, leur taux représente 25 à 35 % des lipides jusqu'au onzième jour. Il augmente ensuite brusquement pour atteindre 50 à 55 % et redescendre légèrement aux environs de 40 %. L'évolution de cette variation est évidemment en rapport avec le développement de la capacité biosynthétique du foie de l'embryon vers le onzième jour (travaux de SCHJEIDE).

Dans ce groupe des phosphatides, le pourcentage des sphingomyélines est quatre fois plus important que dans les phosphatides du jaune et l'augmentation du pourcentage des céphalines est également notable.

Nous avons également déterminé la composition en acides gras des groupes qui subissent les variations quantitatives les plus nettes, soit par suite d'un anabolisme important (stérides, phosphatides), soit par suite d'un catabolisme intensif (glycérides).

- Les *stérides* sont très riches en acide oléique (52 %) et contiennent peu d'acide linoléique (19 %) comparativement aux stérides humains (50 %).
- La composition en acides gras des glycérides évolue peu en fonction du temps d'incubation et elle reste très comparable à celle des glycérides du jaune frais.
- Pour les phosphatides totaux, la répartition des acides gras est peu influencée et reste constamment voisine de celle du jaune. Seule, l'augmentation du pourcentage d'acide stéarique est significative et correspond à l'augmentation déjà signalée du pourcentage des céphalines.

b) Variations des lipides du jaune résiduel

Comme nous l'avons déjà signalé, les *variations quantitatives globales* n'apparaissent qu'aux environs du douzième jour : à partir de cette date, les lipides totaux des liquides résiduels diminuent nettement. Les varia-

tions quantitatives des différents groupes peuvent être schématisées de la façon suivante :

- On note une diminution du taux des *glycérides* au 10-11^{me} jour, mais la concentration reste sensiblement constante et représente 65 à 75 % des lipides.
- Le taux de *cholestérol total* subit une variation dans le même sens que la précédente, mais la concentration (4,5 % des lipides) reste aussi constante.
- Les *acides gras libres*, après une phase passagère d'augmentation (hydrolyse des triglycérides) diminuent régulièrement.
- Les *phosphatides* diminuent surtout à partir du 10-11^{me} jour, mais leur concentration relative reste voisine de 30 %.

Cette similitude de comportement des différents groupes de lipides traduit bien *la parfaite adaptation des lipides du jaune aux besoins de l'embryon*.

En ce qui concerne les *variations qualitatives*, on note une baisse plus marquée des céphalines que des lécithines, ce qui correspond du reste à l'inverse du phénomène observé chez l'embryon.

Les pourcentages des acides gras des glycérides et des phosphatides subissent peu de variations en fonction du temps d'incubation et de plus, à quelques légères modifications près, on retrouve les mêmes compositions que dans le jaune frais : *il n'y a donc pas de prélèvement préférentiel des différentes catégories d'acides gras*.

c) Evolution des lipoprotéines sériques

L'étude peut être faite soit sur le sang des vaisseaux extérieurs (à partir du 5^{me} jour) soit sur le sang prélevé au niveau des vaisseaux du cou.

Dans le sang des vaisseaux externes, on retrouve les complexes lipoprotéiques du jaune, tandis que dans celui des vaisseaux internes, on peut identifier deux groupes de lipoprotéines qui sont assimilables aux β et α lipoprotéines du sérum de l'animal adulte.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons cherché à établir les corrélations entre les lipides de réserve et les lipides embryonnaires.

Ainsi le bilan lipidique au 19^{me} jour, présente un déficit de l'ordre de 30 % par rapport aux lipides du jaune frais : ces 30 % ont donc été catabolisés à des fins énergétiques.

Quant aux variations comparées des acides gras constitutifs des lipides du jaune résiduel et de l'embryon, on peut constater que les courbes sont sensiblement les mêmes (schéma n° 14). La seule différence se situe au niveau des phosphatides embryonnaires qui contiennent un pourcentage plus élevé d'acides gras saturés. Cette différence s'explique par la composition de la fraction céphalinique qui provient du cerveau de l'embryon qui est très nettement prédominant.

Enfin, nous avons établi une relation entre le poids de l'embryon et le poids des lipides résiduels ou le poids des phosphatides résiduels. Il est remarquable de constater que ces variations s'expriment toutes les deux par une courbe régulière très proche d'une branche d'hyperbole.

Bibliographie

Les numéros entre crochets qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

- AGNERAY J., PUISIEUX F. et DOURIS R., *Ann. Biol. Clin.*, 1958, 16, 563 [160].
AGNERAY J., PUISIEUX F., et WEPIERRE J., *Ann. Biol. Clin.*, 1959, 17, 178 [161].
ALDERTON G. et FEVOLD H.L., *Arch. Biochem.*, 1945, 8, 415 [6, 97].
ALLEN R.J.C., *Biochem. J.*, 1940, 34, 858 [178].
ANSELL G.B. et SPANNER S., *Biochem. J.*, 1961, 79, 176 [185].
BANDURSKI R.S. et AXELROD B., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 405 [230].
BARRETO R.C.R. et MANO D.B., *Clin. Chim. Acta*, 1961, 6, 887 [172].
BARRON E.J. et HANAHAN D.J., *J. Biol. Chem.*, 1958, 231, 493 [116].
BASU ROY CHOUDHURY R. et REISER R., *J. Nutrition*, 1959, 68, 457 [12].
BEERTHUIS R.K. et KEPPLER J.G., *Nature*, 1957, 179, 731 [202].
BEERTHUIS R.K., DIJKSTRA G., KEPPLER J.G. et RECOURT J.H., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1959, 72, 616 [203].
BERNARDI G. et COOK W.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 44, 86 [56, 67, 94].
BERNARDI G. et COOK W.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 44, 96 [63, 79].
BIRAN L.A. et BARTLEY W., *Biochem. J.*, 1961, 79, 159 [125].
BISERTE G. et HAVEZ R., *Ann. Biol. Clin.*, 1960, 18, 687 [224].
BLIGH E.G. et DYER W.J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 911 [173].
BLIX G., *Mikrochim. Acta*, 1937, I, 75 [162].
BLIX G., *Biochem. Z.*, 1940, 305, 145 [163].
BLOOR W., *J. Biol. Chem.*, 1914, 17, 377 ; 1915, 22, 133 ; 1928, 77, 53, [100, 101, 102].
BOLDINGH J., *Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas)*, 1950, 69, 247 [194].
BORGSTRÖM B., *Acta Physiol. Scand.*, 1952, 25, 101 et 111 [113, 114].
BÖTTCHER C.J.F., WOODFORD F.P., BOELSMA-VANHOUTE E. et VAN GENT C.M., *Rec. Trav. Chim.*, 1959, 78, 794 [118, 124, 169, 231, 244].
BRIGGS A.P., *J. Biol. Chem.*, 1922, 53, 13 [183].
BURLEY R.W. et COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1961, 39, 1295 [59, 80].
BURROWS S., GRYLLS F.S.M. et HARRISON J.S., *Nature*, 1952, 170, 800 [229].
CARLSON A. et WADSTRÖM B., *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 197 [167].
CERIOTTI G., *Clin. Chim. Acta*, 1957, 2, 351, [225].
CHARGAFF E., *J. Biol. Chem.*, 1942, 142, 491 [4].
COOK R.P., *Cholestérol* (Un vol. 542 pages) Académie Press, N.Y. 1958 [27].
COPPOCK J.B.M., DANIELS N.W.R., GRESHAM G.A. et HOWARD A.N., *J. Athérosclerosis Res.*, 1962, 2, 139 [16, 21].

- CORMIER M., JOUAN P. et GIRRE L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 1037 [133].
- CRAIG B.M. et MURTY N.L., *Can. J. Chem.*, 1958, 36, 1297 [209].
- CRAWFORD N., *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, 357 [156].
- CROPPER F.R. et HEYWOOD A., *Nature*, 1953, 172, 1101 [200].
- CRUICKSHANK E.M., *Biochem. J.*, 1934, 28, 965 [15].
- DELSAL J.L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, 26, 99 [104].
- DELSAL J.L. et MANHOURI H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 1047 [177].
- DELSAL J.L. et MANHOURI H., *Biochemistry of lipids* (POPJAK ed.), Pergamon Press, NORWICH G.B., 1960, page 36 [III].
- DIECKERT J.W. et REISER R., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1956, 33, 123 [131].
- DIJKSTRA G., KEPPLER J.G. et SCHOLS J.A., *Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas)*, 1955, 74, 805 [206].
- DOLE V.P., *J. Clin. Invest.*, 1956, 35, 150 [170].
- DOWNING D.T., KRANZ Z.H. et MURRAY K.E., *Australian J. Chem.*, 1960, 13, 80 [216].
- DUTTON H.J. et REIBOLD C.L., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1948, 25, 120 [192].
- EVANS R.J. et BANDEMER S.L., *Poultry Sci.*, 1961, 40, 597 [18, 23, 40, 54, 58, 74, 76, 82].
- EVANS R.J. et BANDEMER S.L., *J. Agr. Food Chem.*, 1957, 5, 868 [70].
- FEIGENBAUM A.S. et FISHER H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 79, 302 [10].
- FEULGEN R., FELLER P. et ANDRESEN G., *Ber. Oberhess. Ges. Nat. u. Heilk.*, 1949, 24, 270 [46].
- FEVOLD H.L., *Advances in Protein Chemistry* (Acad. Press, N.Y.) 1951, 6, 187 [3].
- FEVOLD H.L. et LAUSTEN A., *Arch. Biochem.*, 1946, II, I [7, 99].
- FILLERUP D.L. et MEAD J.F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, 83, 574 [105, 117].
- FISHER H. et LEVEILLE G.A., *J. Nutrition*, 1957, 63, 119 [20].
- FISKE C.H. et SUBBAROW Y., *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375 [176].
- FLICKINGER R.A. et ROUNDS D.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 22, 38 [86].
- FOLCH J. et VAN SLYKE D., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1939, 41, 514 [107].
- FOLCH J., LEES M. et STANLEY G.H.S., *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497 [106].
- FREEMAN N.K., LINDGREN F.T., N.G. YOOK C. et NICHOLS A.V., *J. Biol. Chem.*, 1957, 227, 449 [120].
- GAGE S.H. et FISH P.A., *Ameri. J. Anat.*, 1924, 34, I [13].
- GARLAND P.B. et RANDLE P.J., *Nature*, 1962, 196, 987 [166].
- GARRIGAN O.W. et CHARGAFF E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 70, 452 [247].
- GAUJOUX E. et KRIJANOWSKY A., *C.R. Soc. Biol. (PARIS)*, 1932, 110, 1083 [237].
- GORRINGE J.A.L., *Clin. Chim. Acta*, 1957, 2, 353 [221].
- GRIGAUT A., *C.R. Soc. Biol.*, 1910, 68, 791 [159].
- HAAG W., *Ann. Biol. Clin.*, 1956, 14, 465 [223].
- HAMBURGER V. et HAMILTON H.L., *J. Morphol.*, 1951, 88, 49 [248].
- HAMILTON H.L., *Lillie's development of the chick* (HOLT ed), N.Y., 1953, page 74 [246].
- HANES C.S. et ISHERWOOD F.A., *Nature*, 1949, 164, 1107 [150, 228].
- HARRAP F.E.G., *Analyst*, 1960, 85, 452 [73].
- HAWKE J.C., *Biochem. J.*, 1959, 71, 588 [39].
- HERB S.F., RIEMENSCHNEIDER R.W. et NICHOLS P.L., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1949, 26, 371 ; 1950, 27, 325 ; 1951, 28, 347 [196].

- HERB S.F. et RIEMENSCHNEIDER R.W., *Anal. Chem.*, 1953, 25, 953 [195].
- HEREMANS J. et VAERMAN J.P., *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, 430 [227].
- HEVESY G.C., LEVI H.B. et REBBE O.H., *Biochem. J.*, 1938, 32, 2147 [91].
- HIRSCH J. et AHRENS E.H., *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 311 [119].
- HOFMANN A.F., *Anal. Biochem.*, 1962, 3, 145 [141].
- HORLICK I. et O'NEIL J.B., *Lancet*, 1958, 275, 243 [14].
- HORNSTEIN I., ALFORD J.A., ELLIOTT L.E. et CROWE P.F., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 540 [168].
- INOUE Y. et NODA M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 76, 271 [38].
- INSULL W. Jr et AHRENS E.H., *Biochem. J.*, 1959, 72, 27 [103].
- JAMES A.T., *Am. J. Clin. Nutrition*, 1958, 6, 595 [211].
- JAMES A.T. et MARTIN A.J.P., *Biochem. J.*, 1952, 50, 679 [198].
- JAMES A.T. et WEBB J.P.W., Butterworths Scientific Publications, LONDRES 1958 [19].
- JAMES A.T. et MARTIN A.J.P., *Biochem. J.*, 1956, 63, 144, [201, 205].
- JARRIER M. et POLONOVSKI J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 495 [154].
- JATZKEWITZ H. et MEHL E., *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1960, 320, 251 [149, 151].
- JOUBERT F.J. et COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1958, 36, 389 [62, 93].
- JUKES T.H. et KAY H.O., *J. Nutrition*, 1932, 5, 81 [2].
- KAUCHER M., GALBRAITH H., BUTTON V. et WILLIAMS H.H., *Arch. Biochem.*, 1944, 3, 203 [5, 26].
- KAUFMANN H.P. et NITSCH W.H., *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1954, 56, 154 et 1956, 58, 234 [190, 191].
- KAUFMANN H.P. et SCHMIDT O., *Fette u. Seifen*, 1940, 47, 294 [122].
- KAUFMANN H.P., MAKUS Z. et DEICKE F., *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, 63, 235 [139].
- KAZAKOV K.S. *Uchenye Zapiski Kazan Gosudart Vet. Inst.*, 1956, 64, 199 [50].
- KEPPLER J.G., *The Chem. and Technol. of edible oils and fats* (DEVINE ed) Pergamon Press, GLASGOW, 1961, page 79 [204].
- KING E.J., *Biochem. J.*, 1932, 26, 292 [179].
- LAKSHMINARAYANA G., KRUGER F.A., CORNWELL D.G. et BROWN J.B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 88, 318 [110].
- LEA C.H., RHODES D.N. et STOLL R.D., *Biochem. J.*, 1955, 60, 353, [36, 126, 130].
- LEES T.M. et DE MURIA P.J., *J. Chromato.*, 1962, 8, 108 [148].
- LEVY A.J. et GEORGIAKAKIS N., *Pflüg. Arch. Ges. Physiol.*, 1908, 124, 585 [238].
- LIEBERMANN C. et BURCHARD H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1885, 18, 1803 [158, 234].
- LIPSKY S.R., *Chem. Eng. News*, 1958, 36, 48 [210].
- LIPSKY S.R., LANDOWNE R.A. et LOVELOCK J.E., *Anal. Chem.*, 1959, 31, 852 [212, 213].
- LIS E.W., TINOCO J. et OKEY R., *Anal. Biochem.*, 1961, 2, 100 [115].
- LUDDY F.E., BARFORD R.A. et RIEMENSCHNEIDER R.W., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1960, 37, 447 [215].
- MALINS D.C. et MANGOLD H.K., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1960, 37, 576 [136, 152].
- MARINETTI G.V. et STOTZ E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6668 [129] ; *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 168 [132] et 1960, 37, 571 [135].
- MARINETTI G.V., ERBLAND J. et KOCHEN J., *Fred. Proc.*, 1957, 16, 837 [134].

- MARTIN W.G., TURNER K.J. et COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 1197 [61].
- MARTIN W.G., VANDEGAER J.E. et COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1957, 35, 241 [241].
- MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M., *Biochem. J.*, 1941, 35, 1358 [197].
- Mc CULLY K.A., CHI CHING MOK et COMMON R.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1962, 40, 937 [72].
- Mc CULLY K.A., MAW W.A. et COMMON R.H., *Can J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 1457 [71].
- Mc INDOE W.M., *Biochem. J.*, 1959, 73, 45 P [53, 75] ; 1958, 70, 8 P [48] ; 1959, 72, 153 [84] ; 1961, 80, 41 P [242].
- Mc KINLEY W.P., OLIVIER W.F., MAW W.A. et COMMON R.H., *Prod. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, 84, 346 [68] et *Tenth World's Poultry Congress*, section papers, Dept. of Agriculture for Scotland (EDINBURGH), 1954 page 139 [69].
- MECHAM D.K. et OLCOTT H.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 3670 [9].
- MEDUSKI J., *Bull. Aca. Polo. Sci.*, 1958, 6, 455 [49].
- METCALFE L.D., *Nature*, 1960, 188, 142 [199].
- METCALFE L.D. et SCHMITZ A.A., *Anal. Chem.*, 1961, 33, 363 [218, 219].
- MICHALEC C., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1958, 28, 212 [189].
- MICHALEC C., SULC M. et MESTAN J., *Nature*, 1962, 193, 63 [144].
- MILLER W.L. Jr. et BAUMANN C.A., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1954, 85, 561 [29].
- MORGAN E.J., *Biochem. J.*, 1930, 24, 410 [256].
- MULDNER H.G., WHERRETT J.R. et CUMINGS J.N., *J. Neurochem.*, 1962, 9, 607 [140].
- NAKANISHI K., BHATTACHARYA B.K. et FIESER L.F., *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 4415 [28].
- NEEDHAM J., *Chem. Embryology*, Cambridge university press. 1931, I, 287 [1].
- NICHOLS C.W., LINDSAY S. et CHAIKOFF I.L., *J. Athérosclérosis Res.*, 1961, I, 133 [251].
- ORR C.H. et CALLEN J.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 249 [207] et *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1959, 72, 649 [208].
- PENNOCK J.F., NEISS G. et MAHLER H.R., *Biochem. J.*, 1962, 85, 530 [236, 245].
- PERILÄ O., *Acta Chem. Scand.*, 1955, 9, 864 [232].
- POLONOVSKI J., ETIENNE J., PAYSANT M. et PETIT M., *Ann. Biol. Clin.*, 1959, 17, 186 [112, 127].
- PRIVETT O.S., BLANK M.L. et LUNDBERG W.O., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1961, 38, 312 [137].
- RAMASARMA T., JAYARAMAN J. et SARMA P.S., *Naturwissenschaften*, 1961, 48, 102 [239].
- REISER R., *J. Nutrition*, 1951, 44, 159 [25, 33].
- REMOTTI E., *Atti Lincei*, 1927, 5, 510 [255].
- RHODES D.N., *Biochem. J.*, 1958, 68, 380 [24, 41].
- RHODES D.N. et LEA C.H., *Nature*, 1956, 177, 1129 [II, 34] et *Biochem. J.*, 1957, 65, 526 [35].
- RIEMENSCHNEIDER R.W., HERB S.F. et NICHOLS P.L., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1949, 26, 371 [193].
- RIZZOLI C. et GLIOZZI M.A., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1955, 31, 426 [226].
- ROBINSON N. et PHILLIPS B.M., *Clin. Chim. Acta.*, 1963, 8, 385 [145] et 832 [146].
- ROMANOFF A.L., et ROMANOFF A.J., *The Avian Egg*, (Willey ed) N.Y. 1949, page 337 [235].
- ROUSER G., MARINETTI G.V., WITTER R.F., BERRY J.F. et STOTZ E., *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 485 [128].

- RUDNICKI D., MELA P. et WAELSCH H., *J. Exp. Zool.*, 1954, 126, 297 [257].
- RUGGIERI S., *Nature*, 1963, 193, 1882 [220].
- SCHJEIDE O.A., *Growth*, 1956, 20, 195 [92] et *Progress in the chemistry of fats and other lipids* (HOLMAN ed.) Pergamon Press, N.Y., 1963, 6, 253 [81, 83, 85, 89, 249, 250, 253, 258, 259].
- SCHJEIDE O.A., RAGAN N. et SIMONS S., *Radiation Res.* 1958, 9, 327 [90].
- SCHJEIDE O.A. et URIST M.R., *Science*, 1956, 124, 1242 [87] et *Exp. Cell. Res.*, 1959, 17, 84 [57, 78, 88].
- SCHLENK H. et GELLERMAN J.L., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 1412 (217).
- SCHMIDT G., BENOTTI J., HERSHMAN B. et THANNHAUSER S.J., *J. Biol. Chem.*, 1946, 166, 505 [175, 184].
- SCHMIDT G., BESSMAN M.J., HICKEY M.D. et THANNHAUSER S.J., *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 1027 [52].
- SCHRADE W., BIEGLER R. et BÖHLE E., *J. Athérosclérosis Res.*, 1961, 1, 47 [44].
- SEARCY R.L. et BERGQUIST L.M., *Clin. Chim. Acta*, 1960, 5, 192 [157].
- SHEPARD C.C. et HOTTLE G.A., *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 349 [8].
- SHORLAND F.B., *New Zealand J. Sci. Techno.*, 1951, 33, 224 [22, 32].
- SNYDER F. et STEPHENS N., *Anal. Biochem.*, 1962, 4, 128 [143].
- SPERRY W., *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 1942, 14, 88 [180].
- STEPP W., FEULGEN R. et VOIT K., *Biochem. Z.*, 1927, 181, 284 [45].
- STEWART R.D., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1954, 32, 679 [164].
- STOFFEL W., CHU F. et AHRENS E. Jr., *Anal. Chem.*, 1959, 31, 307 [214].
- STOKES W.M., FISH W.A. et HICKEY F.C., *J. Biol. Chem.*, 1956, 220, 415 [31, 261].
- SUGANO H., *J. Biochem. (Japon)*, 1958, 45, 393 [64, 95] ; 1959, 46, 549 [65] ; 1959, 46, 417 [66].
- SUGANO H. et WATANABE I., *J. Biochem. (Japon)*, 1961, 50, 473 [55, 77, 96].
- SVANBORG A. et SVENNERHOLM L., *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, 443 [174].
- SWAHN B., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1953, 4, 98 [222].
- SYLVESTER N.D., AINSWORTH A.N. et HUGHES E.B., *Analyst*, 1945, 70, 295 [123].
- TATTRIE N.H., *J. Lipid Res.*, 1959, 1, 60 [37].
- TERROINE E.F., et BELIN P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 9, 1074 [17].
- THIELE O.W., *Z. Physiol. Chem.*, 1955, 299, 151 [47].
- THUILLIE M.J., *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1961, 1, 98 [109].
- TSUJI F.J., BRIN M. et WILLIAMS H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, 56, 290 [51, 252, 254].
- TURNER K.J. et COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1958, 36, 937 [60].
- VACIKOVA H., FELT V. et MALIKOVA J., *J. Chromato.*, 1962, 9, 301 [142].
- VALDIGUIE P. et DOUSTE BLAZY L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 1035 [42].
- VANDEGAER J.E., REICHMAN M.E. et COOK W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 62, 328 [98].
- VAN HANDEL E., *J. Atherosclerosis Res.*, 1961, 1, 121, [186].
- VANSTONE W.E., MAW W.A. et COMMON R.H., *Can J. Biochem. Physiol.*, 1955, 33, 891 [260].
- WAGNER H., ABISCH L. et BERNHARD K., *Helv. Chim. Acta*, 1955, 38, 1536 [233].
- WAGNER H., HÖRHAMMER L. et WOLFF P., *Biochem. Z.*, 1961, 334, 175 [138 153].
- WAREMBOURG H., BISERTE G., LEKIEFFRE J. et SEZILLE G., *Presse Médicale*, 1963, 46, 2184 [43, 121, 171, 240].

- WHEELDON L.W., BRINLEY M. et TURNER D.A., *Anal. Biochem.*, 1962, 4, 433 [165].
- WHERRETT J.R. et CUMMING J.N., *Biochem. J.*, 1963, 86, 378 [147].
- WIJS J.J., *J. Soc. Chem. Ind.*, 1898, 17, 698 [188].
- WILLIAMS J., *Biochem. J.*, 1962, 83, 346 [243].
- WINDAUS A. et STANGE O., *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 244, 218 [30].
- WREN J.J. et MITCHELL H.K., *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2823 [108].
- YASUDA H., *J. Biol. Chem.*, 1931, 94, 401 [187].
- ZAK B., *Am. J. Clin. Path.*, 1957, 27, 538 [155].
- ZILVERSMIT D.B., *Standard methods of clinical chemistry*, (Acad. Press, N.Y.) 1958, II, 132 [181].
- ZILVERSMIT D.B. et DAVIS A.K., *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, 35, 155 [182].

Table des matières

	Pages
INTRODUCTION	9
 Première Partie 	
CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES LIPIDES ET LES LIPOPROTEINES DU JAUNE D'ŒUF DE POULE	
A. — COMPOSITION GENERALE DU JAUNE	11
I. Principaux composants macromoléculaires	11
II. Travaux concernant la composition lipidique	12
a) Lipides totaux	13
b) Glycérides	13
c) Stérides et stérols	14
d) Phosphatides	14
Conclusion	17
III. Travaux concernant les lipides de l'œuf en incubation...	18
Conclusion	19
IV. Travaux concernant les lipoprotéines du jaune	19
a) Méthodes de fractionnement	19
b) Méthodes d'études électrophorétiques	21
c) Composition et structure	23
Conclusion	24
B. — COMPOSITION GENERALE DES LIPOPROTEINES DE L'EM- BRYON	25
I. Lipoprotéines du sang embryonnaire	25
II. Relations entre les lipoprotéines sériques de la poule en période de ponte et celles du jaune et du sérum d'embryon.	26
Conclusion	27

LES METHODES D'ANALYSE

	Pages
I. — PREPARATION DES LIPOPROTEINES DU JAUNE	29
II. — METHODES D'EXTRACTION DES LIPIDES	30
a) Méthode de THUILLIE	30
b) Méthode de FOLCH	30
c) Méthode au méthylal-méthanol	31
III. — METHODES DE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES	31
a) Chromatographie sur colonne	32
1) Séparation des classes de lipides	32
2) Fractionnement des phosphatides	33
b) Chromatographie en couche mince	34
1) Théorie succincte	34
2) Préparation des chromatoplaques	34
3) Méthodes de révélation	35
4) Chromatographie des lipides neutres	36
5) Chromatographie des phosphatides	36
IV. — DOSAGE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS LIPIDIQUES ..	37
a) Acides gras estérifiés	37
b) Cholestérol	38
c) Glycérol	39
d) Acides gras libres	42
e) Phosphore lipidique	43
f) Sphingomyélines	45
V. — ANALYSE DES ACIDES GRAS DES DIVERSES CLASSES DE LIPIDES	45
b) Principales méthodes utilisables	45
a) Chromatographie en phase vapeur	46
1) Généralités	46
2) Comparaison entre phase polaire et apolaire	47
3) Méthodes de méthylation	48
4) Méthode personnelle de méthylation	49

	Pages
5) Chromatographie en phase vapeur	50
α Principe	50
β Technique utilisée	50
VI. — ETUDES ELECTROPHORETIQUES DES LIPOPROTEINES ..	51

Troisième Partie

TRAVAUX PERSONNELS

I. - ETUDE GENERALE DE LA COMPOSITION DU JAUNE

A. — COMPOSITION LIPIDIQUE GLOBALE	54
1) Etude de la composition globale	54
2) Identification des acides gras libres	54
3) Recherche et dosage des stérides	55
4) Etude des phosphatides	57
a) Chromatographie en couche mince	57
b) Chromatographie sur colonne	58
5) Récapitulation de la composition lipidique	59
B. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIFFERENTS LI- PIDES	51
1) Lipides neutres totaux et phosphatides	61
2) Principaux composants des phosphatides	65
3) Principaux composants des lipides neutres	66
4) Récapitulation	68
C. — PROTEINES ET LIPOPROTEINES DU JAUNE	69
1) Etude électrophorétique	69
2) Etude des lipides des lipoprotéines	71
D. — COMPOSITION LIPIDIQUE DU BLANC D'ŒUF	73

II. - ETUDE DYNAMIQUE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DU JAUNE RESIDUEL ET DE L'EMBRYON DURANT L'INCUBATION	74
A. — PROTOCOLE D'ETUDE	74
1) Collection du jaune résiduel	74
2) Extraction des lipides du jaune et de l'embryon	74
3) Recueil du sang embryonnaire	75
B. — PRINCIPAUX LIPIDES EMBRYONNAIRES	75
1) Lipides totaux	75
2) Variations des groupes de lipides	79
a) Acides gras libres et glycérides	79
b) Cholestérol libre et estérifié	80
c) Phosphatides	81
C. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES	84
1) Stérides	84
2) Glycérides	85
3) Phosphatides	86
D. — CONCLUSION A L'ETUDE DES LIPIDES EMBRYONNAIRES.	86
E. — PRINCIPAUX LIPIDES DU JAUNE RESIDUEL	87
1) Lipides totaux	87
2) Variations des groupes de lipides	87
a) Acides gras libres et glycérides	88
b) Cholestérol total et estérifié	91
c) Phosphatides	92
F. — COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIVERS GROUPES DE LIPIDES DU JAUNE RESIDUEL	93
1) Glycérides	93
2) Phosphatides	93
G. — CONCLUSION A L'ETUDE DES LIPIDES DU JAUNE RE- SIDUEL	94

H. — VARIATIONS ELECTROPHORETIQUES DU JAUNE ET DU PLASMA EMBRYONNAIRE	95
I. — CORRELATIONS ENTRE LIPIDES DE RESERVE ET LIPIDES EMBRYONNAIRES	96
1) Bilan lipidique en cours d'incubation	96
2) Comparaisons entre les pourcentages d'acides gras des lipides du jaune résiduel et de l'embryon	99
3) Relation entre le poids de l'embryon et le poids des lipides résiduels	100
4) Relation entre le poids de l'embryon et le poids des phosphatides résiduels	104

CONCLUSIONS GENERALES	107
BIBLIOGRAPHIE	111
TABLE DES MATIERES	117



Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté :

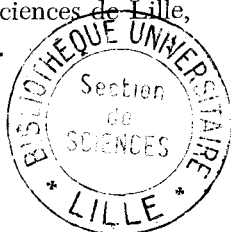
Etude Comparative des Protéines du Jaune d'Oeuf



Vu et approuvé :

Lille, le 23 mars 1964.

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Lille,
P. PARREAU.



Vu et permis d'imprimer :

Lille, le 27 mars 1964.

Le Recteur de l'Académie de Lille,
G. DEBEYRE.

Imp. CROUAN & ROQUES

L I L L E — P A R I S
